



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“Determinación del potencial antihipertensivo de 6-hidroxi-flavona y su
mecanismo de acción funcional”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA
P R E S E N T A
JANNETH ALEXIA CARRILLO RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO
CO- TUTOR: M.F EMMANUEL GAONA TOVAR

CUERNAVACA, MORELOS. MÉXICO

A mis padres, Yan y Fortino por su amor y apoyo incondicional, por enseñarme el valor del esfuerzo y la constancia. Me han dado todo lo que son y más... Los amo infinitamente.

A mis dos ángeles, Alvarito y Hermi, todos los días de mi vida me esfuerzo para que se sientan orgullosos de mi desde el cielo, los amo y extraño.

A mi maestro de vida, José Alonso Valderrama, por acompañarme en el camino, por confiar en mí, por darme la oportunidad de aprender de él, por respaldarme ante cualquier cosa y rescatarme cuando me encuentro perdida. Nuestra filosofía es posiblemente incomprensible porque cada uno de nosotros somos extraordinariamente únicos, nuestro común denominador es nuestra batalla del bien, derrotando al mal. Mi agradecimiento y amor son infinitos.

A mi compañera de vida desde tiempos inmemorables y mi alma gemela, Jey... Estamos unidas de una manera única y mágica y soy muy afortunada. Te amo, gemela malvada.

A mis mejores amigos, Miguel. M, Iriana. A, Jeni. P, Fer. T, Consuelo. A, Ignacio. S, Freddy. G, se que nuestro amor es latente pero inquebrantable.

A mi querido Ing. investigador Jorge Luis S, siempre tengo la certeza de que tu opinión muy valiosa para mí, estará acompañada de prudencia, sensatez y cariño. Gracias por leerme, por escucharme y apoyarme en este proyecto. Esto es un logro de los dos.

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios Universidad Autónoma del Estado de Morelos y Facultad de Farmacia.

Al proyecto de Conacyt Ciencia Básica A1-S- 13540.

*En el modo de ser, la dicha depende de amar,
compartir y dar.*

Ab imo pectore ...

CONTENIDO

ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Generalidades	2
II.2 Clasificación de la hipertensión arterial según la organización mundial de la salud (OMS, 2019)	2
II.3 Regulación de la presión arterial	6
II.4 Tratamiento	9
II.5 Flavonoides	14
II.6 Estudios previos	17
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
V.1 Objetivo general	21
V.2 Objetivos particulares	21
VI. METODOLOGÍA	22
VI.1 Evaluaciones farmacológicas	22
VI.2 Análisis estadístico	28
VI.3 Determinación del efecto antihipertensivo del compuesto 6- hidroxiflavona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)	28
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VII.1 Determinación del efecto vasorrelajante del compuesto 6-hidroxiflavona en anillos de aorta aislada de rata	30
VII.2 Determinación del mecanismo de acción funcional	31

VII.3 Determinación del efecto antihipertensivo en un modelo <i>in vivo</i> de 6-Hidroxi flavona en ratas SHR.	43
VIII. CONCLUSIONES	47
IV. BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión arterial. Recuperado de (OMS,2019).	2
Tabla 2. Clasificación de la Hipertensión arterial. Asociación Norteamericana del Corazón: JNC 8. Recuperado de (Velásquez <i>et al.</i> , 2005)	3
Tabla 3. Clasificación de la Hipertensión arterial. Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología. Recuperado de (B. Williams <i>et al.</i> , 2019). ..	3
Tabla 4. Medicamentos utilizados para el tratamiento de la hipertensión arterial, por mecanismo de acción y efecto Farmacológico.	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Anatomía de una arteria: imagen tomada y modificada de (Chen <i>et al.</i> , 2019) .	5
Figura 2. Esquema de la relajación del músculo liso por medio del óxido nítrico, tomado de (Katzung <i>et al.</i> , 2012).	9
Figura 3. Tratamiento no farmacológico indicado en la hipertensión arterial (figura propia).	10
Figura 4. Ruta metabólica del metabolito flavona. (Esquema propia).....	14
Figura 5. Estructura base de los flavonoides.	15
Figura 6. Estructura del compuesto flavonoide 6-hidroxi flavona. Tomado y modificado de (Torres Piedra <i>et al.</i> , 2011).	18
Figura 7. Esquema representativo de la evaluación del efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata contraídos con NA 0.1 μ M.....	24
Figura 8. Determinación del mecanismo de acción del compuesto 6-hidroxi flavona dependiente de endotelio con los inhibidores L-NAME y ODQ.....	25
Figura 9. Participación de los receptores α -adrenérgicos en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.....	26
Figura 10. Participación de los receptores α -adrenérgicos en anillos de aorta aislada de rata con endotelio.....	27

Figura 11. Participación de la apertura de canales de K ⁺ en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.....	28
---	----

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Determinación del efecto vasorrelajante dependiente de la concentración del compuesto 6-hidroxi flavona en presencia y ausencia de endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni **p<0.01 ***p<0.001. 6-Hidroxi flavona e+ vs 6-Hidroxi flavone e-.....	30
Gráfica 2. Determinación del efecto vasorrelajante de 6- hidroxiflavona en presencia de inhibidores L-NAME [2.66 μM] y ODQ [1μM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni. 6-OH Flavona Vs 6-OH Flavona + L-NAME *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. 6-OH Flavona Vs 6-OH Flavona + ODQ °p<0.05, °°p<0.001.....	33
Gráfica 3. Determinación del efecto vasorrelajante de 6- hidroxiflavona en presencia del inhibidor ODQ [1μM] en anillos de aorta aislada sin endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni.	34
Gráfica 4. Determinación del efecto contráctil de NA en anillos de aorta aislada sin endotelio, en presencia y ausencia de la CE50 [198.47 μM] de 6- hidroxiflavona. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni ***p<0.001.....	36
Gráfica 5. Determinación del efecto contráctil de CaCl ₂ en anillos de aorta aislada sin endotelio, en presencia y ausencia de la CE50 de 6- hidroxiflavona. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni ***p<0.001.....	39
Gráfica 6. Determinación del efecto vasorrelajante de 6- hidroxiflavona en presencia del inhibidor de canales de K ⁺ tetraetilamonio (TEA). ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni **p<0.01 ***p<0.001.....	42
Gráfica 1. Medición de la presión sistólica en ratas SHR en un modelo <i>in vivo</i>	41
Gráfica 2. Medición de la presión diastólica en ratas SHR en un modelo <i>in vivo</i>	42
Gráfica 3. Medición de la Frecuencia cardiaca en ratas SHR en un modelo <i>in vivo</i>	42

ABREVIATURAS

6-OHF	6-hidroxi flavona
μM	Micromolar
AC	Adenilciclasa
ACC	American College of Cardiology
AHA	American Heart Association
ARA II	Antagonistas de Receptores de Angiotensina II
BK_{Ca}	Canales de potasio de larga conductancia
Ca²⁺	Ion Calcio
Ca-CaM	Complejo calcio/calmodulina
CaCl₂	Cloruro de calcio
CE₅₀	Concentración Efectiva media
CMLV	Célula Muscular Lisa Vasular
CO₂	Dióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
E_{max}	Efecto máximo
EDTA	Ácido EtilenDiamonio TetraAcético
eNOS	Sintasa de Óxido Nítrico endotelial
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FC	Frecuencia cardíaca
GC	Guanilato ciclase

GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
HTA	Hipertensión Arterial
IECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IP₃	Inositol trifosfato
JNC	<i>Joint National Committee</i>
K⁺	<i>Ion Potasio</i>
K_{2P}	Canales de potasio de dominio de 2 poros en tándem
K_{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
KCa	Canales de potasio activados por Ca ²⁺
KCl	<i>Cloruro de potasio</i>
KH₂PO₄	Fosfato monobásico de potasio
Kv	Canales de potasio activados por voltaje
L-NAME1	L-Nitro Arginina Metil Ester
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MLC	Cadena Ligera de Miosina
MLCK	Kinasa de la Cadena Ligera de Miosina
MLCP	Fosfatasa de la Cadena Ligera de miosina
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio

NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintasa de la óxido Nítrico
O₂	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-
ODQ	ona
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión Arterial
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión Arterial Sistólica
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PNA	Péptido natriurético auricular
RS	Retículo Sarcoplásmico
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
TEA	Tetraetilamonio

RESUMEN

La hipertensión arterial es una enfermedad crónico-degenerativa producida por distintos factores, dentro de los que destacan los genéticos, ingesta excesiva de sodio, edad avanzada, tabaquismo, entre otros factores. La hipertensión representa un problema grave ya que es una de las principales enfermedades que aqueja a la población mexicana, además de tener altos índices de mortalidad (ENSANUT 2016). Por otro lado, en México existe una amplia diversidad en plantas las cuales representan una opción potencial en cuestión de alternativas para el desarrollo de nuevos fármacos que nos ayuden a tratar no solo HAS, sino también diversas enfermedades. Los flavonoides tienen una amplia actividad farmacológica en las que se encuentra su acción antioxidante, antiinflamatoria, protectora de la pared vascular y capilar, entre otras. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores encontrándose en vegetales, semillas frutas y en bebidas como la cerveza y el vino (Kuklinski, 2000). Con base en lo anterior, el presente trabajo se enfocó en determinar el efecto vasorrelajante y mecanismo de acción funcional del compuesto 6- hidroxiflavona en anillos de aorta aislada de rata, así como también evaluar el efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo* en ratas SHR, teniendo como resultado un efecto relajante de la 6-hidroxilavona parcialmente dependiente de la presencia de endotelio (E_{max} $90.42 \pm 4.49\%$, CE_{50} $66.76 \pm 11.06 \mu M$) que en ausencia de endotelio (E_{max} $68.43 \pm 6.01\%$, CE_{50} $198.47 \pm 6.61 \mu M$). Basados en estos resultados se determinó el mecanismo de acción funcional en el que se demostró que el proceso de relajación de la 6-hidroxiflavona es parcialmente dependiente de endotelio, actuando a través de la activación de la vía de NO, un efecto antagonista no competitivo o competitivo irreversible sobre los receptores adrenérgicos y un bloqueo de los canales de calcio en anillos de aorta aislada de rata en ausencia de endotelio. En cuanto al ensayo *in vivo*, se pudo apreciar una falta del efecto antihipertensivo de 6- OHF asociado a la baja solubilidad que presenta este compuesto.

I. INTRODUCCIÓN

Durante miles de años, la humanidad ha utilizado la biodiversidad que existe en plantas medicinales para tratar distintos padecimientos, y según datos de la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 80% de los países en desarrollo utilizan plantas medicinales para complementar las necesidades médicas (OMS, 2013). En México, existen aproximadamente cuatro mil especies registradas con propiedades curativas, sin embargo, el presupuesto que se invierte en realizar investigaciones científicas que aprovechen el potencial de las plantas medicinales y los metabolitos que derivan de ellas, es insuficiente (OMS, 2013). La hipertensión arterial representa un problema grave ya que es una de las principales enfermedades que afectan a la población mexicana, con altos índices de mortalidad, esto debido a que la enfermedad puede presentarse de manera silenciosa y, por tanto, ocasionar una detección tardía, por lo que los pacientes presentan complicaciones, tales como cardiopatías isquémicas, accidentes cerebrovasculares, infarto al miocardio, ictus isquémico y hemorrágico, etc. (NICE, 2011). Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran en todas las plantas superiores (Kuklinski, 2000), pueden distribuirse en los vegetales, semillas, frutas, y en bebidas como vino y cerveza (Martínez, 2002). Estos han sido estudiados por su variedad de actividades farmacológicas y se ha demostrado que son sustancias con efecto positivo para la salud por su acción antioxidante, antiinflamatoria, protectora de la pared vascular y capilar, entre otras funciones (Kuklinski, 2000). En la actualidad, en el área farmacéutica se realizan diversos estudios en plantas, con la finalidad de encontrar compuestos bioactivos con potencial farmacológico que puedan actuar como tratamiento alternativo o que sustituyan los politratamientos (Ramos, 2015).

Por esta razón, el presente trabajo tiene la finalidad de explorar el mecanismo de acción funcional de la 6-hidroxi flavona sobre anillos de aorta aislada de rata en un modelo *ex vivo* e *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR por sus siglas en inglés) como potencial fármaco para el tratamiento de la hipertensión arterial.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades.

La presión arterial se define como la fuerza que ejerce la sangre sobre la pared de un vaso, en forma perpendicular y que determina una distensión de la pared del vaso o tensión (Best & Taylor, 2003). Una persona sana debe tener valores de presión arterial inferiores a 120/80 mmHg (OMS, 2013).

La hipertensión, es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, lo que puede dañarlos. Cada vez que el corazón late, bombea sangre a los vasos, que llevan la sangre a todas las partes del cuerpo. Cuanta más alta es la tensión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear (OMS, 2013).

II.2 Clasificación de la hipertensión arterial según la organización mundial de la salud (OMS, 2019).

La OMS clasifica la hipertensión como se muestra en la Tabla 1, ésta es utilizada en México para el diagnóstico de esta enfermedad.

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión arterial. Recuperado de (OMS,2019).

Categoría	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Óptima	<120	<80
Elevada	120-129	80-84
Normal-Alta	130-139	85-89
HTA Grado 1	140-159	90-99
HTA Grado 2	160-179	100-109
HTA Grado 3	≥180	≥110
HTA sistólica aislada	≥140	≥90

Existen otras clasificaciones internacionales que separan la hipertensión arterial, como son: Clasificación de hipertensión arterial según la Asociación

Norteamericana del Corazón (JNC8) como lo muestra la Tabla 2, y Clasificación de la hipertensión arterial según la Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología como lo muestra la Tabla 3.

Tabla 2. Clasificación de la Hipertensión arterial. Asociación Norteamericana del Corazón: JNC 8. Recuperado de (Velásquez *et al.*, 2005)

Nivel de Presión Arterial (mmHg)			
Categoría	Sistólica		Diastólica
Normal	< 120	y	< 80
Prehipertensión	120-139	o	80-89
Hipertensión Arterial			
Hipertensión Estadio 1	140–159	o	90–99
Hipertensión Estadio 2	160	o	100

Tabla 3. Clasificación de la Hipertensión arterial. Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología. Recuperado de (B. Williams *et al.*, 2019).

Nivel de Presión Arterial (mmHg)			
Categoría	Sistólica		Diastólica
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal Alta	130-139	y/o	85-89
Hipertensión Arterial			
Hipertensión Grado 1	140–159	y/o	90–99
Hipertensión Grado 2	160–179	y/o	100–109
Hipertensión Grado 3	≥180	y/o	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	y	< 90

Epidemiología.

Entre los factores que contribuyen a la aparición de la hipertensión arterial se encuentran aquellos asociados con el estilo de vida, una elevada ingesta de sodio, dietas elevadas en grasas saturadas y tabaquismo, que son algunos detonantes del padecimiento que afecta a 31.5% de la población mexicana (Ensanut, 2016). En el año 2015 se estimó que 1,130 millones de personas padecían esta enfermedad, con una prevalencia >150 millones en Europa central y oriental. Según datos de la revista española cardiológica en el 2018, el 60% de la población que padece hipertensión arterial son adultos de más de 60 años (Williams *et al.*, 2019). De acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut, 2016), se estimó que en México poco más del 60% de los pacientes desconocen que son hipertensos, ya que generalmente es una enfermedad que no muestra síntomas o estos son inespecíficos (Federación Mexicana de Diabetes, A.C). Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19 demostraron un aumento porcentual en la prevalencia de la enfermedad en población mayor a los 20 años, estos valores fueron de 20.9% en mujeres y 15.3% en hombres, comparado con datos del año 2012 en donde hubo una prevalencia del 18.8% en mujeres y 12.7% en hombres, respectivamente (ENSANUT, 2020).

Sistema vascular.

Una de las principales funciones del sistema vascular es transportar y distribuir las sustancias necesarias a todos los tejidos del cuerpo y eliminar los productos de desecho del organismo. También permite mantener la homeostasis de todos los tejidos del cuerpo, asegurar un funcionamiento óptimo y la supervivencia de todas las células (Ávila, 2017).

Anatomía de las arterias.

Las paredes de las arterias se encuentran conformadas por tres capas llamadas tunicas:

- La capa interna recubre la parte interior del vaso, consta de un epitelio pavimentoso simple, el endotelio, que se encuentra sobre una membrana basal y una capa suelta de tejido conjuntivo laxo. El endotelio secreta sustancias químicas que estimulan la dilatación y constricción del vaso, entre otras actividades.
- La capa media o central, suele ser la más gruesa y está conformada por músculo liso, colágeno y, en algunos casos, tejido elástico. Su función es fortalecer los vasos y evitar que la presión de la sangre los rompa, vasomotilidad y cambios en el diámetro del vaso sanguíneo.
- La capa externa consta de tejido conjuntivo laxo. Ésta ancla el vaso y cede el paso a pequeños nervios, vasos linfáticos y vasos sanguíneos más pequeños (Kenneth, 2013).

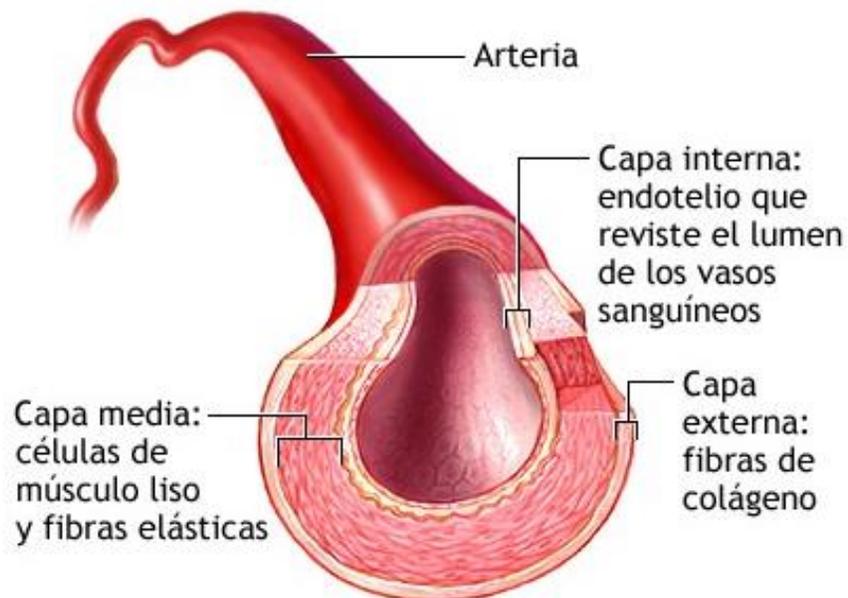


Figura 1 Anatomía de una arteria: imagen tomada y modificada de (Chen et al., 2019)

Fisiología de la presión arterial

La presión sanguínea es el producto del gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos cuando es impulsada por el corazón (Lima, 2016). El mantenimiento de la presión arterial normal se debe a un sistema de control complejo y multifactorial, que involucra al sistema nervioso central, periférico autónomo, al corazón, riñón, glándula suprarrenal y vasos sanguíneos, en consecuencia, al haber una alteración funcional de estas múltiples vías ocurre una anomalía en la presión arterial (Rondón S *et al.*, 2002).

II.3 Regulación de la presión arterial.

Fisiológicamente el organismo dispone de tres mecanismos principales de regulación de la presión arterial, con el fin de generar un equilibrio en el flujo sanguíneo (Best & Taylor, 2003).

- Disminución de la secreción de hormona antidiurética (HAD).
- Reducción de la descarga simpática renal y de la liberación de renina.
- Liberación del péptido natriurético auricular (PNA) (Best & Taylor, 2003).

Contracción de la musculatura lisa vascular.

Los vasos sanguíneos están recubiertos en mayor parte por músculo liso vascular unitario, lo que significa que todas las fibras musculares se contraen al mismo tiempo, éstas a su vez están unidas por uniones GAP que conectan con los citoplasmas de las células. El proceso de contracción de las células del músculo liso vascular es iniciado por calcio; la concentración del calcio intracelular aumenta en respuesta a estímulos específicos, éste es unido con la proteína ácida calmodulina, formando un complejo Ca^{2+} /Calmodulina que activará a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) para fosforilar la cadena ligera de miosina. El incremento del Ca^{2+} en el medio intracelular se generará por la liberación de este ion desde el retículo sarcoplásmico y por la entrada desde el medio extracelular a través de los canales de calcio tipo L dependientes del voltaje, abriéndose en respuesta a la despolarización provocada por el estiramiento de las células lisas

vasculares. Algunos agonistas como norepinefrina, angiotensina II o endotelina se unen a su receptor acoplado a la proteína G heterotrimérica, específicamente en su cadena alfa, con la finalidad de activar la función de la fosfolipasa C. Esta enzima es encargada de catalizar, a partir de un fosfolípido de membrana (Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), formando dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DG) y el trifosfato inositol (IP3). IP3 por su parte se unirá a receptores SERCA en el retículo sarcoplásmico para provocar la liberación de calcio. DG, se unirá al Ca^{2+} para activar a la proteína de Kinsasa C (PKC), para fosforilar a las cadenas ligeras de las proteínas de miosina, y en conjunto con actina forman el puente cruzado e inician el acortamiento de las células musculares lisas vasculares (CMLV) (Renna *et al.*, 2013).

Resistencia periférica.

La resistencia periférica es definida como la oposición al flujo que la sangre encuentra en los vasos alejados del corazón (Kenneth, 2013). La pared de los vasos sanguíneos está conformada por una gran capa de músculo liso, este tiene la capacidad de regular la actividad contráctil reaccionando ante estímulos simpáticos y otros mecanismos locales, hormonales y humorales. Todo este sistema de contractilidad de los vasos está regulado por sustancias vasoactivas de acción parácrina, como óxido nítrico, H^+ , ácido láctico, dióxido de carbono, adenosina, prostaglandinas e histaminas, que se liberan a través del endotelio vascular y tejidos vecinos (Best & Taylor, 2003).

Gasto cardiaco

El gasto cardiaco es la cantidad de sangre que expulsa el corazón en un minuto, este valor se expresa de la siguiente manera:

GC: volumen sistólico (VS) x frecuencia cardiaca (FC)

El gasto cardiaco es el principal determinante del transporte de oxígeno al organismo y se adapta en cada momento a las necesidades del organismo (García *et al.*, 2011).

Conductancia del Ca²⁺.

Las catecolaminas como la adrenalina, la noradrenalina y los fármacos simpaticomiméticos, aumentan el Ca²⁺ mediante la activación de los receptores betaadrenérgicos que están acoplados a la adenilciclasa (AC) y a la síntesis del AMPc (este actúa en forma directa y a través de la fosforilación), con la finalidad de llevar a cabo la contractilidad y la frecuencia cardiaca (Best & Taylor, 2003).

Función del óxido nítrico en el proceso de relajación del músculo liso vascular.

El óxido nítrico (NO) tiene un efecto significativo sobre el tono del músculo liso vascular y la presión arterial. Vasodilatadores como acetilcolina y bradicinina, incrementan la concentración intracelular de calcio en las células endoteliales, provocando la síntesis de NO, éste se difunde al músculo liso vascular generando la vasorrelajación (Jaffrey *et al.*, 2003). El óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) puede ser activada de forma dependiente o independiente de calcio. Los agonistas acetilcolina y bradicinina se unen a receptores específicos o canales iónicos abiertos de las membranas celulares del endotelio para aumentar la entrada del calcio. Los iones de calcio se unen a la calmodulina formando el complejo calcio/calmodulina (Ca-CaM), el complejo activa a eNOS para producir NO a través de L-Arginina (Vanhoutte *et al.*, 2016). El NO pasa a través de las células del músculo liso y activa la guanilciclasa soluble y la síntesis de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir de trifosfato de guanosina (GTP). cGMP se une a la proteína Cinasa G (PKG) y la activa. A partir de esto ocurre una disminución de la entrada de calcio e inhibición de la contracción muscular dependiente de éste, como se muestra en la figura 2 (Jaffrey *et al.*, 2003).

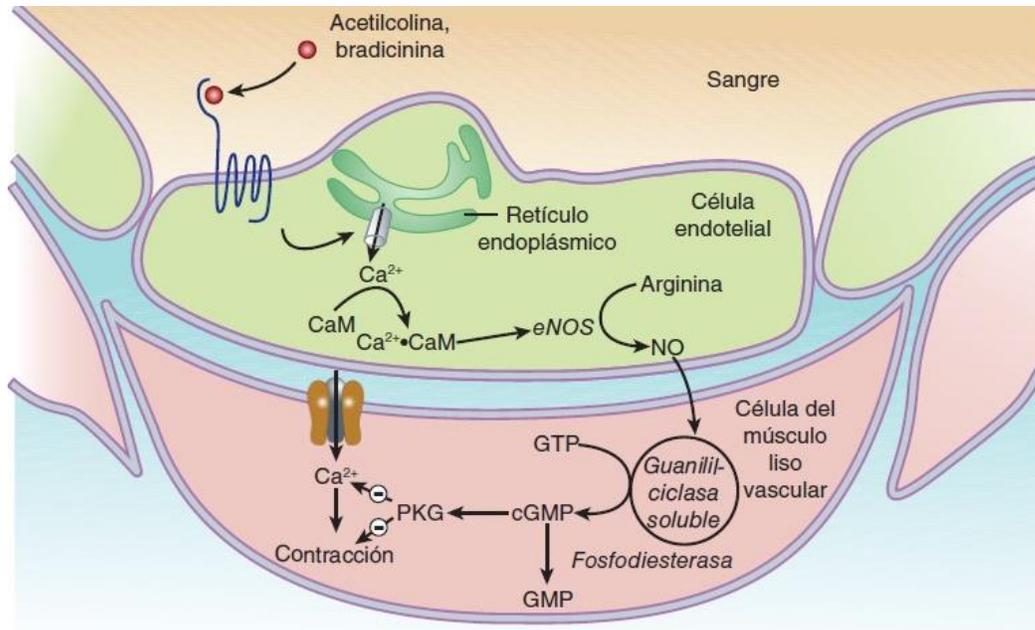


Figura 2. Esquema de la relajación del músculo liso por medio del óxido nítrico, tomado de (Katzung et al., 2012).

II.4 Tratamiento.

En la actualidad existen diversos tratamientos farmacológicos y no farmacológicos para el control de la presión arterial (GPC, 2010). El tratamiento no farmacológico retrasa la evolución de la etapa de prehipertensión a la hipertensión e incluyen modificaciones del estilo de vida como la dieta, ejercicio, evitar el estrés y reducir el consumo de alcohol y tabaco. Hay ciertas pautas dietéticas que promueven el consumo de frutas, verduras, granos, productos lácteos y alimentos ricos en K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y P, como la dieta mediterránea. Evitar el sodio en la alimentación tiene como propósito la reducción de la presión arterial, así como el estilo de vida estresante (Mahmood *et al.*, 2018).



Figura 3. Tratamiento no farmacológico indicado en la hipertensión arterial (Imagen propia).

En el tratamiento farmacológico existen distintos fármacos que actúan a diferentes niveles fisiológicos, con distintos mecanismos de acción con la finalidad de complementar un poli-tratamiento y controlar de manera más eficaz esta enfermedad. Pero es justo por esta razón que los pacientes con poli-tratamientos no se apegan a ellos, ya que resulta ser desagradable tomar dos o más medicamentos.

Varios estudios han demostrado el beneficio del tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial en pacientes, utilizando diuréticos o beta bloqueadores como tratamiento de primera línea (GPC, 2010).

Clasificación de los medicamentos antihipertensivos.

Existen diferentes tipos de medicamentos indicados para el tratamiento de la presión arterial, cada uno de estos tienen distintas aplicaciones clínicas (Benowitz *et al.*, 2013) tal y como se muestran en la Tabla 4 y algunos de estos

medicamentos están organizados por subclase, su mecanismo de acción y su efecto farmacológico.

Tabla 4. Medicamentos utilizados para el tratamiento de la hipertensión arterial, por mecanismo de acción y efecto Farmacológico.
Tomado y modificado de (Benowitz *et al.*,2013).

Subclase, fármaco	Mecanismo de acción	Efectos
Diuréticos <ul style="list-style-type: none"> • Tiazidas: Hidroclotiazida Clortalidona • Diuréticos de asa: Furosemida • Espironolactona: Epleronona 	<p>Antagonizan al transportador de Na/Cl en el túbulo contorneado distal renal.</p> <p>Antagonizan al transportador de Na/K/2Cl renal en el asa de Henle</p> <p>Antagonizan al receptor de aldosterona en el túbulo colector renal.</p>	<p>Disminuyen el nivel sanguíneo y tienen efectos vasculares imprecisos.</p> <p>Las tiazidas tienen mayor eficacia.</p> <p>Aumentan la excreción de Na y disminuyen la de K.</p>
Simpaticolíticos de acción central: <ul style="list-style-type: none"> • Clonidina • Metildopa 	<p>Activan a receptores adrenérgicos α_2</p>	<p>Disminuyen el estímulo aferente simpático central. Reducen la secreción de noradrenalina de las terminaciones nerviosas noradrenérgicas</p>
Antagonistas de terminaciones nerviosas simpáticas: <ul style="list-style-type: none"> • Reserpina • Guanetidina 	<p>Antagoniza al transportador de aminas vesicular en nervios noradrenérgicos y refleja la reserva de transmisor. Interfiere con la emisión de aminas y sustituye a la noradrenalina en las vesículas.</p>	<p>Disminuye todos los efectos simpáticos, en especial los cardiovasculares, y aminora la presión sanguínea.</p>
Antagonistas α: <ul style="list-style-type: none"> • Prazosina • Terazosina 	<p>Antagonizan selectivamente a los receptores adrenérgicos α.</p>	<p>Impiden la vasoconstricción simpática. Disminuye el tono del músculo liso prostático.</p>

<ul style="list-style-type: none"> • Doxazosina 		
Antagonistas β: <ul style="list-style-type: none"> • Metoprolol • Carvediol • Nebivolol 	Antagonizan a receptores β , el Carvediol también bloquea a receptores α , el nebivolol también libera óxido nítrico.	Impiden la estimulación cardíaca simpática, disminuyen la secreción de renina.
Vasodilatadores: <ul style="list-style-type: none"> • Verapamilo • Diltiazem • Nifedipino, amlodipino • Hidralazina • Minoxidilo 	<p>Bloqueo no selectivo de conductos de calcio del tipo L.</p> <p>Bloqueo de conductos de calcio vasculares > conductos de calcio cardiacos.</p> <p>Causa emisión del óxido nítrico.</p> <p>Metabolito que abre conductos del K en el músculo liso vascular.</p>	<p>Aminoran la frecuencia y el gasto cardíaco, reducen la resistencia vascular.</p> <p>Disminuyen la resistencia vascular.</p> <p>Provocan vasodilatación, disminuyen la resistencia vascular.</p>
Fármacos parenterales <ul style="list-style-type: none"> • Nitroprusiato • Fenoldopam • Diazóxido • Labatalol 	<p>Libera óxido nítrico. Activa receptores D_1. Abre conductos del K. Antagonista α y β.</p>	Provocan una vasodilatación potente.
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) <ul style="list-style-type: none"> • Captopril 	Inhiben la enzima convertidora de angiotensina	Reduce la concentración de angiotensina II, reduce la vasoconstricción y secreción de aldosterona y aumenta la bradicina.

<p>Antagonistas del receptor de angiotensina (ARA):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Losartán, entre otros. 	<p>Antagoniza los receptores AT₁ para angiotensina</p>	<p>Igual que los receptores de los IECA, pero sin aumento de la bradicina.</p>
<p>Inhibidor de Renina: Aliskireno</p>	<p>Inhibe la actividad enzimática de la renina</p>	<p>Disminuye las angiotensinas I y II y la aldosterona.</p>

II.5 Flavonoides.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales superiores, predominando en partes aéreas como: hojas, flores, frutos, y algunos flavonoides son responsables del color amarillo de algunas flores. Los flavonoides están contenidos principalmente en Rutáceas, Polygonáceas y Umbelíferas (Kuklinski, 2000).

Ruta metabólica de la flavona.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de la ruta del ácido shikímico y de la ruta de los policétidos, como se muestra en el Figura 4 (Evans, 1991).

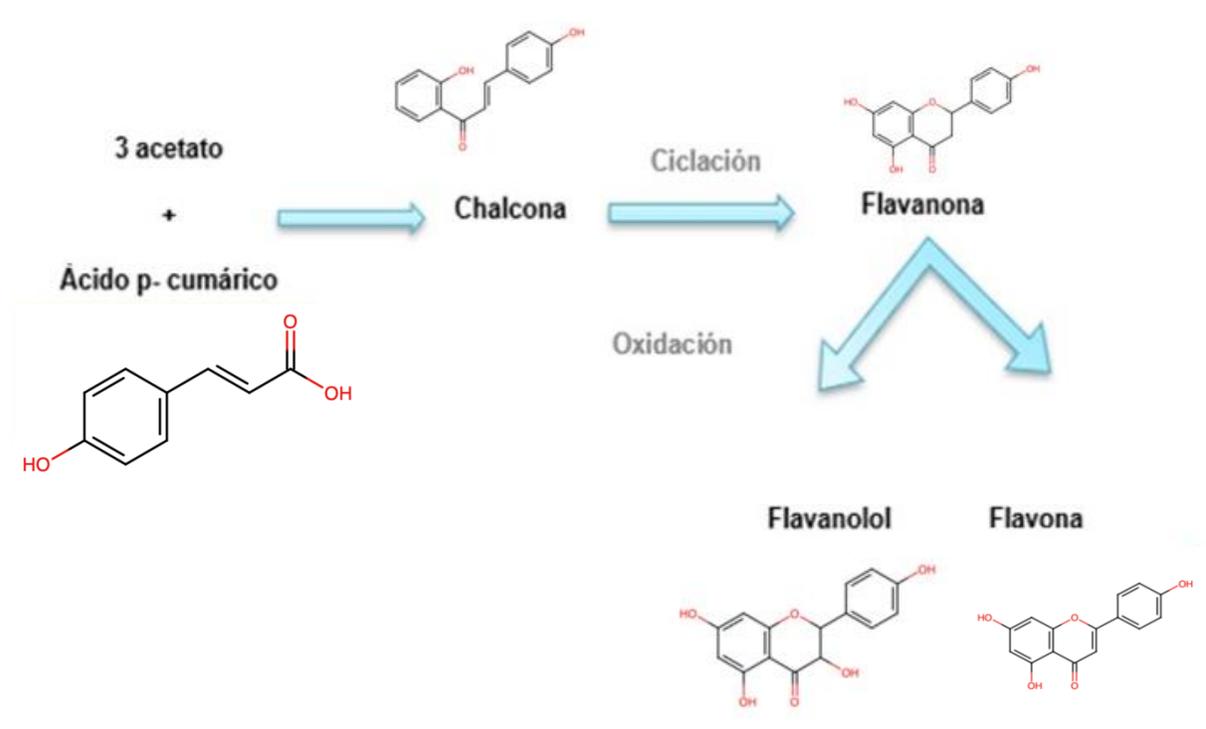


Figura 4. Ruta metabólica del metabolito flavona. (Esquema propio).

Descripción de la estructura base del flavonoide.

Los flavonoides son estructuras del tipo difenil pirano ($C_6-C_3-C_6$), con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada a través de un oxígeno (Martínez *et al.*, 2002). Estas estructuras poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C_3 y en el anillo B. Son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático (polifenólicas). Se encuentran como aglicones libres o en forma de O- heterósidos o C- heterósidos, unidos frecuentemente a glucosa. El anillo A es biosintetizado por la ruta de los policétidos y el anillo B y la unidad C_3 , que forma el anillo C, proceden de la ruta del ácido shikímico (Kuklinski, 2000).

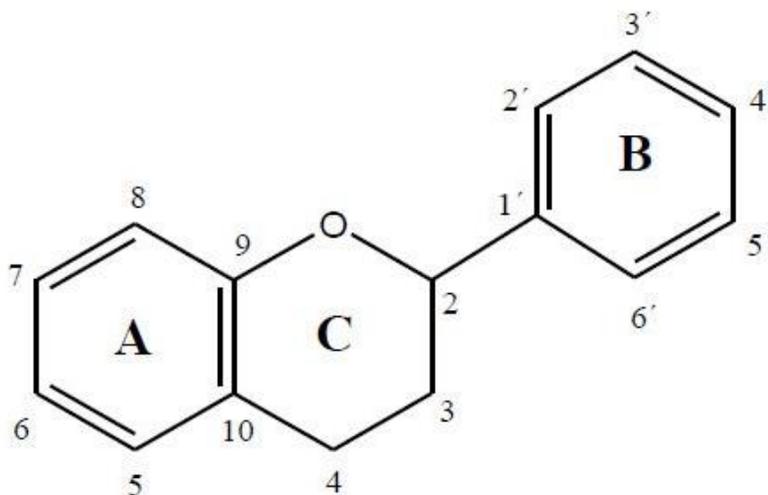


Figura 5. Estructura base de los flavonoides.

Clasificación de los flavonoides.

Estos pueden clasificarse con base a sus variaciones estructurales:

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo -OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

Figura 6. Clasificación de los flavonoides. Tomado de (Jiménez et al., 2009).

Actividad terapéutica.

Se conoce que las especies de flavonoides poseen diversas acciones farmacológicas, como:

- Acción vitamina P (Factor antiescorbútico).
- Antihemorrágicos.
- Antiarrítmicos.
- Protectores de la pared vascular o capilar.
- Antiinflamatorios.
- Antirradicales libres.
- Anti hepatotóxicos.
- Antibacterianos, antivíricos y antifúngicos.
- Diuréticos y antiurémicos.
- Antiespasmódicos.

Fármacos flavonoides en el mercado.

Actualmente, existen en el mercado pocos fármacos derivados de flavonoides. A continuación, se enlistan algunos de ellos.

- Fabroven: este medicamento es una combinación del extracto seco de heterósidos esterólicos, hesperidina metil chalcona y ácido ascórbico (vitamina C). Fabroven es un agente protector vascular, aumenta la tonicidad venosa y la resistencia capilar, y disminuye la permeabilidad vascular. Éste está indicado en el alivio del edema y síntomas relacionados con la insuficiencia venosa crónica (Pierre Fabre Ibérica, S.A., 2017).
- Daflón: Es una combinación de diosmina + hesperidina. Este medicamento es un agente venotónico y vasoprotector que provocan una vasoconstricción, aumento de la resistencia de los vasos y disminución de su permeabilidad, indicado en el tratamiento de edema y síntomas relacionados con insuficiencia venosa crónica (Vademécum, 2016).
- Flebikern: Es una fracción flavonoica purificada y micronizada, utilizado para aumentar el tono de las venas y la resistencia de los capilares. Este es utilizado en el tratamiento de edema y síntomas relacionados con la insuficiencia venosa crónica en adultos (Kern Pharma, S.L, 2013).

II.6 Estudios previos.

En el 2011, Torres- Piedra y Cols. de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos realizó estudios del efecto vasorrelajante *ex vivo* e *in vitro* de una serie de flavonoides estructuralmente relacionados, utilizando anillos de aorta de ratas en un modelo pre-contraído. Uno de los flavonoides analizados fue la 6-hidroxi flavona, que resultó ser uno de los más activos, además de tener un efecto parcialmente dependiente de endotelio. Por otro lado, en la tesis doctoral de Flores- Flores, (2018) se determinó el mecanismo de acción *ex*

vivo de 6-hidroxi flavona (figura 6) en anillos de tráquea aislada de rata en una modelo *ex vivo*, para demostrar un efecto relajante que puede ser mediado por un posible bloqueo de canales de calcio operado por receptores y bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje, además de una producción de segundos mensajeros relajantes como el NO y cGMP. Así mismo, para describir el efecto anti asmático se evaluó a 6- hidroxi flavona sobre un modelo de cobayos con asma alérgica inducida con ovoalbúmina. Con estos resultados se concluyó que 6- hidroxi flavona además de demostrar su efecto traqueorelajante a nivel *ex vivo* se comprobó que ejerce un efecto a nivel *in vivo* disminuyendo el efecto de broncoconstricción y disminuyendo la liberación de algunos mediadores de la inflamación como la de troboxanos.

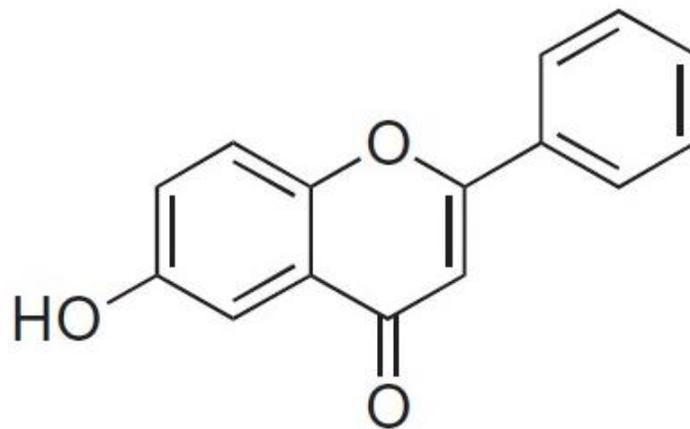


Figura 6. Estructura del compuesto flavonoide 6-hidroxi flavona. Tomado y modificado de (Torres Piedra et al., 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica degenerativa considerada un problema grave de salud pública. A nivel mundial se estima que 1/6 parte de la población sufre esta enfermedad y en algunas poblaciones susceptibles, 1 de 4 adultos mayores de 18 años son hipertensos (Campos *et al.*, 2018). En la actualidad existen distintos medicamentos para tratar la hipertensión arterial, la mayoría de los tratamientos que se prescriben son combinaciones de dos o más de estos, lo que conduce a los pacientes al desapego del tratamiento (Herrera, 2012).

Bajo este contexto, la investigación en plantas medicinales representa una amplia área para el descubrimiento de moléculas bioactivas con potencial efecto farmacológico que permitan brindar una alternativa para el tratamiento de la hipertensión arterial. Durante mucho tiempo los flavonoides han sido estudiados por su diversidad en actividades farmacológicas, entre ellos efectos vasorrelajantes. Por otra parte, se sabe que han sido utilizados en el tratamiento de distintas enfermedades. Sin embargo, en muchas de las variaciones estructurales de los flavonoides no se conoce el mecanismo de acción. En este sentido, en este trabajo se determinó el mecanismo de acción de la molécula 6-hidroxi flavona en un modelo *in vivo* y *ex vivo* en anillos de aorta aislada de rata y, por previas investigaciones se sabe que podría tener un mecanismo de acción dual. Al mismo tiempo se pretende dejar un antecedente para que en el futuro esta molécula pueda convertirse en un medicamento dual indicado para el tratamiento de la hipertensión arterial.

IV. HIPÓTESIS

El compuesto 6- hidroxiflavona tendrá un efecto vasorrelajante y antihipertensivo en modelos *in vivo* y *ex vivo*, con un posible mecanismo de acción funcional parcialmente dependiente de la presencia de endotelio y un posible bloqueo de canales de calcio.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general.

Determinar el mecanismo de acción funcional de 6- hidroxiflavona en anillos de aorta aislada de rata y evaluar el efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

V.2 Objetivos particulares.

- Determinar el efecto vasorrelajante de la 6- hidroxiflavona en anillos de aorta en presencia o ausencia de endotelio.
- Determinar el mecanismo de acción funcional de la 6- hidroxiflavona en presencia de inhibidores, agonistas y antagonistas, según sea el caso.
- Evaluar el efecto antihipertensivo agudo en ratas SHR.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Evaluaciones farmacológicas.

Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 gr de peso, estas fueron alimentadas con Rodent Labs Chow ® y libres de acceso a agua en condiciones de bioterio. El estudio se llevó a cabo bajo la NOM-062-ZOO-1999 en el cual se describen las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, emitida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación.

Reactivos.

Para llevar a cabo el proyecto se utilizaron los siguientes reactivos: Compuesto de tipo flavonoide (6-hidroxi flavona), 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), nifedipina, adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), Tetraetilamonio (TEA), CaCl₂ y solución de Ringer-Krebs.

Obtención de anillos de aorta de rata.

Para este procedimiento, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de éter etílico. Consecutivamente, se hizo la disección abdominal para extraer la aorta torácica, ésta se limpió de manera cuidadosa para eliminar el tejido conectivo y adyacente. Una vez limpia la aorta, se cortó en segmentos de 3-5 mm de longitud. Los segmentos de aorta libres de endotelio se obtuvieron retirando dicha capa de manera mecánica.

Sistema de registro.

Para la determinación del efecto vasorrelajante de la muestra y controles se utilizó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. En este se sujetaron los anillos previamente cortados y limpios en una cámara de incubación conectado a un transductor de fuerza isométrico modelo Grass FT03®, unido a un sistema BIOPAC®. Para proporcionar las condiciones fisiológicas al tejido, se agregaron

10 mL de solución de Ringer-Krebs [(mM) NaCl (118), glucosa 11.4, NaHCO₃ (25), KCl (4.7), MgSO₄ (1.2), KH₂PO₄ (1.2), EDTA (0.026), CaCl₂ (2.5)], a pH 7.4, con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa O₂/CO₂ (95:5%), dicha solución se mantuvo a 37°C, con un baño recirculador.

Determinación del efecto vasorrelajante.

Para la evaluación del efecto vasorrelajante, el tejido fue sometido a una tensión basal de 3 gramos de fuerza y un periodo de estabilización de 30 min. Posteriormente, durante 15 minutos los anillos se sensibilizaron con NA [0.1µM], cada proceso de estimulación se realizó por triplicado. Posteriormente el tejido fue lavado con solución de Ringer-Krebs con la finalidad de recuperar el nivel basal de la tensión. Para confirmar la presencia y ausencia de endotelio en los tejidos, se agregó carbacol [1µM] en la tercera estimulación, seguidamente se hizo un lavado del tejido para regresar al nivel basal de contracción del tejido. Los anillos de aorta que contrajeron al momento de agregar el carbacol fueron considerados con endotelio intacto.

Al tejido previamente sensibilizado se le agregaron las diferentes concentraciones del compuesto 6-hidroxiflavona, como se muestra en la Figura 7. Posteriormente se realizaron curvas concentración-respuesta utilizando el programa AcqKnowledge (BIOPAC, INC.USA).

Para el control positivo en presencia de endotelio, se usó Carbacol. Por otro lado, para el ensayo que se realizó en ausencia de endotelio se empleó como control positivo el medicamento nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio y como vehículo DMSO.

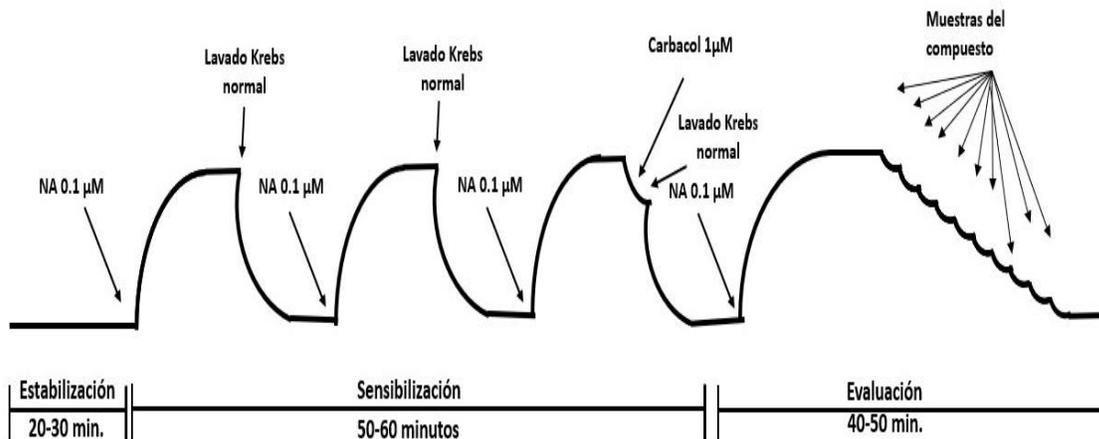


Figura 7. Esquema representativo de la evaluación del efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata contraídos con NA 0.1 μM.

Determinación del mecanismo de acción funcional del compuesto 6-hidroxi flavona en anillos de aorta aislado de rata.

La determinación del mecanismo de acción se efectuó con el compuesto 6-hidroxi flavona tomando en consideración la CE_{50} de dicho compuesto, este dato fue obtenido de la determinación del efecto vasorrelajante.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita, se realizaron 5 experimentos usando anillos de aorta en ausencia y presencia de endotelio según fue el caso, poniéndolos en contacto con diferentes inhibidores (L-NAME como inhibidor del óxido nítrico sintasa y ODQ como inhibidor del guanilato ciclase soluble), agonistas (NA), Bloqueadores de canales (TEA) y $CaCl_2$. Posteriormente, se realizaron los experimentos, como se describen a continuación en cada uno de los apartados.

Predominio de factores derivados del endotelio tales como: producción de óxido nítrico/GMPc.

Con la finalidad de determinar si el compuesto 6-hidroxi flavona ejerce un efecto farmacológico a través de la producción de óxido nítrico y/o activación de la Guanilato ciclase, se siguió la siguiente metodología: se estabilizó y sensibilizó el

tejido con endotelio intacto, los anillos de arteria aorta fueron incubados con un inhibidor de la eNOS L-NAME [2.66 μ M] y un inhibidor de la enzima guanilato ciclasa soluble, ODQ [1 μ M] durante 15 minutos. Seguidamente se indujo la contracción con NA [0.1 μ M]. Una vez estable el tejido, se agregaron las diferentes concentraciones del compuesto de forma acumulativa para obtener las curvas de concentración-respuesta (Figura 8). Este procedimiento se comparó en presencia y ausencia de los inhibidores.

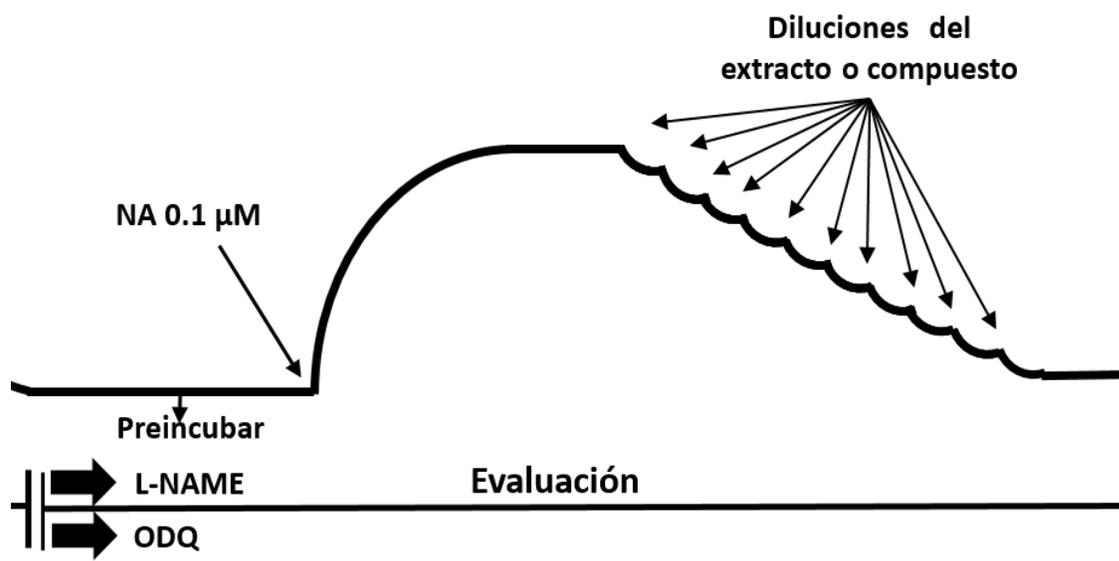


Figura 8. Determinación del mecanismo de acción del compuesto 6-hidroxi flavona dependiente de endotelio con los inhibidores L-NAME y ODQ.

Participación de los receptores α -adrenérgicos.

El objetivo de esta evaluación fue conocer si el mecanismo funcional del compuesto actúa por un antagonismo sobre los receptores α -adrenérgicos. Para conocer el mecanismo se realizó la siguiente metodología: posterior al periodo de estabilización y sensibilización, se realizó una curva control agregando diluciones acumulativas de NA [0.005-10 μ M] a la cámara de incubación, después se lavó el tejido con solución de Ringer-Krebs y ya que llegó a su estado basal se incubó la CE₅₀ del compuesto durante 15 minutos. Terminado el tiempo establecido, se agregaron las diluciones de NA [0.005-10 μ M] de forma acumulativa, tal como se muestra en la Figura 9.

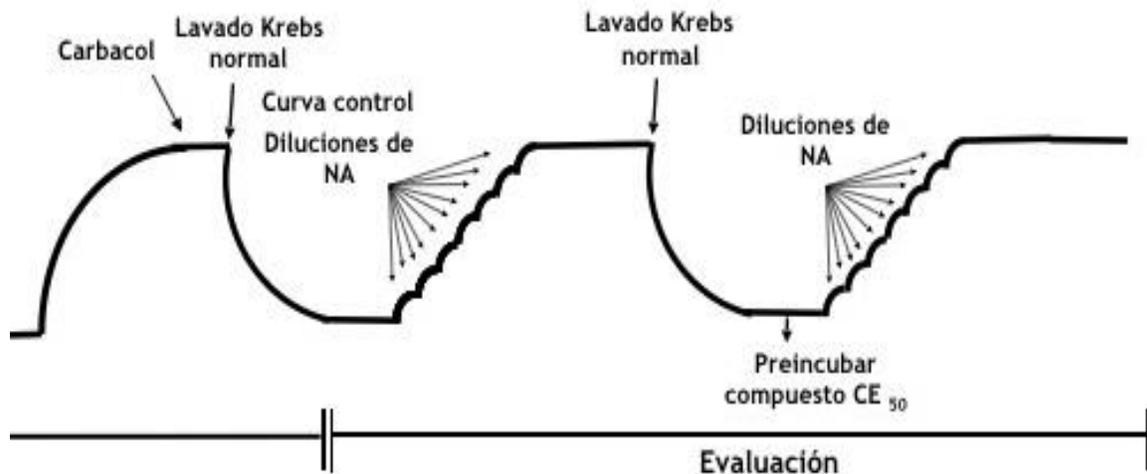


Figura 9. Participación de los receptores α -adrenérgicos en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.

Determinación de la participación de canales de calcio en contracciones inducidas por CaCl_2

Para poder determinar si el efecto relajante del compuesto está involucrado por un posible bloqueo de canales de calcio de la membrana de la célula, se realizaron curvas de concentración-respuesta en solución Krebs 80 mM sin calcio, la contracción del tejido fue hecha con diluciones de CaCl_2 [0.0081- 27.03 mM] con la finalidad de hacer una curva control, posteriormente se lavó el tejido y una vez estable se preincubó la CE_{50} de 6-hidroxiflavona. Transcurridos 15 minutos, se agregaron las diluciones de CaCl_2 [0.0081- 27.03 mM] de forma acumulativa, tal como se muestra en la Figura 10. Finalmente, Se graficaron y compararon ambas curvas.

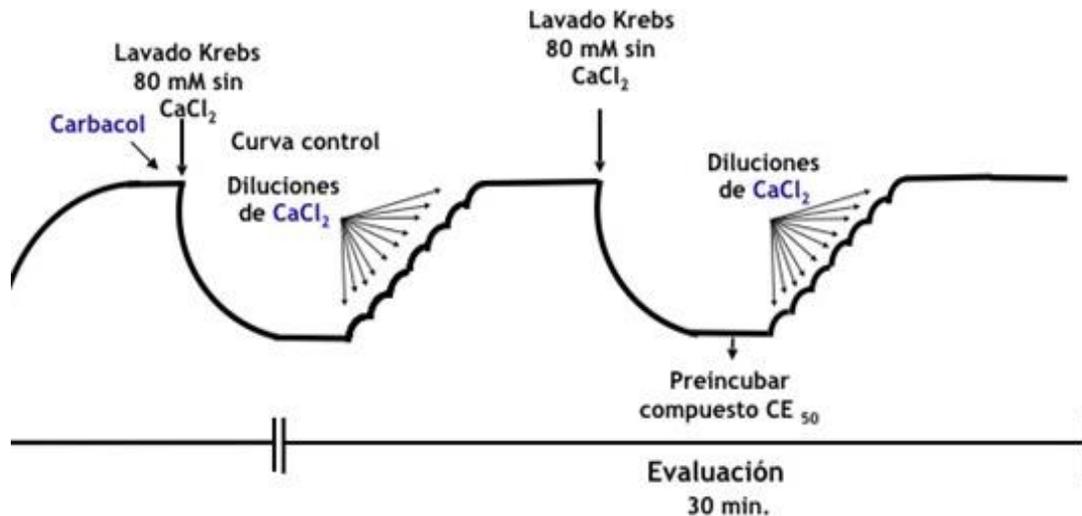


Figura 10. Participación de los canales de calcio en contracciones inducidas por CaCl_2 en anillos de aorta aislada de rata con endotelio.

Determinación de la participación de la apertura de canales de K^+ .

Para establecer si el efecto relajante está mediado por la apertura de canales de K^+ presentes en la musculatura lisa vascular, se realizó una curva control agregando de manera acumulativa al anillo de aorta aislada sin endotelio las diluciones del compuesto 6-hidroxi-flavona. Para la determinación del mecanismo en estudio, se realizaron curvas concentración- respuesta. Para ello, se incubó previamente el compuesto TEA [632 μM] y posteriormente se indujo una contracción con NA. Ya estable el tejido, se agregaron de forma acumulativa las diluciones del compuesto 6-hidroxi-flavona, tal como se muestra en la figura 11. Terminado el experimento se graficó y se compararon ambas curvas.

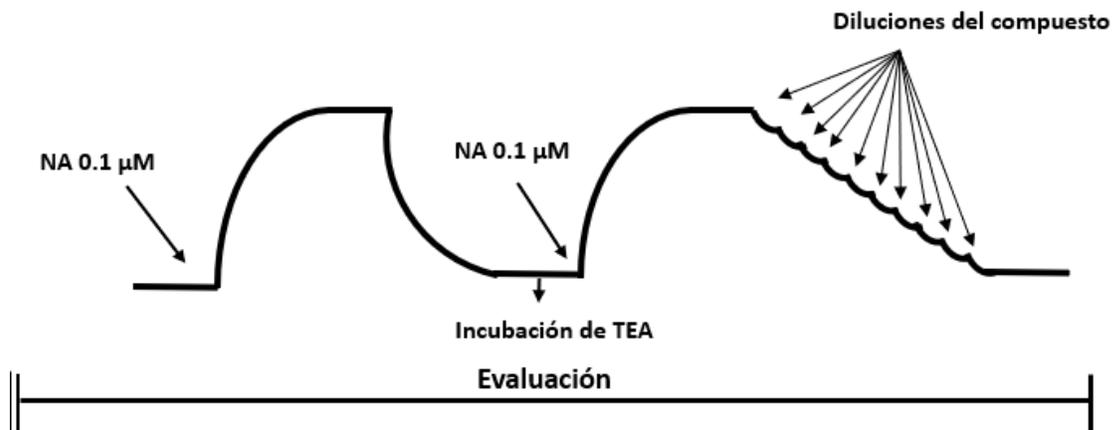


Figura 11. Participación de la apertura de canales de K⁺ en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.

VI.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del efecto vasorrelajante y del mecanismo de acción fueron expresados como la media de 6 animales \pm el error estándar de la media. Las curvas concentración-respuesta se realizaron en el programa Origin 8.0. El análisis estadístico para cada curva se llevó a cabo en el programa de GraphPad Prism 5, estableciendo una diferencia significativa de las medias de $p < 0.05$ mediante un análisis de dos vías (ANOVA) seguida de una prueba comparativa *pos hoc* de Bonferroni.

VI.3 Determinación del efecto antihipertensivo del compuesto 6-hidroxi flavona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Animales.

En este estudio se utilizaron ratas macho adultas (entre 250-300 gr de peso) de una cepa de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) alimentadas *ad libitum* con dieta comercial. El estudio se llevó a cabo bajo la Norma de especificaciones

NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Evaluación del efecto antihipertensivo en un modelo agudo no invasivo.

Para la determinación del efecto antihipertensivo del compuesto 6- hidroxiflavona, se formaron tres grupos de 8 animales: a un grupo (G1), se le administró por vía oral el vehículo (Tween 80 3%/DMSO 2%), al grupo de prueba (G2) se le administró por esta misma vía el compuesto 6-hidroxiflavona en una dosis de 50 mg/kg y al tercero el medicamento bloqueador de canales de calcio Amlodipina (G3, control positivo) a una dosis de 5 mg/kg. Posteriormente se midieron los siguientes parámetros: PAS, PAD y frecuencia cardiaca (FC), esto con ayuda de un Pletistómetro LE5007, HARVARD APPARATUS previsto del programa Chart V 4.2 de Powerlab ADInstruments. Se realizaron al menos 6 lecturas por animal, al tiempo 0, 1, 3, 5 y 7 horas posteriores a la administración.

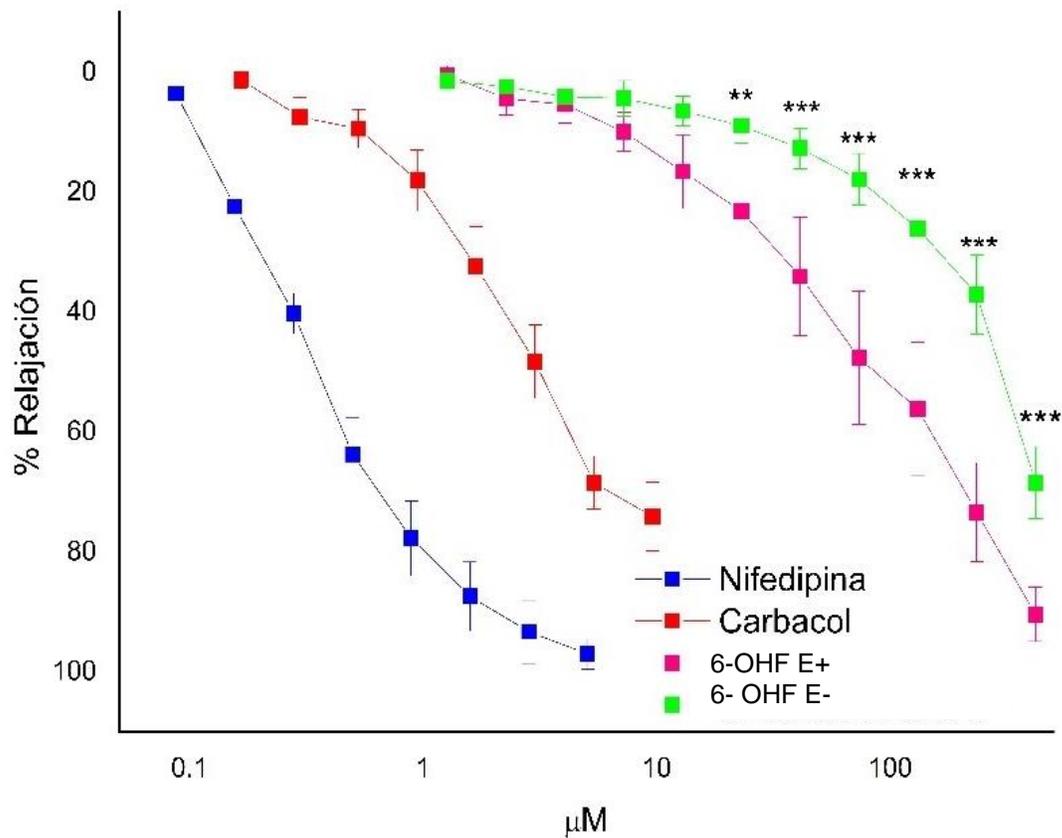
Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos del efecto antihipertensivo fueron expresados como la media de 8 animales \pm el error estándar de la media, estableciendo una diferencia significativa de $p < 0.05$. Se hizo un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguida de una prueba comparativa *pos hoc* de Bonferroni.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Determinación del efecto vasorrelajante del compuesto 6-hidroxi flavona en anillos de aorta aislada de rata.

Tal como se muestra en la Gráfica 1, la 6-hidroxi flavona presentó una eficacia en anillos con endotelio (E_{max}) de $90.42 \pm 4.49\%$ y una concentración efectiva media (CE_{50}) de $66.76 \pm 11.06 \mu M$. El efecto observado en tejido ausente de endotelio presentó una E_{max} de $68.43 \pm 6.01\%$ y una CE_{50} de $198.47 \pm 6.61 \mu M$.



Gráfica 4. Determinación del efecto vasorrelajante dependiente de la concentración del compuesto 6-OHF en presencia y ausencia de endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni $**p < 0.01$ $***p < 0.001$. 6-OHF e+ vs 6-OHF e-.

Compuesto	CE ₅₀ [μM]
6-hidroxi flavona (E+)	66.76+/- 11.06 [μM]
6-hidroxi flavona (E-)	198.47+/- 6.61 [μM]

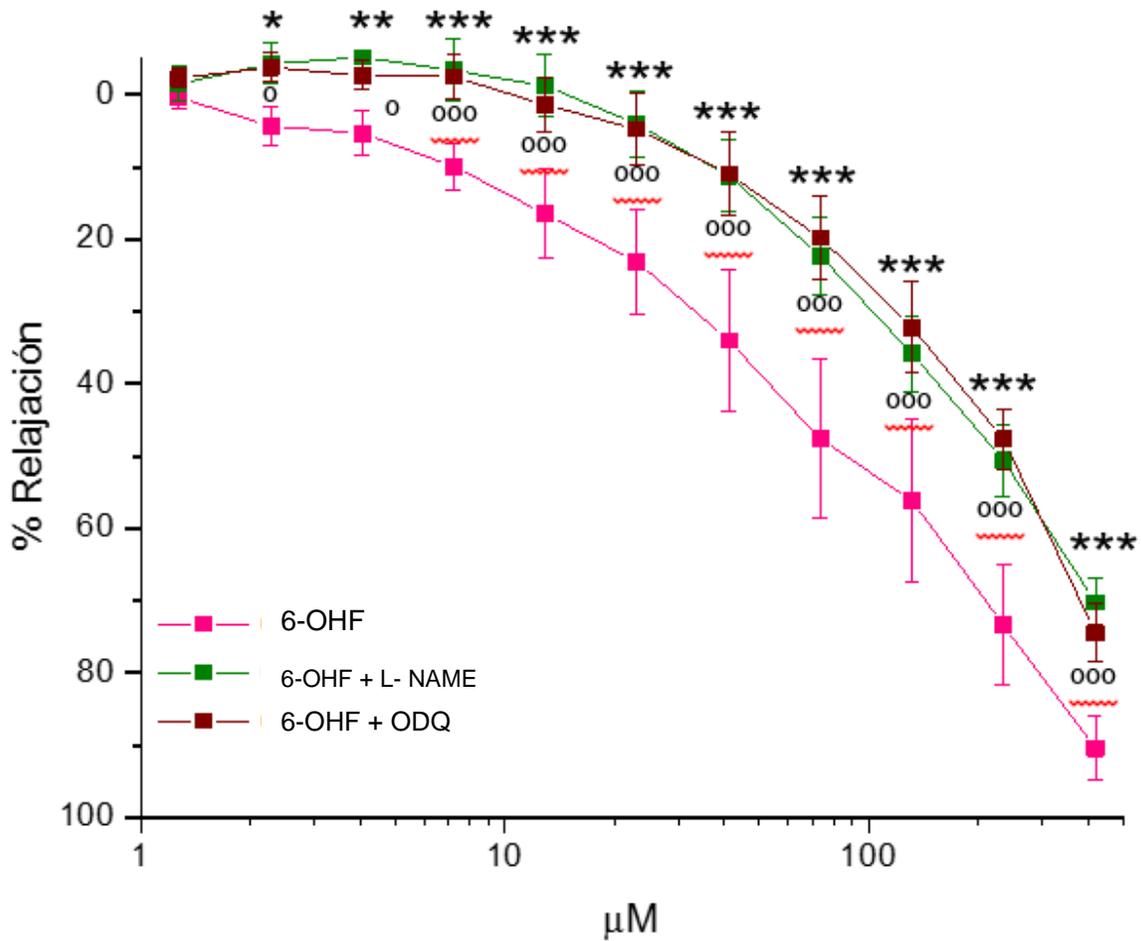
Estos datos muestran que el efecto relajante del compuesto 6-hidroxi flavona es parcialmente dependiente de endotelio y este podría estar mediado por algunos factores endoteliales encargados del proceso de contracción y relajación del músculo liso, tales como producción de NO en el endotelio y activación de Guanilato Ciclasa Soluble debido al incremento del NO. Además, al observarse un efecto relajante en ausencia de endotelio podrían verse involucradas otras vías, tales como antagonismo sobre receptores adrenérgicos, inhibición de enzimas fosfodiesterasas, bloqueo de canales de calcio o activación de canales de potasio, entre otros (Núñez *et al.*, 2019).

VII.2 Determinación del mecanismo de acción funcional.

Factores derivados de endotelio.

El endotelio vascular es una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos y linfáticos (Caja, 2018). Este tejido está encargado de regular el tono vascular mediante la liberación de vasoconstrictores como la endotelina-1 (factor derivado de endotelio hiperpolarizante EDHF), vasodilatadores como el óxido nítrico (factor relajante derivado de endotelio EDRF), y prostaciclina y péptidos natriuréticos. Estos factores vasodilatadores poseen, además, actividades antiagregantes y suprimen la formación de trombos e impiden la estenosis vascular (Daiber *et al.*, 2017). Como se ha descrito en los antecedentes, el NO es un factor determinante derivado del endotelio involucrado en la regulación del tono vascular que es sintetizado a partir de L- arginina y O₂ y

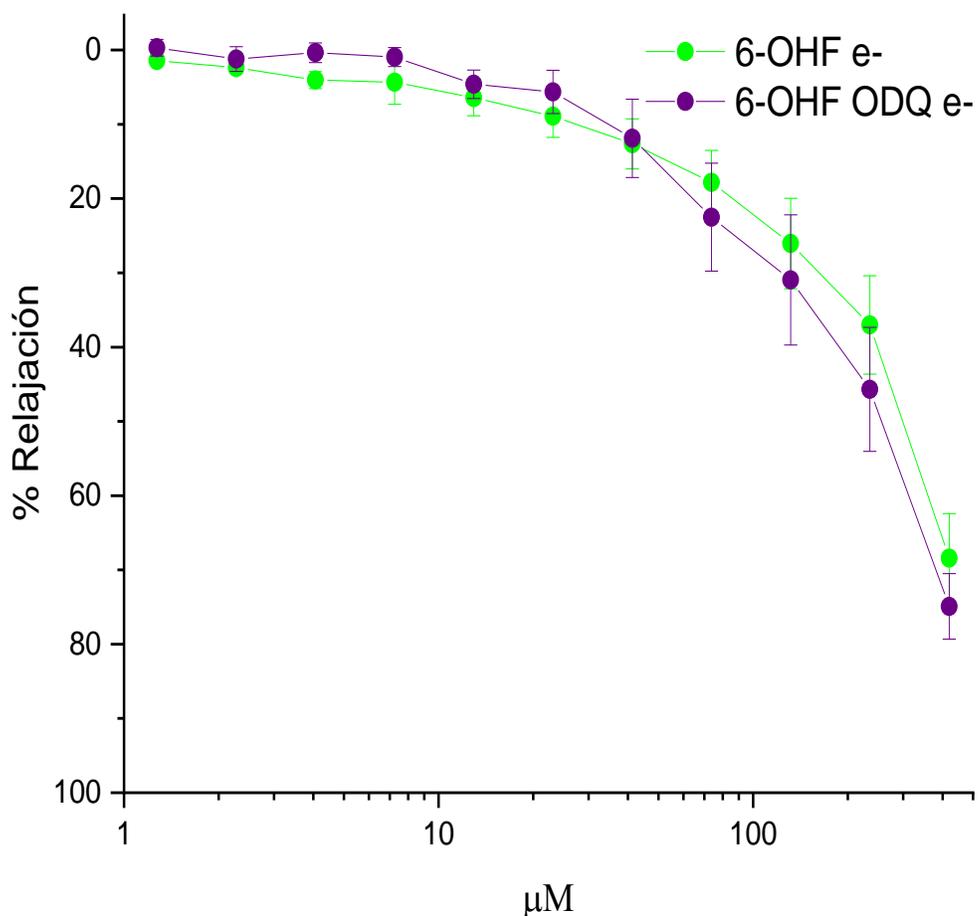
por reducción de Nitrato inorgánico, NO al combinarse con el grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa provoca la activación de esta y en consecuencia transforma GMPc a partir de la conversión de GTP. Conociendo este mecanismo de relajación que ocurre a nivel fisiológico en la célula, se llevó a cabo la metodología descrita como “Predominio de factores derivados del endotelio: producción de óxido nítrico/GMPc” en donde se colocaron los siguientes inhibidores enzimáticos: N-omega-nitro-L-arginina metil éster clorhidrato (L-NAME) el cual es inhibidor de la enzima de óxido nítrico sintasa (NOS), un análogo de la L-arginina que inhibe la producción de NO y la relajación inducida por la acetilcolina e induce a un incremento en la presión arterial. Este compuesto ha sido ampliamente utilizado en estudios de relajación dependientes de endotelio (Sigma Aldrich, s.f de L-NAME). Y El 1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3-a] quioxalin-1- uno (ODQ), un inhibidor enzimático específico de la guanilato ciclasa soluble (GCs) utilizado ampliamente en estudios farmacológicos de la vía del NO/cGMP. ODQ reacciona con el grupo hemo ferroso de la región N- terminal de la subunidad $\alpha 1$ de GCs creando una reacción oxidante y convirtiendo al grupo hemo ferroso en férrico (Zhao et al., 2000). Dado que la activación de GCs está mediada por la unión de NO a la fracción hemo, ODQ provoca una reacción inhibitoria del tipo reversible. Con base en lo antes descrito, se decidió continuar con el ensayo para determinar los factores que se encuentran involucrados en el endotelio, los resultados obtenidos se plasmaron en la Gráfica 2.



Gráfica 5. Determinación del efecto vasorrelajante de 6- OHF en presencia de inhibidores L-NAME [2.66 μM] y ODQ [1μM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni. 6-OHF Vs 6-OHF + L-NAME *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. 6-OHF Vs 6-OHF + ODQ °p<0.05, °°p<0.001.

Como se observa en la gráfica 2, al poner en contacto el tejido con los inhibidores de las enzimas eNOs (L-NAME) y guanilato ciclasa (ODQ) se observó en ambas curvas, un desplazamiento hacia la derecha comparado con el grupo control, lo que nos indica que el proceso de vasorrelajación está disminuido, sin embargo no en su totalidad. Este comportamiento demuestra que el efecto está dado por la producción de NO y en consecuencia la activación de la guanilato ciclasa soluble que produce GMPc a partir de GTP y activación de la proteína PKG, esta última provocando la relajación de la musculatura lisa vascular (Vanhoutte *et al.*, 2016).

Como se describe en la literatura, el GMPc es un componente clave en la regulación de la vasodilatación y es producido por 2 tipos de enzimas: la guanilato ciclasa particulada ligada a la membrana que es activada por peptidos nautriuréticos y la guanilato ciclasa soluble que se encuentra en el citoplasma y es activada por el NO. Ambas se encuentran en la musculatura lisa y catalizan la misma reacción de conversión (Bobin *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, como se logra apreciar la relajacion del tejido aún cuando se colocan estos inhibidores y con el proposito de demostrar si el compuesto 6-hidroxi flavona activa directamente la guanilato ciclasa soluble, se decidió hacer ensayos sobre anillos de aorta en ausencia de endotelio, preincubando ODQ previo a una contracción inducida por NA 0.1 μM , los resultados se muestra en la gráfica 3.



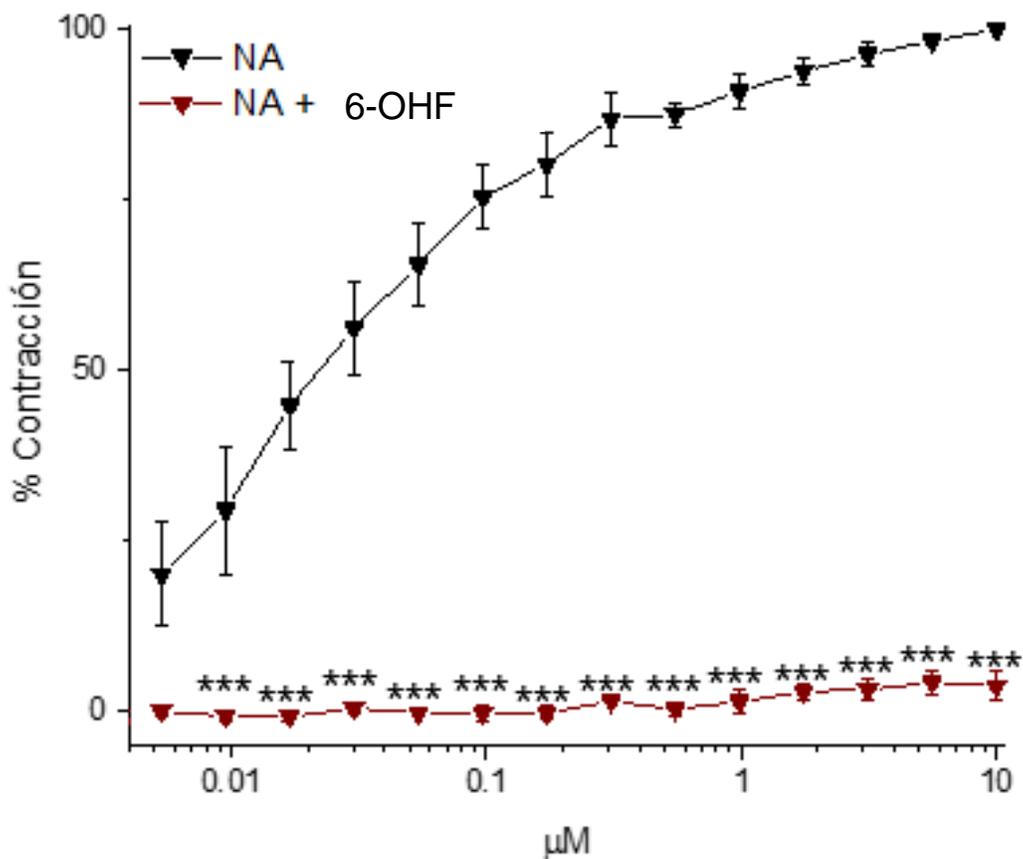
Gráfica 6. Determinación del efecto vasorrelajante de 6- OHF en presencia del inhibidor ODQ [1 μM] en anillos de aorta aislada sin endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni.

La gráfica 3, no muestra una diferencia relevante entre la curva de 6-hidroxi flavona en la que se preincubó ODQ en ausencia de endotelio y la curva control, lo que indica que el efecto relajante del compuesto no se encuentra mediado por la activación de la guanilato ciclasa soluble de forma directa. Esta gráfica, comprueba que el efecto observado está mediado por la producción de NO que es liberado del endotelio (Vanhoutte *et al.*, 2016), resultado de la estimulación por parte de 6-hidroxi flavona.

Factores involucrados en la musculatura lisa.

Receptores adrenérgicos.

Fisiológicamente, la NA es una sustancia segregada por las terminaciones nerviosas simpáticas vasoconstrictoras, esta catecolamina se encuentra almacenada en forma inactiva dentro de las vesículas sinápticas y es liberada cuando el potencial de acción despolariza las fibras adrenérgicas, este proceso provoca un aumento en la permeabilidad del Ca^{2+} en la membrana de dicha fibra, permitiendo la difusión de estos iones hacia las vesículas y generando un vertimiento del neurotransmisor hacia el exterior (Cortijo, 1992). La NA actúa directamente en los receptores α - adrenérgicos acoplados a proteínas G del músculo liso vascular, generando segundos mensajeros como inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. IP_3 promueve la liberación de calcio a través de la unión de sus receptores IP_3 localizados en el retículo sarcoplásmico hacia el citosol en donde, posteriormente se desencadena el proceso de contracción de las células del músculo liso vascular (Guyton., *et al*, 2011; Ávila, 2017). Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, se realizó una curva control concentración-respuesta contraída con NA [0.005 a 10 μM] y otra a la que se agregó previamente la CE_{50} [198.47 μM] de 6-Hidroxi flavona, los resultados del ensayo se muestran a continuación en la gráfica 4.



Gráfica 7. Determinación del efecto contráctil de NA en anillos de aorta aislada sin endotelio, en presencia y ausencia de la CE₅₀ [198.47 μM] de 6-OHF. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni ***p<0.001.

La gráfica 4, muestra una oposición total a la contracción inducida por NA en la que se preincubó la CE₅₀ de 6-Hidroxiflavona con respecto a la curva control, sugiriéndonos que el compuesto está teniendo comportamiento como antagonista alfa adrenérgico del tipo no competitivo o competitivo irreversible, los cuales se fundamentan a continuación: Primeramente, comenzaremos definiendo un antagonista, que es aquella molécula que impide la acción de un agonista al ocupar su sitio de acción o un sitio alostérico (Brenner *et al.*, 2019). Dicho esto, según Flower *et al*, 2018 describe que el antagonismo competitivo irreversible se produce cuando el antagonista se une al mismo sitio del receptor que el agonista, pero se disocia de los receptores muy lentamente, o no lo hace en absoluto, con

el resultado de que la ocupación por el antagonista no varía al añadir el agonista, es decir, ocurre una depresión del efecto máximo que no es vencible mediante el incremento de la concentración del agonista. Este efecto genera una curva dosis-respuesta similar a las de los antagonistas no competitivos, los cuales se comportan con afinidad al receptor, pero no al sitio de reconocimiento del agonista. En este caso, la acción del agonista queda anulada, sin que el incremento de su concentración permita alcanzar una ocupación máxima de receptores (Pazos, 2003), del mismo modo que ocurre en la gráfica antes mencionada.

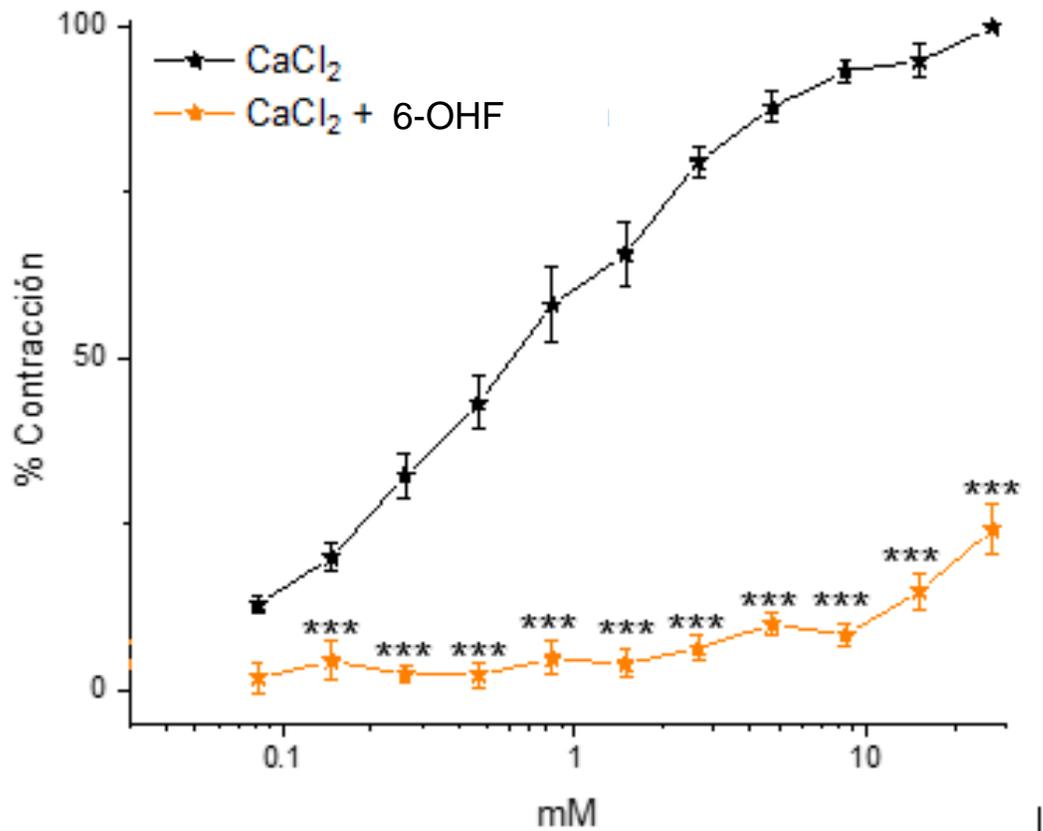
Dentro del proceso de regulación del efecto vasorrelajante, se encuentran implicados otros mecanismos, tales como la activación de canales de K^+ y el bloqueo de los canales de Ca^{2+} y con el propósito de conocer de manera más profunda el mecanismo de acción funcional de 6- hidroxiflavona, se decidieron estudiar de manera experimental estas vías, las cuales se describen ulteriormente.

Participación de los canales de calcio.

Desde los experimentos en 1883 de corazón aislado, se reportó la importancia del calcio en el mantenimiento de la actividad celular y Stiles extendió la investigación en la contracción de la musculatura lisa en 1901. Fue 60 años más tarde con la observación de Ringer, que los investigadores Kamada en Japón y Heilbrunn en los Estados Unidos, descubrieran el rol del calcio intracelular en la contracción de la musculatura. Este descubrimiento impulsó la búsqueda de agentes que bloquearan la acción del calcio, conocidos como bloqueadores de la función del calcio (Godfrain, 2017), lo que derivó en el hallazgo de bloqueadores de canales de calcio. A nivel fisiológico, el Ca^{2+} juega un papel fundamental en las células vasculares, ya que, además de cumplir la función de segundo mensajero, es esencial en el acoplamiento entre la excitación y la contracción (Muñoz, 2012), por lo que la entrada de este ion a través de los canales de calcio al medio intracelular será determinante en dichos procesos. Los canales de calcio son proteínas integrales de membrana, ubicuas, que forman poros a través de los

cuales se produce el flujo selectivo de calcio a favor electroquímico; estos se clasifican en función de su localización subcelular y en su mecanismo de activación, siendo uno de estos los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, los cuales se describen a continuación:

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son abiertos súbitamente en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citosol, la repolarización de la membrana produce el cierre de estos canales, cabe destacar que este tipo de canales tiene la característica de ser dependientes del tiempo, provocando una inactivación y todos los tipos de canales dependientes de voltaje son muy selectivos para el Ca^{2+} respecto al Na^+ o al K^+ . A su vez, este tipo de canales se subdividen en seis: tipo T, L, N, P, Q y R, y en las células del músculo liso vascular predominan los tipos T y L (Zamponi *et al.*, 2015). La regulación de los canales puede darse por la acción de hormonas y neurotransmisores que modifican su conductancia y fenómeno de activación y/o inactivación. El comportamiento puede llevarse a cabo directamente sobre el canal o a través de moduladores. A menudo la regulación se lleva a cabo por la fosforilación de proteínas kinasas activadas por segundos mensajero (Valle, 2006). Los canales tipo L, se activan por despolarizaciones más intensas de la membrana plasmática y tienen una constante de tiempo de un segundo, estos se encuentran altamente expresados en células del músculo liso vascular diferenciadas contráctiles (Sunagawa, 2010). En particular, los canales de calcio tipo L constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} a las células de la musculatura lisa vascular, su inactivación depende de la concentración de calcio que haya dentro de la célula y del potencial de membrana (Izaguirre *et al.*, 1998). Según se ha citado, los canales de calcio son un mecanismo de acción muy importante en la contracción del músculo liso vascular y su bloqueo representa al mismo tiempo un proceso de relajación, es por esta razón que se investigó si el compuesto 6-OHF actúa sobre esta vía, los resultados se expresan en la gráfica siguiente.



Gráfica 8. Determinación del efecto contráctil de CaCl₂ en anillos de aorta aislada sin endotelio, en presencia y ausencia de la CE₅₀ de 6- hidroxiflavona. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni ***p<0.001.

Tal como se observa en la gráfica 5, la curva a la cual fue preincubada la CE₅₀ del compuesto 6-OHF muestra una inhibición contráctil a pesar de inducir la constracción con CaCl₂ de manera acumulativa, comparada con la curva control a la cual, unicamente se agregaron las concentraciones de CaCl₂ donde evidentemente genera un proceso de contracción en los anillos de aorta aislada de rata. Este resultado sugiere que, a nivel fisiológico 6- HOF tiene un comportamiento como bloqueador de los canales de calcio. A continuación se sugiere el posible mecanismo de acción del compuesto basado en evidencia ya descrita por otros autores. De manera estructural, los canales de calcio son proteínas oligoméricas, constituidos por cuatro subunidades $\alpha 1$, β , $\alpha 2$ - δ , γ).

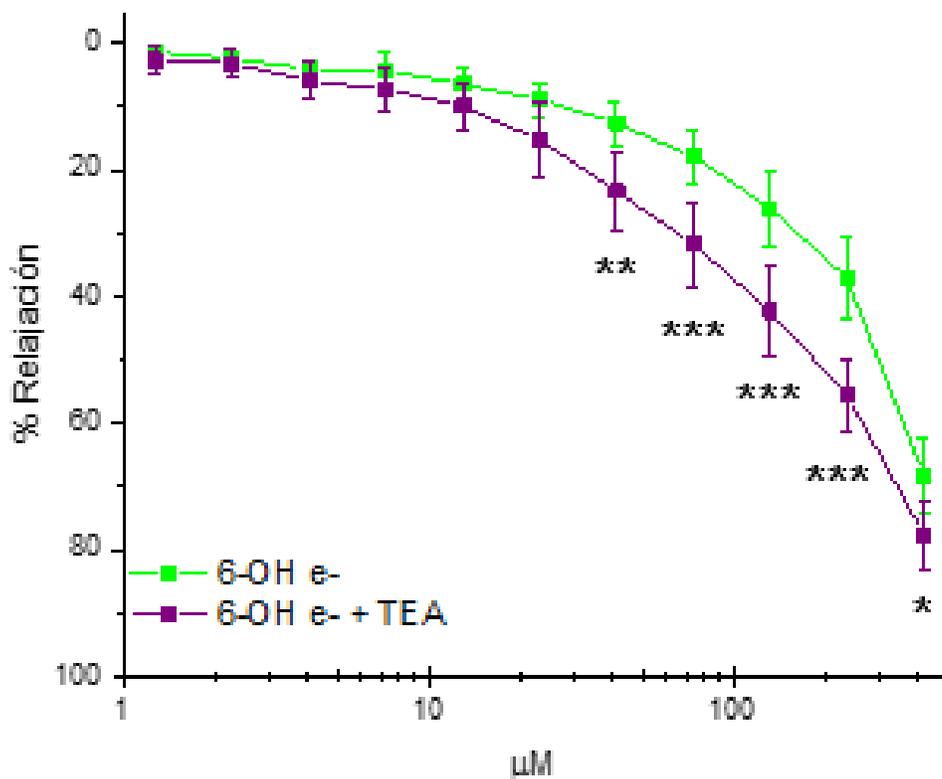
La subunidad principal es $\alpha 1$, una glicoproteína formadora del poro del canal para el paso de los iones de Ca^{2+} y el segmento S4 que actúa como un sensor de voltaje para responder a un estímulo despolarizante (Moreno *et al.*, 2005), y según Lozano *et al.*, 2020 los fármacos bloqueadores de canales de calcio se unen directamente a determinados segmentos de transmembrana de la subunidad $\alpha 1$ del canal, estos bloqueadores tienen la capacidad de unirse rápidamente a las células que presentan potenciales de membrana más despolarizados, lo que explica su mayor afinidad por las células musculares vasculares, generando de esta manera una disminución en la contractilidad. Con el objetivo de concluir este ensayo *ex vivo*, se decidió, además, indagar en la participación de 6-hidroxi-flavona sobre la apertura de los canales de K^+ , cuyos resultados se muestran en seguida.

Participación de la apertura de los canales de K^+ .

En una célula típica en reposo, la membrana es permeable selectivamente al K^+ y el potencial de membrana es ligeramente positivo respecto al potencial de equilibrio de K^+ . Esta permeabilidad en reposo ocurre gracias a que hay canales de potasio abiertos, al abrirse más de estos canales la membrana se hiperpolariza y la célula se inhibe (García, 2017), al mismo tiempo los canales de K^+ tienen la capacidad de regular la duración del potencial de acción. En el músculo liso vascular, su apertura está producida por los factores relajantes derivados de endotelio tales como endotelina y calcitonina (Nelson & Quayle, 1995), y la apertura de estos provoca la hiperpolarización de las células, cerrando los canales de calcio voltaje dependientes, inhibiendo la entrada de los iones de Ca^{2+} y su salida del RS. Esta acción provoca una disminución en la concentración de calcio y por consiguiente vasodilatación (Marrugat *et al.*, 2008).

Existen distintos tipos de canales de K^+ con diferentes bases moleculares que contribuyen a la regulación de la conductancia basal del K^+ en las células de la musculatura lisa: canales de potasio activados por voltaje (Kv), canales de potasio activados por Ca^{2+} (KCa), canales de potasio de larga conductancia (BK_{Ca})

canales de potasio rectificadores internos (K_{IR}), canales de potasio de dominio de 2 poros en tándem (K_{2P}) y canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Teramoto, 2006). Además, se ha descrito que los canales K_V y los BK_{Ca} , se encargan en gran medida del control del tono vascular (Fernández *et al.*, 2004). Los BK_{Ca} están muy involucrados en la patología en estudio y su incremento en la actividad de estos canales en las células del MLV puede ser un mecanismo compensador frente al incremento del tono vascular en la hipertensión (García, 2017). Conociendo estos antecedentes se decidió explorar la participación de la apertura de canales de potasio en el proceso de relajación ocasionado por la 6-Hidroxi flavona en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio. Para ello, se utilizó Tetraetilamonio (TEA), un inhibidor inespecífico de este tipo de canales, el cual ha sido utilizado en la investigación por diversos autores para establecer mecanismos que involucran el flujo de iones, en los que se encuentra involucrado el K^+ (Choi, 1991, Heginbotham & MacKinnon, 1992, Harder & Sperelakis 1979). Los resultados se expresan a continuación en la gráfica 6.



Gráfica 9. Determinación del efecto vasorrelajante de 6- hidroxiflavona en presencia del inhibidor de canales de K⁺ tetraetilamonio (TEA). ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc bonferroni **p<0.01 ***p<0.001.

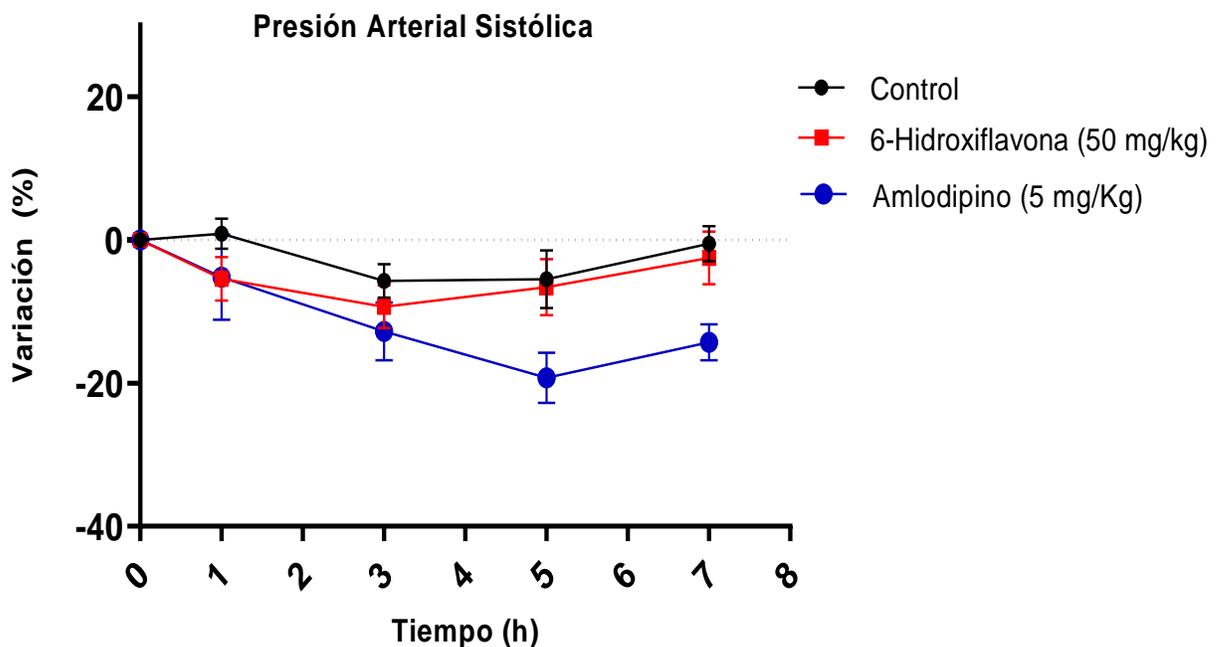
Al analizar la gráfica 6, se observa que la curva morada a la cual se agregó el compuesto 6-hidroxiflavona más TEA, persiste en un efecto vasorrelajante y, al compararlo con la curva color verde a la que únicamente se le agregaron las diluciones del compuesto de manera acumulativa, no presenta una diferencia significativa. Este resultado, nos lleva a la conclusión de que el efecto vasorrelajante observado por 6-hidroxiflavona no está mediado por la activación de los canales de potasio.

VII.3 Determinación del efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo* de 6-Hidroxi flavona en ratas SHR.

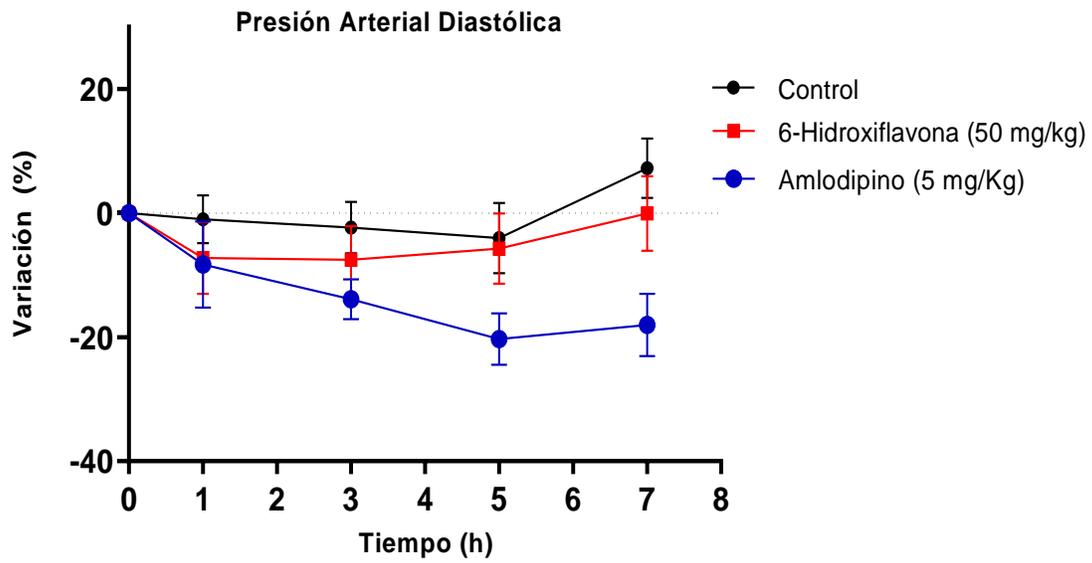
Las ratas SHR, constituyen un modelo de animales adecuado de hipertensión genética para estudiar la Hipertensión esencial en humanos, ya que reproducen muchas características de esta condición (Caniffi *et al.*, 2015). El origen de la rata espontáneamente hipertensa deriva en 1963 por Okamoto y Aoki de un cruzamiento selectivo entre un macho Wistar espontáneamente hipertenso y una hembra con la presión arterial ligeramente por encima de la media (Okamoto *et al.*, 1963). Se ha demostrado que las ratas SHR presentan resistencia a la insulina, determinados grados de dislipidemia, disfunción endotelial, aumento del estrés oxidativo, factores vasoconstrictores y disminución de la biodisponibilidad del NO (Mendizábal, 2013), de modo que, al realizar modelos *in vivo* nos proporcione datos más acercados a la patología en estudios. Por otro lado, los flavonoides son compuestos que no son lipofílicos, así que la presencia de grupos fenólicos tanto los conjugados sulfatados como los glicosilados, facilitan su eliminación. Para que un flavonoide pueda absorberse debe dividirse en una aglicona y un glicósido, este último tiene mayor solubilidad en agua, por tanto se absorberá más rápido. Sin embargo, la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. Por lo que, en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se dan a las 1.75 horas (Jiménez *et al.*, 2009). La transformación de estos compuestos se localiza en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de fase I en la que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos (Martínez *et al.*, 2002). En este punto se engloba el proceso de Farmacocinética, en donde el primer paso de absorción describe desde que se administra el compuesto y llega al compartimiento, para lo cual, es necesario que se disuelva y pueda alcanzar la circulación y tener acceso al sitio de acción y el fármaco que entra a la circulación es conocido como fracción disponible. Después de llegar a la circulación, el compuesto es distribuido hacia los órganos y tejidos por medio de los líquidos intersticial e intracelular. La distribución depende principalmente de las características fisicoquímicas como la

liposolubilidad, carácter ácido o básico, capacidad para atravesar membranas biológicas y unión a proteínas plasmáticas. Posteriormente, el compuesto experimenta el proceso de metabolismo en el cual la función principal es finalizar la actividad biológica de la molécula y producir metabolitos que faciliten la última etapa que es la eliminación del organismo (Rang *et al.*, 2007).

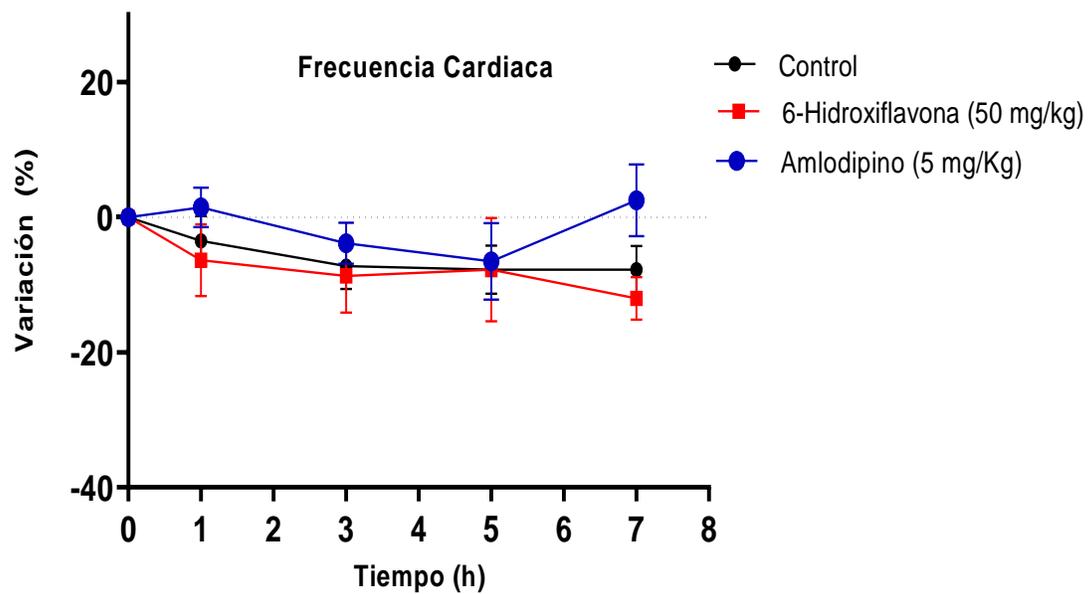
Con base en lo anterior, se decidió proceder con la metodología para este ensayo, con la finalidad de conocer el efecto antihipertensivo de 6-hidroxi flavona en un modelo *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas. A continuación se muestran los resultados obtenidos.



Gráfica 10. Medición de la presión sistólica en ratas SHR en un modelo *in vivo*.



Gráfica 11. Medición de la presión diastólica en ratas SHR en un modelo *in vivo*.



Gráfica 12. Medición de la Frecuencia cardiaca en ratas SHR en un modelo *in vivo*.

Las gráficas obtenidas de la evaluación del efecto antihipertensivo en ratas SHR, mostraron que no existe una disminución relevante en la presión arterial sistólica, diastólica y tampoco una disminución de la frecuencia cardiaca de 6-hidroxi flavona a la dosis evaluada de 50 mg/kg, comparado con el grupo control, al cual se administró únicamente Tween 80 al 3% y DMSO al 2%, esto con la finalidad de corroborar que el vehículo no influyera sobre la presión arterial.

El hecho de que no se observe un efecto en la disminución de la presión arterial, puede asociarse a distintas causas tales como vía de administración, farmacocinética, características fisicoquímicas del compuesto y su biodisponibilidad. La vía de administración oral es una de las vías enterales más comunes ya que representa una manera cómoda al momento de aplicar un fármaco, pero al mismo tiempo experimenta algunas desventajas como la destrucción del compuesto por actividad enzimática, absorción irregular o metabolismo de primer paso en el hígado (Flores, 2014), dichas características estarán directamente relacionadas con la farmacocinética del compuesto, en las cuales se comprenden los procesos de ADME. De igual manera, la biodisponibilidad es un factor determinante en el efecto farmacológico y su valor puede estar afectado también por las características fisicoquímicas del compuesto y por la solubilidad de éste (Martínez *et al.*, 2002). Tal es el caso de esta molécula que, al presentar pocos grupos funcionales OH y al ser un cristal, lo convierte en un compuesto poco polar lo que dificulta la capacidad de disolverse en un vehículo. Sin embargo, cabe destacar que, al momento de preparar las muestras que se les administraron a los animales, el compuesto quedó sedimentado en el vehículo, dicha característica evidencia problemas con la solubilidad.

La solubilidad es otro factor muy importante en la determinación de la velocidad y el grado de absorción de fármacos a nivel gastrointestinal después de su administración (Thomas *et al.*, 2006). Para poder mejorar la solubilidad de un fármaco existen algunas estrategias que consisten en el uso de surfactantes, cosolventes, ligeras variaciones de pH, disminución del tamaño de partícula o síntesis de la sal del compuesto (Castillo *et al.*, 2018; Labastidas *et al.*, 2006) y,

con base en los resultados que se obtuvieron, se sugiere indagar más en las opciones que existen para la mejora de la solubilidad de los compuestos orgánicos.

VIII. CONCLUSIONES

El compuesto 6- Hidroxiflavona presentó un efecto vasorrelajante parcialmente dependiente de endotelio, actuando a través de diversos mecanismos de acción en los que se incluyen la producción de Óxido Nítrico, antagonismo alfa adrenérgico del tipo no competitivo o competitivo irreversible en receptores adrenérgicos y un bloqueo de los canales de calcio tipo L.

El ensayo *in vivo* realizado en ratas SHR con 6- hidroxiflavona, no demostró un efecto antihipertensivo, este resultado está asociado a la baja solubilidad que presenta el compuesto.

IV. BIBLIOGRAFÍA

1. (GPC, 1015) Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial en el Adulto mayor y situaciones especiales, México: Secretaria de Salud; 2015
2. (Flores, 2014) Flores, J. Farmacología Humana, 2014. *España, edición, 6.*
3. (Caja, 2018) Caja, L. (2018, junio). Papel Del Endotelio En La Enfermedad Cardiovascular (Trabajo De Fin De Grado). Universidad Complutense, Madrid.
4. (Daiber *et al.*, 2017) Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V. V., Muzykantov, V. R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., And Münzel, T. (2017) Targeting Vascular (Endothelial) Dysfunction. *British Journal Of Pharmacology*, 174: 1591– 1619. Doi: 10.1111/Bph.13517.
5. (Touyz *et al.*, 2017) Touyz, R. M., Alves-López, R., Ríos, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular Smooth Muscle Contraction In Hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529-539.
6. (Vanhoutte *et al.*, 2016) Vanhoutte, P. M., Zhao, Y., Xu, A., & Leung, S. W. (2016). Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, And Misfortunes of The Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circulation Research*, 119(2), 375-396.
7. (Bobin *et al.*, 2016) Bobin, P., Belacel Ouari, M., Bedioune, I., Zhang, L., Leroy, J., Leblais, V. & Vandecasteele, G. (2016). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases In Heart and Vessels: A Therapeutic Perspective. *Archives Of Cardiovascular Diseases*, 109(6-7), 431-443.
8. (Zamponi *et al.*, 2015) Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, And Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821-870.
9. (Puyol *et al.*, 2001) Puyol, D. R., Rivero-Vilches, F., De Frutos, S., Puyol, M. R., & Saura, M. (2001). Guanilato Ciclasas: Procesos Fisiológicos Mediados Por Gmpc. *Nefrología*, 21(3), 233-239.

10. (Harder *et al.*, 1979) Harder & Sperelakis 1979, Harder, D. R., & Sperelakis, N. I. C. K. (1979). Action Potentials Induced in Guinea Pig Arterial Smooth Muscle by Tetraethylammonium. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 237(1), C75-C80.
11. (La Jornada) La Jornada. Usan plantas medicinales casi 80% de los países en desarrollo, según la OMS. [En línea]. La Jornada. 24 de enero, 2013. <<https://www.jornada.com.mx/2013/01/24/ciencias/a02n1cie>> [Consulta: 28 agosto 2019]
12. (Herrera, 2012): Eugenia Herrera Guerra. (2012). Adherencia Al Tratamiento En Personas Con Hipertensión Arterial. S.F, De Avances En Enfermería Vol. Xxx N.º 2
13. (Teramoto, 2006) Teramoto, N. (2006). Physiological Roles Of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Smooth Muscle. *The Journal Of Physiology*, 572(3), 617-624.
14. (Nelson & Quayle, 1995). Nelson, M. T., & Quayle, J. M. (1995). Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 268(4), C799-C822.
15. (Choi, 1991) Choi, K. L., Aldrich, R. W., & Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium Blockade Distinguishes Two Inactivation Mechanisms in Voltage-Activated K⁺ Channels. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 88(12), 5092-5095.
16. (Godfraind, 2017) Godfraind, T. (2017). Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. *Frontiers In Pharmacology*, 8, 286.
17. (Herrera, 2012): Eugenia Herrera Guerra. (2012). Adherencia Al Tratamiento En Personas Con Hipertensión Arterial. S.F, De Avances En Enfermería Vol. Xxx N.º 2
18. (Godfraind, 2017) Godfraind, T. (2017). Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. *Frontiers In Pharmacology*, 8, 286.

19. (Ávila, 2017): Ávila, M. (2019) Comunicación funcional entre canales de Ca^{+2} tipo L y canales de Ca^{+2} activados por reservorios y su regulación del tono vascular (tesis doctoral). Universidad de Sevilla, Sevilla.
20. (Okamoto *et al.*, 1963) Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, 27(3), 282-293.
21. (Evans, 1991) Evans. (1991). *Farmacognosia*. México D.F: Interamericana McGraw Hill.
22. (Cortijo *et al.*, 1992) Cortijo, F. J. T., & Ramos, J. L. C. O. (1992). Estudio de la acción de los fármacos agonistas de los receptores adrenérgicos alfa-2 y su antagonista el atipamezol en la especie porcina. Universidad Complutense de Madrid.
23. (Izaguirre *et al.*, 1998) Izaguirre, V., & Zavaleta, A. I. (1998). Canales de calcio voltajes dependientes. *Ciencia e Investigación*, 1(1), 49-61.
24. (Kuklinski, 2000) Claudia Kuklinski. (2000). *Farmacognosia*. Barcelona: Omega.
25. (Rondón *et al.*, 2002) Rondón, S., Cluet, I., Rossell, M., & Alvarez, T. (2002). Niveles séricos de óxido nítrico en adolescentes con antecedentes hereditarios de hipertensión arterial sistémica. *Arch Venez Puer Ped*, 65(4), 159-164.
26. (Pazos, 2003) Pazos, A. (2003). *Acciones de los fármacos I. Interacciones fármaco y receptor*. Flórez J.
27. (Velázquez *et al.*, 2005) Fiedler-Velásquez, Eduardo, y Gourzong-Taylor, Charles. (2005) Epidemiología y patogenia de la hipertensión arterial esencial, rol de angiotensina II, óxido nítrico y endotelina. *Acta Médica Costarricense*, 47 (3), 109-117. Recuperado el 16 de octubre de 2019 de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022005000300003&lng=en&tlng=es.
28. (Martinez *et al.*, 2006) Labastidas, I., & Martínez, F. (2006). Aspectos termodinámicos de la solubilidad acuosa de algunas sales orgánicas de interés farmacéutico. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25(1), 55.

29. (Valle, 2006) 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.
30. (Rang & Dale, 2007) Rang, H. P., & Dale, M. M. (2007). Rang and Dale's pharmacology. Elsevier.
31. (Jiménez *et al.*, 2009) Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, 52(2), 73-75.
32. (Sunagawa, 2010) Sunagawa, M. (2010). Involvement of Ca²⁺ channel activity in proliferation of vascular smooth muscle cells. Pathophysiology, 17(2), 101-108.
33. (Jaffrey, 2012) Jaffrey S, MD & PhD. (2012). Óxido Nítrico. En Farmacología Básica y Clínica (331-337). México, D.F: Mc Graw Hill.
34. (Muñoz, 2012) Muñoz, E. (2012). Participación de los canales de calcio y las mitocondrias en la proliferación de las células de músculo liso y vascular.
35. (Renna *et al.*, 2013) Nicolas Renna y Roberto Miatello. (2013). Fisiología del músculo liso vascular. En Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. (172-175). Buenos Aires, Argentina: Inter médica.
36. (Benowitz, 2013) Neal L. Benowitz, MD. (2013). Fármacos cardiovasculares y renales. En Farmacología Básica y Clínica (169-188). México, D.F: Mc Graw Hill.
37. (Kenneth, 2013) Kenneth S. Saladin. (2013). Anatomía y Fisiología La unidad entre forma y función. México D.F: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S. A. De C. V.
38. (Castillo, 2013) Mendizábal Castillo, Y. (2013). Caracterización de la función macro-y microvascular en un modelo animal de hipertensión (rata SHR) y de síndrome metabólico (rata SHROB). Efectos de las glitazonas y papel del tejido adiposo perivascular.

39. (Melo, 2016) Lima Melo, J. (2016). Efecto hipotensor e inhibidor de la vasoconstricción por bloqueo de canales de calcio del extracto metanólico de hojas hierba luisa (*Cymbopogon Citratus*) en ratas normotensas y anillos vasculares aórticos de rata.
40. (García, 2017) García, S. A. (2017). Título: Implicación De Los Canales De Potasio Activados Por Calcio En La Patología Cardiovascular (Doctoral Dissertation, Universidad Complutense).
41. (Castillo *et al.*, 2018) Castillo, A., & Acelotl, M. (2018). Investigación documental: importancia de la biodisponibilidad en el proceso de desarrollo de medicamentos.
42. (Brenner *et al.*, 2019) Brenner, G. M., & Stevens, C. W. (Eds.). (2019). Farmacología básica. Elsevier.
43. (Martínez *et al.*, 2002) Martínez-Flórez, S., González-gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 7 17(6), 271-278.
44. (Best & Taylor, 2003) Best & Taylor: bases fisiológicas de la práctica médica, Mario A. Dvorkin y Daniel P. Cardinali. 13ª Edición. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2003.
45. (Flores, 2018) Flores-Flores A. Determinación del efecto antialérgico, toxicológico y farmacocinético de 6-hidroxiflavona para su potencial desarrollo como fármaco antiasmático. Tesis doctoral. Cuernavaca, Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2018.
46. (OMS, 2013) Organización Mundial de la Salud, 2013 <https://www.who.int/topics/hypertension/es/> Citado el: 31 de agosto 2019
47. (Torres *et al.*, 2010) Torres M, Figueroa M, Hernández O, Ibarra M, Navarrete G, Estrada S. (04 de noviembre de 2010). Vasorelaxant effect of flavonoids through calmodulin inhibition: Ex vivo, in vitro, and in silico approaches. Elsevier, 19, 542-546.
48. (Williams *et al.*, 2019) Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., & Burnier, M. (2019). Guía ESC/ESH 2018 sobre el

- diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol*, 72(2), 160.
49. (Vademecum, 2016): https://www.vademecum.es/equivalencia-listadaflon+500+comp.+recub.+450%2F50+mg-espana-c05ca53+p1-es_1 Consultado el 24 de octubre de 2019.
50. (Kern Pherma SL, 2013) Kern Pherma SL 2013 https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/p/77434/P_77434.html.pdf Consultado el 24 de octubre de 2019.
51. (Vanhoutte *et al.*, 2016) Paul M. Vanhoutte, Yingzi Zhao, Aimin Xu, Susan W.S. Leung. (2016). Thirty Years of Saying NO. Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circulation Research*, 378.
52. (Pierre Fabre Ibérica S.A., 2017) Pierre Fabre Ibérica, S.A., 2017: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/p/59471/P_59471.pdf. Consultado el 24 de octubre del 2019.
53. (Chen, 2019) Michael A. Chen, 2019. Consultado el 24 de octubre de 2019 https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19194.htm
54. (Mahmood *et al.*, 2018) Mahmood, S., Shah, K., U., Khan, T., M., Nawaz, S., Rashid, H., Ali Baqar, S., W., Kamran, S. (2018). Non-pharmacological management of hypertension: in the light of current research.
55. (Sigma Aldrich, S.F De L-NAME, 2020): National Center for Biotechnology Information (2020). Pubchem Substance Record For SID 24278011, Source: Sigma-Aldrich. Retrieved October 12, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24278011>
56. (Heginbotham & Mackinnon, 1992). Heginbotham, L., & Mackinnon, R. (1992). The Aromatic Binding Site for Tetraethylammonium Ion on Potassium Channels. *Neuron*, 8(3), 483-491.
57. (NGC, 2019) National Guideline Centre (UK). (2019). Hypertension in adults: diagnosis and management. National Institute for Health and Care Excellence (UK).

58. (Romero et al., 2018) Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., & Rivera-Dommarco, J. (2019). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: metodología y perspectivas. *salud pública de méxico*, 61(6, nov-dic), 917-923.
59. (Zhao et al., 2000) 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.
60. (Caniffi et al., 2015) Caniffi, C., Sueiro, L., Bouchet, G., Romero, M., Barrionuevo, E., Arranz, C., & Costa, M. (2015). Cardiovascular Response to Chronic Administration of C-type Natriuretic Peptide in Spontaneously Hypertensive Rats. *Argentine Journal Of Cardiology*, 83(2), 94-100. doi:10.7775/ajc.83.2.4292
61. (Fernández et al., 2004) Fernández-Fernández, J. M., Tomás, M., Vázquez, E., Orio, P., Latorre, R., Sentí, M., ... & Valverde, M. A. (2004). Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 113(7), 1032-1039.
62. (García et al., 2011) García, X., Mateu, L., Maynar, J., Mercadal, J., Ochagavía, A., & Ferrandiz, A... (2011). Estimación del gasto cardíaco: Utilidad en la práctica clínica. Monitorización disponible invasiva y no invasiva. *Medicina Intensiva*, 35(9), 552-561. Recuperado en 03 de febrero de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912011000900004&lng=es&tlng=es.
63. (Jiménez et al., 2020) Lozano Jiménez, Yenny Yolanda, & Sánchez Mora, Ruth Mérida. (2020). Calcium channels as a pharmacological target. *Nova*, 18(34), 57-76. Epub January 04, 2021. <https://dx.doi.org/10.22490/24629448.3926>
64. (Marrugat et al., 2008) Marrugat, J., López-López, J. R., Heras, M., Tamargo, J., & Valverde, M. (2008). Red Cardiovascular HERACLES. *Revista Española De Cardiología*, 61(1), 66-75.

65. (Moreno *et al.*, 2005) Moreno-Martinez, F. L., Cepero, S., López, O., Ramírez, M., & Monteagudo, L. (2005). Aspectos clásicos y actualizados acerca de los bloqueadores de los canales de calcio. *Revista PortalesMédicos. com*, 280(1).
66. (Thomas *et al.*, 2006) Thomas, V. H., Bhattachar, S., Hitchingham, L., Zocharski, P., Naath, M., Surendran, N., ... & El-Kattan, A. (2006). The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2(4), 591-608.
67. (Zavaleta *et al.*, 2016) Zavaleta Martínez-Vargas, A., Salas Arruz, M., & Zavaleta Boza, C. (2016). Bioequivalencia de medicamentos in vivo e in vitro (Bioexención). *Diagnóstico (Perú)*, 17-27.
68. (Campos *et al.*, 2018) Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., & Barquera, S. (2018). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. *Ensanut MC 2016. salud pública de México*, 60, 233-243.
69. Ramos Morales, L. E. (2015). La adherencia al tratamiento en las enfermedades crónicas. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat*, 16(2), 175-189.
- 70.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 13 de mayo de 2021
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0067/2021

**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 **“Determinación del potencial antihipertensivo de 6-hidroxi flavona y su mecanismo de acción funcional”** presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Janneth Alexia Carrillo Rodríguez, (20161006930)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. Antonio Monroy Noyola

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Angélica Flores Flores

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dra. Priscila Sinaí Rendón Vallejo

**ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaria de Docencia

Cp Archivo
Cp. BEDM

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:2021-05-13 20:44:26 | Firmante

MjuxLfVyFERnfmlKf8WhEq+rgjXqwdbM86osu6lg4JvjI6ROvgejyG0pa1mDLjAgvc34KXKq/0WaKY9AIWuFTvTEWuIHB3xVRKDWiwoOVtuGAeh2U4XBgf0tJU0APKRxHH93GTP
NjBq83BbYvtrMPFA+niIPBVUFJSbE4LtljvlszuC9P1watOB6OE5ES2wxUcEH1fT+jWL9gKaZythZf5Oer4c+ZdKFdPmgJzJ99fZeDKtz9ObFJAwAjUy9wpt/PptUIHc0UQJknnGSJcT
c14TM4wGFVjJQS8WIFwIMsu/RVuBtbHKBIW2AG8fJ4VCMzQR940WHVB7JNbACy03c9g==

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



[ucNjR7](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7gVqVgH2717bvsBvqHZYL6cJM9BRJ4f>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

ANGELICA FLORES FLORES | Fecha:2021-05-14 22:16:31 | Firmante

HOAVfyCKGM9uirtBJosbtLs7Nks/s0QG/8P5pq+KluHboSkYGackYt2ngyk80jZqN9lb7qJMd1zcdKobh6N7vLVX1q2DfwPXJHJ1bAnZydg8gF/JK/7hkQ2JNBf3uh77xqCrbZZnEqMg5n93jgyCKfHXsOD+tuQTYldTpWohoiwiVJb/EtdXDWmU2i4BMcA+J48GBnS/f3d7v2oE/oPKQH5P5e8r/PIW+ZrEgh0jFLKku+7Xep7MPICWxP4GQxKDErCQ+MU7G6VIA/jJfIEEP59FnsqyDnaY03r4O2/qLvOfE82jH7vHunEwoitBOB/LkwQzjTtg69QZxs5JMazQ==

RAFAEL VILLALOBOS MOLINA | Fecha:2021-05-15 07:19:21 | Firmante

dYNwvnuLuvrXRxo0HLX1n13hFExk9lemZSMQBHaTddMiEk3rb+9rV4nLkdj/l85U1MU3O2DEuaz5SIKVHpwXo7YnTufuQdEvVv0Rmk14vWiB2P5IKSSaXbxMWSqENtBMEk/9u2EQE/pbopVEQTQIDM7aXYyq/BDcYxy09YavKAluQt5gpPqfJ8kd3rEXc48FVRXMF1Y3JpmfkYf5ypv8sytnvKN30vhQyaMnF/AwSnOdPh/oQN6/5xnclSKA7D62w/nYRxA0ZJcOlxY9vIsB7cw/6vawgP9R1hogd2GeCWI3ZTgvnXIGcP2bJCA8qOMMJBPJ/capvUPIX2OQ==

ANTONIO MONROY NOYOLA | Fecha:2021-05-17 19:02:13 | Firmante

CVKpuT/MfAArBtNWCuT0OkzW/ulES+8UNAkdv1EmD++dfjYJWtyrg6VnLLIqVL/GHaY07lyMU6n8ZLTVcuq7lqGf8SgMycG9o6yeDyzo4RoyQ2oy5CqGmtb6G9xouwntrfzZo4yWqiuZhr3PHSpGtEBLOtb2K1RpiPoEVcBvF8RDsmeYt+7Bv+DJB4Es5liw7SQRviAnjBB0wo0T631EPQY/73oxG3Wru4mnrjUDv4EYV05bpeFf2uVr6m8KDOqvE0jvVXyd0FwclOY697XLEx/29PJBV/VoN7hdPCw1BpSESS04FViHz9E830BtNdJqG0tQhB2ZtSDdw48pg==

PRISCILA SINAI RENDON VALLEJO | Fecha:2021-05-18 12:19:43 | Firmante

ndoX0rDMiONQkaTA3+anvAiv+2ybPyWfxUrShdWV0sbwDDt8TgcTxnTFz6nK6BPbuH7UEoNvjZiqfCDx1MqPrRi5Vfpdv9dXB5XRbqge/ULUeGpkgSo7/OjZK3H0fPXQ9ksQT+vNMIPeiz2EXy/xJ0w46DIFPEde6NUzzYDqr1YKD6d5bV5JR57SwfGyCILBLVY7939XEbvX9a9HNaams5bLDG+gRZHLLKS3BoboRAT4MuWDA241VqGKuG9U9mpoO5heWbGM1afHYp84Xc798ibM6cAu2J26u2N7s4CxEW4z98sf+qPACH3AjXymIKm0j8a71A7MYRrLOxeaaj+g==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-05-18 22:55:56 | Firmante

T8MN+6QkkEdX9QGsPc0ZnBrO24lvixyJ418jzqn4Lf5h32907DXFqzIUUrozL9DnUR2KsjFE7DLJ8MNY4r5a5DirUeu9eJ6w/9hVvnTIVLlxscz4M3R7GGuqEsCFGOZafEes9VkpMRTA9Rz5rLGFACgHovBJZAvYAM6w5BZ0QLp4F1Pv0SAuTsRmdQFoVAw0/r3tc+VBwulWiaZuj0cLkKPhLmRILEnH0EP9W1dw6FOE6kihIkzA/vV90+HW4lzXOh/u9WXz2sXgJ37mIShracCL7RR1Ki9EdzVyoyuyqEhABKEtx2WJbxsJghOyomErMTpMnFkAzfHSrzikGmA==

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



BSzRhw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/das5a08RNsj7qOGI5gDuQ3GqxKYA2BH>

