



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Evaluación de la actividad vasodilatadora en
anillos aislados de aorta de derivados de
flavonoides obtenidos de *Croton
schiedeanus***

Andrea Milena Barón Peña

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
Año 2020

Evaluación de la actividad vasodilatadora en anillos aislados de aorta de derivados de flavonoides obtenidos de *Croton schiedeanus*

Andrea Milena Barón Peña

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacología

Director:

Ph.D. Mario Francisco Guerrero

Línea de Investigación:

Obtención de análogos de metabolitos activos de "Badea, Papa, Vira vira y Almizclillo"
para el escalamiento de un prototipo farmacológico con efectos cardiovasculares

Grupo de Investigación:

FARMOL

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2020

A Dios, la razón de mi existencia; a mi madre, mi mayor ejemplo a seguir y a mi hijo, el motor de mi vida.

Agradecimientos

A Dios el dueño de mi vida, solo tú sabes cuándo es el momento y agradezco este, uno de los más gratificantes en mi existir.

Al profesor Mario Francisco Guerrero, quien depositó su confianza en mí y me brindó la oportunidad de aprender, igualmente a los compañeros del grupo de investigación FARMOL por su compañerismo y retroalimentación.

A los docentes del departamento de Farmacia quienes con amor y vocación transmiten su conocimiento en el proceso de formación académica de los estudiantes. A los profesores Luis Fernando Ospina, Fleming Martínez, Yolima Baena, Yoshie Hata, Carlos Maldonado, los recordare con mucho cariño.

A Estefy y Yuliana, mis compañeras de lucha; gracias por su amistad, las quiero mucho.

A mi familia, por todo el apoyo que me han brindado, especialmente a mi madre, la más grandiosa mujer del mundo, siempre creyendo en mí y sacrificándolo todo por amor. A mi abuelo, magno en sabiduría, el mejor hombre y padre del mundo. A Sindy la mejor hermana y tía, te quiero demasiado. A Gaby, Sofi y Leidy por hacer parte de mi vida.

A mi hijo, mi pequeño, mi motor, mi mundo, mi todo. Eres la razón de tantas ganas de crecer personal y profesionalmente, haces de mí una mejor persona, una mejor mujer, mi polo a tierra. Te Amo y te necesito.

Resumen

Croton schiedeanus ejerce efectos vasodilatadores vinculados con la capacidad de sus metabolitos flavonoides, entre ellos ayanina y quercetina, para captar radicales libres y activar la ruta del óxido nítrico (Guerrero M et al, 2002; Carron R et al, 2010; Páez M et al, 2013).

Considerando previos ensayos que mostraron que la actividad biológica que caracteriza cada flavonoide depende de la disposición de los grupos funcionales sobre la estructura nuclear (Kumar S y Pandey A, 2013; Cartaya O y Reynaldo I, 2001), se llevó a cabo un trabajo en conjunto con el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia (Grupo: Estudio Químico y de Actividad Biológica de *Rutaceae* y *Myristicaceae* Colombianas) en el que se obtuvieron por semisíntesis 5 derivados con sustituyentes metoxilo y acetilo de ayanina y quercetina, metabolitos que fueron aislados de *Croton schiedeanus* (Chiappe-Pulido A, 2013).

En este estudio se procedió a evaluar el efecto relajante vascular de estos compuestos y se establecieron aproximaciones sobre la estructura óptima de la flavona para generar actividad vasodilatadora. Así mismo, se determinó el posible papel que la ruta metabólica NO/GMPc desempeña en su respuesta.

Los derivados flavonoides 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O-metilquercetina (TADMQ) y 7-O-metilquercetina (MQ) generaron relajación de anillos vasculares aislados de aorta de rata SHR previamente contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), siendo posible su implementación en ensayos *in-vivo* para determinar su potencial en el tratamiento de hipertensión arterial. El estudio sustenta el planteamiento de que la mayor actividad vasorelajante que le confiere su estructura química, se relaciona con la presencia de grupos metoxilo en posición 3 y 7 de los carbonos de los anillos C y A y grupos hidroxilo en posición 3' y 4' del anillo B.

Los ensayos con L-NAME y ODQ muestran cambios en la curva de concentración respuesta indicando que la vía metabólica del NO/GMPC está involucrada en su modo de acción, aunque, deben estar asociados otros mecanismos que vale la pena evaluar en próximas investigaciones, porque la relajación ejercida por las moléculas TADMQ, MQ, quercetina y ayanina sobre los anillos de aorta de ratas SHR no se inhibe totalmente.

Palabras clave: Vasodilatador, Vasoconstrictor, Óxido Nítrico, Flavonoides, *Croton schiedeanus*, Derivados flavonoides, Hipertensión arterial, L-NAME, ODQ.

Abstract

Croton schiedeanus has vasodilator effects linked to the ability of its flavonoid metabolites, including ayanine and quercetin, to capture free radicals and activate the nitric oxide pathway (Guerrero M et al, 2002; Carron R et al, 2010; Paez M et al, 2013).

Considering previous trials that showed that the biological activity that characterizes each flavonoid depends on the disposition of the functional groups on the nuclear structure (Kumar S and Pandey A, 2013; Cartaya O and Reynaldo I, 2001), a work was carried out in conjunction with the Department of Chemistry of the National University of Colombia (Group: Chemical and Biological Activity Study of Rutaceae and Colombian Myristicaceae) in which 5 derivatives with methoxy and acetyl substituents of ayanine and quercetin were obtained by semisynthesis, metabolites that were isolated from *Croton schiedeanus* (Chiappe-Pulido A, 2013).

In this study, the vascular relaxing effect of these compounds was evaluated and approximations were established on the optimal structure of flavone to generate vasodilator activity. Likewise, the possible role that the NO / cGMP metabolic pathway plays in its response was determined.

The flavonoid derivatives 3'-4'-5-tri-acetyl-3-7-di-O-methylquercetin (TADMQ) and 7-O-methylquercetin (MQ) generated relaxation of isolated vascular rings of SHR rat aorta previously contracted with phenylephrine ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), its implementation being possible in tests to determine its potential in the treatment of hypertension. The study supports the approach that the greater relaxing vessel activity conferred by its chemical structure is related to the presence of methoxy groups in position 3 and 7 of the carbons of rings C and A and hydroxyl groups in position 3 and 4' of ring B.

The trials with L-NAME and ODQ show changes in the response concentration curve indicating that the metabolic pathway of the NO / GMPC is involved in its mode of action, although other mechanisms that are worth evaluating in future research should be associated, because The relaxation exerted by the TADMQ, MQ, quercetin and ayanine molecules on the aortic rings of SHR rats is not completely inhibited.

Keywords: Vasodilator, Vasoconstrictor, Nitric Oxide, Flavonoids, *Croton schiedeanus*, Flavonoid derivatives, Hypertension, L-NAME, ODQ.

Contenido

| | Pág. |
|---|--------------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras | XV |
| Lista de tablas | XVI |
| Lista de Abreviaturas | XVIII |
| Introducción | 1 |
| Objetivos | 3 |
| 1. Regulación del tono del músculo liso vascular | 5 |
| 1.1 Contracción del músculo liso | 5 |
| 1.2 Relajación del músculo liso..... | 7 |
| 1.2.1 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) | 8 |
| 1.2.2 Óxido Nitrico | 8 |
| 1.2.3 Prostaciclina I2..... | 9 |
| 2. Hipertensión Arterial | 11 |
| 2.1 Fisiopatología de la HTA..... | 12 |
| 2.1.3 Factores determinantes de la presión arterial..... | 12 |
| 2.1.2 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)..... | 13 |
| 2.1.3 Endotelinas (ETs)..... | 13 |
| 2.2 Tratamiento de la HTA..... | 14 |
| 3. Descripción de Croton schiedeanus | 17 |
| 3.1 Flavonoides | 19 |
| 4. Antecedentes | 21 |
| 4.1 Obtención de los Compuestos Semisintetizados | 22 |
| 5. Metodología | 29 |
| 5.1 Diseño experimental | 29 |
| 5.1.1 Animales experimentales | 29 |
| 5.1.2 Compuestos Semisintetizados | 29 |
| 5.1.3 Modelo de aorta aislada de rata | 30 |
| 6. Resultados y Discusión | 33 |
| 6.1 Resultados..... | 33 |
| 6.1.1 Evaluación de la actividad relajante de los Derivados Flavonoides | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6.1.2 | Evaluación de la ruta metabólica NO/GMPc | 36 |
| 6.1.2.1 | Ayanina vs L-NAME vs ODQ..... | 36 |
| 6.1.2.2 | Quercetina vs L-NAME vs ODQ..... | 37 |
| 6.1.2.3 | TADMQ vs L-NAME vs ODQ..... | 38 |
| 6.1.2.4 | MQ vs L-NAME vs ODQ..... | 40 |
| 6.2 | Discusión..... | 41 |
| 6.2.1 | Vasorelajación y relación estructura - actividad | 41 |
| 6.2.2 | Ruta metabólica NO/GMPc..... | 44 |
| 7. | Conclusiones y recomendaciones | 49 |
| 7.1 | Conclusiones..... | 49 |
| 7.2 | Recomendaciones..... | 48 |
| A. | Anexo: Procesamiento estadístico de los datos | 49 |
| | Bibliografía | 58 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1: Activación de la contracción del músculo liso. | 5 |
| Figura 2: Regulación del tono del músculo liso vascular..... | 6 |
| Figura 3: Equema fisiopatológico de la hipertensión arterial | 12 |
| Figura 4: Hojas de <i>Croton schiedeanus</i> | 17 |
| Figura 5: Estructura de la molécula 3,7,4'-tri-O-metilquercetina | 18 |
| Figura 6: Estructura de la molécula de 3,7-di-O-metilquercetina..... | 18 |
| Figura 7: Estructura general de los flavonoides | 19 |
| Figura 8: Acciones cardiovasculares de los flavonoides | 20 |
| Figura 9: Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios . | 24 |
| Figura 10: Estructura de la molécula de 3'-4'-di-acetil-3-7-di-O-metil quercetina.... | 25 |
| Figura 11: Estructura de la molécula de 3'-4'-5-triacetil-3-7-di-O-metil quercetina . | 25 |
| Figura 12: Estructura de la molécula de 3'-acetil-3-7-4-tri-O-metil quercetina | 26 |
| Figura 13: Estructura de la molécula de 3,7,3'-4'-tetra-O-metil quercetina | 26 |
| Figura 14: Estructura de la molécula de 7-O-metil quercetina..... | 26 |
| Figura 15: Curva concentración respuesta de los derivados flavonoides, ayanina, quercetina y el control..... | 33 |
| Figura 16: Curva concentración respuesta de MQ, TADMQ, ayanina, quercetina y el control | 35 |
| Figura 17: Relajación inducida por ayanina en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ..... | 36 |
| Figura 18: Relajación inducida por quercetina en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ..... | 37 |
| Figura 19: Relajación inducida por TADMQ en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ..... | 39 |
| Figura 20: Relajación inducida por MQ en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ..... | 40 |

Lista de tablas

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1: Sitio de acción de los fármacos vasodilatadores | 8 |
| Tabla 2: Clasificación de la Hipertensión Arterial | 11 |
| Tabla 3: Sistemas reguladores de la presión arterial | 13 |
| Tabla 4: Manejo farmacológico de la presión arterial | 14 |
| Tabla 5: Tipos de flavonoides aislados de la especie de <i>Croton schiedeanus</i> Schiecht en Colombia | 18 |
| Tabla 6: Comparación de ajustes de los derivados flavonoides, ayanina y quercetina según diferencias con el control | 34 |
| Tabla 7: Efecto máximo de relajación inducido por ayanina en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ | 37 |
| Tabla 8: Efecto máximo de relajación inducido por quercetina en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ | 38 |
| Tabla 9: Efecto máximo de relajación inducido por TADMQ en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ L-NAME y ODQ | 39 |
| Tabla 10: Efecto máximo de relajación inducido por MQ en presencia y ausencia de L- NAME y ODQ..... | 41 |

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|--------------------|--|
| All | Angiotensina II |
| AMPc | Adenosin-3,5-monofosfato cíclico |
| ATMQ | 3'-acetil-3-7-4'-tri-O-metil quercetina |
| Ca ⁺⁺ | Calcio |
| CaM | Calmodulina |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| CCLM | Quinasa de la Cadena Ligera de Miosina |
| CDV | Canales dependientes de Voltaje |
| CF | Cromatografía Flash |
| CLV | Cromatografía líquida al vacío |
| cNOs | Óxido Nítrico Sintasa constitutiva de las neuronas |
| COR | Canales Operados por Receptor |
| COX | Ciclooxigenasa |
| DADMQ | 3'-4'-di-acetil-3-7-di-O-metil quercetina |
| DMQ | 3-7-di-O-metilquercetina |
| ECA | Enzima convertidora de Angiotensina |
| ECE | Enzima convertidora de Endotelina |
| ECV | Enfermedades cardiovasculares |
| EDHF | Factor Hiperpolarizante del Endotelio |
| EETs | Ácidos Epoxieicosatrienoicos |
| eNOs | Óxido Nítrico Sintasa constitutiva del endotelio |
| Emax | Efecto máximo |
| ETs | Endotelinas |
| FC | Frecuencia Cardiaca |
| FLC | Fosfolipasa C |
| GC | Gasto Cardiaco |
| GC | Guanilato Ciclasa |
| GMPc | Guanilil-3,5-monofosfato cíclico |
| HTA | Hipertensión Arterial |
| iNOs | Óxido Nítrico Sintasa inducible por Macrófagos y Hepatocitos |
| IP3 | Inositol-1,4,5-trifosfato |
| L-NAME | Nitro-L-arginina-metil-ester hidrocloreto |
| MQ | 7-O-metil quercetina |
| NO | Óxido Nítrico |
| Nos | Óxido Nítrico Sintasa |

| | |
|-------|---|
| O2 | Oxígeno |
| ODQ | 1,2,4 Oxidazol 4,3 quinoxalina |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PA | Presión Arterial |
| PE | Fenilefrina |
| PGH2 | Prostaglandina H2 |
| PGI2 | Prostaglandina I2 |
| PIP2 | 4,5-bifosfato-fosfatidil-inositol |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PKG | Proteína quinasa G |
| PDEs | Fosfodiesterasas |
| RP | Resistencia Periférica |
| RS | Retículo Sarcoplásmico |
| SHR | Ratas Espontáneamente Hipertensas |
| SRAA | Sistema Renina Angiotensina Aldosterona |
| TADMQ | 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O-metilquercetina |
| TeMQ | 3-7-3'-4'-tetra-O-metil quercetina |
| TxA2 | Tromboxano A2 |

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se caracterizan por alteraciones a nivel de los vasos sanguíneos y del corazón representando la principal causa de muerte en todo el mundo (Vega-Abascal J et al, 2015), según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2015 murieron por enfermedad cardiovascular 17,7 millones de personas, que representa el 31% del total de todas las muertes registradas en el mundo. Uno de los principales riesgos de ECV es la hipertensión con una prevalencia mundial para el 2014 del 22%. Es fundamental entender los escenarios que buscan mejorar el tratamiento de estas patologías para afinar herramientas que puedan mejorar su terapéutica e incluso prevenir su manifestación.

Varios autores han venido trabajando con la especie *Croton schiedeanus*, planta que ha sido utilizada popularmente para el manejo de hipertensión arterial y como coadyuvante del sistema cardiovascular en general, en un estudio donde evaluaron a diferentes concentraciones el extracto acuoso y etanólico de *Croton schiedeanus* en preparados de anillos de aorta de rata lograron evidenciar los efectos antihipertensivos y vasorelajantes dependientes de la concentración (Guerrero M et al, 2000; Paéz M et al, 2013).

Croton schiedeanus ejerce efectos vasodilatadores vinculados con la capacidad de sus metabolitos flavonoides, entre ellos ayanina (Paéz M et al, 2013), para captar radicales libres y activar la ruta del óxido nítrico (NO) (Chiappe-Pulido A, 2013; Carron R et al, 2010; Chaves-Torres M et al, 2012), generando respuestas en modelos experimentales en ratas de laboratorio y en preparaciones vasculares *ex vivo* que han contribuido a dar soporte al uso tradicional de esta especie (Guerrero M et al, 2002).

Adicional a ayanina “3,7,4'-tri-O-metilquercetina” (ver figura 5), que es el metabolito mayoritario de esta especie, se estableció que el metabolito 3-7-di-O-metilquercetina “DMQ” (ver figura 6), también presente en *C. schiedeanus*, ejerce mayor potencia

vasodilatadora, por lo que se planteó el interrogante de si la presencia de grupos hidroxilo en posición 3' y 4' y grupos metoxilos en posición 3 y 7 sería responsable del incremento en el potencial vasodilatador de estos flavonoides (Chiappe-Pulido A, 2013).

Estas y otras observaciones llevaron a un trabajo conjunto con el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia (Grupo: Estudio Químico y de Actividad Biológica de *Rutaceae* y *Myristicaceae* Colombianas) en el que se obtuvieron por semisíntesis derivados acetilados y metilados de ayanina y quercetina (Ver Anexo B) (Chiappe-Pulido A, 2013).

En este estudio se presentan los resultados de la evaluación del efecto vasodilatador de tales compuestos en la preparación de anillos aislados de aorta de rata SHR y con ello se hicieron aproximaciones sobre su relación estructura – actividad relajante vascular. Adicionalmente, se determinó el posible papel que la ruta metabólica NO/GMPc desempeña en su respuesta.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad relajante vascular de derivados de flavonoides obtenidos de *Croton schiedeanus* en preparados de anillos aislados de aorta de rata.

Objetivos específicos

- Cuantificar el efecto relajante de los siguientes derivados flavonoides de *Croton schiedeanus*: 3'-4'-di-acetil-3-7-di-O-metil-quercetina, 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O-metil-quercetina, 3'-acetil-3-7-4'-tri-O-metil-quercetina, 3-7-3'-4' tetra-O-metil-quercetina y 7-O-metil quercetina sobre anillos de aorta de rata.
- Determinar el papel de la ruta metabólica NO/GMPc en el efecto de tales compuestos.
- Establecer aproximaciones sobre su relación estructura-actividad.

1. REGULACIÓN DEL TONO DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

El tono vasomotor del musculo liso depende del equilibrio de los siguientes mecanismos (Correa-Hernández S, 2004; Botana L, 2002):

- Liberación de neurotransmisores
- Producción de diferentes relajantes y agentes constrictores derivados del endotelio
- Agentes relajantes y constrictores presentes en la circulación sanguínea
- Factores fisicoquímicos de la sangre

1.1 CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

El inicio de la contracción se da por la liberación y disponibilidad de calcio (Ca^{++}) intracelular que se une a la calmodulina (CaM), una proteína citoplasmática, y forman un complejo calcio – calmodulina (4 moléculas de Ca^{++} por una de CaM) (Correa-Hernández S, 2004; Martín P, 2012). Este complejo activa la quinasa de la cadena ligera de miosina (CCLM) y se produce el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los filamentos de actina para finalmente generar la contracción muscular (Martín P, 2012). (Figura 1).

El aumento de los niveles de calcio en el citosol se da por (Botana L, 2002):

- ❖ Despolarización de la membrana: Apertura de canales dependientes de voltaje (CDV), ya sean tipo T (corta duración) o tipo L (larga duración).
- ❖ Activación de un receptor fisiológico correspondiente:
 - Activación de un receptor acoplado a la fosfolipasa (FLC): a) una proteína G activa la FLC que cataliza el 4,5-bifosfato-fosfatidil-inositol (PIP₂) a inositol-1, 4, 5 - trifosfato (IP₃) quien ingresa al retículo sarcoplásmico (RS) liberando Ca^{++} hacia el citoplasma; b) apertura de canales operados por

receptor (COR) y c) despolarización de la membrana por acoplamiento de un agonista con su receptor.

- Activación de un receptor no acoplado a FLC: paso de calcio a través de un COR acoplado a una proteína G independiente de la despolarización.
- Vasoconstrictores sintéticos asociados a CDV.

Los mecanismos vasoconstrictores dependientes del endotelio son: a) enzima convertidora de endotelina (ECE), b) cicloxigenasa (COX) con producción de TXA₂, PGH₂, O₂ y c) enzima convertidora de agiotensina (ECA) (Correa-Hernández S, 2004).

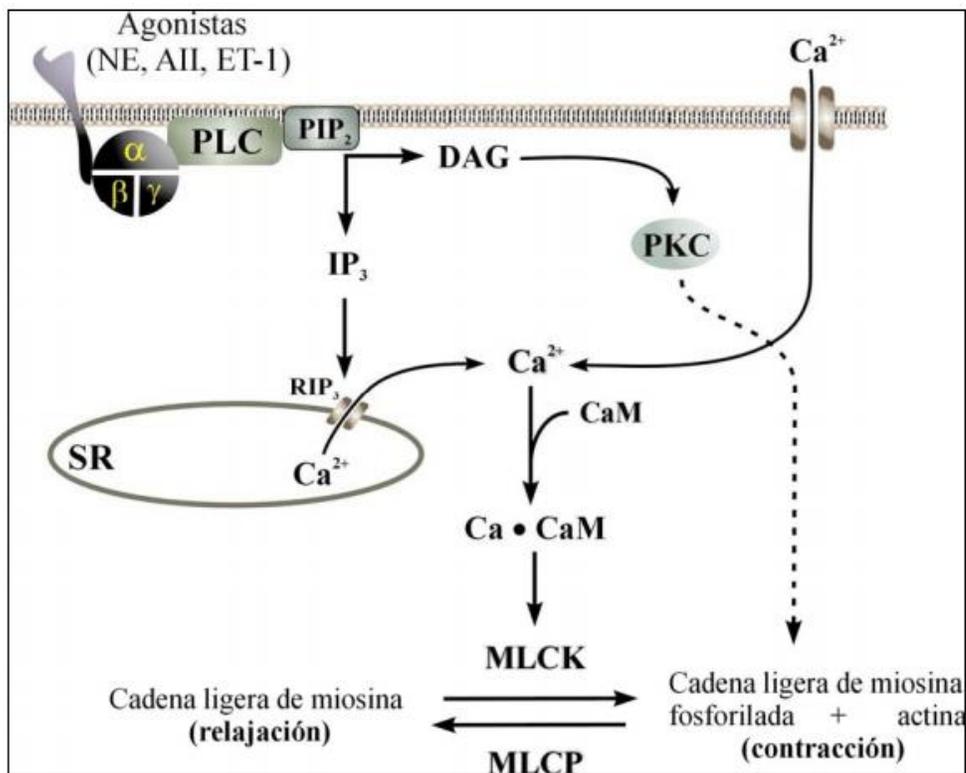


FIGURA 1. Activación de la contracción del músculo liso: noradrenalina, angiotensina y endotelina no requieren despolarización de la membrana para permitir el flujo de Ca⁺⁺ hacia el citosol. La fosfolipasa C cataliza PIP₂ a PI₃ que libera Ca⁺⁺ del RS. El Ca⁺⁺ libre interactúa con la calmodulina (CaM) activando la CCLM que fosforila la miosina (Galván R, 2007).

1.2 RELAJACIÓN DEL MUSCULO LISO

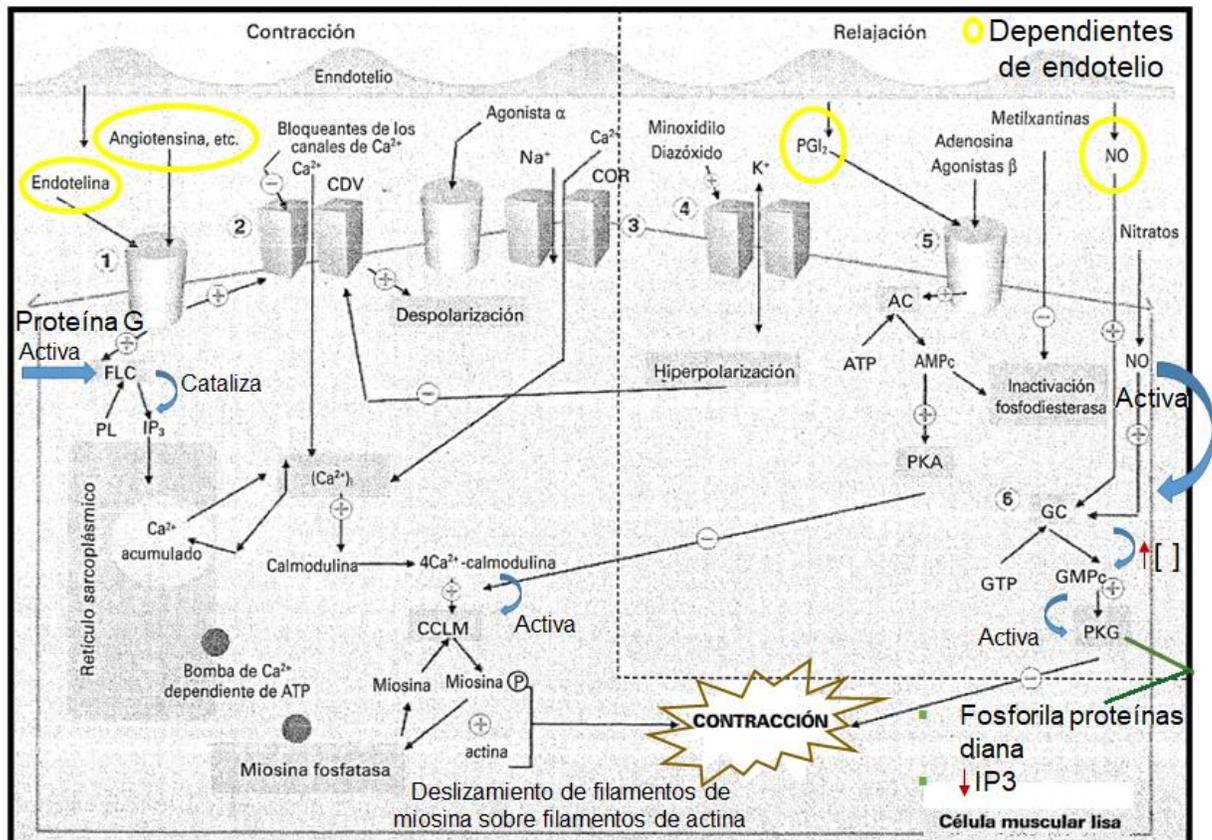


FIGURA 2. Regulación del tono del músculo liso vascular (Botana L, 2002)

La relajación del músculo liso inicia cuando disminuye la concentración de calcio intracelular o se inhibe el acoplamiento del complejo calcio-calmodulina, que se da por la hiperpolarización de la membrana plasmática o por activación de las vías del adenosin-3,5-monofosfato cíclico (AMPc) o del guanilil-3,5-monofosfo cíclico (GMPc) (Galván R, 2007).

Los mecanismos vasodilatadores dependientes del endotelio son: a) factor hiperpolarizante de endotelio (EDHF) b) óxido nítrico (NO) que aumenta el GMPc y c) prostaglandina I₂ (PGI₂) que aumenta el AMPc. Los mecanismos independientes del endotelio incluyen: a) activación proteínquinasa G (PKG), b) inhibición de la proteínquinasa C (PKC), c) inhibición de fosfodiesterasas (PDEs) de GMPc y AMPc y disminución de la recaptación de calcio (Correa-Hernández S, 2004).

| TIPO DE FÁRMACO | LUGAR DE ACCIÓN |
|--|---|
| Hidralazina | No se conoce |
| Agonistas de los canales de K ⁺ | Activan los canales de K ⁺ ; lo que produce la hiperpolarización de la célula impidiendo la apertura de los canales de calcio. |
| Nitrovasodilatadores | Aumentan los niveles de GMPc, que activa la PKG, la cual inhibe la contracción. |
| Antagonistas de los receptores alfa-adrenérgicos | Se unen selectivamente a los receptores alfa-adrenérgicos e interfieren en la capacidad de los simpaticomiméticos para unirse al receptor y producir una respuesta. |
| Antagonistas de los receptores de la angiotensina II | Bloquean específicamente el receptor de la angiotensina II, disminuyen la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático a través de la inactivación de la proteína G. |
| IECA | Inhiben la ECA impidiendo la conversión de la angiotensina I en angiotensina II. |
| Bloqueadores de los canales de calcio | Inhiben el paso de calcio al interior de las células bloqueando los canales de Ca ⁺⁺ tipo L. |

TABLA 1. Sitio de acción de los fármacos vasodilatadores (Botana L, 2002).

1.2.1 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

Compuestos generados por el endotelio que inducen relajación generando la apertura de canales de K⁺ dependientes de calcio que hiperpolarizan la membrana. La estructura química de estos compuestos no está del todo clara, sin embargo, se confiere su actividad a metabolitos del ácido araquidónico tipo ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) (Duboscq C, 2017).

1.2.2 Óxido Nítrico

El factor relajante derivado del endotelio es el NO, su síntesis se da a partir de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOs) que tiene 3 isoformas, tipo I: eNOs constitutiva del endotelio, tipo II: cNOs constitutiva de las neuronas y tipo III: iNOs inducible ante la presencia de macrófagos y hepatocitos (Vogel G, 2002). A nivel vascular el óxido nítrico sintetizado por la eNOs entra a la célula del músculo liso y cumple sus funciones como agente vasodilatador por acciones directas sobre la musculatura o al regular acciones específicas sobre mecanismos constrictores adrenérgicos (Amaya A, Visitación M y Ortega A, 2001).

Dentro de la célula del músculo liso, el NO activa la guanilato ciclasa (GC) que aumenta la concentración de GMPc activando la proteinquinasa dependiente de GMPc (PKG) que fosforila proteínas diana e inhibe la producción de IP3, con la consecuente disminución de calcio intracelular y por ende la relajación del vaso sanguíneo (Correa-Hernández S, 2004).

Su acción adrenérgica ha sido reportada en estudios donde demuestran que, frente al aumento del tono arterial a largo plazo mediado por catecolaminas, el NO aumenta y se genera una inhibición compensatoria de alfa-adrenérgicos (Amaya A, Visitación M y Ortega A, 2001).

1.2.3 Prostaciclina I2

Producido por la COX, su efecto relajante se da al aumentar el AMPc a través de receptores específicos, lo que disminuye la concentración de calcio regulando la vasoconstricción (Duboscq C, 2017).

2.HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión arterial (HTA) se manifiesta cuando se pierde el equilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores del vaso sanguíneo constituyéndose en una enfermedad y al mismo tiempo un factor de riesgo cardiovascular (Wagner-Grau P, 2010; Weschenfelder-Magrini D y Gue-Martini J, 2012; Ortiz A, 2018). Según la OMS cuatro de cada diez adultos presenta una presión arterial (PA) alta y cuando se inicia un tratamiento solo una persona de 3 logra mantener valores de PA con cifras menores a 140/90.

| CIFRAS DE PA (mmHg) | ESTRATIFICACIÓN |
|----------------------------|---------------------------|
| Por debajo de 130/85 | Normal |
| 130-139/85/89 | Pre-hipertensión arterial |
| 140-159/90-99 | HTA grado 1 |
| 160-179/100-109 | HTA grado 2 |
| Por encima de 180/110 | HTA grado 3 |

TABLA 2. Clasificación de la Hipertensión Arterial (Fernández A, 2013; Espinosa-Brito A, 2018)

La HTA es una condición mundial de gran importancia para la salud pública, ya que cada año mueren 7,6 millones de personas por esta causa. Dentro de los principales factores de riesgo se encuentran la edad con una prevalencia del 60% en personas con más de 65 años, factores genéticos, sexo, factores socioeconómicos, exceso de peso y obesidad, malos hábitos alimenticios, ingesta de alcohol, sedentarismo, tabaquismo, entre otros (Weschenfelder-Magrini D y Gue-Martini J, 2012; Espinosa-Brito A, 2018; Trindade-Radovanovic C et al, 2014).

Actualmente se están implementando estrategias para disminuir esos factores de riesgo y tratamientos alternativos que eviten la presentación de reacciones adversas significativas,

por lo que los productos naturales cobran una mayor relevancia en la terapéutica cardiovascular (Salas J y Guerrero M, 2010; Nova M y Guerrero M, 2008).

2.1 Fisiopatología de la HTA

La presión arterial es la fuerza con la que la sangre pasa presionando las paredes de las arterias, por lo tanto, es el producto del gasto cardiaco (GC) y la resistencia vascular periférica que está determinada por las arterias de mediano calibre (Maicas C et al, 2003).

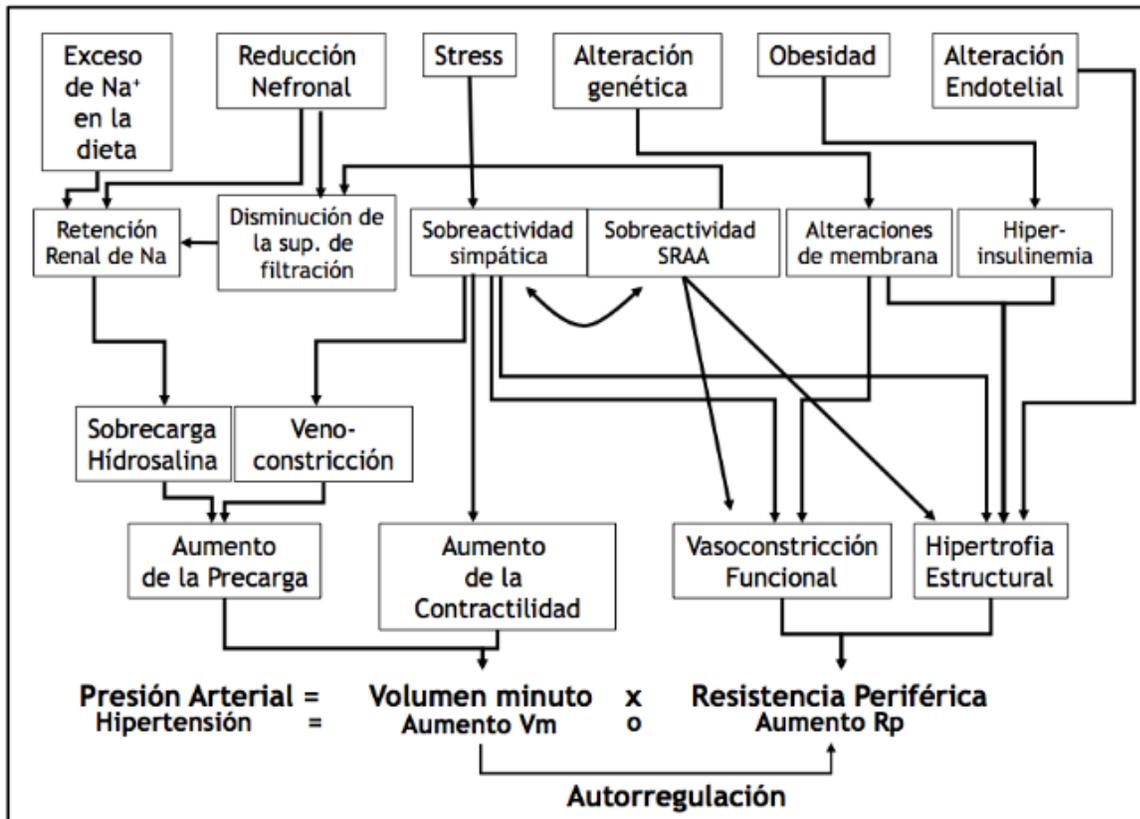


FIGURA 3. Esquema fisiopatológico de la hipertensión arterial (Wassermann A, 2013).

2.1.1 Factores determinantes de la presión arterial

Los factores que determinan los valores de presión arterial son el gasto cardiaco que aumenta cuando la contractibilidad cardiaca también lo hace, por un aumento del volumen sanguíneo y por aumento de la frecuencia cardiaca (FC) y la resistencia periférica (RP)

que está determinada por los factores que producen vasoconstricción y los que originan hipertrofia estructural (Maicas C et al, 2003).

| SISTEMAS PRESORES | SISTEMAS DEPRESORES |
|--|---|
| MEDIADORES DE LA RESISTENCIA VASCULAR PERIFÉRICA | |
| Aumento de la Resistencia | Disminución de la Resistencia |
| Angiotensina II Norepinefrina Epinefrina Vasopresina (ADH) Endotelina Eicosanoides: tromboxano A ₂ Neuropeptido Y | Bradicinina Óxido nítrico Péptido atrial natriurético Prostaglandinas Prostaciclina |
| MEDIADORES DEL GASTO CARDÍACO | |
| Aumento del gasto cardíaco | Disminución del gasto cardíaco |
| Aldosterona/mineralocorticoides Vasopresina Aumento del volumen intravascular Aumento de la actividad del S. N. simpático | Hemorragia Pérdida de sal y agua Disminución del volumen intravascular |

TABLA 3. Sistemas reguladores de la presión arterial (Maicas C et al, 2003)

2.1.2 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

Es el sistema hormonal con mayor participación en el control de la HTA y con gran importancia a nivel renal. La angiotensina II (All) es la segunda molécula con mayor capacidad vasoconstrictora, estimula la liberación de aldosterona favoreciendo la reabsorción de sodio a nivel renal, por lo que se incrementa el intercambio entre sodio y potasio; la All aumenta la avidéz por la sal a nivel del sistema nervioso central, aumenta la contractibilidad cardíaca, favorece mecanismos pro-inflamatorios que pueden generar hipertrofia del músculo cardíaco y de la pared de las arterias incrementando los procesos de fibrosis (Wassermann A, 2013).

2.1.3 Endotelinas (ETs)

Son los vasoconstrictores locales más potentes, la enzima convertidora de endotelina (ECE) forma principalmente ET1 que actúa como vasoconstrictor sistémico, aumentando el tono vascular e implícita en la excreción de sodio y agua a nivel renal. Sus efectos

biológicos dependen de la concentración. Así mismo, participa en el remodelamiento vascular regulando la proliferación de células que pueden producir hiperplasia e hipertrofia del musculo liso vascular (Wagner-Grau P, 2010).

2.2 Tratamiento de la HTA

El tratamiento para la HTA tiene como objetivo establecer o controlar los valores de PA. Cuando se establece un tratamiento se debe tener en cuenta, enfermedades concomitantes, resistencia a medicamentos, uso de un solo producto o en conjunto, presentación de efectos adversos e incluso se tiene en cuenta su costo; de tal manera que se pueda asegurar una terapia efectiva y segura que sea asequible al público (Andrade-Castellanos C, 2015; Barrios-Alonso V, 2017).

| FÁRMACO ANTIHIPERTENSIVO | DOSIS DIARIA INICIAL (mg) | DOSIS OBJETIVO (mg) |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|
| Inhibidores ECA | | |
| Captopril | 50 | 150-200 |
| Enalapril | 5 | 20 |
| Lisinopril | 10 | 40 |
| Bloqueadores del receptor Angiotensina | | |
| Eprosartan | 400 | 600-800 |
| Candesartan | 4 | 12-32 |
| Losartan | 50 | 100 |
| Valsartan | 40-80 | 160-320 |
| Ibesartan | 75 | 300 |
| Beta bloqueadores | | |
| Atenolol | 25-50 | 100 |
| Metoprolol | 50 | 100-200 |
| Bloqueadores de los canales de calcio | | |
| Amlodipino | 2.5 | 10 |
| Diltiazem | 120-180 | 360 |
| Nitrendipine | 10 | 20 |
| Diuréticos Tiazídicos | | |
| Bendroflumethiazide | 5 | 10 |
| Chorthalidone | 12.5 | 12.5-25 |
| Hydrochlorothiazide | 12.5-25 | 25-100 |
| Indapamide | 1.25 | 1.25-2.5 |

TABLA 4. Manejo Farmacológico de la Hipertensión Arterial (James P et al, 2014).

El tratamiento de primera elección incluye a los diuréticos tiazídicos, que se pueden formular como monoterapia o en combinación con IECAs o bloqueadores de canales de calcio, teniendo en cuenta que deben ser pacientes que no presenten diabetes o insuficiencia renal crónica, ya que dentro de los efectos adversos que pueden generar estos grupos de fármacos se encuentran dislipidemia e intolerancia a la glucosa, hiponatremia, hipocalemia y gota (Andrade-Castellanos C, 2015; Stoll A, 2006; Barrios-Alonso V, 2017)

3.Descripción *Croton schiedeanus* Schlecht

El *Croton schiedeanus* Schlecht, es una planta perteneciente a la familia Euphorbiaceae con aproximadamente 300 géneros dentro de los que se encuentra el *Croton* que abarca entre 500 a 600 especies; él Almizclillo, conocido así popularmente, es un árbol de 8 a 24 metros de altura, con frutos verrugosos de color café, flores blancas y corteza grisácea, se puede encontrar en todo el territorio colombiano especialmente en el altiplano Cundiboyacence y Amazonas (Chiappe-Pulido A, 2013).



FIGURA 4. Hojas de *Croton schiedeanus* (Chiappe-Pulido A, 2013)

Sus hojas y corteza han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de úlceras gástricas, afecciones de piel, amebiasis, cólicos, enfermedades cardiorrespiratorias, para facilitar la digestión y como coadyuvante en procesos de hipertensión arterial (Puebla P et al, 2004; Correa S et al, 2008).

Teniendo en cuenta que los metabolitos secundarios del genero *Croton* son los responsables de la actividad biológica, se han aislado compuestos tipo terpeno, flavonoide y alcaloide entre otros (Coy-Barrera C, Gómez D y Castiblanco F, 2016).

| NÚCLEO | ESPECIE | PARTE | COMPUESTO AISLADO | ACTIVIDAD BIOLÓGICA |
|----------------------------|-----------------------|-------|---|---------------------|
| Flavonoles quercetina | Croton schiedeanus | Aérea | 3,4',7-tri-O-metilquercetina | Vasorrelajante |
| | | | 3,7-di-O-metilquercetina 3-O-metilquercetina | Vasorrelajante |
| Flavonoles glicosidados | Schlecht | | 3,3'-O-L- ramnosidoquercetina | No reportado |

Tabla 5: Tipos de flavonoides aislados de la especie *Croton schiedeanus* Schlecht en Colombia (Coy-Barrera C, Gómez D y Castiblanco F, 2016).

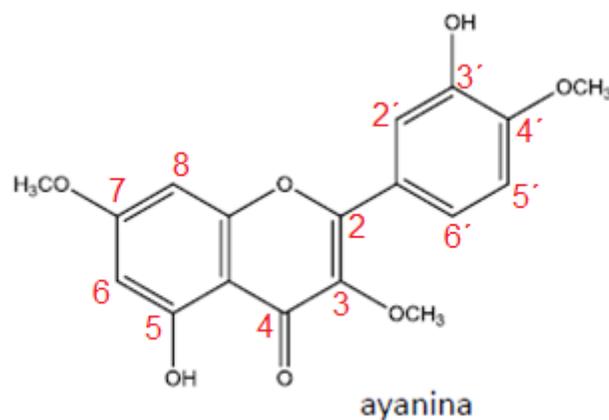


FIGURA 5. Estructura de la molécula 3,7,4'-tri-O-metilquercetina (Guerrero M et al, 2001).

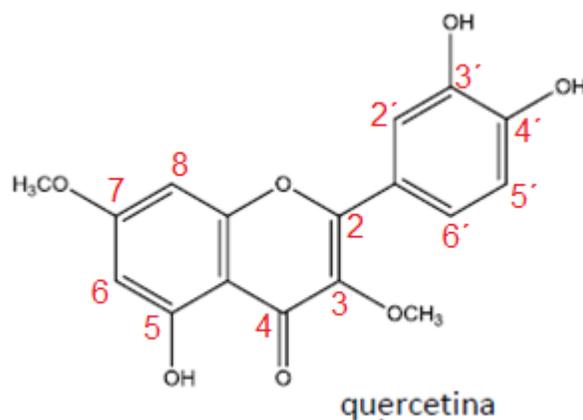


FIGURA 6. Estructura de la molécula 3,7-di-O-metilquercetina "DMQ" (Chiappe-Pulido A, 2013).

3.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides se sintetizan a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA, comparten una estructura en común compuesta por dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C) heterocíclico (Limón D et al, 2010; Duarte J y Pérez F, 2015; Tenoiro-López F et al, 2006).

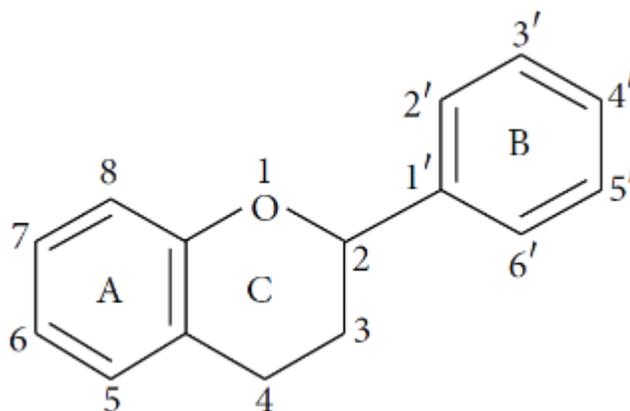


FIGURA 7. Estructura general de los flavonoides (Mills S y Bone, 2012 referenciado por Ortiz A, 2018).

El interés farmacológico de estos compuestos surge por las evidencias epidemiológicas en cuanto a la relación entre el consumo de alimentos ricos en flavonoides y menor riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, así mismo, una menor incidencia en patologías asociadas a cáncer (Sánchez-Santos M, 2007).

La actividad biológica que caracteriza cada flavonoide depende de la disposición de los grupos funcionales sobre la estructura nuclear, por ejemplo, la configuración, sustitución y número de grupos hidroxilo influyen en varios mecanismos de actividad antioxidante. Los flavonoides se caracterizan por ser los más eficaces eliminadores de radicales libres como el peróxido, superóxido y peroxinitrito (Kumar S y Pandey A, 2013; Cartaya O y Reynaldo I, 2001).

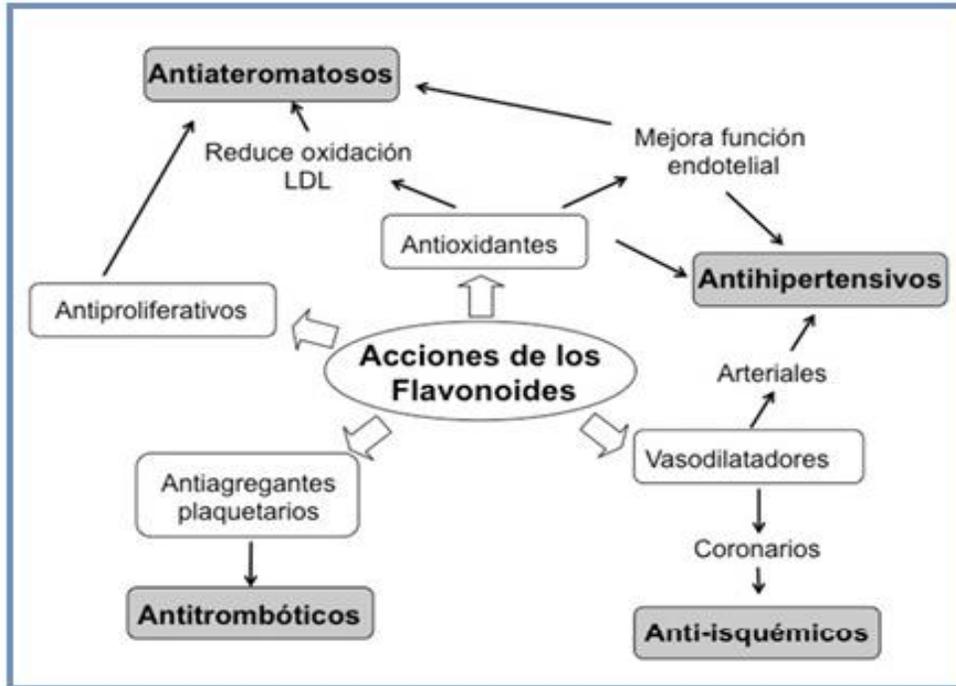


FIGURA 8. Acciones cardiovasculares de los flavonoides (Duarte J y Pérez F, 2015).

4. Antecedentes

Varios autores han venido trabajando con la especie *Croton schiedeanus*, especie que ha sido utilizada popularmente para el manejo de hipertensión arterial y como coadyuvante del sistema cardiovascular en general. En un estudio donde se evaluaron diferentes concentraciones en preparados de anillos de aorta de rata, el extracto acuoso logró evidenciar efectos vasorelajantes (Guerrero M, Carrón R, Martín M, Román L y Reguero M, 2000). En otro ensayo, se demostró que el extracto etanólico de *Croton schiedeanus* también ejerce efectos relajantes en preparados de anillos de aorta aislado de ratas y efectos hipotensores en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), soportando los resultados anteriores (Guerrero M, Carron R, Martín M, Román L y Reguero M, 2002).

Posteriormente, Puebla P, Correa S, Guerrero M, Carron R y San-Feliciano (2003) realizaron un estudio fitoquímico a una fracción ácida de extractos de la parte aérea de *Croton schiedeanus* de donde se aislaron seis diterpenoides de tipo cis-clerodano, dos de ellos nuevos compuestos naturales. También se obtuvieron dos nuevos furano-diterpenoides de tipo neo-clerodano. La elucidación estructural se logró sobre la base de extensos experimentos de RMN, incluidos el análisis de difracción de rayos X. Los flavonoides conocidos previamente, ayanina y quercetina, también se obtuvieron a partir del extracto de esta planta.

Más adelante se estudió el efecto relajante de estos compuestos tipo clerodanos en anillos de aorta aislados contraídos con KCl o Fenilefrina (PE), mostrando un mejor perfil vasodilatador cuando se incorporan simultáneamente con ayanina. Estos resultados sugieren que *Croton schiedeanus* induce sus efectos a través de acciones sinérgicas de varias sustancias vasodilatadoras (Guerrero M, Puebla P, Carron R, Martín M y Román L, 2004).

Guerrero M y colaboradores (2002) demostraron que *Croton schiedeanus* ejerce efectos vasodilatadores posiblemente vinculados con su capacidad para captar radicales libres, atribuibles en buena medida a la presencia de metabolitos flavonoides, entre ellos, ayanina. Los mecanismos vasodilatadores de estos metabolitos están ligados a la activación de (NO) óxido nítrico, resultados que fueron soportados más adelante por Chiappe-Pulido A (2013); Carron R, Sanz E, Puebla P, Martín M, San-Román L y Guerrero M (2010); Chaves-Torres M, Puebla P y Guerrero M (2012); Páez M, Rodríguez D, López D, Castañeda J, Buitrago D, Cuca L y Guerrero M (2013).

Guerrero M, Puebla P, Martín M, Carron R, Román L, Reguero M y Arteaga L (2001) habían determinado la seguridad de ayanina, tras realizar un estudio donde se evaluó la administración oral de este compuesto a altas dosis en ratas normotensas, concluyendo que no presenta toxicidad ni efectos adversos tras la administración oral de 500mg.

Entre los posibles mecanismos de relajación inducidos por el flavonoide ayanina en anillos aislados de aorta de rata, se encontró que este metabolito induce vasodilatación dependiente del endotelio asociado a la vía del NO/GMPc, de acuerdo a la respuesta observada en presencia de L-NAME (un inhibidor de la óxido nítrico sintasa), ODQ (un inhibidor de la guanilato ciclasa) y L-arginina (precursor de NO). (Carron R, Sanz E, Puebla P, Martín M, San-Román L y Guerrero M, 2010).

4.1 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS SEMISINTETIZADOS

Chiappe-Pulido A (2013), realizó un estudio fitoquímico parcial de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* de la cual se aislaron tres compuestos flavonoides con un método de extracción selectivo, a partir de estas moléculas se realizaron reacciones de metilación, desmetilación y acetilación para la obtención de derivados flavonoides (Ver Anexo B), que más adelante habrían de ser evaluadas para avanzar en lo atinente a su relación estructura – actividad y proponer eventuales fuentes terapéuticas a base de derivados semisintéticos.

El material vegetal se colectó en mayo del 2010 en el municipio de Tocaima y fue identificado para confirmar la especie. Utilizaron un kilo de hojas frescas de *Croton schiedeanus*, el material se secó a temperatura ambiente; realizándose trituración y maceración con etanol al 96% obteniendo 145gr de extracto.

Se hizo una marcha fitoquímica preliminar que demostró la presencia de metabolitos tipo carotenoide, fenólico, flavonoide y alcaloide. Fraccionaron 130gr del extracto etanólico con éter de petróleo y éter etílico con la consecuente obtención de tres fracciones (Ver figura 9).

De la fracción resultante con éter etílico tomaron 40gr para someter a fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (CLV) utilizando los solventes tolueno, cloroformo, acetato de isopropilo y metanol; de lo que se derivaron 14 fracciones (EE-1/EE-14).

Purificaron la fracción EE-2 por cromatografía flash (CF) obteniendo 4 fracciones (EE-2-1/EE-2-4), de la fracción EE-2-3 se obtuvieron 7 fracciones también por CF (EE-2-3-1/EE-2-3-7). De la fracción EE-2-3-6 se obtienen 40mg de un compuesto denominado HCS1.

Previo a las purificaciones, con las 14 fracciones habían realizado un chequeo por medio de cromatografía en capa delgada (CCD) y las fracciones EE-12- EE-14 se reunieron en una sola fracción por la similitud dada, al realizar cromatografía en columna sucesiva, se obtuvo 100 mg de un segundo compuesto HCS2. Finalmente, la fracción inicial de éter etílico (1.5 g) que sometieron a fraccionamiento por CF dio como resultado 16 fracciones (EE-F1/EE-F16). De la fracción EE-F5 obtuvieron 6 fracciones también por CF (EE-F5-1/EE-F5-6); de las fracciones EE-F5-2 y EE-F5-3 obtuvieron 15 mg de un tercer compuesto HCS3.

La elucidación estructural de los tres compuestos indica que corresponden a los flavonoides: 3-7-3'-tri-O-metilquercetina (Pachypodol), 3-7-di-O-metilquercetina (DMQ) y 3-7-4'-tri-O-metil quercetina (ayanina).

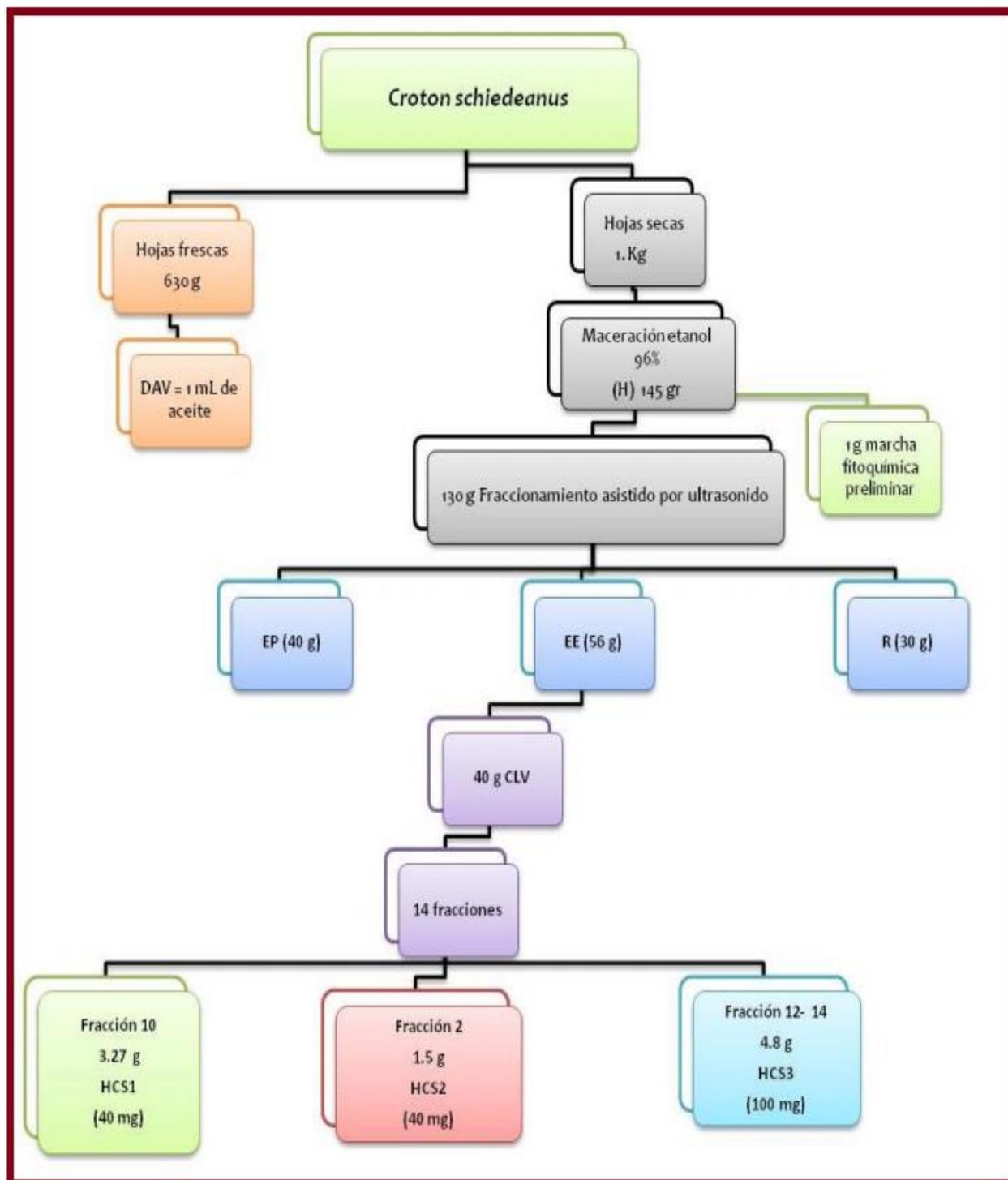


FIGURA 9. Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios (Chiappe A, 2013).

Basados en previos ensayos que mostraron que el compuesto DMQ es más activo en su actividad relajante que ayanina, potencia que estaría relacionada con la presencia de hidroxilos en posición 3' y 4' y metoxilos en posición 3 y 7 de la flavona, se procedió efectuar reacciones de acetilación y metilación obteniendo 5 derivados con sustituyentes metoxilo y acetilo, para proceder en este estudio a examinar su efecto relajante vascular y con ello hacer aproximaciones sobre la estructura óptima de la flavona en lo ateniendo a actividad vasodilatadora:

- Derivados acetilados de DMQ:

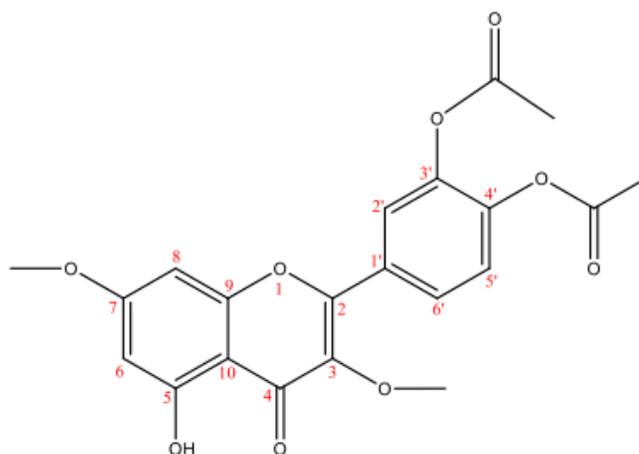


FIGURA 10. Estructura de la molécula 3'-4'-di-acetil-3-7-di-O-metil quercetina (DADMQ)

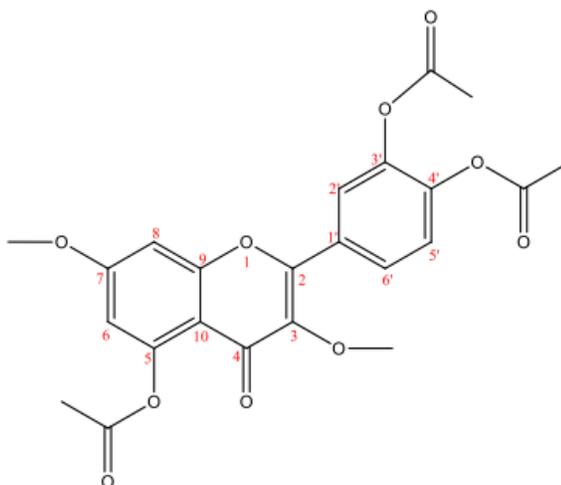


FIGURA 11. Estructura de la molécula 3'-4'-5-triacetil-3-7-di-O-metil quercetina (TADMQ)

- Derivado acetilado de ayanina:

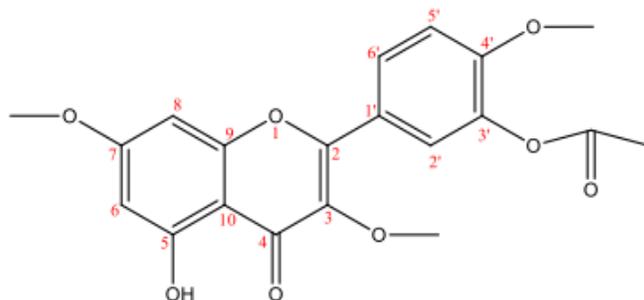


FIGURA 12. Estructura de la molécula 3'-acetyl-3-7-4'-tri-O-metil quercetina (ATMQ)

- Derivado metilado ayanina:

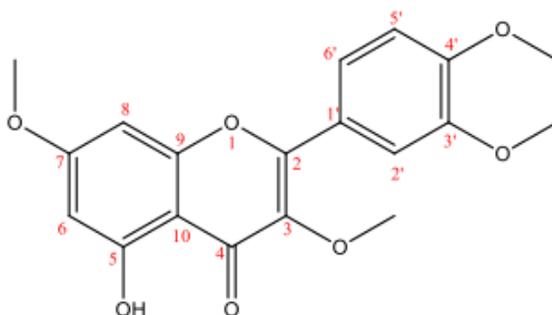


FIGURA 13. Estructura de la molécula 3-7-3'-4'tetra-O-metil quercetina (TeMQ)

- Derivado desmetilado de DMQ

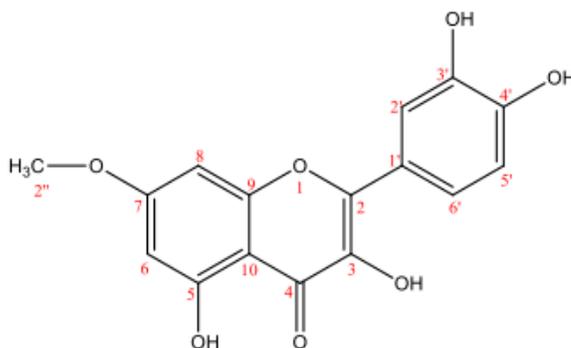


FIGURA 14. Estructura de la molécula 7-O-metil quercetina (MQ)

A partir de los resultados obtenidos con este trabajo mencionado, se pudo desarrollar la presente investigación, por lo que se evaluó la actividad relajante vascular de los derivados flavonoides obtenidos en preparados de anillos aislados de aorta de rata SHR, se determinó el papel de la ruta metabólica NO/GMPc de los mismos y se establecieron aproximaciones sobre su relación estructura-actividad.

5. Metodología

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1 Animales experimentales

Se emplearon ratas espontáneamente hipertensas SHR (200 – 250g) provenientes del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, se alimentaron con concentrado y agua a voluntad y se mantuvieron en un ambiente controlado con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, a una temperatura entre los 19 a 23 °C, y una humedad relativa en promedio del 60%.

5.1.2 Compuestos evaluados

Cinco derivados flavonoides de *Croton schiedeanus* obtenidos a través de extracción asistida por ultrasonido usando éter etílico (suministrados por el Grupo de Investigación: Estudio Químico y de Actividad Biológica de *Rutaceae* y *Myristicaceae* Colombianas), (Ver capítulo 4 y Anexo B):

- 3'-4'-di-acetil- 3-7-di - O -metil quercetina (DADMQ)
- 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O- metil quercetina (TADMQ)
- 3'-acetil-3-7-4'-tri-O- metil quercetina (ATMQ)
- 3-7-3'-4'tetra-O- metil quercetina (TeMQ)
- 7-O-metil quercetina (MQ)

5.1.3 Modelo de aorta aislada de rata

Técnica: las ratas se sacrificaron en una cámara de CO₂, la disección se llevó a cabo por toracotomía media para identificar la aorta, se retiró el vaso, y se cortó en pequeños anillos de aproximadamente 3 a 6mm de longitud, los anillos se montaron por medio de dos soportes paralelos insertados en el lumen y se ubicaron en un medio preparado con Krebs-Henseleit con un flujo constante de O₂ al 95% y CO₂ al 5%; a una temperatura de 37° C y un pH entre 7,38 a 7,42.

Cada baño de anillo de aorta se conectó a un transductor isométrico (*FT 10, WPI*) y este a su vez a un amplificador (*ISDB-8, WPI*), conectado al convertidor análogo digital del computador (*LabTrax, WPI*) para la visualización y registro de la señal de la fuerza generada por el anillo vascular. La tensión de fuerza inicial que se ejerció para cada anillo fue de 2 gramos, aplicada para garantizar la estabilización de la preparación, para lo cual se requirió un periodo de equilibrio de aproximadamente 1 hora, con tres cambios del medio liquido cada 20 minutos.

Para inducir la primera contracción en cada anillo se utilizó Fenilefrina (PE) a una dosis de 1X10⁻⁶M, permitiéndose que alcanzara una fase de meseta de contracción máxima, registrada por el polígrafo.

Ensayo: para observar si los derivados flavonoides inducían efectos vaso-relajantes se implementaron cinco tratamientos con un control negativo (DMSO) y dos controles positivos (ayanina y quercetina). Cada tratamiento contaba mínimo con 5 réplicas y en cada replica se probaron 8 concentraciones crecientes acumulativas desde 1X10⁻⁸ hasta 1X10⁻⁴M. Los tratamientos se probaron sobre anillos contraídos con PE (1X10⁻⁶M) y se establecieron de la siguiente manera:

- Control negativo: DMSO al 0,1%
- Tratamiento 1: PE + 3'-4'-di-acetil- 3-7-di - O -metil quercetina (DADMQ)
- Tratamiento 2: PE + 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O- metil quercetina (TADMQ)
- Tratamiento 3: PE + 3'-acetil-3-7-4'-tri-O- metil quercetina (ATMQ)

- Tratamiento 4: PE + 3-7-3'-4'tetra-O- metil quercetina (TeMQ)
- Tratamiento 5: PE + 7-O-metil quercetina (MQ)
- Tratamiento 6: PE + ayanina
- Tratamiento 7: PE + quercetina

En cada tratamiento se adicionó el derivado flavonoide cuando los anillos alcanzaron una tensión constante (meseta), después de la administración de PE. Las concentraciones acumulativas fueron: $1 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $3 \times 10^{-5} \text{M}$, $6 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{M}$. De la misma manera, la respuesta se registró en el polígrafo (*Miobath WPI*) y se obtuvieron los datos de relajación por cada concentración en cada anillo.

Para determinar el papel en la ruta metabólica NO/GMPc se estableció el siguiente protocolo (teniendo en cuenta las moléculas que obtuvieron las mejores respuestas de relajación):

- Tratamiento 1: L-NAME + PE + TADMQ
- Tratamiento 5: L-NAME + PE + MQ
- Tratamiento 3: ODQ + PE + TADMQ
- Tratamiento 4: ODQ + PE + MQ

L-NAME (Nitro-L-arginina-metil-ester-hidroclorido) y ODQ (1,2,4 oxidazol 4,3 quinoxalina) se administraron a dosis de $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $3 \times 10^{-5} \text{M}$ respectivamente, aproximadamente 10 minutos antes de la administración de PE (1×10^{-6}).

Datos: se obtuvieron curvas de concentración respuesta, concentración efectiva 50 (CE50) que se entiende como la concentración necesaria para alcanzar el 50% de la máxima respuesta (Molina L y Melo S; 2010), y, efecto máximo (Emax) que es la máxima respuesta que se puede obtener (relajación vascular máxima). Estos datos se expresaron como el promedio \pm el error estándar (e.s.m.), de cada réplica (anillos) por cada tratamiento.

La CE50 y su respectiva pEC50 (-logEC50), se obtuvieron por regresión semilogarítmica aplicada a 8 puntos (concentraciones) cuyas magnitudes de efecto (porcentaje de relajación) se ubicaron entre el 20 y el 80% del efecto máximo.

La variable dependiente fue la respuesta relajante obtenida como porcentaje de la concentración máxima inducida por PE ($1 \times 10^{-6} \text{M}$).

Estadística: se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tratamiento y concentración), prueba de diferencias múltiples “Dunnett”, previa verificación de la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas y se utilizaron los programas EXCEL y GraphPad para el análisis y procesamiento estadístico de los datos (Anexo A).

Aspectos Éticos, Legales y ambientales: se tuvieron en cuenta los principios de las buenas prácticas de laboratorio, el concepto de bioseguridad y las 3R para el manejo de los animales. Se realizó una inducción (entrenamiento inicial) para asegurar el manejo adecuado de las ratas y de los elementos y equipos del laboratorio necesarios para la adquisición de habilidades y destrezas en el desarrollo de la técnica.

El sacrificio de los animales se realizó en una cámara de CO para disminuir la posibilidad de sufrimiento de las ratas, adicionalmente se montaron varios preparados vasculares, 8 por cada aorta y así se evitó el uso de animales innecesariamente, asegurando la reducción de los mismos y cumpliendo con las normas de bienestar animal establecidas para especímenes de laboratorio.

Los residuos biológicos se dispusieron bajo protocolos del sistema de gestión ambiental de la Universidad Nacional, a través de la empresa Ecocapital quien se encargó de la disposición final de los mismos. La investigación se realizó acorde con la Ley 84 de 1989, “Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, establecida en la Resolución 8430 de 1993, del Ministerio de Salud de Colombia.

El proyecto se presentó al comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional, quien evaluó aspectos éticos del proyecto y determinó que este cumplía con los aspectos éticos básicos, brindando el concepto final de “Proyecto avalado” (Acta 06-2019) el 4 de junio del 2019.

6. Resultados y Discusión

6.1 Resultados

6.1.1 Evaluación de la actividad relajante de los Derivados Flavonoides

De acuerdo con la curva concentración-respuesta (figura 15) que refleja la actividad vasodilatadora de los derivados flavonoides sobre anillos de aorta aislados de ratas SHR contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), se determinó que 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O-metilquercetina "TADMQ" (acetilado de DMQ) y 7-O-metilquercetina "MQ" (desmetilado de DMQ) tienen actividad relajante dependiente de la concentración.

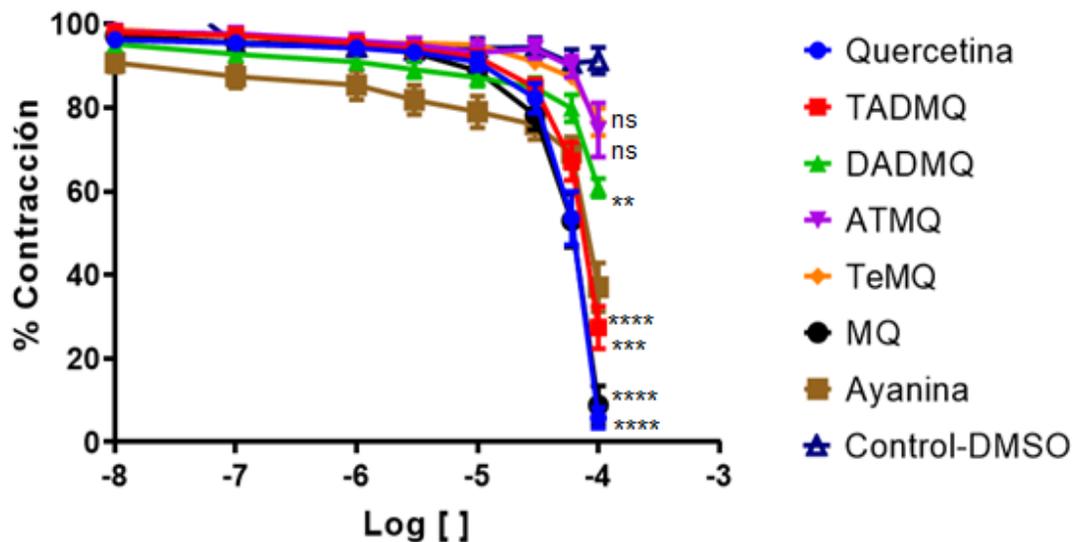


FIGURA 15. Curva concentración - respuesta de los derivados flavonoides, ayanina, quercetina y el control (DMSO 0,1%) en anillos de aorta de rata SHR contraídos con Fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$). Cada punto se representa con su respectivo EMS a una confianza de $p < 0.05$ según las diferencias con el control.

La molécula 3'-4'-di-acetil- 3-7-di - O -metil quercetina "DADMQ" (derivado acetilado de DMQ) ejerce efectos vasodilatadores también en función de la concentración, pero con menor potencia en relación a TADMQ y MQ. Los flavonoides 3'-acetil-3-7-4'-tri-O- metil quercetina "ATMQ" (acetilado de ayanina) y 3-7-3'-4'tetra-O- metil quercetina "TeMQ" (metilado de ayanina) no mostraron efectos relajantes sobre los anillos.

La curva de inhibición del porcentaje de contracción de MQ es similar a la de quercetina, este derivado desmetilado, tiene un efecto máximo de relajación del 91,1±4,46%, con la menor CE50 ($5,5 \times 10^{-5}$ M), indicadores que hacen de esta molécula, la más potente de las evaluadas. TADMQ (3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O-metilquercetina) demostró que es un derivado flavonoide con buena capacidad vasodilatadora, incluso mejor que el metabolito mayoritario de *Croton schiedeanus*, ayanina, con un efecto máximo de relajación del 72,5±5,1% y una CE50 de $7,263 \times 10^{-5}$ (ver tabla 6 y figura 16).

| COMPARACIÓN DE AJUSTES | | | | | | |
|-------------------------------|---------------|--------------|------|------------------------|---|------------------|
| Compuesto | % Contracción | % Relajación | EMS | CE50 | IC CE50 | LogCE50 |
| Quercetina (n = 14) | 5,9 | 94,1 | 2,49 | $5,7 \times 10^{-5}$ M | $[5,3-6,1 \times 10^{-5}$ M]**** | 4,24 [4,27-4,20] |
| TADMQ (n = 11) | 27,5 | 72,5 | 5,10 | $7,2 \times 10^{-5}$ M | $[6,7-7,8 \times 10^{-5}$ M]*** | 4,13 [4,17-4,10] |
| DADMQ (n = 11) | 61 | 39,0 | 2,19 | $8,4 \times 10^{-4}$ M | $[3,3 \times 10^{-4}-2,1 \times 10^{-3}$ M]** | 3,07 [3,47-2,67] |
| ATMQ (n = 6) | 74,7 | 25,3 | 6,48 | $3,0 \times 10^{-4}$ M | $[1,3-7,0 \times 10^{-4}$ M] | 3,51 [3,87-3,15] |
| TeMQ (n = 7) | 76,7 | 23,3 | 3,28 | $7,7 \times 10^{-4}$ M | $[3,1 \times 10^{-4}-1,9 \times 10^{-3}$ M] | 3,11 [3,50-2,71] |
| MQ (n = 8) | 8,9 | 91,1 | 4,65 | $5,5 \times 10^{-5}$ M | $[4,9-6,0 \times 10^{-5}$ M]**** | 4,25 [4,30-4,21] |
| Ayanina (n = 10) | 37 | 63,0 | 5,81 | $1,6 \times 10^{-4}$ M | $[7,6 \times 10^{-5}-3,4 \times 10^{-4}$ M]**** | 3,78 [4,11-3,45] |
| Control (n = 8) | 91,3 | 8,7 | 3,22 | ---- | | ---- |

TABLA 6. Comparación de ajustes de los Derivados Flavonoides, ayanina y quercetina con un intervalo de confianza del 95% (<p0,05) según las diferencias con el control (DMSO 0,1%).

Se aplica un análisis de varianza (ANOVA de dos factores), este indicó que hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, concentraciones y unidades experimentales, por lo cual se confirma la hipótesis alterna que parte de la premisa que al menos un tratamiento es diferente (Anexo A7). Para determinar que tratamientos marcaban esa discrepancia, se realizó una prueba de diferencias múltiples. Se seleccionó la prueba de diferencias múltiples de Dunnett, ya que este, compara los tratamientos frente a un control (Casas G y Veitía N; 2008). Para la presente investigación se adiciono DMSO al 0,1% como control negativo (Anexo A8).

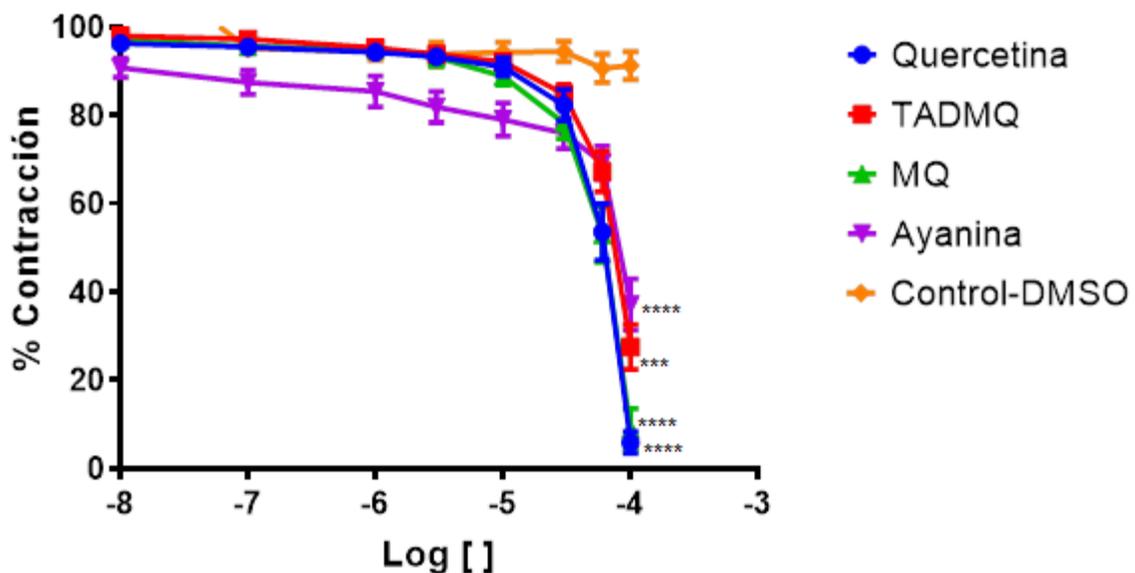


FIGURA 16. Curva concentración - respuesta de MQ, TADMQ, ayanina, quercetina y el control (DMSO 0,1%) en anillos de aorta de rata SHR contraídos con Fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$). Cada punto se representa con su respectivo EMS con una confianza de $p < 0.05$ según las diferencias con el control.

Como se ve reflejado en las curvas de dosis-respuesta, el método de Dunnett identifica que ayanina, quercetina, MQ y TADMQ son significativamente diferentes respecto al control, aunque DADMQ también es estadísticamente significativo, no se tiene en cuenta, ya que su CE_{50} ($8,4 \times 10^{-4} \text{M}$) es muy alta y el E_{max} es muy bajo ($39 \pm 2,19\%$). De igual manera las moléculas ATMQ y TeMQ tienen un E_{max} por debajo del 26% lo que no representa ninguna diferencia respecto a DMSO, razón por la que no se hace continuidad a la evaluación de las últimas tres moléculas mencionadas para el desarrollo de los dos

últimos objetivos propuestos en el estudio. Los valores de CE50 fueron obtenidos mediante el software GraphPad-Prism-8® con un intervalo de confianza del 95%.

6.1.2 Evaluación de la ruta metabólica NO/GMPc

Los ensayos con L-NAME y ODQ muestran que, si hay cambios en la curva de concentración respuesta pero que estos no inhiben del todo la relajación ejercida por las moléculas TADMQ, MQ, quercetina y ayanina sobre los anillos de aorta de ratas SHR.

6.1.2.1 Ayanina vs L-NAME vs ODQ

El porcentaje de inhibición de la relajación de ayanina es igual con L-NAME y ODQ (55.6%), lo que sugiere que ayanina ejerce su acción relajante principalmente por la vía metabólica ON/GMPc, pero no totalmente dependiente de esa vía.

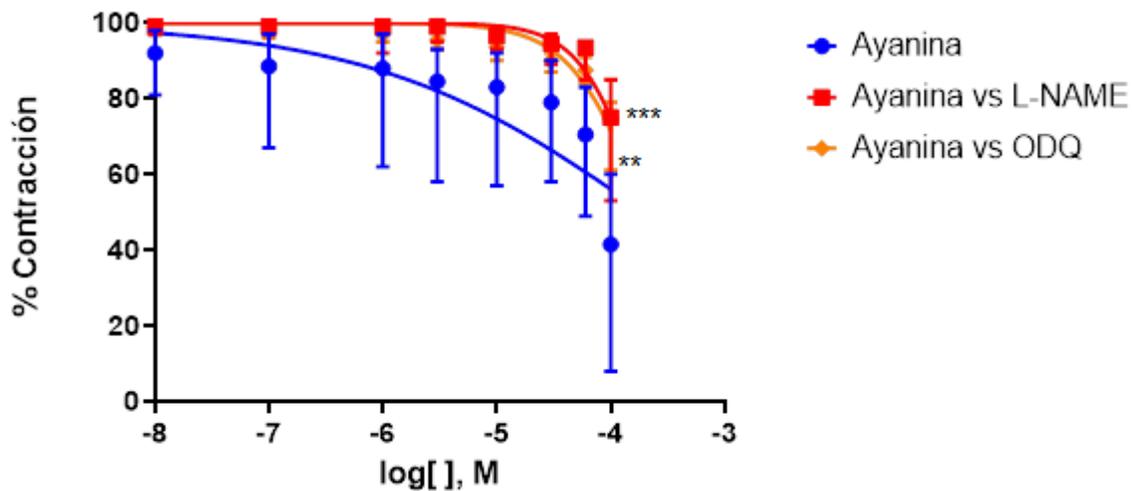


FIGURA 17. Relajación inducida por ayanina en anillos de aorta de rata SHR pre-contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) (***) ($p < 0,05$) o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) (** $p < 0,05$).

| INHIBICIÓN DEL EFECTO MÁXIMO | | | | | |
|-------------------------------|---------------|--------------|------|---|----------------|
| Compuesto | % Contracción | % Relajación | EMS | CE50 | % ↓ Relajación |
| Ayanina (n=10) | 37 | 63.0 | 5,81 | $1,6 \times 10^{-4} \text{M}$ [$7,6 \times 10^{-5}$ - $3,4 \times 10^{-4} \text{M}$] | - |
| Ayanina VS L-NAME (n=6) | 72.3 | 27.7 | 5,03 | $1,6 \times 10^{-5} \text{M}$ [$1,2$ - $2,1 \times 10^{-4} \text{M}$] ^{***} | 55.6 |
| Ayanina VS ODQ (n=6) | 72 | 28.0 | 2,82 | $4,1 \times 10^{-4} \text{M}$ [$2,4$ - $6,7 \times 10^{-4} \text{M}$] ^{**} | 55.6 |

TABLA 7. Efecto máximo de relajación inducido por ayanina en anillos de aorta de rata SHR pre-contráidos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$), ($p < 0,05$).

6.1.2.2 Quercetina vs L-NAME vs ODQ

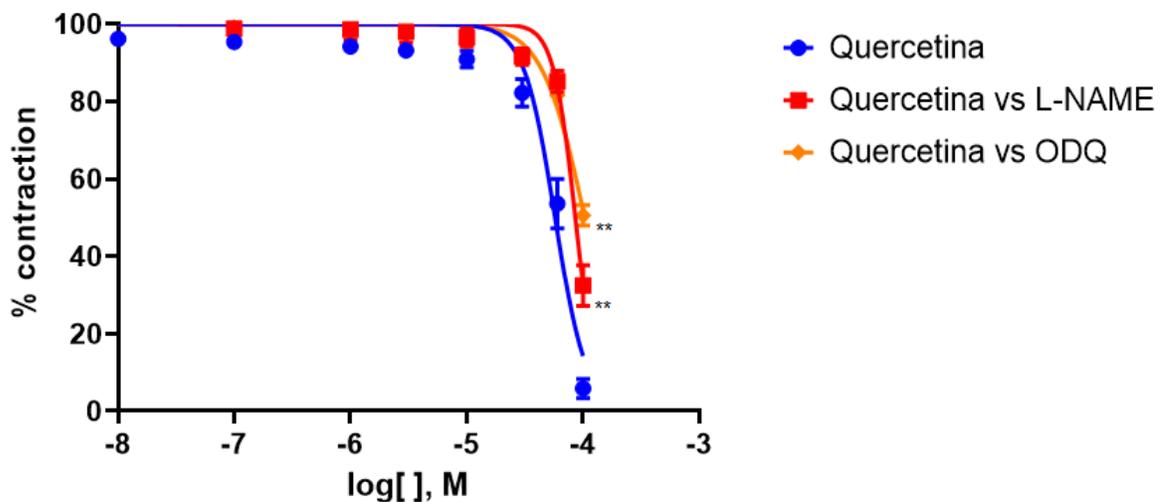


FIGURA 18. Relajación inducida por quercetina en anillos de aorta de rata SHR pre-contráidos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) (** $p < 0,05$) o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) (** $p < 0,05$).

Los resultados de la inhibición de la relajación que ejercen L-NAME y ODQ sobre quercetina indican que hay diferencias significativas por lo que la vía del NO/GMPc puede

estar involucrada en su modo de acción, sin embargo, el porcentaje de inhibición es del 27,7% con L-NAME lo que significa que posiblemente pueden estar involucrados otros mecanismos.

El efecto máximo de relajación que se logra con quercetina en anillos de aorta de rata SHR contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) es de $94,1 \pm 2,49\%$, cuando estos anillos se pre-tratan con L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) se logra un E_{max} de $67,5 \pm 5,21\%$ y con ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) de $49,2 \pm 2,5\%$.

| INHIBICIÓN DEL EFECTO MÁXIMO | | | | | |
|----------------------------------|---------------|--------------|------|--|----------------|
| Compuesto | % Contracción | % Relajación | EMS | CE50 | % ↓ Relajación |
| Quercetina (n=14) | 5,9 | 94,1 | 2,49 | $5,7 \times 10^{-5} \text{M}$ [5,3- $6,1 \times 10^{-5} \text{M}$] | - |
| Quercetina VS L-NAME (n=7) | 32.5 | 67.5 | 5,21 | $8,5 \times 10^{-5} \text{M}$ [8,1- $9,0 \times 10^{-5} \text{M}$]** | 27.7 |
| Quercetina VS ODQ (n=5) | 50.8 | 49.2 | 2,55 | $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ [$9,7 \times 10^{-5}$ - $1,09 \times 10^{-4} \text{M}$]** | 47.9 |

TABLA 8. Efecto máximo de relajación inducido por quercetina en anillos de aorta de rata SHR pre-contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$), ($p < 0,05$).

6.1.2.3 TADMQ vs L-NAME vs ODQ

El análisis de varianza para comprobar si hay diferencias estadísticas en la inhibición de la relajación con L-NAME y ODQ frente a TADMQ indica que, si las hay, entre tratamientos, concentraciones y unidades experimentales, por lo que también se realizó una prueba de comparaciones múltiples (Dunnett) (Ver anexos A9 y A10).

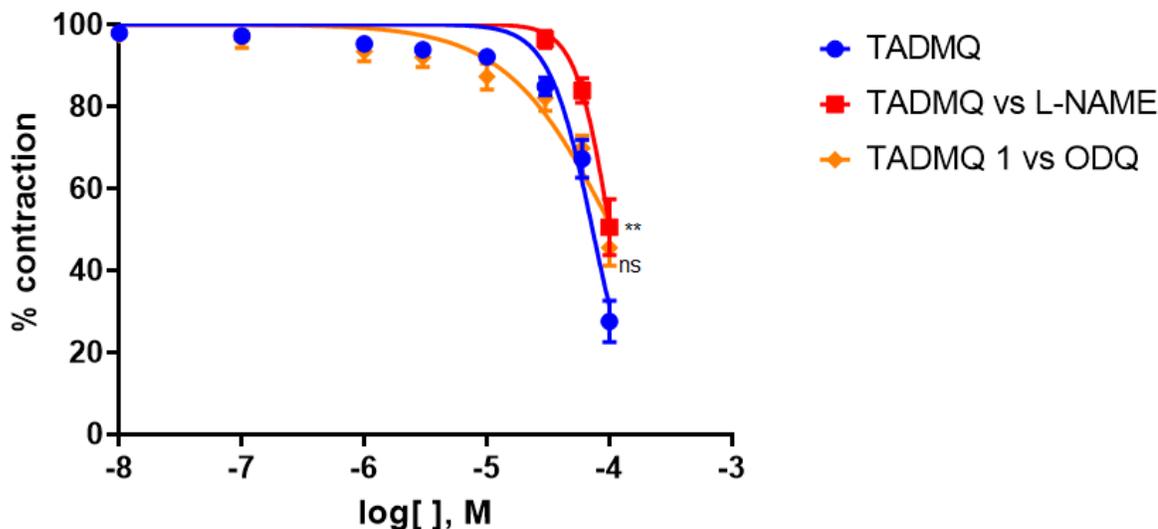


FIGURA 19. Relajación inducida por TADMQ en anillos de aorta de rata SHR pre-contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) (** $p < 0,05$) o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) (** $p < 0,05$).

| INHIBICIÓN DEL EFECTO MÁXIMO | | | | | |
|------------------------------|---------------|--------------|------|---|----------------|
| Compuesto | % Contracción | % Relajación | EMS | CE50 | % ↓ Relajación |
| TADMQ (n=11) | 27,5 | 72,5 | 5,10 | $7,2 \times 10^{-5} \text{M}$ [6,7- $7,8 \times 10^{-5} \text{M}$] | - |
| TADMQ VS L-NAME (n=6) | 50.5 | 49.5 | 6,8 | $1 \times 10^{-4} \text{M}$ [$9,3 \times 10^{-5}$ - $1,08 \times 10^{-4} \text{M}$]** | 32 |
| TADMQ VS ODQ (n=8) | 45.6 | 54.4 | 4,4 | $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ [$8,4 \times 10^{-5}$ - $1,3 \times 10^{-4} \text{M}$] ^{ns} | 26 |

TABLA 9. Efecto máximo de relajación inducido por TADMQ en anillos de aorta de rata SHR pre-contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) ** $p < 0,05$ o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ^{ns} $p < 0,05$.

En la figura 19 podemos observar como L-NAME interviene en la acción biológica de la molécula TADMQ, disminuyendo su capacidad relajante, con un porcentaje de inhibición del 32% (ver tabla 9), siendo este valor significativo estadísticamente, mientras que ODQ

cuenta con un porcentaje de inhibición del 26% y no representa ninguna diferencia significativa.

6.1.2.4 MQ vs L-NAME vs ODQ

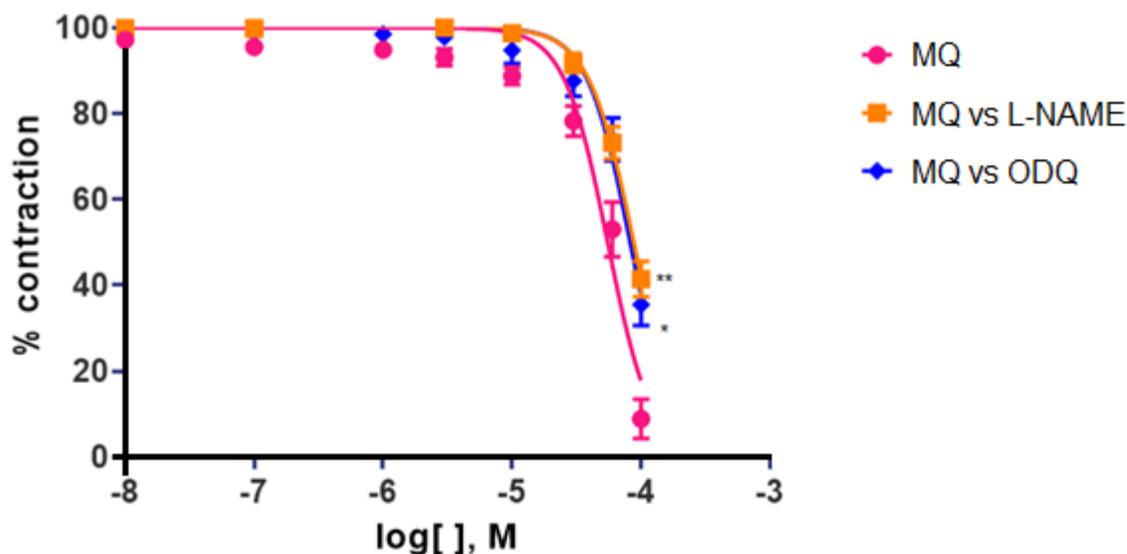


FIGURA 20. Relajación inducida por MQ en anillos de aorta de rata SHR pre-contráidos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) (** $p < 0,05$) o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) (* $p < 0,05$).

El efecto máximo de relajación que se logra con MQ en anillos de aorta de rata SHR contraídos con fenilefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) es de $91,1 \pm 4,65\%$, cuando los anillos se tratan 10 minutos antes con L-NAME ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) y ODQ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$), se logra un E_{max} de $58,6 \pm 4,15\%$ y $64,5 \pm 4,98\%$ respectivamente, lo que representa la inhibición de la relajación del 35% con L-NAME y del 28% con ODQ (ver tabla 10).

| INHIBICIÓN DEL EFECTO MÁXIMO | | | | | |
|-------------------------------|---------------|--------------|------|--|----------------|
| Compuesto | % Contracción | % Relajación | EMS | CE50 | % ↓ Relajación |
| MQ (n=8) | 8,9 | 91,1 | 4,65 | 5,5X10 ⁻⁵ M [4,9-6,0X10 ⁻⁵ M] | - |
| MQ VS L-NAME (n=10) | 41.4 | 58.6 | 4,15 | 1X1 ⁻⁴ M [9,3 x10 ⁻⁵ -1,08X10 ⁻⁴ M]** | 35.2 |
| MQ VS ODQ (n=8) | 35.5 | 64.5 | 4,98 | 1,0X10 ⁻⁴ M [8,4x10 ⁻⁵ -1,3X10 ⁻⁴ M]* | 28.6 |

TABLA 10. Efecto máximo de relajación inducido por TADMQ en anillos de aorta de rata SHR pre-contráidos con fenilefrina (1X10⁻⁶M), en presencia y ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME (1X10⁻⁴M) **p<0,05 o el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ (3X10⁻⁵M) *p<0,05.

6.2 Discusión

6.2.1 Vasorelajación y relación estructura - actividad

Correa S y colaboradores (2008), reportaron que la CE50 de Quercetina (3,7-di-O-metilquercetina) en anillos de aorta de ratas normotensas contraídos con fenilefrina fue de 4,9X10⁻⁶M con un efecto máximo del 100%, relajación que también se logró con 3-O-metilquercetina, una molécula que obtuvieron por semi-síntesis derivada de DMQ. En este estudio la CE50 de quercetina fue de 5,75X10⁻⁵M con un porcentaje de relajación de 94,1±2,49%, es importante resaltar que MQ y TADMQ se sintetizaron a partir de este metabolito y que estos dos últimos mostraron mejor actividad relajante respecto a ayanina.

Chiwororo W y Ojewole J; (2010), evaluaron los efectos de la quercetina sobre venas porta contraídas espontáneamente de ratas Wistar sanas, administrando dosis acumulativas desde 1X10⁻⁷ hasta 1X10⁻⁴ logrando un efecto máximo de relajación de los anillos del 100%, no se reporta la CE50.

Sánchez M y colaboradores (2006), estudiaron los efectos de la quercetina en un modelo in vivo utilizando ratas SHR y wistar a quienes administraron el flavonoide a dosis de 10mg/kg durante 13 semanas, observando que en las ratas hipertensas se redujo el aumento de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, mejorando la vasodilatación aortica. En ratas wistar, quercetina no tuvo efecto sobre la presión arterial ni la función endotelial.

Los efectos biológicos de quercetina dependen de la disposición de los grupos funcionales sobre su estructura nuclear (Kumar S y Pandey A, 2013; Cartaya O y Reynaldo I, 2001). De acuerdo a las características químicas de los flavonoides, varios autores refieren que la estructura de quercetina es una de las que mejor representa estas condiciones y por ende es uno de los más potentes antioxidantes (Cartaya O, Reynaldo I; 2001), la presencia de dos hidroxilos en el anillo B (carbonos 3' y 4'), un doble enlace en el anillo C (carbonos 2 y 3) y la disposición de grupos hidroxilo de los anillos A y C (carbonos 3,5 y 7) confieren un potencial captador de radicales libres y una mayor estabilidad a su forma auto-oxidada (Martínez S et al; 2002). Estas características estructurales le dan la capacidad a quercetina para ser oxidada por oxígeno y generar O_2^- , el cual reacciona con NO (López et al; 2004).

En células epiteliales de aorta bovina, quercetina inicialmente estimula la liberación de calcio, que es regulada por la fosforilación de eNOs con un consecuente aumento de óxido nítrico (Khoo et al, 2010 referenciado por Galindo-Gallardo P, 2012). Por lo que posiblemente se le confiere actividad relajante del musculo liso asociada a esta vía metabólica. Los metabolitos glucuronizados y sulfatados de quercetina no poseen actividad vasodilatadora directa en la aorta de rata (Lodi et al., 2009 referenciado por Galindo-Gallardo P; 2012).

Al analizar las características químico-estructurales de los derivados flavonoides estudiados en esta investigación, las dos moléculas que presentaron actividad vasorelajante en anillos de aorta aislados de ratas SHR, tienen una conformación de grupos funcionales que probablemente le confieren esta actividad biológica. MQ tiene 4 hidroxilos: dos en los carbonos 3' y 4' del anillo B, uno en el carbono 3 del anillo C y uno en el carbono 5 con un metilo en el carbono 7 del anillo A. Por otro lado, la molécula TADMQ cuenta con dos metilaciones en los carbonos 3 y 7. Las dos moléculas tienen un

enlace doble entre los carbonos 2 y 3 del anillo C. Estas características estructurales concuerdan con las reportados por la literatura en cuanto a la relación estructura- actividad de quercetina.

Chaves M, Puebla P y Guerrero M (2012) evaluaron la vasodilatación inducida por el extracto etanólico de *Crotón schiedeanus* y encontraron que ejerce efectos relajantes superiores vs ayanina en cuanto a potencia y eficacia, ellos reportan una CE50 de $1,3 \times 10^{-5}$ M y $4,9 \times 10^{-5}$ M con un efecto máximo del 100% y del 67% respectivamente. Nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por estos investigadores, ayanina ejerció un efecto máximo de relajación de $63 \pm 5,8\%$ con una CE50 de $1,63 \times 10^{-4}$ M.

Las moléculas derivadas de ayanina no ejercen función vasodilatadora probablemente porque se sustituyen dos grupos metilo a nivel de los carbonos 3' y 4' del anillo C en TeMQ y uno acetilo en 3' con un metilo en 4' del anillo C de ATMQ. Teniendo en cuenta las bondades de la ayanina frente a procesos cardiovasculares, vale la pena evaluar la actividad anti-trombogénica tanto de esta como de las otras dos moléculas mencionadas; Cartaya O, Reynaldo I (2001) afirman que esta actividad aumenta con el grado de metilación de los flavonoides siendo 3,5,6,7,8,3' y 4' heptametoxiflavona el más activo. Así mismo reportaron que otros autores afirman que un mayor número de metilos en estas unidades estructurales favorece la actividad antimicótica y antitumoral de flavonoides. Al aumentar el número de metilaciones disminuyen su capacidad antioxidante.

A nivel de relación estructura – actividad, con esta investigación se propone que a nivel vascular: a) las metilaciones de los carbonos 3' y 4' del anillo B disminuyen la capacidad relajante, mientras que si se encuentran en los carbonos 3 y 7 de los anillos C y A respectivamente la aumentan b) cuando grupos funcionales hidroxilo se encuentra en posición 3' y 4' del anillo B al mismo tiempo aumenta la capacidad vasodilatadora c) las moléculas evaluadas derivadas de quercetina muestran un perfil vasorelajante prometedor d) el mayor número de grupos hidroxilo favorecen la capacidad antioxidante de las moléculas y consecuentemente, una mayor capacidad antioxidante, favorece el perfil vasorelajante de las mismas.

Aunque los ensayos *ex-vivo* con flavonoides en vasos sanguíneos principalmente en ratas muestran un perfil vasodilatador prometedor, es importante tener en cuenta que estos

resultados no deben extrapolarse para asumir efectos *in-vivo*, ya que la biodisponibilidad de estas moléculas se ve afectada por una transformación o metabolismo inicial a nivel de los enterocitos y luego a nivel hepático (Sánchez-Santos M, 2007), precisamente por su configuración estructural y facilidad de auto-oxidación. Teniendo en cuenta esta información, el derivado TADMQ concebiría mayor interés, porque es una molécula con actividad relajante vascular y en su conformación estructural posee tres grupos acetilo en los carbonos 3',4' y 5 de los anillos C y A respectivamente, que podrían brindarle mayor estabilidad en su biotransformación y reflejar una mejor biodisponibilidad. Es importante realizar estudios que puedan generar mayor información al respecto.

6.2.2 Ruta metabólica NO/GMPc

Carron y colaboradores (2010), concluyeron que ayanina induce una relajación dependiente del endotelio en la aorta de ratas wistar, efecto vinculado principalmente con la vía metabólica del óxido nítrico/GMP cíclico, considerando la respuesta observada en presencia de L-NAME, ODQ y L-arginina.

Correa y colaboradores (2008), reportaron que, ODQ modifica más la curva de concentración respuesta de quercetina y 3-O-metilquercetina, respecto a L-NAME, coincidiendo los resultados con los obtenidos en este estudio, de igual manera, estos compuestos no logran inhibir el Emax de relajación del metabolito.

En la investigación que llevaron a cabo Chiwororo W y Ojewole J (2010), quercetina siempre produjo efectos bifásicos significativos, que comprendieron un breve efecto estimulante inicial (aumento del tono basal), seguido de un efecto relajante (inhibidor) prolongado y duradero en los anillos de vena porta de ratas wistar. Las leves contracciones iniciales del músculo venoso se modificaron cuando fueron pre-tratados con nifedipina a concentraciones de 1×10^{-7} , por lo que llegaron a la conclusión que quercetina posiblemente podría estar activando los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. El efecto vasorelajante fue inhibido parcial, pero no significativamente por L-NAME a concentraciones de 100 μ M, estos últimos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio. Finalmente concluyeron que las proteínas quinasas dependientes de

AMPc podrían haber contribuido al efecto vasorelajante del metabolito en las venas porta ya que TPCK (N-p-tosil-l-fenilalanina-clorometil-cetona) antagonizo significativamente su acción.

Duarte et al (2004) afirmaron que quercetina juega un papel importante en la disfunción endotelial, ya que, la generación de O_2^- estimula inicialmente la señal de calcio y por mecanismos de regulación consecuentes, aumentando la actividad de eNOs y la liberación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).

L-NAME y ODQ influyen en la respuesta relajante de MQ, TADMQ, quercetina y ayanina. La prueba de diferencias múltiples indica que estos compuestos modifican la respuesta de las moléculas por lo que posiblemente puede estar vinculada la ruta metabólica NO/GMPc para ejercer su efecto farmacológico, pero, como no inhibe la respuesta totalmente, se sugiere que pueden estar implicados en la regulación de la relajación del musculo liso arterial otros mecanismos de acción. Es importante su evaluación en ensayos posteriores y contemplar otras rutas metabólicas.

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Los derivados flavonoides 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O-metilquercetina y 7-O-metilquercetina son dos moléculas que despiertan gran interés farmacológico, ya que, en ensayos in-vitro generaron relajación de anillos aislados de aorta de rata SHR previamente contraídos con fenilefrina, siendo posible su implementación en ensayos in-vivo para determinar su papel farmacocinético y farmacodinámico frente al tratamiento de la hipertensión arterial o en otros procesos patológicos asociados.
- En cuanto a la relación estructura actividad se propone que a nivel vascular se potencializan los efectos relajantes cuando en la molécula base de los flavonoides se encuentran metilaciones de los carbonos 3 y 7 de los anillos C y A y cuando grupos funcionales hidroxilo se encuentra en posición 3' y 4' del anillo B al mismo.
- Los ensayos con L-NAME y ODQ muestran que si hay cambios en la curva de concentración respuesta y aunque estadísticamente hay diferencias significativas que sugieren que la vía metabólica del NO/GMPC está involucrada en su modo de acción, la relajación ejercida por las moléculas TADMQ, MQ, quercetina y ayanina sobre los anillos de aorta de ratas SHR no se inhibe totalmente. Posiblemente están asociados otros mecanismos de acción que vale la pena evaluar en próximas investigaciones.

7.2 Recomendaciones

Es necesario evaluar en ensayos in vivo las moléculas TADMQ y MQ en animales hipertensos, para identificar si las características farmacocinéticas y farmacodinámicas influyen en la regulación de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, identificando moléculas con potencial terapéutico favorable en hipertensión arterial.

A. Anexo: Procesamiento estadístico de los datos

| Estadística Descriptiva - % Relajación (Emáx) | | | | | | | | |
|---|------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|
| Parámetro | Quercetina | TADMQ | DADMQ | ATMQ | TeMQ | MQ | Ayanina | DMSO |
| Media | 94,1 | 72,5 | 39,0 | 25,3 | 23,3 | 91,1 | 63,0 | 8,7 |
| Error típico | 2,49 | 5,10 | 2,19 | 6,48 | 3,28 | 4,65 | 5,81 | 3,23 |
| Mediana | 100 | 76,67 | 41,45 | 21,52 | 21,67 | 100 | 58,38 | 9,05 |
| Moda | 100 | - | - | - | - | 100 | - | - |
| Desviación estándar | 9,30 | 16,91 | 7,27 | 15,88 | 8,69 | 13,14 | 18,39 | 9,13 |
| Varianza de la muestra | 86,50 | 286,11 | 52,90 | 252,07 | 75,45 | 172,61 | 338,09 | 83,35 |
| Curtosis | 1,20 | -0,37 | -1,26 | 4,16 | 0,53 | -0,11 | -1,35 | 1,39 |
| Coefficiente de asimetría | -1,47 | -0,55 | -0,46 | 1,90 | -0,70 | -1,12 | 0,44 | 0,25 |
| Rango | 27,98 | 50,38 | 21,61 | 45,15 | 25,79 | 33,47 | 51,56 | 31,30 |
| Mínimo | 72,02 | 44,66 | 27,07 | 10,92 | 7,96 | 66,53 | 40,48 | -5,95 |
| Máximo | 100 | 95,044 | 48,681 | 56,066 | 33,754 | 100 | 92,040 | 25,36 |
| Suma | 1317,85 | 797,78 | 429,25 | 151,84 | 163,43 | 728,43 | 630,32 | 69,75 |
| Cuenta | 14 | 11 | 11 | 6 | 7 | 8 | 10 | 8 |
| Nivel de confianza(95,0%) | 5,370 | 11,363 | 4,886 | 16,662 | 8,033 | 10,984 | 13,153 | 7,63 |

ANEXO A1. Estadística descriptiva, comparación de todos los tratamientos vs control negativo.

| Estadística Descriptiva - % Relajación (Emáx) | | | |
|---|------------|------------|---------|
| Parámetro | Quercetina | Q + L-NAME | Q + ODQ |
| Media | 94,13 | 67,51 | 49,25 |
| Error típico | 2,49 | 5,21 | 2,55 |
| Mediana | 100 | 68,64 | 52,55 |
| Moda | 100 | - | - |
| Desviación estándar | 9,30 | 13,77 | 5,70 |
| Varianza de la muestra | 86,50 | 189,65 | 32,53 |
| Curtosis | 1,205 | 3,701 | 1,171 |
| Coefficiente de asimetría | -1,468 | -1,672 | -1,392 |
| Rango | 27,98 | 41,42 | 13,62 |
| Mínimo | 72,02 | 39,13 | 40,06 |
| Máximo | 100 | 80,547 | 53,682 |
| Suma | 1317,85 | 472,54 | 246,24 |
| Cuenta | 14 | 7 | 5 |
| Nivel de confianza(95,0%) | 5,370 | 12,736 | 7,082 |

ANEXO A2. Estadística descriptiva, efecto máximo de quercetina con y sin L-NAME y ODQ.

| Estadística Descriptiva - % Relajación (Emáx) | | | |
|--|----------------|-------------------|----------------|
| Parámetro | Ayanina | A + L-NAME | A + ODQ |
| Media | 63,03 | 27,76 | 28,01 |
| Error típico | 5,81 | 5,03 | 2,82 |
| Mediana | 58,38 | 25,29 | 25,46 |
| Moda | - | - | - |
| Desviación estándar | 18,39 | 12,32 | 6,92 |
| Varianza de la muestra | 338,09 | 151,69 | 47,82 |
| Curtosis | -1,35 | -0,97 | 0,03 |
| Coefficiente de asimetría | 0,44 | 0,66 | 1,04 |
| Rango | 51,56 | 31,22 | 18,36 |
| Mínimo | 40,48 | 15,41 | 21,06 |
| Máximo | 92,04 | 46,63 | 39,42 |
| Suma | 630,32 | 166,57 | 168,06 |
| Cuenta | 10 | 6 | 6 |
| Nivel de confianza(95,0%) | 13,15 | 12,92 | 7,26 |

ANEXO A3. Estadística descriptiva, efecto máximo de ayanina con y sin L-NAME y ODQ.

| Estadística Descriptiva - % Relajación (Emáx) | | | |
|--|--------------|-------------------|----------------|
| Parámetro | TADMQ | T + L-NAME | T + ODQ |
| Media | 72,525 | 49,552 | 54,464 |
| Error típico | 5,100 | 6,873 | 4,466 |
| Mediana | 76,671 | 52,020 | 54,269 |
| Moda | - | - | - |
| Desviación estándar | 16,915 | 16,835 | 12,631 |
| Varianza de la muestra | 286,106 | 283,418 | 159,553 |
| Curtosis | -0,367 | -1,730 | 0,565 |
| Coefficiente de asimetría | -0,549 | -0,300 | -0,198 |
| Rango | 50,380 | 41,334 | 41,921 |
| Mínimo | 44,664 | 27,893 | 32,535 |
| Máximo | 95,044 | 69,227 | 74,456 |
| Suma | 797,780 | 297,310 | 435,716 |
| Cuenta | 11 | 6 | 8 |
| Nivel de confianza(95,0%) | 11,363 | 17,667 | 10,560 |

ANEXO A4. Estadística descriptiva, efecto máximo de TADMQ con y sin L-NAME y ODQ.

| Estadística Descriptiva - % Relajación (Emáx) | | | |
|--|-----------|--------------------|-----------------|
| Parámetro | MQ | MQ + L-NAME | MQ + ODQ |
| Media | 91,054 | 58,611 | 64,572 |
| Error típico | 4,645 | 4,155 | 4,986 |
| Mediana | 100 | 58,413 | 67,364 |
| Moda | 100 | - | - |
| Desviación estándar | 13,138 | 13,140 | 14,104 |
| Varianza de la muestra | 172,611 | 172,660 | 198,914 |
| Curtosis | -0,112 | 0,023 | 2,637 |
| Coeficiente de asimetría | -1,118 | -0,222 | -1,427 |
| Rango | 33,468 | 45,562 | 44,351 |
| Mínimo | 66,532 | 34,310 | 34,841 |
| Máximo | 100 | 79,872 | 79,192 |
| Suma | 728,431 | 586,114 | 516,577 |
| Cuenta | 8 | 10 | 8 |
| Nivel de confianza(95,0%) | 10,984 | 9,400 | 11,791 |

ANEXO A5. Estadística descriptiva, efecto máximo de MQ con y sin L-NAME y ODQ.

| AJUSTE DE DATOS - TABLA DE RESULTADOS | | | | | | | | |
|--|--|--------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| DATOS | Quercetina | TADMQ | DADMQ | ATMQ | TeMQ | MQ | Ayanina | Control DMSO |
| LogEC50 | -4,24 | -4,139 | -3,075 | -3,516 | -3,111 | -4,258 | -3,787 | -1338221 |
| Pendiente | -3,251 | -2,461 | -0,3957 | -1,099 | -0,6571 | -2,567 | -0,3911 | 1,066E-06 |
| EC50 | 5,756,E-05 | 7,263,E-05 | 8,418,E-04 | 3,049,E-04 | 7,747,E-04 | 5,515,E-05 | 1,632,E-04 | 0 |
| IC 95% (asintótico) | | | | | | | | |
| LogEC50 | -4,272 to -4,208 | -4,171 to -4,107 | -3,478 to -2,671 | -3,878 to -3,154 | -3,504 to -2,718 | -4,301 to -4,216 | -4,118 to -3,457 | |
| Pendiente | -4,009 to -2,494 | -2,973 to -1,949 | -0,5045 to -0,2868 | -1,725 to -0,4733 | -0,8819 to -0,4323 | -3,207 to -1,927 | -0,5194 to -0,2627 | |
| EC50 | 5,347e-005 to 6,195e-005 | 6,753e-005 to 7,812e-005 | 0,0003324 to 0,002132 | 0,0001325 to 0,0007019 | 0,0003132 to 0,001916 | 4,998e-005 to 6,085e-005 | 7,623e-005 to 0,0003495 | |
| Bondad de ajuste | | | | | | | | |
| Grados de libertad | 110 | 86 | 86 | 46 | 54 | 62 | 78 | |
| R cuadrado | 0,8346 | 0,8359 | 0,5395 | 0,4258 | 0,6304 | 0,8626 | 0,4623 | |
| Suma de cuadrados | 18701 | 8441 | 5958 | 2554 | 1336 | 8033 | 16349 | |
| Sy.x | 13,04 | 9,907 | 8,324 | 7,451 | 4,974 | 11,38 | 14,48 | |
| Comparación de ajustes | | | | | | | | |
| Hipotesis Nula | LogEC50 igual para cada grupo de datos | | | | | | | |
| Hipotesis Alternativa | LogEC50 diferente para cada grupo de datos | | | | | | | |

ANEXO A6. CE50, Log EC50 e Intervalos de confianza (95%) por cada grupo de datos.

| ANOVA (Dos vías) | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------|---------|-----------------|---------------------|----------|--|--|--|--|
| Tabla analizada | Dosis vs respuesta | | | | | | | | |
| DERIVADOS FLAVONOIDES | | | | | | | | | |
| ANOVA 2 vías | | | | | | | | | |
| Asumir esfericidad? | Si | | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | | |
| Fuente de variación | % de variación total | Valor P | Resumen valor P | Significante? | | | | | |
| Interacción | 19,15 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Concentración | 42,59 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Tratamiento | 10,21 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Unidad experimental (UE) | 8,177 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Tabla ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P | | | | |
| Interacción | 61074 | 49 | 1246 | F (49, 469) = 24,64 | P<0,0001 | | | | |
| Concentración | 135846 | 7 | 19407 | F (7, 469) = 383,6 | P<0,0001 | | | | |
| Tratamiento | 32572 | 7 | 4653 | F (7, 67) = 11,95 | P<0,0001 | | | | |
| Unidad experimental (UE) | 26079 | 67 | 389,2 | F (67, 469) = 7,694 | P<0,0001 | | | | |
| Residual | 23726 | 469 | 50,59 | | | | | | |
| Resumen datos | | | | | | | | | |
| Número de columnas (tto) | 8 | | | | | | | | |
| Número de filas (I) | 8 | | | | | | | | |
| Número de anillos (UE) | 75 | | | | | | | | |

ANEXO A7. ANOVA a dos vías de todos los tratamientos.

| MÉTODO DE DUNNETT | | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------|----|-----|-------|----|--|
| Comparar medias de columna (efecto de columna principal) | | | | | | | | | |
| Número de familias | 1 | DERIVADOS FLAVONOIDES | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 7 | | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett | Diferencia media pronosticada (LS) | IC 95,00% | Significante | Resumen | | | | | |
| Control-DMSO vs. Quercetina | 19,94 | 11,68 to 28,19 | Si | **** | | | | | |
| Control-DMSO vs. TADMQ | 14,42 | 5,774 to 23,08 | Si | *** | | | | | |
| Control-DMSO vs. DADMQ | 11,33 | 2,683 to 19,98 | Si | ** | | | | | |
| Control-DMSO vs. ATMQ | 4,078 | -5,976 to 14,13 | No | ns | | | | | |
| Control-DMSO vs. TeMQ | 4,319 | -5,316 to 13,95 | No | ns | | | | | |
| Control-DMSO vs. MQ | 20,2 | 10,89 to 29,51 | Si | **** | | | | | |
| Control-DMSO vs. Ayanina | 20,58 | 11,75 to 29,41 | Si | **** | | | | | |
| Detalles de la prueba | Media predicha 1 (LS) | Media predicha 2 (LS) | Diferencia media pronosticada (LS) | SE of diff, | N1 | N2 | q | DF | |
| Control-DMSO vs. Quercetina | 96,39 | 76,46 | 19,94 | 3,091 | 64 | 112 | 6,448 | 67 | |
| Control-DMSO vs. TADMQ | 96,39 | 81,97 | 14,42 | 3,241 | 64 | 88 | 4,45 | 67 | |
| Control-DMSO vs. DADMQ | 96,39 | 85,06 | 11,33 | 3,241 | 64 | 88 | 3,497 | 67 | |
| Control-DMSO vs. ATMQ | 96,39 | 92,31 | 4,078 | 3,767 | 64 | 48 | 1,083 | 67 | |
| Control-DMSO vs. TeMQ | 96,39 | 92,07 | 4,319 | 3,61 | 64 | 56 | 1,196 | 67 | |
| Control-DMSO vs. MQ | 96,39 | 76,19 | 20,2 | 3,488 | 64 | 64 | 5,793 | 67 | |
| Control-DMSO vs. Ayanina | 96,39 | 75,81 | 20,58 | 3,309 | 64 | 80 | 6,219 | 67 | |

ANEXO A8. Método de Dunnett, comparación de todos los tratamientos vs control negativo.

| ANOVA (Dos vías) | | | | | |
|--------------------------|----------------------|------------------------|-----------------|-------------------|----------|
| Tabla analizada | Dosis vs respuesta | TADMQ VS L-NAME VS ODQ | | | |
| ANOVA 2 vías | Pareo: apilado | | | | |
| Asumir esfericidad? | Si | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de variación | % de variación total | Valor P | Resumen valor P | Significante? | |
| Interacción | 2,5 | <0,0001 | **** | Si | |
| Concentración | 71 | <0,0001 | **** | Si | |
| Tratamiento | 4,5 | 0,0055 | ** | Si | |
| Unidad experimental (UE) | 7,5 | <0,0001 | **** | Si | |
| Tabla ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 2355 | 14 | 168 | F (14, 154) = 5,1 | P<0,0001 |
| Concentración | 65809 | 7 | 9401 | F (7, 154) = 286 | P<0,0001 |
| Tratamiento | 4218 | 2 | 2109 | F (2, 22) = 6,6 | P=0,0055 |
| Unidad experimental (UE) | 6981 | 22 | 317 | F (22, 154) = 9,7 | P<0,0001 |
| Residual | 5058 | 154 | 33 | | |
| Resumen datos | | | | | |
| Número de columnas (tto) | 3 | | | | |
| Número de filas ([]) | 8 | | | | |
| Número de anillos (UE) | 25 | | | | |

ANEXO A9. ANOVA a dos vías, TADMQ, L-NAME y ODQ.

| MÉTODO DE DUNNETT | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------|----|----|------|----|
| Comparar medias de columna (efecto de columna principal) | | | | | | | | |
| Número de familias | 1 | TADMQ VS L-NAME VS ODQ | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett | Diferencia media pronosticada (LS) | IC 95,00% | Significante | Resumen | | | | |
| TADMQ vs. TADMQ vs L-NAME | -11 | -19 to -3,5 | Si | ** | | | | |
| TADMQ vs. TADMQ 1 vs ODQ | -0,97 | -7,9 to 6,0 | No | ns | | | | |
| Detalles de la prueba | Media predicha 1 (LS) | Media predicha 2 (LS) | Diferencia media pronosticada (LS) | SE of diff, | N1 | N2 | q | DF |
| TADMQ vs. TADMQ vs L-NAME | 82 | 93 | -11 | 3,2 | 88 | 48 | 3,5 | 22 |
| TADMQ vs. TADMQ 1 vs ODQ | 82 | 83 | -0,97 | 2,9 | 88 | 64 | 0,33 | 22 |

ANEXO A10. Método de Dunnett, comparación de TADMQ vs L-NAME y ODQ.

| ANOVA (Dos vías) | | | | | |
|--------------------------|----------------------|---------|---------------------|-------------------|----------|
| Tabla analizada | Dosis vs respuesta | | MQ VS L-NAME VS ODQ | | |
| ANOVA 2 vías | Pareo: apilado | | | | |
| Asumir esfericidad? | Si | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de variación | % de variación total | Valor P | Resumen valor P | Significante? | |
| Interacción | 2,9 | <0,0001 | **** | Si | |
| Concentración | 84 | <0,0001 | **** | Si | |
| Tratamiento | 4,2 | 0,0025 | ** | Si | |
| Unidad experimental (UE) | 6,1 | <0,0001 | **** | Si | |
| Tabla ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 3731 | 14 | 267 | F (14, 161) = 7,9 | P<0,0001 |
| Concentración | 109267 | 7 | 15610 | F (7, 161) = 462 | P<0,0001 |
| Tratamiento | 5463 | 2 | 2732 | F (2, 23) = 7,8 | P=0,0025 |
| Unidad experimental (UE) | 8011 | 23 | 348 | F (23, 161) = 10 | P<0,0001 |
| Residual | 5445 | 161 | 34 | | |
| Resumen datos | | | | | |
| Número de columnas (tto) | 3 | | | | |
| Número de filas ([]) | 8 | | | | |
| Número de anillos (UE) | 26 | | | | |

ANEXO A11. ANOVA a dos vías, MQ, L-NAME y ODQ.

| MÉTODO DE DUNNETT | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------|----|---------------------|-----|----|
| Comparar medias de columna (efecto de columna principal) | | | | | | MQ VS L-NAME VS ODQ | | |
| Número de familias | 1 | | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett | Diferencia media pronosticada (LS) | IC 95,00% | Significante | Resumen | | | | |
| MQ vs. MQ vs L-NAME | -12 | -19 to -4,6 | Si | ** | | | | |
| MQ vs. MQ vs ODQ | -9,7 | -17 to -1,9 | Si | * | | | | |
| Detalles de la prueba | Media predicha 1 (LS) | Media predicha 2 (LS) | Diferencia media pronosticada (LS) | SE of diff, | N1 | N2 | q | DF |
| MQ vs. MQ vs L-NAME | 76 | 88 | -12 | 3,1 | 64 | 80 | 3,8 | 23 |
| MQ vs. MQ vs ODQ | 76 | 86 | -9,7 | 3,3 | 64 | 64 | 2,9 | 23 |

ANEXO A12. Método de Dunnett, comparación de MQ vs L-NAME y ODQ.

| ANOVA (Dos vías) | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|---------|-----------------|-------------------|----------|----------------|--|--|--|
| Tabla analizada | Dosis vs respuesta | | | | | | | | |
| | Ayanina VS L-NAME VS ODQ | | | | | | | | |
| ANOVA 2 vías | | | | | | Pareo: apilado | | | |
| Asumir esfericidad? | | | | | | Si | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | | |
| Fuente de variación | % de variación total | Valor P | Resumen valor P | Significante? | | | | | |
| Interacción | 5,2 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Concentración | 39 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Tratamiento | 24 | 0,0002 | *** | Si | | | | | |
| Unidad experimental (UE) | 17 | <0,0001 | **** | Si | | | | | |
| Tabla ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P | | | | |
| Interacción | 2626 | 14 | 188 | F (14, 133) = 8,8 | P<0,0001 | | | | |
| Concentración | 19618 | 7 | 2803 | F (7, 133) = 132 | P<0,0001 | | | | |
| Tratamiento | 12329 | 2 | 6165 | F (2, 19) = 14 | P=0,0002 | | | | |
| Unidad experimental (UE) | 8653 | 19 | 455 | F (19, 133) = 21 | P<0,0001 | | | | |
| Residual | 2823 | 133 | 21 | | | | | | |
| Resumen datos | | | | | | | | | |
| Número de columnas (tto) | 3 | | | | | | | | |
| Número de filas (I) | 8 | | | | | | | | |
| Número de anillos (UE) | 22 | | | | | | | | |

ANEXO A13. ANOVA a dos vías: Ayanina, L-NAME y ODQ.

| MÉTODO DE DUNNETT | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------|----|----|-----|----|--|--|--|--|--|--|
| Comparar medias de columna (efecto de columna principal) | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ayanina VS L-NAME VS ODQ | | | | | | | | | | | | | |
| Número de familias | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | | | | | | | | 2 | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett | Diferencia media pronosticada (LS) | IC 95,00% | Significante | Resumen | | | | | | | | | | |
| Ayanina vs. Ayanina vs L-NAME | -18 | -27 to -8,5 | Si | *** | | | | | | | | | | |
| Ayanina vs. Ayanina vs ODQ | -16 | -25 to -6,3 | Si | ** | | | | | | | | | | |
| Detalles de la prueba | Media predicha 1 (LS) | Media predicha 2 (LS) | Diferencia media pronosticada (LS) | SE of diff, | N1 | N2 | q | DF | | | | | | |
| Ayanina vs. Ayanina vs L-NAME | 76 | 94 | -18 | 3,9 | 80 | 48 | 4,6 | 19 | | | | | | |
| Ayanina vs. Ayanina vs ODQ | 76 | 91 | -16 | 3,9 | 80 | 48 | 4 | 19 | | | | | | |

ANEXO A14. Método de Dunnett, comparación de Ayanina vs L-NAME y ODQ.

| ANOVA (Dos vías) | | | | | |
|--------------------------|----------------------|---------|-----------------------------|-------------------|----------|
| Tabla analizada | Dosis vs respuesta | | Quercetina VS L-NAME VS ODQ | | |
| ANOVA 2 vías | Pareo: apilado | | | | |
| Asumir esfericidad? | Si | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | |
| Fuente de variación | % de variación total | Valor P | Resumen valor P | Significante? | |
| Interacción | 5,2 | <0,0001 | **** | Si | |
| Concentración | 54 | <0,0001 | **** | Si | |
| Tratamiento | 4,6 | 0,0007 | *** | Si | |
| Unidad experimental (UE) | 5,2 | <0,0001 | **** | Si | |
| Tabla ANOVA | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor P |
| Interacción | 8253 | 14 | 590 | F (14, 161) = 11 | P<0,0001 |
| Concentración | 85103 | 7 | 12158 | F (7, 161) = 233 | P<0,0001 |
| Tratamiento | 7272 | 2 | 3636 | F (2, 23) = 10 | P=0,0007 |
| Unidad experimental (UE) | 8311 | 23 | 361 | F (23, 161) = 6,9 | P<0,0001 |
| Residual | 8411 | 161 | 52 | | |
| Resumen datos | | | | | |
| Número de columnas (tto) | 3 | | | | |
| Número de filas ([]) | 8 | | | | |
| Número de anillos (UE) | 26 | | | | |

ANEXO A15. ANOVA a dos vías: Quercetina, L-NAME y ODQ.

| MÉTODO DE DUNNETT | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------|-----|----|-----|----|
| Comparar medias de columna (efecto de columna principal) | | | | | | | | |
| Número de familias | 1 | | Quercetina VS L-NAME VS ODQ | | | | | |
| Número de comparaciones por familia | 2 | | | | | | | |
| Alfa | 0,05 | | | | | | | |
| Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett | Diferencia media pronosticada (LS) | IC 95,00% | Significante | Resumen | | | | |
| Quercetina vs. Quercetina vs L-NAME | -11 | -19 to -3,9 | Si | ** | | | | |
| Quercetina vs. Quercetina vs ODQ | -13 | -21 to -4,3 | Si | ** | | | | |
| Detalles de la prueba | Media predicha 1 (LS) | Media predicha 2 (LS) | Diferencia media pronosticada (LS) | SE of diff, | N1 | N2 | q | DF |
| Quercetina vs. Quercetina vs L-NAME | 76 | 88 | -11 | 3,1 | 112 | 56 | 3,6 | 23 |
| Quercetina vs. Quercetina vs ODQ | 76 | 89 | -13 | 3,5 | 112 | 40 | 3,6 | 23 |

ANEXO A16. Método de Dunnett, comparación de Quercetina vs L-NAME y ODQ

Bibliografía

Amaya, A., Visitación, M y Ortega, A. (2001). Vascular Responses After Short-Term and Long-Term Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 37: 133-142.

Andrade-Castellanos, C. (2015). Hipertensión arterial primaria: tratamiento farmacológico basado en la evidencia. *Med Int Méx*; 31:191-195.

Barrios-Alonso, V. (2017). Terapia Combinada para el Tratamiento de la hipertensión arterial. *Actualidad en Cardiología Clínica*. Sociedad Española de Cardiología.

Botana, L. (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. McGRAW-HILL, Interamericana de España. 1er Edición: 221-229.

Carron, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M., San-Roman, L y Guerrero, M. (2010). Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rats. *Colombia Médica*. 41: 6-10.

Cartaya, O y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*; 22 (2), 5-14.

Casas, G y Veitía, N. (2008). Aplicación de métodos de comparaciones múltiples en Biotecnología Vegetal. *Biotecnología Vegetal*; 8 (2): 67 – 71.

Chaves-Torres, M., Puebla, P y Guerrero, M. (2012). Vasodilatación inducida por *Croton schiedeanus Schlecht* vinculada con la ruta metabólica de guanilato ciclasa. *Revista Colombiana de Ciencias químicas farmacéuticas*. 41: 36-49.

Chiappe-Pulido, A. (2013). Estudio Fitoquímico de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de química. Bogotá, Colombia.

Chiwororo, W y Ojewole, J. (2010). Cardiovascular Topics Dual effect of quercetin on rat isolated portal vein smooth muscle contractility. *Cardiovascular Journal of Africa*, 21(3), 132–136.

- Correa-Hernández, S. (2004). Estudio Fitoquímico y Evaluación de la acción relajante vascular de *Croton schiedeanus Schlecht*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Bogotá, Colombia.
- Correa, S., Puebla, P., Carrón De La Calle, R., Martín, M., Roman Del Barrio, L y Guerrero, M. (2008). Perfil vasodilatador de compuestos flavonoides y fenilbutanoides aislados de *Croton Schiedeanus Schlecht*. Revista Facultad de Medicina, 56, 291–301.
- Coy-Barrera, C., Gómez, D y Castiblanco, F (2016). Importancia Medicinal del género *Croton*. Revista Cubana de Plantas Medicinales; 21 (2): 234-247.
- Duarte, J., Andriambeloson, E., Diebolt, M y Andriantsitohaina, R. (2004). Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res*; 53:595-602.
- Duarte, J y Pérez, F. (2015). Protección cardiovascular con flavonoides. Enigma farmacocinético. *Ars Pharmaceutica*; 56 (4).
- Duboscq, C. (2017). Endotelio vascular. *Rev. Hematología*. 21: 19 – 30.
- Espinosa-Brito, A. (2018). Hipertensión arterial: cifras para definirla al comenzar 2018. *Revista Finlay*. 8: 66-74.
- Fernández, A. (2013). Manejo de la Hipertensión Arterial. Departamento de Cardiología y Cirugía Cardíaca. Clínica Universidad de Navarra. *Medpub journals*. 9:2.
- Galindo-Gallardo, P. (2012). Biodisponibilidad y efecto antihipertensivo de la quercetina. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacología.
- Galván, R. (2007). Canales iónicos implicados en la regulación del tono vascular. Tesis de grado. Universidad de Colina. Facultad de Medicina.
- Guerrero, M., Carron, R., Martín, M., Róman, L y Reguero, M. (2000). Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus Schlecht* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 75: 33-36.

Guerrero, M., Puebla, P., Martín, M., Carron, R., Roman, L., Reguero, M y Arteaga, L. (2001). Inhibitory effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on the anti-adrenergic response elicited by Ayanin in the pithed rat.

Guerrero, M., Puebla, P., Carron, R., Martín, M., Arteaga, L y San-Roman, L. (2002). Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 80: 37-42.

Guerrero, M., Puebla, P., Carron, R., Marín, M y San-Roman, L. (2002). Quercetin 3, 7 – dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54: 1373-1378.

Guerrero, M., Puebla, P., Carron, R., Martín, M y Román, L. (2004). Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 94: 185–189.

James, P., Oparil, S., Carter, B y Cushman, W. (2014). Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults. Report from the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*; 311(5):507-520.

Kumar, S y Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*; 2013, 1-16.

Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E y Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismos de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*; 34, 143-154.

López, G., Moreno, L., Cogolludo, A., Galisteo, M., Ibarra, M., Duarte, J., Lodi, F., Tamargo, J y Pérez, F. (2004). Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol*; 65:851-59.

Maicas, C., Lázaro, E., Alcalá, J., Hernández, P y Rodríguez, L. (2003). Etiología y Fisiología de la Hipertensión Arterial Esencial. *Sociedad Castellana de Cardiología. Monocardio* 3: 141-160.

Martín, P. (2012). Canales de potasio en el músculo liso vascular humano: ácido araquidónico como factor hiperpolarizante dependiente de endotelio. Tesis doctoral.

Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas.

Martínez, S., Gonzáles, J., Culebras, J y Tuñón, M. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr, Hosp*; 17 (6): 271-278.

Molina, L y Melo, S. (2010). Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE₅₀ y CE₉₅ de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomía Colombiana*; 28 (2): 235-244.

Nova, M y Guerrero, M. (2008). Evaluación del Efecto del Extracto Etanólico de *Croton schiedeanus Schlecht* en un Modelo de Hipertensión Arterial inducida con L-NAME en ratas wistar. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*; 40:149-151.

Organización Mundial de la Salud. OMS. (2019).

Ortiz, A. (2018). Evaluación de las interacciones vasculares de los principales metabolitos activos presentes en *Croton schiedeanus* ("Almizclillo"). Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias – Farmacología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Páez, M., Rodríguez, D., López, D., Castañeda, J., Buitrago, D., Cuca, L y Guerrero, M. (2013). *Croton schiedeanus* Schltd prevents experimental hypertension in rats induced by nitric oxide déficit. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 49: 865-871.

Puebla, P., López, J., Guerrero, M., Carron, R., Martín, M., Román, L y San-Feliciano, A. (2003). Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Phytochemistry* 62: 551–555.

Puebla, P., Guerrero, M y Correa, S. (2004). Flavonoides del género *Croton*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 33 (1): 77 – 85.

Puebla, P., Correa, S., Guerrero, M., Carron, R y San-Feliciano, A. (2005). New cis-Clerodane Diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Chem. Pharm. Bull.* 53(3): 328—329.

Salas, J y Guerrero, M. (2010). Evaluación del Efecto del Extracto Etanólico de *Croton schiedeanus Schlecht* en un Modelo de Hipertensión Arterial inducida con L-NAME y D-

Fructuosa. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Bogotá, Colombia.

Sánchez-Santos, M. (2007). Efectos preventivos de quercetina sobre la disfunción endotelial. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacología.

Sánchez, M., Galisteo, M., Vera, R., Villar, IC., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Pérez-Vizcaino, F y Duarte, J. (2006). Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOs activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*; 24: 75-84.

Stoll, A. (2006). Tratamiento de la Hipertensión Arterial Primaria. *Acta méd. Peruana*. 23 (2). versión On-line ISSN 1728-5917.

Tenoiro-López, F., Del Valle, L y Pastelín, G. (2006). Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Arch. Cardiol*; 76 (4).

Trindade-Radovanovic, C., Dos-Santos, L., Barros-Carvalho, M y Marcon, S. (2014). Hipertensión Arterial y otros Factores de Riesgo Asociados a las Enfermedades Cardiovasculares en Adultos. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* jul. 22(4): 547-53.

Vega-Abascal, J., Guimará, M., Garces, Y., Vegal y Rivas, M. (2015). Predicción de riesgo coronario y cardiovascular global en la atención primaria de salud. *Ccm*. 19 (2): 202-211.

Vogel-H, Gerhard. (2002). *Drug Discovery and Evaluation. Pharmacological Assays*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 2nd ed: 66-70.

Wagner-Grau, P. (2010). Fisiopatología de la Hipertensión Arterial. *An Fac med*. 2010;71(4):225-9.

Wassermann, A. (2013). Hipertensión Arterial: Epidemiología, Fisiopatología y Clínica. Curso de Capacitación de Posgrado a Distancia Síndrome Metabólico y Riesgo Vascular. Fundación para el Estudio, la Prevención y el Tratamiento de la Enfermedad Vascular Aterosclerótica FEPREVA. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Weschenfelder-Magrini, D y Gue-Martini, J. (2012). Hipertensión Arterial: principales factores de riesgos modificables en la estrategia salud de la familia. Revista electrónica trimestral de Enfermería. 26: 344-353