



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DEL NITROXILO-TRPA1-PÉPTIDO
RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA EN EL
EFECTO VASODILATADOR INDUCIDO POR EL BETA-
CARIOFILENO**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DIANA NALLELY PACHECO DÁVILA

DIRIGIDA POR:

DR. CÉSAR IBARRA ALVARADO

**QUERÉTARO
MAYO DE 2024
MÉXICO**

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DEL NITROXILO-TRPA1-PÉPTIDO
RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA EN EL EFECTO
VASODILATADOR INDUCIDO POR EL BETA-CARIOFILENO**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DIANA NALLELY PACHECO DÁVILA

DIRIGIDA POR:

DR. CÉSAR ALVARADO IBARRA

COMITÉ TUTORAL

Dr. César Ibarra Alvarado

Presidente

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Secretario

Dr. Francisco Javier Luna Vázquez

Vocal

Dra. Alejandra Rojas Molina

Suplente

Dra. Beatriz Adriana Luz Martínez

Suplente

Dr. José Santos Cruz
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Mayo de 2024

México

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ACRÓNIMOS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares: importancia mundial y nacional	3
2.2 Hipertensión arterial	3
2.3 Tratamientos farmacológicos de la hipertensión arterial	5
2.4 Anatomía del vaso sanguíneo	5
2.5 Fisiología del vaso sanguíneo	6
2.5.1 Vasodilatación	7
2.5.1.1 Endotelio	7
2.5.1.2 Neurotransmisores gaseosos	8
2.5.1.3 Receptores de potencial transitorio	9
2.5.1.4 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	11
2.5.1.5 Receptores a cannabinoides	12
2.5.2 Vasoconstricción	14
2.6 Productos naturales como fuentes de compuestos vasodilatadores	15
2.7 Cannabinoides y cannabimiméticos con efecto vasodilatador	15
2.8 Beta-cariofileno y su efecto vasodilatador	16
2.9 Métodos bioquímicos empleados para medir los niveles de transmisores gaseosos (NO y H ₂ S)	17
2.10 Métodos empleados para medir el efecto vasodilatador de compuestos	18
2.11 Química computacional y acoplamiento molecular	18
2.11.1 Modelado de proteínas por homología	18
2.11.2 Acoplamiento molecular	19
2.11.3 Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	24

6.	OBJETIVOS	25
6.1	Objetivo General	25
6.2	Objetivos específicos	25
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1	Desarrollo experimental	26
7.1.1	Animales de experimentación	26
7.1.2	Ensayo de actividad enzimática	26
7.1.2.1	Producción de nitritos totales en homogenados de aorta de rata	26
7.1.2.2	Producción de sulfuro de hidrógeno en homogenados de aorta de rata	27
7.1.3	Ensayo de aorta aislada de rata	27
7.1.3.1	Evaluación del efecto vasodilatador: ensayo de aorta aislada de rata	27
7.1.3.2	Evaluación de la participación del canal TRPA1, el receptor a CGRP y el nitroxilo en el efecto vasodilatador del beta-cariofileno	28
7.2	Estudio de acoplamiento molecular para la elaboración de modelos de interacciones moleculares del beta-cariofileno con el receptor TRPA1	28
7.2.1	Preparación de ligando	28
7.2.2	Preparación de la estructura del canal TRPA1	28
7.2.3	Acoplamiento molecular del beta-cariofileno con TRPA1	28
8.	RESULTADOS	30
8.1	Ensayo de actividad enzimática	30
8.1.1	Producción de nitritos totales en homogenados de aorta de rata	30
8.1.2	Producción de sulfuro de hidrógeno en homogenados de aorta de rata	31
8.2	Evaluación de la participación de la ruta del HNO-TRPA1-CGRP	31
8.2.1	Evaluación de la participación de TRPA1 en el efecto vasodilatador de beta-cariofileno	31
8.2.2	Evaluación de la participación del receptor a CGRP en el efecto vasodilatador de beta-cariofileno	32
8.2.3	Evaluación de la participación de HNO en el efecto vasodilatador de beta-cariofileno	33
8.3	Estudio de acoplamiento molecular para la elaboración de modelos de interacciones moleculares del β -cariofileno con el receptor TRPA1	34
9.	DISCUSIÓN	40
10.	CONCLUSIONES	43
11.	REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Corte transversal donde se muestra la estructura general de una arteria: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia.	6
Figura 2. Topología membranal y dominios funcionales del canal TRPA1.	10
Figura 3. Participación del canal TRPA1 en la vasodilatación.	11
Figura 4. Evaluación de nitritos totales en extractos de aorta.	30
Figura 5. Evaluación de sulfuro total en extractos de aorta.	31
Figura 6. Participación del inhibidor del canal TRPA1, HC-030031.	32
Figura 7. Participación del inhibidor del receptor al CGRP.	33
Figura 8. Participación del captador de nitroxilo, L-cisteína.	34
Figura 9. Modelo por homología del canal TRPA1 humano	35
Figura 10. Análisis de Ramachandran del modelo del canal TRPA1.	36
Figura 11. Diagrama de interacción LE e interacción entre TRPA1 y BCP.	37
Figura 12. Diagrama de interacción BC e interacción entre TRPA1 y BCP.	38
Figura 13. Comparación de RMSD entre hTRPA1 sin ligando, hTRPA1 y BCP en el sitio BC, y hTRPA1 y BCP en el sitio LE.	39
Figura 14. Comparación de RMSD del ligando en el sitio BC y el ligando en el sitio LE.	39

ACRÓNIMOS

2-AG	2-araquidonilglicerol
ACh	Acetilcolina
AA	Atomista (<i>all-atom</i>)
AEA	Anandamida
ANG-II	Angiotensina-II
BCP	Beta-cariofileno
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CBS	Cistationina β -sintasa
CG	Grano grueso
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CRLR	Receptor semejante al receptor de calcitonina
CSE	Cistationina γ -liasa
(E)-BCP	Trans-cariofileno
eCB	Receptor cannabinoide endotelial
ECVs	Enfermedades cardiovasculares
EDHFs	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
ET	Endotelina
FAAH	Enzima amida hidrolasa de ácidos grasos
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
MBB	Monobromobimano
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKA	Proteína cinasa A
PKG	Proteína cinasa G
RAMP1	Proteína modificadora de la actividad del receptor 1
sGC	Guanilato ciclasa soluble
TRP	Canal de receptor de potencial transitorio
TRPA1	Canal de receptor de potencial transitorio anquirina 1
TRPV1	Canal de receptor de potencial transitorio vaniloide 1

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reportó los detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentada en el documento.

RESUMEN

La hipertensión es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen la principal causa de muerte en México y a nivel mundial. Aunque en la actualidad se cuenta con diversos fármacos para el tratamiento de la hipertensión, muchos no logran la efectividad ideal, su costo es elevado y presentan efectos secundarios graves. Por esta razón, es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antihipertensiva. Una estrategia prometedora es la utilización de plantas medicinales, debido a que constituyen una fuente importante de compuestos con diferentes efectos farmacológicos, incluyendo el efecto antihipertensivo. Entre estos compuestos podemos encontrar al beta-cariofileno, un cannabimimético presente en varias plantas utilizadas en México con fines alimenticios y medicinales. Estudios preliminares realizados por nuestro grupo de trabajo han mostrado que este compuesto presenta un efecto vasodilatador, el cual es mediado, al menos en parte, por la activación de receptores a cannabinoides CB2 y las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}. Estudios previos han mostrado que varios cannabinoides son capaces de activar no solo receptores a cannabinoides, sino también canales TRP, incluyendo los canales TRPA1. La activación de este tipo de canales en el endotelio vascular da como resultado la relajación del músculo liso arterial. Por otra parte, el incremento en los niveles de NO y H₂S, genera nitroxilo (HNO), el cual activa también canales TRPA1, dando como resultado la activación de la vía del HNO-TRPA1-CGRP y la relajación del vaso sanguíneo. Con base en estos antecedentes, en el presente proyecto se planteó confirmar que el beta-cariofileno activa las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, midiendo los niveles de NO y H₂S mediante métodos enzimáticos. Además, se determinó la participación de la vía del HNO-TRPA1-CGRP en el efecto vasodilatador producido por este compuesto, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata. Por otro parte, se realizó un estudio de acoplamiento molecular para determinar si el beta-cariofileno se une con elevada afinidad al canal TRPA1. Nuestros resultados indicaron que este compuesto produce su efecto vasodilatador mediante la activación de la vía del HNO-TRPA1-CGRP y que se une con elevada afinidad al canal TRPA1. Con base en estos resultados, el beta-cariofileno representa un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión arterial.

Palabras clave: beta-cariofileno, vía del HNO-TRPA1-CGRP, canales TRPA1, vasodilatación

ABSTRACT

Hypertension is the main risk factor for the development of cardiovascular diseases, which are the main cause of death in Mexico and worldwide. While at present there are various drugs for the treatment of hypertension, many of them do not accomplish the ideal effectiveness, their cost is high, and they have serious side effects. For this reason, the search for new compounds with antihypertensive activity is important. A promising strategy is the use of medicinal plants, since they constitute an important source of compounds with different pharmacological effects, including antihypertensive effect. Among these compounds we can find beta-caryophyllene, a cannabimimetic present in several plants used in Mexico for food and medicinal purposes. Preliminary studies carried out by our working group have shown that this compound has a vasodilator effect, which is mediated, at least in part, by activation of CB2 cannabinoid receptors and the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways. Previous studies have shown that several cannabinoids can activate not only cannabinoid receptors, but also TRP channels, including TRPA1 channels. Activation of these types of channels in the vascular endothelium results in the relaxation of the arterial smooth muscle. On the other hand, the increase in the levels of NO and H₂S, generates nitroxyl (HNO), which also activates TRPA1 channels, resulting in the activation of the HNO-TRPA1-CGRP pathway and the relaxation of the blood vessel. Based on these antecedents, the aim of this project was to confirm that beta-caryophyllene activates the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways, measuring NO and H₂S levels by using enzymatic methods. Furthermore, it was determined the participation of the HNO-TRPA1-CGRP pathway on the vasodilator effect produced by this compound, through isolated rat aorta assay. In addition, an *in silico* molecular docking study was carried out to determine if beta-caryophyllene binds with high affinity to the TRPA1 channel. Our results indicated that this compound produces its vasodilatory effect by activating the HNO-TRPA1-CGRP pathway and that it binds with high affinity to the TRPA1 channel. Based on these results, beta-caryophyllene represents a structural prototype for the development of drugs useful for treating cardiovascular diseases, including arterial hypertension.

Keywords: beta-caryophyllene, HNO-TRPA1-CGRP pathway, TRPA1 channel, vasodilation

Agradecimientos

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por otorgar la beca por medio de la cual pude realizar este proyecto.

Al Dr. César Ibarra Alvarado por sus enseñanzas, asesoramiento, paciencia y guía durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Alejandra Rojas por sus consejos, enseñanzas y siempre estar disponible para escuchar mis inquietudes.

Al Dr. Antonio Romo por su guía, paciencia, enseñanzas y por siempre darme un espacio para desahogarme.

A todo mi comité sinodal por siempre estar disponibles para apoyarme en todo lo que necesité.

A todos mis compañeros de laboratorio porque hicieron muy ameno el tiempo que pasamos juntos y por los buenos momentos que compartimos a lo largo de este tiempo.

A mi familia por siempre creer en mí e impulsarme a ser cada día una mejor versión de mí.

A Roberto Aguirre Salgado por su apoyo incondicional y paciencia, por siempre impulsarme a dar un poco más y creer que esto era posible.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2021). Su alta prevalencia en países en vías de desarrollo resalta la importancia de una mejor gestión y concientización de la reducción de los factores de riesgo para padecerlas (Bowry *et al.*, 2015). En este sentido, la presión arterial elevada es el principal factor de riesgo para el desarrollo de estas enfermedades (Mills *et al.*, 2020). En México, se diagnostican 450,000 casos nuevos anualmente y se estima que solamente 45.6% de las personas que la padecen, logran mantenerla bajo control (Campos-Nonato *et al.*, 2018).

A pesar de que existen varios fármacos para el tratamiento de la hipertensión, esta enfermedad rara vez puede ser controlada solamente con un fármaco y muchos de ellos tienen efectos secundarios graves (Azizi *et al.*, 2019). Es por esta razón, que es necesaria la búsqueda de fármacos alternativos para el tratamiento de la hipertensión arterial (Bhatt *et al.*, 2021). En estudios previos, se ha encontrado que el óxido nítrico y el sulfuro de hidrógeno, dos transmisores gaseosos que juegan un papel muy importante en la fisiología del sistema cardiovascular, pueden interactuar para generar nitroxilo (HNO), el cual activa al receptor de potencial transitorio anquirina 1 (TRPA1), para generar la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y, finalmente, culminar en la relajación del vaso sanguíneo (Wu *et al.*, 2018), por lo que compuestos con efecto vasodilatador que modulen esta vía son potencialmente útiles para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión arterial.

En las últimas décadas, ha incrementado el interés en las terapias que utilizan compuestos de origen natural (Al Disi *et al.*, 2020) y existen muchas evidencias que avalan las propiedades benéficas de metabolitos secundarios, obtenidos de fuentes naturales, en el tratamiento de varias enfermedades cardiovasculares (Knox *et al.*, 2019), incluyendo la hipertensión arterial (Ajebli y Eddouks, 2020). En este grupo de compuestos se encuentran a los cannabinoides y los cannabimiméticos, compuestos químicamente distintos a los cannabinoides, pero capaces de imitar sus efectos (Kumar *et al.*, 2019a), entre los cuales destaca el beta-cariofileno, un sesquiterpeno, capaz de activar receptores a cannabinoides en el sistema cardiovascular, relajando los vasos sanguíneos y,

posiblemente, reduciendo la presión arterial (Younis y Mohamed, 2019; García, 2018). Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado completamente el mecanismo de acción, por medio del cual este compuesto produce su efecto vasodilatador, por lo que en este proyecto se planteó confirmar que el beta-cariofileno produce un incremento en la producción de NO y H₂S y se determinó si el efecto vasodilatador de este compuesto involucra la activación de la vía del nitroxilo-TRPA1-CGRP. Adicionalmente, se determinó si este cannabimimético se une con elevada afinidad al canal TRPA1. Nuestros resultados indicaron que el efecto vasodilatador del beta-cariofileno involucra un incremento en los niveles del NO y del H₂S y la activación de la vía del HNO-TRPA1-CGRP, y que este compuesto se une con elevada afinidad al canal TRPA1. Con base en estos resultados, el beta-cariofileno representa un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos antihipertensivos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares: importancia mundial y nacional

Hasta el año 1990, las enfermedades infecciosas, las perinatales y la malnutrición eran las principales causas de muerte en el mundo, sin embargo, a partir de este año se pudo ver un claro declive en esta tendencia y las enfermedades no contagiosas han pasado a ser la principal causa de muerte, entre las que podemos encontrar a las enfermedades cardiovasculares (ECVs) y al cáncer (Roth *et al.*, 2018). En términos generales, las ECVs se pueden clasificar en cinco categorías: isquemia miocárdica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad arterial periférica y anomalías estructurales (Bowry *et al.*, 2015).

De acuerdo con la OMS, las ECVs son la principal causa de muerte a nivel mundial, causando aproximadamente 17.9 millones de muertes en 2019 (World Health Organization, 2021); los países que se ven afectados en mayor medida por estas enfermedades son los que tienen ingresos bajos a medios, en comparación con los países de ingresos altos. Se estima que el número de muertes por ECVs en países de bajos ingresos es tres veces mayor y muchas de ellas se dan entre la población activa laboral (Bowry *et al.*, 2015). En México, las muertes causadas por ECVs representaban el 22.5% del total de muertes registradas en 2015, convirtiéndola también en la principal causa de muerte en el país (Cervantes-Dávila, 2019).

La alta prevalencia de las ECVs en regiones en vías de desarrollo resalta la importancia de una mejor gestión y concientización de los factores de riesgo importantes para aminorar el desarrollo de estas enfermedades en la población (Bowry *et al.*, 2015). Padecer de hipertensión es el principal factor de riesgo para desarrollar ECVs a nivel mundial (Mills *et al.*, 2020). En México, se ha observado un aumento en la incidencia de esta enfermedad a partir de la década de los noventa (Cervantes-Dávila, 2019).

2.2 Hipertensión arterial

La presión arterial se refiere a la presión que ejerce la sangre sobre las arterias. Existe la presión sistólica y la presión diastólica: la presión sistólica es la presión ejercida sobre las arterias, cuando el corazón se contrae, expulsando la sangre por la aorta y la presión diastólica es la presión de estos vasos sanguíneos durante el periodo de relajación del corazón. La hipertensión se presenta cuando los valores de presión están por arriba de

los parámetros normales, con una presión sistólica por arriba de los 140 mmHg y/o una presión diastólica arriba de los 90 mmHg (World Health Organization, 2021; Mills *et al.*, 2020). Padecer de hipertensión está asociado con alteraciones estructurales y funcionales de la vasculatura arterial y órganos, irrigados por ésta, entre los que se incluyen el cerebro, el corazón, los riñones, las arterias centrales y periféricas, y los ojos (Unger *et al.*, 2020).

La OMS estima que aproximadamente 1.2 mil millones de adultos de entre 39 y 79 años padece de hipertensión (World Health Organization, 2021). La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado, debido a los cambios demográficos mundiales, por los cuales se ha incrementado el número de personas de mayor edad y la constante exposición a factores de riesgo como una dieta rica en sodio y la falta de actividad física (Mills *et al.*, 2020). Se espera que esta tendencia continúe y aumente a 1.5 mil millones de personas con hipertensión en 2025 (Knox *et al.*, 2019). Se prevé que el panorama empeorará, ya que hay muchos estudios que muestran que una cantidad importante de hipertensos no saben que padecen esta enfermedad (aproximadamente el 46%) (World Health Organization, 2021; Oparil *et al.*, 2018), no reciben tratamiento o sus tratamientos son deficientes (Oparil *et al.*, 2018).

De manera similar a lo que sucede con las ECVs, la hipertensión se presenta con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo; se estima que casi tres cuartos del total de personas con hipertensión viven en estas regiones y la deficiencia en las estrategias de control contribuye de manera importante en el incremento de muertes causadas por ECVs. Asimismo, se estima que tres cuartos de los casos de derrame cerebral y la mitad de la incidencia de ECVs pueden ser atribuidos a un control subóptimo de la presión sanguínea (Ibrahim y Damasceno, 2012). Según las tendencias se espera que para el año 2025 tres de cada cuatro casos de hipertensión se den en países en vías de desarrollo y que la mayor tasa de incidencia de este padecimiento sea en la región de América Latina y el Caribe (Kearney *et al.*, 2005).

En México, se diagnostican aproximadamente 450,000 casos nuevos de hipertensión anualmente y la cifra de personas que padecen la enfermedad es mayor si se toma en cuenta que cerca del 40% no saben que la tienen y del total de personas diagnosticadas solamente el 45.6% tiene su condición controlada (Campos-Nonato *et al.*, 2018). Según los resultados de la última edición de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición la tasa de

incidencia de hipertensión en adultos de 20 años o más es de 34.1% y es mayor en mujeres en todas las edades (Shamah-Levy *et al.*, 2020).

2.3 Tratamientos farmacológicos de la hipertensión arterial

Actualmente, las principales terapias farmacológicas disponibles para el tratamiento de la hipertensión son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 1, los antagonistas de receptores β -adrenérgicos, los bloqueadores de canales de calcio y los diuréticos (Bhatt *et al.*, 2021; Mills *et al.*, 2020). Sin embargo, la presión arterial rara vez puede ser controlada con un solo fármaco y la mayoría de los pacientes hipertensos requieren la combinación de dos o más fármacos para mantener su presión sanguínea bajo control (An *et al.*, 2020).

Existe una gran variedad de tratamientos antihipertensivos disponibles con diferentes mecanismos de acción, sin embargo, muchos de ellos presentan efectos secundarios graves (Azizi *et al.*, 2019), tales como la reducción en el funcionamiento de los riñones, angioedema, reducción en el metabolismo de la glucosa, hipocalcemia, hiponatremia, entre otros (Mills *et al.*, 2020). De manera adicional, se pueden presentar efectos adversos de menor gravedad como dolor de cabeza, fatiga, adormecimiento, mareo, edema, calambres musculares, náuseas y problemas gastrointestinales (Alomar y Strauch, 2010).

Aunque el empleo de fármacos antihipertensivos es una estrategia bien establecida para el tratamiento de esta condición (Azizi *et al.*, 2019), cerca del 40% de los pacientes no logra controlar su presión sanguínea a un nivel seguro (Bhatt *et al.*, 2021), por lo que continúa siendo indispensable la búsqueda de nuevos fármacos alternativos más eficientes para el tratamiento de esta enfermedad (Azizi *et al.*, 2019; Bhatt *et al.*, 2021).

2.4 Anatomía del vaso sanguíneo

La función principal del sistema circulatorio es la de proveer oxígeno y nutrientes a los distintos tejidos, a la vez que elimina los desechos metabólicos. El sistema vascular es muy extenso y está compuesto por vasos sanguíneos, que se pueden dividir en arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas (Knox *et al.*, 2019). La estructura de cada uno de estos segmentos puede variar dependiendo del órgano al que irrigan, pero en general, a excepción de los capilares, todos los vasos sanguíneos se componen de tres capas: (1) la adventicia es la capa externa que provee al vaso sanguíneo de soporte y forma; (2) la túnica media es la capa central, compuesta de tejido elástico y muscular, que regula el diámetro interno del vaso sanguíneo; la composición de músculo y fibras de colágeno puede variar dependiendo del tamaño y localización del vaso sanguíneo y (3) la túnica

Íntima es la capa interior y consiste de un recubrimiento de células endoteliales (Figura 1) (Tucker *et al.*, 2017).

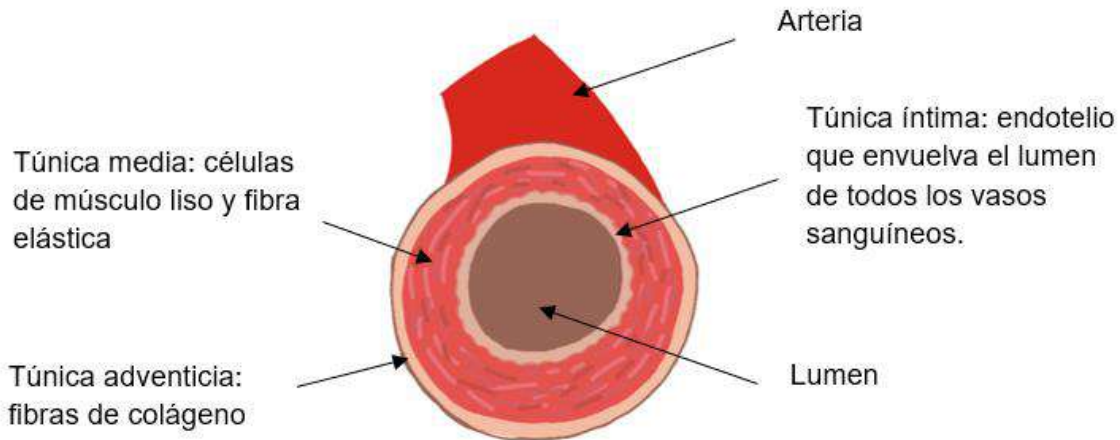


Figura 1. Corte transversal donde se muestra la estructura general de una arteria: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (Modificado de Leach *et al.*, 2010).

Las arterias se pueden dividir en dos tipos: elásticas y musculares, dependiendo de la composición de fibras elásticas y músculo que contengan; las primeras se encuentran más cercanas al corazón y es gracias a su naturaleza elástica que pueden mantener una presión relativamente constante a pesar de la acción del corazón. Por otro lado, las venas, a pesar de estar compuestas por las mismas capas, son mucho más delgadas y menos elásticas, ya que no se someten a presiones altas (Tucker *et al.*, 2017).

2.5 Fisiología del vaso sanguíneo

La posición anatómica del endotelio le permite tener interacción tanto con el flujo sanguíneo como con las células de la pared del músculo liso del vaso sanguíneo y así fungir como una barrera semipermeable. El endotelio regula el transporte de macromoléculas entre el lumen y el músculo liso vascular, ya sea por difusión a través de su membrana, a través de sus uniones célula-célula, brechas endoteliales o por transporte vesicular. Hay estímulos fisiológicos y patofisiológicos que pueden afectar la permeabilidad de las células del endotelio, las cuales juegan un rol importante en la regulación del tono vascular a nivel local, mediante la producción de sustancias

vasodilatadoras y vasoconstrictoras derivadas del endotelio, como el óxido nítrico (NO) y la angiotensina-II (Triantafyllidi y Benas, 2021; Cahill y Redmond, 2016).

Por otro lado, las células de músculo liso son las encargadas de asegurar la contracción y relajación del vaso sanguíneo y contribuyen, en gran manera, a la regulación de la circulación sanguínea; en sujetos sanos estas células se encuentran en un fenotipo no proliferativo llamado fenotipo contráctil, que se caracteriza por contar con abundantes fibras contráctiles, como la isoforma α de actina, miosina y otras proteínas relacionadas con el aparato contráctil (Bacakova *et al.*, 2018). Al igual que otros tipos de células musculares, la contracción es regulada por la concentración intracelular y extracelular de Ca^{2+} . Cuando incrementa su concentración en el citosol, el calcio forma un complejo con la calmodulina que activa la cinasa de la cadena ligera de miosina, la cual fosforila la cadena ligera de miosina. La miosina fosforilada permite la formación de puentes de actina y miosina, dando como resultado final la contracción. Por otro lado, la vasodilatación se da cuando una cinasa activa a una enzima fosfatasa de la miosina, la cual desfosforila a la miosina y previene que se dé la contracción del músculo liso vascular (Sweeney y Hammers, 2018).

2.5.1 Vasodilatación

2.5.1.1 Endotelio

El endotelio juega un rol importante en la regulación de la tensión vascular, ya que produce una gran variedad de moléculas vasodilatadoras. La más conocida es el NO, que es sintetizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) dentro de la célula endotelial, la cual se difunde a las células del músculo liso, provocando su hiperpolarización y relajación, mediante la activación del guanilato ciclasa y la producción de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). El endotelio también produce prostaglandinas que son generadas por la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) sobre el ácido araquidónico; estas moléculas provocan la hiperpolarización, mediante el incremento en los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Adicionalmente, existen evidencias de la presencia de factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHFs), que producen su efecto vasodilatador mediante la activación de canales iónicos de K^+ . Entre estos factores se encuentra el peróxido de hidrógeno, ácidos epoxieicosatrienólicos, monóxido de carbono (CO), sulfuro de hidrógeno (H_2S), anandamida y el propio ion potasio. Otras sustancias vasodilatadoras generadas por otros tipos de células, que incluyen al péptido

relacionado con el gen de la calcitonina, la adrenomedulina y la sustancia P, incrementan la cantidad de NO liberada por el endotelio (Oparil *et al.*, 2018).

La disfunción del endotelio juega un rol importante en la patogénesis de la hipertensión y se han encontrado niveles bajos de NO en pacientes que sufren de hipertensión en comparación con pacientes con una presión arterial en rango normal (Oparil *et al.*, 2018).

2.5.1.2 Neurotransmisores gaseosos

El H₂S y el NO son considerados gases tóxicos, sin embargo, se ha demostrado que juegan un papel esencial en funciones fisiológicas de varios sistemas. Existen varias similitudes entre estas dos moléculas, por ejemplo, ambas son producidas por enzimas específicas, pueden penetrar libremente la membrana celular y son sensibles a especies reactivas de oxígeno; ambas moléculas son capaces de modular la función vascular a través de rutas similares (Wu *et al.*, 2018).

El NO es producido por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a partir de la L-arginina en el endotelio, una reacción que depende de la concentración de calcio y calmodulina. La eNOS se activa al estimularse diversos receptores de fuerzas mecánicas, acetilcolina, bradiquinina, sustancia P y serotonina. La activación de la eNOS y la consecuente liberación de NO, que atraviesa fácilmente la membrana celular por difusión, estimula a la guanilato ciclasa soluble (sGC), que, a su vez, aumenta la concentración intracelular de cGMP y activa a la proteína cinasa G (PKG), lo que finalmente da como resultado la relajación del músculo liso vascular (Cahill y Redmond, 2016).

Por otro lado, el H₂S es producido a partir de la L-cisteína por la acción de dos enzimas dependientes de fosfato: la cistationina β-sintasa (CBS) y la cistationina γ-liasas (CSE). La CSE se expresa en músculo liso y endotelio vascular (Al-Magableh y Hart, 2011). Aunque se ha comprobado que el H₂S es producido principalmente en el músculo liso y tiene una acción autocrina, hay evidencia que sugiere que también es sintetizado en las células del endotelio y tiene blancos de acción dentro de estas células. Las principales rutas de acción identificadas del H₂S son la activación de canales de potasio dependientes de ATP, la modulación del metabolismo celular y la modificación postraduccional de proteínas por sulfhidración (Beltowski y Jamaroz-Wisniewska, 2014; Al-Disi *et al.*, 2020).

Existe evidencia que indica que los transmisores gaseosos H₂S y NO actúan de manera cooperativa para producir su efecto vasodilatador, ya que se ha observado que el H₂S inhibe la degradación de cGMP, al inhibir a la fosfodiesterasa, potenciando la relajación

causada por el NO (Greaney *et al.*, 2017). Además, la sulfhidración de la eNOS por H₂S aumenta su actividad. También, se ha demostrado que la interacción del H₂S y el NO genera la forma reducida del NO, nitroxilo (HNO), el cual, a su vez, induce la liberación del vasodilatador conocido como péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), ya que activa al canal de receptor de potencial transitorio anquirina 1 (TRPA1). Entonces, el CGRP activa a su receptor en el músculo liso, produciendo la relajación del vaso sanguíneo (Beltowski y Jamaroz-Wisniewska, 2014).

2.5.1.3 Receptores de potencial transitorio

Los receptores de potencial transitorio (TRP) son una súper familia de canales permeables a cationes, que intervienen en el control del flujo de cationes monovalentes y divalentes a través de la membrana y así contribuyen a la regulación de su potencial (Alvarado *et al.*, 2021). En el sistema cardiovascular, los canales TRP se encuentran en músculo liso, endotelio, neuronas perivasculares y astrocitos (Earley y Brayden, 2015). Entre este tipo de canales se encuentra la familia anquirina que contiene a un único miembro: el canal TRPA1, que obtiene su nombre debido al alto número de repeticiones del dominio anquirina que contiene en su extremo *N*-terminal (Wang *et al.*, 2019). Este dominio está compuesto por una secuencia de 33 aminoácidos (Alvarado *et al.*, 2021) y ha sido relacionado con interacciones proteína-proteína y la elasticidad de la molécula (Meents *et al.*, 2019).

El canal TRPA1 está conformado por seis dominios transmembranales, sus extremos *N*-terminal y *C*-terminal se encuentran dentro de la célula; entre los dominios transmembranales 5 y 6 se forma un bucle que forma un poro y su extremo *N*-terminal es rico en cisteína (Figura 2) (Meents *et al.*, 2019). La estimulación del canal por agonistas causa la apertura del poro para permitir el paso de iones; aunque el canal es permeable a varios cationes monovalentes y divalentes, tiene mayor permeabilidad hacia cationes divalentes en especial al Ca²⁺ (Alvarado *et al.*, 2021).

Los agonistas de este canal se pueden dividir en dos grupos. En el primer grupo se encuentran compuestos electrofílicos que modifican de manera covalente al canal, por ejemplo compuestos naturales encontrados en algunas plantas y especies como el isotiocianato de alilo, el cinamaldehído y la alicina, algunos químicos industriales e irritantes volátiles, como la acroleína, el H₂O₂, los anestésicos y agonistas endógenos como compuestos generados por estrés oxidativo y el HNO, producido por la reacción entre el NO y el H₂S. El HNO lleva a cabo su acción, oxidando los grupos tiol de dos

residuos de cisteína en el extremo *N*-terminal del canal TRPA1, produciendo la formación de un enlace disulfuro entre ellos (Meents *et al.*, 2019; Alvarado *et al.*, 2021). En el segundo grupo se encuentran compuestos no electrofílicos que no modifican de manera covalente al canal, por ejemplo, algunos derivados de plantas como mentol, nicotina y tetrahidrocannabinol. Asimismo, existe evidencia de que algunos medicamentos se unen al canal de manera no covalente en un “bolsillo” o sitio de unión, como el clotrimazol y la nifedipina (Meents *et al.*, 2019).

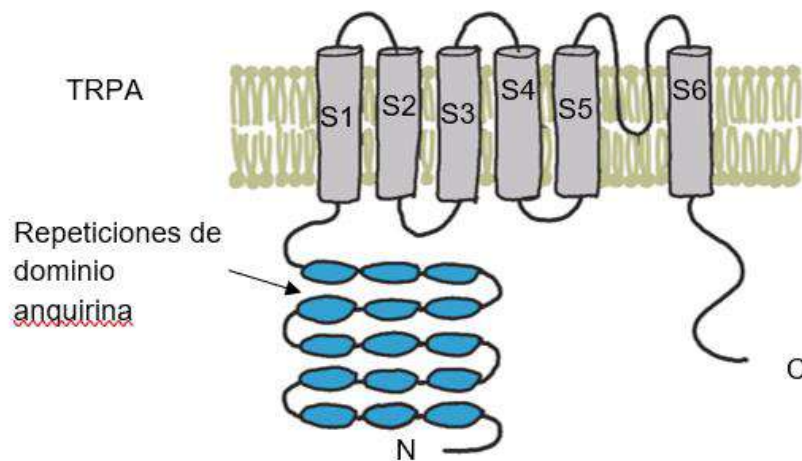


Figura 2. Topología membranar y dominios funcionales del canal TRPA1 (Modificado de Earley y Brayden, 2015).

Se ha demostrado la presencia de TRPA1 en las neuronas sensoriales de la túnica adventicia vascular y en células del endotelio de vasos sanguíneos cerebrales, sin embargo, no se ha detectado en el músculo liso vascular (Alvarado *et al.*, 2021). Por un lado, la activación del canal TRPA1 en las neuronas sensoriales induce la liberación de CGRP y NO, derivado de NOS, los cuales activan a sus receptores en las células del músculo liso adyacente, causando relajación. Por otro lado, el incremento en el flujo de Ca^{2+} en el endotelio provoca que la membrana celular se hiperpolarice, al causar la apertura de canales de potasio, específicamente los dependientes de calcio y los rectificadores anómalos, provocando un cambio en la polaridad de la membrana; este impulso viaja a través de las uniones mioendoteliales, que son protuberancias presentes en las células endoteliales, las cuales están en contacto con la célula del músculo liso adyacente y también la hiperpolariza (Figura 3) (Wang *et al.*, 2019).

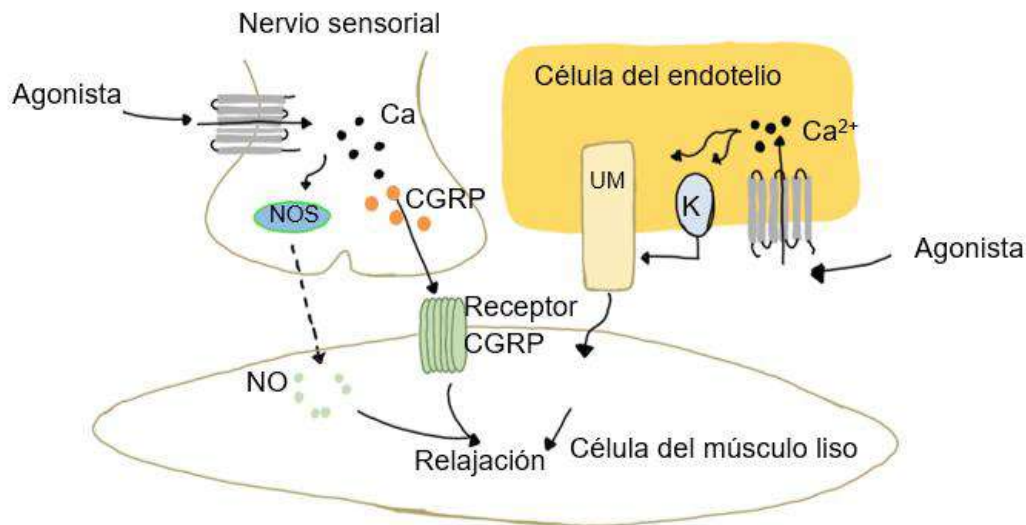


Figura 3. Participación del canal TRPA1 en la vasodilatación. Por un lado, el incremento en el flujo de Ca^{2+} vía el canal TRPA1 resulta en un cambio en el potencial de la membrana de la célula endotelial que la hiperpolariza, debido a la apertura de canales de potasio (K) dependientes de calcio y rectificadores anómalos; este cambio de potencial es capaz de viajar a la célula del músculo liso a través de las uniones mioendoteliales (UM), que son protuberancias presentes en la célula endotelial en contacto con la célula del músculo liso. Por otro lado, la activación del canal TRPA1 en nervios sensoriales provoca la entrada de Ca^{2+} que induce la liberación del CGRP, activando a su receptor presente en la célula de músculo liso y la consecuente síntesis de NO, sintetizado por la NOS (Modificado de Wang *et al.*, 2019).

2.5.1.4 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) fue identificado por primera ocasión en 1982 y pronto se demostró que es un neuropéptido con potente efecto vasodilatador y un neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico. Este péptido está formado por 37 aminoácidos y se produce por el *splicing* alternativo del gen de la calcitonina (Kee *et al.*, 2018); existen dos formas del péptido: α -CGRP y β -CGRP, aunque el α -CGRP tiene una mayor actividad de regulación cardiovascular (Kumar *et al.*, 2019b; Argunhan *et al.*, 2021). Este péptido se encuentra en todo el sistema nervioso sensorial central y periférico, en células del músculo liso en el sistema cardiovascular (Kee *et al.*, 2018) y en el endotelio (Kumar *et al.*, 2019b).

La liberación de esta molécula se lleva a cabo de manera dependiente de la concentración intracelular de calcio. Aunque algunos transmisores vasoconstrictores

como la angiotensina pueden mediar su liberación, con mayor frecuencia se lleva a cabo por la estimulación de canales TRP: los canales TRP vaniloide 1 (TRPV1) y los TRPA1, los dos tipos de canales TRP de mayor importancia en los vasos sanguíneos, que se expresan generalmente en diferentes tejidos junto al CGRP (Kee *et al.*, 2018). Posterior a su liberación, la actividad del CGRP es mediada a través de un receptor compuesto por tres proteínas: (1) receptor semejante a receptor de calcitonina (CRLR), (2) proteína modificadora de la actividad del receptor 1 (RAMP1) y (3) proteína componente de receptor, donde el CRLR funge como sitio de unión del receptor. El CRLR está compuesto por siete dominios transmembranales, el extremo *N*-terminal se encuentra fuera de la membrana celular y el extremo *C*-terminal está dentro de la célula. La activación del receptor por α -CGRP se da en dos etapas: en la primera el extremo *C*-terminal del α -CGRP se une al extremo *N*-terminal de CRLR y, posteriormente, el extremo *N*-terminal del α -CGRP se une a ciertos dominios transmembranales (Kumar *et al.*, 2019b); la evidencia sugiere que la interacción se da con los dominios 3 y 5 (Liang *et al.*, 2018).

La activación del receptor CGRP produce una señal mediada por cAMP para generar vasodilatación directamente en la célula del músculo liso o de manera dependiente de NO en las células del endotelio (Argunhan *et al.*, 2021). En la primera opción, el cAMP activa a la proteína cinasa A (PKA), que fosforila y activa canales de potasio dependiente de ATP, generando la relajación del músculo liso, mientras que en el segundo mecanismo el cAMP activa a la PKA, la cual fosforila y activa a la eNOS, incrementando la síntesis de NO (Kumar *et al.*, 2019b).

Aunque la evidencia sugiere que el CGRP no juega un papel importante en la regulación fisiológica de la presión arterial de sujetos saludables, su participación es importante en pacientes con estrés cardiovascular y puede ser un agente protector en la disfunción cardiovascular (Argunhan *et al.*, 2021), generada por la hipertensión, ya que puede atenuar el incremento de la presión arterial (Kumar *et al.*, 2019b).

2.5.1.5 Receptores a cannabinoides

Los compuestos cannabinoides producen sus efectos en el sistema cardiovascular, directamente mediante la activación de receptores o indirectamente mediante metabolitos resultantes de la degradación de endocannabinoides (Krzyżewska *et al.*, 2021). Aunque el sistema endocannabinoide no juega un papel importante en la regulación cardiovascular en condiciones fisiológicas, se ha demostrado que participa de manera crucial en diversas patologías, por ejemplo, en algunos casos de hipertensión se ha encontrado que está

sobrerregulado (Sierra *et al.*, 2018; Krzyżewska *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado que algunos cannabinoides producen relajación en los vasos sanguíneos, la cual depende de la presencia del endotelio (Krzyżewska *et al.*, 2021).

El sistema endocannabinoide está compuesto por mediadores derivados del ácido araquidónico; los más conocidos son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), que son ligandos endógenos (Martín-Giménez *et al.*, 2018) de los dos receptores a cannabinoides canónicos: CB1 y CB2 (Sierra *et al.*, 2018), aunque también hay evidencia que sugiere que compuestos cannabinoides y endocannabinoides pueden modular receptores cannabinoides no canónicos, por ejemplo, los receptores TRPV1-4, TRPA1 y TRPM8 (Muller *et al.*, 2019), así como a las enzimas encargadas de la hidrólisis de los endocannabinoides. Entre estas enzimas destacan la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que cataboliza a la AEA y la convierte en ácido araquidónico y etanolamina; la monoacilglicerol lipasa, que metaboliza al 2-AG y, por último, las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1/2), que metabolizan tanto a la AEA como al 2-AG (Martín-Giménez *et al.*, 2018).

Receptor CB1

El receptor a cannabinoides CB1 se descubrió en 1990 y es el receptor acoplado a proteína G con subunidad alfa inhibidora más abundante en el sistema nervioso central, aunque también puede ser encontrado en el sistema nervioso autónomo. En el sistema cardiovascular, algunos estudios han indicado su presencia en el endotelio arterial y capilar, y en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo; sin embargo, de acuerdo con la evidencia actual se cree que la mayoría de los efectos ejercidos por CB1 se deben a la activación del sistema nervioso parasimpático. La evidencia sugiere que los principales efectos cardiovasculares ejercidos por cannabinoides y endocannabinoides están ligados principalmente a la actividad de este receptor, ya que su estimulación ejerce efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos y una respuesta vasodilatadora. Estos efectos son mediados por la regulación de la liberación de neurotransmisores o la activación local de receptores periféricos presentes en el músculo liso, cardiomiocitos y endotelio. En estudios previos realizados en arteria aislada, se ha demostrado que la activación de este receptor genera un decremento en los niveles de cAMP y un aumento en la generación de NO (Puhl, 2020).

Receptor CB2

El receptor a cannabinoides CB2 se expresa principalmente en las células del sistema inmune, pero también se ha encontrado en varios tejidos del sistema cardiovascular como cardiomiocitos y fibroblastos del ventrículo izquierdo, así como en músculo liso y endotelio de arterias. Se ha reportado que su estimulación con AEA provoca un efecto inotrópico positivo, dependiente de cAMP (Puhl, 2020), además de que puede tener un rol protector ante la progresión de arterosclerosis (Alfulaj *et al.*, 2018), y hay evidencia de que el efecto vasodilatador provocado por el beta-cariofileno implica la participación de este receptor (García-Camargo, 2018).

Además de los receptores canónicos CB1 y CB2, se ha sugerido la existencia de un tercer tipo de receptor a cannabinoides llamado no-CB1/no-CB2 o receptor cannabinoide endotelial (eCB), que puede estar involucrado en el efecto vasodilatador (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021).

2.5.2 Vasoconstricción

La contracción del músculo liso se realiza a través de dos mecanismos distintos; en el primero, se inicia con el cambio de potencial de la membrana y, en el segundo, se activan receptores acoplados a proteínas G y la subsecuente generación de segundos mensajeros, finalmente ambos mecanismos ejercen su acción dependiente de la concentración de Ca^{2+} . En este proceso, los canales de K^+ juegan un papel esencial en el control del potencial de membrana y, a su vez, en la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. De esta manera, si los canales de K^+ se cierran la membrana celular se despolariza y se activan los canales de Ca^{2+} , aumentando la concentración de calcio intracelular y generando contracción muscular (Knox *et al.*, 2019).

El endotelio produce también moléculas vasoconstrictoras que ejercen una función contraria a los vasodilatadores, algunas de ellas son la endotelina (ET), la angiotensina-II (ANG-II), las prostaglandinas, los tromboxanos A_2 y radicales libres de oxígeno (Cahill y Redmond, 2016).

Existen muchos factores que pueden incrementar la vasoconstricción, entre ellos están la regulación deficiente de la enzima NOS endotelial y otras enzimas prooxidantes, la sobreactividad de canales de calcio, que llevan a un incremento en los niveles de calcio intracelular y la hiperplasia e hipertrofia de las células del músculo liso vascular; estos

eventos patológicos pueden incrementar el grosor de las paredes de los vasos sanguíneos y precipitar la aparición de la hipertensión (Al Disi *et al.*, 2020).

2.6 Productos naturales como fuentes de compuestos vasodilatadores

En la última década, el uso de plantas medicinales como alternativa terapéutica se ha incrementado, tanto en países desarrollados, como en países en vías de desarrollo (Al Disi *et al.*, 2020); el creciente interés en las terapias con medicina herbolaria para el tratamiento de ECVs se debe, en parte, a la gran cantidad de información que avala que muchos fitoquímicos tienen propiedades que benefician a la salud cardiovascular (Knox *et al.*, 2019) y un impacto favorable en la presión sanguínea (Ajebli y Eddouks, 2020).

De acuerdo con estudios recientes, varias de las especies vegetales que se pueden utilizar para el control de las ECVs son ingredientes comunes en la comida. Esto resalta la gran variedad de nutraceuticos y metabolitos secundarios importantes para el control de estas enfermedades, los cuales se encuentran en las frutas, los vegetales y las especias (Ajebli y Eddouks, 2020). Algunas de las plantas que presentan un efecto vasodilatador son el ajo (*Allium sativum*), el apio (*Apium graveolens*), la chipaca (*Bidens pilosa* L.), la planta del té (*Camellia sinensis*), el azafrán (*Crocus sativus*), entre otros (Al Disi *et al.*, 2020).

Diversos extractos vegetales o metabolitos secundarios, aislados de plantas, pueden modular varios parámetros asociados con la patogénesis de la hipertensión, como la producción de NO, el fenotipo de las células del músculo liso vascular, la inhibición enzimática, la función endotelial, la activación de plaquetas y la expresión génica (Ajebli y Eddouks, 2020; Al Disi *et al.*, 2020).

2.7 Cannabinoides y cannabimiméticos con efecto vasodilatador

Los cannabinoides se pueden clasificar como fitocannabinoides, la mayoría de ellos aislados a partir *Cannabis sativa*; cannabinoides sintéticos y endocannabinoides (Richter *et al.*, 2018). De manera adicional, se han encontrado moléculas, conocidas como cannabimiméticos, químicamente distintas, que pueden ser aisladas a partir de distintas plantas, pero son capaces de imitar los efectos de los fitocannabinoides, ya que actúan sobre el sistema endocannabinoide, activando los receptores a cannabinoides o modulando la actividad de las enzimas que sintetizan y degradan endocannabinoides (Kumar *et al.*, 2019a).

El sistema endocannabinoide se encuentra en diversos tejidos del sistema cardiovascular y su modulación produce efectos cardiovasculares complejos que van desde la vasodilatación hasta la vasoconstricción. Por ejemplo, en sujetos saludables la activación de CB1 disminuye la contractilidad del miocardio y la presión sanguínea; además, los endocannabinoides AEA y 2-AG pueden activar los canales TRPV1 y TRPV4 en células del músculo liso, produciendo una respuesta vasodilatadora (Gonçalves *et al.*, 2020), aunque cabe mencionar que el receptor TRPV1 se ha estudiado ampliamente y se ha encontrado su presencia en diversos tejidos del sistema cardiovascular, como fibras nerviosas sensoriales, células endoteliales y el miocardio, además de células de músculo liso vascular (Sierra *et al.*, 2017). Por otra parte, el uso de fitocannabinoides se ha relacionado con un aumento en la actividad cardíaca y con una disminución de la presión sanguínea (Gonçalves *et al.*, 2020).

2.8 Beta-cariofileno y su efecto vasodilatador

El beta-cariofileno (BCP) es un sesquiterpeno, presente en el aceite esencial, extraído de varias plantas, como la pimienta negra (*Piper nigrum*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), la canela (*Cinnamomum* ssp.), el orégano (*Origanum vulgare*), la albahaca (*Ocimum* ssp.), el tomillo (*Thymus vulgaris*), la salvia (*Salvia officinalis*), la menta (*Mentha piperita*), el jengibre (*Zingiber officinale*), entre otros. En la naturaleza se puede encontrar principalmente como trans-cariofileno ((*E*)-BCP) y es un cannabinomimético, ya que es ligando de receptores a cannabinoides presentes en el organismo. Sin embargo, a diferencia de otros cannabinoides tradicionales que son capaces de activar ambos receptores, el BCP por su estructura química es agonista selectivo de los receptores CB2 (Puhl, 2020) y eCB (García-Camargo, 2018).

La activación del receptor CB2 por este compuesto es responsable de algunos efectos farmacológicos a nivel celular; en primer lugar, puede inhibir la actividad de la adenilato ciclasa que convierte el ATP a cAMP, esto finalmente conduce a un aumento en la concentración de calcio intracelular; también puede modular algunas rutas metabólicas, modificando la expresión y la actividad de varias proteínas. En el sistema cardiovascular, se ha demostrado que es un inhibidor de la inflamación vascular, modula la síntesis de moléculas de adhesión y ayuda a mantener el balance en la concentración de distintas isoformas de la enzima NOS (Puhl, 2020).

En un estudio realizado en un modelo de infarto de miocardio inducido en ratas, el BCP mostró tener un efecto cardioprotector, reduciendo la presión sanguínea (Younis y

Mohamed, 2019). Además, en algunos estudios realizados para conocer la composición de plantas, utilizadas en la medicina tradicional para tratar la hipertensión, se encontró que el BCP es uno de los compuestos principales (Santos *et al.*, 2014; Ashraf *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha encontrado que el BCP en ensayos de aorta aislada de rata es capaz de relajar este tejido contraído previamente con fenilefrina, así como que su efecto está relacionado a la activación de receptores CB₂ presentes en él y a la acción de las enzimas NOS y CSE (García-Camargo, 2018).

2.9 Métodos bioquímicos empleados para medir los niveles de transmisores gaseosos (NO y H₂S)

La cuantificación del NO es complicada, debido a la corta vida media del compuesto y a su reactividad; sin embargo, se han desarrollado varios métodos para superar estos problemas (Wu *et al.*, 2018). En general los métodos de cuantificación se pueden dividir en técnicas de cuantificación directas o indirectas y en la mayoría de los casos se utilizan técnicas indirectas, en donde se mide la actividad de la NOS o la reacción del NO con algunos blancos moleculares, como la sGC, la cual cataliza la formación de cGMP a partir de GTP; o productos derivados de reacciones del NO, como la formación de S-nitrosotioles o de nitritos/nitratos. Las técnicas más utilizadas para la detección de estos analitos son de espectroscopia como colorimetría, fluorimetría, luminimetría y resonancia electrónica de espín (Csonka *et al.*, 2015); también se han desarrollado métodos de detección electroquímicos en cultivos celulares y corazones de ratas, debido a la reactividad electroquímica que presenta el NO (Wu *et al.*, 2018).

Existen varios métodos para detectar la concentración de H₂S, entre ellos se encuentran técnicas colorimétricas, sondas fluorescentes, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, análisis espectrofotométricos, sensores polarográficos (Wu *et al.*, 2018) y cromatografía de gases (Cao *et al.*, 2019). En la literatura científica, el método utilizado comúnmente para medir su concentración en muestras biológicas es el de azul de metileno. Esta técnica se basa en la espectrofotometría del colorante después de la reacción que se lleva a cabo entre el sulfuro y el *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina. Sin embargo, este método puede presentar varios problemas como baja sensibilidad, formación de dímeros y trímeros de colorantes e interferencias (Shen *et al.*, 2015). Otro método utilizado que ha sido considerado muy útil y que proporciona mayor estabilidad a la muestra es el de monobromobimano (MBB), en donde el MBB reacciona con H₂S y lo convierte en sulfuro de dibimano, que puede ser determinado posteriormente con HPLC equipado con un detector de fluorescencia (Cao *et al.*, 2019).

2.10 Métodos empleados para medir el efecto vasodilatador de compuestos

Los ensayos preclínicos para determinar la actividad vasoactiva de compuestos utilizan modelos apropiados para la determinación de diversos parámetros farmacodinámicos (Knox *et al.*, 2019), los cuales han sido el resultado de estudios hechos en modelos animales (Ajbli y Eddouks, 2020). En estos modelos animales se utilizan frecuentemente ratas para imitar estados de enfermedad humana, especialmente enfermedades cardiovasculares y endocrinas (Santos *et al.*, 2014). El ensayo de aorta aislada de rata ha sido utilizado ampliamente por las ventajas que presenta sobre otros modelos experimentales *in vitro*; entre los que cabe resaltar la complejidad biológica que se puede lograr entre el nivel celular y el modelo animal, la reproducibilidad de la respuesta contráctil y la posibilidad de observar las respuestas a las señales que se dan entre célula endotelial y célula de músculo liso vascular. A lo largo de los años este tipo de ensayo se ha utilizado para validar las propiedades vasoactivas, especialmente el efecto vasodilatador de extractos y compuestos obtenidos de plantas usadas en la medicina tradicional (Knox *et al.*, 2019).

2.11 Química computacional y acoplamiento molecular

Desde la década de los noventa, gracias al progreso logrado en las ciencias genómicas y en las técnicas de cristalografía de proteínas y resonancia magnética nuclear, ha sido posible el desarrollo de modelos en 3D de estructuras químicas y complejos de proteína con diversos ligandos. Simultáneamente, se ha realizado un avance significativo en las ciencias computacionales, que ha permitido el desarrollo de métodos para predecir interacciones moleculares y hacer la caracterización *in silico* de los complejos proteína-ligando y hacer tamizajes a gran escala de distintas moléculas contra un blanco (Cavasotto *et al.*, 2019).

2.11.1 Modelado de proteínas por homología

Para comprender mejor la estructura y función de una proteína es esencial contar con su estructura tridimensional, ya que esto ayuda a diseñar experimentos más específicos. Sin embargo, la elucidación experimental de las estructuras 3D de proteínas ha sido una limitante, por lo que hoy en día hay una diferencia significativa entre el número de secuencias proteicas conocidas y las estructuras 3D disponibles en las bases de datos. Existen métodos computacionales que pueden ser utilizados para cubrir esta brecha, entre ellas se encuentra el modelado por homología o modelado comparativo. En esta técnica se interpola la información estructural entre estructuras homologas para proveer

modelos proteicos con suficiente precisión para la investigación basada en estructuras (Chikhale *et al.*, 2021).

Un factor importante para el modelado es el software que genera el modelo proteico *per se*, empezando por la alineación de la secuencia problema y estructuras plantilla; se generan coordenadas para la alineación de aminoácidos con una estructura plantilla; se modela a las regiones que no están dentro de la plantilla, por ejemplo: modelado de inserción o delección y construcción de las cadenas laterales de los aminoácidos; adicionalmente, se minimiza la energía de las fuerzas moleculares para resolver cualquier irregularidad estereoquímica. Actualmente, existen varios softwares capaces de llevar a cabo alguna o todas estas tareas, por ejemplo: MODELLER, Rosetta, I-TASSER, SCWRL o ProModII (Studer *et al.*, 2021).

2.11.2 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una técnica en la que se analiza la conformación y orientación de moléculas en el sitio activo de una macromolécula blanco (Torres *et al.*, 2019), que permite predecir la posición más favorable para la interacción entre estas moléculas a partir de sus representaciones tridimensionales (Ballón-Paucara y Grados-Torrez, 2019). Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy importante para el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos (Torres *et al.*, 2019) y se puede dividir en las siguientes etapas:

1. Lo primero es obtener la estructura del blanco. Estas estructuras tridimensionales se pueden obtener del Protein Data Bank; en caso de que no se encuentren se deben usar métodos de predicción computacional como modelado comparativo y *ab initio*. Usualmente, ya se conoce el sitio donde se unirá el ligando, sin embargo, si no se conoce se debe predecir mediante algoritmos el sitio más probable.
2. Se debe obtener la estructura del ligando en bases de datos de moléculas pequeñas como ZINC o PubChem.
3. Se debe evaluar la protonación y asignar cargas tanto del sitio activo como del ligando, ya que esta información es crítica para poder predecir las interacciones entre el blanco y el ligando (Torres *et al.*, 2019). Para poder predecir de manera correcta el estado de protonación es necesario conocer el pH fisiológico y calcular los valores de pKa para los residuos ionizables de la proteína blanco (Ballón-Paucara y Grados-Torrez, 2019).

4. En la última etapa, la información se somete a dos procesos: simulaciones de búsqueda y funciones de puntuación (Torres *et al.*, 2019). En la primera, se generan varias conformaciones del blanco y se acopla el ligando a cada una de estas distintas conformaciones. Este proceso supone un gasto de capacidad computacional enorme, por lo que se han desarrollado otros métodos en los que se superponen varias conformaciones o se hace un promedio de ellas para acoplar el ligando. En el segundo proceso, se selecciona y clasifica la posición ideal del ligando dentro del blanco de entre las muchas conformaciones generadas anteriormente (Ballón-Paucara y Grados-Torrez, 2019), las distintas funciones de puntuación se pueden dividir en tres grupos: (1) de campos de fuerza, que son ecuaciones que calculan la suma de energías de interacción electrostática; (2) empíricas, que son las que predicen la afinidad de enlace de acuerdo a datos experimentales existentes y (3) basadas en conocimiento, que son aquellas que toman en cuenta la frecuencia de las interacciones entre pares atómicos observados en estructuras tridimensionales de complejos blanco-ligando determinadas experimentalmente (Torres *et al.*, 2019).

2.11.3 Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso

Las proteínas juegan un rol vital dentro de los organismos y son responsables de una amplia gama de procesos necesarios para sustentar la vida, como puede ser el reconocimiento molecular, la transducción de señales, la catálisis de enzimas entre otros. Estos eventos son posibles gracias a las interacciones entre proteínas y otras moléculas, como ligandos, péptidos, otras proteínas y ácidos nucleicos. El creciente avance en las técnicas de caracterización de proteínas ha permitido el avance de áreas como la simulación de dinámicas moleculares (Lazim *et al.*, 2020).

La simulación de dinámica molecular es una herramienta teórica que puede proveer respuestas respecto a la relación de estructura-función de las proteínas; la información obtenida mediante esta técnica puede permitir una mejor comprensión sobre datos de termodinámica y cinética necesarios para una mejor elucidación de los mecanismos responsables de la modulación biológica como pueden ser las asociaciones ligando-proteína y proteína-proteína. Finalmente, el conocimiento de estas asociaciones puede ser de alto valor durante el proceso de desarrollo de fármacos (Lazim *et al.*, 2020).

Dentro de las técnicas de simulación de dinámica molecular podemos encontrar la llamada atomista o átomo a átomo (*all-atom*, AA) y la de grano grueso (*coarse-grained*,

CG). En la primera, como su nombre lo dice, se modela cada átomo del sistema, sin embargo, esto supone la necesidad de una gran cantidad de recursos computacionales y de tiempo. La segunda técnica es una alternativa en la que se representan modelos atomísticos con una menor cantidad de grados de libertad. Desde el punto de vista de la dinámica molecular, los modelos CG consisten en interacciones entre “puntos de masa”, llamadas perlas, en donde cada una corresponde a un grupo de átomos en una simulación AA del mismo sistema, lo que implica un menor número de partículas y menos partículas vecinas por considerar. Así pues, estos modelos permiten reproducir varias propiedades de los modelos AA con una mayor eficiencia computacional (Joshi y Deshmukh, 2021).

Los modelos CG pueden ser divididos en tres categorías: (1) aquellos que reducen el orden de representación de partículas en las estructuras moleculares, (2) aquellos que asumen una deformación homogénea de la escala atómica y (3) aquellos que utilizan representación de campo. La mayoría de los modelos CG se basan en el método de reducción estructural, el cual engloba dos pasos cruciales: (a) la reducción de la complejidad de los sistemas atómicos, mediante en mapeo de las perlas en la estructura atómica de las moléculas y (b) el desarrollo de los campos de fuerza, una serie de parámetros que definen las interacciones entre las perlas (Joshi y Deshmukh, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La OMS considera a las enfermedades cardiovasculares como la principal causa de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2021). Los países en vías de desarrollo se ven afectados de manera especial por estas enfermedades y se estima que el número de muertes que causan en estos países es tres veces mayor que en países desarrollados y es aún más preocupante que muchas de estas muertes se dan entre la población activa laboral (Bowry *et al.*, 2015).

El principal factor de riesgo para el desarrollo de estas enfermedades es la hipertensión (Mills *et al.*, 2020) y, en México, la incidencia de hipertensión en adultos mayores a 20 años es de 34.1% y aunque los que la padecen en mayor medida son adultos mayores, un porcentaje importante de población joven también sufre de hipertensión (Shamah-Levy *et al.*, 2020).

Desafortunadamente, muchos de los fármacos utilizados para tratar esta enfermedad presentan efectos secundarios graves (Azizi *et al.*, 2019) y muchas veces es necesario el uso de más de un fármaco para controlarla (An *et al.*, 2020). Si además se toma en cuenta que algunos de los factores de riesgo para el desarrollo de la hipertensión es el incremento en el porcentaje de adultos mayores y la falta de actividad física (Mills *et al.*, 2020), que es una conducta cada vez más común entre la gente joven en México (Montero y Juan, 2017), es imperativo la búsqueda de fármacos alternativos con mayor efectividad y menos efectos adversos. Para este fin, se han utilizado las plantas medicinales, las cuales constituyen una fuente valiosa de compuestos activos potencialmente útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión (Knox *et al.*, 2019; Ajebli y Eddouks, 2020). Entre estos compuestos se encuentran los fitocannabinoides y los cannabimiméticos que han demostrado ser útiles en el tratamiento de este tipo de enfermedades (Gonçalves *et al.*, 2020).

En estudios preliminares, realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha comprobado que el beta-cariofileno es capaz de relajar la aorta de rata, mediante la activación de receptores a cannabinoides CB2 y de las vías del NO/cGMP y del H₂S/K_{ATP} (García-Camargo, 2018). Sin embargo, no se ha elucidado completamente su mecanismo de acción y queda aún por determinar si este cannabimimético produce su efecto vasodilatador, incrementando los niveles de NO y H₂S, los cuales inducen la formación de nitroxilo para finalmente producir su efecto vasodilatador mediante la activación de la vía

del HNO-TRPA1-CGRP. El beta-cariofileno constituye un prototipo estructural prometedor, con un mecanismo de acción novedoso, potencialmente útil para el tratamiento de la hipertensión.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Induce el beta-cariofileno su efecto vasodilatador mediante la activación de la vía del nitroxilo-TRPA1-péptido relacionado con el gen de la calcitonina?

5. HIPÓTESIS

El efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno involucra la activación de la vía del nitroxilo-TRPA1-péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar si la vía del nitroxilo-TRPA1-péptido relacionado con el gen de la calcitonina participa en el efecto vasodilatador inducido por el beta-cariofileno.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar si el beta-cariofileno incrementa los niveles de NO y H₂S en la aorta, utilizando técnicas bioquímicas.
2. Determinar si el beta-cariofileno produce su efecto vasodilatador, mediante el incremento en los niveles de nitroxilo, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata.
3. Evaluar si los canales TRPA1 participan en el efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno en la aorta de rata.
4. Determinar si el beta-cariofileno produce su efecto vasodilatador, mediante la activación del receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata.
5. Proponer un modelo de interacción molecular entre el beta-cariofileno y el canal TRPA1.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Desarrollo experimental

7.1.1 Animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron ratas macho Wistar (250–300 g) para el estudio farmacológico, las cuales fueron proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. Los animales se mantuvieron en jaulas de policarbonato con medidas 64 x 34 x 25 cm con tapa de reja metálica con separaciones de 1.5 cm entre cada una. Se utilizó una cama sanitaria de aserrín, la cual se cambió diariamente. Los animales se alojaron en un cuarto bien ventilado a una temperatura de 22 ± 2 °C, bajo un ciclo de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad (luz de 7:00 a.m. a 7 p.m.) con un 30 % de humedad. Los animales estuvieron en este cuarto, ubicado en el bioterio de la Facultad de Química, en la planta baja del edificio 2, por un período no mayor a 5 días. A los animales se les proporcionó alimento (Rodent chow 5001) y agua *Ad libitum*. En total, se utilizaron 15 ratas para los ensayos bioquímicos y en los que se empleó aorta aislada de rata; de acuerdo con ensayos realizados previamente se hicieron 6 evaluaciones para cada ensayo, utilizando 3 ratas distintas para obtener resultados relevantes estadísticamente (García-Camargo, 2018; Valencia-Guzmán *et al.*, 2021; Castro-Ruiz *et al.*, 2019). Posteriormente, se contó con un servicio de recolección de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBIs) para el tratamiento y procesamiento de los residuos generados.

7.1.2 Ensayo de actividad enzimática

7.1.2.1 Producción de nitritos totales en homogenados de aorta de rata

El cambio en la concentración de NO, inducido por el beta-carbofileno, se evaluó indirectamente a través de la cuantificación de nitritos totales en anillos aórticos. Los anillos se homogenizaron en buffer de fosfatos (PBS) 100 mM (pH 7.4) con un inhibidor de proteasas. Las muestras se incubaron con beta-carbofileno en una concentración de 200 µg/mL o acetilcolina (control positivo) en una concentración de 50 µM, por 30 minutos y se centrifugaron a 16945 x g durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteínas del sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford. Los nitritos totales se determinaron utilizando el kit de ensayo colorimétrico “Nitrite/Nitrate Colorimetric Assay Kit” de Cayman Chemical (no. catálogo 780001) (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021).

7.1.2.2 Producción de sulfuro de hidrógeno en homogenados de aorta de rata

Se utilizó un método espectrofotométrico con la formación de azul de metileno, de acuerdo con lo reportado por Wen *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Los anillos aórticos se homogenizaron en PBS helado 100 mM (pH 7.4) con un inhibidor de proteasas. Se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Las muestras (300 μ L) se mezclaron con 50 μ L de piridoxal-5-fosfato 2 mM, L-cisteína 10 mM y beta-cariofileno (200 μ g/mL) o acetilcolina (50 μ M; control positivo). La reacción se llevó a cabo en un tubo central con un papel filtro saturado con acetato de zinc 1% y sellado con un tapón de goma. Para iniciar la reacción se llevó el sistema de un baño de hielo a una incubadora a 37°C con agitación ligera por 90 minutos. La reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético 10% (500 μ L) y se incubó por 60 minutos más. Se agregaron 250 μ L de agua destilada, 150 μ L de sulfato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina 20 mM en HCl 7.2 M y 150 μ L de FeCl₃ en HCl 1.2 M y la mezcla se incubó por 20 minutos. La absorbancia se midió a 670 nm y la concentración se calculó utilizando una curva de calibración de solución estándar de NaHS (0-100 μ M) (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021).

7.1.3 Ensayo de aorta aislada de rata

7.1.3.1 Evaluación del efecto vasodilatador: ensayo de aorta aislada de rata

Para este ensayo se utilizaron ratas de 250 a 300 g que se sacrificaron utilizando una guillotina de acuerdo con la norma NOM-062-ZOO-1999. Se extrajo cuidadosamente la aorta torácica y se colocó en una caja petri que contenía solución de Krebs-Henseleit (en mM): NaCl 126.8; KCl 5.9; NaHCO₃ 30; KH₂PO₄ 1.2; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.5; y D-glucosa 5. La aorta se limpió, se le retiró el tejido conectivo y se dividió en anillos de 4 a 5 mm, que se suspendieron en dos ganchos de acero inoxidable en forma de L y se colocaron en un baño de órganos aislados de 5 mL que contenía solución de Krebs-Henseleit a 37°C y burbujeo constante de carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) (Knox *et al.*, 2019). Los cambios en la tensión se midieron con un transductor de fuerza Grass modelo FT03 unido a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7D. Los anillos se expusieron a una tensión basal de 1.5 g por 60 minutos (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021). Posteriormente, los anillos se incubaron con solución de Krebs-Henseleit despolarizante (con elevada concentración de KCl) hasta que la tensión máxima sea alcanzada. Los anillos se lavaron y equilibraron constantemente por 30 minutos (Knox *et al.*, 2019) hasta regresar a la tensión inicial de 1.5 g. Finalmente, los anillos se contrajeron con L-fenilefrina 1 μ M y se definió la fuerza de contracción inducida como 100%. Cuando se estabilizó la tensión se añadieron las sustancias de prueba (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021).

7.1.3.2 Evaluación de la participación del canal TRPA1, el receptor a CGRP y el nitroxilo en el efecto vasodilatador del beta-cariofileno

La participación del canal TRPA1 en el efecto vasodilatador del beta-cariofileno se evaluó incubando segmentos de aorta durante 20 minutos en presencia de HC-030031, un inhibidor específico de este canal. De manera similar, la participación del receptor del CGRP se evaluó incubando segmentos de aorta en presencia de GCRP₈₋₃₇, un inhibidor específico para este receptor. Por último, se evaluó la participación de HNO incubando segmentos de aorta en presencia de L-cisteína, un capturador de nitroxilo (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021).

7.2 Estudio de acoplamiento molecular para la elaboración de modelos de interacciones moleculares del beta-cariofileno con el receptor TRPA1

7.2.1 Preparación de ligando

Se obtuvo la estructura cristalográfica del beta-cariofileno de la base de datos PubChem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) y se preparó, utilizando el módulo *Ligand preparation* del programa Schrödinger-Maestro, se asignaron los órdenes de enlace y se calculó el estado de ionización a pH 7 ± 0.5 (García-Camargo, 2018).

7.2.2 Preparación de la estructura del canal TRPA1

Se buscó la criomicroscopía original (O75762) en la base de datos UniProt (www.uniprot.org) y se completaron los residuos faltantes en el servidor web SwissModel (www.swissmodel.expasy.org, Universidad de Basel), excepto por los residuos 62 a 609, correspondientes a las repeticiones de anquirina que no son relevantes en este trabajo. Se armó un sistema con modelo de membrana POPC y con tipo de agua de cuatro puntos con polarización tipo Ewald (TIP4PEW) y con iones Na⁺ y Cl⁻ para tener una concentración isoosmótica (0.15 M). La preparación de este sistema se realizó en el módulo *System builder* del programa Schrödinger-Maestro 2020-4 y se ejecutó la simulación en el programa Desmond versión 6.8 integrada al programa Schrödinger-Maestro.

7.2.3 Acoplamiento molecular del beta-cariofileno con TRPA1

El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el programa AutoDock GPU 1.5.3. Se realizaron 100 corridas con 50 000 000 de evaluaciones de energía en un algoritmo genético Lamarckiano para generación de conformaciones y un método de búsqueda local Solis-Wets, en los sitios reconocidos como importantes para unión de ligandos del canal TRPA1 (Echavarría-Ponce, 2021).

7.3 Análisis estadístico

Se realizaron 6 evaluaciones para cada una de las concentraciones, utilizando, al menos, tres ratas distintas. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM). Los datos experimentales generados de las evaluaciones se ajustaron a una ecuación sigmoïdal y se graficaron, mediante el programa PRISMA 8.0 GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para la obtención de las curvas concentración respuesta. Con este programa se calculó también la concentración efectiva media (EC_{50}) y el efecto máximo (E_{max}) mediante un ajuste no lineal de la curva. Las comparaciones entre más de dos poblaciones se realizaron mediante una ANOVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 Ensayo de actividad enzimática

8.1.1 Producción de nitritos totales en homogenados de aorta de rata

Nuestro grupo de trabajo realizó un estudio previo en el cual se encontró que el efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno (BCP) involucra la activación de la enzima NOS (García-Camargo, 2018). Para confirmar este hallazgo, se determinó si existía un incremento en la producción de óxido nítrico, cuantificando los nitritos totales en muestra homogenizadas de aorta tratadas con ACh (58.8 μ M) y BCP (980 mM). Sin ser estimuladas las muestras aórticas producen 19.92 ± 1.54 μ mol de nitritos+nitratos/ μ g de proteína, el BCP induce un aumento significativo ($p < 0.001$) en la producción de NO (82.75 ± 5.76 μ mol de nitritos+nitratos/ μ g de proteína) en comparación con el estado basal y con el producido por la ACh (40.75 ± 7.10 μ mol de nitritos+nitratos/ μ g de proteína) (Figura 4).

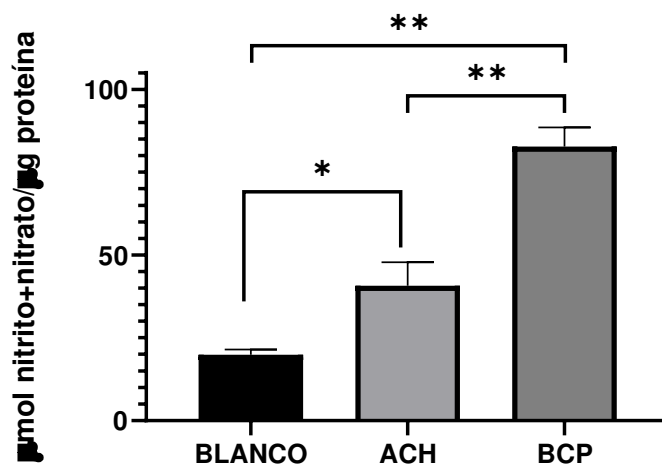


Figura 4. Evaluación de nitritos totales en extractos de aorta en ausencia (blanco) y presencia de acetilcolina (ACh) y beta-cariofileno (BCP); los resultados representan promedio \pm SEM (n=6); * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

8.1.2 Producción de sulfuro de hidrógeno en homogenados de aorta de rata

De manera similar, nuestro grupo de trabajo demostró que el efecto vasodilatador ejercido por el BCP también involucra la participación de la enzima CSE (García-Camargo, 2018). Para confirmar la participación de esta enzima, se determinó si existía un aumento en la producción del neurotransmisor gaseoso H₂S en presencia de BCP (980 mM), utilizando ACh (58.8 μM) como control positivo. Sin ser estimuladas las muestras aórticas producen 27.82 ± 3.49 μmol H₂S/μg de proteína, el BCP produce un aumento significativo ($p < 0.001$) en la producción de H₂S (45.65 ± 1.15 μmol H₂S/μg de proteína) en comparación con el estado basal y comparable al producido por la ACh (58.87 ± 2.58 μmol de H₂S/μg de proteína) (Figura 5).

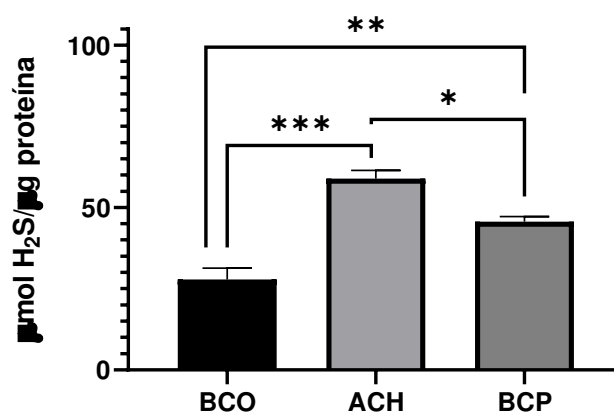


Figura 5. Evaluación de sulfuro total en extractos de aorta en ausencia (blanco, BCO) y presencia de ACh y beta-cariofileno (BCP); los resultados representan promedio ± SEM (n=6); * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

8.2 Evaluación de la participación de la ruta del HNO-TRPA1-CGRP

8.2.1 Evaluación de la participación de TRPA1 en el efecto vasodilatador de beta-cariofileno

Para determinar si los canales TRPA1 participan en el efecto vasodilatador del BCP, se realizó un ensayo de aorta aislada de rata en el que se incubaron segmentos de aorta en ausencia y presencia del inhibidor específico de los canales TRPA1, el H-030031 (100 μM). La inhibición de este canal redujo de manera significativa el efecto vasodilatador del

BCP (Figura 6), particularmente a concentraciones mayores ($E_{max} = 30.66 \pm 2.80\%$), en comparación con las aortas en ausencia de este inhibidor ($E_{max} = 42.74 \pm 3.33\%$). Lo que indica que la respuesta vasodilatadora del BCP involucra la participación de los canales TRPA1.

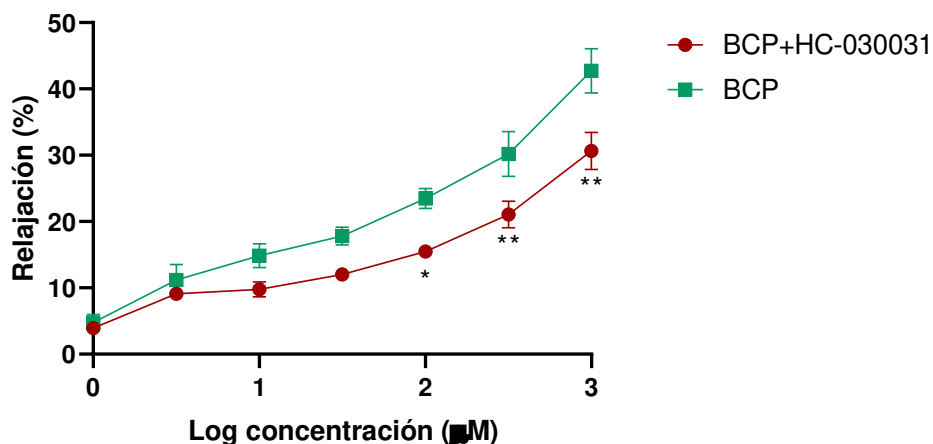


Figura 6. Participación del canal TRPA1 en el efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno (BCP). Se determinó el efecto vasodilatador del BCP en ausencia y presencia de HC-030031, un inhibidor del canal TRPA1; los resultados representan el promedio \pm SEM ($n=6$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

8.2.2 Evaluación de la participación del receptor a CGRP en el efecto vasodilatador del beta-cariofileno

Para determinar si el CGRP participa en el efecto vasodilatador del BCP, se realizó un ensayo de aorta aislada de rata en el que se incubaron segmentos de aorta en ausencia y en presencia del inhibidor específico del receptor de este péptido, el CGRP₈₋₃₇ ($3 \mu\text{M}$). La inhibición de este receptor redujo de manera significativa el efecto vasodilatador del BCP ($E_{max} = 31.09 \pm 6.06\%$), particularmente a concentraciones mayores. Lo que indica que la respuesta vasodilatadora del BCP involucra la participación del receptor al CGRP (Figura 7).

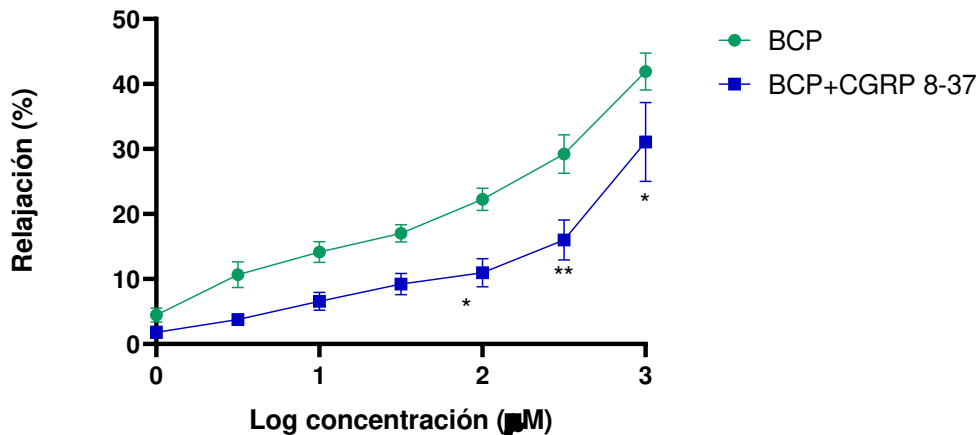


Figura 7. Participación del receptor al CGRP en el efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno (BCP). Se determinó el efecto vasodilatador del BCP en ausencia y presencia de CGRP₈₋₃₇, un inhibidor del receptor CGRP; los resultados representan el promedio \pm SEM (n=6); * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

8.2.3 Evaluación de la participación de HNO en el efecto vasodilatador de beta-cariofileno

Para determinar si el CGRP participa en el efecto vasodilatador del BCP, se realizó un ensayo de aorta aislada de rata en el que se incubaron segmentos de aorta en ausencia y presencia del captador de HNO, la cisteína (3 mM). La eliminación de este gas redujo drásticamente el efecto vasodilatador del BCP ($E_{max} = 16.56 \pm 2.43\%$), indicando que la respuesta vasodilatadora del BCP involucra la participación del HNO (Figura 8).

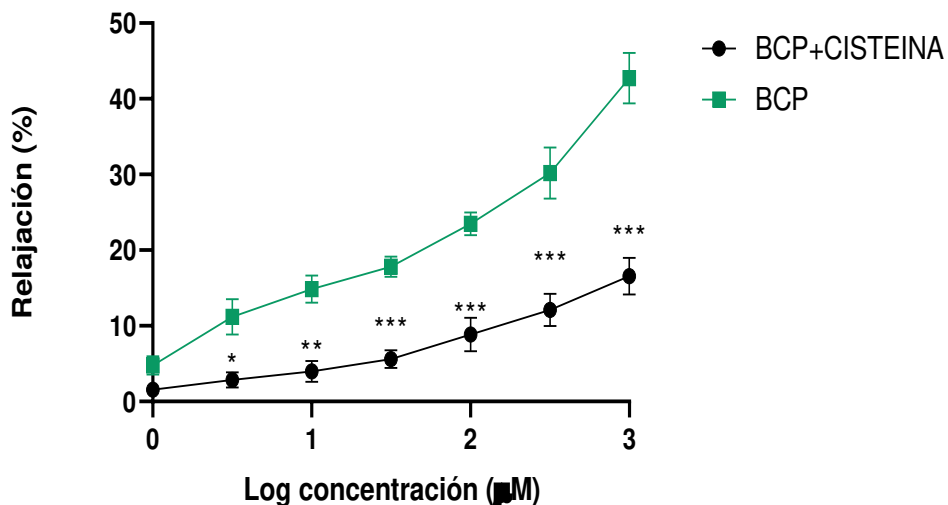


Figura 8. Participación del HNO en el efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno (BCP). Se determinó el efecto vasodilatador del BCP en ausencia y presencia de L-cisteína, un captador de HNO; los resultados representan el promedio \pm SEM (n=6); * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

Estos resultados indican que la ruta del HNO-TRPA1-CGRP participa en el efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno.

8.3 Estudio de acoplamiento molecular para la elaboración de un modelo de interacción molecular del beta-cariofileno con el receptor TRPA1

Los resultados de los estudios farmacológicos indicaron que el BCP interacciona con el canal TRPA1; sin embargo, con estos estudios no es posible determinar la naturaleza de estas interacciones o el sitio de acoplamiento de este sesquiterpeno en el canal. Por esta razón, se realizó un estudio computacional de acoplamiento molecular del BCP con el canal TRPA1.

Para comenzar el estudio computacional se realizó el modelado por homología de la estructura de este canal. En primera instancia, se obtuvo la secuencia canónica de aminoácidos del canal TRPA1 humano en la plataforma de Uniprot (O75762; www.uniprot.org) y el modelado por homología se realizó utilizando el servidor SwissModel (Figura 9), en la cual se omitieron los residuos de anquirina (residuos 62 a 609) que, para fines de este estudio se decidió omitir por ser residuos cuya función principal es estructural.

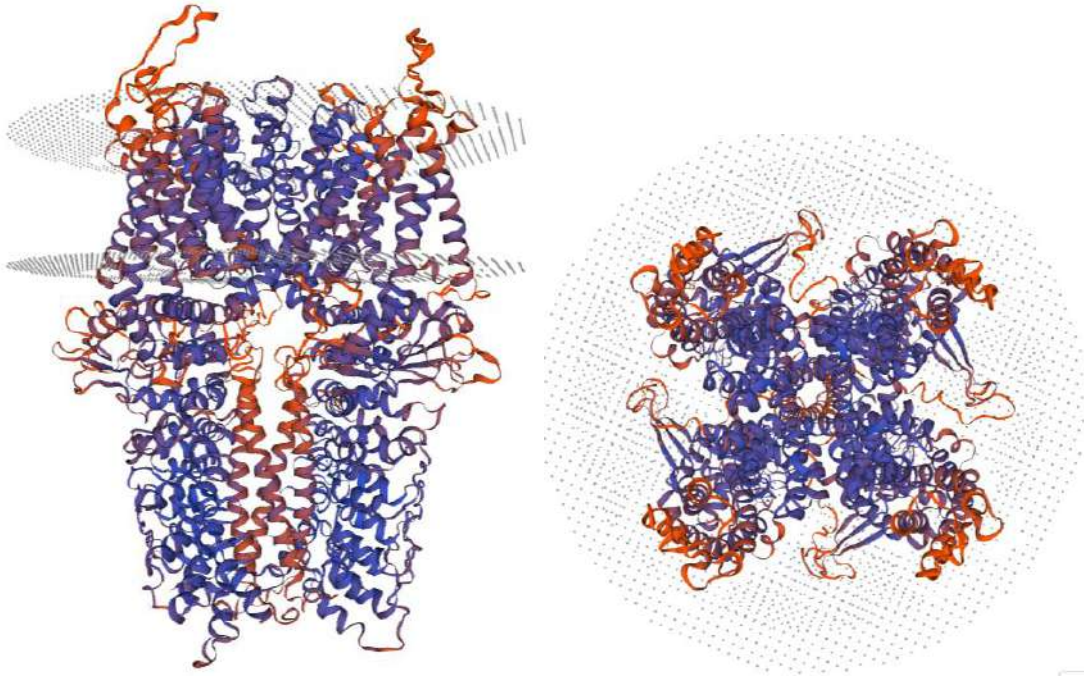


Figura 9. Modelo por homología de TRPA1 humano, generado con el software SwissModel, vista lateral (izquierda) y vista del poro (derecha).

Este modelo fue posteriormente sometido a un análisis de Ramachandran para evaluar su calidad, para lo que se empleó el servidor de Molprobity (Figura 10; <http://molprobity.manchester.ac.uk/>), en el cual se encontró que existía un 93.78% de torsiones favorecidas, lo que indica que el modelo tiene una calidad adecuada y se procedió con su uso en los experimentos posteriores.

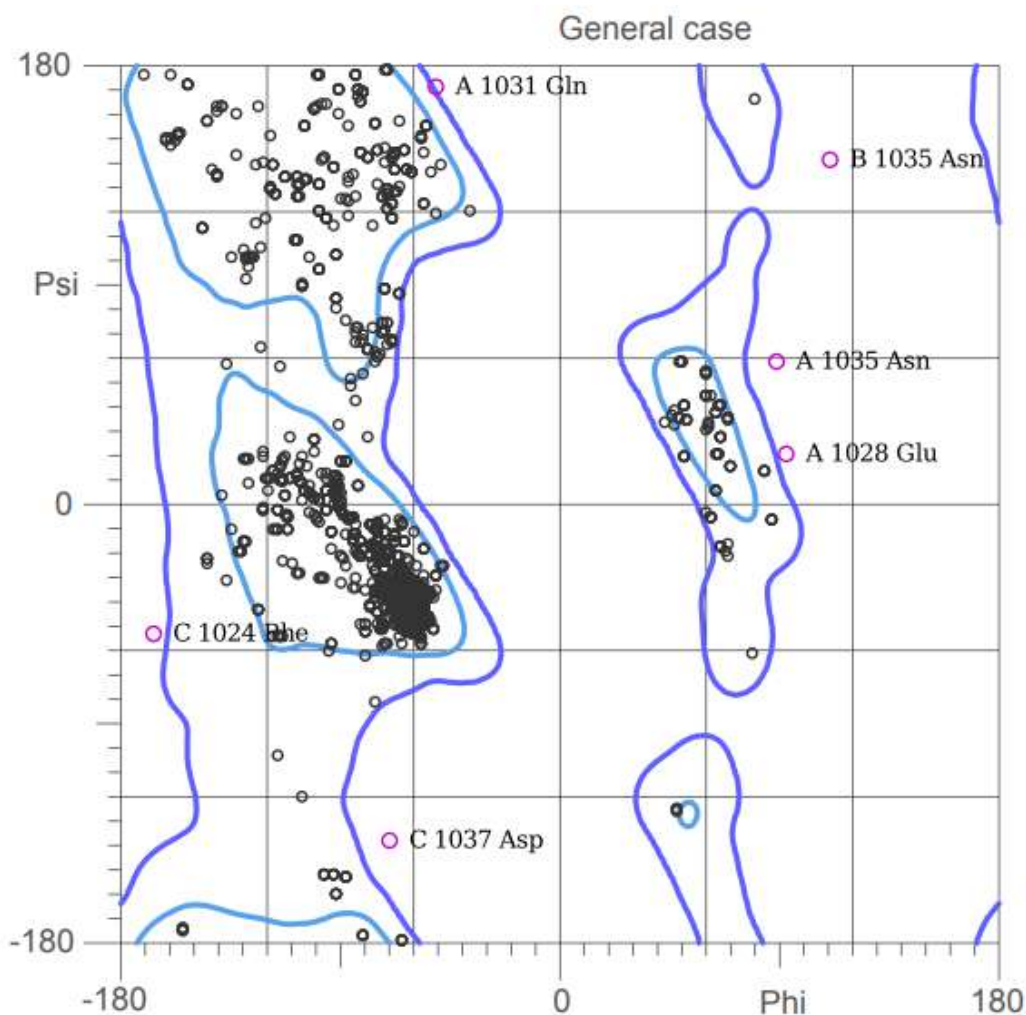


Figura 10. Análisis de Ramachandran del modelo TRPA1.

Se procedió a realizar las simulaciones de acoplamiento entre BCP y el modelo de TRPA1 en el software AutoDock GPU 1.5.3; en primera instancia se hizo una simulación “ciega”, en donde se buscaron los posibles sitios de unión de BCP dentro de todo el modelo. Esta simulación mostró la existencia de dos sitios principales de unión: el de menor energía (LE, por sus siglas en inglés) y de mejor clúster (BC, por sus siglas en inglés). A continuación, se realizó la simulación de la unión de BCP con estos dos sitios en específico.

A continuación, se pueden observar el modelo de interacción entre los aminoácidos localizados en el sitio de unión LE y BC, y el BCP. El código de colores del software Maestro es: los aminoácidos cargados positivamente se muestran en color morado, los

cargados negativamente en color rojo, los polares en color azul y los hidrofóbicos en color verde.

Como se puede observar en la Figura 11, las interacciones que predominan entre el sitio de unión LE y el BCP son de tipo hidrofóbicas, lo cual es de esperarse debido a la naturaleza de hidrocarburo del BCP.

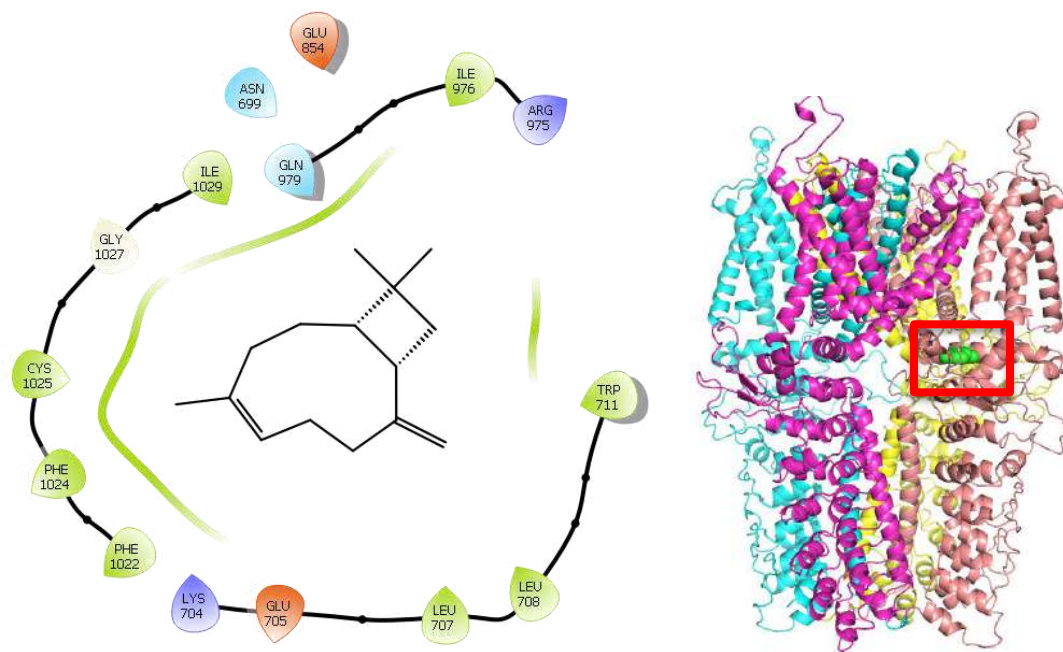


Figura 11. Diagrama de interacción LE (derecha), interacción entre TRPA1 y BCP (izquierda).

De igual manera en la Figura 12, se presenta el diagrama de interacción entre el sitio de unión BC y el BCP, en este modelo también se denota que las interacciones que predominan son las hidrofóbicas, sin embargo, también se presenta un contacto con un aminoácido polar entre el doble enlace en el BCP y el residuo de treonina 684.

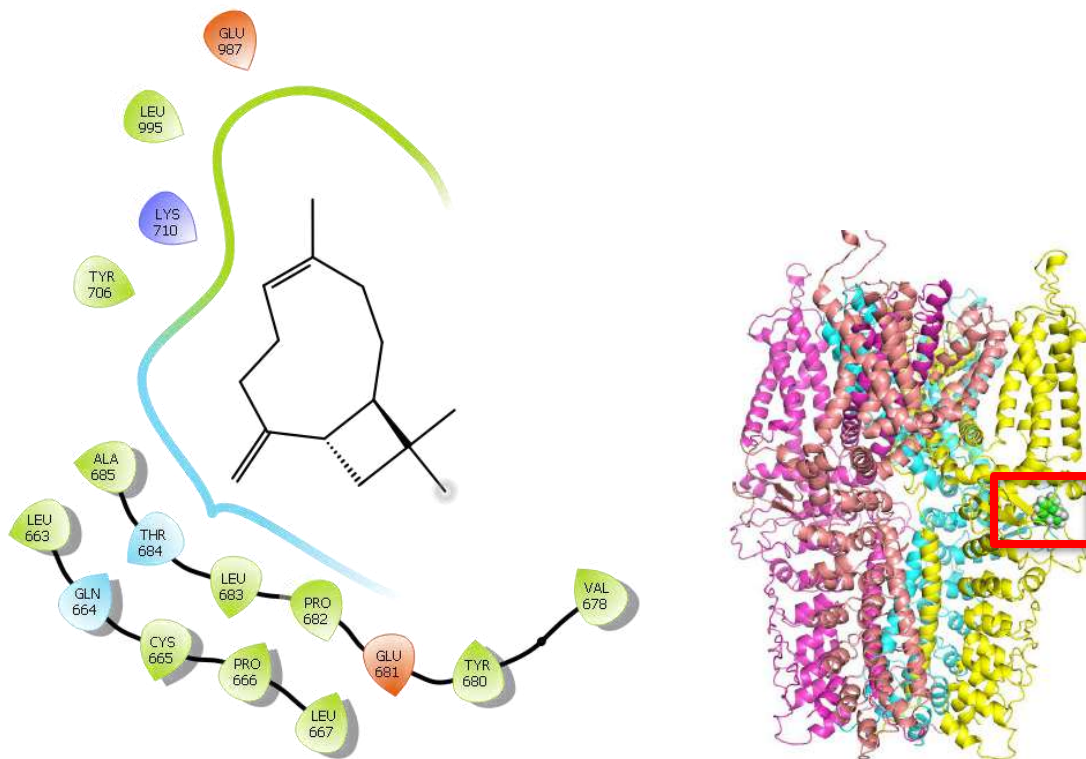


Figura 12. Diagrama de interacción BC (derecha), interacción entre TRPA1 y BCP (izquierda).

Además de esto, se realizó también una simulación de dinámica molecular del canal hTRPA1 sin la presencia del ligando y con los resultados anteriores del *docking*; con estas tres simulaciones se pudo hacer una comparación de las RMSD de todos (Figura 13), en la cual se denota que en todas las simulaciones la proteína tenía una tendencia a estabilizarse hacia el final del tiempo de simulación. Además, realizando una comparación entre los RMSD del ligando en los sitios de unión LE y BC (Figura 14), se puede ver que el ligando es más estable en el sitio LE. La inestabilidad del BCP en el sitio BC provocaba que el compuesto se saliera del sitio de unión hacia el final de la simulación, lo que convierte al sitio de unión LE entre BCP y TRPA1 en el mejor candidato.

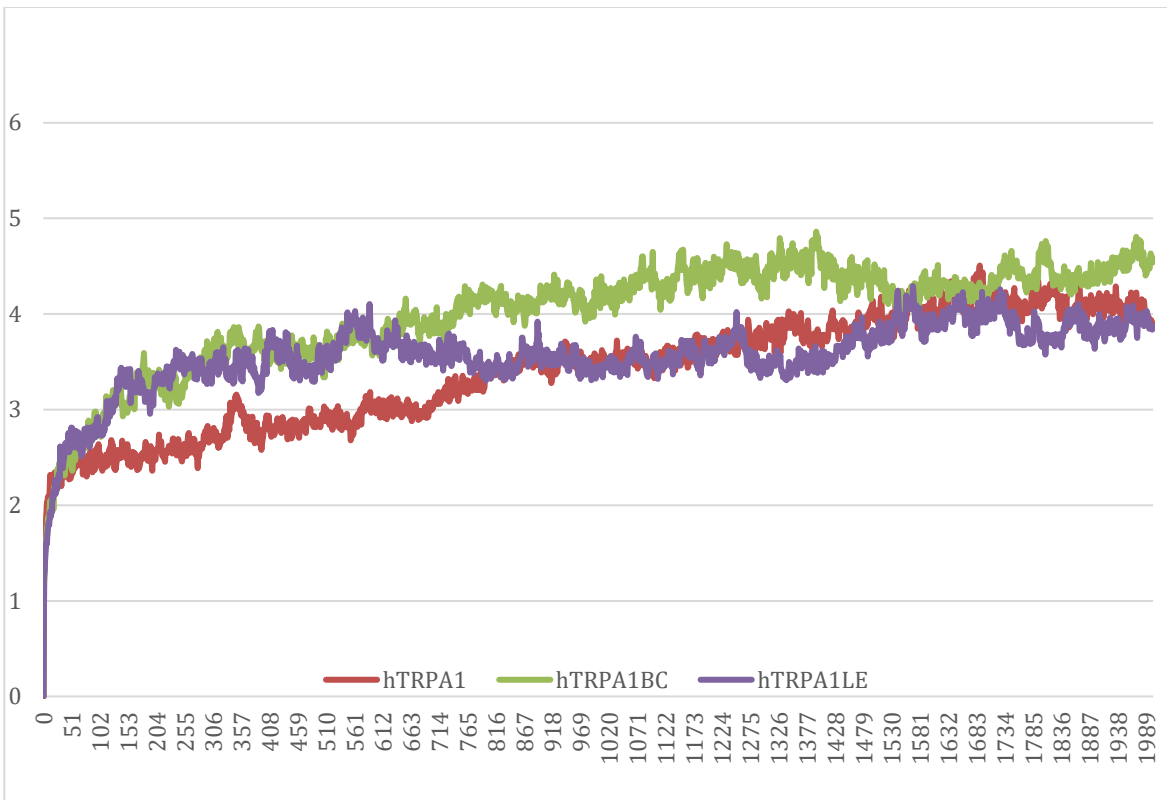


Figura 12. Comparación de RMSD entre hTRPA1 sin ligando (rojo), hTRPA1 y BCP en el sitio BC (verde), y hTRPA1 y BCP en el sitio LE (azul).

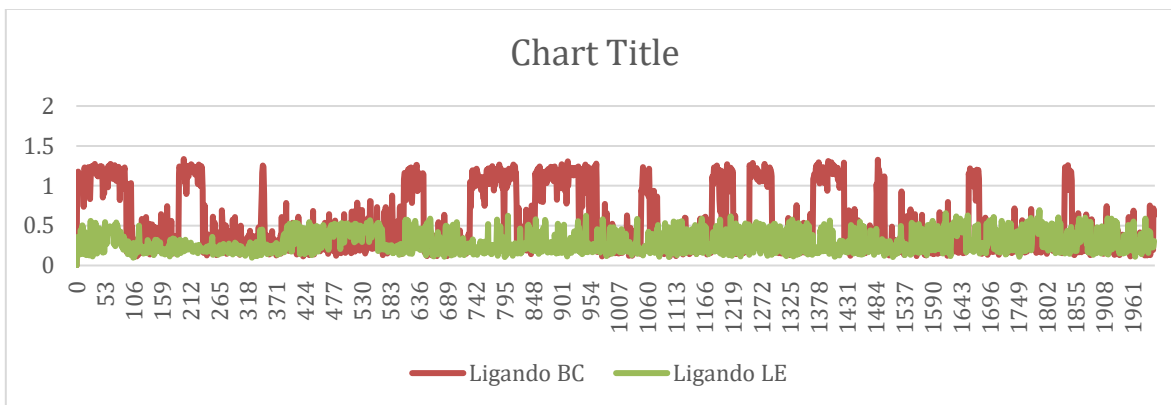


Figura 13. Comparación de RMSD del ligando en el sitio BC (rojo) y el ligando en el sitio LE (verde).

9. DISCUSIÓN

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas el sistema endocannabinoide constituye un candidato importante para el desarrollo de nuevas terapias y se ha reportado que diversos cannabinoides podrían desarrollarse como compuestos terapéuticos prometedores (Dziemitko *et al.*, 2023). Investigaciones recientes realizadas por nuestro grupo de trabajo indican que el BCP es un modulador del sistema endocannabinoide, mediante la activación de los receptores CB2 y eCB y que tiene un efecto vasodilatador dependiente de la concentración en aorta de rata (García-Camargo, 2018).

Recientemente, nuestro grupo de investigación también demostró que el efecto vasodilatador producido por el BCP involucra la activación de las vías del NO/cGMP y del H₂S/K_{ATP}, ya que la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS), productora de NO y de la cistationina γ -liasa (CSE), que produce H₂S induce una disminución del efecto vasodilatador de este compuesto (García-Camargo, 2018). En estudios previos, ya se había descrito que estos neurotransmisores gaseosos son capaces de producir la relajación de los vasos sanguíneos (Natarajan y Winner, 2023). Se ha demostrado previamente que la activación de la CSE tiene un efecto vasodilatador y que puede ser activada por productos naturales; por ejemplo, se encontró que la norswertianolina, una molécula pequeña natural, actúa como ligando de la CSE y provoca un aumento en la producción de H₂S, dando como resultado final la disminución de la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas (Niu *et al.*, 2021). Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo también encontró que las enzimas NOS y CSE están involucradas en el efecto vasodilatador de otro producto de origen natural, la afinina (Castro-Ruiz *et al.*, 2019). Con el fin de confirmar la participación de estos transmisores gaseosos en el efecto vasodilatador producido por el BCP, se determinaron los niveles de estos gases en aortas incubadas con este metabolito. Los resultados de estos experimentos indicaron que el BCP es capaz de producir un aumento en la concentración de NO y H₂S, y que, por lo tanto, su efecto relajante de la musculatura lisa arterial involucra la activación de las vías del NO/cGMP y del H₂S/K_{ATP}.

En estudios anteriores, se ha demostrado que los endocannabinoides como la AEA y el 2-AG activan no solo a los receptores cannabinoides (Sierra *et al.*, 2018), si no que también

son capaces de activar canales TRP, incluyendo al TRPA1 (Lipina y Hunda, 2017; Muller *et al.*, 2019). Se ha encontrado, por ejemplo, que el endocannabinoide AEA es capaz de producir un aumento en la producción de NO a través de la activación de canales TRPV1 (Cella *et al.*, 2008), también el cannabinoide sintético WIN 55,212-2, que es un agonista del receptor CB2, produce un aumento en la producción de NO (González *et al.*, 2011) y, más recientemente, López-Canales *et al.* (2022) encontraron que otro cannabinoide sintético, el PHAR-DBH-Me, que actúa como agonista del receptor CB2, también debe su efecto vasodilatador a la producción de NO.

En este contexto, se demostró que el NO y el H₂S reaccionan entre sí, generando la forma reducida del NO, nitroxilo (HNO), el cual, a su vez, induce la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), ya que activa al canal TRPA1. Entonces, el CGRP activa a su receptor en el músculo liso, produciendo la relajación del vaso sanguíneo (Beltowski y Jamaroz-Wisniewska, 2014). Debido a que nuestros resultados indicaban que el BCP incrementaba los niveles de NO y H₂S, era posible que reaccionaran entre sí para producir HNO, generando la relajación del músculo liso arterial. Por esta razón, se determinó el efecto vasodilatador del BCP en presencia de un capturador de HNO, la L-cisteína. Los resultados de estos experimentos indicaron que el efecto vasodilatador de este compuesto involucra la producción de HNO, ya que su captura reduce el efecto vasodilatador del BCP. Con el fin de determinar si el HNO producido por el BCP activaba al canal TRPA1, induciendo la liberación del CGRP y, por tanto, la relajación del vaso sanguíneo, en este trabajo, se determinó el efecto vasodilatador del BCP en presencia de HC-030031, un inhibidor de los canales TRPA1 o de GCRP₈₋₃₇, un inhibidor del receptor a CGRP. Los resultados de estos experimentos indicaron que el efecto del BCP involucra la activación de la vía del HNO-TRAP1-CGRP, ya que al capturar al nitroxilo o inhibir al canal TRPA1 o al receptor a CGRP, se reduce significativamente el efecto vasodilatador del BCP.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el efecto vasodilatador del BCP involucra la activación de la vía de señalización HNO-TRPA1-CGRP. Como ya se mencionó el BCP es capaz de incrementar los niveles de NO y H₂S, generando HNO, el cual puede activar al canal TRPA1. Sin embargo, es posible que el BCP active directamente a este canal. Por este motivo, se realizó un estudio de acoplamiento y dinámica molecular entre el BCP y el canal TRPA1, para saber si efectivamente este compuesto interacciona directamente con este canal. Los estudios de acoplamiento molecular sugirieron la existencia de dos posibles sitios de unión de BCP en el canal

TRPA1, de los cuales el sitio con mayor estabilidad y mejor candidato fue el sitio LE. En este sitio podemos encontrar algunos residuos de especial interés: el triptófano 711 (TRP711), el ácido glutámico 854 (GLU854) y la glutamina 979 (GLN979); estos aminoácidos también fueron identificados como sitio de unión para el catión Zn^{2+} y una mutación genética en esta zona provocaba una disminución en la respuesta del canal al catión, por lo que se consideran cruciales para la activación del canal (Matsubara *et al.*, 2024). De manera adicional, el residuo TRP711 también se consideró como importante para la activación del canal por la afinina en un estudio de acoplamiento molecular realizado por nuestro equipo de trabajo (Valencia-Guzmán *et al.*, 2021).

Es importante mencionar que, a pesar de que el BCP no se logró estabilizar en el sitio de unión BC en el tiempo de simulación, podemos encontrar también en este sitio residuos importantes relacionados con la activación del canal, a través de uniones covalentes a cisteínas cercanas, como la treonina 684 (THR684), la cual es esencial para la activación del canal mediante la unión covalente del activador selectivo JT010 a la cisteína 621 (CYS621) (Matsubara *et al.*, 2022). Por otra parte, la THR684 y la tirosina 680 (TYR680) fueron encontrados como parte fundamental para la activación del canal por parte de los compuestos 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) y 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB), dos moléculas sensibilizadoras de la piel que son activadoras selectivas del canal TRPA1 (Wu *et al.*, 2022). Debido a que la técnica de acoplamiento molecular empleada no es capaz de predecir la formación de enlaces covalentes entre el ligando y la proteína, así como la naturaleza electrofílica del BCP, no se puede descartar la importancia del sitio de unión BC para el enlace de este sesquiterpeno, ya que este sitio coincide con el sitio de unión de activadores electrofílicos reportados.

A pesar de que los métodos computacionales proveen una ruta para el conocimiento y mejor entendimiento de sistemas e interacciones complejos, es importante tener en mente que existe un cierto grado de incertidumbre inherente en estos resultados (Wan *et al.*, 2021), es por esto por lo que es importante ahondar más en los resultados obtenidos en este trabajo.

10. CONCLUSIONES

- El beta-cariofileno induce un aumento en la concentración de NO en homogenados de aorta de rata.
- El beta-cariofileno produce un incremento en los niveles de H₂S en homogenados de aorta de rata.
- El efecto vasodilatador producido por el beta-cariofileno involucra la participación de la vía del HNO-TRPA1-CGRP.
- El beta-cariofileno se une con elevada afinidad al canal TRPA1 y, por lo tanto, es posible que su efecto vasodilatador involucre también la activación directa de este canal.
- El beta-cariofileno representa un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión arterial.

11. REFERENCIAS

- Ajebli, M., y Eddouks, M. (2020). Phytotherapy of hypertension: An updated overview. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 20(6), 812-839.
- Alfulaj, N., Meiners, F., Michalek, J., Small-Howard, A. L., Turner, H. C., y Stokes, A. J. (2018). Cannabinoids, the heart of the matter. *Journal of the American Heart Association*, 7(14), e009099.
- Al-Magableh, M., y Hart, J. (2011). Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(4), 403-413.
- Al Disi, S., Anwar, M., y Eid, A. (2016). Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: part I. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 323.
- Alomar, M., y Strauch, C. (2010). A prospective evaluation of antihypertensive medications safety and efficacy in UNited Arab Emirates private hospitals. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(2), 89-94.
- Alvarado, M., Thakore, P., y Earley, S. (2021). Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1: A Unique Regulator of Vascular Function. *Cells*, 10(5), 1167.
- An, J., Derington, C., Luong, T., Olson, K., King, J., Bress, A., y Jackevicius, C. (2020). Fixed-Dose Combination Medications for Treating Hypertension: A review of effectiveness, Safety and Challenges. *Current Hypertension Reports*, 22(11), 1-19.
- Ashraf, K., Sultan, S., y Adam, A. (2018). *Orthosiphon stamineus* Benth. is an Outstanding Food Medicine: Review of Phytochemical and Pharmacological Activities. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 10(3), 109–118.
- Argunhan, F., Thapa, D., Aubdool, A., Carlini, E., Arkless, K., Hendrikse, E., ... y Brain, S. (2021). Calcitonin Gene-Related Peptide Protects Against Cardiovascular Dysfunction Independently of Nitric Oxide *In Vivo*. *Hypertension*, 77(4), 1178-1190.
- Azizi, M., Rossignol, P., y Hulot, J. (2019). Emerging drug classes and their potential use in hypertension. *Hypertension*, 74(5), 1075-1083.
- Bacakova, L., Travnickova, M., Filova, E., Matějka, R., Stepanovska, J., Musilkova, J., ... y Molitor, M. (2018). The role of vascular smooth muscle cells in the physiology and pathophysiology of blood vessels. *Muscle Cell and Tissue: Current Status of Research Field*, 229.
- Ballón-Paucara, W., y Grados-Torrez, R. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55-72.

- Beltowski, J., y Jamaroz-Wisniewska, A. (2014). Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules*, 19(12), 21183-21199.
- Bhatt, L., Selokar, I., Raut, D., y Hussain, T. (2021). Novel Targets for Hypertension Drug Discovery. *Current Hypertension Reports*, 23(4), 1-14.
- Bowry, A., Lewey, J., Dugani, S., y Choudhry, N. (2015). The burden of cardiovascular disease in low-and middle-income countries: epidemiology and management. *Canadian Journal of Cardiology*, 31(9), 1151-1159.
- Cahill, P., y Redmond, E. (2016). Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248, 97-109.
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., y Barquera, S. (2018). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia diagnóstico y tipo de tratamiento. Ensanut MC 2016. *Salud Pública de México*, 60, 233-243.
- Cao, X., Ding, L., Xie, Z., Yang, Y., Whiteman, M., Moore, P., y Bian, J. (2019). A review of hydrogen sulfide synthesis, metabolism, and measurement: is modulation of hydrogen sulfide a novel therapeutic for cancer?. *Antioxidants and Redox Signaling*, 31(1), 1-38.
- Castro-Ruiz, J. (2019). Estudio del efecto vasodilatador de la afinina purificada a partir de *Heliopsis longipes*, y determinación de su mecanismo de acción [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Cavasotto, C., Aucar, M., y Adler, N. (2019). Computational chemistry in drug lead discovery and design. *International Journal of Quantum Chemistry*, 119(2), e25678.
- Cella, M., Leguizamón, G. F., Sordelli, M. S., Cervini, M., Guadagnoli, T., Ribeiro, M. L., ... y Farina, M. G. (2008). Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. *Placenta*, 29(8), 699-707.
- Cervantes-Dávila, C. A. (2019). Tendencia e impacto de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en México, 1990-2015. *Revista Cubana de Salud Pública*, 45(4), 1-18.
- Chikhale, R., Gupta, V., Eldesoky, G., Wabaidur, S., Patil, S., y Islam, M. (2021). Identification of potential anti-TMPRSS2 natural products through homology modelling, virtual screening and molecular dynamics simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), 6660-6675
- Csonka, C., Páli, T., Bencsik, P., Görbe, A., Ferdinandy, P., y Csont, T. (2015). Measurement of NO in biological samples. *British Journal of Pharmacology*, 172(6), 1620-1632.
- Dziemitko, S., Harasim-Symbor, E., y Chabowski, A. (2023). How do phytocannabinoids affect cardiovascular health? An update on the most common cardiovascular diseases. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 14, 20406223221143239.

- Earley, S., y Brayden, J. (2015). Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiological Reviews*, 95(2), 645-690.
- Echavarría-Ponce, R. (2021). Estudio computacional de la interacción de tetrahidrocannabivarina (THCV) con blancos moleculares involucrados en obesidad: receptores a adiponectina y neuropéptido Y [Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo]. Universidad Autónoma de Querétaro.
- García-Camargo, M. (2018). Participación de transmisores gaseosos y receptores a cannabinoides en el efecto vasodilatador producido por el β -cariofileno [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gonçalves, E. C., Baldasso, G., Bicca, M., Paes, R., Capasso, R., y Dutra, R. (2020). Terpenoids, cannabimimetic ligands, beyond the cannabis plant. *Molecules*, 25(7), 1567.
- González, C., Herradón, E., Abalo, R., Vera, G., Pérez-Nievas, B. G., Leza, J. C., ... & López-Miranda, V. (2011). Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia–reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 27(4), 331-340
- Greaney, J., Kutz, J., Shank, S., Jandu, S., Santhanam, L., y Alexander, L. (2017). Impaired Hydrogen Sulfide–Mediated Vasodilation Contributes to Microvascular Endothelial Dysfunction in Hypertensive Adults. *Hypertension*, 69(5), 902-909.
- Ibrahim, M., y Damasceno, A. (2012). Hypertension in developing countries. *The Lancet*, 380(9841), 611-619.
- Joshi, S., y Deshmukh, S. (2021). A review of advancements in coarse-grained molecular dynamics simulations. *Molecular Simulation*, 47(10-11), 786-803.
- Kearney, P., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P., y He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*, 365(9455), 217-223.
- Kee, Z., Kodji, X., y Brain, S. (2018). The role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in neurogenic vasodilation and its cardioprotective effects. *Frontiers in Physiology*, 9, 1249.
- Knox, M., Vinet, R., Fuentes, L., Morales, B., y Martínez, J. (2019). A review of endothelium-dependent and-independent vasodilation induced by phytochemicals in isolated rat aorta. *Animals*, 9(9), 623.
- Krzyżewska, A., Baranowska-Kuczko, M., Mińczuk, K., y Kozłowska, H. (2021). Cannabinoids—A New Perspective in Adjuvant Therapy for Pulmonary Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10048.

- Kumar, A., Premoli, M., Aria, F., Bonini, S., Maccarinelli, G., Gianoncelli, A., ... y Mastinu, A. (2019a). Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators?. *Planta*, 249(6), 1681-1694.
- Kumar, A., Potts, J., y DiPette, D. (2019b). Protective role of α -calcitonin gene-related peptide in cardiovascular diseases. *Frontiers in Physiology*, 10, 821.
- Lazim, R., Suh, D., y Choi, S. (2020). Advances in molecular dynamics simulations and enhanced sampling methods for the study of protein systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6339.
- Leach, J., Mofrad, M., y Saloner, D. (2010). Computational models of vascular mechanics. *Computational Modeling in Biomechanics* (págs. 99-170).
- Liang, Y., Khoshouei, M., Deganutti, G., Glukhova, A., Koole, C., Peat, T., ... y Sexton, P. (2018). Cryo-EM structure of the active, G s-protein complexed, human CGRP receptor. *Nature*, 561(7724), 492-497.
- Lipina, C. y Hunda H. (2017). The endocannabinoid system: 'NO' longer anonymous in the control of nitrenergic signalling?, *Journal of Molecular Cell Biology*, 9 (2), 91–103
- López-Canales, O. A., Pavón, N., Ubaldo-Reyes, L. M., Juárez-Oropeza, M. A., Torres-Durán, P. V., Regla, I., y Paredes-Carbajal, M. C. (2022). Characterization of hypotensive and vasorelaxant effects of PHAR-DBH-Me a new cannabinoid receptor agonist. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 26(2), 77
- Martín-Giménez, V., Noriega, S., Kassuha, D., Fuentes, L., y Manucha, W. (2018). Anandamide and endocannabinoid system: an attractive therapeutic approach for cardiovascular disease. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 12(7), 177-190.
- Matsubara, M., Muraki, Y., Hatano, N., Suzuki, H., y Muraki, K. (2022). Potent activation of human but not mouse TRPA1 by JT010. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14297.
- Matsubara, M., Muraki, Y., Suzuki, H., Hatano, N., y Muraki, K. (2024). Critical Amino Acid Residues Regulating TRPA1 Zn²⁺ Response: A Comparative Study Across Species. *Journal of Biological Chemistry*, 107302.
- Meents, J., Ciotu, C., y Fischer, M. (2019). TRPA1: a molecular view. *Journal of Neurophysiology*, 121(2), 427-443.
- Mills, K., Stefanescu, A., y He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nature Review Nephrology*, 14(4), 223-237.
- Montero, M., y Juan, F. (2017). Estudio longitudinal de los comportamientos y el nivel de actividad físico-deportiva en el tiempo libre en estudiantes de Costa Rica, México y

- España. *Retos: Nuevas Tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación*, (31), 219-226.
- Muller, C., Morales, P., y Reggio, P. (2019). Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 487.
- Natarajan, A., y Winner, J. (2023). Gasotransmitters: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 12(4), 607.
- Niu, Y., Du, C., Cui, C., Zhang, H., Deng, Y., Cai, J., ... y Geng, B. (2021). Norswertianolin Promotes Cystathionine γ -Lyase Activity and Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury and Hypertension. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 677212.
- Oparil, S., Acelajado, M., Bakris, G., Berlowitz, D., Cífková, R., Dominiczak, A., . . . Whelton, P. K. (2018). Hypertension. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, 18014.
- Puhl, S. (2020). Cannabinoid-sensitive receptors in cardiac physiology and ischaemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(3), 118462.
- Richter, J., Quenardelle, V., Rouyer, O., Raul, J., Beaujeux, R., Gény, B., y Wolff, V. (2018). A systematic review of the complex effects of cannabinoids on cerebral and peripheral circulation in animal models. *Frontiers in Physiology*, 9, 622.
- Roth, G., Abate, D., Abate, K., Abay, S., Abbafati, C., Abbasi, N., y Borschmann, R. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1736-1788.
- Santos, K., Sant'anna, L., Bressa, P., Tietbohl, L., Lima, B., y Fernandes, C. (2014). Cardiovascular effects of the essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Natural Products*, 2014(7), 177-183.
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., . . . Rivera-Dommarco, J. (2020). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Naturales*. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shen, X., Kolluru, G., Yuan, S., y Kevil, C. (2015). Measurement of H₂S in vivo and in vitro by the monobromobimane method. *Methods in Enzymology*, 554, 31-45.
- Sierra, S., Luquin, N., y Navarro-Otano, J. (2018). The endocannabinoid system in cardiovascular function: novel insights and clinical implications. *Clinical Autonomic Research*, 28(1), 35-52.
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johnner, N., y Schwede, T. (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Computational Biology*, 17(1), e1008667.

- Sweeney, H., y Hammers, D. (2018). Muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), a023200.
- Torres, P., Sodero, A., Jofily, P., y Silva-Jr, F. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4574.
- Triantafyllidi, H., y Benas, D. (2021). Endothelium: The trivial Fence Became a Powerful Gatekeeper of vascular Health. *Angiology*, 72(7), 601-603.
- Tucker, W., Arora, Y., y Mahajan, K. (2017). Anatomy, blood vessels. Stat Pearls Publishing. Obtenido de: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk470401>
- Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N., Poulter, N., Prabhakaran, D., y Schutte, A. (2020). 2020 International Society of Hypertension: global hypertension practice guidelines. *Hypertension*, 75(6), 1334-1357.
- Valencia-Guzmán, C. J., Castro-Ruiz, J. E., García-Gasca, T., Rojas-Molina, A., Romo-Mancillas, A., Luna-Vázquez, F. J., ... e Ibarra-Alvarado, C. (2021). Endothelial TRP channels and cannabinoid receptors are involved in affinin-induced vasodilation. *Fitoterapia*, 153, 104985.
- Wan, S., Sinclair, R. C., y Coveney, P. V. (2021). Uncertainty quantification in classical molecular dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 379(2197), 20200082.
- Wang, Z., Ye, D., Ye, J., Wang, M., Liu, J., Jiang, H., ... y Wan, J. (2019). The TRPA1 channel in the cardiovascular system: promising features and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1253.
- Wen, Y., Wang, H., y Zhu, Y. (2018). The drug developments of hydrogen sulfide on cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- World Health Organization. (21 de junio de 2021). *Cardiovascular Diseases (CVDs)*. Recuperado el 04 de septiembre de 2021, de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- World Health Organization. (Agosto de 2021). *Hypertension*. Recuperado el 07 de septiembre de 2021, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
- Wu, D., Hu, Q., y Zhu, D. (2018). An update on hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in the cardiovascular system. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Wu, H., Niu, C., Qu, Y., Sun, X., y Wang, K. (2022). Selective activation of TRPA1 ion channels by nitrobenzene skin sensitizers DNFB and DNCB. *Journal of Biological Chemistry*, 298(2).

Younis, N., y Mohamed, M. (2019). β -Caryophyllene as a Potential Protective Agent Against Myocardial Injury: The Role of Toll-Like Receptors. *Molecules*, 4 (10), 1929.