



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

BÚSQUEDA *IN SILICO* Y POR SÍNTESIS ORGÁNICA DE
MOLÉCULAS VASODILATADORAS QUE ACTIVAN LAS VÍAS DEL
NO/GMP_c Y H₂S/K_{ATP}

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. DANIELLA MEDINA RUIZ

DIRECCIÓN

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Abril, 2019



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



BÚSQUEDA IN SILICO Y POR SÍNTESIS ORGÁNICA
DE MOLÉCULAS VASODILATADORAS QUE ACTIVAN
LAS VÍAS DEL NO/GMPc Y H₂S/KATP

por

Daniella Medina Ruíz

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQDCN-247333



“BÚSQUEDA *IN SILICO* Y POR SÍNTESIS ORGÁNICA DE MOLÉCULAS
VASODILATADORAS QUE ACTIVAN LAS VÍAS DEL NO/GMPc Y H₂S/K_{ATP}”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

M. en C. DANIELLA MEDINA RUIZ

Dirigido por:

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODALES

Dr. César Ibarra Alvarado

Presidente

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Secretario

Dra. Alejandra Rojas Molina

Vocal

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Firma

Firma

Alejandra Rojas M.

Firma

Firma

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

*No me importa tu profesión,
ni tu manera de vestir,
ni tu concepto de moda,
ni tu estatus social o económico,
ni tus posibilidades financieras,
ni tus pertenencias.*

*Me impresiona cómo piensas,
tus convicciones y tus valores,
me impresiona cuan **límpio** es tu corazón,
tu trato hacia los demás,
tu **humildad** como persona y
como alimentas tu **espíritu** y tu **intelecto**.*

Autor desconocido

*Dedicado al amor de la Familia Medina-Ruiz-
Vázquez-Torres-Jaime*

Agradecimientos

Agradezco de corazón a todos los que compartieron el espacio y tiempo que este trabajo abarcó, por su compañía, por su ayuda y enseñanzas.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Químico Biológicas y al Laboratorio de Productos Naturales, por permitirme desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado (número de becario 100062), y por los recursos otorgados al proyecto FOFI-UAQ número FCQ-2016-09 asignado al Dr. César Ibarra Alvarado.

A la Dra. Alejandra y al Dr. César, porque sin garantía alguna, confiaron en mí, dándome la oportunidad de cambiar mi vida y regalándome en el trayecto su ejemplo, conocimientos y experiencias.

Al Dr. Antonio, porque aún sin ser mi director de tesis, me trató como si lo fuera y puso su mayor esfuerzo para obtener los mejores resultados.

Al Dr. Moustapha, por ser uno de mis modelos a seguir como investigador y como persona.

A la Dra. Juanita, porque no sólo fue mi maestra y tutora, también fue una entusiasta de este proyecto.

Al Dr. Alejandro, por compartirme su técnica de disección, su espátula consentida y sus reactivos y materiales... por el café y la plática.

A la Lic. Claudia Cook, porque sin su generoso apoyo no habría sido posible llegar a la culminación de este trabajo. Eres una persona y profesional increíble Claudia, gracias por dar tanto de ti a todos los que te pedimos ayuda.

A Carmelita Campos, que con la amabilidad que la caracteriza, me llevó de la mano en todos los trámites administrativos.

A Berenice Erreguin, cuyo trabajo y vehemencia, con y por la isoxsuprina, fueron parte integral de este trabajo.

Al Dr. Francisco Luna, a la Dra. Rosalina Hernández, a la Dra. Leticia García y a la M. en C. Alma Vuelvas les agradezco su tiempo, atención y consejo. Mi respeto, admiración y cariño para ustedes.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Ale, Andy, Aransa, Christian, Chuy, César, Diana, Edgardo, Edna, Eli, Eloy, Enrique, Esteban, Fer, Giovanni, Héctor, Iván, Ivonne, Jessy, Lalo, Lu, Luis Fernando, Luis Rodríguez, Mariana, Michelle, Monse, Normis, Peyo, Raquel, Ray, Rodri, Ronni y Vic. Por sus risas y sonrisas, por su mal genio, por su compañerismo y empatía, por las ocurrencias, por escucharme, por reírse de mis chistes “Fossianos” y mis dichos mal dichos, por sus historias y ejemplo de tenacidad.

A Martín y José Luis de intendencia, quienes siempre estuvieron dispuestos a apoyarme y hasta cuidarme, cuando tenía que quedarme tarde en el laboratorio.

A mi tía Mayté, que me brindó un techo y todo su amor.

A las hermanas Ruiz Corona y familias y a la familia Vazquez Torrero, a Martha González y familia, a Gabriela Pérez, a Lorena García, Erika Bobadilla, Nancy Lemarroy, Hortensia Silva y Francisco Rodríguez. Su cariño, atenciones y presencia aún en la distancia, me acompañaron y me dieron fortaleza.

Al Lic. Roberto O. Maqueda Barrios y a la Lic. Hilda I. Ramos Espinosa por darme trabajo remunerado, porque así me fue posible terminar este proyecto.

A Amelia y Carolina, gracias por su compañía, por su amistad y lealtad, son grandes maestras de vida y estoy y estaré para ustedes siempre.

A mi gurú queretana, mi guía en lo académico, lo personal y lo transcendental. Irasema, sé que hubiera terminado este reto sin tu ayuda, pero hubiera sido infinitamente menos cálido, divertido e interesante.

A la mujer más importante: a ti Mamá Pavita, gracias por absolutamente TODO.

A los hombres más importantes: Papito Alfredo, Betito, Fidi y Andy, gracias.

A la Vida...

ÍNDICE GENERAL		Pág.
	ÍNDICE GENERAL	i
	ÍNDICE DE FIGURAS	iii
	ÍNDICE DE TABLAS	v
	RESUMEN	vi
	ABSTRACT	vii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1	Enfermedades cardiovasculares	3
2.2	Vasos sanguíneos	4
2.3	Endotelio vascular	4
2.4	Vía del NO/GMPc	5
2.4.1	Generación de NO	5
2.4.2	Regulación de la producción endotelial de NO	7
2.4.3	Mecanismos bioquímicos involucrados en la vasodilatación producida por NO	8
2.5	Vía del H ₂ S/K _{ATP}	10
2.5.1	Generación de H ₂ S	10
2.5.2	Regulación de la producción de H ₂ S	12
2.5.3	Mecanismos bioquímicos involucrados en la vasodilatación producida por H ₂ S	13
2.6	Colaboración del NO y el H ₂ S en el efecto vasodilatador	14
2.7	Fármacos utilizados para tratar la hipertensión	16
2.8	Productos naturales con efecto vasodilatador	21
2.9	Compuestos con actividad vasodilatadora de <i>Prunus serotina</i> y sus mecanismos de acción	22
2.10	Compuestos triterpénicos con actividad vasodilatadora que regulan la actividad de la eNOS y la CSE	26
2.11	Estudios <i>in silico</i>	28
2.11.1	Acoplamiento molecular	29
2.11.2	Dinámica molecular	30
2.12	Estudios <i>in silico</i> del ácido ursólico y la eNOS y la CSE	31
2.13	Moléculas liberadoras de NO y H ₂ S	33
2.13.1	Moléculas híbridas liberadoras de NO y H ₂ S	35
3.	JUSTIFICACIÓN	41
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	43
5.	HIPÓTESIS	43
6.	OBJETIVO GENERAL	44
7.	OBJETIVOS PARTICULARES	44

8.	METODOLOGÍA	46
8.1	Identificación, mediante el método de acoplamiento molecular, de compuestos con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE	46
8.2	Modelo General de Interacción proteína-ligando con base en los elementos farmacofóricos virtuales identificados	49
8.3	Ensayos de dinámica molecular de los compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE	49
8.4	Determinación del efecto vasodilatador	50
8.5	Cuantificación de los niveles de H ₂ S	53
8.6	Análisis estadístico	53
8.7	Síntesis e identificación de moléculas híbridas de ácido ursólico	54
9.	RESULTADOS	57
9.1	Identificación de compuestos que se unen con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE	57
9.2	Modelo general de interacción proteína-ligando con base en los elementos farmacofóricos virtuales identificados	58
9.3	Determinación del efecto vasodilatador de los compuestos consenso y la participación de las vías del NO/GMP _c y H ₂ S/K _{ATP} en sus mecanismos de acción	61
9.4	Ensayos de dinámica molecular de los compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE	65
9.5	Incremento en los niveles de H ₂ S inducidos por isoxsuprina	68
9.6	Participación de la activación de adrenoreceptores β ₂ y bloqueo de adrenoreceptores α ₁ en la vasodilatación inducida por isoxsuprina	68
9.7	Síntesis e identificación de moléculas híbridas de ácido ursólico	70
10.	DISCUSIÓN	73
11.	CONCLUSIONES	81
12.	BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figuras		
1	Esquema de la eNOS	6
2	Mecanismo de vasodilatación mediado por NO y H ₂ S	9
3	Esquema de la CSE	11
4	Colaboración entre NO y H ₂ S	15
5	Activación de la vía del NO/GMPc por nebivolol.	20
6	Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador de la acetilcolina, el hiperósido, la prunina y el ácido ursólico en segmentos de aorta intactos de rata	23
7	Estructura del ácido ursólico	24
8	Curva concentración respuesta del ácido ursólico en ausencia y en presencia de endotelio	25
9	Curvas concentración respuesta del ácido ursólico en presencia de los inhibidores PPG (1 mM), L-NAME (1 µM) y PPG + L-NAME	26
10	Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador producido por triterpenos	27
11	Participación de los transmisores gaseosos en el efecto vasodilatador producido por los triterpenos ácido ursólico y uvaol	28
12	Forma de unión del ácido ursólico a la eNOS	32
13	Forma de unión del ácido ursólico a la CSE	32
14	Estructuras de agentes liberadores de NO que mimetizan su acción biológica	33
15	Polisulfuros de dialilo derivados del ajo liberadores de H ₂ S	34
16	Estructuras de agentes liberadores de H ₂ S utilizadas en investigación básica	35
17	Estructuras de agentes liberadores de H ₂ S y sus fármacos parentales reportados en la literatura como candidatos a fármacos en desarrollo	37
18	Estructuras químicas de compuestos denominados NOSH	39
19	Estructura química general de los conjugados de triterpenoides con azidotimidina	40
20	Identificación mediante el método de acoplamiento molecular (HTVS)	48
21	Síntesis de un compuesto derivado de ácido ursólico liberador de H ₂ S (DMR-S1).	54
22	Síntesis de un compuesto derivado de ácido ursólico liberador de NO (DMR-N1).	55

23	Modelo de elementos farmacofóricos con (A) eNOS (estructura 3NOS) and (B) CSE (estructura 3COG)	59
24	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos consenso y los controles positivos usados (SNP, ACh y NaHS).	61
25	Estructuras químicas de los compuestos consenso más potentes.	63
26	Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador de isoxsuprina, carvedilol, y nebivolol en ausencia (control) y presencia de inhibidores de eNOS y CSE.	64
27	Energías de interacción lineal (método LIE) obtenidas de la simulación de dinámica molecular con GROMACS de los complejos CSE-isoxsuprina y CSE-fenoterol.	66
28	Interacciones CSE-isoxsuprina durante las simulaciones de dinámica molecular usando GROMACS.	67
29	La producción total de H ₂ S (medido como sulfuros) inducida por isoxsuprina en homogenados de aorta de rata en la ausencia o presencia de PAG	68
30	A) Efecto vasodilatador de isoxsuprina en presencia de propranolol (1 μM), un antagonista de receptoresβ. B) Efecto vasoconstrictor de fenilefrina en la ausencia (control) o presencia de isoxsuprina (1 μM) o prazosina (0.12 μM), usado como control positivo.	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas		Pág.
1	Factores vasoactivos derivados del endotelio	5
2	Fármacos para tratar la hipertensión utilizados en los servicios de salud pública en México	17
3	Puntajes de afinidad (docking scores) por programa computacional y percentil consenso de los compuestos seleccionados	58
4	Valores de EC ₅₀ de los “compuesto consenso” y controles positivos	62
5	Valores de EC ₅₀ de los “compuestos consenso” y la participación de las vías de señalización del NO/GMPc y el H ₂ S/K _{ATP} en su efecto vasodilatador	63
6	Datos de la espectroscopía NMR (700 MHz para ¹ H, 100 MHz para ¹³ C) del compuesto DMR-S1 en cloroformo deuterada a 298 K, obtenidos del programa MestReNova	70
7	Datos de la espectroscopía NMR (500 MHz para ¹ H, 126 MHz para ¹³ C) del compuesto DMR-N1 en acetona deuterada a 298 K, obtenidos del programa MestReNova	72

RESUMEN

Recientemente, se demostró que el uvaol y el ácido ursólico incrementan la producción de NO y H₂S en tejido de aorta y que ambos compuestos se unen con alta afinidad a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y a la cistationina gamma liasa (CSE). Con base en estos antecedentes, se planteó la presente tesis que tiene como objetivos: 1. Realizar una búsqueda virtual de alto rendimiento (high-throughput virtual screening, HTVS) de compuestos que se unan con alta afinidad a los sitios alostéricos de unión a triterpenos en la eNOS y la CSE, utilizando una base de datos de 107,373 compuestos, obtenida de cuatro bibliotecas virtuales, evaluar su efecto vasodilatador y determinar su mecanismo de acción, mediante el ensayo de aorta aislada de rata y 2. Sintetizar a) una molécula híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H₂S que incremente el efecto vasodilatador de este triterpeno y b) una molécula liberadora de NO, que podría formar un híbrido con el ácido ursólico. De los nueve compuestos que se seleccionaron por su elevada afinidad por ambas enzimas, la isoxsuprina resultó ser el vasodilatador más potente ($EC_{50} = 0.046 \pm 0.004 \mu\text{M}$). La vasodilatación producida por este compuesto involucra la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, así como el bloqueo de los adrenoreceptores α_1 y de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. De manera adicional, la isoxsuprina incrementó al doble los niveles de H₂S en homogenados de aorta, sugiriendo que este compuesto activa directamente a la enzima CSE, lo cual confirma nuestros resultados *in silico*. Por otra parte, se sintetizó una molécula híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H₂S (DMR-S1) y una subestructura liberadora de NO (DMR-N1). Se espera que los derivados de ácido ursólico liberadores de NO o H₂S potencien el efecto vasodilatador de este triterpeno. Este estudio proporciona evidencia que permite proponer a los compuestos vasodilatadores que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE, como la isoxsuprina, así como a los compuestos híbridos liberadores de NO o H₂S como prototipos estructurales potencialmente útiles en el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares.

ABSTRACT

Recently, it was shown that uvaol and ursolic acid increase the production of NO and H₂S in aortic tissue and both compounds bind with high affinity to endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and to cystathionine gamma lyase (CSE). Based on this precedent, the objectives of this thesis were raised as follows: 1. To perform a high-throughput virtual screening (HTVS) for compounds that bind with high affinity to allosteric binding sites to triterpenes in the eNOS and the CSE, using a database of 107,373 compounds obtained from four virtual libraries, evaluate its vasodilator effect and determine its mechanism of action, by means of the isolated rat aortic assay and 2. To synthesize one hybrid molecule of ursolic acid with H₂S releasing substructure, in order to increase the vasodilating effect of this triterpene. Of the nine compounds that were selected because of their high affinity for both enzymes, isoxsuprine was the most potent vasodilator ($EC_{50} = 0.046 \pm 0.004 \mu\text{M}$). The vasodilation produced by this compound involves the activation of the NO/GMPc and H₂S/KATP pathways, as well as the blockade of the α 1 adrenoceptors and L-type voltage-dependent calcium channels. Additionally, isoxsuprine increased twice the H₂S levels in aorta homogenates, suggesting that this compound directly activates the CSE enzyme, validating our results *in silico*. On the other hand, a hybrid molecule of ursolic acid and a H₂S-releasing substructure (DMR-S1), and one NO-releasing molecule (DMR-N1) were synthesized. We expect the NO or H₂S releasing ursolic acid derivatives will enhance the vasodilating effect of this triterpene. This study provides evidence that allows proposing vasodilator compounds that bind with high affinity to enzymes eNOS and CSE, such as isoxsuprine, and also hybrid compounds that release NO or H₂S, as potentially useful structural prototypes in the development of alternative drugs for the treatment of various cardiovascular pathologies.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento en la presión arterial constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV), las cuales representan la principal causa de muerte a nivel mundial [1,2]. Comúnmente, el tratamiento de la hipertensión requiere el empleo de varios fármacos antihipertensivos, muchos de los cuales tienen poca efectividad y causan severos efectos adversos [2–5].

La hipertensión se ha asociado con la disfunción endotelial, la cual se caracteriza por una interrupción en la síntesis y/o liberación de factores relajantes derivados del endotelio [6–10], tales como los gasotransmisores NO y H₂S, que tienen un papel fundamental en la regulación de la vasodilatación [11–15]. Por esta razón, se ha incrementado el interés por encontrar fármacos novedosos que sean capaces de liberar NO y H₂S o de inducir su síntesis, o ambas [14,16,17].

En estudios previos, se ha sugerido que algunos productos naturales como los triterpenos (uvaol, ácido ursólico, ácido morólico y betulínico, entre otros) tienen alta afinidad por cavidades encontradas en el sitio de acceso al sustrato de la región catalítica de la eNOS y pueden activar a esta enzima directamente [18,19]. De manera adicional, nuestro grupo de trabajo encontró un sitio de control alostérico en la CSE, al cual se une con alta afinidad el ácido ursólico y el uvaol, usando ensayos *in silico* [18]. Estos hallazgos apoyan la hipótesis que propone que en ambas enzimas existen sitios de unión a triterpenos, los cuales se vislumbran como blancos farmacológicos prometedores en la búsqueda de moléculas líderes novedosas para el desarrollo de fármacos útiles para tratar las ECV. En este contexto, y haciendo uso de la búsqueda virtual de alto rendimiento (HTVS, por sus siglas en inglés) en bibliotecas de compuestos con adecuadas propiedades fisicoquímicas (lead-like), como una estrategia valiosa para la investigación y desarrollo farmacéutico [20–23], el objetivo del presente trabajo fue identificar nuevas moléculas líder que se unan con alta afinidad a los sitios hipotéticos de control alostérico de unión a triterpenos en las enzimas eNOS y CSE, haciendo la búsqueda en bibliotecas de compuestos comerciales, naturales y sintéticos. Adicionalmente, se sintetizó una molécula

híbrida de ácido ursólico y una región liberadora de H₂S (DMR-S1), y la región liberadora de NO de la molécula DMR-N1.

De los nueve compuestos que se seleccionaron por su elevada afinidad por ambas enzimas, la isoxsuprina resultó ser el vasodilatador más potente. La vasodilatación producida por este compuesto involucra la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, así como el bloqueo de los adrenoreceptores α 1 y de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L.

Este estudio proporciona evidencia que permite proponer a los compuestos vasodilatadores que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE, como la isoxsuprina, así como a los compuestos híbridos liberadores de NO o H₂S como prototipos estructurales potencialmente útiles en el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo y, por lo tanto, representan un reto de salud pública. La diabetes, inflamación, hipercolesterolemia, demencia, aterosclerosis e hipertensión son factores que representan un riesgo mayor para el desarrollo de las ECV. La hipertensión en particular es una de las causas que contribuyen en mayor medida a la patogénesis de las ECV y su mortalidad. De hecho, la hipertensión es responsable de la muerte de una de cada ocho personas, sumando aproximadamente 8 millones de muertes por año. Además, la hipertensión afecta aproximadamente un tercio de la población adulta en la mayoría de los países, amenazando a mil millones alrededor del mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que para 2025, aproximadamente 1600 millones de adultos sufrirán de hipertensión y complicaciones asociadas a las ECV [24].

En el país, según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2012, el 31.5% de la población mexicana tiene hipertensión arterial y de éstos, el 47.3% lo desconoce. En otras palabras, de cada 1000 adultos mexicanos, 315 padecen hipertensión y casi la mitad de ellos (148.9) lo desconoce. A medida que se avanza en la edad es más probable que se padezca hipertensión. Según el análisis de la ENSANUT 2012, en los adultos mayores de 60 años, la hipertensión fue 3.4 veces más frecuente que en los adultos de 20 a 29 años. También se encontraron 1.3 veces más adultos hipertensos con obesidad (42.3%) que con peso normal (18.5%) [25].

La disfunción endotelial es uno de los mecanismos patofisiológicos que influyen sobre la elevación de la presión arterial y se caracteriza por un estado de vasodilatación reducida, vasoconstricción aumentada y pérdida de la integridad de la monocapa endotelial del vaso sanguíneo [9].

La disfunción endotelial se induce por muchos factores tales como el estrés oxidativo, la hiperglicemia, la hiperlipidemia, el tabaquismo o la concentración elevada de homocisteína, lo cual conduce al desarrollo de varias ECV [26,27].

2.2 Vasos sanguíneos

Hay tres tipos de vasos sanguíneos: arterias, capilares y venas. Ellos forman un sistema cerrado de conductos que llevan la sangre del corazón a las células de los tejidos y de vuelta al corazón [28].

Las paredes de las arterias y venas se componen de tres capas distintas. 1) La túnica externa, la capa más superficial que está formada por tejido conectivo denso e irregular que contiene colágeno y fibras elásticas. Estas fibras proveen soporte y elasticidad a los vasos sanguíneos. 2) La túnica media, que es la capa más gruesa, consiste en colágeno y células de músculo liso que son responsables de la vasodilatación y vasoconstricción de los vasos sanguíneos. 3) La túnica íntima, la capa más profunda, la cual forma el revestimiento de los vasos sanguíneos y consiste en una capa simple de epitelio llamado endotelio, soportado por capas delgadas de tejido conectivo que contiene fibras elásticas y de colágeno [28,29].

2.3 Endotelio vascular

El endotelio es una capa sencilla de células que cubren la superficie interna de los vasos sanguíneos en el cuerpo humano. Su grosor va desde 1 μm en las grandes arterias y venas a 0.1 μm en los microvasos y su superficie total va de los 300 a los 1000 m^2 y su peso total es aproximadamente de 1.5 kg. El endotelio sano tiene muchas funciones importantes en el sistema vascular que incluyen: vasodilatación, inhibición de la agregación de plaquetas y coagulación, inhibición de la adhesión y migración de leucocitos y supresión de la proliferación de las células de músculo liso [27].

Para ejercer el control sobre el tono vascular, las células endoteliales sintetizan y liberan factores relajantes y constrictores tales como el óxido nítrico, nitroxilo, monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, algunos metabolitos del ácido araquidónico (prostaciclina, tromboxano), varios péptidos (endotelina, urotensina, péptido natriurético tipo C, adrenomedulina), adenosina, purinas, especies reactivas de oxígeno, e incluso enzimas requeridas en la generación de hormonas vasoactivas tales como angiotensina II (Tabla 1). El desbalance en la síntesis o liberación de estos factores endoteliales puede explicar el inicio y desarrollo de las patologías cardiovasculares, de la hipertensión arterial hasta la aterosclerosis [26,27,30–32].

Tabla 1. Factores vasoactivos derivados del endotelio

Factores vasodilatadores	Factores vasoconstrictores
Óxido nítrico (NO)	Tromboxano A ₂
Nitroxilo (HNO)	Endotelina 1
Monóxido de carbono (CO)	Anión superóxido (O ₂ ⁻)
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	
Prostaciclina (PGI ₂)	
Péptido natriurético tipo C (CNP)	

2.4 Vía del NO/GMPc

2.4.1 Generación de NO

En mamíferos, el NO puede ser generado por tres diferentes isoformas de la enzima NO sintasa (NOS). Las isoenzimas son denominadas como NO sintasa neuronal (nNOS o NOS I), inducible (iNOS o NOS II) y endotelial (eNOS o NOS III). Todas las isoformas de NOS utilizan L-arginina como sustrato y oxígeno molecular y fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida reducida (NADPH) como co-sustratos. El dinucleótido de adenina flavina (FAD), el mononucleótido de flavina

(FMN) y la tetrahidro-L-biopterina (BH₄) son cofactores de todas las isoenzimas. Todas las proteínas NOS son homodímeros (Figura 1) [33,34].

La NOS funcional transfiere electrones del NADPH, por medio de las flavinas FAD y FMN desde el extremo carboxiterminal del dominio reductasa, al grupo hemo en el extremo amino terminal del dominio oxigenasa. El dominio oxigenasa también enlaza al cofactor esencial BH₄, a oxígeno molecular y al sustrato L-arginina. En el sitio hemo, los electrones son usados para reducir y activar el O₂ y para oxidar la L-arginina a L-citrulina y NO. Las tres isoformas de la NOS se unen a calmodulina, pero en las isoformas eNOS y nNOS esta unión se lleva a cabo cuando el calcio (Ca²⁺) intracelular aumenta, a diferencia de la iNOS, que se une a calmodulina aún a bajas concentraciones de Ca²⁺.

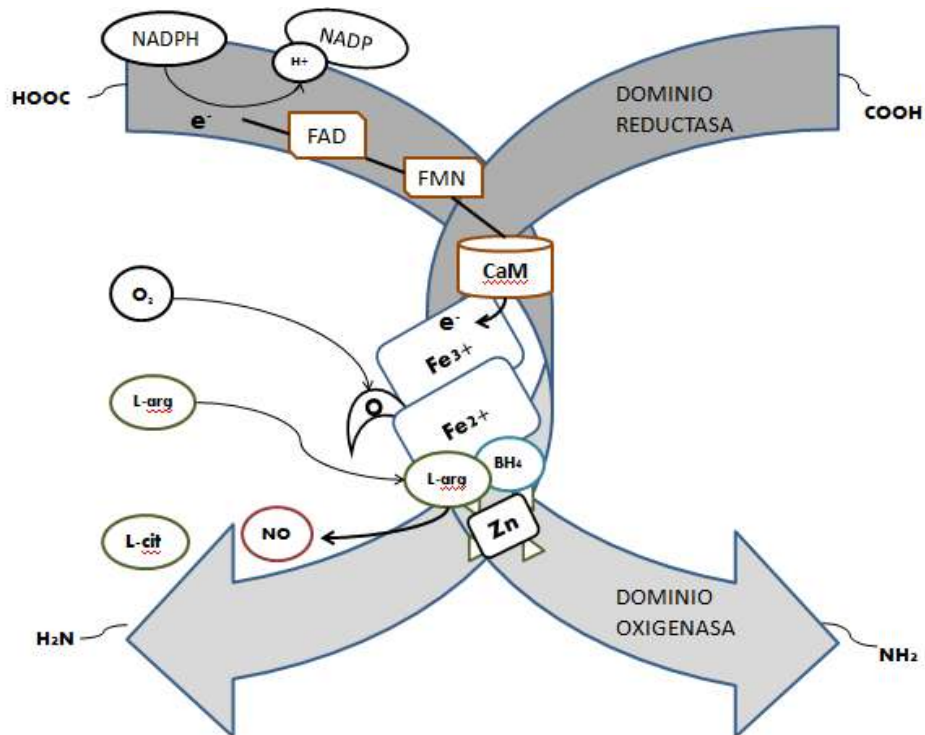


Figura 1. Esquema de la eNOS. Modificado de [33].

Todas las NOS contienen un grupo zinc-tiolato formado por un ión zinc que se coordina tetrahédricamente a dos regiones CysXXXXCys (una por cada monómero)

en la interface del dímero de la NOS. El ión zinc tiene una función estructural en la enzima. El NO formado puede actuar sobre diversas proteínas y enzimas blancos. La ruta fisiológica más importante en la que interviene el NO es la activación de la guanilil ciclasa soluble (GCs) y la generación de monofostato cíclico de guanosina (GMPc) [33,34].

2.4.2 Regulación de la producción endotelial de NO

La actividad de la eNOS y, por lo tanto, la cantidad de NO que es sintetizada, es regulada por una serie de mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y postraduccionales que incluyen la acilación con ácidos grasos, disponibilidad del sustrato y cofactores, grado de fosforilación, S-nitrosilación, acetilación e interacciones proteína-proteína [34].

La localización subcelular de la eNOS es mediada por acilación de la proteína con ácidos grasos. Hay dos modificaciones principales: la *N*-miristoilación cotraduccional sobre la glicina 2 (Gly2) y la palmitoilación postraducciona sobre las cisteínas 15 y 26 (Cys15 y Cys26). Una vez que estas modificaciones han surtido efecto, la eNOS es dirigida hacia el complejo de Golgi y a la caveola plasmática, que son invaginaciones de la membrana en las que se encuentra una estructura de soporte constituida por la proteína caveolina 1, la cual es un inhibidor de la actividad de la eNOS. La pérdida de la palmitoilación conduce a una redistribución intracelular de la eNOS y disminuye la síntesis de NO. La localización de la eNOS en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi es necesaria para la fosforilación de la serina 1177 (Ser1177) por la proteína cinasa B (Akt) [34,35].

La actividad de eNOS se incrementa marcadamente cuando el Ca^{2+} se incrementa. El Ca^{2+} induce la unión de calmodulina a la enzima. Sin embargo, también otras proteínas interactúan con eNOS y regulan su actividad. Por ejemplo, la proteína de choque térmico 90 (hsp90) se asocia con eNOS y sirve como un modulador alostérico que activa a la enzima y promueve su acoplamiento. El reclutamiento de calmodulina y hsp90 por eNOS, puede desplazar a la proteína caveolina 1 de eNOS y conducir a su activación [33].

La fosforilación en la Ser1177 es la modulación positiva más importante de la actividad de la eNOS. Esta fosforilación es catalizada por varias cinasas incluyendo Akt, proteína cinasa A (PKA), cinasa activada por AMP (AMPK), cinasa de la cinasa de calcio-calmodulina (CaMKK) II beta y cinasa de control (CHK) 1 [35].

El residuo de treonina 495 (Thr495) es fosforilado bajo condiciones no estimuladoras, interfiriendo con su unión a calmodulina y la defosforilación de este residuo se asocia con estímulos que elevan las concentraciones de Ca^{2+} , inducen mayor unión a calmodulina e incrementan la actividad de la eNOS [33].

La S-nitrosilación (es decir, el reemplazo del átomo de hidrógeno en el grupo tiol de un residuo de cisteína por una entidad de NO) inhibe la actividad enzimática de la eNOS, la cual es rápidamente denitrosilada por estimulación con agonistas. Esta disminución en la nitrosilación, mediada por el receptor, está inversamente relacionada a la fosforilación de la enzima en la Ser1177. Por lo que las reacciones de nitrosilación, acilación y fosforilación podrían ser interdependientes [35].

La acetilación constitutiva de eNOS (la transferencia de un grupo acetilo) en los residuos de lisina 497 (Lys497) y lisina 507 (Lys507), localizados en su dominio de enlace a calmodulina, interfiere con su interacción e inhibe la actividad de la eNOS [34,35].

Finalmente, debido a que la actividad catalítica de la eNOS requiere del sustrato L-arginina y del cofactor BH_4 , se ha sugerido que su deficiencia podría ser la causa de la disfunción endotelial por desacoplamiento de la eNOS [34].

2.4.3 Mecanismos bioquímicos involucrados en la vasodilatación producida por la NO

En las células endoteliales de los vasos sanguíneos, agonistas como la acetilcolina (ACh) y la bradicinina estimulan la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), a través de la interacción con sus receptores acoplados a proteína G (R_{APG}), el cual se une a receptores sobre el retículo endoplásmico y origina la liberación de Ca^{2+} . Esta elevación transitoria de Ca^{2+} promueve la unión de calcio a calmodulina y forma un complejo que activa a la eNOS. La eNOS produce NO en modestas cantidades

hasta que la concentración de calcio disminuye, manteniendo el tono vascular. El NO producido puede difundirse hacia células blanco cercanas, como las células de músculo liso vascular e interactuar con diversos blancos moleculares, entre ellos la GCs. Esta enzima entonces cataliza la producción de GMPc a partir de trifosfato de guanosina (GTP). El GMPc modula la actividad de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), por medio de la activación de una proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) que fosforila a la MLCK. La fosforilación de la MLCK disminuye su afinidad por la calmodulina y como consecuencia disminuye la fosforilación de la cadena ligera de miosina y estabiliza la forma inactiva de la miosina. La fosforilación de la MLCK induce la vasodilatación, lo cual inhibe el ciclo de entrecruzamientos entre miosina y actina (Figura 2) [31,36].

Además, la fosfatasa de la cadena ligera de miosina revierte la acción de la MLCK, catalizando la defosforilación de la cadena ligera de miosina. El balance entre las actividades de la cinasa y la fosfatasa determinan el grado de contracción del músculo liso [37].

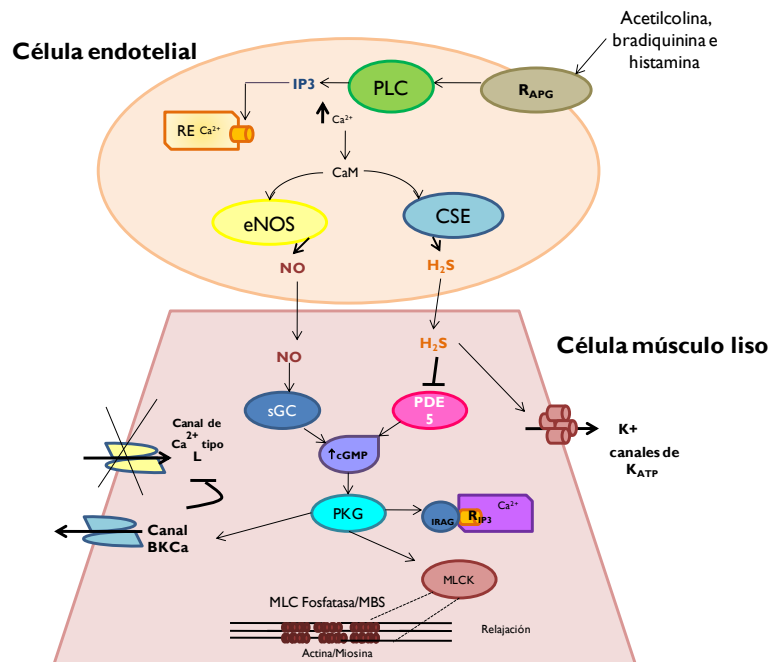


Figura 2. Mecanismo de vasodilatación mediado por NO y H₂S. Modificado de [31].

Existen varias proteínas blanco de la PKG (en específico PKG-I) que están implicadas en la modulación del calcio celular, en el marco de los mecanismos que se han implicado en la vasodilatación mediada por la vía de NO/GMPc/PKG [37]:

- PKG puede fosforilar a IRAG (sustrato de PKG asociado al receptor de IP₃), el cual regula al receptor de IP₃ y, por lo tanto, la liberación de calcio de los almacenes intracelulares mediados por IP₃. La subunidad β de PKG-I fosforila a IRAG en la serina 696 (Ser696), convirtiendo a IRAG en un inhibidor de la actividad del receptor de IP₃ y, por lo tanto, suprimiendo la liberación de Ca²⁺.

- La fosforilación/activación por PKG-I de canales de potasio de gran conductividad activados por calcio (BK_{Ca}) promueve la abertura de estos canales, favoreciendo la pérdida de potasio intracelular, la hiperpolarización de la membrana plasmática y la disminución del flujo de calcio hacia dentro de la célula a través de los canales de Ca²⁺ tipo L.

2.5 Vía del H₂S/K_{ATP}

2.5.1 Generación de H₂S

El H₂S endógeno es sintetizado por tres enzimas: cistationina-β-sintasa (CBS), cistationina-γ-liasa (CSE) y por la 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (3-MST) en cooperación con cisteína aminotransferasa, aunque recientemente se descubrió una nueva ruta en la que la 3-MST y la D-aminoácido oxidasa (DAO) generan H₂S de D-cisteína [27,38].

La CBS, la CSE y la 3-MST se encuentran en diferentes órganos. La CBS se encuentra mayoritariamente en el cerebro, sistema nervioso e hígado, mientras que la CSE está localizada principalmente en la vasculatura y el hígado y, la 3-MST se expresa tanto en el cerebro como en la vasculatura. Mientras la CSE y la CBS están localizadas primordialmente en el citosol, la 3-MST es una proteína dependiente de zinc que se localiza tanto en la mitocondria como en el citosol [39]. La CBS y la CSE

utilizan los aminoácidos L-cisteína, L-homocisteína y L-cistationina con piridoxal-5-fosfato como cofactor para producir el H₂S [40].

La CSE es una enzima que se expresa en células endoteliales de ratón y se ha demostrado que es activada por Ca²⁺/calmodulina en respuesta a activación colinérgica [27,41]. Estructuralmente es una enzima homotetramérica con una masa molecular por subunidad de 45 kDa (Figura 3),

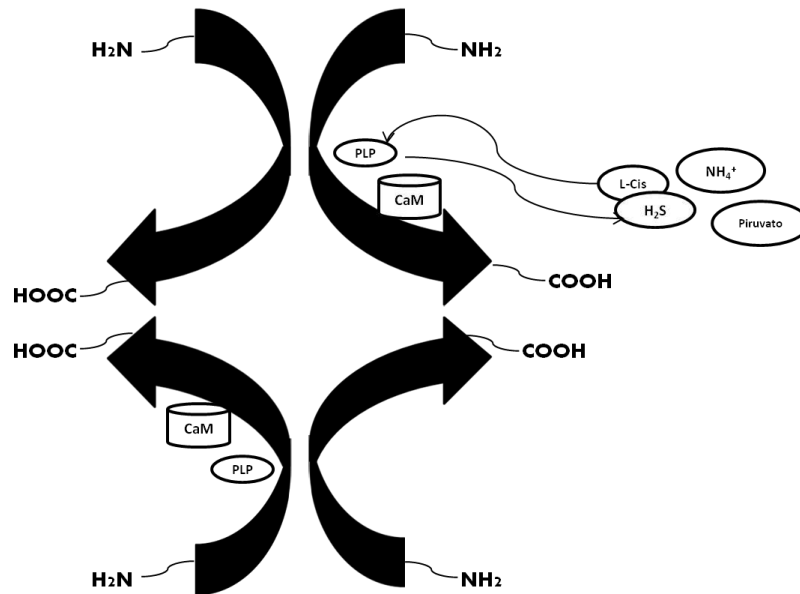
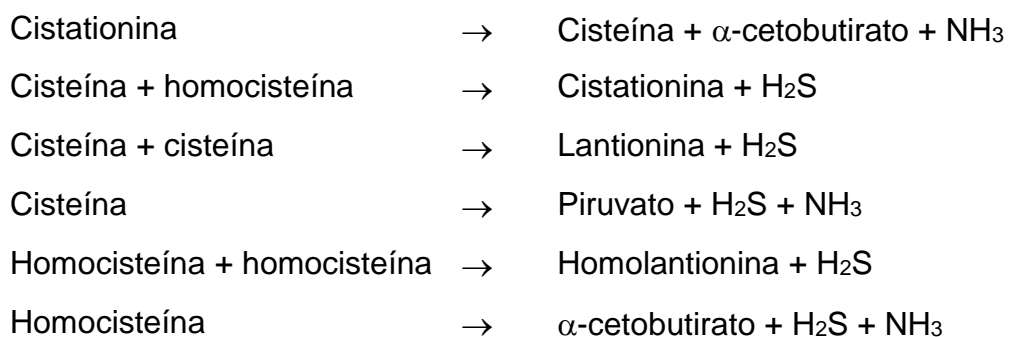


Figura 3. Esquema de la CSE, basado en el modelo reportado por [42].

Y puede catalizar varias reacciones para generar H₂S como sigue:



La baja especificidad por el sustrato de la CSE permite que tanto la cistationina, la cisteína y la homocisteína puedan ocupar el mismo sitio de unión al sustrato [43].

El H₂S fácilmente se disuelve en agua y se disocia a H⁺, HS⁻ y S²⁻. Bajo condiciones fisiológicas, aproximadamente el 20% existe como H₂S y el 80% restante como HS⁻, con cantidades traza de S²⁻. El término “sulfuro de hidrógeno” se usa de manera indiscriminada para referirse a H₂S, HS⁻ y S²⁻ [38].

Una vez desprotonado, el HS⁻ (bisulfuro) es oxidado rápidamente en la mitocondria para formar tiosulfato, el cual es convertido finalmente a sulfito y sulfato. Esta oxidación es altamente dependiente del nivel de oxígeno, por lo que se ha sugerido que la señalización mediada por H₂S es baja en condiciones normales de oxígeno, pero se incrementa marcadamente en tejidos hipóxicos, debido a la reducida oxidación, por lo que el sulfuro es considerado como un “sensor de oxígeno”, el cual interviene en las respuestas tisulares a hipoxia [44,45].

Por lo anterior, uno de los principales retos en el estudio del H₂S bajo condiciones *in vivo* es la extremadamente corta vida media de esta molécula efímera, la cual se ha estimado de segundos a minutos [45].

2.5.2 Regulación de la producción de H₂S

La regulación de la CSE no se ha elucidado completamente. Cada subunidad contiene dos regiones CXXC y su influencia sobre la actividad de CSE se desconoce. Bajo condiciones *in vitro*, la CSE sufre una modificación traduccional por una proteína pequeña modificadora tipo ubiquitina (SUMO), una señal que es usada generalmente para la localización nuclear, pero su relevancia fisiológica y su papel sobre la función de la CSE es desconocida. El incremento en la expresión de la CSE correlaciona con un incremento de cuatro veces en la producción de H₂S en respuesta a estrés en el retículo endoplásmico, donde el H₂S juega un papel protector. Se ha reportado además, tanto el aumento como la disminución de la expresión de la CSE en varios modelos de ratón, asociados a diabetes [43].

2.5.3 Mecanismos bioquímicos involucrados en la vasodilatación producida por H₂S

Se han descrito algunos mecanismos de señalización en los que interviene el H₂S, tales como la S-sulfhidración de proteínas (la conversión de un grupo tiol –SH de cisteína a grupos persulfuro –SSH), la reacción con especies reactivas de oxígeno y NO, así como la reducción de enlaces disulfuro de proteínas a tioles [46]. En cuanto a la vasodilatación, se demostró que ratones homocigotos en la interrupción del gen que codifica para la CSE (CSE^{-/-}) sufren de hipertensión, exhiben disfunción endotelial y son deficientes al inducir hiperpolarización dependiente de endotelio [27,41].

El H₂S funciona como un factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y su actividad vasodilatadora ha sido atribuida primariamente a la activación de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Figura 2). El efecto del H₂S sobre la relajación de vasos sanguíneos es sensible a la presencia del inhibidor de canales K_{ATP}, glibenclamida y se cree que este gas es capaz de activar directamente este canal. La activación del canal aparentemente ocurre por persulfidación (–RSS) en la cisteína 43 (Cys43) en la subunidad formadora de poro Kir_{6.1}, lo cual disminuye el enlace con ATP y promueve la unión del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato al canal [47,48].

Se ha observado que la vasodilatación inducida por sulfuro ácido de sodio (NaHS, un agente liberador de H₂S) se ve reducida en presencia de inhibidores (apamina y caribdotoxina) de los canales de potasio activados por calcio de pequeña e intermedia conductancia (SK_{Ca} e IK_{Ca}) y de un inhibidor (glibenclamida) de canales de K_{ATP}, por lo que, se ha sugerido que el H₂S producido en células endoteliales induce la relajación del vaso sanguíneo mediante la activación de los canales endoteliales SK_{Ca} e IK_{Ca}, así como estimulando los canales de K_{ATP} en células de músculo liso vascular [47,49].

Otro mecanismo propuesto para explicar el papel vasodilatador del H₂S, involucra a la PKG, ya que se observó que el H₂S en presencia de oxígeno molecular o peróxido

de hidrógeno, reacciona para formar polisulfuros, los cuales inducen la oxidación de la PKG, activándola e induciendo vasodilatación [50].

Además, existe evidencia de que el H₂S inhibe la actividad degradadora de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) (la cual convierte el GMPc a 5' GMP) y, por lo tanto, impide que los niveles de GMPc disminuyan amplificando la respuesta celular mediada por PKG (Figura 2) [31,51].

2.6 Colaboración del NO y el H₂S en el efecto vasodilatador

Se ha generado evidencia de la interacción entre las rutas de señalización mediadas por el NO y el H₂S. Estos transmisores gaseosos muestran efectos fisiológicos sinérgicos que indican que existe cooperación entre los dos sistemas de señalización [39].

En uno de los primeros estudios donde se caracterizó el efecto vascular del H₂S, se reportó una reducción en el efecto vasodilatador inducido por NaHS en anillos de aorta de rata, cuando se adicionó el inhibidor de NO, L-N^o-nitroarginina metil éster (L-NAME), lo que sentó las bases para sugerir la cooperación entre el H₂S y el NO [27].

En cultivos de células endoteliales de aorta bovina, el uso de sulfuro de sodio (Na₂S) indujo un incremento en la producción de NO dependiente del tiempo. El Na₂S no tuvo efecto sobre la expresión de eNOS, pero incrementó la cantidad de enzima fosforilada en la Ser1177 por arriba de un 140%. El efecto de Na₂S sobre la fosforilación y producción de NO fue abolido por el inhibidor de la Akt, tribicina [52], lo que sugiere que el H₂S induce la fosforilación de la eNOS por un mecanismo en el que interviene la Akt (Figura 4).

El NaHS estimula también la producción de NO en células endoteliales de arteria bovina, la cual es abolida por un agente quelante de calcio intracelular, el ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi) etano-*N,N,N',N'*-tetraacético (por sus siglas en inglés, BAPTA-AM), pero no por la remoción de Ca²⁺ del fluido extracelular. De manera adicional, el incremento en los niveles de NO se ha atenuado por un inhibidor del receptor de rianodina en el retículo endoplásmico, dantroleno, y por un antagonista del receptor

de inositol trifosfato, xestospongina. Estos resultados indicaron que la liberación de calcio del retículo endoplásmico está involucrada en la activación de la eNOS inducida por el H₂S [53].

El incremento en la producción de NO inducido por el NaHS y L-cisteína también se observó en células endoteliales de vena umbilical de humano. Además, los niveles de NO (medidos como la acumulación de nitritos y nitratos extracelulares) se reducen cuando la expresión de la CSE disminuye y se elevan cuando la expresión de la CSE aumenta. En este mismo estudio, se reportó que el NaHS incrementó la fosforilación de la eNOS en la Ser1177, la cual fue eliminada por los inhibidores de la cinasa p38 activada por mitógeno (p38 MAPK) y de la fosfoinositol-3 cinasa (PI3K), SB202198 y LY294002, respectivamente [54].

Además, se encontró que existe un nivel de cooperación entre las rutas de señalización del NO y el H₂S, convergiendo a nivel de la PKG para promover la angiogénesis y la vasodilatación, ya que se observó que el NaHS disminuye la actividad de la PDE5A purificada, de manera dependiente de la concentración, sugiriendo que los niveles elevados de GMPc en las células de músculo liso vascular estimulados con NaHS son debidos a la degradación reducida de GMPc (Figura 2) [31].

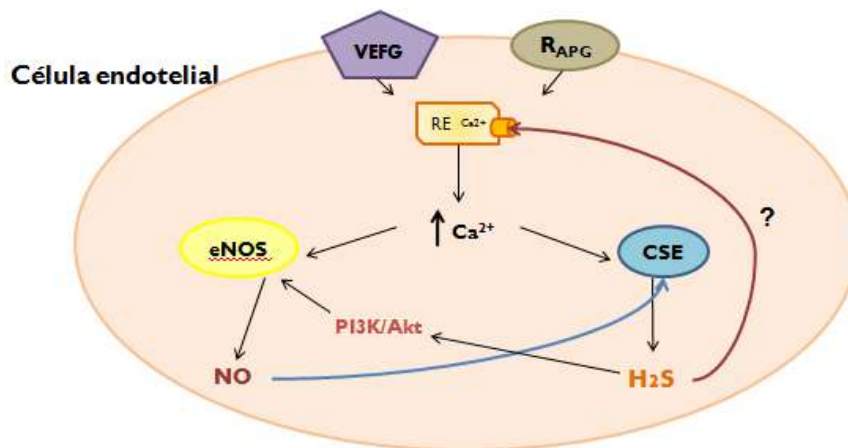


Figura 4. Colaboración entre NO y H₂S.

Se ha demostrado experimentalmente que las acciones citoprotectivas del H₂S son mediadas en parte por NO. Se encontró en ratones *knock-out* (KO) para la enzima CSE, que mostraron niveles reducidos de H₂S, un incremento en el estrés oxidativo y una respuesta exacerbada a la lesión al miocardio por isquemia/reperfusión. Los ratones KO también exhibieron niveles reducidos de NO y síntesis reducida de NO por medio de la eNOS. Tanto el estrés oxidativo como la lesión al miocardio en ratones CSE KO fue atenuada por terapia con H₂S exógeno, con un incremento en la función de la eNOS y la restauración de los niveles de NO [55].

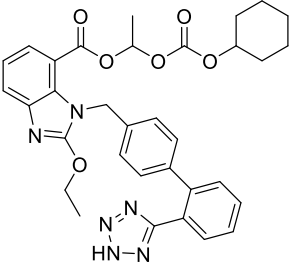
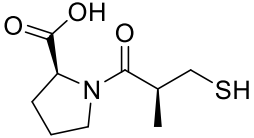
Se ha demostrado que eNOS puede ser S-sulfhidrada o S-nitrosilada en el mismo residuo de cisteína 433 (Cys433). El NaHS incrementa la S-sulfhidración y reduce la S-nitrosilación *in vitro* e *in vivo*. Los ratones KO para la expresión de la CSE no sufren sulfhidración en la pared aórtica y presentan una menor concentración de NO en el tejido. Mientras que el donador de NO, nitrosoglutatión (GSNO) incrementa la nitrosilación de eNOS y este efecto es abolido por el NaHS; el GSNO no elimina la sulfhidración inducida por NaHS. La S-sulfhidración estimula a la eNOS, mientras que la S-nitrosilación disminuye su actividad. Las modificaciones en la Cys443 no afectan la fosforilación en la Ser1177 y, la fosforilación de este residuo de serina no afecta la S-sulfhidración o S-nitrosilación de la Cys433. La sulfhidración de la Cys443 incrementa la dimerización de eNOS. La enzima en su forma de dímero produce más NO, mientras que la eNOS en su forma monomérica está “desacoplada”, ya que produce más iones superóxido (O₂⁻) que NO. En ratones KO para la expresión de la CSE, las células endoteliales producen menos NO y más O₂⁻, pero el efecto se revierte con el donador de H₂S, el NaHS [56].

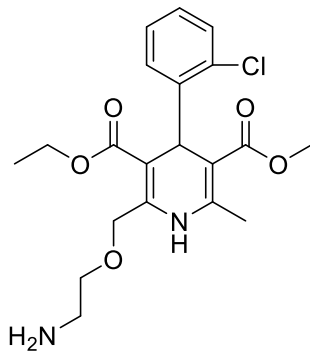
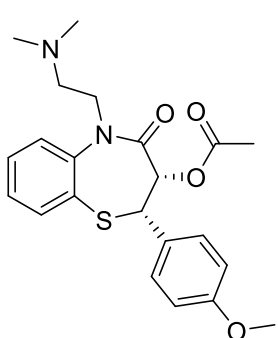
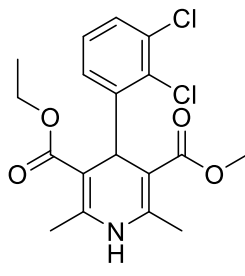
2.7 Fármacos utilizados para tratar la hipertensión

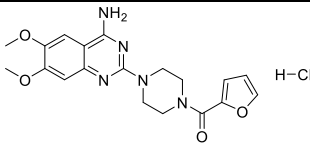
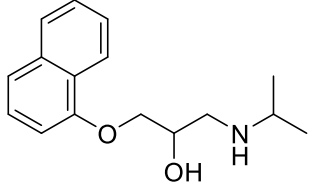
Conforme al reporte del panel de miembros de la Octava Reunión Nacional del Comité de la Asociación Médica Americana (JNC 8 por sus siglas en inglés), los fármacos que se deben incluir en el tratamiento antihipertensivo inicial son diuréticos tipo tiazida, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y bloqueadores del receptor de angiotensina [3].

Con base en el Cuadro Básico de Medicamentos del Instituto Mexicano del Seguro Social (<http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/cuadros-basicos/CBM.pdf> consultado el 11 de febrero de 2019) encontramos que para tratar la hipertensión están indicados los siguientes tipos de medicamentos:

Tabla 2. Fármacos para tratar la hipertensión utilizados en los servicios de salud pública en México

Clasificación	Nombre del fármaco	Estructura Química	Mecanismo	1) Efectos Adversos, 2) Contraindicaciones y 3)Precauciones
Antagonistas de los receptores de angiotensina	Candesartán		Antagonista de los receptores de angiotensina II, subtipo AT-1 con fuerte afinidad y lenta disociación del receptor.	1) Cefalea, dolor lumbar, mareo, infección del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, taquicardia, fatiga, dolor abdominal. En ocasiones se han reportado pancreatitis, angioedema, leucopenia, trombocitopenia y fotosensibilidad.
Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina	Captopril		Inhibe a la enzima convertidora de la angiotensina lo que impide la formación de angiotensina II a partir de angiotensina I. Disminuye la resistencia vascular periférica y reduce la retención de sodio y agua.	1) Tos seca, dolor torácico, proteinuria, cefalea, disgeusia, taquicardia, hipotensión, fatiga y diarrea. 2) Hipersensibilidad a captopril, insuficiencia renal, inmunosupresión, hiperpotasemia y tos crónica.

Clasificación	Nombre del fármaco	Estructura Química	Mecanismo	1) Efectos Adversos, 2) Contraindicaciones y 3) Precauciones
Bloqueadores de los canales de calcio	Amlodipino		Inhibe la entrada de calcio a las células cardiacas y del músculo liso vascular, disminuyen la contracción del corazón	1) Cefalea, fatiga, náusea, astenia, somnolencia, edema, palpitaciones y mareo.
	Diltiazem		Reduce la concentración de calcio en citosol y produce disminución de la actividad cardiaca y vasodilatación coronaria.	1) Cefalea, cansancio, estreñimiento, taquicardia, hipotensión, disnea. 2) Infarto agudo del miocardio, edema pulmonar, bloqueo de la conducción auriculoventricular, insuficiencia cardiaca, renal o hepática graves. 3) En la tercer edad y pacientes con insuficiencia hepática de leve a moderada.
	Felodipino		Bloqueador de los canales de calcio con selectividad vascular en comparación con la selectividad miocárdica.	1) Debidos a su efecto vasodilatador arteriolar: Náusea, mareo, cefalea, rubor, hipotensión arterial. Otros efectos: Estreñimiento y edema. 2) Choque cardiogénico, bloqueo auriculoventricular, hipotensión arterial, asma y concomitante con betabloqueadores.

Clasificación	Nombre del fármaco	Estructura Química	Mecanismo	1) Efectos Adversos, 2) Contraindicaciones y 3) Precauciones
Bloqueadores de receptores α -1 adrenérgicos	Prazosina		Bloqueador Antagonista α 1 adrenérgico, que disminuye la resistencia vascular periférica.	1) Hipotensión postural, mareo, lipotimia, síncope, cefalea, astenia, palpitaciones, náusea, taquicardia, somnolencia y debilidad. 2) Hipersensibilidad al fármaco, insuficiencia coronaria, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal y ancianos. 3) Síndrome de Raynaud, hiperplasia prostática e hipotensión ortostática
Antagonistas β adrenérgicos (β 1 y β 2)	Propranolol		Antagonista β adrenérgico que disminuye la demanda cardiaca de oxígeno, la frecuencia cardiaca, la presión arterial y temblor muscular.	1) Bradicardia, hipotensión, estreñimiento, fatiga, depresión, insomnio, alucinaciones, hipoglucemia, broncoespasmo, hipersensibilidad. La supresión brusca del medicamento puede ocasionar angina de pecho o infarto del miocardio. 2) Hipersensibilidad al fármaco, insuficiencia cardiaca, asma, retardo de la conducción aurículoventricular, bradicardia, diabetes, síndrome de Reynaud e hipoglucemia. 3) En insuficiencia renal o hepática.

Los fármacos antihipertensivos son una de las opciones terapéuticas empleadas para tratar la hipertensión y son diseñados para controlar la presión sanguínea buscando la mínima toxicidad a largo plazo, sin embargo no están exentos de efectos no deseados y no pueden ser utilizados para prevenir el comienzo de la hipertensión. Sin embargo, la medicina tradicional ha encontrado en las plantas una

fueron originalmente derivados de plantas, como la reserpina (de *Rauwolfia serpentina*) y la tetrandina (de *Stephenia tetradra*) y los mecanismos de acción de extractos de alimentos funcionales y plantas medicinales muestran mecanismos de acción similares a los de los fármacos antihipertensivos [24].

Además, se ha descrito que el nebivolol, un fármaco bloqueador β_1 altamente selectivo, tiene la habilidad de estimular las óxido nítrico sintasas (NOSs) e inducir la liberación de NO en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Figura 5) [57].

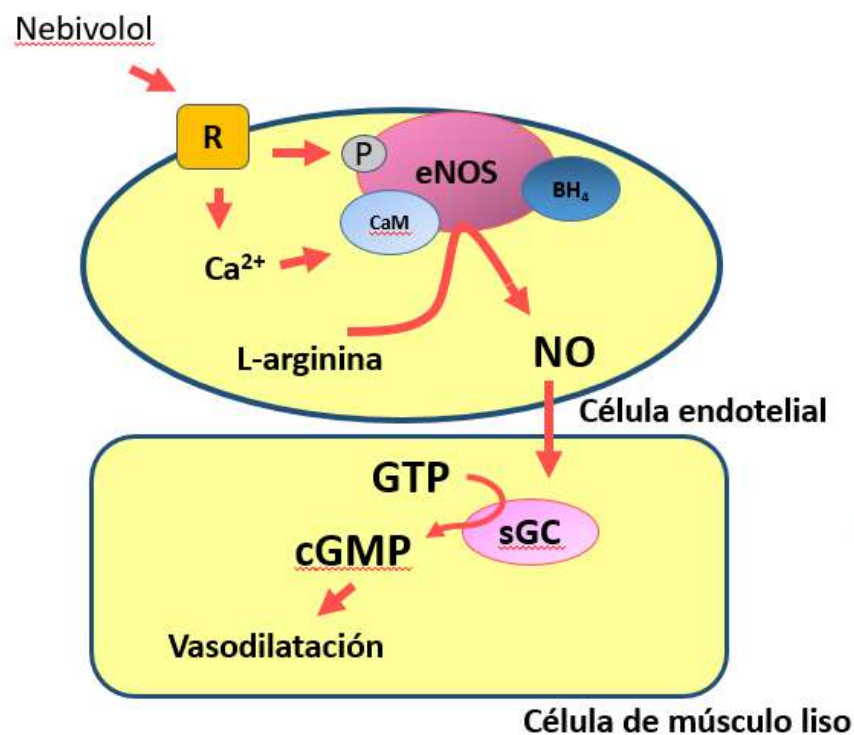


Figura 5. Activación de la vía del NO/GMPc por nebivolol.

Por lo que es posible, que otros fármacos empleados en la terapéutica para tratar enfermedades cardiovasculares, posean efectos vasodilatadores cuyo mecanismo

de acción sea dependiente de las vías de señalización de los neurotransmisores del endotelio vascular (NO, H₂S).

2.8 Productos naturales con efecto vasodilatador

En un artículo de revisión publicado por nuestro grupo de trabajo, se encontraron descritos en la literatura de los últimos 22 años, 207 metabolitos secundarios con efecto vasodilatador y sus mecanismos de acción propuestos, los cuales fueron clasificados de acuerdo a su estructura química, encontrando que la mayoría de los compuestos son alcaloides, flavonoides o terpenoides. Algunos de los compuestos que han sido estudiados en múltiples ocasiones incluyen los flavonoides naringenina, diocleína, quercetina y (-)-epigalo-catequina-3-galato; los polifenoles piceatanol y resveratrol; el sesquiterpeno poligodial; el monoterpeno rotundifolona y el alcaloide rutaecarpina. En otros casos, las mezclas de varios compuestos obtenidos de plantas o los productos generados de ellos fueron estudiados, tales como los polifenoles del vino tinto, saponinas del ginseng, proantocianidinas del té verde, así como xantonas de *Halenia elliptica*. En 34 plantas, fueron identificados dos o más compuestos vasodilatadores, los cuales en algunos casos tienen diferentes mecanismos de acción. Ejemplos de estos son las chalconas aisladas de *Angelica keiskei*, los alcaloides obtenidos de *Peganum harmala*, los glicósidos identificados en *Melaleuca quinquenervia*, entre otros [58].

Entre los mecanismos de acción propuestos se encontraron: la activación de la vía del NO/GMPc, la activación de la vía de la PGI₂/AMPc, la inhibición de la PDE, la activación de canales de K⁺, el bloqueo de canales de Ca²⁺, la activación de canales receptores de potencial transitorio (TRP) y la inhibición de la proteína cinasa C (PKC). Sin embargo, se observó que los compuestos que producen su efecto vasodilatador por un mecanismo dependiente del endotelio, el 98.4% involucró la vía del NO/GMPc, mientras que la vía de la PGI₂/AMPc sólo se identificó en un 23% de los compuestos. Sin embargo, más de la mitad de los compuestos examinados tienen un mecanismo de acción que requiere la participación del endotelio, al menos

en parte, por lo que los factores derivados del endotelio podrían jugar un papel clave en los mecanismos de acción de estos vasodilatadores [58].

La evaluación de la participación de la vía del NO/GMPc se realiza mediante el empleo de inhibidores de la eNOS y de la GCs. En el primer caso, el inhibidor comúnmente empleado es el L-NAME o algún otro derivado como la L-NMMA y para la GCs se utiliza la 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) [19,59–68].

Entre los canales de potasio y de calcio reportados en los mecanismos de acción de los productos naturales con efecto vasodilatador, revisados por Luna-Vázquez y col., 2013 [58], se encontraron los siguientes:

- Canales de potasio: BK_{Ca}, IK_{Ca}, SK_{Ca}, K_{ATP}, canales de potasio de rectificación interna (K_{IR}) y canales de potasio dependientes de voltaje (K_V).
- Canales de calcio: canales de calcio operados por voltaje tipo L (VOCCL) y canales de calcio operados por receptor (ROCC).

La participación de los diferentes tipos de canales de K⁺ se ha evaluado mediante el empleo de bloqueadores específicos de cada uno de ellos. Los bloqueadores de canales de K⁺ más utilizados son: cloruro de tetraetilamonio (TEA) como inhibidor no selectivo; glibenclamida, inhibidor de los canales de K_{ATP}; 4-aminopiridina (4-AP), inhibidor de canales K_V; iberiotoxina y caribdotoxina, bloqueadores de canales BK_{Ca} [19,59–68].

2.9 Compuestos con actividad vasodilatadora de *Prunus serotina* y sus mecanismos de acción

Prunus serotina Ehrh (cereza negra americana), comúnmente llamada “capulín” en México, es un árbol nativo de Norteamérica perteneciente a la familia *Rosacea*. En

la medicina tradicional mexicana, se preparan tés y jarabes de las hojas y frutos para tratar padecimientos tales como hipertensión, molestias de estómago, infecciones de la boca, diarrea, malaria, bronquitis y tos [69].

Recientemente, nuestro grupo de trabajo identificó en extractos metanólicos y acuosos liofilizados, obtenidos de las hojas de *P. serotina*, tres compuestos: el hiperósido, la prunina y el ácido ursólico, los cuales promueven la relajación del músculo liso vascular de la aorta de rata de una manera dependiente de la concentración (Figura 6) [70].

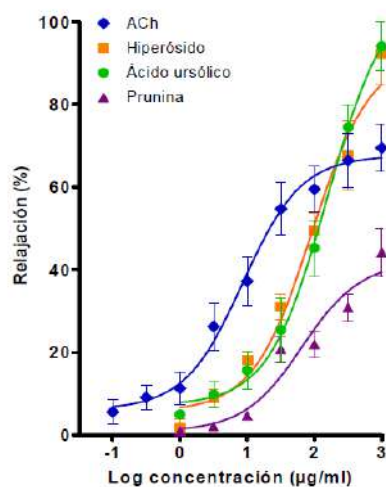


Figura 6. Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador de la acetilcolina, el hiperósido, la prunina y el ácido ursólico en segmentos de aorta intactos de rata.

De manera adicional, se purificó, elucidó la estructura química y se caracterizó el mecanismo de acción de los compuestos vasodilatadores presentes en los frutos de *P. serotina* [71].

Entre los compuestos obtenidos se purificó uno mayoritario, proveniente de un extracto de diclorometano de la cáscara del capulín que posteriormente fue identificado como ácido ursólico [71]. En la Figura 7 se muestra la estructura del ácido ursólico.

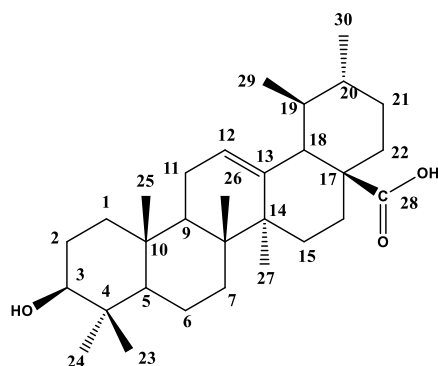


Figura 7. Estructura del ácido ursólico.

La evaluación farmacológica de los compuestos purificados indicó que el hiperósido y el ácido ursólico indujeron una relajación significativa, dependiente de la concentración, en aorta aislada de rata. El compuesto que presentó el mayor E_{max} fue el ácido ursólico (Figura 6) [70,71].

Los resultados obtenidos en este estudio coincidieron con los reportados en la literatura, que indican que el mecanismo vasodilatador del ácido ursólico es dependiente de endotelio (Figura 8) [72] y sugieren que tanto la vía del NO/GMPc, como la vía del H_2S/K_{ATP} participan en el mecanismo vasodilatador de este triterpeno [71].

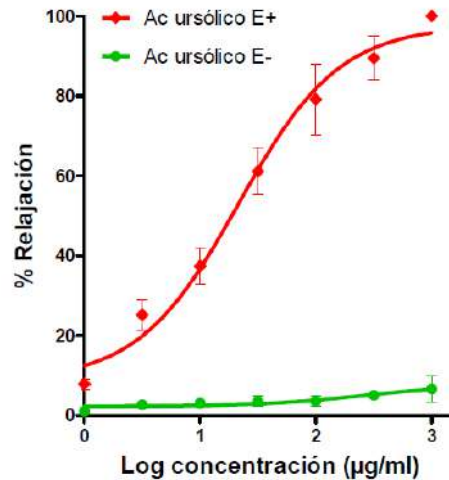


Figura 8. Curva concentración respuesta del ácido ursólico en ausencia (E-) y en presencia (E+) de endotelio.

Además, se mostró que el efecto vasodilatador del ácido ursólico involucra la participación de canales de potasio, ya que el bloqueo de estos canales con TEA o glibenclamida desplazó las curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador del ácido ursólico a la derecha [71].

Otros resultados obtenidos en este mismo trabajo mostraron que las vías del NO/GMP_c y del H₂S/K_{ATP} actúan de manera sinérgica, ya que al inhibir simultáneamente las dos vías de señalización con L-NAME y propargilglicina (PPG), respectivamente, el efecto vasodilatador del ácido ursólico se inhibió casi por completo (Figura 9).

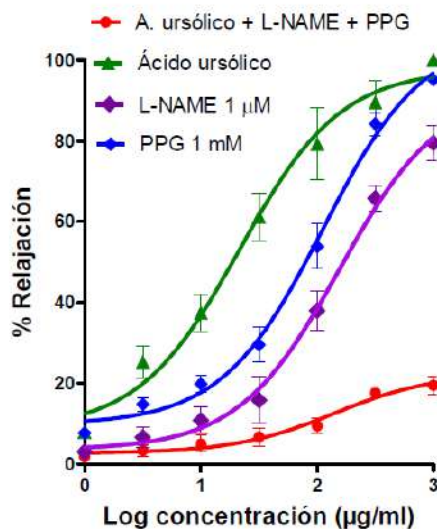


Figura 9. Curvas concentración respuesta del ácido ursólico en presencia de los inhibidores PPG (1 mM), L-NAME (1 µM) y PPG + L-NAME.

2.10 Compuestos triterpénicos con actividad vasodilatadora que regulan la actividad de eNOS y CSE

Uno de los grupos de fitoquímicos bioactivos con efecto vasodilatador son los terpenos, los cuales representan una amplia familia de compuestos clasificados de acuerdo a su número de unidades de isopreno. Los triterpenoides son sintetizados en plantas por ciclación del escualeno y están distribuidos de manera general en la naturaleza. Aproximadamente, 20,000 triterpenoides de los tipos dammarano, ergostano, friedelano, lupano, oleanano, taraxastano y ursano, han sido identificados en diferentes plantas medicinales [73]. El interés en las actividades biológicas de los triterpenos continúa, debido a sus efectos antiinflamatorio, antiviral, antitumoral, anti-VIH e insecticida, así como para el tratamiento de enfermedades metabólicas y vasculares [74].

Los triterpenos pentacíclicos, principalmente los ácidos ursólico y oleanólico, tienen una amplia variedad de propiedades farmacológicas tales como: actividad antioxidante, antiaterosclerótica, antihiperlipidémica, cardiotónica y antidisrítmica. Además, se ha demostrado que el ácido oleanólico es capaz de relajar de manera

dependiente de la concentración, anillos de aorta de rata que poseen un endotelio funcional y que el ácido ursólico tiene un efecto vasodilatador significativo dependiente de endotelio, el cual es producido por la liberación de NO y H₂S [18,72]

Recientemente, nuestro grupo de investigación evaluó el efecto vasodilatador de seis triterpenos (ácido ursólico, uvaol, ácido betulínico, friedelina, ácido oleanólico y lupeol). Los resultados de estos experimentos indicaron que todos los compuestos relajan la aorta de rata, de una manera dependiente de la concentración (Figura 10) [75].

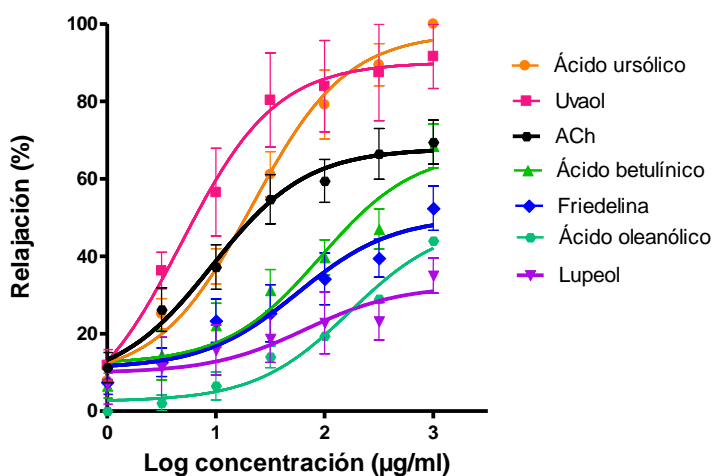
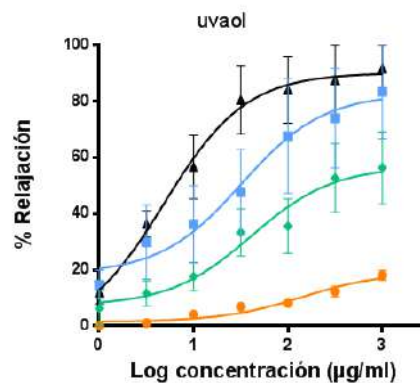
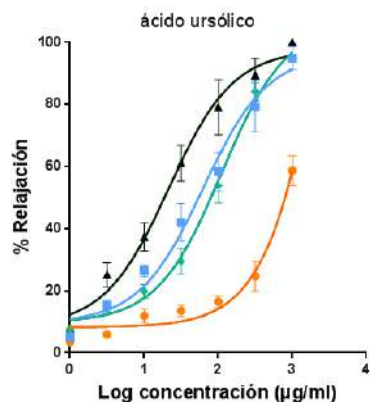


Figura 10. Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador producido por triterpenos.

En este estudio, se determinó que el efecto vasodilatador de los triterpenos más potentes (ácido ursólico y uvaol) involucra la participación del NO, H₂S y CO, ya que al emplear inhibidores de las enzimas que los producen (L-NAME, PPG y mesoporfirina-IX (meso-IX), para inhibir a la eNOS, a la CSE y a la hemooxigenasa-2 (HO-2), respectivamente), se redujo significativamente la relajación de la aorta inducida por estos triterpenos (Figura 11) [75].



▲ Triterpeno ● Triterpeno + L-NAME ● Triterpeno + PPG ■ Triterpeno + MESO-IX

Figura 11. Participación de los transmisores gaseosos en el efecto vasodilatador producido por los triterpenos ácido ursólico y uvaol.

En un estudio similar [19], se mostró que cinco ácidos triterpénicos (ursólico, morónico, morólico, betulínico y 3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioico) relajan anillos de aorta de rata de manera dependiente de la concentración y, con base en los resultados del análisis tipo SAR (del inglés Structure-Activity Relationship) realizado en ese trabajo, se concluyó que el esqueleto pentacíclico de estos compuestos se debe conservar para ejercer el efecto vasodilatador, el cual aumenta si se cuenta con un aceptor de puentes de hidrógeno en su estructura.

2.11 Estudios *in silico*

El diseño *in silico* de fármacos consiste en una colección de herramientas computacionales que permiten tomar decisiones racionales en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos, tal como la identificación de un blanco molecular de interés terapéutico, la selección o el diseño de nuevos compuestos líder y su modificación para obtener mejores afinidades o propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas [76,77].

2.11.1 Acoplamiento molecular

La unión de moléculas pequeñas (ligandos) a sus dianas biológicas es un fenómeno indispensable para numerosos procesos biológicos. En el diseño de fármacos basado en la estructura de la diana biológica, la predicción precisa de las formas de unión entre el ligando y el receptor es fundamental y es el objetivo de la técnica computacional denominada “acoplamiento molecular”, del inglés “*docking*” [78].

Esta técnica considera a los átomos y a los enlaces como una serie de vectores o coordenadas atómicas y predice la asociación más “acertada” entre ellas. Dentro del diseño de fármacos asistido por computadora, está clasificada como una técnica basada en el conocimiento del blanco biológico y permite conocer tanto los sitios como las formas de unión posibles de los ligandos a una proteína (poses) [79,80].

En los métodos basados en la estructura, se requiere que la estructura tridimensional del blanco biológico haya sido reportada, ya sea por cristalografía de rayos X, por espectroscopía de resonancia magnética nuclear o predicha por modelado por homología. Los protocolos de *docking* incluyen un algoritmo de búsqueda y una función de evaluación para generar y evaluar las poses del ligando. Los algoritmos de búsqueda se clasifican de acuerdo a la metodología de búsqueda empleada para explorar la flexibilidad del ligando: sistemática, estocástica y determinística [81,82].

Los algoritmos sistemáticos exploran todos los grados de libertad del ligando durante la búsqueda. Los métodos que emplean esta aproximación pueden ser nuevamente clasificados como exhaustivos, de construcción incrementada y ensamblaje conformacional. La búsqueda exhaustiva explora sistemáticamente los valores de cada grado de libertad en una manera combinatoria, rotando todos los ángulos diédricos del ligando de acuerdo a cierto rango predeterminado de valores y un conjunto de restricciones iniciales, por ejemplo, restricciones geométricas y

químicas. El programa “Glide” por ejemplo, emplea este tipo de algoritmo de búsqueda sistemático exhaustivo [82].

Para identificar la “pose” (forma o modo de acoplamiento entre receptor-ligando) más favorable, cada pose es evaluada (del inglés *scored*) basado sobre su complementariadad al blanco en términos de forma y propiedades, tales como las electrostáticas. Una buena evaluación (del inglés *score*) para una molécula dada indica que es potencialmente un buen ligando [83].

Un experimento de acoplamiento puede generar de cientos a miles de conformaciones blanco-ligando, por lo que debe contar con una función de evaluación eficiente para clasificar estos complejos y diferenciar las predicciones de las formas de unión válidas de las no válidas. Las funciones de evaluación pueden ser agrupadas en cuatro tipos: (1) funciones de evaluación basadas en mecánica molecular o en campos de fuerza, (2) funciones de evaluación empírica, (3) funciones de evaluación basadas en el conocimiento y (4) funciones de evaluación por consenso [84].

2.11.2 Dinámica molecular

Hay tres estrategias principales en los métodos de *docking*, para considerar la flexibilidad de la proteína y del ligando: (1) la proteína se considera rígida y sólo se exploran los grados de libertad traslacional y rotacional para el ligando, considerando al ligando como un cuerpo rígido sin grados de libertad conformacional, (2) la proteína se considera rígida pero se consideran todos los grados de libertad del ligando, incluyendo los grados de libertad conformacional y (3) la proteína se considera parcial o totalmente flexible y se investigan todos los grados de libertad del ligando [82]. En la segunda estrategia, los métodos para inducir la flexibilidad del receptor incluyen el “*induced-fit docking*” [84].

Para alcanzar la tercera estrategia, se pueden emplear las simulaciones de dinámica molecular clásica de las cuales se obtienen diferentes conformaciones del blanco. La dinámica molecular es la integración numérica de la segunda ley de Newton de movimiento y calcula una trayectoria de conformaciones de una proteína en función del tiempo. La trayectoria se calcula para un número específico de átomos en pequeños lapsos de tiempo, generalmente de 1-10 fs (femtosegundos). La fuerza neta de cada átomo se calcula como el gradiente negativo de su energía potencial y se usa para acelerar al átomo en la dirección de la fuerza. La dinámica molecular se usa comúnmente para explorar aquellas conformaciones cuando todos los átomos, incluyendo el solvente, son simulados explícitamente [84].

2.12 Estudios *in silico* del ácido ursólico y eNOS y CSE

En un estudio de acoplamiento molecular realizado para cinco ácidos triterpénicos (ursólico, morónico, morólico, betulínico y 3,4-seco-olean-18-en-3,28-dioico) y la eNOS, se propuso que el carboxilo en el carbono 28 del esqueleto pentacíclico es importante para la interacción de los triterpenos con la enzima eNOS, así como la presencia de aceptores de puentes de hidrógeno en el carbono 3. Además, los resultados de este estudio sugirieron que estos compuestos preferentemente se unen en dos sitios de la eNOS denominados C1 y C2, que fueron identificados como de acceso al sitio catalítico y se cree que dicha unión activa a la eNOS [19].

En nuestro grupo de trabajo, también se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular entre el ácido ursólico y la eNOS y se incluyó en este estudio el acoplamiento de este triterpeno a la CSE [58]. Los resultados indicaron que el ácido ursólico no tiene afinidad por los sitios catalíticos de la eNOS y la CSE, pero presenta una tendencia a unirse en los sitios C1 y C2, como se describió previamente [19].

En la eNOS, los sitios C1 y C2 están ubicados ligeramente fuera del sitio catalítico y forman el canal de acceso del sustrato al interior de la proteína. La estabilización del ácido ursólico en estos sitios se da por la interacción con residuos sobre los sitios C1 y C2 y por puentes de hidrógeno con los residuos de aspártico 480

(Asp480) e histidina 373 (His373) y una interacción electrostática con arginina 367 (Arg367) (Figura 12) [18].

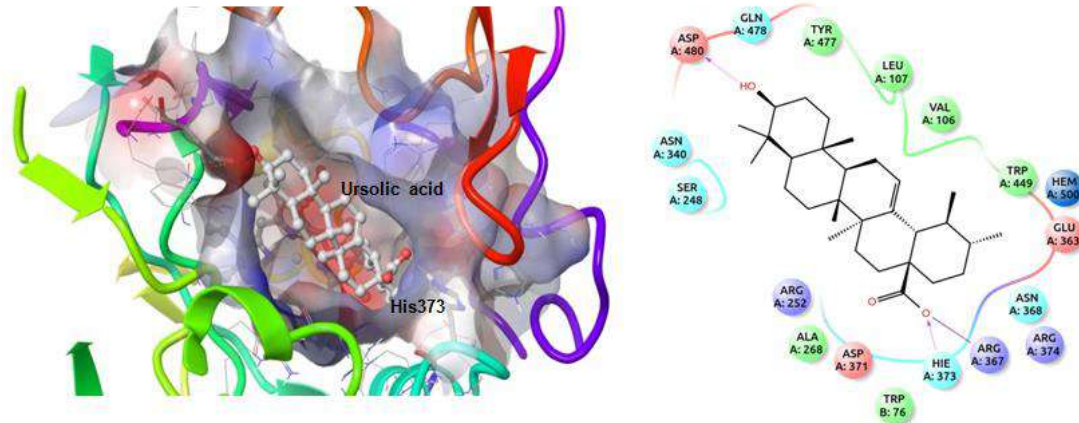


Figura 12. Forma de unión del ácido ursólico a la eNOS.

En el caso de la interacción entre el ácido ursólico y la CSE, este triterpeno tiene afinidad por un sitio que comparte residuos de las cadenas A y B de la proteína y su acoplamiento es estabilizado por un puente de hidrógeno y contactos de corta distancia (Figura 13) [18].

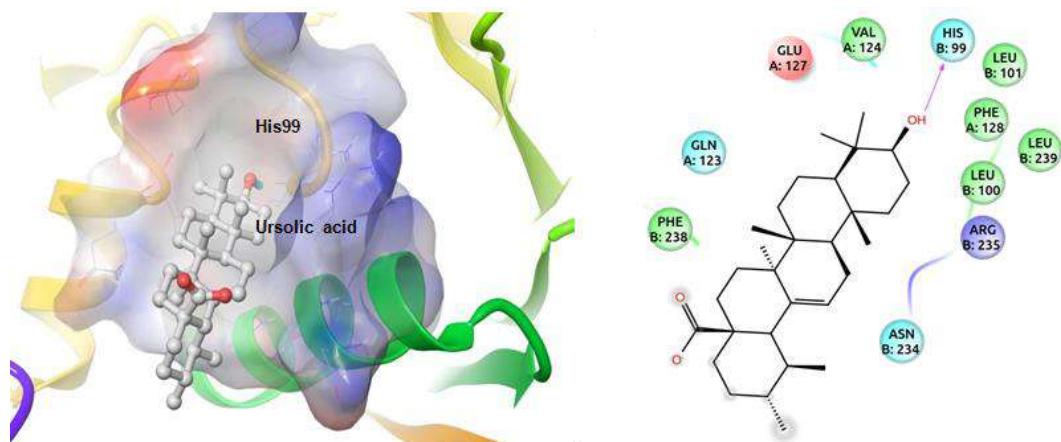


Figura 13. Forma de unión del ácido ursólico a la CSE.

2.13 Moléculas liberadoras de NO y H₂S

Una de las estrategias en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y pulmonares involucra la activación de la vía de señalización del NO/GMPc, mediante nitratos orgánicos liberadores de NO, tales como nitroglicerina, mononitrato y dinitrato de isosorbida, entre otros (Figura 14). Sin embargo, la administración continua eventualmente conduce a la tolerancia a nitratos. Por esta razón el desarrollo de fármacos que induzcan la liberación de NO por medio de la estimulación de la eNOS puede ser importante para el tratamiento de la hipertensión [72].

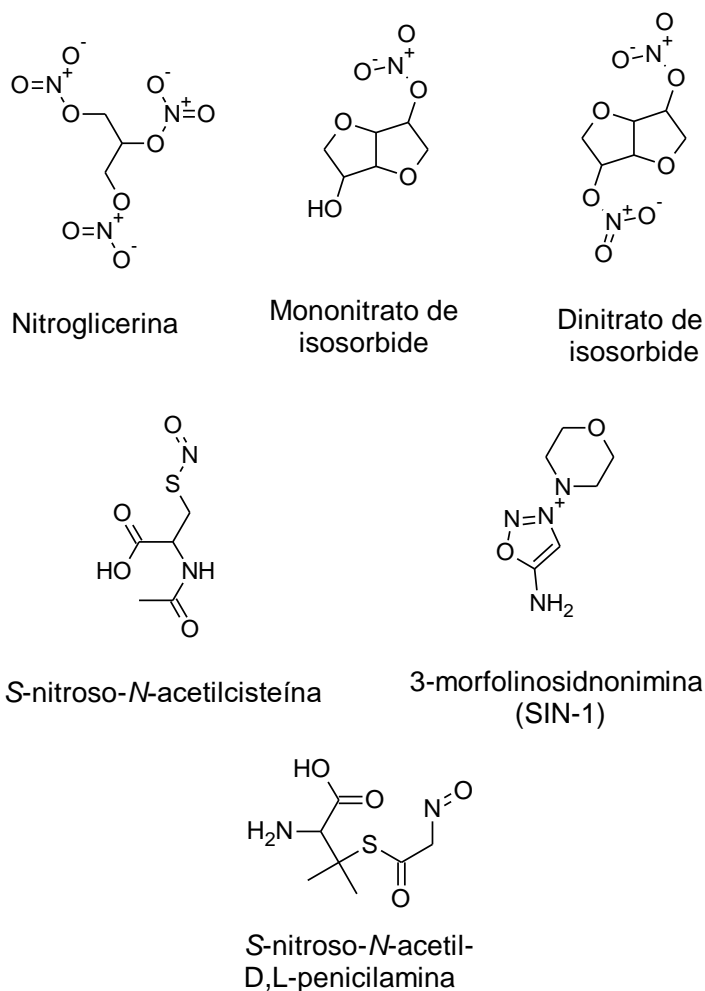


Figura 14. Estructuras de agentes liberadores de NO [85,86].

Algunos estudios han demostrado que el H₂S protege contra múltiples enfermedades cardiovasculares en una manera similar al NO. Las terapias con H₂S también han demostrado aumentar la biodisponibilidad de NO [55].

Sin embargo, el potencial terapéutico del gas H₂S es limitado debido a dificultades en obtener concentraciones controladas con precisión y el posible impacto tóxico del exceso de H₂S. El NaHS, aunque ha sido usado ampliamente como herramienta de investigación, es un donador de vida corta que no mimetiza el proceso lento y continuo de generación de H₂S *in vivo*. Además, el NaHS en solución acuosa puede ser rápidamente oxidado por O₂ [87].

Los compuestos polisulfurados derivados del ajo se han identificado como moléculas liberadoras de H₂S, tal como el trisulfuro de dialilo (Figura 15), del que se ha sugerido que actúa como mediador en el efecto vasoactivo del ajo [88].

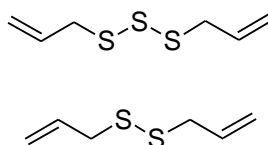


Figura 15. Polisulfuros de dialilo derivados de ajo liberadores de H₂S.

Algunas otras moléculas como el GYY4137 ((4-metoxifenil) morfolin-4-ilfosfinoditiolato de morfolinio), la cisteína, la *N*-acetilcisteína y el reactivo de Lawensson han sido utilizadas para investigación básica (Figura 16) [89].

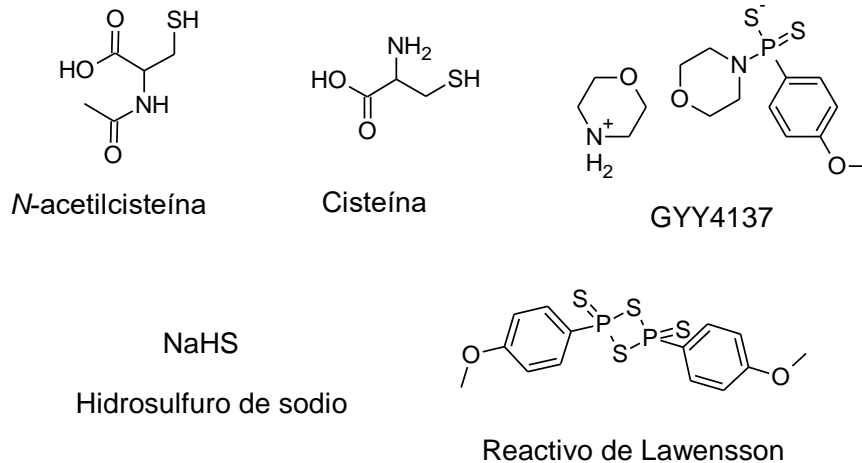


Figura 16. Estructuras de agentes liberadores de H₂S utilizadas en investigación básica. Modificada de [89].

2.13.1 Moléculas híbridas liberadoras de NO y H₂S

La hibridación farmacofórica, en la cual dos regiones bioactivas son covalentemente enlazadas y generadas como una entidad híbrida unitaria, es una estrategia en el descubrimiento de fármacos para el desarrollo de nuevas moléculas con mayor actividad biológica [90].

En el caso de las enfermedades que deben ser tratadas con una combinación de fármacos que actúan a diferentes niveles biológicos y con el objetivo de reducir los efectos secundarios y el bajo cumplimiento en la administración de las dosis, así como mejorar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos, la química farmacéutica ha puesto sus esfuerzos en desarrollar fármacos dirigidos a múltiples blancos (en inglés, MTDL, Multi-Target Directed Ligands), incorporando en una molécula dos posibles mecanismos de acción, usualmente relacionados a dos distintos grupos funcionales [91].

Desde el descubrimiento de la producción endógena de NO, los investigadores han intentando emplear el potencial terapéutico de esta pequeña molécula gaseosa

conocida por ser un potente vasodilatador. Sin embargo, se requiere de métodos que almacenen y liberen de manera controlada la dosis específica necesaria en la terapia indicada. Además, el diseño de híbridos que contengan grupos donadores de NO que actúen sinérgicamente con el fármaco “nativo” ha generado un gran interés [91,92].

Entre las estrategias abordadas, se han desarrollado macromoléculas en la forma de proteínas, dendrímeros, partículas y polímeros, que funcionan como “andamios” de las partes liberadoras de NO y que almacenan y liberan el NO de una manera controlada, por lo que aventajan en esta característica a los análogos donadores de NO de bajo peso molecular [93].

Un ejemplo del uso de esta estrategia son compuestos derivados de inhibidores selectivos de las isoformas específicas de la anhidrasa carbónica (CA) que cuentan con una región liberadora de NO. Estos agentes bifuncionales fueron evaluados *in vitro* e *in vivo* y conforme a los resultados preliminares se han propuesto para el tratamiento de glaucoma de ángulo abierto, regresión de cáncer y osteoporosis, en los cuales están involucradas las actividades del NO y de la CA [91].

En lo que respecta al H₂S, en la literatura se encuentran reportados varios candidatos a fármacos en desarrollo que son liberadores de H₂S (Figura 17). En general, estas líneas de investigación se enfocan a la síntesis de estructuras químicas conocidas a las que se les adiciona una región liberadora de H₂S. Por ejemplo, en el caso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se pretende disminuir su toxicidad y, en el caso particular del derivado de diclofenaco (ATB 337/ACS 15), se encontró que la modificación química incrementó sus efectos antiinflamatorios con respecto al fármaco parental. Así mismo, este fármaco disminuyó la toxicidad gastrointestinal y no afectó al hematocrito. El compuesto ATB-429, derivado de la mesalamina, un fármaco empleado para tratar la inflamación del intestino, mostró ser significativamente más efectivo y el compuesto ATB-346, un derivado del naproxeno, mostró un incremento en la efectividad y una

notoria reducción en la toxicidad gastrointestinal y cardiovascular, con respecto al fármaco parental (Figura 17) [89].

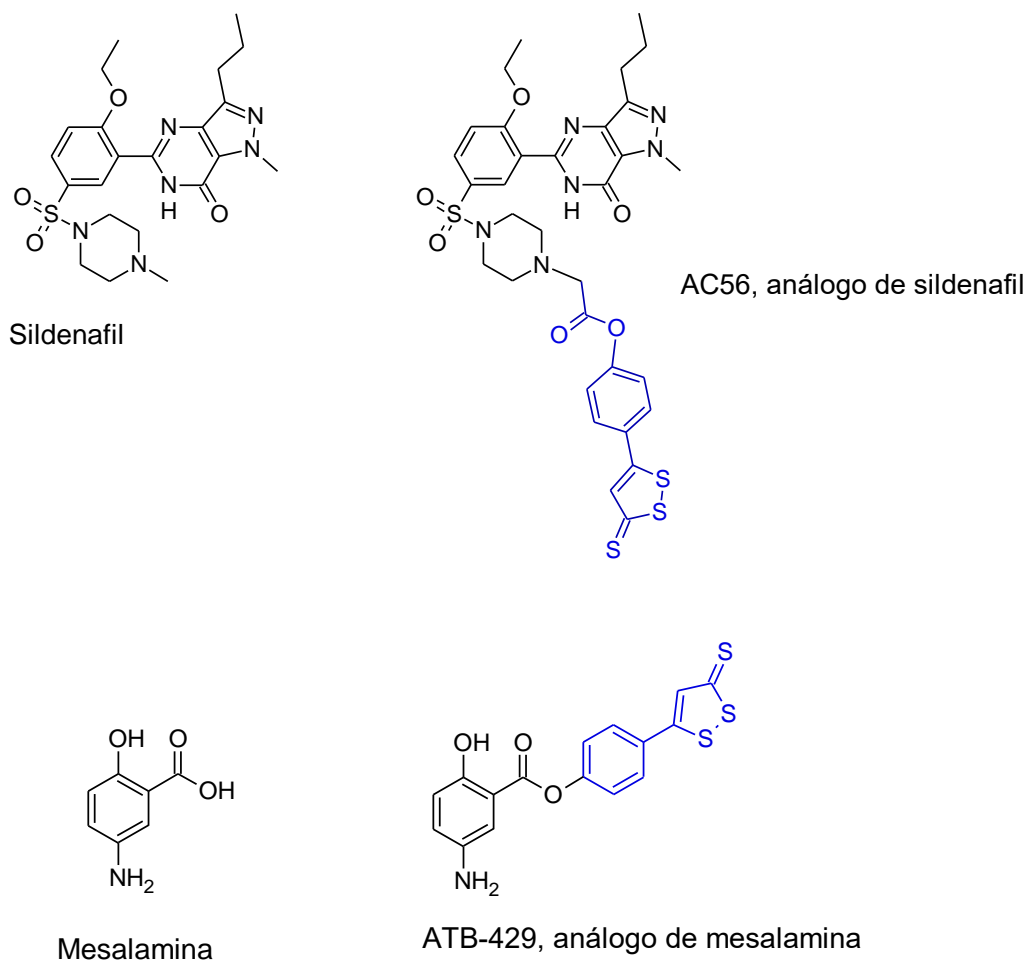
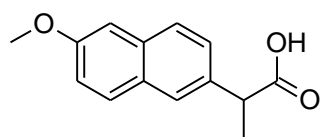
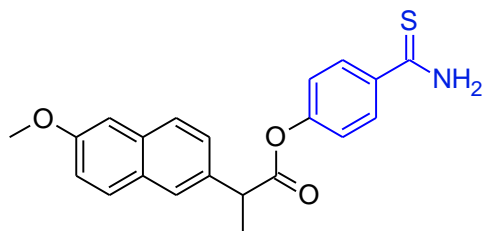


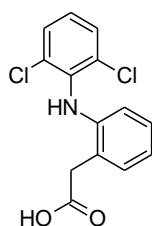
Figura 17. Estructuras de agentes liberadores de H_2S y sus fármacos parentales (sildenafil, mesalamina, naproxeno, indometacina, diclofenaco) reportados en la literatura como candidatos a fármacos en desarrollo.



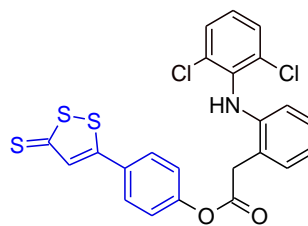
Naproxeno



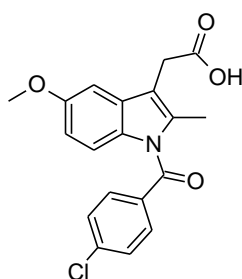
ATB-346, análogo de naproxeno



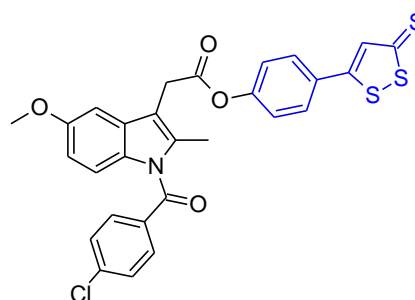
Diclofenaco



Derivado ATB-337/ACS-15
(Antibe/GTC-Pharma)



Indometacina



ATB-343, análogo de la indometacina

Figura 17 (continuación). Estructuras de agentes liberadores de H_2S y sus fármacos parentales (sildenafil, mesalamina, naproxeno, indometacina, diclofenaco) reportados en la literatura como candidatos a fármacos en desarrollo.

Sin embargo, se ha señalado que una de las limitaciones de algunos de los fármacos anteriores, es que liberan el H_2S muy rápido, por lo que no son adecuados para mimetizar la generación fisiológica de H_2S [87].

Incluso se han desarrollado moléculas que liberan simultáneamente NO y H₂S, denominadas NOSH, diseñadas para inhibir el crecimiento celular de varias líneas de cáncer humano que cuentan con la estructura de la aspirina para portar ambas regiones liberadoras y han mostrado ser extremadamente efectivas para inhibir el crecimiento de las líneas celulares cancerosas y, adicionalmente, NOSH-1 mostró un rango de seguridad tóxica remarcable (Figura 18) [94].

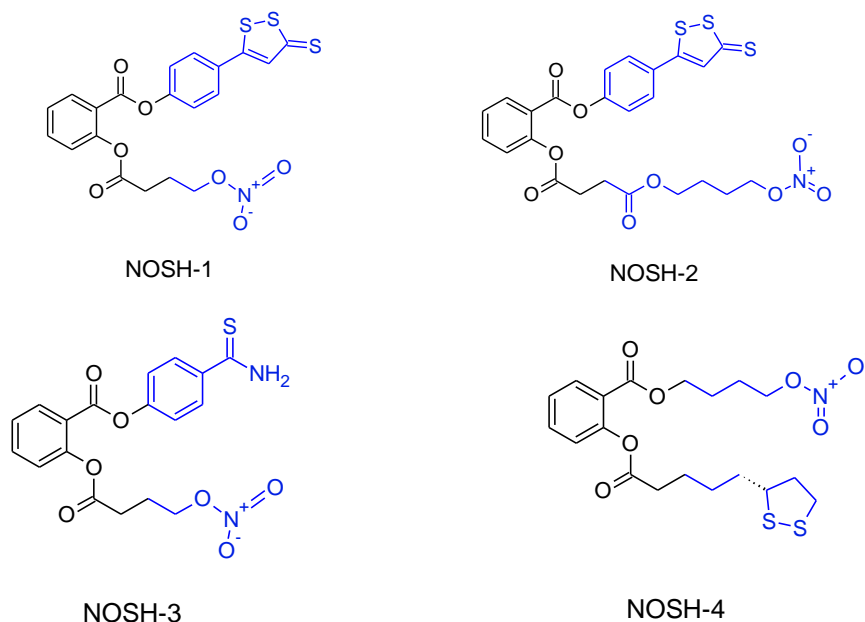


Figura 18. Estructuras químicas de compuestos denominados NOSH [94].

Otros agentes híbridos del ácido betulínico y otros triterpenoides como el ácido ursólico y el ácido oleanólico con azidotimidina (Figura 19), un nucleósido inhibidor de la transcriptasa reversa, han demostrado poseer capacidad citotóxica [90], lo que constituye otro éxito en la utilidad de estas moléculas híbridas.

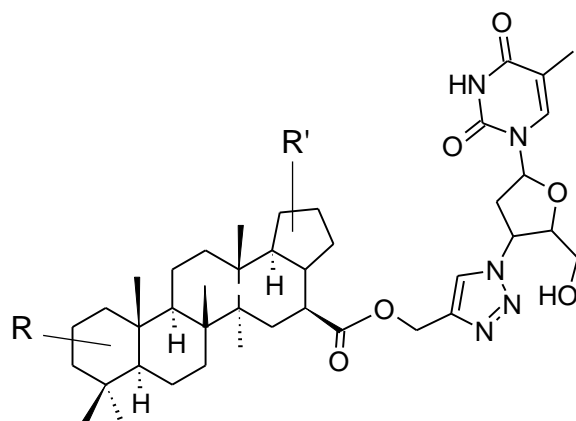


Figura 19. Estructura química general de los conjugados de triterpenoides con azidotimidina (AZT).

Por lo tanto, una molécula híbrida de ácido ursólico y una región liberadora de NO y/o H₂S, podría potenciar el efecto vasodilatador de la molécula original tanto por la posible activación directa de las enzimas eNOS y CSE por el ácido ursólico [18], como por el incremento en los niveles del H₂S y el NO.

3. Justificación

A nivel global las enfermedades cardiovasculares son el origen de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total, siendo las complicaciones derivadas de la hipertensión arterial las causantes de 8 millones de esas muertes. La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, que son importantes causas de mortalidad en México. Las complicaciones de la hipertensión arterial se relacionan directamente con la magnitud del aumento de la tensión arterial y el tiempo de evolución. Por estas razones el tratamiento temprano y efectivo de la hipertensión arterial tiene importantes beneficios para la salud de la población.

Entre las principales estrategias farmacológicas para tratar la hipertensión se encuentran los diuréticos, los bloqueadores de los canales de calcio, los α -bloqueadores, los β -bloqueadores, los inhibidores del sistema nervioso simpático y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se deben administrar varios de estos fármacos de manera conjunta para controlar la enfermedad, ya que poseen una baja efectividad. De manera adicional, la utilización de estos fármacos disminuye la calidad de vida del enfermo, debido a los efectos adversos del tratamiento prescrito.

El desarrollo de la hipertensión se ha asociado con la disfunción endotelial y a la reducción de la disponibilidad de transmisores gaseosos, tales como el NO y el H₂S, mediada por la disminución en la actividad o la expresión de las enzimas que los producen. Al respecto, se han identificado una serie de productos naturales como los alcaloides, triterpenos y flavonoides que inducen la dilatación del músculo liso vascular, a través de la liberación de NO y H₂S, los cuales actúan de manera conjunta en el proceso de vasodilatación. Ambas moléculas no requieren de un receptor de membrana para efectuar su función vasodilatadora, por lo que el diseño

de moléculas liberadoras de estos gases representa una nueva estrategia farmacológica para el tratamiento de la hipertensión.

Con base en estos antecedentes, es evidente que moléculas que sean capaces de activar a las enzimas productoras de NO o H₂S, o que liberen estas moléculas por sí mismas, incrementando los niveles de estos transmisores gaseosos, podrían ejercer un potente efecto vasodilatador e hipotensor y servirían como compuestos líder para ser desarrollados como fármacos alternativos para tratar enfermedades cardiovasculares, tales como la hipertensión arterial.

4. Pregunta de investigación

¿Se pueden obtener moléculas con ayuda de estudios *in silico* y síntesis orgánica que produzcan un efecto vasodilatador mediante la activación de las vías del NO/GMP_C y H₂S/K_{ATP}?

5. Hipótesis

Las moléculas obtenidas por estudios *in silico* y síntesis orgánica producen un efecto vasodilatador mediante la activación de las vías del NO/GMP_C y H₂S/K_{ATP}, causado por una activación directa de las enzimas eNOS y CSE o a través de la liberación de estos transmisores gaseosos.

6. Objetivo general

Determinar si los compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE y derivados de ácido ursólico liberadores de H₂S o compuestos liberadores de NO, ejercen su efecto vasodilatador mediante la activación de las vías del NO/GMP_C y H₂S/K_{ATP}, a través de la estimulación de receptores membranales, la activación directa de las enzimas eNOS y CSE o a través de la liberación de NO o H₂S.

7. Objetivos particulares

1. Identificar, mediante el método de acoplamiento molecular, compuestos con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE, usando como fuente de moléculas algunas librerías virtuales de compuestos comerciales, de origen natural y sintético.
2. Proponer un modelo general de interacción proteína-ligando con base en los elementos farmacofóricos virtuales identificados.
3. Realizar los ensayos de dinámica molecular de los compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE.
4. Determinar el efecto vasodilatador de los compuestos obtenidos por estudios in silico que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE y compararlos con compuestos vasodilatadores conocidos.
5. Cuantificar la liberación de H₂S inducida por el compuesto con mayor efecto vasodilatador identificado previamente por nuestros estudios in silico.

6. Determinar los diferentes blancos moleculares involucrados en el efecto vasodilatador del compuesto con mayor efecto vasodilatador.

7. Sintetizar e identificar por técnicas espectroscópicas: a) una molécula híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H₂S que incremente el efecto vasodilatador de este triterpeno y b) una subestructura liberadora de NO.

8. Metodología

8.1 Identificación mediante el método de acoplamiento molecular, de compuestos con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE

Preparación de las estructuras de la eNOS y la CSE

Ambas enzimas de *H. sapiens* se han resuelto por cristalografía de rayos X y sus coordenadas atómicas se encuentran depositadas en la base de datos de proteínas (Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>). En este proyecto se usaron las estructuras de la eNOS (PDB: 3NOS) [95] y de la CSE (PDB: 3COG) [42] que presentan la mejor resolución disponible para estas estructuras, además de contar con los cofactores necesarios para su actividad en estado nativo. Es normal que las estructuras resueltas por cristalografía de rayos X presenten errores y cuenten con información adicional, por lo que las estructuras fueron sometidas a un proceso de corrección y preparación usando el módulo *Protein preparation wizard* disponible en el conjunto de programas Maestro (Schrödinger Inc. <http://www.schrodinger.com>), asignando órdenes de enlace, adicionando átomos faltantes, borrando moléculas de agua, iones accesorios y ligandos, así como completando residuos faltantes y eligiendo la conformación más adecuada de cadenas laterales ambiguas.

Construcción y preparación de ligandos

Se utilizaron cuatro bibliotecas virtuales de compuestos obtenidas de la base de datos ZINC (<http://zinc.docking.org/>) [96–98]: 1) Productos naturales (ZINC-Natural Products: 89,425 compuestos), 2) Fármacos aprobados (ZINC-DrugBank: 1,731 compuestos), 3) Biblioteca comercial (ZINC-Maybridge Commercial vendor library: 14,400 compuestos) y 4) Base de datos diversa del Instituto Nacional de Cáncer de USA (NCI Diverse: 1,817 compuestos). Las cuatro bibliotecas se combinaron en una base de datos conjunta con 107,373 compuestos. En seguida,

se analizó esta base de datos con el programa MOE [99] para seleccionar estructuras identificadas por poseer un código SMILES único. La base de datos que resultó de este análisis se procesó con el programa LigPrep (Schrödinger Release 2015-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015), para obtener un conjunto de moléculas con las siguientes propiedades correspondientes a una molécula tipo líder (“lead-like molecules”): 1) peso molecular menor a 500 Da (MW), área superficial topológica polar igual o menor a 140 Å²(TPSA) y coeficiente de partición octanol-agua menor a 5 (log P); 2) igual o menos de 10 grupos aceptores y 5 grupos donadores de puentes de hidrógeno (HBA y HBD, respectivamente); and 3) topología molecular (reducido número y tamaño de los anillos, limitada flexibilidad molecular y número de enlaces rotables (igual o menor a 10). El programa LigPrep se utilizó para generar los estados de protonación de los compuestos (pH = 7.0 ± 2.0) y todas las formas tautoméricas en ese rango de pH. En el caso de moléculas quirales, se respetó dicha quiralidad y, en caso contrario, se generaron los estereoisómeros, por lo que la biblioteca de “moléculas tipo líder” (lead-like library) resultante incluyó 176,500 estructuras.

Acoplamiento molecular

La identificación virtual de alto rendimiento (HTVS) de las moléculas con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE se realizó con el programa HTVS Glide program [100–102] (Glide, version 6.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) y, conforme a los resultados obtenidos con este programa, las 2000 estructuras químicas que resultaron con mayor afinidad por los sitios alostéricos identificados previamente en cada una de las enzimas [18], se sometieron a nuevos ensayos de acoplamiento molecular con cuatro diferentes programas: Glide XP [102], AutoDock [103], AutoDock Vina [104] y UCSF-Dock [105]. Los compuestos que resultaron con mayor afinidad, medida en términos de “docking scores” (puntajes de interacción o acoplamiento) y con una actividad biológica o farmacológica conocida (denominados en este trabajo como “compuestos consenso”) se seleccionaron para realizar su evaluación farmacológica (Figura 20).

Identificación virtual de alto rendimiento (*high-throughput virtual screening*) de moléculas con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE

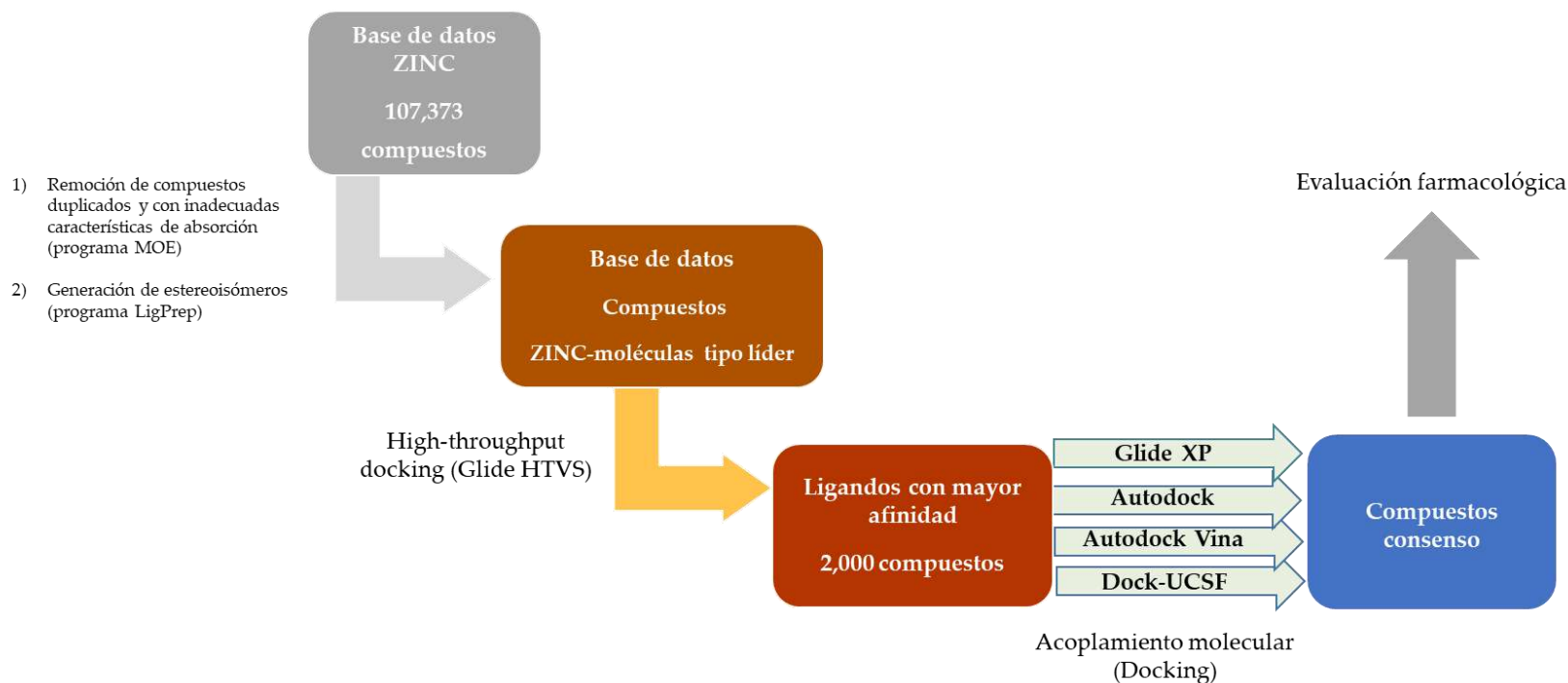


Figura 20. Identificación de compuestos, mediante el método de acoplamiento molecular. Una vez que los compuestos duplicados se removieron de la base de datos ZINC, los compuestos tipo líder se seleccionaron y se sometieron a la identificación virtual de alto rendimiento. Los compuestos con los puntajes de afinidad más altos se sometieron a nuevos ensayos de acoplamiento utilizando los programas Glide XP, Autodock, Autodock Vina y Dock-UCSF. Los compuestos consenso identificados por este método se evaluaron farmacológicamente.

Este procedimiento se llevó a cabo en cuatro programas distintos: Glide XP [102] de la suite Maestro, AutoDock [103], Autodock Vina [104] y UCSF-Dock [105]. Los cuatro programas dieron como resultado diversas estructuras, de las cuales sólo se consideraron aquellas que presentaron un consenso entre los 4 programas. Estos se usaron con los parámetros normales de uso en las estructuras cristalográficas de las 2 proteínas.

8.2 Modelo general de interacción proteína-ligando con base en los elementos farmacofóricos virtuales identificados

Para identificar los “elementos farmacofóricos” de los compuestos con mayor afinidad por las enzimas eNOS y CSE encontrados por acoplamiento molecular (punto 8.1), denominados como “compuestos consenso”, se utilizó el programa computacional Pharmer (2015, Pittsburg, PA, USA) [106]. Con este programa se identificaron los elementos comunes de los compuestos consenso en los complejos proteína-ligando como los donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, sistemas aromáticos, grupos hidrofóbicos y grupos iónicos en las conformaciones tridimensionales de los ligandos. Estas características fueron agrupadas de acuerdo a su naturaleza, posición y tamaño, usando el método estadístico medoides [107], incluido en el paquete cluster [108] del programa computacional estadístico R (v. 2.0.7-1, Vienna, Austria) [109].

8.3 Ensayos de dinámica molecular de los compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE

Una vez obtenidas las estructuras enzima-ligando, estos complejos se sometieron a una simulación de dinámica molecular con GROMACS[110], usando el campo de fuerza AMBER [111] y ajustando los parámetros necesarios para el ligando con ACPYPE [112]. El complejo se sometió a una minimización de energía seguida de un periodo de equilibrio de posición restringida y libre, para finalmente llevarse a

cabo una simulación de 10 ns en un ensamble isotérmico-isobárico (300 K, 1 atm). Una vez obtenidas las simulaciones, se calculó la energía libre de unión usando la ecuación de la energía de interacción [113] como una noción de afinidad del ligando por la enzima:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \alpha[(V_{\text{LJ}})_{\text{enlace}} - (V_{\text{LJ}})_{\text{libre}}] + \beta[(V_{\text{CL}})_{\text{enlace}} - (V_{\text{CL}})_{\text{libre}}] + \gamma ,$$

donde $(V_{\text{LJ}})_{\text{bound}}$ es la energía promedio de potencial Lennard-Jones para la interacción ligando-proteína; $(V_{\text{LJ}})_{\text{free}}$ es la energía promedio de potencial Lennard-Jones para la interacción ligando-disolvente; $(V_{\text{CL}})_{\text{bound}}$ es la energía electrostática promedio de la interacción ligando-proteína; $(V_{\text{CL}})_{\text{free}}$ es la energía electrostática promedio de la interacción ligando-disolvente; mientras que α , β y γ son coeficientes que para ligandos tipo fármaco están fijados en $\alpha=0.18$, $\beta=0.5$ y $\gamma=0$.

8.4 Determinación del efecto vasodilatador

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y lo indicado por el International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Las ratas Wistar macho (250-300 g) se adquirieron en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Los animales permanecieron un periodo máximo de dos días en un espacio especial para mantenimiento temporal de animales de experimentación, conforme al capítulo 6 de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, en la planta baja del edificio 2 de la Facultad de Química de la UAQ. Estos animales se mantuvieron en jaulas de acrílico que cumplen con las características establecidas en el capítulo 5 de la NOM-062-ZOO-1999 y el manejo se realizó conforme a los apartados 5.1.3 a 5.1.6 de la misma norma, suministrando a los roedores agua embotellada que cumple con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 y alimento especial para roedores *ad libitum* que cumple con las características establecidas en el apartado 4.7 y 5.1.3.1 de la NOM-062-ZOO-1999, con periodos de luz/oscuridad de 12 horas cada

uno. Los animales se sacrificaron por decapitación (apartado 9.5.3.3 de la NOM-062-ZOO-1999) y se extrajo la aorta torácica descendente, la cual se colocó en una solución fría de Krebs-Henseleit para aorta (pH 7.4; 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 30 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄ y 5 mM D-glucosa) [114] y se cortó en anillos de 4 a 5 mm. Los residuos peligrosos biológico infecciosos se etiquetaron y almacenaron siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 por un periodo menor a 30 días. Posteriormente se contrató un recolector de residuos biológico infecciosos y un servicio de incineración de los mismos que cuenta con la autorización de SEMARNAT para la prestación de estos servicios (Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos Art. 42; Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos Art. 46 –VI y 81).

Los compuestos de prueba y los compuestos control para los ensayos farmacológicos y bioquímicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los compuestos isoxsuprina, carvedilol, propranolol y pindolol fueron provistos como mezclas racémicas. Las soluciones de compuestos insolubles en agua se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO), con una concentración final en la cámara de incubación del 0.2% (v/v). Los demás compuestos y las diluciones correspondientes se prepararon en agua destilada para obtener las concentraciones deseadas en las cámaras de tejido aislado (de 0.001 a 3 µM o de 1 µM a 3.5 M, dependiendo de la potencia de los compuestos).

Los anillos de aorta de rata previamente extraídos, fueron montados en cámaras de incubación de 5 ml con solución de Krebs-Henseleit a 37 °C y burbujeo constante de una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Los cambios en el tono del músculo liso arterial en presencia de los compuestos de prueba, se registraron por medio de un transductor de fuerza Grass modelo FT03 unido a un polígrafo Grass de 6 canales Modelo 7D (Astro-Med, Inc. West Warwick, RI. USA). El tejido se sometió a una tensión de reposo (basal) de 1.5 g y se dejó estabilizar por 60 min. Una vez que el tejido alcanzó el equilibrio, los segmentos se precontrajeron con una solución de

100 mM de KCl durante 15 min para estimular el músculo liso arterial. A continuación, se eliminó el KCl, lavando de 3 a 8 veces cada una de las cámaras. La aorta se dejó reposar hasta alcanzar nuevamente su tensión basal de 1.5 g. Una vez estabilizado el tejido, los segmentos de aorta se contrajeron con fenilefrina (1 μ M).

Los diferentes compuestos de prueba se evaluaron conforme a su potencia en dos intervalos de concentraciones, de 0.001 a 3 μ M y de 3 μ M a 3.5 M. Las diferentes concentraciones de las muestras se adicionaron a las cámaras de tejido aislado 20 min después de haber inducido la contracción de la aorta con la fenilefrina. La respuesta provocada por cada una de las concentraciones de los compuestos de prueba en la aorta se registró durante un período de 10 min y los cambios en la tensión producidos por las sustancias se detectaron mediante los transductores de fuerza. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de relajación, tomando como base la contracción alcanzada al adicionar la fenilefrina [114]. La participación de las vías del NO/GMP_c y del H₂S/K_{ATP} en el efecto vasodilatador de los “compuestos consenso” se evaluó incubando los anillos de aorta por 20 minutos en presencia de NG-nitro-L-arginina metil éster 100 μ M (L-NAME, inhibidor de la NOS) y DL-propargilglicina 10 mM (PAG, inhibidor de la CSE) [18,114,115]. La participación de los adrenoreceptores β 2 en el efecto vasodilatador de la isoxsuprina se determinó incubando por 20 minutos los anillos de aorta en presencia de 1 μ M de propranolol (un antagonista no selectivo de los adrenoreceptores β 1 y β 2).

Para evaluar si el bloqueo de adrenoreceptores α 1 contribuía al efecto vasodilatador inducido por isoxsuprina, se construyeron curvas concentración respuesta adicionando concentraciones no acumulativas de fenilefrina (de 1×10^{-8} a 1×10^{-3} M, con cinco minutos de contacto), empleado como vasoconstrictor, se añadió a las cámaras de incubación ya sea solo o después de la adición de isoxsuprina (1×10^{-6} M) o prazosina (1.2×10^{-7} M, antagonista selectivo de adrenoreceptores α 1). Los compuestos de prueba (isoxsuprina o prazosina) se lavaron del tejido después de la adición de cada concentración de prueba de fenilefrina y se volvieron a adicionar a la cámara 5 minutos antes de la adición de la siguiente concentración del agonista.

Los cambios en el tono de la aorta causados por fenilefrina se expresaron como porcentajes de la contracción con respecto a la máxima contracción generada al añadir el agonista [116].

8.5 Cuantificación de la liberación de H₂S

Este ensayo enzimático se llevó a cabo para cuantificar por un método colorimétrico la concentración de H₂S. Los segmentos de aorta se congelaron en nitrógeno líquido y se homogenizaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 con inhibidor de proteasas (Sigmafast protease inhibitor cocktail en tabletas libres de EDTA). En seguida, el homogenado de aorta y todos los componentes de la mezcla de incubación (piridoxal-5'-fosfato, 2 mM; L-cisteína, 10 mM e isoxsuprina o isoxsuprina más propargilglicina, 0.026 µg/ml y 10 mM, respectivamente) fueron puestos en tubos de vidrio con tapones de goma y un pocillo de plástico (hecho con un microtubo de 2 ml), al cual se le agregaron 0.5 ml de acetato de zinc 1% (w/v) pH 10 y una tira de papel filtro (0.5 cm x 2.5 cm) para atrapar el H₂S generado. El oxígeno contenido en cada frasco fue purgado inyectando N₂ por 20 segundos. La mezcla se dejó reaccionar por 1 hora a 37°C y la reacción se detuvo al agregar ácido tricloroacético al 50%, dejándose una hora más a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se agregaron 50 µl de N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) (20 mM) en HCl 1.2 M y 50 µl de FeCl₃ (30 mM) en HCl 1.2 M. La absorbancia de la solución resultante se midió a 670 nm y la concentración de H₂S se calculó usando una curva de calibración hecha con una solución estándar de NaHS (0-100 µM) [117].

8.6 Análisis estadístico

Se realizaron 6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de los compuestos de prueba. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error estándar del promedio (S.E.M.). Los datos experimentales generados en cada evaluación se ajustaron a una ecuación sigmoideal y se graficaron mediante el programa PRISMA 5.0 Graph Pad (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)

para la obtención de las curvas concentración respuesta. En cada caso se determinó la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}). La CE_{50} se define como la concentración de sustancia de prueba (μM) necesaria para producir el 50% de la relajación máxima sobre el tejido precontraído con fenilefrina y el E_{max} indica la eficacia con la que el compuesto relajan la aorta aislada de rata.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba post hoc de Dunnett, usando el programa de estadística GraphPad Prism 7.02. Los valores de $*p < 0.01$, $**p < 0.001$, $***p < 0.0001$ se consideraron significativos. En la figura 29 el análisis estadístico fue hecho usando ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey.

8.7 Síntesis e identificación de a) una moléculas híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H_2S y b) una subestructura liberadora de NO

Las síntesis se realizaron conforme se indica en las Figuras 21 y 22.

1. Síntesis de una molécula híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H_2S

Primer paso: Síntesis de ácido ursólico acetilado (reportado en [118])

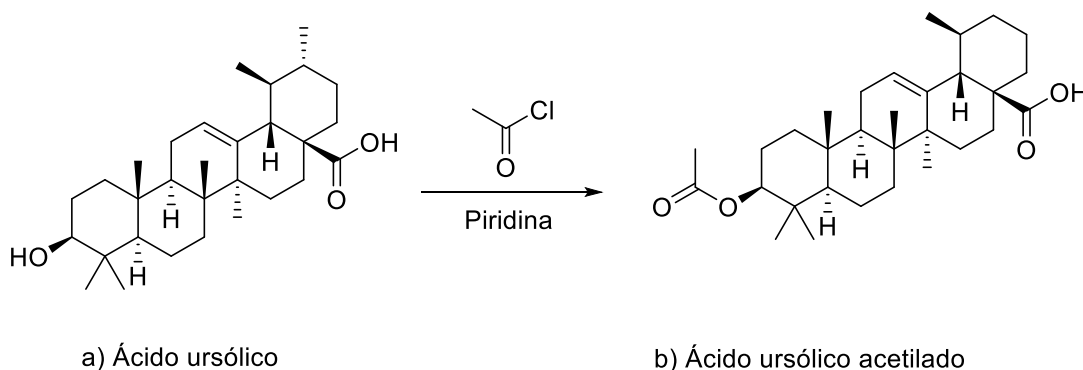
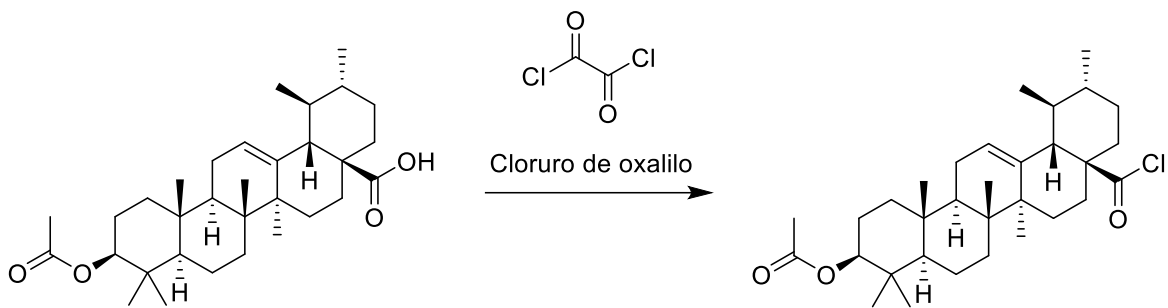


Figura 21. Síntesis de un compuesto derivado de ácido ursólico liberador de H_2S (DMR-S1).

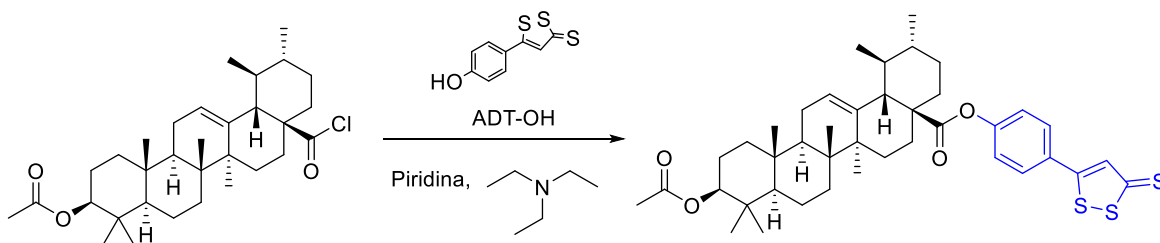
Segundo paso: Síntesis del cloruro de ácido ursólico acetilado.



b) Ácido ursólico acetilado

c) Cloruro del ácido ursólico acetilado

Tercer paso: Acoplamiento de la subestructura liberadora de H₂S y el cloruro de ácido ursólico acetilado.

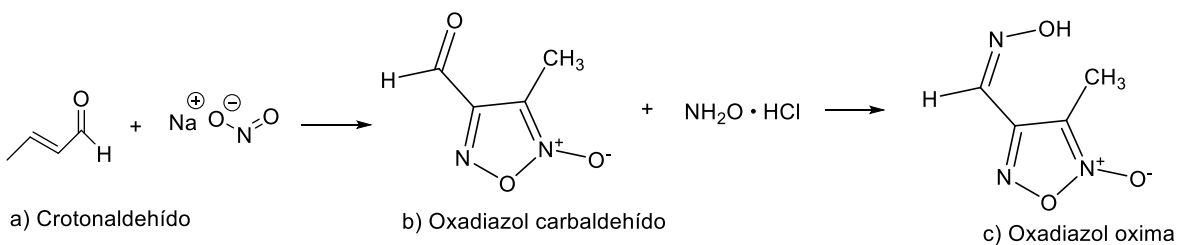


c) Cloruro del ácido ursólico acetilado

d) Molécula híbrida DMR-S1 liberadora de H₂S

Figura 21 (continuación). Síntesis de un compuesto derivado de ácido ursólico liberador de H₂S (DMR-S1).

2. Síntesis de una subestructura liberadora de NO



a) Crotonaldehído

b) Oxadiazol carbaldehído

c) Oxadiazol oxima

Figura 22. Síntesis de una subestructura liberadora de NO (DMR-N1)

Al término de las reacciones, los compuestos se purificaron por cristalización y/o cromatografía en columna usando mezclas hexano/acetato de etilo como eluyentes, para finalmente caracterizar los productos por técnicas espectroscópicas.

Cabe mencionar que este procedimiento sintético se llevó a cabo bajo los criterios de la química sustentable (IUPAC, EPA) por técnicas de microescala, minimizando el consumo de reactivos y disolventes, así como disminuyendo la generación de residuos.

9. Resultados

9.1 Identificación de compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE

La figura 20 muestra la secuencia con la que se realizó la búsqueda de alto rendimiento de compuestos con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE. De la base de datos denominada ZINC de bibliotecas virtuales, se obtuvieron 107,373 compuestos que contaban con un código SMILES único. El programa computacional MOE [99] se usó para seleccionar compuestos no reactivos y con adecuadas propiedades físicoquímicas (peso molecular no mayor a 500 g/mol y menos de 5 grupos donadores de puentes de hidrógeno y menos de 10 grupos aceptores de puentes de hidrógeno). Para generar las estructuras 3D de los compuestos seleccionados se usó el programa LigPrep (Schrödinger Release 2015-4), considerando su estereoquímica, estados de protonación y formas tautoméricas.

Este procedimiento dio como resultado una base de datos de 176,500 estructuras de “compuestos tipo líder” que se sometieron a un ensayo de acoplamiento molecular de alto rendimiento con los sitios de unión alostérica de las enzimas eNOS y CSE, identificados previamente con compuestos triterpénicos [18], usando el programa “GLIDE High-Throughput Virtual Screening (HTVS) docking module (Glide, version 6.2, Schrödinger)” [100–102] y las estructuras de las enzimas con más alta resolución obtenidas de la base de datos Protein Data Bank, eNOS (PDB:3NOS) y CSE (PDB:3COG). Los 2000 ligandos resultantes que presentaron mayor afinidad por ambas enzimas, se sometieron posteriormente a ensayos de acoplamiento molecular con el sitio de unión de interés (sitio hipotético de activación alostérica), utilizando cuatro programas diferentes: Glide XP [102], AutoDock [103], AutoDock Vina [104], and UCSF-Dock [105]. Los nueve compuestos con mejores puntajes de afinidad en consenso en los cuatro programas empleados [119] se clasificaron como “compuestos consenso” (Tabla 3).

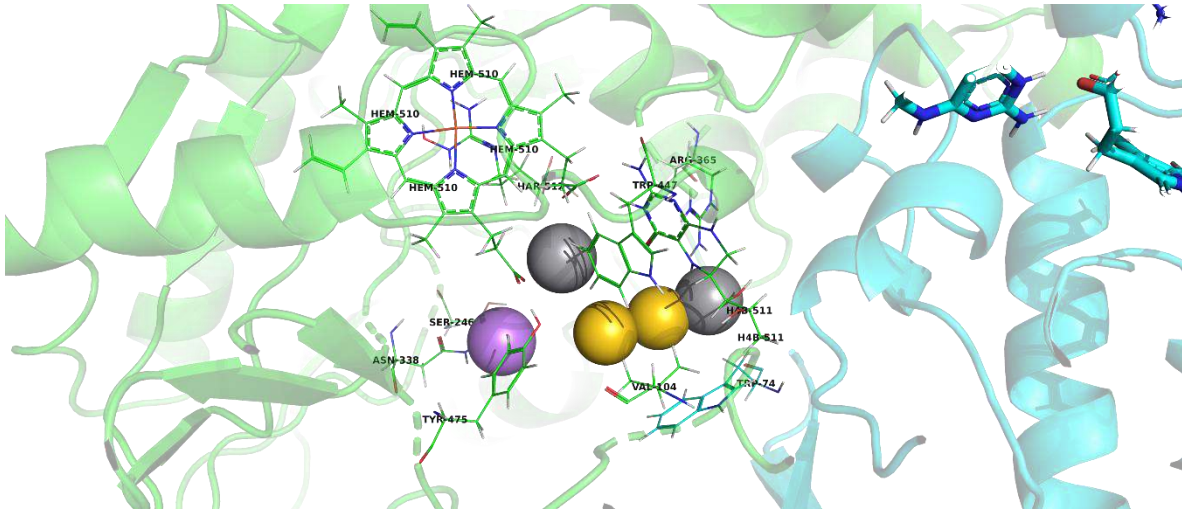
Tabla 3. Puntajes de afinidad (docking scores) por programa computacional y percentil consenso de los compuestos seleccionados.

Compuestos consenso	AD	Glide	Vina	D1	D2	C	AD	Glide	Vina	D1	D2	C
	eNOS (ΔG° , kcal/mol)						CSE (ΔG° , kcal/mol)					
Nebivolol	-12.55	-8.16	-8.4	-231	122.08	0.02	-11.16	-6.11	-7.2	-196	-36.68	0.02
Carvedilol	-11.38	-7.785	-6.7	-279	-2.683	0.05	-11.62	-6.294	-6.9	-168	-13.164	0.09
Fenoterol	-10.38	-7.798	-7.9	-255	-12.507	0.05	-8.31	-6.62	-6.2	-160	-21.05	0.023
Propranolol	-9.87	-6.625	-7.4	-220	39.78	0.17	-9.29	-4.675	-6.7	-135	-22.099	0.30
Midodrina	-7.68	-7.682	-7.3	-214	97.38	0.20	-6.69	-4.865	-5.5	-149	-21.88	0.31
Pindolol	-9.66	-6.54	-7.1	-199	27.858	0.25	-7.72	-4.872	-6.1	-88	9.469	0.34
Isoxsuprina	-11.38	-6.035	-7.6	-176	176.391	0.25	-8.91	-5.873	-6.1	-120	-13.856	0.44
Sitagliptina	-10.01	-6.023	-7.0	-241	22.632	0.26	-8.09	-5.156	-7.0	-175	-15.915	0.27
Epicatequina	-9.82	-5.834	-6.6	-235	-3.102	0.30	-7.15	-4.65	-7.1	-151	-19.092	0.26

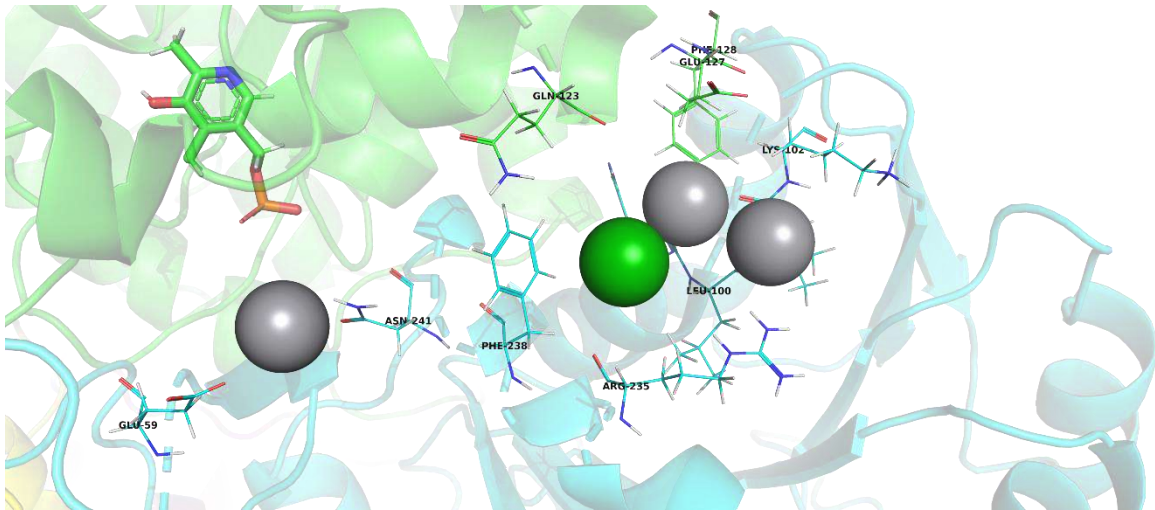
AD: AutoDock 4.2, Glide: Glide XP, D1: Dock1 (UCSF-Dock), D2: Dock2 (UCSF-Dock), C: Consensus

9.2 Modelo general de interacción proteína-ligando con base en los elementos farmacofóricos virtuales identificados

Con el fin de obtener información acerca de los requerimientos estructurales necesarios para la mejor interacción entre los compuestos consenso y las enzimas eNOS y CSE, se realizó la búsqueda de los elementos farmacofóricos en los mejores complejos proteína-ligando (en términos de puntaje de afinidad, docking score), obtenidos en consenso para los cuatro ensayos de acoplamiento molecular. Para ello, se aplicó el método "Partitioning Around Medoids (PAM)" para agrupar estos elementos y así identificar los principales grupos funcionales e interacciones proteína-ligando esenciales para alcanzar la mayor afinidad por ambas enzimas (Figura 23). Este análisis estadístico, que no es un modelo de farmacoforo en el sentido estricto, puede ser útil para la futura identificación de compuestos activos.



A)



B)

Figura 23. Modelo de elementos farmacofóricos con (A) eNOS (estructura 3NOS) y (B) CSE (estructura 3COG). Los donadores de puentes de hidrógeno se representan en gris, las interacciones de tipo aromático en verde, las interacciones hidrofóbicas en amarillo y una interacción con un aceptor de puentes de hidrógeno en morado.

En el caso de la eNOS, los principales aminoácidos que interactúan con los compuestos consenso se ubican tanto en el canal de acceso del sustrato, como en el sitio catalítico. Los compuestos probados mostraron dos interacciones entre los grupos donadores de puentes de hidrógeno y el grupo hemo (HEM) y el

cofactor tetrahidrobiopterina (H4B) (representados en gris), también mostraron interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Trp447 y Val104 (en amarillo), y una interacción adicional entre un grupo aceptor de puentes de hidrógeno y el aminoácido Asn338 (en morado). Estos resultados sugieren que los compuestos consenso se unen a eNOS en diferentes aminoácidos que aquellos a los que se unen los triterpenos (ácido ursólico y uvaol), debido principalmente a diferencias estructurales como el fuerte carácter hidrofóbico de los triterpenos contra la presencia de un mayor número de grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno presentes en los “compuestos consenso”.

Con respecto al modelo de CSE, los compuestos consenso interactúan con aminoácidos localizados tanto en la subunidad A como en la subunidad B de la enzima, lo cual respalda la propuesta hecha con anterioridad [18] sobre la localización del sitio de unión al ligando en la interfase entre las dos subunidades. Estos residuos involucrados en la interacción ligando-proteína, se encuentran en un radio de aproximadamente 12.5 Å con respecto a la ubicación del piridoxal fosfato de la cadena A (Figura 23), que puede ser considerada una distancia grande como para tener influencia sobre el sitio catalítico. Sin embargo, este sitio de unión identificado se ubica muy cerca del canal de acceso al sustrato hacia el sitio catalítico que se forma entre la interfase A-B de esta enzima homotetramérica. Las interacciones de puentes de hidrógeno se observaron entre grupos donadores de puentes de hidrógeno de los ligandos y los aminoácidos Glu59, His99 y Leu101 de CSE (en gris) y, adicionalmente también se encontró una interacción aromática adicional con Phe238 (en verde). Estos hallazgos sugieren que los compuestos consenso se unen en el sitio de unión a triterpenos sugerido en trabajos previos [18] y podrían funcionar como activadores alostéricos de esta enzima.

9.3 Determinación del efecto vasodilatador de los compuestos consenso y la participación de las vías del NO/GMPc y H₂S/K_{ATP} en sus mecanismos de acción

Todos los “compuestos consenso” seleccionados produjeron una relajación significativa de la aorta de rata dependiente de la concentración y alcanzaron un efecto máximo (E_{max}) del 100%. Los compuestos más potentes fueron isoxsuprina ($EC_{50} = 0.046 \pm 0.004 \mu M$) y carvedilol ($EC_{50} = 0.069 \pm 0.003 \mu M$), los cuales fueron aproximadamente cinco veces menos potentes que el nitroprusiato de sodio (SNP: $EC_{50} = 0.0099 \pm 0.001 \mu M$), usado como control positivo.

La EC_{50} de Nebivolol fue de $2.014 \pm 0.215 \mu M$, mientras que sitagliptina, fenoterol, midodrina, epicatequina, pindolol y propranolol presentaron valores de EC_{50} mayores a $18 \mu M$. Las curvas concentración-respuesta (CRC) en la Figura 24, muestran el efecto vasodilatador obtenido con los compuestos consenso y con los controles positivos [SNP, acetilcolina (ACh) y sulfuro ácido de sodio (NaHS)] y los valores de EC_{50} y E_{max} se resumen en la Tabla 4.

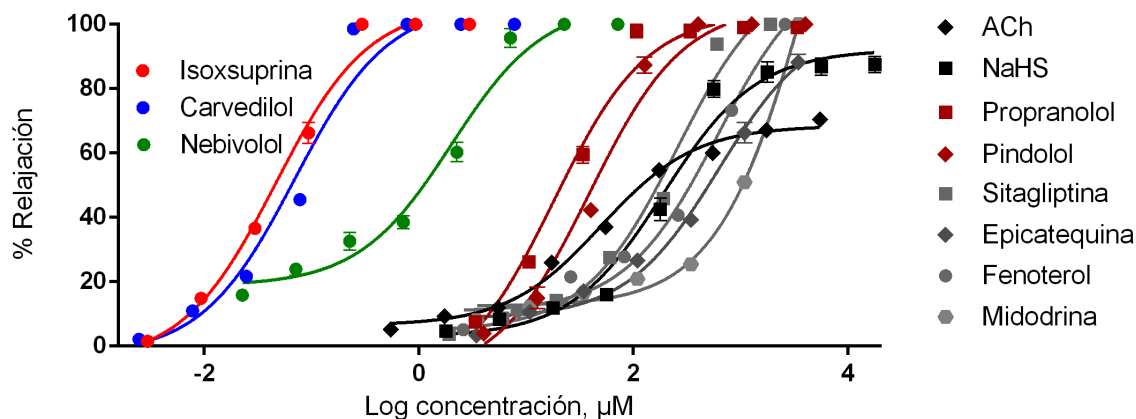


Figure 24 Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos consenso y los controles positivos usados (SNP, ACh y NaHS). Los valores se expresan como el promedio \pm SEM ($n = 6$).

Tabla 4. Valores de EC₅₀ de los “compuesto consenso” y controles positivos

Compuesto	EC₅₀ (μM) ± SEM	E_{max} (%) ± SEM
Controles		
SNP	0.0099 ± 0.001	100.7 ± 0.747
Acetilcolina	50.30 ± 5.126	68.46 ± 1.122
NaHS	191.0 ± 9.841	92.17 ± 2.721
Compuestos más potentes		
Isoxsuprina	0.046 ± 0.004	106.1 ± 0.343
Carvedilol	0.069 ± 0.003	106.6 ± 0.115
Nebivolol	2.010 ± 0.215	106.7 ± 0.543
Compuestos menos potentes		
Propranolol	18.120 ± 1.419	103.6 ± 1.663
Pindolol	39.490 ± 2.603	106 ± 0.463
Sitagliptina	252.30 ± 8.058	117.6 ± 0.497
Fenoterol	608.60 ± 43.225	120.3 ± 1.548
Epicatequina	626.40 ± 67.372	101.5 ± 2.400
Midodrina	4698 ± 324.691	219.5 ± 8.219

Los datos son promedios ± SEM, n=6.

La inhibición de la eNOS con NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 100 μM, desplazó significativamente a la derecha la curva concentración respuesta de los compuestos consenso, con el respectivo incremento en sus valores de EC₅₀ ($p < 0.05$) (Tabla 5).

Aunque previamente se ha descrito que el NO está involucrado en el efecto vasodilatador del carvedilol [120], el nebivolol [121], el propranolol [122], el pindolol [123] y la epicatequina [59], ésta es la primera vez que se demuestra que la activación de la vía del NO/GMPc contribuye al efecto vasodilatador de la midodrina, la sitagliptina, el fenoterol y la isoxsuprina. Además, el efecto vasodilatador de todos los compuestos consenso, con la excepción de nebivolol y propranolol, fue reducido por DL-propargilglicina (PAG) 10 mM, como se demostró por el incremento en sus valores de EC₅₀ (Tabla 5). Ambos resultados sugieren que la vasodilatación producida por los compuestos consenso involucra la activación de eNOS y/o CSE.

Tabla 5. Valores de EC₅₀ de los “compuestos consenso” y la participación de las vías de señalización del NO/GMPc y el H₂S/K_{ATP} en su efecto vasodilatador

Compuesto	Control EC ₅₀ (μM) ± SEM	L-NAME EC ₅₀ (μM) ± SEM	PAG EC ₅₀ (μM) ± SEM
<i>Vasodilatadores más potentes</i>			
Isoxsuprina	0.0461 ± 0.004	0.3846 ± 0.040***	0.3255 ± 0.026***
Carvedilol	0.0695 ± 0.003	0.3643 ± 0.011***	0.1500 ± 0.019**
Nebivolol	2.0135 ± 0.215	11.290 ± 1.501***	2.5280 ± 0.229
<i>Vasodilatadores menos potentes</i>			
Propranolol	18.120 ± 1.419	40.430 ± 5.696**	27.900 ± 3.651
Pindolol	39.490 ± 2.603	166.1 ± 3.610***	89.47 ± 7.940***
Sitagliptina	252.30 ± 8.058	864.3 ± 8.692***	436.2 ± 12.63***
Fenoterol	608.6 ± 43.225	882.1 ± 27.513***	1038 ± 22.241***
Epicatequina	626.4 ± 67.372	1789 ± 389.469*	3087 ± 552.718**
Midodrina	4698 ± 324.691	8618 ± 2060.477*	10076 ± 1955.342*

Los datos son promedios ± SEM ($n = 6$). El análisis estadístico se realizó usando el análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Dunnett.

Los valores de * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ se consideraron significativos.

En la Figura 25 se muestran las estructuras químicas de los compuestos vasodilatadores más potentes y en la Figura 26 se observa que las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP} contribuyen de manera importante en el efecto vasodilatador producido por isoxsuprina y carvedilol y que el efecto vasodilatador producido por nebivolol, es independiente de la vía del H₂S/K_{ATP}.

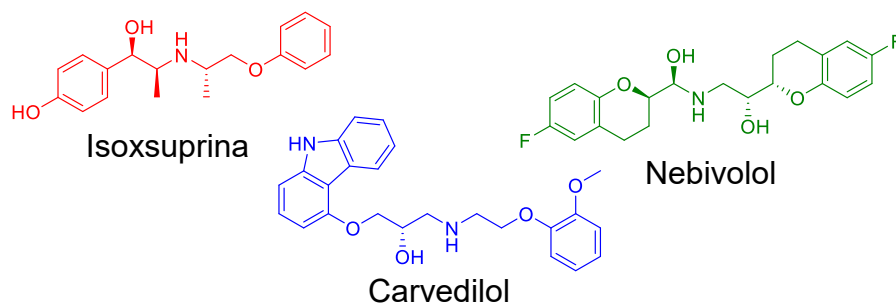


Figura 25. Estructuras químicas de los compuestos consenso más potentes.

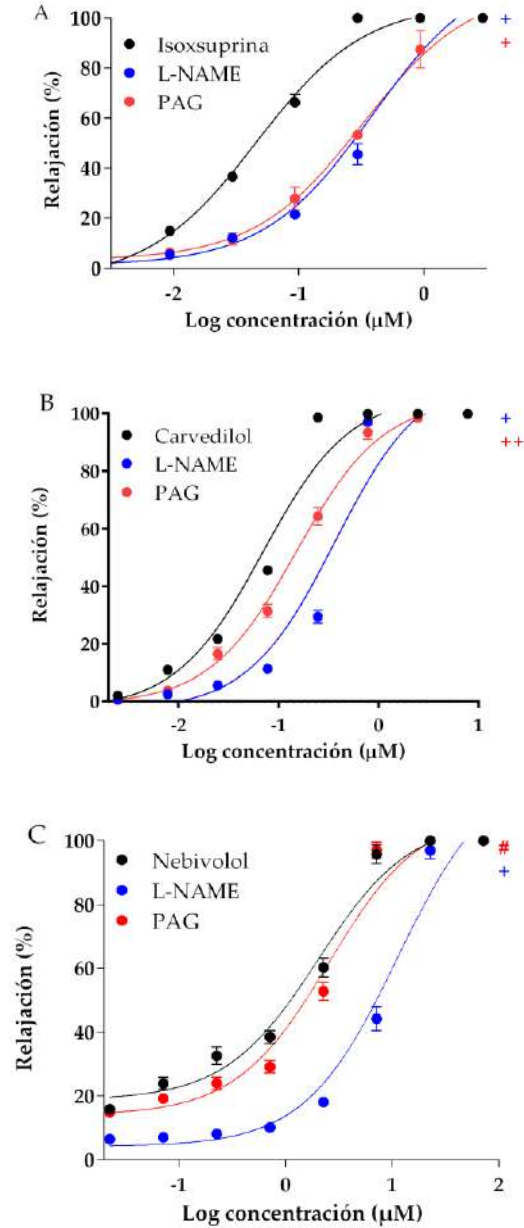


Figure 26. El efecto vasodilatador de A) isoxsuprina, B) carvedilol, y C) nebivolol en ausencia (control) y presencia de inhibidores de eNOS y CSE (L-NAME, 100 µM y PAG, 10 mM, respectivamente). Los datos son promedios ± SEM (n = 6). El análisis estadístico fue realizado usando el análisis de varianzas ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Dunnett. (*p < 0.01, **p < 0.001, ***p < 0.0001).

9.4 Ensayos de dinámica molecular de los compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE

Con base en la alta potencia vasodilatadora de la isoxsuprina y los resultados obtenidos en los ensayos de acoplamiento molecular, que indican en conjunto que este compuesto exhibe alta afinidad de unión a la CSE, se realizó una simulación de dinámica molecular (MD) de la interacción isoxsuprina-CSE (el compuesto consenso con el más potente efecto vasodilatador) y de la interacción fenoterol-CSE (uno de los compuestos con menor efecto vasodilatador) (Tabla 4). La gráfica de energía de unión calculada (CBE) de la Figura 27, indica que el complejo isoxsuprina-CSE permanece en equilibrio por aproximadamente 5 ns y, posteriormente, el compuesto gradualmente pierde su afinidad por la enzima. Con respecto al complejo fenoterol-CSE, el compuesto mostró alta afinidad por la enzima al inicio de la simulación, sin embargo la pierde más rápidamente que la isoxsuprina. En el periodo de estabilización, el complejo fenoterol-CSE muestra una Energía de Interacción Lineal (LIE) promedio de 1.83 kcal/mol, la cual es mucho más baja que la LIE promedio de -26.2 kcal/mol calculada para el complejo isoxsuprina-CSE en el mismo periodo (Figura 27).

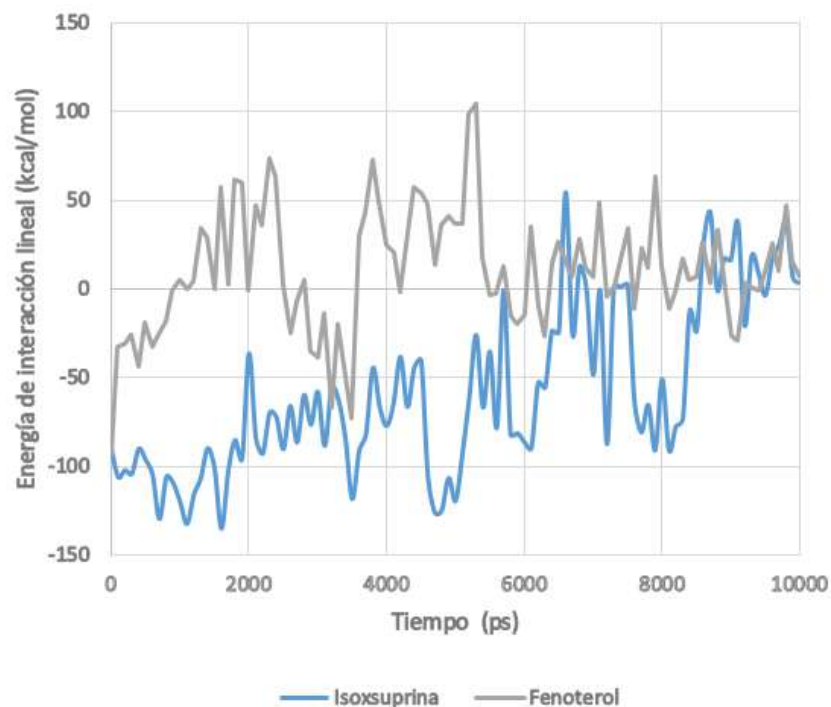


Figure 27. Energías de interacción lineal (método LIE) obtenidas de la simulación de dinámica molecular con GROMACS de los complejos CSE-isoxsuprina y CSE-fenoterol, usando el campo de fuerza AMBER y ajustando los parámetros requeridos para el ligando con el programa ACPYPE.

La Figura 28 muestra las interacciones entre la CSE y la isoxsuprina durante las simulaciones de dinámica molecular usando GROMACS. El complejo CSE-isoxsuprina pierde algunas de las interacciones identificadas en el ensayo de acoplamiento molecular. Sin embargo, los datos obtenidos de la simulación confirmaron que la isoxsuprina establece interacciones con aminoácidos de las cadenas A y B formando puentes de hidrógeno entre su grupo amino y un ácido glutámico (Glu59) y su grupo hidroxilo y una alanina (Ala357). Estas interacciones están localizadas en la interfase de las subunidades A y B de la CSE, en el sitio de unión a triterpenos previamente identificado [18]. Este sitio fue evaluado en simulaciones de dinámica molecular realizadas con los triterpenos uvaol y ácido oleanoico [124], los cuales presentaron una actividad vasodilatadora mediana y casi nula dependiente de H₂S, respectivamente. De acuerdo a los resultados de esas simulaciones, el uvaol y el ácido oleanoico forman un complejo con la CSE

cuya LIE es de -0.73 y 33.88 kcal/mol, respectivamente. Estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo para fenoterol e isoxsuprina, sugieren una posible correlación entre el efecto vasodilatador y el valor teórico de LIE, el cual predice la afinidad de los compuestos consenso con la CSE.

Consistentemente con lo anterior, nuestros ensayos *ex vivo* claramente demuestran que la vía del H₂S/K_{ATP} está involucrada en la vasodilatación inducida por isoxsuprina, explicando por qué aunque la simulación mostró que la isoxsuprina pierde afinidad por la CSE durante el periodo de simulación, las interacciones enzima-ligando son suficientes para incrementar la actividad enzimática y producir una importante vasodilatación. En contraste, el fenoterol que conforme a la simulación de dinámica molecular rápidamente pierde afinidad por CSE, demostró un efecto vasodilatador significativamente menor.

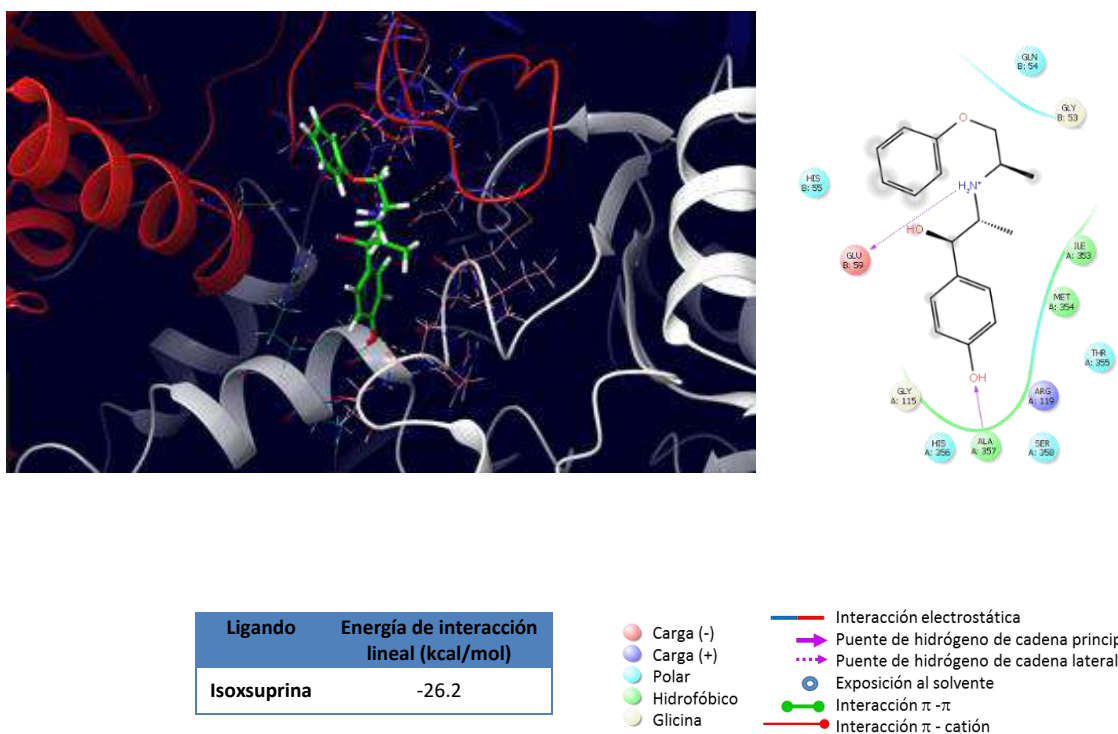


Figura 28. Interacciones CSE-isoxsuprina durante las simulaciones de dinámica molecular usando GROMACS.

9.5 Incremento en los niveles de H₂S inducidos por isoxsuprina

Para confirmar que el efecto vasodilatador de la isoxsuprina involucra la activación directa de la CSE, como sugieren nuestros estudios *in silico*, se midieron los niveles de H₂S en homogenados de aorta. Los resultados de estos experimentos indicaron que la isoxsuprina incrementa en aproximadamente dos veces los niveles de este gasotransmisor (Figura 29). Cuando los anillos de aorta se incubaron simultáneamente con isoxsuprina y PAG, un inhibidor de la CSE, se redujeron drásticamente los niveles de H₂S. Estos resultados indican que la isoxsuprina puede activar directamente a la CSE, como lo sugieren nuestros estudios *in silico*.

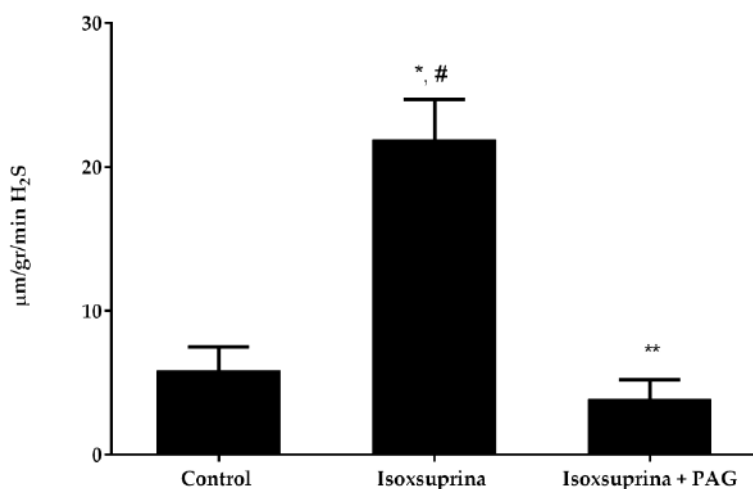


Figura 29. La producción total de H₂S (medido como sulfuros) inducido por isoxsuprina en homogenados de aorta de rata en la ausencia o presencia de PAG. El análisis estadístico fue hecho usando un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey (**p= 0.0001 isoxsuprina vs. control; *** p < 0.0001 isoxsuprina vs. isoxsuprina + PAG).

9.6 Participación de la activación de adrenoreceptores β₂ y bloqueo de adrenoreceptores α₁ en la vasodilatación inducida por isoxsuprina

Para determinar la participación de adrenoreceptores β₂ en la vasodilatación inducida por isoxsuprina, los anillos de aorta se incubaron con 1 µM propranolol

(un antagonista no selectivo de receptores β_1 y β_2). Nuestros resultados indicaron que el efecto vasodilatador producido por isoxsuprina ($EC_{50} = 0.046 \pm 0.004 \mu\text{M}$) no involucra la activación de receptores adrenérgicos β_2 , ya que el bloqueo de estos receptores no redujo significativamente la vasodilatación producida por isoxsuprina ($EC_{50} = 0.033 \pm 0.003 \mu\text{M}$, $p = 0.9615$) (Figura 30 A). Sin embargo, isoxsuprine $1 \mu\text{M}$ significativamente desplazó a la derecha ($EC_{50} = 2.56 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$) la curva concentración respuesta correspondiente al efecto vasoconstrictor de fenilefrina ($EC_{50} = 0.032 \pm 0.003 \mu\text{M}$), un agonista específico de los adrenoreceptores α_1 . Un comportamiento similar se observó cuando se evaluó la vasoconstricción provocada por fenilefrina en presencia de prazosina ($EC_{50} = 0.9 \pm 0.057 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$), un inhibidor específico de los adrenoreceptores α_1 (Figura 30 B). Los resultados de estos experimentos indican que el bloqueo de adrenoreceptores α_1 contribuye a la vasodilatación inducida por isoxsuprina, mientras que la activación de adrenoreceptores β_2 no participa en el mecanismo vasodilatador de este compuesto.

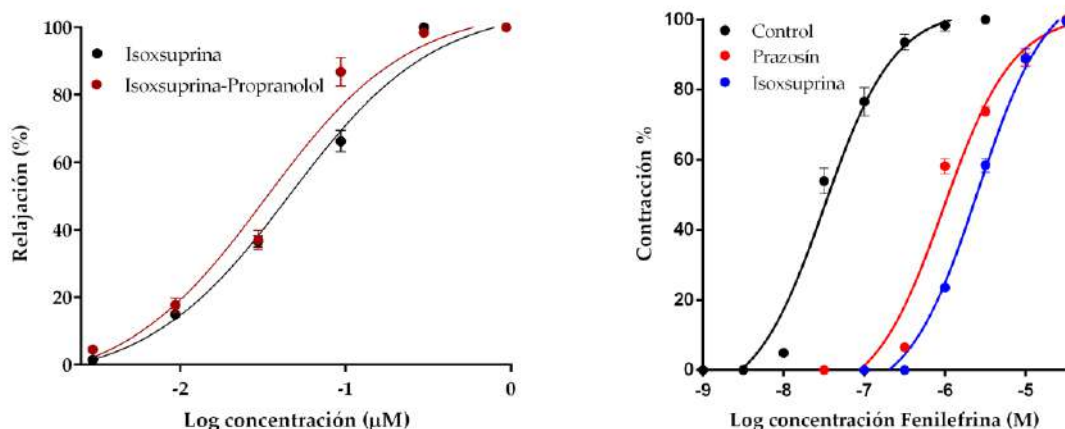
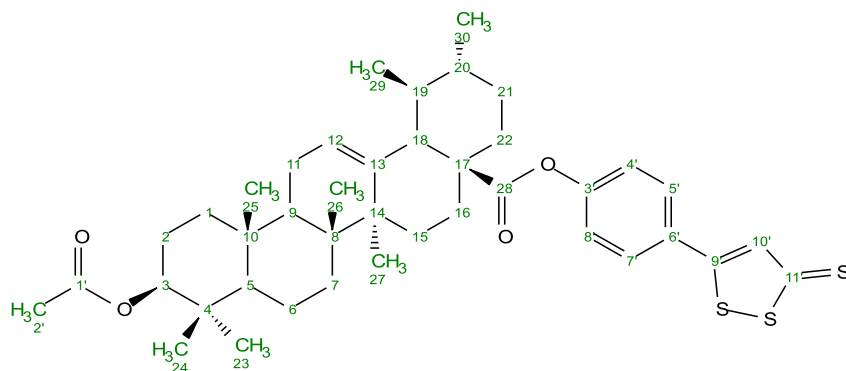


Figure 30. A) Efecto vasodilatador de isoxsuprina en presencia de propranolol ($1 \mu\text{M}$), un antagonista de β receptores. B) Efecto vasoconstrictor de Fenilefrina en la ausencia (control) o presencia de isoxsuprina ($1 \mu\text{M}$) o prazosín ($0.12 \mu\text{M}$), usado como control positivo. Los datos son el promedio \pm SEM ($n = 6$). El análisis estadístico se realizó usando un análisis de VARIANZA, seguido por una prueba post hoc de Dunnett. Los valores de *** $p < 0.0001$ se consideraron significativos.

9.7 Síntesis e identificación de a) una moléculas híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H₂S y b) una subestructura liberadora de NO

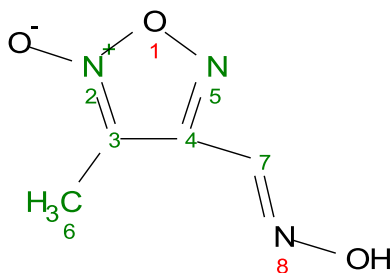
Se obtuvo la síntesis del compuesto DMR-S1 (Figura 21; 707.06 g/mol, p.f. (punto de fusión)= 111 °C, R_f = 0.88 (Hex: AcOEt; 8:2), sólido anaranjado; 6.51 %, 23 mg, 0.032 mmol) y de la subestructura liberadora de NO DMR-N1 (Figura 22; 143.1 g/mol, R_f = 0.75 (Hex: AcOEt; 8:2), sólido amarillo pálido; porcentaje de rendimiento 85.44 %, 220 mg, 1.6395 mmol). Los espectros de resonancia magnética nuclear (protónica y de C¹³) se obtuvieron en colaboración con el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión de la Dra. Nuria Esturau-Escofet. A continuación se presentan las tablas obtenidas con el programa MestReNova, que contienen los valores de los desplazamientos químicos encontrados para los átomos que conforman la molécula híbrida derivada de ácido ursólico DMR-S1 y los desplazamientos químicos de los átomos que conforman la subestructura liberadora de NO (DMR-N1). Ambas elucidaciones estructurales confirman que efectivamente obtuvimos las moléculas esperadas: una molécula híbrida derivada de ácido ursólico liberadora de H₂S (DMR-S1) y la subestructura liberadora de NO (DMR-N1).

Tabla 6. Datos de la espectroscopía NMR (700 MHz para ¹H, 176 MHz para ¹³C) del compuesto DMR-S1 en cloroformo deuterado a 298 K, obtenidos del programa MestReNova.



Posición	δ_C en ppm	δ_H en ppm, mult., (<i>J</i> en Hz)	COSY	HMBC
1	38.48	a: 1.66, t (3.4) b: 1.11, m	1b 1a	2, 3, 5, 10, 25 3, 9, 10, 11, 25
2	23.69	1.64, m	3	3, 4, 5
3	80.99	4.50, dd (10.3, 5.8)	2	2, 4, 23, 24, 1'
4	37.83	-	-	-
5	55.44	0.86	6a, 6b	3, 4, 7, 9, 23, 25
6	18.33	1.38, m 1.53, m	5, 6b, 7a, 7b 5, 6a, 7a, 7b	4, 5, 7, 8, 10, 24, 25, 26 4, 5, 7, 8, 10, 24, 26
7	33.22	1.37, m 1.55, m	6a, 6b, 7b, 6a, 6b, 7a	5, 6, 8, 10, 11, 14, 5, 6, 8, 9, 10
8	39.90	-	-	-
9	47.60	1.55, m	11	1, 5, 7, 8, 10, 11, 14, 25, 26
10	37.02	-	-	-
11	23.51	1.94, m	9, 12, 15	8, 9, 10, 12, 13, 14, 18
12	126.26	5.33, t (3.60)	11	9, 11, 13, 14, 18
13	137.87	-	-	-
14	42.37	-	-	-
15	28.25	1.20, ddd (13.9, 3.8, 2.3)	16	13, 14, 16, 17, 27
16	24.42	a: 1.83, ddd (9.1, 4.5, 2.4) b: 2.14, td (13.7, 4.4)	21b, 22a, 22b 15, 22a, 22b	14, 17, 18, 19, 21, 28 15, 17, 18, 22, 28, 30
17	48.93	-	-	-
18	53.10	2.34, d (11.2)	19	12, 13, 14, 16, 17, 20, 28, 29
19	39.00	1.43, m	18	13, 17, 18, 20, 21, 22, 29, 30
20	39.25	0.99, s	29	19, 21, 30
21	30.74	1.39, m 1.60, m	21b 21a	17, 19, 20, 29, 30 17, 19, 20, 30
22	36.70	a: 1.81, d (4.3) b: 1.90, m	16, 21b, 22b, 21b, 22a,	16, 17, 18, 20, 21, 28
23	28.23	0.87, s	-	2, 3, 4, 5, 24
24	16.89	0.86, s	-	3, 4, 5, 23
25	15.73	0.96, s	-	4, 5, 9, 23, 24
26	17.76	0.86, s	-	7, 8, 9, 14, 15, 25
27	23.57	1.13, s	-	12, 13
28	175.65	-	-	-
29	21.27	0.99, s	-	20, 21, 29
30	17.15	0.90, d (6.5)	20	18, 19, 20, 22, 30
1'	171.17	-	-	-
2'	21.46	2.05, s	-	3, 1'
3'	80.99	-	-	-
4'	123.09	7.15, m	5'	3', 6', 8'
5'	128.26	7.66, m	4'	3', 7', 9'
6'	129.01	-	-	-
7'	128.26	7.66, m	8'	3', 5', 9'
8'	123.09	7.15, m	7'	3', 4', 6'
9'	172.05	-	-	-
10'	136.06	7.39, s	-	5', 7', 9', 11'
11'	215.64	-	-	-

Tabla 7. Datos de la espectroscopía NMR (500 MHz para ^1H , 126 MHz para ^{13}C) del compuesto DMR-N1 en acetona deuterada a 298 K, obtenidos del programa MestReNova.



Posición δ_{C} en ppm	δ_{H} en ppm, mult.	HMBC
3	111.78	-
4	153.51	-
6	9.52	2.29, s
7	140.41	8.22, s

10. Discusión

En un estudio previo, se encontró que el efecto vasodilatador del ácido ursólico y el uvaol era producido por la activación de las vías del NO/GMPc y H₂S/K_{ATP}, posiblemente a través de la interacción de estos triterpenos a sitios de unión alostéricos localizados en las enzimas eNOS y CSE, provocando su activación [18]. Por esta razón, estos sitios de unión alostéricos a triterpenos en ambas enzimas constituyen blancos farmacológicos valiosos en la búsqueda de nuevos compuestos líderes para el desarrollo de fármacos para tratar enfermedades cardiovasculares (ECV). Estos compuestos, muy diferentes estructuralmente a los activadores competitivos, podrían actuar como moduladores alostéricos positivos capaces de activar estas dos importantes enzimas, sin competir con ligandos ortostéricos [125,126]. Con el fin de identificar moduladores alostéricos de la eNOS y la CSE, en el presente proyecto se llevó a cabo una búsqueda virtual de alto rendimiento (HTVS) de compuestos con adecuadas características fisicoquímicas (tipo líder) y comercialmente disponibles, lo que nos condujo a la identificación de nueve compuestos consenso que mostraron altos valores de afinidad (affinity scores) para ambas enzimas. Los compuestos con más altos valores de afinidad resultaron ser dos agonistas beta adrenérgicos (fenoterol e isoxsuprina) [127,128], cuatro antagonistas beta adrenérgicos (carvedilol, nebivolol, propranolol y pindolol) [57,123,129], un agonista adrenérgico α 1 (midodrina) [130], un inhibidor de la dipeptidilpeptidasa (sitagliptina) [131] y un antioxidante (epicatequina) [132]. Como se esperaba, los nueve compuestos consenso mostraron un efecto vasodilatador sobre la aorta aislada de rata y en este trabajo, se reporta por primera vez la contribución de la vía del NO/GMPc en el efecto vasodilatador producido por la midodrina, el fenoterol, la sitagliptina y la isoxsuprina. Los resultados de este estudio también respaldan reportes previos que indicaban que los efectos farmacológicos del fenoterol sobre otros tejidos diferentes a los vasos sanguíneos, están relacionados con una elevación de los niveles de NO [133,134]. Nuestros resultados también concuerdan con estudios anteriores, en los que se demostró que la

sitagliptina administrada oralmente en ratas diabéticas, incrementa significativamente los niveles de NO en aorta de rata y en suero [131,135]. El HTVS realizado en este trabajo sobre el sitio de unión alostérico a triterpenos en la eNOS nos condujo a la identificación del carvedilol, el nebivolol, el propranolol, el pindolol y la epicatequina. En estudios previos, ya se había demostrado que estos compuestos presentaban un efecto vasodilatador, que era mediado por la vía del NO/GMPc [59,120–123].

No obstante, un hallazgo importante en este trabajo fue identificar que la vía del H₂S/K_{ATP} está involucrada en el efecto vasodilatador de los compuestos consenso identificados por HTVS, exceptuando el nebivolol y el propranolol, lo cual hasta ahora no se había descrito.

Los compuestos que mostraron mayor efecto vasodilatador fueron la isoxsuprina, carvedilol y nebivolol. La potencia de la isoxsuprina fue similar a la observada para el carvedilol, mientras que el nebivolol fue aproximadamente 30 veces menos potente que los dos primeros. Esto podría ser atribuido al hecho de que la vía del H₂S/K_{ATP} no participa en la vasodilatación inducida por el nebivolol. Existen numerosas evidencias que indican que la señalización por NO vascular se incrementa por H₂S, favoreciendo la vasodilatación [136]. Por lo tanto, es posible hipotetizar que en el caso de la isoxsuprina y el carvedilol, la activación simultánea de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, podrían actuar en una manera cooperativa [31] y conducir a un efecto vasodilatador aumentado.

El nebivolol es un fármaco ampliamente utilizado en la clínica, ya sea solo o en combinación con otro fármaco para el tratamiento de la hipertensión arterial sistémica o falla cardiaca crónica [137]. Este compuesto quiral se adquiere como mezcla racémica. El isómero D es un agente bloqueador β₁ altamente selectivo, mientras que el enantiómero L es capaz de inducir relajación vascular por aumento en la producción de NO [138]. El mecanismo exacto por medio del cual el L-nebivolol activa la eNOS no ha sido elucidado, pero algunos estudios han demostrado que este compuesto incrementa la producción de NO por medio de la activación de receptores β₃ endoteliales [139]. Sin embargo, otros autores han reportado que la activación de la vía del NO/GMPc por nebivolol involucra la activación de

adrenoreceptores β_2 [138–140]. Nuestros experimentos *ex vivo* en presencia de L-NAME confirmaron la participación de la vía del NO/GMPc en el efecto vasodilatador de nebivolol.

Los resultados de los ensayos *in silico* mostraron que el carvedilol también se une con alta afinidad tanto a la eNOS como a la CSE. Consistente con estos resultados, la inhibición de ambas enzimas disminuyó significativamente el efecto vasodilatador de este compuesto. Estos resultados además, coinciden con previos estudios donde se propuso que este compuesto actúa sobre el endotelio vascular, provocando la liberación de NO [141,142] y aumentando su biodisponibilidad [57]. Carvedilol es un antagonista de adrenoreceptores β y es un fármaco autorizado para tratar pacientes con falla cardíaca, hipertensión e isquemia del miocardio [143,144]. Este compuesto interactúa con diversos blancos biológicos, antagonizando receptores adrenérgicos β_1 y NMDA, así como inhibiendo canales de calcio [143,145]. Sin embargo, no había sido reportado que la vía del H_2S/K_{ATP} participa en el efecto antihipertensivo de este compuesto. En un estudio previo, se mostró que la vasodilatación producida por carvedilol era inhibida, pero no completamente bloqueada por L-NAME [146]. Posiblemente, esta vasodilatación “insensible” a L-NAME podría ser atribuida a la activación de la vía del H_2S/K_{ATP} , como sugieren nuestros resultados tanto farmacológicos como aquellos obtenidos *in silico*, en los cuales se encontró que la estimulación de esta vía puede ser debida a la activación directa de la CSE.

De todos los compuestos consenso, la isoxsuprina resultó ser el vasodilatador más potente, cuyo mecanismo de acción involucra en un grado similar, las vías del NO/GMPc y del H_2S/K_{ATP} . A diferencia del nebivolol y el carvedilol, los cuales han sido exitosamente usados para tratar varias enfermedades cardiovasculares [137,143,144], la isoxsuprina tiene un uso terapéutico restringido y no ha sido estudiada sistemáticamente. Por esta razón, decidimos investigar con mayor detalle los mecanismos bioquímicos involucrados en el efecto vasodilatador de este compuesto. Nuestro estudio *in silico* sugirió que este compuesto es capaz de unirse con alta afinidad al sitio alostérico de unión a triterpenos en la CSE. Este resultado fue posteriormente confirmado en la evaluación farmacológica, la cual demostró que el efecto vasodilatador de isoxsuprina fue significativamente bloqueado por

propargilglicina. Además, los niveles de H₂S medidos en homogenados de aorta de rata, después de ser incubados con isoxsuprina, se incrementaron aproximadamente dos veces. Todos los resultados anteriores apoyan nuestra hipótesis que señala que el efecto vasodilatador de la isoxsuprina involucra la activación de la vía del H₂S/K_{ATP}, muy posiblemente por la interacción directa con la CSE.

Considerando además que el H₂S estimula directamente los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) [147,148] exploramos si estos canales estaban involucrados en el mecanismo de acción de isoxsuprina. Como esperábamos, el inhibidor glibenclamida disminuyó significativamente el efecto vasodilatador de esta molécula, apoyando que la vía del H₂S/K_{ATP} participa en dicho efecto [149]. Se ha reportado que la isoxsuprina activa adrenoreceptores β₂ y bloquea adrenoreceptores β₁, iniciando la relajación del músculo liso [116,150]. Debido a estos efectos se ha usado a la isoxsuprina para tratar algunas patologías, incluyendo insuficiencia cerebrovascular, enfermedad de Raynaud y parto prematuro [151]. De manera interesante, nuestros experimentos empleando el modelo de aorta de rata mostraron que la isoxsuprina indujo vasodilatación a través del bloqueo de adrenoreceptores α₁, pero no la activación de adrenoreceptores β₂. Resultados similares se obtuvieron en arteria digital de caballo [116] y para explicar sus hallazgos, los autores propusieron que en el músculo liso de las arterias existía un bajo número de adrenoreceptores β₂ y que la isoxsuprina actúa como un agonista parcial, activando este tipo de receptores, sólo en aquellos tejidos donde hay un mayor número de adrenoreceptores β₂, tales como el intestino de aves [116] y en el útero [152].

Además, la falta de efecto del pretratamiento con propranolol sobre la vasodilatación producida por isoxsuprina es consistente con aquel encontrado en otros tejidos vasculares y no vasculares, incluyendo yugular de rata [153], miometrio aislado humano [154] y vasos deferentes de rata [155]. Sin embargo, nuestros resultados en aorta de rata difieren de lo encontrado en venas digitales aisladas de caballo [156], donde el propranolol ligeramente inhibió la acción vasodilatadora de la isoxsuprina. En este escenario, es posible proponer que el propranolol, el cual es

un antagonista no selectivo de receptores adrenérgicos β , no es capaz de bloquear la actividad adrenoreceptora β_2 en aorta de rata. Ahora bien, considerando que algunos estudios han demostrado que en células endoteliales vasculares los adrenoreceptores β_1 , β_2 , y β_3 son funcionalmente expresados y se acoplan a la activación de la vía del NO/GMPc [57,123], es necesario utilizar inhibidores específicos de adrenoreceptores β_2 , tal como el compuesto ICI-118551, para determinar con certeza el papel que este tipo de receptores juegan en el efecto vasodilatador de la isoxsuprina.

Kozlovski y col. (2015) mostraron que la vasodilatación coronaria producida tanto por nebivolol como por carvedilol no involucra la activación directa de adrenoreceptores β_2 , sin embargo, sugieren que los metabolitos de estos compuestos activan este tipo de receptores [142]. Por lo tanto, considerando que la activación de adrenoreceptores β_2 estimula la vía del NO/GMPc [138,140], es factible proponer que los metabolitos de esos compuestos y la isoxsuprina interactúan con estos receptores, activando tanto la vía del NO/GMPc como la vía del H_2S/K_{ATP} , sin embargo, es necesario realizar más experimentos para comprobar esta hipótesis.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación [149], se realizaron experimentos adicionales para evaluar si otras vías de señalización estaban involucradas en el mecanismo de acción de la isoxsuprina. Los resultados de ese estudio indicaron que la inhibición de la ciclooxigenasa no reduce significativamente la vasodilatación inducida por la isoxsuprina. Este resultado difiere de aquellos previamente encontrados en otros agonistas beta adrenérgicos. La inhibición de esta enzima redujo la dilatación de la arteria coronaria causada por terbutalina en hámsters [157] e incrementó la relajación, inducida por isoproterenol, de la arteria braquial en humanos [158]. Estas diferencias se pueden atribuir tanto a una distribución diferencial de subtipos de adrenoreceptores en los diversos tipos de arterias y al uso de diferentes especies [159]. La inhibición de la hemooxigenasa tampoco disminuyó el efecto vasodilatador por isoxsuprina [149]. Hasta donde tenemos conocimiento, no hay reportes que indiquen si la vasodilatación inducida por isoxsuprina involucra la participación de la vía del CO/GMPc. Los resultados de

estos experimentos sugieren que las vías de la PGI₂/cAMP y del CO/GMPc no contribuyen al efecto vasodilatador producido por este compuesto.

Algunos estudios han comparado el efecto tocolítico de la isoxsuprina con aquel producido por bloqueadores de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo-L (LVCC), tales como el nifedipino [160]. Sin embargo, a la fecha no hay reportes acerca del efecto de la isoxsuprina sobre los LVCC en aorta de rata. En experimentos previos realizados por nuestro grupo de trabajo [149], se encontró que de manera similar a lo que ocurre con el verapamilo, la isoxsuprina desplaza a la derecha la curva concentración respuesta del efecto vasoconstrictor del cloruro de calcio. Este hallazgo indica que la vasodilatación producida por isoxsuprina involucra el bloqueo de los LVCCs, lo cual no había sido descrito anteriormente. El bloqueo de los LVCCs reduce el flujo de calcio extracelular hacia las células de músculo liso vascular, aumentando la vasodilatación, la cual finalmente conduce a una disminución en la presión sanguínea [161].

La disminución de la presión sanguínea, resultado del bloqueo de LVCCs por nifedipino o verapamilo, es más pronunciado en pacientes con hipertensión que en individuos con presión sanguínea normal, lo cual indica que los bloqueadores de los LVCCs pueden considerarse como agentes antihipertensivos específicos [162]. Además, es un hecho bien demostrado que las acciones combinadas de la liberación basal de NO y el antagonismo de calcio resulta en una vasodilatación mucho más grande que los efectos aditivos de ambos efectos [163]. La estructura co-cristalizada del complejo LVCC-verapamil proporcionó evidencia que sugirió que el verapamilo se une al poro del canal [164]. Considerando que existe una elevada similitud estructural entre la isoxsuprina y el verapamilo, determinado con el índice de Tanimoto (0.8) [165], es posible que la isoxsuprina se una al sitio de unión de verapamilo en el LVCC. Sin embargo, evidentemente es necesario modelar la arquitectura multi-dominio de los LVCCs, usando métodos sofisticados y procesadores de alto rendimiento [166], para entender mejor el efecto de la isoxsuprina y otras moléculas pequeñas sobre estos canales.

En este trabajo, como estrategia alternativa en el desarrollo de fármacos vasodilatadores que activen las vías del NO/GMPc y la H₂S/K_{ATP}, se diseñaron dos nuevas moléculas haciendo uso de la hibridación farmacofórica, para unir covalentemente dos regiones bioactivas: una molécula de ácido ursólico y una región liberadora de NO o H₂S, con el fin de conseguir una molécula híbrida con mayor actividad biológica [90], como en el caso del derivado de diclofenaco ATB 337/ACS 15, en donde se encontró que la modificación química incrementó sus efectos antiinflamatorios con respecto al fármaco parental y como en el caso del compuesto ATB-429, derivado de la mesalamina, un fármaco empleado para tratar la inflamación del intestino, el cual mostró ser significativamente más efectivo que el fármaco parental y el compuesto ATB-346, un derivado del naproxeno, que también demostró un incremento en la efectividad [89]. Con base en el éxito que han tenido las moléculas híbridas, es altamente probable que los derivados de ácido ursólico liberadores de NO o H₂S, produzcan un intenso y sostenido efecto vasodilatador, mediante la activación directa de las enzimas eNOS y CSE y la liberación adicional de gasotransmisores. Estos potentes vasodilatadores podrían utilizarse para el desarrollo de fármacos útiles para tratar ECV. No obstante, es necesario la realización de más experimentos para sintetizar diferentes compuestos híbridos, mejorar su rendimiento y optimizar su efecto vasodilatador.

Debido a que muchas de las ECV se han asociado a la disfunción endotelial, en donde las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP} son disfuncionales, es importante buscar nuevas moléculas líderes para el desarrollo de fármacos alternativos, los cuales sean capaces de restaurar los niveles de NO y H₂S [31]. Ejemplos de estos fármacos son los compuestos que se unen con alta afinidad a los sitios alostéricos de unión a triterpenos en las enzimas eNOS y CSE y los compuestos híbridos liberadores de NO y H₂S. Los resultados obtenidos en este estudio, nos permiten proponer a la isoxsuprina como un valioso fármaco que podría ser reposicionado para tratar un amplio espectro de ECVs, como la hipertensión, el derrame cerebral y la falla cardíaca, ya que induce un potente efecto vasodilatador que involucra no solo la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, sino también el bloqueo

de canales de calcio y adrenoreceptores α_1 . Estos mecanismos, pueden actuar sinérgicamente dando a este compuesto la posibilidad de producir efectos clínicos benéficos que claramente difieren de los vasodilatadores convencionales.

11. Conclusiones

1. Los vasodilatadores más potentes obtenidos de la búsqueda virtual de alto rendimiento (HTVS) de compuestos que se unen con alta afinidad a los sitios alostéricos de unión a triterpenos en las enzimas eNOS y CSE fueron la isoxsuprina, el carvedilol y el nevigolol
2. El efecto vasodilatador de la isoxsuprina involucra en un grado similar la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}
3. La isoxsuprina produce su efecto vasodilatador, mediante el bloqueo de receptores adrenergicos α_1 , pero no involucra la activación de los receptores adrenergicos β_2 .
4. Con la información obtenida en esta tesis se puede proponer el reposicionamiento de la isoxsuprina como una molécula prometedora que podría ser usada en la terapéutica de diversas patologías cardiovasculares.
5. Los sitios alostéricos de unión a triterpenos en la eNOS y la CSE constituyen blancos farmacológicos valiosos en la búsqueda de compuestos líderes para el desarrollo de fármacos para tratar enfermedades cardiovasculares.
6. Se sintetizaron, una molécula híbrida de ácido ursólico y una subestructura liberadora de H₂S (DMR-S1) y una subestructura liberadora de NO (DMR-N1). Tanto la molécula híbrida como la subestructura liberadora constituirán prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos antihipertensivos alternativos.

12. Bibliografía

1. Dhungana, R. R.; Pandey, A. R.; Bista, B.; Joshi, S.; Devkota, S. Prevalence and associated factors of hypertension : A community-based cross-sectional study in municipalities of Kathmandu , Nepal. *Int. J. Hypertens.* **2016**, *2016*, 1–11, doi:10.1155/2016/1656938.
2. Mukete, B. N.; Ferdinand, K. C. Polypharmacy in older adults with hypertension: A comprehensive review. *J. Clin. Hypertens.* **2016**, *18*, 10–18, doi:10.1111/jch.12624.
3. James, P. A.; Oparil, S.; Carter, B. L.; Cushman, W. C.; Dennison-Himmelfarb, C.; Handler, J.; Lackland, D. T.; LeFevre, M. L.; MacKenzie, T. D.; Ogedegbe, O.; Smith, S. C.; Svetkey, L. P.; Taler, S. J.; Townsend, R. R.; Wright, J. T.; Narva, A. S.; Ortiz, E. 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults. *JAMA.* **2014**, *311*, 507, doi:10.1001/jama.2013.284427.
4. Jackson, R. E.; Bellamy, M. C. Antihypertensive drugs. *BJA Educ.* **2015**, *15*, 280–285, doi:10.1093/bjaceaccp/mku061.
5. Markovitz, A. A.; Mack, J. A.; Nallamotheu, B. K.; Ayanian, J. Z.; Ryan, A. M. Incremental effects of antihypertensive drugs: instrumental variable analysis. *BMJ* **2017**, *359*, j5542, doi:10.1136/bmj.j5542.
6. Leung, S. W. S.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? *Acta Physiol.* **2017**, *219*, 108–123, doi:10.1111/apha.12628.
7. Goto, K.; Ohtsubo, T.; Kitazono, T. Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1–20, doi:10.3390/ijms19010315.
8. John, C. M.; Mallat, R. K.; George, G.; Kim, T.; Mishra, R. C.; Braun, A. P. Pharmacologic targeting of endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels: A strategy to improve cardiovascular function. *Channels.* **2018**, *6950*, 01-28, doi:10.1080/19336950.2018.1454814.
9. Montezano, A. C.; Dulak-Lis, M.; Tsiropoulou, S.; Harvey, A.; Briones, A. M.;

- Touyz, R. M. Oxidative stress and human hypertension: Vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.* **2015**, *31*, 631–641, doi:10.1016/j.cjca.2015.02.008.
10. Stead, R.; Musa, M. G.; Bryant, C. L.; Lanham, S. A.; Johnston, D. A.; Reynolds, R.; Torrens, C.; Fraser, P. A.; Clough, G. F. Developmental conditioning of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasorelaxation. *J. Hypertens.* **2016**, *34*, 452–463, doi:10.1097/HJH.0000000000000833.
 11. Nagpure, B. V.; Bian, J.-S. Interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide in the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–16, doi:10.1155/2016/6904327.
 12. Panthi, S.; Chung, H. J.; Jung, J.; Jeong, N. Y. Physiological importance of hydrogen sulfide: Emerging potent neuroprotector and neuromodulator. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/9049782.
 13. Panthi, S.; Manandhar, S.; Gautam, K. Hydrogen sulfide, nitric oxide, and neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.* **2018**, *7*, 1–8, doi:10.1186/s40035-018-0108-x.
 14. Cebová, M.; Košútová, M.; Pecháňová, O. Cardiovascular effects of gasotransmitter donors. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, S291–S307.
 15. Gheibi, S.; Jeddi, S.; Kashfi, K.; Ghasemi, A. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *149*, 42–59, doi:10.1016/j.bcp.2018.01.017.
 16. Coneski, P. N.; Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide Release Part III. Measurement and Reporting. *Chem Soc Rev.* **2012**, *41*, 3753–3758, doi:10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.
 17. Song, Z. J.; Ng, M. Y.; Lee, Z.-W.; Dai, W.; Hagen, T.; Moore, P. K.; Huang, D.; Deng, L.-W.; Tan, C.-H. Hydrogen sulfide donors in research and drug development. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 557–570, doi:10.1039/C3MD00362K.
 18. Luna-Vázquez, F. J.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; Romo-Mancillas, A.; López-Vallejo, F. H.; Solís-Gutiérrez, M.; Rojas-Molina, J. I.; Rivero-Cruz,

- F. Role of nitric oxide and hydrogen sulfide in the vasodilator effect of ursolic acid and uvaol from black cherry *prunus serotina* fruits. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/molecules21010078.
19. Rios, M. Y.; López-Martínez, S.; López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J. L.; Villalobos-Molina, R.; Ibarra-Barajas, M.; Navarrete-Vazquez, G.; Hidalgo-Figueroa, S.; Hernández-Abreu, O.; Estrada-Soto, S. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: Ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1023–1029, doi:10.1016/j.fitote.2012.05.014.
 20. López-Vallejo, F.; Caulfield, T.; Martínez-Mayorga, K.; Giulianotti, M.; Nefzi, A.; Houghten, R.; Medina-Franco, J. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* **2011**, *14*, 475–87.
 21. Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 13384–13421, doi:10.3390/molecules200713384.
 22. Patel, H.; Pawara, R.; Surana, S. In-silico evidences for binding of Glucokinase activators to EGFR C797S to overcome EGFR resistance obstacle with mutant-selective allosteric inhibition. *Comput. Biol. Chem.* **2018**, *74*, 167–189, doi:10.1016/j.compbiolchem.2018.03.026.
 23. Stahura, F.; Bajorath, J. Virtual screening methods that complement HTS. *Comb Chem High Throughput Screen* **2004**, *7*, 259–69.
 24. Shouk, R.; Abdou, A.; Shetty, K.; Sarkar, D.; Eid, A. H. Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives. *Nutr. Res.* **2014**, *34*, 106–115, doi:10.1016/j.nutres.2013.12.005.
 25. Campos-Nonato, I.; Hernández-Barrera, L.; Rojas-Martínez, R.; Pedroza-Tobías, A.; Medina-García, C.; Barquera, S. Hipertensión arterial: Prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública Mex* **2013**, *55*, S144–S150.
 26. Triggle, C. R.; Samuel, S. M.; Ravishankar, S.; Marei, I.; Arunachalam, G.; Ding, H. The endothelium: Influencing vascular smooth muscle in many ways.

- Can. J. Physiol. Pharmacol* **2012**, *90*, 713–738.
27. Beltowski, J.; Jamroz-Wiśniewska, A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules* **2014**, *19*, 21183–21199.
 28. LaPres, J.; Kersten, B.; Tang, Y. *Gunstream's anatomy & physiology: with integrated study guide*; 6ta ed.; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2015;
 29. Saladin, K. S. *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*; McGraw-Hill: New York., 2011;
 30. Félétou, M. The endothelium part 1: multiple functions of the endothelial cells—focus on endothelium-derived vasoactive mediators. In *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease.*; Morgan & Claypool Life Sciences., 2011.
 31. Coletta, C.; Papapetropoulos, A.; Erdelyi, K.; Olah, G.; Módis, K.; Panopoulos, P. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2012**, *109*, 1–6, doi:10.1073/pnas.1202916109.
 32. Moyes, A. J.; Khambata, R. S.; Villar, I.; Bubb, K. J.; Baliga, R. S.; Lumsden, N. G.; Xiao, F.; Gane, P. J.; Rebstock, A S, Worthington, R. J.; Simone, M. I.; Mota, F.; Rivilla, F.; Vallejo, S.; Peiró, C.; Sánchez Ferrer, C F Djordjevic, S.; Caulfield, M. J.; MacAllister, R. J.; Selwood, D. L.; Ahluwalia, A.; Hobbs, A. J. Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 4039–4051.
 33. Förstermann, U.; Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Hear. J.* **2012**, *33*, 829–837.
 34. Qian, J.; Fulton, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front. Physiol* **2013**, *4*, 1–11.
 35. Heiss, E. H.; Dirsh, V. M. Regulation of eNOS enzyme activity by postranslational modification. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 3503–3513.
 36. Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.: Philadelphia, PA, 2013;
 37. Francis, S. H.; Busch, J. L.; Corbin, J. D. cGMP-Dependent Protein Kinases

- and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 525–563, doi:10.1124/pr.110.002907.
38. Kimura, H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules* **2014**, *19*, 16146–16157.
 39. Kolluru, G. K.; Shen, X.; Bir, S. C.; Kevil, C. G. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* **2013**, *35*, 5–20.
 40. Olas, B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clin. Chim. Acta.* **2015**, *439*, 212–218.
 41. Yang, G.; Wu, L.; Jiang, B.; Yang, W.; Qi, J.; Cao, K.; Meng, Q.; Mustafa, A. K.; Mu, W.; Zhang, S. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science.* **2008**, *322*, 587–590.
 42. Sun, Q.; Collins, R.; Huang, S.; Holmberg-Schiavone, L.; Anand, G. S.; Tan, C.-H.; Van-den-Berg, S.; Deng, L.-W.; Moore, P. K.; Karlberg, T.; Sivaraman, J. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 3076–3085, doi:10.1074/jbc.M805459200.
 43. Kabil, O.; Banerjee, R. Enzymology of H₂S Biogenesis, decay and signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 770–782.
 44. Olson, K. R. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2013**, *51*, 623–632.
 45. Polhemus, D. J.; Lefer, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 730–737.
 46. Ono, K.; Akaike, T.; Sawa, T.; Kumagai, Y.; Wink, D. A.; Tantillo, D. J.; Hobbs, A. J.; Nagy, P.; Xian, M.; Lin, J.; Fukuto, J. M. Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: Implications of their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *77*, 82–94.
 47. Mustafa, A. K.; Sikka, G.; Gazi, S. K.; Steppan, J.; Jung, S. M.; Bhunia, A. K.; Barodka, V. M.; Gazi, F. K.; Barrow, R. K.; Wang, R.; Amzel, L. M.; Berkowitz, D. E.; Snyder, S. H. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1259–1268.

48. Kabil, O.; Motl, N.; Banerjee, R. H₂S and its role in redox signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1844*, 1355–66.
49. Tang, G.; Yang, G.; Jiang, B.; Ju, Y.; Wu, L.; Rui, W. H₂S is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1634–1646.
50. Stubbert, D.; Pryszyzhna, O.; Rudyk, O.; Scotcher, J.; Burgoyne, J. R.; Eaton, P. Protein kinase G I α oxidation paradoxically underlies blood pressure lowering by the reductant hydrogen sulfide. *Hypertension* **2014**, *64*, 1344–1351.
51. Bucci, M.; Papapetropoulos, A.; Vellecco, V.; Zhou, Z.; Pyriochou, A.; Roussos, C.; Roviezzo, F.; Brancaleone, V.; Cirino, G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1998–2004.
52. Predmore, B. L.; Julian, D.; Cardounel, A. J. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism. *Front. Physiol.* **2011**, *2*, 104.
53. Kida, M.; Sugiyama, T.; Yoshimoto, T.; Ogawa, Y. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 211–215.
54. Altaany, Z.; Yang, G.; Wang, R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2013**, *17*, 879–888.
55. King, A. L.; Polhemus, D. J.; Bhushan, S.; Otsuka, H.; Kondo, K.; Nicholson, C. K.; Bradley, J. M.; Islam, K. N.; Calvert, J. W.; Tao, Y.; Dugas, T. R.; Kelley, E. E.; Elrod, J. W.; Huang, P. L.; Wang, R.; J, L. D. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 3182–3187.
56. Altaany, Z.; Ju, Y.; Yang, G.; Wang, R. The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra87.
57. Vanhoutte, P. M.; Gao, Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 265–273, doi:10.1016/j.coph.2012.12.002.

58. Luna-Vázquez, F. J.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; Rojas-Molina, J. I.; Zavala-Sánchez, M. A. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. *Molecules* **2013**, *18*, 5814–5857.
59. Aggio, A.; Grassi, D.; Onori, E.; D'Alessandro, A.; Masedu, F.; Valenti, M.; Ferri, C. Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 263–272, doi:10.1007/s00394-012-0320-x.
60. Zaima, K.; Takeyama, Y.; Koga, I.; Saito, A.; Tamamoto, H.; Azziz, S. S.; Mukhtar, M. R.; Awang, K.; Hadi, A. H.; Morita, H. Vasorelaxant effect of isoquinoline derivatives from two species of *Popowia perakensis* and *Phaeanthus crassipetalus* on rat aortic artery. *J. Nat. Med.* **2012**, *66*, 421–427.
61. Arai, H.; Zaima, K.; Mitsuta, E.; Tamamoto, H.; Saito, A.; Hirasawa, Y.; Rahman, A.; Kusumawati, I.; Zaini, N. C.; Morita, H. Alstiphyllanines I-O, ajmaline type alkaloids from *Alstonia macrophylla* showing vasorelaxant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3454–3459.
62. Carvalho, M. T.; Rezende, K. C.; Evora, P. R.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R.; Silva, M. L.; Celotto, A. C. The lignan (-)-cubebin inhibits vascular contraction and induces relaxation via nitric oxide activation in isolated rat aorta. *Phytother. Res.* **2013**, *27*.
63. Deng, Y.; Ng, E. S.; Yeung, J. H.; Kwan, Y. W.; Lau, C. B.; Koon, J. C.; Zhou, L.; Zuo, Z.; Leung, P. C.; Fung, K. P.; Lam, F. F. Y. Mechanisms of the cerebral vasodilator actions of isoflavonoids of Gegen on rat isolated basilar artery. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*, 294–304.
64. Gong, L. L.; Fang, L. H.; Qin, H. L.; Lv, Y.; Du, G. H. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of coptisine in rat aortic rings. *Am. J. Chin. Med.* **2012**, *40*, 309–320.
65. Khan, A. U.; Ullah, R.; Khan, A.; Mustafa, M. R.; Hussain, J.; Murugan, D. D.; Hadi, A. H. Vasodilator effect of *Phlomis bracteosa* constituents is mediated through dual endothelium dependent and endothelium-independent pathways. *Clin. Exp. Hypertens.* **2012**, *34*, 132–139.
66. Senejoux, F.; Girard-Thernier, C.; Berthelot, A.; Bévalot, F.; Demougeot, C.

- New insights into the mechanisms of the vasorelaxant effects of apocynin in rat thoracic aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2012**, *27*, 262–70.
67. Simplicio, J. A.; Pernomian, L.; Simão, M. R.; Carnio, E. C.; Batalhão, M. E.; Ambrosio, S. R.; Tirapelli, C. R. Mechanisms underlying the vascular and hypotensive actions of the labdane ent-3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *5*, 66–76.
 68. Yilmaz, B.; Usta, C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. *Phytother. Res.* **2012**, *27*, 285–9.
 69. García-Aguilar, L.; Rojas-Molina, A.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, J. I.; Vázquez-Landaverde, P. A.; Luna-Vázquez, F. J.; Zavala-Sánchez, M. A. Nutritional value and volatile compounds of black cherry (*Prunus serotina*) seeds. *Molecules* **2015**, *20*, 3479–3495.
 70. Ibarra-Alvarado, C.; Rojas, A.; Luna, F.; Rojas, J. I.; Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, F. Vasorelaxant constituents of the leaves of *Prunus serotina* “capulín”. *Rev. Latinoam. Quim.* **2009**, *37*, 164–173.
 71. Luna-Vázquez, F. J. Purificación, elucidación estructural y caracterización del mecanismo de acción de compuestos vasodilatadores presentes en el fruto de *Prunus serotina* (Cav. ex Spreng) Mc Vaugh (Rosaceae) “capulín”, Universidad Autónoma Metropolitana, 2013.
 72. Aguirre-Crespo, F.; Vergara-Galicia, J.; Villalobos-Molina, J.; López-Guerrero, J.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* **2006**, *79*, 1062–8.
 73. Shanmugam, M. K.; Daia, X.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H.; Sethi, G. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochem Pharmacol.* **2013**, *85*, 1579–87.
 74. Hill, R.; Connolly, J. D. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 780–818.
 75. Solís-Gutiérrez, M. Determinación del efecto vasodilatador de triterpenos y elucidación de su mecanismo de acción., 2013.
 76. Savarino, A. In-Silico docking of HIV-1 integrase inhibitors reveals a novel drug

- type acting on an enzyme/DNA reaction intermediate. *Retrovirology*. **2007**, *4*, 21.
77. Angelis, D.; Karasmanis, E. P.; Bai, X.; Spiliotis, E. T. In Silico Docking of Forchlorfenuron (FCF) to Septins Suggests that FCF Interferes with GTP Binding. *PLoS One* **2014**, *9*, e96390.
 78. Taylor, R. D.; J., J. P.; Essex, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2002**, *16*, 151–166.
 79. Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* **2002**, *47*, 409–443.
 80. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* **2004**, *3*, 935–949.
 81. Sperandio, O.; Miteva, M. A.; Delfaud, F.; Villoutreix, B. O. Receptor-Based Computational Screening of Compound Databases: The Main Docking-Scoring Engines. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2006**, *7*, 369–393.
 82. Guedes, I. A.; de Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. Receptor–ligand molecular docking. *Biophys. Rev.* **2014**, *6*, 75–87.
 83. Kroemer, R. T. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, *8*, 312–328.
 84. Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 334–395.
 85. Magierowski, M.; Magierowska, K.; Kwiecien, S.; Brzozowski, T. Gaseous Mediators Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Mechanism of Gastrointestinal Integrity, Protection and Ulcer Healing. *Molecules* **2015**, *20*, 9099–123.
 86. De Souza, G. F.; Taladriz-Blanco, P.; Velloso, L. A.; de Oliveira, M. G. Nitric oxide released from luminal S-nitroso-N-acetylcysteine increases gastric mucosal blood flow. *Molecules* **2015**, *20*, 4109–23.
 87. Zhao, Y.; Wang, H.; Xian, M. Cysteine-Activated Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15–17.

88. Benavides, G. A.; Squadrito, G. L.; Mills, R. W.; Patel, H. D.; Isbell, T. S.; Patel, R. P.; Darley-Usmar, V. M.; Doeller, J. E.; Kraus, D. W. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 17977–82.
89. Caliendo, G.; Cirino, G.; Santagada, V.; Wallace, J. L. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): Development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2010**, *253*, 6275–6286.
90. Dang, T.; Kim, T.; Pham, T.; Thanh, N.; Ba, T.; Doan, D.; D’hooghe, M.; Van, N. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel triterpenoid-AZT conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5190–5194.
91. Carradori, S.; Mollica, A.; De Monte, C.; Granese, A.; Supuran, C. T. Nitric Oxide Donors and Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors: A Dual Pharmacological Approach for the Treatment of Glaucoma, Cancer and Osteoporosis. *Molecules* **2015**, *20*, 5667–5679.
92. Schoenfish, A. W. C. and M. H. Nitric Oxide Release Part II. Therapeutic Applications. *Chem Soc* **2012**, *41*, 3742–3752, doi:10.1039/c2cs15273h.Nitric.
93. Carpenter, A. W.; Schoenfish, M. H. Nitric Oxide Release Part II. Therapeutic Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3742–3752.
94. Kodela, R.; Chattopadhyay, M.; Kashfi, K. NOSH-aspirin: A novel nitric oxide–hydrogen sulfide-releasing hybrid: a new class of anti-inflammatory pharmaceuticals. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 257–262.
95. Fischmann, T. O.; Hruza, A.; Niu, X. D.; Fossetta, J. D.; Lunn, C. A.; Dolphin, E.; Prongay, A. J.; Reichert, P.; Lundell, D. J.; Narula, S. K.; Weber, P. C. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol* **1999**, *6*, 233–42, doi:10.1038/6675.
96. Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177–182, doi:10.1021/ci049714+.
97. Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*,

- 1757–1768, doi:10.1021/ci3001277.
98. Sterling, T.; Irwin, J. J. ZINC 15 - Ligand discovery for everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2324–2337, doi:10.1021/acs.jcim.5b00559.
 99. Clark, A. M.; Labute, P.; Santavy, M. 2D structure depiction. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1107–1123, doi:10.1021/ci050550m.
 100. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749, doi:10.1021/jm0306430.
 101. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. II. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *2*, 1750–1759.
 102. Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196, doi:10.1021/jm051256o.
 103. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791, doi:10.1002/jcc.21256.
 104. Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–61, doi:10.1002/jcc.21334.
 105. Lang, P. T.; Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Pettersen, E. F.; Meng, E. C.; Thomas, V.; Rizzo, R. C.; Case, D. A.; James, T. L.; Kuntz, I. D. DOCK 6: Combining techniques to model RNA – small molecule complexes. *RNA* **2009**, *15*, 1219–1230, doi:10.1261/rna.1563609.
 106. Koes, D. R.; Camacho, C. J. Pharmer: Efficient and exact pharmacophore search. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1307–1314, doi:10.1021/ci200097m.

107. Reynolds, A. P.; Richards, G.; De La Iglesia, B.; Rayward-Smith, V. J. Clustering rules: A comparison of partitioning and hierarchical clustering algorithms. *J. Math. Model. Algorithms* **2006**, *5*, 475–504, doi:10.1007/s10852-005-9022-1.
108. Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A.; Hubert, M.; Hornik, K. cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. *R Packag. version 2.0.7-1* <https://www.r-project.org/> **2018**.
109. R-Core-Team R: A language and environment for statistical computing. <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/> **2013**, *3*, 201.
110. Hess, B.; Kutzner, C.; Van Der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435–447, doi:10.1021/ct700301q.
111. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247–260, doi:10.1016/j.jmglm.2005.12.005.
112. Da Silva, S.; Vranken, A. W.; Wim, F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 1–8, doi:10.1186/1756-0500-5-367.
113. Punkvang, A.; Saparpakorn, P.; Hannongbua, S.; Wolschann, P.; Beyer, A.; Pungpo, P. Investigating the structural basis of arylamides to improve potency against M. Tuberculosis strain through molecular dynamics simulations. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5585–5593.
114. Ibarra-Alvarado, C.; García, J. A.; Aguilar, M. B.; Rojas, A.; Falcón, A.; Heimer de la Coteria, E. P. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 511–518, doi:10.1016/j.cbpc.2007.06.002.
115. Castro-Ruiz, J. E.; Rojas-Molina, A.; Luna-Vázquez, F. J.; Rivero-Cruz, F.; García-Gasca, T.; Ibarra-Alvarado, C. Affinin (Spilanthol), isolated from *heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1–15, doi:10.3390/ijms18010218.
116. Belloli, C.; Carcano, R.; Arioli, F.; Beretta, C. Affinity of isoxsuprine for

- adrenoreceptors in equine digital artery and implications for vasodilatory action. **2000**, 32, 119–124.
117. Stipanuk, M. H.; Beck, P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* **1982**, 206, 267–277.
 118. Aguilera-Durán, G. Síntesis de derivados de ácido ursólico con actividad Vasodilatadora, Universidad Autónoma de Querétaro, 2016.
 119. Houston, D. R.; Walkinshaw, M. D. Consensus docking: Improving the reliability of docking in a virtual screening context. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 384–390, doi:10.1021/ci300399w.
 120. Nishioka, K.; Nakagawa, K.; Umemura, T.; Jitsuiki, D.; Ueda, K.; Goto, C.; Chayama, K.; Yoshizumi, M.; Higashi, Y. Carvedilol improves endothelium-dependent vasodilation in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart* **2007**, 93, 247–248, doi:10.1136/hrt.2006.087999.
 121. Jiang, H.; Polhemus, D. J.; Islam, K. N.; Torregrossa, A. C.; Li, Z.; Potts, A.; Lefer, D. J.; Bryan, N. S. Nebivolol acts as a S-nitrosoglutathione reductase inhibitor. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2016**, 21, 478–485, doi:10.1177/1074248415626300.
 122. Priviero, F. B. M.; Teixeira, C. E.; Toque, H. A. F.; Claudino, M. A.; Webb, R. C.; De Nucci, G.; Zanesco, A.; Antunes, E. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: A role for nitric oxide and calcium entry blockade. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, 33, 448–455, doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04386.x.
 123. Figueroa, X. F.; Poblete, I.; Fernandez, R.; Pedemonte, C.; Cortes, V.; Huidobro-Toro, J. P. NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of β -adrenoceptors. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **2009**, 297, H134–H143, doi:10.1152/ajpheart.00023.2009.
 124. Alegría-González, C. L. Estudios de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular de triterpenos selectos en las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial y cistationina gamma-liasa, Universidad Autónoma de Querétaro, 2017.

125. Krimm, I. Identifying protein allosteric transitions for drug discovery with 1D NMR. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 901–904, doi:10.1002/cmdc.201700064.
126. Lu, S.; Huang, W.; Zhang, J. Recent computational advances in the identification of allosteric sites in proteins. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1595–1600, doi:10.1016/j.drudis.2014.07.012.
127. Marzo, A.; Zava, D.; Coa, K.; Dal Bo, L.; Ismaili, S.; Tavazzi, S.; Cantoni, V. Pharmacokinetics of isoxsuprine hydrochloride administered orally and intramuscularly to female healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* **2009**, *59*, 455–60, doi:10.1055/s-0031-1296425.
128. Jozwiak, K.; Woo, A.; Tanga, M.; Toll, L.; Jimenez, L.; Kozocas, J.; Plazinska, A.; Xiao, R.; Wainer, I. Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives: A platform towards highly selective and effective beta(2)-adrenergic receptor agonists. *Bioorg Med Chem* **2011**, *18*, 728–736, doi:10.1016/j.bmc.2009.11.062.
129. Cekic, E. G.; Soydan, G.; Guler, S.; Babaoglu, M. O.; Tuncer, M. Propranolol-induced relaxation in the rat basilar artery. *Vascul. Pharmacol.* **2013**, *58*, 307–312, doi:10.1016/j.vph.2012.12.004.
130. Poveromo, L. B.; Pharmed, E. L. M.; Sutherland, S. E. Midodrine for the weaning of vasopressor infusions. **2016**, 260–265, doi:10.1111/jcpt.12375.
131. Tang, S. T.; Su, H.; Zhang, Q.; Tang, H. Q.; Wang, C. J.; Zhou, Q.; Wei, W.; Zhu, H. Q.; Wang, Y. Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor-B/IB system through the activation of AMP-activated protein kinase. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *37*, 1558–1566, doi:10.3892/ijmm.2016.2578.
132. Galleano, M.; Bernatova, I.; Puzserova, A.; Balis, P.; Sestakova, N.; Pechanova, O.; Fraga, C. G. (–)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB Life.* **2013**, *65*, 710–715, doi:10.1002/iub.1185.
133. Eliseeva, E. V.; Kulakova, N. V.; Nevzorova, V. A. Nitric oxide synthase in bronchial epithelium and nitric oxide metabolites in the lungs of rats with bronchial asthma after fenoterol inhalation. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2000**, *130*,

- 763–765, doi:10.1007/BF02766088.
134. Odnoshivkina, U. G.; Sytchev, V. I.; Nurullin, L. F.; Giniatullin, A. R.; Zefirov, A. L.; Petrov, A. M. β 2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: implication in delayed inotropic effect. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *765*, 140–153, doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.020.
 135. Nade, V. S.; Kawale, L. A.; Pateland, K. M. Protective effect of sitagliptin and rosuvastatin combination on vascular endothelial dysfunction in type-2 diabetes. *Indian J Pharm Sci* **2015**, *77*, 96–102.
 136. Szabo, C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* **2017**, *312*, 125–129, doi:10.1152/ajpcell.00282.2016.
 137. Wang, Y.; Dong, X. Nebivolol ameliorates asymmetric dimethylarginine-induced vascular response in rat aorta via β 3 adrenoceptor-mediated mechanism. *Clin. Exp. Hypertens.* **2016**, *38*, 252–259, doi:10.3109/10641963.2015.1081233.
 138. Broeders, M. A.; Doevendans, P. A.; Bekkers, B.; Bronsaer, R.; van Gorsel, E.; Heemskerk, J.; MG, Egbrink, M.; van Breda, E.; Reneman, R.; van Der Zee, R. Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation* **2000**, *102*, 677–84.
 139. Dessy, C.; Saliez, J.; Ghisdal, P.; Daneau, G.; Lobysheva, I. I.; Frérart, F.; Belge, C.; Jnaoui, K.; Noirhomme, P.; Feron, O.; Balligand, J. L. Endothelial β 3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation β -blocker nebivolol. *Circulation* **2005**, *112*, 1198–1205, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.532960.
 140. Quang, T. T.; Rozec, B.; Audigane, L.; Gauthier, C. Investigation of the different adrenoceptor targets of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* **2009**, *156*, 601–608, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00074.x.
 141. Chen, J.; Huang, C.; Zhang, B.; Huang, Q.; Chen, J.; Xu, L. The effects of carvedilol on cardiac structural remodeling: The role of endogenous nitric

- oxide in the activity of carvedilol. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 1155–1158, doi:10.3892/mmr.2013.1329.
142. Kozlovski, V. I.; Lomnicka, M.; Bartus, M.; Sternak, M.; Chlopicki, S. Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of β 2 receptors and COX-2/PGI2 pathways. *Pharmacol. Reports* **2015**, *67*, 1041–1047, doi:10.1016/j.pharep.2015.03.008.
143. Yao, K.; Zhang, W. W.; Yao, L.; Yang, S.; Nie, W.; Huang, F. Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *470*, 961–966, doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.089.
144. Oliveira, P. J.; Gonçalves, L.; Monteiro, P.; Providencia, L. a; Moreno, A. J. Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria? *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2005**, *3*, 147–58, doi:10.2174/1570161053586903.
145. Wang, L.; Wang, R.; Jin, M.; Huang, Y.; Liu, A.; Qin, J.; Chen, M.; Wen, S.; Pi, R.; Shen, W. Carvedilol attenuates 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells: Involvement of Akt and Nrf2/ARE pathways. *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 1733–1740, doi:10.1007/s11064-014-1367-2.
146. Garland, C. J.; Hiley, C. R.; Dora, K. A. EDHF : spreading the influence of the endothelium. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 839–852, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01148.x.
147. Zhao, W.; Zhang, J.; Lu, Y.; Wang, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6008–6016, doi:10.1093/emboj/20.21.6008.
148. Peers, C.; Bauer, C. C.; Boyle, J. P.; Scragg, J. L.; Dallas, M. L. Modulation of ion channels by hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 95–105, doi:10.1089/ars.2011.4359.
149. Erreguin-Luna, B. Identificación de compuestos vasodilatadores que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE, a partir de la exploración virtual de bases de datos de compuestos comerciales, Universidad Autónoma de Querétaro, 2016.

150. Kim-Egloff, C.; Hässig, M.; Bruckmaier, R.; Bleul, U. Doppler sonographic examination of uterine and placental perfusion in cows in the last month of gestation and effects of epidural anesthesia and isoxsuprine. *Theriogenology* **2016**, *85*, 986–998, doi:10.1016/j.theriogenology.2015.11.010.
151. Hill, J. W.; Thompson, J. F.; Carter, M. B.; Edwards, B. S.; Sklar, L. A.; Rosenberg, G. A. Identification of isoxsuprine hydrochloride as a neuroprotectant in ischemic stroke through cell-based high-throughput screening. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0096761.
152. Amer, M.; Dungan, K.; McKinney, G. The effects of isoxsuprine hydrochloride on the cyclic nucleotide system in the rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther* **1974**, *190*, 243–8.
153. Cohen, M.; Wiley, K. Beta1 and beta2 receptor mechanisms in rat jugular veins: differences between norepinephrine and isoproterenol-induced relaxation. *Life Sci.* **1978**, *23*, 1997–2006.
154. Calixto, J.; Simas, C. Mechanism of action of isoprenaline, isoxuprine, terbutaline and orciprenaline on gravid human isolated myometrium. Influence of the neuronal uptake process. *Biol Reprod.* **1984**, *30*, 1117–23.
155. Abel, P.; Fox, A.; Minneman, K. Effects of isoxuprine and nylidrin on adrenoreceptors in rat vas deferens. *J Aut. Pharmacol* **1985**, *5*, 213–9.
156. Elliott, J.; Soydan, J. Characterization of b-adrenoceptors in equine digital veins: implications of the modes of vasodilatory action of isoxsuprine. *Equine vet. J., Suppl.* **1995**, *19*.
157. Brousseau, D.; Desjardins, J.; Jasmin, G.; Dumont, L. Altered coronary and cardiac adrenergic response in the failing hamster heart: role of cyclooxygenase derivatives. *Can J Physiol Pharmacol.* **2002**, *80*, 218–225.
158. Limberg, J.; Johansson, R.; Peltonen, G.; Harrell, J.; Kellawan, J.; Eldridge, M.; Sebranek, J.; Schrage, W. β -Adrenergic-mediated vasodilation in young men and women: cyclooxygenase restrains nitric oxide synthase. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* **2016**, *310*, H756-64, doi:10.1152/ajpheart.00886.2015.
159. Toda, N.; Okamura, T. Beta adrenoceptor subtype in isolated human, monkey and dog epicardial coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **1990**, *253*, 518–


- 24.
160. Raymajhi, R.; Pratap, K. A comparative study between nifedipine and isoxsuprine in the suppression of preterm labour. *Kathmandu Univ Med J* **2003**, *1*, 85–90.
161. Elliott, W. J.; Ram, C. V. S. Calcium channel blockers. *J. Clin. Hypertens.* **2011**, *13*, 687–689, doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00513.x.
162. Godfraind, T. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2014**, *19*, 501–515, doi:10.1177/1074248414530508.
163. Salomone, S.; Silva, C. L. M.; Morel, N.; Godfraind, T. Facilitation of the vasorelaxant action of calcium antagonists by basal nitric oxide in depolarized artery. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 505–512, doi:10.1007/BF00168443.
164. Tang, L.; Gamal El-Din, T.; Swanson, T.; Pryde, D.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W. Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs. *Nature* **2016**, *537*, 117–121.
165. Sud, M. MayaChemTools: An Open Source Package for Computational Drug Discovery. *J Chem Inf Model* **2016**, *56*, 2292–2297.
166. Ahmed, M.; Jalily Hasani, H.; Ganesan, A.; Houghton, M.; Barakat, K. Modeling the human Nav1.5 sodium channel: structural and mechanistic insights of ion permeation and drug blockade. *Drug Des Devel Ther* **2017**, *11*, 2301–2324.

ANEXO

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN DERIVADO DE ESTA TESIS

Article

Vasodilation Elicited by Isoxsuprine, Identified by High-Throughput Virtual Screening of Compound Libraries, Involves Activation of the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} Pathways and Blockade of α_1 -Adrenoceptors and Calcium Channels

Daniella Medina-Ruiz ^{1,2}, Berenice Erreguin-Luna ², Francisco J. Luna-Vázquez ², Antonio Romo-Mancillas ³, Alejandra Rojas-Molina ² and César Ibarra-Alvarado ^{2,*}

¹ Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro C.P. 76010, Mexico; daniellamedinar@gmail.com

² Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, Mexico; bereel@outlook.com (B.E.-L.); fjlnunavz@yahoo.com.mx (F.J.L.-V.); rojasa@uaq.mx (A.R.-M.)

³ Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, Mexico; ruben.romo@uaq.mx

* Correspondence: cibarra@uaq.mx; Tel.: +52-442-1921-200 (ext. 5527)

Received: 5 February 2019; Accepted: 8 March 2019; Published: 11 March 2019



Abstract: Recently, our research group demonstrated that uvaol and ursolic acid increase NO and H₂S production in aortic tissue. Molecular docking studies showed that both compounds bind with high affinity to endothelial NO synthase (eNOS) and cystathionine gamma-lyase (CSE). The aim of this study was to identify hits with high binding affinity for the triterpene binding-allosteric sites of eNOS and CSE and to evaluate their vasodilator effect. Additionally, the mechanism of action of the most potent compound was explored. A high-throughput virtual screening (HTVS) of 107,373 compounds, obtained from four ZINC database libraries, was performed employing the crystallographic structures of eNOS and CSE. Among the nine top-scoring ligands, isoxsuprine showed the most potent vasodilator effect. Pharmacological evaluation, employing the rat aorta model, indicated that the vasodilation produced by this compound involved activation of the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} signaling pathways and blockade of α_1 -adrenoceptors and L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels. Incubation of aorta homogenates in the presence of isoxsuprine caused 2-fold greater levels of H₂S, which supported our preliminary *in silico* data. This study provides evidence to propose that the vasodilator effect of isoxsuprine involves various mechanisms, which highlights its potential to treat a wide variety of cardiovascular diseases.

Keywords: high-throughput virtual screening; isoxsuprine; NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways; calcium channels; vasodilation

1. Introduction

High blood pressure plays a major role in the occurrence of cardiovascular diseases (CVD), which represent the main cause of death in the world [1,2]. Usually, hypertension treatment requires the employment of multiple antihypertensive drugs, many of which have low therapeutic effectiveness and cause severe adverse effects [1,3–5].

Hypertension has been associated with endothelial dysfunction, which is characterized by a disruption in the synthesis and/or release of endothelium-derived relaxing factors [6–10], such as

the gasotransmitters NO and H₂S, whose participation in regulating vasodilation is critical [11–15]. In recent years, the interest in finding novel drugs that either donate NO and H₂S or induce their synthesis, or both, has increased [14,16,17].

Earlier *in silico* studies suggested that naturally occurring triterpenes, such as uvaol and ursolic, morolic, and betulinic acids, display high affinity for binding pockets found in the substrate access to the catalytic site of eNOS and might directly activate it [18,19]. We also previously found, using *in silico* analysis, that ursolic acid and uvaol bind with high affinity to a site that could act as an allosteric site on CSE [18]. These findings supported the hypothesis that the proposed triterpene-binding sites to both enzymes might represent promissory pharmacological targets in the search of new hit compounds for the development of drugs useful to treat CVD. In this context and considering that high throughput virtual screening (HTVS) of lead-like libraries represents a valuable hit finding strategy for pharmaceutical research and development [20–23], the aim of the present study was to identify new hits that bind with high affinity to the triterpene-binding putative allosteric sites on eNOS and CSE, through HTVS of commercial natural and synthetic compound libraries. Compounds that showed the highest affinity for the proposed pharmacological targets were evaluated *ex vivo* and participation of the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways in their vasodilator effect was determined. Once the compound with the most potent vasodilator effect was identified, its mechanism of action was investigated in more detail.

2. Results

2.1. Virtual Screening

Figure 1 shows the sequence of the screening process. 107,373 compounds, with unique Smiles codes, were obtained from the ZINC database. The MOE software [24] was used in order to exclusively select non-reactive compounds with suitable physico-chemical properties (MW under 500 and less than 5 hydrogen bond donors and 10 hydrogen bond acceptors). The LigPrep program (Schrödinger Release 2015-4) was employed to generate 3D structures of the selected compounds, considering their stereochemistry, protonation states, and tautomeric forms.

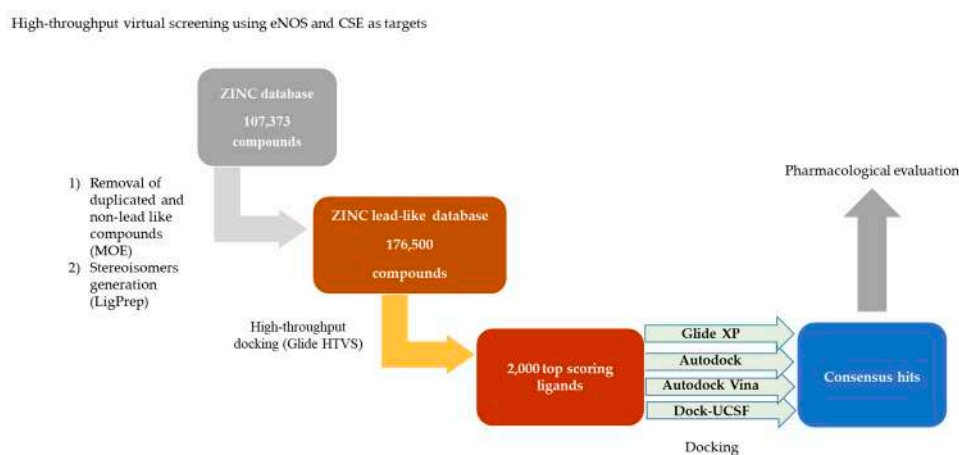


Figure 1. Virtual screening strategy diagram. Once duplicated compounds were removed from the ZINC database, lead-like compounds were selected and high-throughput virtual screening was done. Compounds with the highest scores were docked using Glide XP, Autodock, Autodock Vina, and Dock-UCSF. The consensus hits were identified and subsequently evaluated.

This procedure led to a set of 176,500 lead like structures that were subjected to a docking into the triterpene allosteric binding sites on eNOS and CSE [18], using the GLIDE High-Throughput Virtual Screening (HTVS) docking module (Glide, version 6.2, Schrödinger) [25–27]. Virtual screening was performed with the highest-resolution protein structures available from the Protein Data Bank

archive, eNOS (PDB: 3NOS) [28] and CSE (PDB: 3COG) [29]. The 2000 top scoring ligands for each of the targets were subsequently docked within the binding site of interest, employing Glide XP [27], AutoDock [30], AutoDock Vina [31], and UCSF-Dock [32]. The nine top ranking compounds with best scores (“consensus hits”; Supplementary materials Table S1) were selected via consensus in all four programs [33].

2.2. Determination of the Vasodilator Effect of the Consensus Hits and Involvement of the NO/cGMP and the H₂S/K_{ATP} Pathways in Their Mechanism of Action

All selected consensus hits induced a significant concentration-dependent relaxation of the rat aorta and reached a 100% of maximum effect. The most potent compounds were isoxsuprine (EC₅₀ = 0.046 ± 0.004 μM) and carvedilol (EC₅₀ = 0.069 ± 0.003 μM), which turned out to be approximately five-fold less potent than sodium nitroprusside (SNP: EC₅₀ = 0.0099 ± 0.001 μM), used as a positive control.

Nebivolol showed an EC₅₀ = 2.014 ± 0.215 μM, whereas, sitagliptin, fenoterol, midodrin, epicatechin, pindolol, and propranolol showed EC₅₀ values higher than 18 μM. The concentration-response curves (CRC) of the vasodilator effect elicited by the consensus hits and the positive controls [SNP, acetylcholine (ACh), and sodium hydrosulfide (NaHS)] are shown in Figure 2 and their EC₅₀ and E_{max} values are summarized in Table 1.

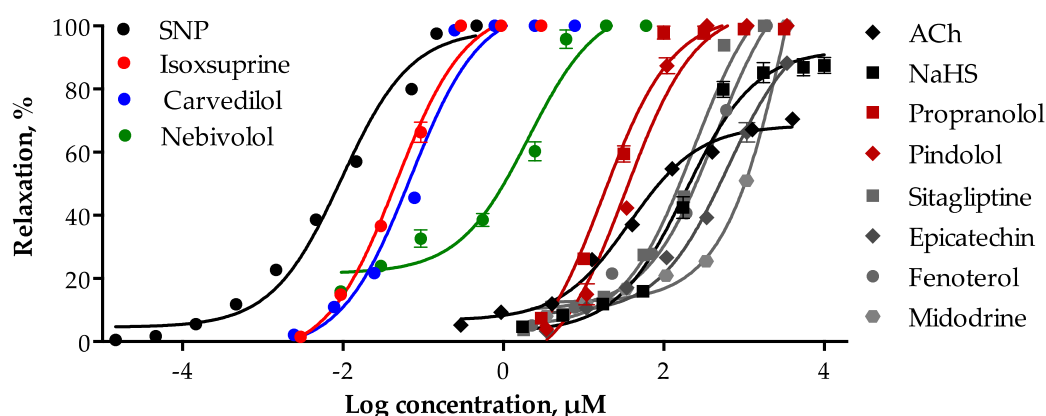


Figure 2. Concentration-response curves of the vasodilator effect of the consensus hits and the positive controls (SNP, ACh, and NaHS). Values are expressed as mean ± SEM (*n* = 6).

Table 1. EC₅₀ values of the consensus hits and the positive controls.

Compound	EC ₅₀ (μM) ± SEM	E _{max} (%) ± SEM
Controls		
SNP	0.0099 ± 0.001	100.7 ± 0.747
ACh	50.30 ± 5.126	68.46 ± 1.122
NaHS	191.0 ± 9.841	92.17 ± 2.721
Highly Potent Compounds		
Isoxsuprine	0.046 ± 0.004	106.1 ± 0.343
Carvedilol	0.069 ± 0.003	106.6 ± 0.115
Nebivolol	2.014 ± 0.215	106.7 ± 0.543
Lowly Potent Compounds		
Propranolol	18.120 ± 1.419	103.6 ± 1.663
Pindolol	39.490 ± 2.603	106 ± 0.463
Sitagliptine	252.30 ± 8.058	117.6 ± 0.497
Fenoterol	608.60 ± 43.225	120.3 ± 1.548
Epicatechin	626.40 ± 67.372	101.5 ± 2.400
Midodrine	4698 ± 324.691	219.5 ± 8.219

Data are means ± SE, relaxation is expressed as a percentage of the precontraction induced by 1 μM phenylephrine; *n* = 6.

Inhibition of eNOS with 100 μM N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) significantly shifted to the right the CRC of the consensus hits, with the consequent increase in their respective EC_{50} values (Table 2). Although it had been previously described that NO is involved in the vasorelaxant effect of carvedilol [34], nebivolol [35], propranolol [36], pindolol [37], and epicatechin [38], this is the first report, which shows that activation of the NO/cGMP pathway contributes to the vasodilator effect elicited by midodrine, sitagliptin, fenoterol, and isoxsuprine. On the other hand, the vasodilator effect of all the consensus hits, with the exception of nebivolol and propranolol, was reduced by 10 mM DL-propargylglycine (PAG), which was evidenced by the increase in their EC_{50} values (Table 2). These results suggested that the vasodilation elicited by the consensus hits involves activation of eNOS and/or CSE.

Figure 3 shows participation of the NO/cGMP and $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$ pathways in the vasodilator effect elicited by isoxsuprine, carvedilol, and nebivolol, the three most potent consensus hits (Figure 4). Both biochemical pathways importantly contribute to isoxsuprine- and carvedilol- induced vasodilation. However, the vasodilator effect elicited by nebivolol is independent of the $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$ pathway.

Table 2. EC_{50} values of the “consensus hits” and participation of the NO/cGMP and the $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$ signaling pathways in their vasodilator effect.

Compound	Control	L-NAME	PAG
	EC_{50} (μM) \pm SEM	EC_{50} (μM) \pm SEM	EC_{50} (μM) \pm SEM
Most Potent Vasodilators			
Isoxsuprine	0.0461 ± 0.004	0.3846 ± 0.040 ***	0.3255 ± 0.026 ***
Carvedilol	0.0695 ± 0.003	0.3643 ± 0.011 ***	0.1500 ± 0.019 **
Nebivolol	2.0135 ± 0.215	11.290 ± 1.501 ***	2.5280 ± 0.229
Less Potent Vasodilators			
Propranolol	18.120 ± 1.419	40.430 ± 5.696 **	27.900 ± 3.651
Pindolol	39.490 ± 2.603	166.1 ± 3.610 ***	89.47 ± 7.940 ***
Sitagliptin	252.30 ± 8.058	864.3 ± 8.692 ***	436.2 ± 12.63 ***
Fenoterol	608.6 ± 43.225	882.1 ± 27.513 ***	1038 ± 22.241 ***
Epicatechin	626.4 ± 67.372	1789 ± 389.469 *	3087 ± 552.718 **
Midodrine	4698 ± 324.691	8618 ± 2060.477 *	10076 ± 1955.342 *

Data are means \pm SEM ($n = 6$). Statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by Dunnett’s post hoc test. Values of * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ were considered as significant.

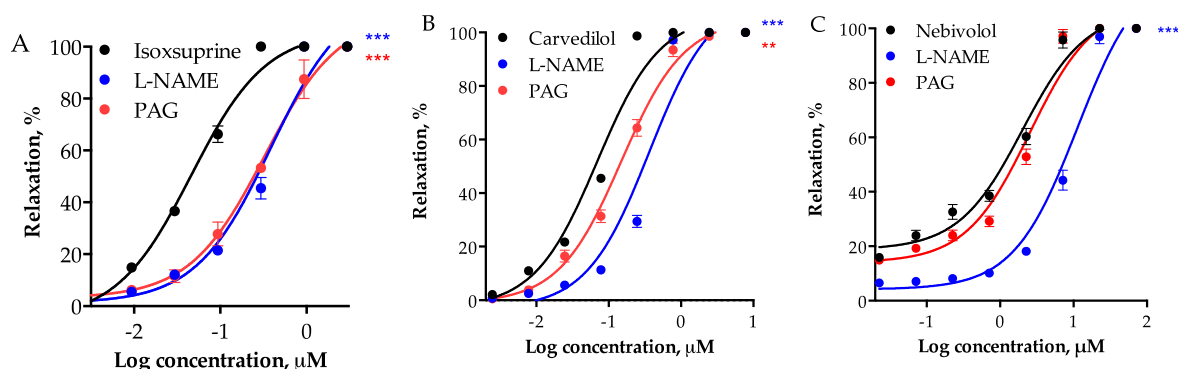


Figure 3. Vasodilatory effect of (A) isoxsuprine, (B) carvedilol, and (C) nebivolol in the absence (control) and presence of inhibitors of eNOS and CSE (L-NAME, 100 μM and PAG, 10 mM, respectively). Data are means \pm SEM ($n = 6$). Statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by Dunnett’s post hoc test (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

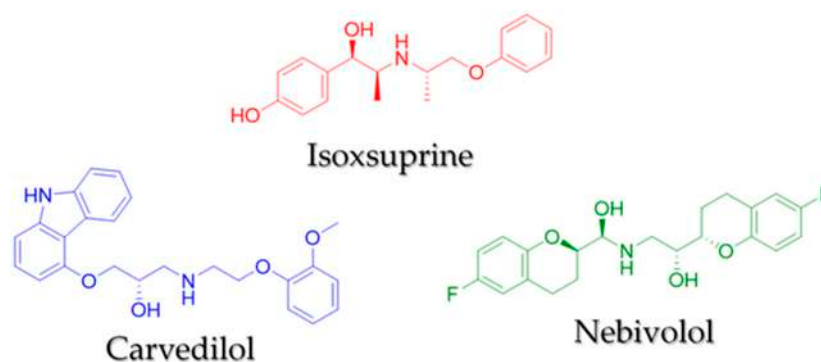


Figure 4. Chemical structures of the most potent compounds: isoxsuprine, carvedilol, and nebivolol.

2.3. Virtual Pharmacophoric Elements Identification and General Protein-Ligand Interaction Model

Considering that individual identification of the interactions relevant for the binding of the consensus hits to eNOS and CSE would be limited to that particular compound and thus would render limited information about the structural requirements for best binding, we conducted a search of pharmacophoric elements in the best protein-ligand complexes obtained by consensus docking. Thereafter, we applied Partitioning Around Medoids (PAM) to cluster these elements in order to identify the main residues and protein-ligand interactions essential for increased affinity for both enzymes (Figure 5). This statistical analysis, which is not a formal pharmacophore model, will be useful for future identification of active compounds.

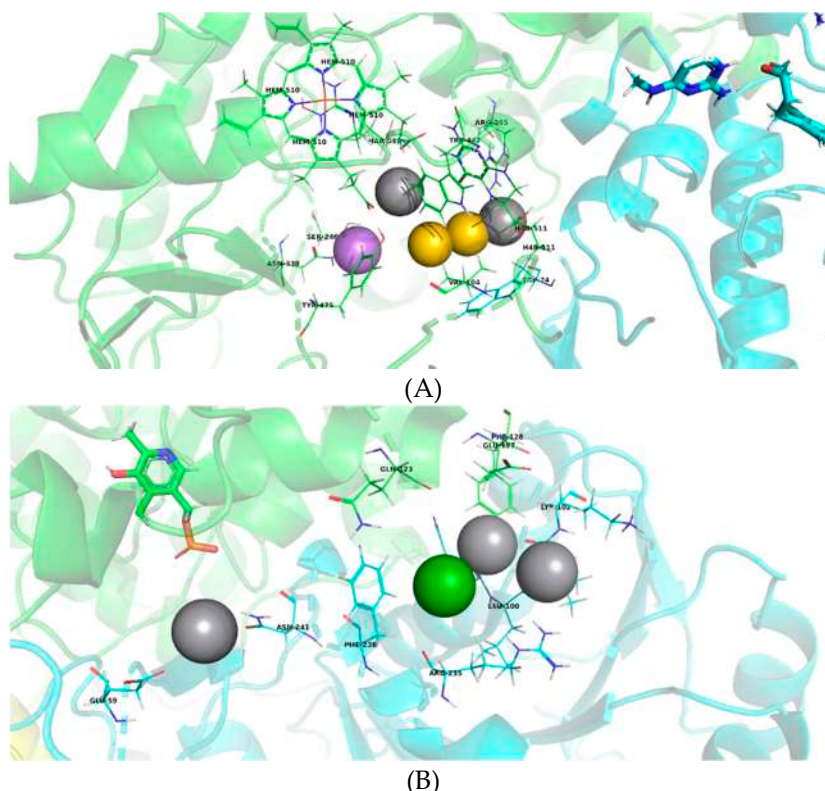


Figure 5. Model of pharmacophoric elements with (A) eNOS (3NOS structure) and (B) CSE (3COG structure). Hydrogen bond donors are represented in gray; aromatic-type interactions in green; hydrophobic interactions in yellow and an interaction as bridge acceptor of hydrogen in purple.

In the case of eNOS, the main amino acid residues that interact with the consensus hits are located both on the substrate access channel and within the catalytic site. The tested molecules showed two

interactions between hydrogen bond donors and heme (HEM) and tetrahydrobiopterin (H4B) cofactors (represented in gray), as well as hydrophobic interactions with Trp447 and Val104 (in yellow), and an additional interaction between a hydrogen bond acceptor and Asn338 (in purple). These results suggest that the consensus hits bind to eNOS at different amino acid residues to which uvaol and ursolic acid bind, most likely due to their structural differences, since unlike triterpenoids that are mainly hydrophobic, the consensus hits have more hydrogen bond donors and acceptors.

On the other hand, the consensus hits were found to interact with amino acids that belong to subunits A and B of CSE, which supports our proposal that the ligand binding site is located at the interface between these two subunits. These residues are positioned within a 12.5 Å radius of the pyridoxal phosphate of chain A (Figure 5B), which could be considered a large distance to influence the catalytic site. However, the binding site is placed very close to the substrate access channel to the catalytic site, which is formed within the A–B interface of this homotetrameric enzyme. Hydrogen bonding interactions are observed between hydrogen bond donors located in the ligands and Glu59, His99, and Leu101 of CSE (in gray). An additional aromatic interaction with Phe238 (in green) was found. These findings suggest that the consensus hits bind to the proposed binding site of triterpenes found in our previous works on CSE and could play a role as allosteric activators of this enzyme.

2.4. Molecular Dynamics (MD) of Isoxsuprine–CSE Interaction

Considering the vasodilator potency of isoxsuprine and the results obtained from molecular docking, which suggested that this compound displays high binding affinity for CSE, we conducted a MD simulation of isoxsuprine–CSE interaction (the most potent vasodilator) and fenoterol–CSE interaction (this compound belongs to the group of less potent vasodilators, Table 2). The plot of calculated binding energy (CBE) (Figure S1, Supplementary materials) indicated that the isoxsuprine–CSE complex remains in equilibrium for approximately 5 ns, and subsequently this compound gradually loses its affinity for the enzyme. On the other hand, fenoterol showed a favorable affinity for CSE at the start of the simulation, to subsequently lose it faster than isoxsuprine does. In the stability period (1–5 ns), the fenoterol–CSE complex has a mean LIE of 1.83 kcal/mol, which is lower than the mean LIE of –26.2 kcal/mol calculated for isoxsuprine–CSE in the same period (Figure 6).

Our *ex vivo* assays clearly demonstrated that the H₂S/K_{ATP} pathway is involved in isoxsuprine-induced vasodilation, indicating that although *in silico* MD simulation showed that isoxsuprine affinity for CSE decreases during the simulation period, ligand–enzyme interactions are significant enough to increase enzymatic activity, which eventually contributes to produce an important vasodilation. Contrastingly, fenoterol, which according to the MD simulation quickly loses affinity for CSE, displayed a significantly lower vasodilation.

Figure 6 shows isoxsuprine–CSE interactions during MD simulations using GROMACS. Isoxsuprine–CSE complex lost some of the binding interactions previously visualized through molecular docking. However, MD simulation data confirmed that isoxsuprine establishes interactions with A and B chain residues by forming hydrogen bonds between its amino group and a glutamic acid residue (Glu59) and its phenolic hydroxyl group and an alanine residue (Ala357). These bindings are located at the interface of A and B subunits of CSE at the previously identified as a triterpene-binding site [18]. Noteworthy, this site was preliminarily tested by molecular dynamics simulations carried out with the naturally occurring triterpenes uvaol and oleanolic acid [39], which elicited a medium and almost nil H₂S-dependent vasodilatory activity, respectively. According to those simulations, uvaol and oleanolic acid form a complex with CSE with a mean LIE of –0.73 and 33.88 kcal/mol, respectively. These results, together with the ones we obtained in the present study for fenoterol and isoxsuprine, suggests a possible correlation between the vasodilator effect and the theoretical LIE value, which predicts the binding affinity of docked compounds with CSE.

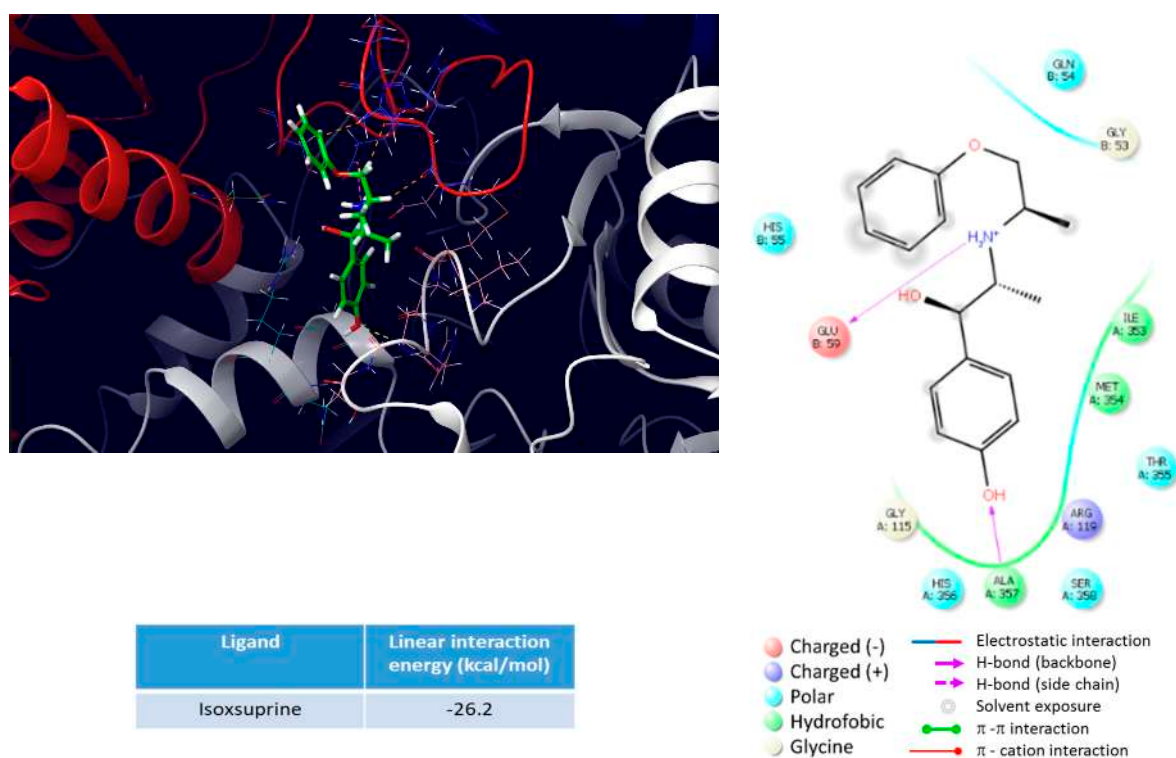


Figure 6. Isoxsuprine-CSE interactions during MD simulations using GROMACS.

2.5. Increase in H_2S Levels Elicited by Isoxsuprine

In order to confirm whether direct stimulation of CSE participated, at least partly, in isoxsuprine-induced vasodilation, as suggested by our *in silico* study, H_2S levels in aorta homogenates were measured. We found that incubation of rat aorta rings with isoxsuprine resulted in approximately two-fold increased levels of this gasotransmitter (Figure 7). As expected, when aortic rings were simultaneously incubated with isoxsuprine and PAG, a drastic reduction in H_2S levels was observed. These results supported the hypothesis that isoxsuprine might directly activate CSE.

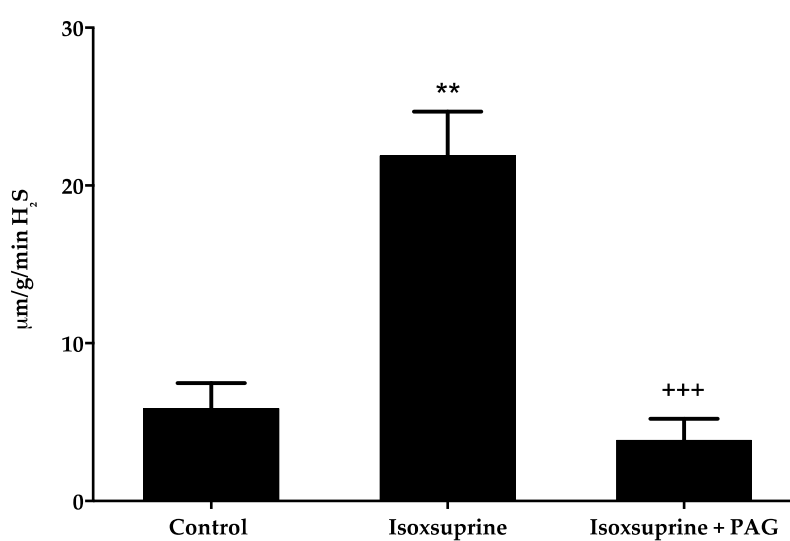


Figure 7. Total H_2S production (measured as sulfides) induced by isoxsuprine in rat aortic homogenates in the absence or presence of PAG. Statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by a Tukey's test (** $p = 0.0001$ isoxsuprine vs. control; +++ $p < 0.0001$ isoxsuprine vs. isoxsuprine + PAG).

2.6. Participation of Other Endothelial-Derived Relaxing Factors in the Vasodilator Effect of Isoxsuprine

Denudation of aortic rings significantly reduced the vasodilator effect of isoxsuprine ($EC_{50} = 0.3781 \pm 0.019 \mu\text{M}$), further supporting involvement of the NO/cGMP and $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$ pathways in its vasodilator effect. However, considering that eNOS and CSE inhibition did not completely abolish isoxsuprine-induced vasodilation, the role of other endothelium-derived vasodilators, such as CO and prostacyclin (PGI_2) was investigated. Neither inhibition of heme oxygenase (HO) with chromium mesoporphyrin IX, nor inhibition of cyclooxygenase (COX) with indomethacin significantly reduced vasodilatory effect of isoxsuprine (Figure 8A). In contrast, the vasorelaxant effect of isoxsuprine was significantly reduced by blockade of ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) ($EC_{50} = 1.152 \pm 0.0335 \mu\text{g}/\text{mL}$; $p < 0.0001$) (Figure 8B), indicating that these channels are involved in this effect.

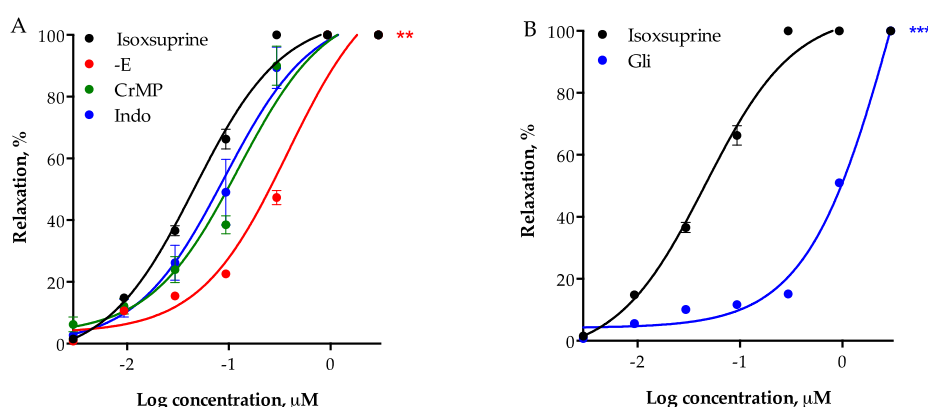


Figure 8. (A) Vasodilatory effect of isoxsuprine in the presence (+E) or absence (-E) of endothelium or in the presence of the heme oxygenase inhibitor, chromium mesoporphyrin IX (CrMP) ($15 \mu\text{M}$) or the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (Indo) ($10 \mu\text{M}$). Statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test (** $p < 0.001$ vs. control). (B) Vasodilatory effect of isoxsuprine in the absence (control) or presence of the ATP-dependent potassium channel (K_{ATP}) inhibitor, glibenclamide (Gli) ($1 \mu\text{M}$). Statistical analysis was made using t-test with Welch's correction (***) $p < 0.0001$).

2.7. Participation of β_2 -Adrenoceptor Activation and α_1 -Adrenoceptor Blockade in Isoxsuprine-Induced Vasodilation

In order to determine participation of β_2 -adrenoceptors in isoxsuprine-induced vasodilation, aortic rings were incubated with $1 \mu\text{M}$ propranolol (a non-selective antagonist of β_1 and β_2 receptors). Our results indicated that the vasodilator effect produced by isoxsuprine ($EC_{50} = 0.046 \pm 0.004 \mu\text{M}$) doesn't involve activation of β_2 -adrenergic receptors, as demonstrated by the fact that the mean effective concentration of the vasodilation provoked by isoxsuprine was not significantly modified ($p = 0.9615$) in the presence of $1 \mu\text{M}$ propranolol ($EC_{50} = 0.033 \pm 0.003 \mu\text{M}$). On the other hand, $1 \mu\text{M}$ isoxsuprine significantly ($p < 0.0001$) shifted to the right ($EC_{50} = 2.56 \pm 0.19 \mu\text{M}$) the concentration-response curve for the vasoconstrictor effect of phenylephrine ($EC_{50} = 0.032 \pm 0.003 \mu\text{M}$), a specific α_1 -adrenoceptor agonist. A similar behavior was observed when the vasoconstriction provoked by phenylephrine was evaluated in the presence of prazosin ($EC_{50} = 0.9 \pm 0.057 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$), a specific inhibitor of α_1 -adrenoceptors (Figure 9B). In summary, the results derived from these pharmacological experiments showed evidence suggesting that blockade of α_1 -adrenoceptors contributes to isoxsuprine-induced vasodilation, while activation of β_2 -adrenoceptors does not participate in the vasodilatory mechanism of this compound.

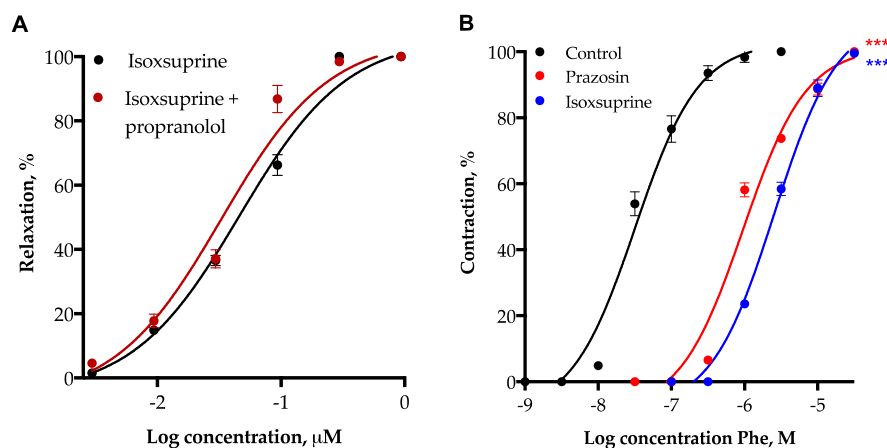


Figure 9. (A) Vasodilatory effect of isoxsuprine in the absence and presence of propranolol ($1 \mu\text{M}$), a β -receptor antagonist. (B) Vasoconstrictor effect of Phenylephrine (Phe) in the absence (control) or presence of isoxsuprine ($1 \mu\text{M}$) or prazosin ($0.12 \mu\text{M}$), used as a positive control. Data are means \pm SEM ($n = 6$). Statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test. Values of *** $p < 0.0001$ were considered as significant.

2.8. Involvement of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels in the Vasodilator Effect of Isoxsuprine

To assess participation of L-type voltage-dependent calcium channels (LVCCs) in the vasodilator effect of isoxsuprine, a CRC of the vasoconstrictor effect of CaCl_2 on isolated rat aorta in the presence of isoxsuprine was constructed (Figure 10). The results showed that this compound is capable of blocking LVCCs, since it shifted the CRC of CaCl_2 -induced aortic contractions ($\text{EC}_{50} = 0.0004459 \pm 0.00003 \text{ M}$) to the right and significantly increased the EC_{50} ($0.003256 \pm 0.0002 \text{ M}$, $p < 0.0001$). Verapamil, used as a positive control, behaved in a similar manner ($\text{EC}_{50} = 0.002712 \pm 0.0003 \text{ M}$, $p = 0.0008$).

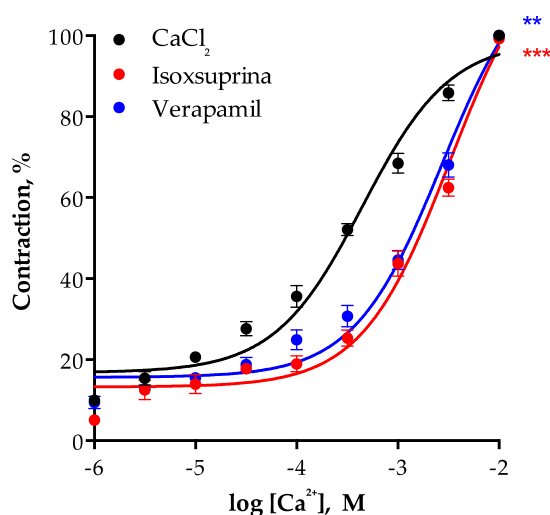


Figure 10. Vasoconstrictor effect of CaCl_2 in the absence or presence of isoxsuprine or verapamil (positive control). Statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test (** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ vs. control (CaCl_2)).

3. Discussion

Our previous studies carried out on ursolic acid and uvaol showed that the vasodilator effect produced by these two natural triterpenes, is mediated by the NO/cGMP and $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$ pathways, possibly by binding to putative allosteric control sites located in NOS and CSE, which provokes direct activation of these enzymes [18]. We therefore proposed that the triterpene binding sites on both

enzymes might represent allosteric control sites that could be considered valuable pharmacological targets in the search of new hits for the development of drugs to treat CVD. These hits, very likely structurally different from competitive activators, could act as positive allosteric modulators capable of activating these two important enzymes, without competing with orthosteric ligands [40,41]. In a first approach for detecting new allosteric modulators of eNOS and CSE, we performed a HTVS of commercially-available lead-like compounds, which led to the identification of nine consensus hits that displayed high binding affinity scores for both enzymes. The top scoring hits turned out to be two beta adrenergic agonists (fenoterol and isoxsuprine) [42,43], four beta adrenergic antagonists (carvedilol, nebivolol, propranolol, and pindolol) [37,44,45], an alpha-1 adrenergic agonist (midodrine) [46], a dipeptidyl-peptidase IV inhibitor (sitagliptin) [47], and an antioxidant (epicatechin) [48]. As expected, all nine consensus hits displayed a vasodilator effect on the isolated rat aorta. This is the first report, which shows that activation of the NO/cGMP pathway contributes to the vasodilator effect elicited by midodrine, fenoterol, sitagliptin, and isoxsuprine. The results obtained in the present study, support previous findings, which indicated that the pharmacological effects of fenoterol on tissues other than blood vessels are associated with a rise in NO levels [49,50]. Our results also agree with earlier studies, which demonstrated that sitagliptin, orally administered to diabetic rats, significantly increased NO levels in rat aortas and blood serum [47,51]. The HTVS performed at the triterpene-binding putative allosteric site on eNOS led to the detection of carvedilol, nebivolol, propranolol, pindolol, and epicatechin, whose vasodilatory effect mediated by activation of the NO/cGMP pathway has previously been demonstrated [34–38].

It is worth noting that the vasodilator effect of the consensus hits, excepting nebivolol and propranolol, involved activation of the H₂S/K_{ATP} pathway. Our findings provide a heretofore unknown evidence that the H₂S/K_{ATP} pathway participates in the vasodilation induced by midodrine, fenoterol, sitagliptin, isoxsuprine, carvedilol, pindolol, and epicatechin.

Isoxsuprine, carvedilol, and nebivolol displayed the most potent vasodilator effect. The potency of isoxsuprine was similar to that of carvedilol, while that of nebivolol turned out to be more than 30-fold lower. This might be attributed to the fact that the H₂S/K_{ATP} pathway does not participate in nebivolol-induced vasodilation. Numerous evidences support that H₂S enhances vascular NO signaling, thus favoring vasodilation [52]. Therefore, it is possible to hypothesize that in the case of isoxsuprine and carvedilol, simultaneous activation of the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways, which act in a cooperative way [53], leads to an increased vasodilatory effect.

Nebivolol is widely clinically used, either alone or as an add-on therapy, to treat systemic hypertension or chronic heart failure [54]. This chiral compound is provided as a racemic mixture of two enantiomers. The D isomer is a highly selective β₁-blocking agent, while the L enantiomer is capable of inducing vascular relaxation enhancing production of NO [55]. The exact mechanism by which L-nebivolol activates endothelial NO synthase has not been elucidated. Some studies provide evidence that this compound increases NO release via endothelial β₃-receptors [56]. Other authors reported that activation of the NO/cGMP pathway by nebivolol involved activation of β₂-adrenoceptors [55,57]. Our ex vivo experiments in the presence of L-NAME further confirmed the participation of the NO/cGMP pathway in the vasodilator effect of nebivolol.

On the other hand, the results of the in silico analysis also showed that carvedilol binds with high affinity to both eNOS and CSE. Consistent with this finding, inhibition of both enzymes significantly decreased the vasodilator effect of this compound. Our results are in agreement with those of previous studies, which indicated that this compound acts on vascular endothelium, provoking NO release [58,59] and enhancing NO bioavailability [45]. Carvedilol, a third-generation and nonselective β-adrenoceptor antagonist, is a licensed drug used for treating patients suffering from heart failure, hypertension, and myocardial ischaemia [60,61]. This compound interacts with multiple biological targets, antagonizing β₁-adrenergic and NMDA receptors, as well as inhibiting calcium channels [60,62]. However, to date, no study has been reported indicating that the H₂S/K_{ATP} pathway participates in the antihypertensive effect of this compound. It had already been shown that the

vasodilation produced by carvedilol was inhibited, but not completely blocked by L-NAME [63]. Possibly this L-NAME-insensitive vasorelaxation might be attributed to activation of the H₂S/K_{ATP} pathway, as suggested by our results. Moreover, our *in silico* analysis showed that stimulation of this pathway could be due to a direct activation of CSE.

On the other hand, of all the consensus hits, isoxsuprine turned out to be the most potent vasodilator, whose mechanism of action involved, to a similar degree, both the NO/cGMP and the H₂S/K_{ATP} pathways (Figure 4). Unlike, nebilolol and carvedilol, which are successfully used for treating various cardiovascular diseases [54,60,61], isoxsuprine has a restricted therapeutic use and has not been studied systematically. Therefore, we decided to further investigate the mechanism by which this compound exerts its vasorelaxant effect. Our *in silico* study suggested that this compound is able to bind with high affinity to the triterpene-binding putative allosteric site on CSE. This result was further confirmed in the pharmacological evaluation, which demonstrated that the vasodilatory effect of isoxsuprine was significantly blocked by propargylglycine. Moreover, when measuring H₂S levels in rat aorta homogenates, after incubation with isoxsuprine, a two-fold increase in the production of this gasotransmitter was observed. All these data supports our proposal that isoxsuprine-induced vasodilation involves activation of the H₂S/K_{ATP} pathway, very likely through direct interaction with CSE.

Considering that H₂S directly stimulates ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) [64,65], we explored whether these channels were involved in the mechanism of action of isoxsuprine. As expected, glibenclamide significantly decreased the vasodilator effect of this molecule, further supporting that the H₂S/K_{ATP} pathway underlies its effect. It is known that isoxsuprine activates β_2 -adrenoceptors and blocks α_1 -adrenoceptors, triggering relaxation of smooth muscle [66,67]. Due to this effect isoxsuprine has been employed to treat some pathological conditions, including cerebrovascular insufficiency, Raynaud's phenomenon, and suppression of premature labor [68]. Interestingly, our experiments, employing the rat aorta model, showed that isoxsuprine-induced vasodilation involves blockade of α_1 -adrenoceptors, but not activation of β_2 -adrenoceptors. Similar results were obtained by Belloli et al. in horse digital artery [67]. In order to explain their findings, those authors hypothesized that smooth muscle from arteries contains low levels of β_2 -adrenoceptors and that isoxsuprine acts as a partial agonist, activating this kind of receptors, only in those tissues where there is a large number of β_2 -adrenoceptors, such as in the fowl caecum [67] and in uterus [69]. Moreover, the lack of effect of propranolol pretreatment on the vasodilation elicited by isoxsuprine is consistent with what was found in other vascular and non-vascular tissues including rat jugular vein [70], gravid isolated human myometrium [71], and rat vas deferens [72]. However, what we found in the rat aorta, differ from what Elliot and Soydan (1995) found in isolated equine digital veins, where propranolol slightly inhibited isoxsuprine's vasodilatory action [73]. In this scenario, it is plausible to propose that propranolol, which is a non-selective β -adrenoceptor antagonist, is not able to significantly block β_2 -adrenoceptor activity in rat aorta. Considering that some studies have provided evidence that β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors are functionally expressed in vascular endothelial cells and are coupled to activation of the NO/cGMP pathway [37,45], it would be necessary to use specific inhibitors of β_2 -adrenoceptors, such as ICI-118551, in order to determine with greater certainty the role that these type of receptors play in the vasodilatory effect of isoxsuprine.

Kozlovski et al. showed that coronary vasodilation elicited by both nebilolol and carvedilol does not involve direct activation of beta-2 adrenoceptors, however, they suggested that their metabolites do activate this type of receptors [59]. Considering that it has been suggested that activation of beta-2 adrenoceptors stimulates the NO/cGMP pathway [55,57], it is feasible to hypothesize that the metabolites of these compounds and isoxsuprine interact with these receptors, consequently activating both, the NO/cGMP and/or the H₂S/K_{ATP} pathways. Evidently, this proposal remains to be confirmed.

We conducted additional experiments to assess if other signaling pathways were involved in isoxsuprine's mechanism of action. Inhibition of cyclooxygenase did not significantly reduce

isoxsuprine-induced vasodilation. This result differs from those previously found for other beta adrenergic agonists. Inhibition of this enzyme reduced coronary artery dilation caused by terbutaline in hamsters [74], while it produced an increased brachial artery relaxation induced by isoproterenol in humans [75]. These differences might be attributed to both a differential distribution of adrenoceptor subtypes in the various types of arteries, and the use of different experimental species [76]. Inhibition of hemooxygenase also did not decrease the vasodilator effect elicited by isoxsuprine. As far as we have knowledge, there are no reports that indicate whether isoxsuprine-induced vasodilation involves participation of the CO/cGMP pathway. Taken together, these results showed that the PGI₂/cAMP and CO/cGMP pathways do not contribute to the vasodilator effect produced by this compound.

Some studies have compared the tocolytic effect of isoxsuprine and that produced by L-type voltage-dependent calcium channel (LVCC) blockers, such as nifedipine [77,78]. However, at present there are not reports about the effect of isoxsuprine on LVCC in rat aorta. We found that, similarly to what happened with verapamil, isoxsuprine shifted to the right the concentration-response curve of the vasoconstrictor effect of calcium chloride. This finding evidenced that the vasodilation evoked by isoxsuprine also involves the blocking of LVCCs. This effect was hitherto unknown. The blockade of LVCCs reduces the flow of extracellular calcium to the vascular smooth muscle cells, increasing vasodilation, which finally leads to a decrease in blood pressure [79]. Diminution of blood pressure, resulting from LVCC blockade by nifedipine or verapamil, is more pronounced in patients with hypertension than in individuals with normal blood pressure, which indicates that LVCC blockers may be considered as specific antihypertensive agents [80]. Moreover, it is a well-demonstrated fact that the combined actions of basal NO release and calcium antagonism results in an inhibition of vasoconstriction, which is greater than the additive effects of both events [81]. A co-crystallized structure of LVCC-verapamil complex provided evidence suggesting that verapamil binds within the pore of the channel [82]. Considering the structural similarity between isoxsuprine and verapamil, which we determined by the Tanimoto index (0.8) [83], it is likely that isoxsuprine binds to the verapamil binding site on the L-type voltage-dependent calcium channel. However, evidently it is necessary to model the multi-domain architecture of LVCC, using sophisticated methods and high-performance computing [84], in order to gain a better understanding of the effect of isoxsuprine and other small molecules on these channels.

Since diverse CVDs are associated with endothelial dysfunction related to NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways impairment, it is important to search new leads for the development of alternative drugs, which are able to restore NO and H₂S levels [53]. The results obtained in the present study provide evidence indicating that isoxsuprine induces a potent vasodilator effect that involves not only the activation of the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways, but also the blockade of calcium channels and α_1 -adrenoceptors. These mechanisms, which act synergistically, give this compound the possibility of producing significant beneficial clinical effects that clearly differ from that of conventional vasodilators. Our findings allow us to propose isoxsuprine as a very valuable drug that could be repurposed to treat a wide range of CVDs, such as hypertension, stroke, and heart failure.

4. Materials and Methods

4.1. Virtual Screening

4.1.1. Human eNOS and CSE Enzyme Structures Preparation

The crystallographic structures of eNOS and CSE from *H. sapiens* were obtained from the Protein Data Bank, <http://www.pdb.org> [85–87]. In this work, the highest-resolution protein structures available of eNOS (PDB: 3NOS) [28] and CSE (PDB: 3COG) [29] were used. Cofactors for the active enzymes were included in these structures, which were prepared and corrected by the “Protein Preparation Wizard” (Schrödinger Release 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Protein Preparation Wizard; Epik, Impact, Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2015) [88]. Protein structures

were optimized by adding missing atoms and amino acids, eliminating water molecules, accessory ions, and ligands, and choosing the best conformation for ambiguous side chains.

4.1.2. Lead-Like Compounds Selection from Database and Preparation

Four libraries obtained from the ZINC database (<http://zinc.docking.org/>) [89–91] were used: (1) Natural Products (ZINC-Natural Products: 89,425 compounds), (2) Approved drugs (ZINC-DrugBank: 1731 compounds), (3) Commercial libraries (ZINC-Maybridge Commercial vendor library: 14,400 compounds) and (4) Diverse database of the U.S. National Cancer Institute (NCI Diverse: 1817 compounds). The four libraries were combined into a single comprehensive database with a total of 107,373 compounds, which was processed with MOE [24] to select compounds with a single SMILES code, thus unique structures were selected. The resulting database was subsequently processed by the LigPrep program (Schrödinger Release 2015-4: LigPrep, Schrödinger, LL, 2015) and a subset of lead-like molecules was obtained based on the following three properties: (1) molecular weight (MW), topological polar surface area (TPSA), and octanol-water partition coefficient (log P); (2) hydrogen bond acceptors and donors (HBA and HBD, respectively); and (3) molecular topology (number and size of rings, molecular flexibility, and number of rotatable bonds). The LigPrep program was also used to assign the protonation states of the compounds ($\text{pH} = 7.0 \pm 2.0$) and to generate all tautomeric forms within this pH range. In the case of chiral molecules, chirality was retained, if specified, otherwise stereoisomers were generated. The 176,500 resulting structures were included in our lead-like library.

4.1.3. Virtual Docking

The HTVS Glide program [25–27] (Glide, version 6.2, Schrödinger, LLC, 2014) was used to find the 2000 structures that showed the highest affinity for each enzyme in the putative allosteric triterpene-binding site previously described for eNOS and CSE [18]. Then, the 2000 structures were redocked with four different programs: Glide XP [27], AutoDock [30], AutoDock Vina [31] and UCSF-Dock [32]. The nine compounds, which displayed the highest docking scores (“consensus hit compounds”) were selected for pharmacological evaluation (Figure 1).

4.2. Pharmacological Evaluation

4.2.1. Reagents

Standards for the pharmacological and biochemical assays were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isoxsuprine, carvedilol, propranolol, and pindolol were supplied as a racemic mixture. Stock solutions of water insoluble compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), where the highest concentration of this solvent in the incubation chamber was 0.2% (*v/v*). Other compounds and subsequent dilutions were prepared directly in distilled water.

4.2.2. Experimental Animals

All experiments were performed according to the NOM-062-ZOO-1999, “Technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals”. Male Wistar (200–250 g) rats were provided by the Institute of Neurobiology of the National Autonomous University of Mexico (INB-UNAM), Campus Juriquilla. Protocol for animal use and handling was evaluated and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Chemistry, Autonomous University of Querétaro (CBQ16/1116-7).

4.2.3. Isolated Rat Aorta Assay and Participation of the NO/cGMP and the H₂S/K_{ATP} Pathways in the Vasodilator Effect Elicited by the “Consensus Hits”

The isolated rat aorta assay was carried out according to the method previously reported [18,92,93]. Rats were sacrificed by decapitation using a guillotine (NOM-062-ZOO-1999, section 9.5.3.3). Then, thoracic aorta was removed and placed in a cold Krebs-Henseleit solution with the following composition (mM): 126.8 NaCl; 5.9 KCl; 1.2 KH₂PO₄; 1.2 MgSO₄; 5.0 D-glucose; 30 NaHCO₃; 2.5 CaCl₂

(pH 7.4), bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Adipose and connective tissues were removed from the aorta and thereafter, it was cut into 4–5 mm rings. Aortic rings were mounted in 5 mL incubation chambers with Krebs-Henseleit solution at 37 °C and constant bubbling with carbogen. Tissues were stabilized for 30 min under a tension of 1.5 g at 37 °C. During this period, the bathing medium was changed every 10 min. Once the basal tension was restored at 1.5 g, the aortic segments were contracted with KCl (100 mM) to sensitize the tissue. When the contraction with KCl was stable, the bath medium was replaced until the basal tension of 1.5 g was recovered. Subsequently, tissues were contracted with L-phenylephrine (Phe, 1 μM) and its contractile force was defined as 100%. Thereafter, the test compounds (0.001 to 1000 μg/mL) were cumulatively added to the chambers, 20 min after the addition of Phe. Sodium nitroprusside (SNP), sodium hydrosulfide (NaHS), and acetylcholine (ACh) were used as positive controls. The integrity of endothelium was periodically evaluated in a representative segment of aorta by determining the relaxation induced by ACh (1 μM; greater than 60%). Changes in aortic tonus caused by the test compounds were detected by Grass FT03 force transducers coupled to a Grass 7D Polygraph and were expressed as percentages of relaxation based on the contraction generated by adding Phe. Participation of the NO/cGMP and the H₂S/K_{ATP} pathways in the vasodilator effect of the consensus hits was assessed by incubating the aortic rings for 20 min in the presence of 100 μM NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, inhibitor of NOS) and 10 mM DL-propargylglycine (PAG, inhibitor of CSE) [18,92,93].

4.2.4. Participation of Endothelium, the CO/cGMP and the PGI₂/cAMP Pathways, Potassium Channels and β₂ Adrenoceptors in the Vasodilator Effect of Isoxsuprine

In experiments with endothelium denuded aortic rings, endothelial cells were chemically removed with 0.2% deoxycholic acid. The absence of endothelium was confirmed by adding ACh (1 μM), which did not induce more than 5% of relaxation. In order to further investigate the mechanism of action of isoxsuprine, aortic rings were incubated for 20 min in the presence of the following compounds: (a) 15 μM chromium mesoporphyrin IX (CrMP, inhibitor of heme oxygenase, HO), (b) 10 μM indomethacin (Indo, inhibitor of cyclooxygenase, COX), (c) 10 μM glibenclamide (inhibitor of ATP-dependent potassium channels, K_{ATP}) [18,92,93], and (d) 1 μM propranolol (a non-selective antagonist of β₁ and β₂ adrenoceptors).

4.2.5. Participation of Blockade of α₁-Adrenoceptors and Calcium Channels in the Vasodilator Effect of Isoxsuprine

To evaluate whether the blockade of α₁-adrenoceptors contributes to isoxsuprine-induced vasodilation, concentration-response curves were obtained by noncumulative administrations of increasing concentrations of phenylephrine (from 1 × 10⁻⁸ to 1 × 10⁻³ M; 5 min contact), a selective α₁-adrenoceptor agonist as the contracting compound, either alone or 5 min after the administration of isoxsuprine (1 × 10⁻⁶ M) or prazosin (1.2 × 10⁻⁷ M), a selective α₁-adrenoceptor antagonist. The test compounds, either isoxsuprine or prazosin, were washed out of the tissue after each concentration of phenylephrine and then reapplied 5 min before the next concentration of the agonist. Changes in aortic tonus caused by phenylephrine were expressed as percentages of contraction based on the maximum contraction generated by adding this agonist [67].

In order to determine if isoxsuprine-induced vasodilation involved the blockade of L-type voltage-gated calcium channels, the rat aortic segments were stabilized in the Krebs-Henseleit solution, and afterwards calcium was removed, replacing the bathing medium with calcium-free solution containing EDTA (0.1 mM). Next, the solution was replaced with 60 mM KCl in calcium-free Krebs-Henseleit solution. Then cumulative concentration-response curves for CaCl₂ (1 μM to 3 mM) were constructed in the absence (control) or presence of isoxsuprine (0.03 μg/mL) or verapamil (1 μM, positive control) [94].

4.2.6. Measurement of H₂S Levels in Rat Aorta Homogenates

Aortic segments were frozen in liquid nitrogen and homogenized in PBS pH 7.4 with a protease inhibitor (Sigmafast protease inhibitor cocktail tablets, EDTA free). Next, aorta homogenate (100 µL) and all components of the incubation mixture [pyridoxal-5'-phosphate (2 mM final concentration), L-cysteine (10 mM final concentration) and either isoxsuprine (0.026 ± 0.003 µg/ml final concentration) or isoxsuprine plus PAG (10 mM final concentration)] were poured to 2 mL vials fitted with septum stoppers and plastic center wells. Center wells were filled with 0.5 mL of 1% (*w/v*) zinc acetate pH 10 and a folded 2 cm × 2.5 cm rectangle of Whatman no. 1 filter paper for trapping evolved H₂S. Each vial was flushed with N₂ for 20 s and then sealed. This mixture was left to react for 60 min at 37 °C. The reaction was ended by adding 50% trichloroacetic acid and incubated for 60 min at 37 °C. Afterwards, 50 µL of 20 mM *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine sulphate in 1.2 M HCl were added, followed by addition of 50 µL of 30 mM iron trichloride in 1.2 M HCl. After 20 min, absorbance was measured at 670 nm and H₂S concentration was calculated against a calibration curve of standard NaHS solution (0–100 µM) [95].

4.2.7. Statistical Analysis

Six evaluations were carried out for each concentration of the tested compounds. The results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Experimental data were fitted to a sigmoidal equation, plotted and analyzed to calculate EC₅₀ and E_{max} values (GraphPad Prism 7.02, San Diego, CA, USA). These results were subjected to one-way ANOVA analysis, followed by Dunnett's post hoc test, using the statistical program GraphPad Prism 7.02. Values of * *p* < 0.01, ** *p* < 0.001, *** *p* < 0.0001 were considered to be significant. In Figure 7, statistical analysis was made using a one-way ANOVA, followed by a Tukey's test. In Figure 8B, statistical analysis was made using t-test with Welch's correction.

4.3. Virtual Pharmacophoric Elements Identification and General Protein-Ligand Interaction Model

The software Pharmer (2015, Pittsburg, PA, USA) [96] was used to identify the key pharmacophoric elements of the consensus hits on their protein-ligand complexes: hydrogen bond donors and acceptors, aromatic systems, hydrophobic groups, and ionic groups in the three-dimensional conformations of the ligands. These characteristics were clustered according to their nature, position, and size using a partition around medoids statistical method [97], implemented in the cluster package [98], available in the statistical software R (3.5.2, Vienna, Austria) [99].

4.4. Molecular Dynamics (MD) of Isoxsuprine-CSE Interaction

Once the CSE-isoxsuprine structure was obtained, this complex was subjected to molecular dynamics simulation with GROMACS 5.1.4 [100], using the AMBER99SB force field [101] and adjusting the parameters necessary for the ligand with ACPYPE [102]. The protonation state was defined at physiological pH, so that the ligand had a positive charge. Electrostatic and Lennard-Jones interactions had a cut-off of 1 nm. Simulation was carried out in periodic conditions by using rectangular boxes of maximum length of the system plus 1 nm. The complex was subjected to a minimization of energy followed by a period of equilibrium of free and restricted position, to finally carry out an isothermal-isobaric (300 K, 1 atm) computer simulation of 10 ns, employing a temperature coupling and velocity rescaling with a stochastic term [103] and a Parrinello-Rahman barostat [104]. Binding free energy was calculated by means of the LIE method [105] as a notion of affinity of the ligand for the enzyme.

5. Conclusions

In conclusion, in this work we present for the first time evidences indicating that the vasodilation induced by isoxsuprine comprises different mechanisms that include activation of the NO/cGMP and

the H_2S/K_{ATP} pathways and blockade of α_1 -adrenoceptors and L-type voltage gated calcium channels. All these mechanisms act in a synergistic manner to produce a potent vasodilator effect. This study presents valuable elements for the repositioning of isoxsuprine as a promising molecule that could be used in the therapeutics of various cardiovascular pathologies. Finally, our results provide support for the usefulness of the triterpene-binding putative allosteric sites on eNOS and CSE as valuable pharmacological targets in the search of hit compounds for the development of drugs useful to treat cardiovascular diseases.

Supplementary Materials: The Supplementary Materials are available online. Figure S1: CSE-isoxsuprine and CSE-fenoterol binding free energies results (LIE Method) obtained from Molecular Dynamics Simulation with GROMACS, using AMBER force field and adjusting the parameters required for the ligand with ACPYPE. Table S1: Docking scores by program and percentile consensus of the “consensus hit compounds”.

Author Contributions: Conceptualization: C.I.-A., A.R.-M. (Antonio Romo-Mancillas), and A.R.-M. (Alejandra Rojas-Molina) Pharmacological evaluation and analysis: D.M.-R., B.E.-L., F.J.L.-V., and C.I.-A. In silico studies: D.M.-R., B.E.-L., A.R.-M. (Antonio Romo-Mancillas) Writing, review and editing: D.M.-R., A.R.-M. (Antonio Romo-Mancillas), C.I.-A., A.R.-M. (Alejandra Rojas-Molina) Funding: C.I.-A.

Funding: This research was funded by FOFI-UAQ grant number: Project FCQ-2016-09 assigned to César Ibarra Alvarado.

Acknowledgments: Daniella Medina-Ruiz acknowledges Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for her doctoral grant (CVU 100062). The authors would like to thank to Juana Isela Rojas-Molina for the financial support and the administrative arrangements for the acquisition of the computational equipment and software used in this work.

Conflicts of Interest: All authors declare no conflict of interest.

References

1. Mukete, B.N.; Ferdinand, K.C. Polypharmacy in older adults with hypertension: A comprehensive review. *J. Clin. Hypertens.* **2016**, *18*, 10–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dhungana, R.R.; Pandey, A.R.; Bista, B.; Joshi, S.; Devkota, S. Prevalence and associated factors of hypertension: A community-based cross-sectional study in municipalities of Kathmandu, Nepal. *Int. J. Hypertens.* **2016**, *2016*, 1656938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. James, P.A.; Oparil, S.; Carter, B.L.; Cushman, W.C.; Dennison-Himmelfarb, C.; Handler, J.; Lackland, D.T.; LeFevre, M.L.; MacKenzie, T.D.; Ogedegbe, O.; et al. Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults. *JAMA* **2014**, *311*, 507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jackson, R.E.; Bellamy, M.C. Antihypertensive drugs. *BJA Educ.* **2015**, *15*, 280–285. [[CrossRef](#)]
5. Markovitz, A.A.; Mack, J.A.; Nallamothu, B.K.; Ayanian, J.Z.; Ryan, A.M. Incremental effects of antihypertensive drugs: Instrumental variable analysis. *BMJ* **2017**, *359*, j5542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Leung, S.W.S.; Vanhoutte, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: Age, gender and blood pressure, do they matter? *Acta Physiol.* **2017**, *219*, 108–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Goto, K.; Ohtsubo, T.; Kitazono, T. Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. John, C.M.; Mallat, R.K.; George, G.; Kim, T.; Mishra, R.C.; Braun, A.P. Pharmacologic targeting of endothelial Ca^{2+} -activated K^+ channels: A strategy to improve cardiovascular function. *Channels* **2018**, *12*, 126–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Montezano, A.C.; Dulak-Lis, M.; Tsiropoulou, S.; Harvey, A.; Briones, A.M.; Touyz, R.M. Oxidative stress and human hypertension: Vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.* **2015**, *31*, 631–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Stead, R.; Musa, M.G.; Bryant, C.L.; Lanham, S.A.; Johnston, D.A.; Reynolds, R.; Torrens, C.; Fraser, P.A.; Clough, G.F. Developmental conditioning of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasorelaxation. *J. Hypertens.* **2016**, *34*, 452–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Nagpure, B.V.; Bian, J.-S. Interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide in the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 6904327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Panthi, S.; Chung, H.J.; Jung, J.; Jeong, N.Y. Physiological importance of hydrogen sulfide: Emerging potent neuroprotector and neuromodulator. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 9049782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Panthi, S.; Manandhar, S.; Gautam, K. Hydrogen sulfide, nitric oxide, and neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.* **2018**, *7*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cebová, M.; Košťutová, M.; Pecháňová, O. Cardiovascular effects of gasotransmitter donors. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, S291–S307. [[PubMed](#)]
15. Gheibi, S.; Jeddi, S.; Kashfi, K.; Ghasemi, A. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *149*, 42–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Coneski, P.N.; Schoenfisch, M.H. Nitric Oxide Release Part III. Measurement and Reporting. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3753–3758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Song, Z.J.; Ng, M.Y.; Lee, Z.-W.; Dai, W.; Hagen, T.; Moore, P.K.; Huang, D.; Deng, L.-W.; Tan, C.-H. Hydrogen sulfide donors in research and drug development. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 557–570. [[CrossRef](#)]
18. Luna-Vázquez, F.J.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; Romo-Mancillas, A.; López-Vallejo, F.H.; Solís-Gutiérrez, M.; Rojas-Molina, J.I.; Rivero-Cruz, F. Role of nitric oxide and hydrogen sulfide in the vasodilator effect of ursolic acid and uvaol from black cherry *Prunus serotina* fruits. *Molecules* **2016**, *21*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rios, M.Y.; López-Martínez, S.; López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J.L.; Villalobos-Molina, R.; Ibarra-Barajas, M.; Navarrete-Vázquez, G.; Hidalgo-Figueroa, S.; Hernández-Abreu, O.; Estrada-Soto, S. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: Ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1023–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. López-Vallejo, F.; Caulfield, T.; Martínez-Mayorga, K.; Giulianotti, M.; Nefzi, A.; Houghten, R.; Medina-Franco, J. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2011**, *14*, 475–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ferreira, L.G.; Dos Santos, R.N.; Oliva, G.; Andricopulo, A.D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 13384–13421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Patel, H.; Pawara, R.; Surana, S. In-silico evidences for binding of Glucokinase activators to EGFR C797S to overcome EGFR resistance obstacle with mutant-selective allosteric inhibition. *Comput. Biol. Chem.* **2018**, *74*, 167–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Stahura, F.; Bajorath, J. Virtual screening methods that complement HTS. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 259–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Clark, A.M.; Labute, P.; Santavy, M. 2D structure depiction. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1107–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; et al. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Halgren, T.A.; Murphy, R.B.; Friesner, R.A.; Beard, H.S.; Frye, L.L.; Pollard, W.T.; Banks, J.L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. II. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *2*, 1750–1759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fischmann, T.O.; Hruza, A.; Niu, X.D.; Fossetta, J.D.; Lunn, C.A.; Dolphin, E.; Prongay, A.J.; Reichert, P.; Lundell, D.J.; Narula, S.K.; et al. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 233–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sun, Q.; Collins, R.; Huang, S.; Holmberg-Schiavone, L.; Anand, G.S.; Tan, C.-H.; Van-den-Berg, S.; Deng, L.-W.; Moore, P.K.; Karlberg, T.; et al. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3076–3085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Lang, P.T.; Brozell, S.R.; Mukherjee, S.; Pettersen, E.F.; Meng, E.C.; Thomas, V.; Rizzo, R.C.; Case, D.A.; James, T.L.; Kuntz, I.D. DOCK 6: Combining techniques to model RNA—Small molecule complexes. *RNA* **2009**, *15*, 1219–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Houston, D.R.; Walkinshaw, M.D. Consensus docking: Improving the reliability of docking in a virtual screening context. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 384–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nishioka, K.; Nakagawa, K.; Umemura, T.; Jitsuiki, D.; Ueda, K.; Goto, C.; Chayama, K.; Yoshizumi, M.; Higashi, Y. Carvedilol improves endothelium-dependent vasodilation in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart* **2007**, *93*, 247–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jiang, H.; Polhemus, D.J.; Islam, K.N.; Torregrossa, A.C.; Li, Z.; Potts, A.; Lefer, D.J.; Bryan, N.S. Nebivolol acts as a S-nitrosoglutathione reductase inhibitor. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2016**, *21*, 478–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Priviero, F.B.M.; Teixeira, C.E.; Toque, H.A.F.; Claudino, M.A.; Webb, R.C.; De Nucci, G.; Zanesco, A.; Antunes, E. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: A role for nitric oxide and calcium entry blockade. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 448–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Figueroa, X.F.; Poblete, I.; Fernandez, R.; Pedemonte, C.; Cortes, V.; Huidobro-Toro, J.P. NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of α -adrenoceptors. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H134–H143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Aggio, A.; Grassi, D.; Onori, E.; D'Alessandro, A.; Masedu, F.; Valenti, M.; Ferri, C. Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 263–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Alegría-González, C.L. *Estudios de Acoplamiento Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular de Triterpenos Selectos en las Enzimas Óxido Nítrico Sintasa Endotelial y Cistationina Gamma-Liasa*; Universidad Autónoma de Querétaro: Santiago de Querétaro, Mexico, 2017.
40. Lu, S.; Huang, W.; Zhang, J. Recent computational advances in the identification of allosteric sites in proteins. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1595–1600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Krimm, I. Identifying protein allosteric transitions for drug discovery with 1D NMR. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 901–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Marzo, A.; Zava, D.; Coa, K.; Dal Bo, L.; Ismaili, S.; Tavazzi, S.; Cantoni, V. Pharmacokinetics of isoxsuprine hydrochloride administered orally and intramuscularly to female healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* **2009**, *59*, 455–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jozwiak, K.; Woo, A.; Tanga, M.; Toll, L.; Jimenez, L.; Kozocas, J.; Plazinska, A.; Xiao, R.; Wainer, I. Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives: A platform towards highly selective and effective beta(2)-adrenergic receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *18*, 728–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cekic, E.G.; Soydan, G.; Guler, S.; Babaoglu, M.O.; Tuncer, M. Propranolol-induced relaxation in the rat basilar artery. *Vascul. Pharmacol.* **2013**, *58*, 307–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Vanhoutte, P.M.; Gao, Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 265–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Poveromo, L.B.; Pharmed, E.L.M.; Sutherland, S.E. Midodrine for the weaning of vasopressor infusions. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2016**, *41*, 260–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tang, S.T.; Su, H.; Zhang, Q.; Tang, H.Q.; Wang, C.J.; Zhou, Q.; Wei, W.; Zhu, H.Q.; Wang, Y. Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor-B/IB system through the activation of AMP-activated protein kinase. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *37*, 1558–1566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Galleano, M.; Bernatova, I.; Puzserova, A.; Balis, P.; Sestakova, N.; Pechanova, O.; Fraga, C.G. (–)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB Life* **2013**, *65*, 710–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Eliseeva, E.V.; Kulakova, N.V.; Nevzorova, V.A. Nitric oxide synthase in bronchial epithelium and nitric oxide metabolites in the lungs of rats with bronchial asthma after fenoterol inhalation. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2000**, *130*, 763–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Odnoshivkina, U.G.; Sytchev, V.I.; Nurullin, L.F.; Giniatullin, A.R.; Zefirov, A.L.; Petrov, A.M. β 2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: Implication in delayed inotropic effect. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *765*, 140–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Nade, V.S.; Kawale, L.A.; Patel, K.M. Protective effect of sitagliptin and rosuvastatin combination on vascular endothelial dysfunction in type-2 diabetes. *Indian J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 96–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Szabo, C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2017**, *312*, 125–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Coletta, C.; Papapetropoulos, A.; Erdelyi, K.; Olah, G.; Módis, K.; Panopoulos, P. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9161–9166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, Y.; Dong, X. Nebivolol ameliorates asymmetric dimethylarginine-induced vascular response in rat aorta via β_3 adrenoceptor-mediated mechanism. *Clin. Exp. Hypertens.* **2016**, *38*, 252–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Broeders, M.A.; Doevendans, P.A.; Bekkers, B.; Bronsaer, R.; van Gorsel, E.; Heemskerk, J.; Egbrink, M.G.; van Breda, E.; Reneman, R.; van Der Zee, R. Nebivolol: A third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: Endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation* **2000**, *102*, 677–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Dessy, C.; Saliez, J.; Ghisdal, P.; Daneau, G.; Lobysheva, I.I.; Frérart, F.; Belge, C.; Jnaoui, K.; Noirhomme, P.; Feron, O.; et al. Endothelial β_3 -adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation β -blocker nebivolol. *Circulation* **2005**, *112*, 1198–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Quang, T.T.; Rozec, B.; Audigane, L.; Gauthier, C. Investigation of the different adrenoceptor targets of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 601–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Chen, J.; Huang, C.; Zhang, B.; Huang, Q.; Chen, J.; Xu, L. The effects of carvedilol on cardiac structural remodeling: The role of endogenous nitric oxide in the activity of carvedilol. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 1155–1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Kozlovski, V.I.; Lomnicka, M.; Bartus, M.; Sternak, M.; Chlopicki, S. Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of β_2 receptors and COX-2/PGI2 pathways. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 1041–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Yao, K.; Zhang, W.W.; Yao, L.; Yang, S.; Nie, W.; Huang, F. Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *470*, 961–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Oliveira, P.J.; Gonçalves, L.; Monteiro, P.; Providencia, L.A.; Moreno, A.J. Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria? *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2005**, *3*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wang, L.; Wang, R.; Jin, M.; Huang, Y.; Liu, A.; Qin, J.; Chen, M.; Wen, S.; Pi, R.; Shen, W. Carvedilol attenuates 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells: Involvement of Akt and Nrf2/ARE pathways. *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 1733–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Garland, C.J.; Hiley, C.R.; Dora, K.A. EDHF: Spreading the influence of the endothelium. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 839–852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Zhao, W.; Zhang, J.; Lu, Y.; Wang, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6008–6016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Peers, C.; Bauer, C.C.; Boyle, J.P.; Scragg, J.L.; Dallas, M.L. Modulation of ion channels by hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 95–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kim-Egloff, C.; Hässig, M.; Bruckmaier, R.; Bleul, U. Doppler sonographic examination of uterine and placental perfusion in cows in the last month of gestation and effects of epidural anesthesia and isoxsuprine. *Theriogenology* **2016**, *85*, 986–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Belloli, C.; Carcano, R.; Arioli, F.; Beretta, C. Affinity of isoxsuprine for adrenoreceptors in equine digital artery and implications for vasodilatory action. *Equine Vet. J.* **2000**, *32*, 119–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Hill, J.W.; Thompson, J.F.; Carter, M.B.; Edwards, B.S.; Sklar, L.A.; Rosenberg, G.A. Identification of isoxsuprine hydrochloride as a neuroprotectant in ischemic stroke through cell-based high-throughput screening. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Amer, M.; Dungan, K.; McKinney, G. The effects of isoxsuprine hydrochloride on the cyclic nucleotide system in the rat uterus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1974**, *190*, 243–248. [[PubMed](#)]

70. Cohen, M.; Wiley, K. Beta1 and beta2 receptor mechanisms in rat jugular veins: Differences between norepinephrine and isoproterenol-induced relaxation. *Life Sci.* **1978**, *23*, 1997–2006. [[CrossRef](#)]
71. Calixto, J.; Simas, C. Mechanism of action of isoprenaline, isoxuprine, terbutaline and orciprenaline on gravid human isolated myometrium. Influence of the neuronal uptake process. *Biol. Reprod.* **1984**, *30*, 1117–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Abel, P.; Fox, A.; Minneman, K. Effects of isoxuprine and nylidrin on adrenoreceptors in rat vas deferens. *J. Aut. Pharmacol.* **1985**, *5*, 213–219. [[CrossRef](#)]
73. Elliott, J.; Soydan, J. Characterization of b-adrenoceptors in equine digital veins: Implications of the modes of vasodilatory action of isoxsuprine. *Equine Vet. J.* **1995**, *27* (Suppl. 19), 101–107. [[CrossRef](#)]
74. Brousseau, D.; Desjardins, J.; Jasmin, G.; Dumont, L. Altered coronary and cardiac adrenergic response in the failing hamster heart: Role of cyclooxygenase derivatives. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *80*, 218–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Limberg, J.; Johansson, R.; Peltonen, G.; Harrell, J.; Kellawan, J.; Eldridge, M.; Sebranek, J.; Schrage, W. β -Adrenergic-mediated vasodilation in young men and women: Cyclooxygenase restrains nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2016**, *310*, H756–H764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Toda, N.; Okamura, T. Beta adrenoceptor subtype in isolated human, monkey and dog epicardial coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *253*, 518–524. [[PubMed](#)]
77. Raymajhi, R.; Pratap, K. A comparative study between nifedipine and isoxsuprine in the suppression of preterm labour. *Kathmandu Univ. Med. J.* **2003**, *1*, 85–90.
78. Zahir, F.; Nath, K.K.; Choudhury, H.H. A clinical study of feto-maternal outcome of tocolytic agent nifedipine as compared to isoxsuprine hydrochloride in preterm labor. *MedPulse-Int. Med. J.* **2015**, *2*, 483–487.
79. Elliott, W.J.; Ram, C.V.S. Calcium channel blockers. *J. Clin. Hypertens.* **2011**, *13*, 687–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Godfraind, T. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2014**, *19*, 501–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Salomone, S.; Silva, C.L.M.; Morel, N.; Godfraind, T. Facilitation of the vasorelaxant action of calcium antagonists by basal nitric oxide in depolarized artery. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 505–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Tang, L.; Gamal El-Din, T.; Swanson, T.; Pryde, D.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W. Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs. *Nature* **2016**, *537*, 117–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sud, M. MayaChemTools: An Open Source Package for Computational Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 2292–2297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Ahmed, M.; Jalily Hasani, H.; Ganesan, A.; Houghton, M.; Barakat, K. Modeling the human Nav1.5 sodium channel: Structural and mechanistic insights of ion permeation and drug blockade. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 2301–2324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Berman, H.M.; Henrick, K.; Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Rose, P.W.; Prlic, A.; Bi, C.; Bluhm, W.F.; Christie, C.H.; Dutta, S.; Green, R.K.; Goodsell, D.S.; Westbrook, J.D.; Woo, J.; et al. The RCSB Protein Data Bank: Views of structural biology for basic and applied research and education. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D345–D356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Sastry, G.M.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aid Mol. Des.* **2013**, *27*, 221–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Sterling, T.; Irwin, J.J. ZINC 15—Ligand discovery for everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2324–2337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Irwin, J.J.; Sterling, T.; Mysinger, M.M.; Bolstad, E.S.; Coleman, R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Irwin, J.J.; Shoichet, B.K. ZINC—A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

92. Ibarra-Alvarado, C.; García, J.A.; Aguilar, M.B.; Rojas, A.; Falcón, A.; Heimer de la Cotera, E.P. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 511–518. [CrossRef] [PubMed]
93. Castro-Ruiz, J.E.; Rojas-Molina, A.; Luna-Vázquez, F.J.; Rivero-Cruz, F.; García-Gasca, T.; Ibarra-Alvarado, C. Affinin (Spilanthol), isolated from *heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 218. [CrossRef] [PubMed]
94. Huo, L.; Zhang, J.; Qu, Z.; Chen, H.; Li, Y.; Gao, W. Vasorelaxant effects of Shunaoxin pill are mediated by NO/cGMP pathway, HO/CO pathway and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *173*, 352–360. [CrossRef] [PubMed]
95. Stipanuk, M.H.; Beck, P.W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J.* **1982**, *206*, 267–277. [CrossRef] [PubMed]
96. Koes, D.R.; Camacho, C.J. Pharmer: Efficient and exact pharmacophore search. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1307–1314. [CrossRef] [PubMed]
97. Reynolds, A.P.; Richards, G.; De La Iglesia, B.; Rayward-Smith, V.J. Clustering rules: A comparison of partitioning and hierarchical clustering algorithms. *J. Math. Model. Algorithms* **2006**, *5*, 475–504. [CrossRef]
98. Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A.; Hubert, M.; Hornik, K. Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. *R Packag. Version 2.0.7-1*. 2018. Available online: <https://cran.r-project.org/package=cluster> (accessed on 10 March 2019).
99. R-Core-Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2013. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on 10 March 2019).
100. Hess, B.; Kutzner, C.; Van Der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435–447. [CrossRef] [PubMed]
101. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247–260. [CrossRef] [PubMed]
102. Sousa Da Silva, A.W.; Vranken, W.F. ACPYPE—AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 367. [CrossRef] [PubMed]
103. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101. [CrossRef] [PubMed]
104. Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190. [CrossRef]
105. Aqvist, J.; Medina, C.; Samuelsson, J.E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 385–391. [CrossRef] [PubMed]

Sample Availability: Samples of isoxsuprine, carvedilol, and nebivolol are available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).