

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

**“PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DEL NO/GMP_c Y DEL
H₂S/K_{ATP}, LOS RECEPTORES A CANNABINOIDES Y LOS
CANALES TRP EN EL EFECTO VASODILATADOR
PRODUCIDO POR LA AFININA”**

TESIS

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

PRESENTA

M. en C. Christian Jovanny Valencia Guzmán

DIRIGIDO POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

**Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2021**



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

“PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DEL NO/GMP_c Y DEL H₂S/K_{ATP}, LOS RECEPTORES A CANNABINOIDES Y LOS CANALES TRP EN EL EFECTO VASODILATADOR PRODUCIDO POR LA AFININA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. Christian Jovanny Valencia Guzmán

DIRIGIDO POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

Dr. César Ibarra Alvarado

Presidente

Firma

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Secretario

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Vocal

Firma

Dra. Alejandra Rojas Molina

Suplente

Firma

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Firma

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

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2021

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi Doctorado en el Posgrado en Ciencias Químico Biológicas y al Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales por permitirme desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca N° 210670 y por el apoyo recibido a través del proyecto 316849 del Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04).

A la Dra. Isela Rojas Molina por todo su apoyo en momentos extremadamente difíciles. Cada palabra, imagen e idea expresada en este trabajo deben su existencia a usted.

A la Dra. Alejandra Rojas Molina por creer en mí y en mi capacidad. Gracias por impulsarme a iniciar una nueva aventura.

Al Dr. César Ibarra Alvarado por su guía y por enseñarme a vivir la ciencia de una manera más emocionante.

A Lupita, por tu amor e infinita paciencia, por no dejarme caer y levantarme cuando lo hago. Gracias por ser mi razón para seguir luchando.

DEDICATORIA

A Lupita y Ernesto

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ACRÓNIMOS	viii
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedades cardiovasculares	3
2.2 Fisiología de la pared vascular.....	7
2.2.1 Endotelio vascular.....	8
2.2.2 Factores derivados de endotelio	9
2.2.2.1 Prostaciclina	9
2.2.2.2 Óxido nítrico.....	10
2.2.2.3 Sulfuro de hidrógeno.....	12
2.2.2.4 Nitroxilo.....	13
2.2.2.5 Endotelina.....	14
2.2.2.6 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	15
2.2.2.7 Tromboxano y otros factores vasoconstrictores.....	15
2.2.3 Endocannabinoides	16
2.2.4 Músculo liso vascular	17
2.2.5 Mecanismos de contracción-relajación vascular	18
2.3 Mecanismos de relajación vascular inducida por endocannabinoides	23
2.3.1 Receptores a endocannabinoides.....	24
2.3.2 Canales TRP	28
2.4 Alcamidas	31
2.4.1 Afinina en el reino vegetal.....	34
2.4.2 Usos terapéuticos de plantas productoras de afinina.....	35
2.4.3 Mecanismos de acción involucrados en el efecto vasodilatador producido por afinina	37
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	40
4. HIPÓTESIS	41

5. OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo general	42
5.2 Objetivos específicos	42
6. METODOLOGÍA.....	43
6.1 Animales de experimentación	43
6.2 Preparación de las muestras.....	43
6.3 Ensayos de actividad enzimática	44
6.3.1 Producción de nitritos totales en homogenados de aorta de rata	44
6.3.2 Producción de sulfuro de hidrógeno en homogenados de aorta de rata	44
6.4 Determinación del efecto vasodilatador	45
6.4.1 Preparación de las muestras problema.....	45
6.4.2 Ensayo de aorta aislada de rata	45
6.4.3 Participación del endotelio en la respuesta vasodilatadora de la afinina	46
6.4.4 Evaluación de la participación de los canales TRPA ₁ y TRPV ₁ en la respuesta vasodilatadora de la afinina.....	47
6.4.5 Participación del HNO y de la adenilato ciclasa en la respuesta vasodilatadora de la afinina	47
6.4.6 Evaluación de la participación de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la respuesta vasodilatadora de la afinina.....	48
6.4.7 Participación otros blancos moleculares del sistema endocannabinoide en la respuesta inducida por afinina	48
6.4.8 Evaluación de la participación de los canales dependientes de voltaje tipo L en el efecto vasodilatador de la afinina	48
6.5 Ensayos de acoplamiento molecular utilizando farmacología <i>in silico</i>	49
6.5.1 Preparación de los ligandos.....	49
6.5.2 Preparación de las estructuras de los canales TRPA ₁ y TRPV ₁ y del receptor CB ₁	49
6.5.3 Acoplamiento molecular de la afinina con TRPA ₁ , TRPV ₁ y CB ₁	50
6.6 Análisis estadístico.....	51
7. RESULTADOS	51
7.1 La afinina incrementa los niveles de NO en aorta de rata.....	51
7.2 La afinina induce el incremento en los niveles de H ₂ S en aorta.....	52
7.3 Participación de los canales TRP en el efecto vasodilatador de la afinina ...	54

7.4 Participación de la vía HNO-TRPA ₁ -CGRP en el efecto vasodilatador de la afinina	55
7.5 Participación del sistema endocannabinoide en la vasodilatación inducida por afinina	56
7.6 Participación de proteínas asociadas a vías de señalización activadas por receptores a cannabinoides.	59
7.7 Participación de los canales dependientes de voltaje tipo L en el efecto vasodilatador de la afinina.....	61
7.8 Modelo de interacción molecular entre la afinina y los canales TRPA ₁	62
7.9 Modelo de interacción molecular entre la afinina y los canales TRPV ₁	69
7.10 Modelo de interacción molecular entre la afinina y los receptores CB ₁	77
8. DISCUSIÓN	85
9. CONCLUSIONES.....	99
10. REFERENCIAS.....	100

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares en México.....	4
2	Anatomía del vaso sanguíneo.....	7
3	Factores derivados de endotelio y su acción sobre el tono vascular.....	9
4	Síntesis de óxido nítrico (NO)	11
5	Estructura de los endocannabinoides.....	17
6	Anatomía de la célula muscular lisa.....	18
7	Vasoconstricción y vasodilatación.....	19
8	Mecanismo de contracción de una célula muscular lisa.....	20
9	Mecanismo de relajación de una célula muscular lisa.....	22
10	Esquema de relajación inducida por receptores a cannabinoides.....	25
11	Estructuras representativas de alcaloides de origen vegetal o animal.....	32
12	Evaluación de nitritos totales.....	52
13	Evaluación de la producción de H ₂ S.....	53
14	Participación de canales TRPA ₁ y TRPV ₁ en el efecto vasodilatador de la afinina.....	54
15	Contribución de los canales TRPA ₁ y TRPV ₁ endoteliales en el efecto vasodilatador de la afinina.....	55
16	Participación del HNO y AC en el efecto vasodilatador de la afinina.....	56
17	Participación de los receptores CB ₁ y CB ₂ en el efecto vasodilatador de la afinina.....	57
18	Contribución de los receptores CB ₁ endoteliales en el efecto vasodilatador de la afinina.....	59
19	Participación de la FAAH en el efecto vasodilatador de la afinina.....	60
20	Participación de proteínas G y dímero βγ en el efecto vasodilatador de la afinina.....	60
21	Participación de la PLC en el efecto vasodilatador de la afinina.....	61
22	Participación de los LVCC en el efecto vasodilatador de la afinina.....	62
23	Alineamiento de la secuencia canónica de TRPA ₁	63
24	Comparación del modelo por homología del canal TRPA ₁	64
25	Análisis de Ramachandran del modelo TRPA ₁	65
26	Parámetros termodinámicos del modelo TRPA ₁	66
27	Clustering del modelo de TRPA ₁	67
28	Interacción molecular de alcaloides con el canal TRPA ₁	68
29	Alineamiento de la secuencia canónica de TRPV ₁	70
30	Comparación del modelo por homología del canal TRPV ₁	70
31	Análisis de Ramachandran del modelo TRPV ₁	71
32	Parámetros termodinámicos del modelo TRPV ₁	73
33	Clustering del modelo de TRPV ₁	74
34	Comparación de nuestro modelo del canal TRPV ₁ con otros modelos....	75
35	Interacción molecular de alcaloides con el canal TRPV ₁	76

36	Alineamiento de la secuencia canónica del receptor CB ₁	78
37	Comparación del modelo por homología del receptor CB ₁	79
38	Análisis de Ramachandran del modelo CB ₁	80
39	Parámetros termodinámicos del modelo CB ₁	81
40	Clustering del modelo de CB ₁	83
41	Comparación de nuestro modelo con receptores CB ₁	83
42	Interacción molecular de alcamidas con el receptor CB ₁	84
43	Mecanismo propuesto de la vasodilatación inducida por afinina.....	98

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

1	Resultados de Ramachandran antes y después de 50 ns de simulación del canal TRPA ₁	65
2	Parámetros termodinámicos promedio obtenidos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo TRPA ₁	67
3	Resultados de Ramachandran antes y después de 50 ns de simulación del canal TRPV ₁	72
4	Parámetros termodinámicos promedio obtenidos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo TRPV ₁	74
5	Resultados de Ramachandran antes y después de 50 ns de simulación del receptor CB ₁	80
6	Parámetros termodinámicos promedio obtenidos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo CB ₁	82

Dirección General de Bibliotecas UAQ

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

ACRÓNIMOS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

AA: Ácido araquidónico

AAS: Ácido acetilsalicílico

ACh: Acetilcolina

Akt: Proteín cinasa B

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

Bk: Bradiquinina

CaCM: Complejo calcio-calmodulina

CAT: Cisteína aminotransferasa

CB₁: Receptor a cannabinoides tipo 1.

CB₂: Receptor a cannabinoides tipo 2.

CBS: Cistationina beta sintasa

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CM: Calmodulina

COX: Ciclooxygenasa

CSE: Cistationina gamma liasa

CYP: Citocromo P450

DAG: Diacilglicerol

eCB: Receptor a cannabinoides endotelial

ECS: Sistema endocannabinoide

ECVs: Enfermedades cardiovasculares

eNOS; NOS₃: Óxido nítrico sintasa endotelial

ET: endotelina

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

H. longipes: *Heliopsis longipes*

H₂S: Sulfuro de hidrógeno

HNO: Nitroxílo

HTA: Hipertensión arterial

iNOS; NOS₂: Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃: Trifosfato de inositol
L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster
LOX: Lipooxigenasa
LVCC: canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L
MLC: Cadena ligera de miosina
MLCK: Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP: Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MST: Mercaptopiruvato sulfurotransferasa
NADA: *N*-araquidonoil dopamina
NE: Norepinefrina
nNOS; NOS₁: Óxido nítrico sintasa neuronal
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
OEA: Oleoil etanolamida
PGI₂: Prostaciclina
PIP₂: Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA: Proteín cinasa A
PKC: Proteín cinasa C
PKG: Proteín cinasa G
PLC: Fosfolipasa C
RIP₃: Receptor de IP₃
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RS: Reticulo sarcoplásmico
sGC: Guanilato ciclasa soluble
TRPA₁: Canal de potencial transitorio ankirina sub tipo 1
TRPV₁: Canal de potencial transitorio vaniloide sub tipo 1
TXA₂: Tromboxano A₂

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Este panorama es más grave en países del tercer mundo, en donde el acceso a medicamentos es limitado, debido principalmente a su elevado costo. La búsqueda de nuevos principios activos útiles para el tratamiento de este tipo de enfermedades es de gran importancia, debido a la necesidad de nuevos fármacos que actúen con mayor eficacia, presenten menores efectos adversos y se puedan adquirir a menor costo. El conocimiento etnobotánico mundial ha sido durante mucho tiempo una fuente valiosa para la búsqueda de nuevos principios activos para el tratamiento de diversas enfermedades. Dentro de ese conocimiento destaca la medicina tradicional mexicana, debido a su larga tradición que se remonta a épocas prehispánicas. Dentro de la gran diversidad de plantas utilizadas en México se encuentra *Heliopsis longipes*, conocida popularmente como “chilcuague”, la cual ha sido utilizada para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Uno de los componentes activos mayoritarios del chilcuague es una alcanida, la afinina. Las alcanidas son sustancias estructuralmente similares a los endocannabinoides, los cuales al unirse a sus receptores específicos (CB₁, CB₂), son capaces de modular el tono vascular por diferentes mecanismos, entre los que se incluyen las vías de señalización de transmisores gaseosos. Adicionalmente, los endocannabinoides pueden inducir vasodilatación, mediante la activación de canales TRPA₁ y/o TRPV₁ que son canales de calcio. Se han reportado alcanidas, que pueden inducir vasodilatación por medio de la activación de receptores a cannabinoides o de canales TRP. El objetivo del presente trabajo fue determinar si el efecto vasodilatador de la afinina involucra: 1) un incremento en la producción de transmisores gaseosos, mediante la medición de los niveles de NO y H₂S, utilizando métodos enzimáticos y 2) la activación de canales TRP y/o de receptores a cannabinoides, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata. Además, se realizó un estudio de acoplamiento molecular para determinar el sitio de unión de la afinina en los canales TRP y los receptores a cannabinoides. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de los canales TRPA₁ y TRPV₁. Asimismo, nuestros resultados sugieren que esta alcanida es capaz de activar los receptores CB₁, los cuales activan a la PLC a través de la liberación de los dímeros Gβγ de las proteínas G. De manera adicional, encontramos evidencia que indica que la vasodilatación inducida por afinina está mediada, al menos en parte, por la activación de la vía del HNO-TRPA₁-CGRP. Finalmente, nuestros estudios *in silico* indicaron que la afinina se une con elevada afinidad a los canales TRP (A₁ y V₁) y al receptor a cannabinoides CB₁. Los resultados derivados del presente trabajo permiten proponer a la afinina como un prototipo estructural útil para el desarrollo de fármacos alternativos, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: Afinina; receptores a cannabinoides; vía HNO-TRPA₁-CGRP; canales TRPA₁; canales TRPV₁; vasodilation

SUMMARY

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. This scenario is exacerbated in poor countries, where the access to medicines is limited, mainly due to their high cost. The search for new active principles with potential application to the treatment of this kind of diseases is of great importance, due to the need for new drugs with greater efficacy, less adverse effects, and lower costs. The global ethnobotanical knowledge has been for a long time a valuable source of new active principles for the treatment of many diseases. In this context, Mexican traditional medicine stands out due to its long tradition since pre-Hispanic times. Among the great diversity of plants used in Mexico, *Heliopsis longipes*, commonly known as chilcuague, has been widely used to treat a great variety of diseases. One of the major active components of chilcuague is an alkalamide, affinin. Alkamides are substances structurally similar to endocannabinoids, which activate their specific receptors (CB₁, CB₂), modulating vascular tone by different mechanisms, including the gasotransmitter signaling pathways. Additionally, the endocannabinoids can induce vasorelaxation by activating TRPA₁ and/or TRPV₁ channels, which are calcium channels. It has been reported that alkalamides are able to produce vasorelaxation by activating cannabinoid receptors and TRP channels. The aim of this work was to determine whether vasorelaxation elicited by affinin involves: 1) an increase in gasotransmitter production, by measuring NO and H₂S levels, using enzymatic techniques and 2) activation of TRP channels and cannabinoid receptors (CB₁, CB₂, eCB) by using the rat aortic ring assay. Additionally, we carried out a molecular docking study in order to determine the binding site of affinin on TRP channels and cannabinoid receptors. The results obtained in the present study indicated that the vasodilator effect induced by affinin involves endothelial activation of TRPA₁ and TRPV₁ channels. Our findings also suggested that this alkalamide is also capable of activating CB₁ receptors, which triggers PLC stimulation through release of Gβγ dimers from G_{i/o} proteins. Moreover, we also found evidence that affinin-induced vasodilation is partly mediated via activation of the HNO-TRPA₁-CGRP pathway. Finally, our *in silico* studies indicated that affinin binds with high affinity to TRP (A₁ and V₁) channels and cannabinoid receptor CB₁. The results derived from the present study allow us to propose affinin as a structural prototype useful for the development of alternative drugs for the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: Affinin; cannabinoid receptors; HNO-TRPA₁-CGRP pathway; TRPA₁ channels; TRPV₁ channels; vasodilation

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son consideradas la principal causa de muerte en todo el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, 17 millones de personas mueren anualmente a causa de este tipo de enfermedades en el mundo. Esta cifra representa alrededor del 30% de las muertes totales a nivel mundial. Alrededor del 80% de las muertes asociadas a ECVs se dieron en países de ingresos bajos y medios (World Health Organization, 2013).

A pesar de la amplia variedad de medicamentos existentes en el mercado para el tratamiento de las ECVs, es importante buscar principios activos que permitan el desarrollo de medicamentos más eficaces, que presenten menores efectos adversos y de menor costo. La búsqueda de nuevos fármacos con estructuras químicas novedosas, cuyo mecanismo de acción involucre vías de señalización distintas a las comúnmente exploradas, permitirá lograr este objetivo. Una de las principales estrategias en la búsqueda de moléculas bioactivas con potencial uso farmacológico es el conocimiento etnomédico de diferentes culturas (Anwar *et al.*, 2016). De entre las sustancias bioactivas con potencial interés farmacológico destacan las alcanidas las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal especialmente en plantas de la familia Asteracea (Boonen *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2016; Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Las plantas productoras de alcanidas han sido empleadas desde tiempos remotos con fines medicinales y culinarios en todo el mundo. Uno de sus usos medicinales está asociado a su efecto analgésico en el dolor dental, el cual puede relacionarse con su contenido de alcanidas (Cilia-López *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2013).

En México, la diversidad de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana es particularmente extensa. Entre la gran diversidad de plantas existentes destaca la planta *Heliopsis longipes*, conocida como chilcuague o raíz dorada. Desde su descripción original, *H. longipes* ha sido ampliamente estudiada debido a que posee un gran número de efectos biológicos de interés terapéutico (Acree *et al.*, 1945; Garcia *et al.*, 2016; Molina-Torres y Chavez, 2016). Recientemente, nuestro

grupo de trabajo determinó que el extracto de diclorometano de esta planta la afinina, su alcalamida mayoritaria, producen un efecto relajante de la aorta de rata, el cual involucra la participación de las enzimas eNOS y CSE (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). No obstante, no se han identificaron los blancos moleculares asociados al efecto vasodilatador de la afinina. Debido a la similitud estructural de la afinina con otras alcalamidas y con endocannabinoides como la anandamida, esta alcalamida podría producir sus efectos farmacológicos, mediante mecanismos similares a estos compuestos. En este sentido, es posible que la afinina active canales TRPA₁ y TRPV₁ (Ogata Nomura *et al.*, 2013) y/o receptores a cannabinoides CB₁ o CB₂ (Raduner *et al.*, 2006; Ruiu *et al.*, 2013). Por esta razón, los objetivos del presente trabajo fueron, por un lado, investigar si el efecto vasodilatador producido por la afinina involucra un incremento en los niveles de los transmisores gaseosos, NO y H₂S, y la activación de receptores a cannabinoides y de canales TRP y, finalmente, identificar los posibles sitios de unión de la afinina en los receptores a cannabinoides y los canales TRP, mediante métodos computacionales de acoplamiento molecular. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de los canales TRP (A1 y V1), de los receptores a cannabinoides CB₁ y de la vía del HNO-TRPA₁-CGRP. Estos resultados permiten proponer a la afinina como un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos alternativos útiles en el tratamiento de ECVs..

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades cardiovasculares

Durante las últimas décadas las enfermedades cardiovasculares (ECVs) se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial y constituyen la principal causa de muerte en el mundo. El 80 % de las muertes asociadas a las ECVs ocurre en países de ingresos bajos y medios (World Health Organization, 2013).

La hipertensión arterial (HTA) es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de ECVs graves como las cardiopatías arteriales coronarias y los accidentes cerebrovasculares. Entre 1980 y 2008, el número de personas mayores de 25 años diagnosticadas con hipertensión aumentó de 600 a 1000 millones (World Health Organization, 2013; Rivera y Martin, 2019).

La HTA se define como un aumento en la presión arterial por encima de los 140/90 mm Hg y se divide en HTA primaria y secundaria. La HTA primaria corresponde al 90% de los casos y sus causas son desconocidas, aunque están asociadas a causas genéticas que puede empeorarse o acelerarse por factores de riesgo como obesidad, estrés, tabaquismo, hábitos dietéticos (consumo excesivo de sal, dietas bajas en frutas y verduras), anormalidades en la producción o actividad de compuestos vasoactivos derivados de endotelio, alteraciones hipotalámicas entre otras (Velásquez-Monroy *et al.*, 2003; Sherwood, 2016; Aita *et al.*, 2019; Rivera y Martin, 2019). La HTA secundaria corresponde a solo el 10% de los casos y ocurre en respuesta a problemas o enfermedades secundarias, como daño renal (por ejemplo, aterosclerosis renal o tumores endócrinos) (Córdova-Villalobos *et al.*, 2008; Sherwood, 2016).

En países desarrollados, la prevalencia de la hipertensión ronda el 35%, mientras que en países no desarrollados la prevalencia es, al menos, del 40%, logrando empatar o superar la prevalencia de enfermedades infecciosas. Esta última cifra es de hecho sumamente conservadora, debido a que en los países no desarrollados, los sistemas de salud suelen ser muy ineficientes, por lo que el

número de personas hipertensas debe ser más elevado que el reportado por las instituciones de salud. Se estima que anualmente entre el 1.5 y el 5% de la población hipertensa de países de tercer mundo muere por causas asociadas a la hipertensión (Aita *et al.*, 2019; Rivera y Martin, 2019).

En México, cerca del 25% de las muertes ocurridas en el periodo 2012-2015 han ocurrido a consecuencia de enfermedades relacionadas con el sistema circulatorio que incluyen: enfermedades hipertensivas, enfermedades isquémicas del corazón, enfermedades cerebrovasculares, aterosclerosis, entre otras (Figura 1). De todas las muertes por enfermedades del sistema circulatorio, el 86.6% corresponde a muertes derivadas de complicaciones por hipertensión o asociadas con ella (INEGI, 2016; Rivera y Martin, 2019).

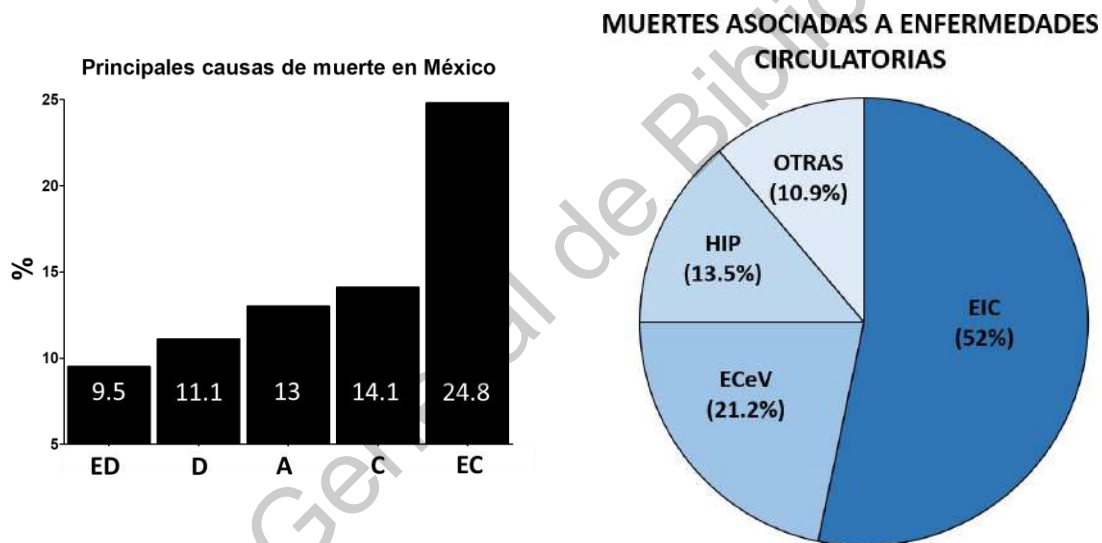


Figura 1. Mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares en México. Las muertes por enfermedades cardiovasculares (ECVs) constituyen el 25% de las muertes totales. De ellas, más del 85% están asociadas o son consecuencia de complicaciones asociadas a la hipertensión. Hipertensión (HIP), enfermedades isquémicas del corazón (EIC), enfermedades cerebrovasculares (ECeV), otras enfermedades del corazón y sistema (OTRAS). Las cantidades están reportadas como el promedio del porcentaje de las muertes ocurridas por enfermedades del sistema circulatorio en México en el periodo 2012-2015. Datos de 2016 publicados por INEGI. Simbología: ED=Enfermedades digestivas; D=Diabetes; A=Accidentes; C=Cáncer; EC=Enfermedades circulatorias.

Uno de los problemas más importantes de la HTA es que inicia de forma silenciosa, de tal forma que cuando aparecen los síntomas, ya existe algún grado

de daño en el corazón y los vasos sanguíneos, a causa del estrés excesivo sobre estos órganos. Todo esto puede desembocar en complicaciones que incluyen insuficiencia cardíaca congestiva, accidentes cerebrovasculares, ataques cardíacos, hemorragias espontáneas, fallo renal o daño a la retina (Sherwood, 2016). Los efectos letales de la HTA se producen principalmente de tres formas: 1) exceso de carga de trabajo del corazón, causando insuficiencia cardíaca y cardiopatía coronaria, lo cual provoca la muerte por un ataque cardíaco. 2) Daño de algún vaso sanguíneo mayor del cerebro, causando infarto cerebral. 3) Lesiones renales, generando insuficiencia renal y, posteriormente, la muerte (Guyton y Hall, 2016).

Otro problema adicional de la HTA es que no solo afecta a personas de la tercera edad, sino que afecta a grupos de edad económicamente activos. La HTA genera discapacidad, pérdida de ingresos económicos y gastos médicos. En países no desarrollados, muchas personas no buscan tratamiento para la HTA, porque su costo es prohibitivo (World Health Organization, 2013).

Paradójicamente, los hogares de estas personas tienen que destinar proporciones considerables de sus ingresos en gastos de hospitalización y atención a complicaciones incluyendo infartos cardíacos, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal. Además, el tratamiento a menudo requiere del empleo de medicamentos costosos durante periodos muy largos y en su mayoría deben administrarse de por vida, llevando no solo al paciente a condiciones económicas precarias, sino también a sus familiares (World Health Organization, 2013; Aita *et al.*, 2019).

En vista de lo anterior, resulta sumamente importante el tratamiento adecuado y oportuno de la HTA (Guyton y Hall, 2016). Una vez detectada la HTA, debe ser tratada para reducir el curso y severidad del problema. Es importante privilegiar el tratamiento con métodos menos agresivos, así la primera alternativa son las medidas no farmacológicas, las cuales son aplicadas como medida primaria en el tratamiento de la HTA inicial. Estas medidas incluyen mantener un peso adecuado, limitar la ingesta de alcohol, moderar el consumo de sal, aumentar el

consumo de frutas y verduras ricas en potasio, controlar dislipidémias, suprimir el tabaco y controlar el estrés (Sherwood, 2016). Dentro del tratamiento farmacológico pueden emplearse fármacos que disminuyan el volumen plasmático o la resistencia periférica (o ambos), llevando la presión a sus estados normales. Los diuréticos y beta bloqueadores son considerados fármacos de primera elección para el tratamiento de HTA, debido a su efectividad y margen de seguridad que ofrecen (Wiysonge *et al.*, 2017; Mann, 2019).

Los fármacos beta bloqueadores son sustancias que inhiben competitivamente a los receptores beta adrenérgicos, evitando la activación de la adenilato ciclasa (AC), por lo que disminuyen la actividad simpática, mediada por estos receptores. En la actualidad existen tres generaciones de beta bloqueadores. La primera tiene afinidad por receptores beta 1 y beta 2 (no selectivos), la segunda tiene mayor selectividad por receptores beta 1 (cardioselectivos) y los de tercera generación tienen efectos vasodilatadores al bloquear receptores alfa 1 o activar la vía del óxido nítrico vascular (Sherwood, 2016; Wiysonge *et al.*, 2017; Mann, 2019). Los fármacos beta bloqueadores han sido considerados durante mucho tiempo como fármacos de primera elección en el tratamiento de la HTA; sin embargo, en los últimos años se ha puesto en duda su utilidad, debido a que se han observado efectos negativos en pacientes hipertensos susceptibles (adultos mayores, diabéticos, con enfermedad renal) (Wiysonge *et al.*, 2017; NICE, 2018; Mann, 2019). Debido a los efectos secundarios que pueden causar la muerte en pacientes susceptibles, en Inglaterra se ha desaconsejado el uso de beta bloqueadores como fármacos de primera elección en el tratamiento de la HTA, especialmente en adultos mayores, argumentando que estos fármacos presentan menor beneficio con respecto a otros fármacos (NICE, 2018).

Debido a las complicaciones y desventajas que pueden presentar los fármacos actualmente utilizados en el tratamiento de la hipertensión, es importante buscar alternativas farmacológicas que permitan tener una eficacia mayor y menores efectos secundarios en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, en particular, de la hipertensión.

2.2 Fisiología de la pared vascular

Para cumplir con su función, el sistema circulatorio consta de un sistema de conductos cerrados que comienzan y terminan en el corazón. Estos conductos reciben el nombre genérico de vasos sanguíneos. A excepción de los capilares, todos los vasos sanguíneos poseen tres capas concéntricas, ordenadas de la luz del vaso hacia el exterior: la túnica íntima, túnica media y adventicia (Figura 2).

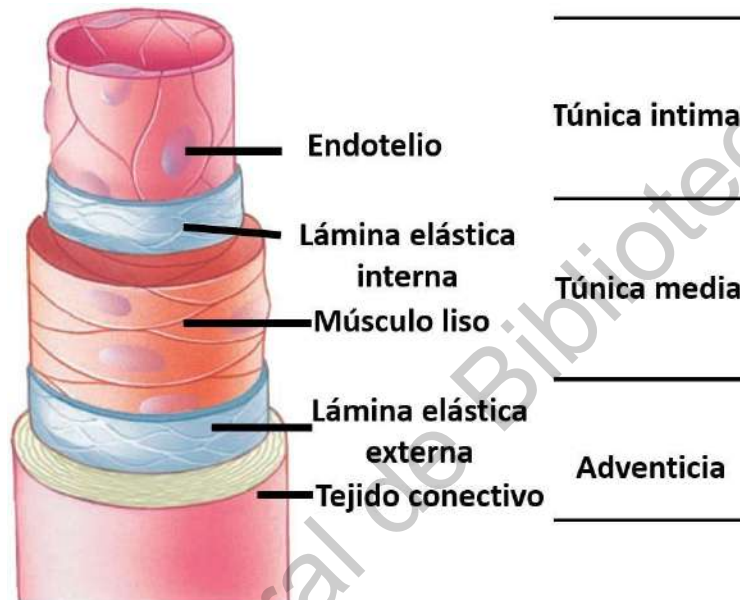


Figura 2. Anatomía del vaso sanguíneo. Se muestran las diferentes capas que conforman un vaso sanguíneo típico, definidas por las túnicas íntima, media y adventicia. La más interna es la túnica íntima conformada por el endotelio y la membrana basal, la túnica media, constituida por la lámina elástica interna y la capa muscular. La lámina elástica externa y el tejido conectivo constituyen la adventicia. Imagen modificada de Sherwood, 2016.

La túnica íntima es la capa más interna, la cual está en contacto directo con la luz del vaso sanguíneo. Esta capa está formada por células endoteliales vasculares y una capa fibroelástica denominada membrana basal. Las células endoteliales tapizan la cara luminal interna de los vasos sanguíneos y constituyen una superficie celular que proporciona al vaso sanguíneo un revestimiento no trombogénico. Estas células tienen una forma elíptica con orientación al flujo sanguíneo y mantienen contacto entre sí. Las uniones entre las células endoteliales son muy estrechas y solo permiten el paso de moléculas de hasta 10 nm de

diámetro, aunque pueden transportar moléculas más grandes a través de mecanismos de transporte vesicular. La túnica íntima está separada de la túnica media por la lámina elástica interna (Pérez-Vizcaíno y Tamargo, 2005; Ganong, 2010; Sherwood, 2016).

La túnica media contiene fundamentalmente células musculares lisas, las cuales se encuentran distribuidas radial y longitudinalmente alrededor de la circunferencia del vaso sanguíneo y se ubican por detrás de las células endoteliales (visto desde la luz vascular). Entre las células musculares lisas y las células endoteliales se encuentra un recubrimiento elástico de membrana basal, conocida como lámina elástica externa. Tanto la lámina interna como la externa están compuestas por sustancias como elastina, colágeno y proteoglicanos (Risler *et al.*, 2002; Sherwood, 2016). La capa muscular se encuentra inervada por fibras nerviosas terminales simpáticas y parasimpáticas. Estas fibras se encargan de modular el diámetro vascular para regular el flujo y la presión sanguínea (Rhodin, 1980; Ganong, 2010).

La túnica adventicia está compuesta por fibras de tejido conectivo, el cual contiene colágeno, protege al vaso sanguíneo y lo fija al tejido subyacente, fibroblastos y fibras nerviosas. Se ha sugerido que la adventicia puede jugar un papel importante en la regulación del óxido nítrico y en la fisiología vascular (Risler *et al.*, 2002; Pérez-Vizcaíno y Tamargo, 2005).

2.2.1 Endotelio vascular

El endotelio vascular se encuentra en contacto directo con la luz vascular, por lo que puede actuar como receptor y transmisor de señales procedentes de células vecinas o alejadas, sensor cambios de presión, cizallamiento o interactuar con plaquetas o leucocitos (Lahera *et al.*, 2005; Sherwood, 2016). Esta capacidad de interacción le permite responder a los estímulos recibidos, mediante la liberación de moléculas vasoactivas. Por esta razón, el endotelio es considerado como el principal órgano de regulación vascular, relacionado con acciones exócrinas, parácrinas, autócrinas, metabólicas e inmunológicas, y con procesos de

coagulación, fibrinólisis y adhesión celular. Todos estos procesos son producidos principalmente por factores derivados de endotelio, los cuales modulan el tono y el crecimiento del músculo liso vascular (Lahera *et al.*, 2005; Ganong, 2010; Sherwood, 2016).

2.2.2 Factores derivados de endotelio

Los factores derivados de endotelio son una serie de moléculas que pueden tener efectos variados sobre la agregación plaquetaria, coagulación, fibrinólisis, crecimiento del músculo liso, etc. Entre estos efectos, destaca el efecto sobre el tono vascular que presentan algunos factores derivados de endotelio (Lahera *et al.*, 2005; Ganong, 2010; Sherwood, 2016). Algunas de estas sustancias se describen de manera general a continuación (Figura 3).

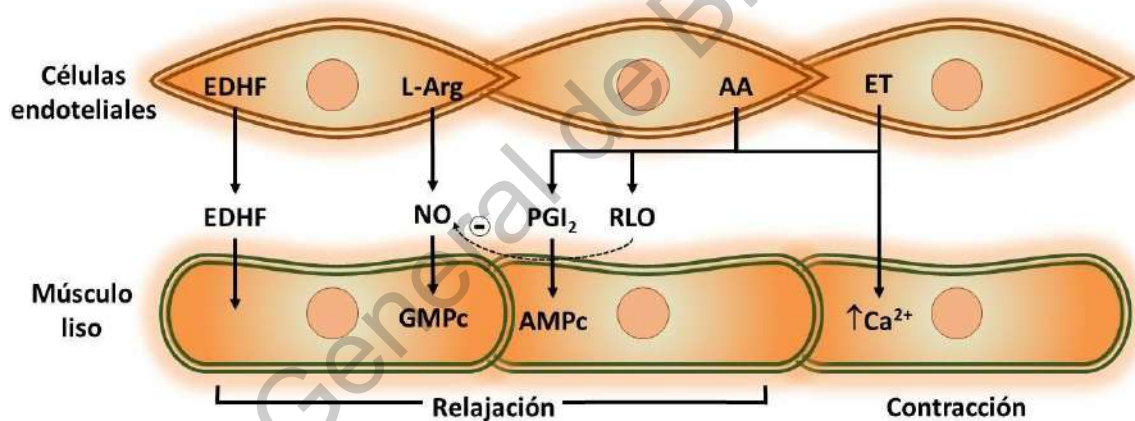


Figura 3. Factores derivados de endotelio y su acción sobre el tono vascular. L-Arg: L-arginina; ET: endotelina; EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio; NO: óxido nítrico; PGI₂: prostaciclina; RLO: radicales libres de oxígeno; TXA₂: tromboxano A₂; GMPc: monofosfato cíclico de guanosina; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina. Modificado de Lahera *et al.*, 2005.

2.2.2.1 Prostaciclina

La prostaciclina (PGI₂) es sintetizada en células endoteliales vasculares a partir del ácido araquidónico (AA). Este factor se encarga principalmente de inhibir

la agregación plaquetaria y aunque tiene la capacidad de relajar el músculo liso vascular, no se considera que tenga una participación importante en la modulación del control de la presión sanguínea. En cualquier caso, se sabe que su acción involucra la activación de la AC y se inactiva aproximadamente 2 minutos después de su síntesis, mediante degradación no enzimática. La síntesis y liberación de PGI₂ es estimulada por angiotensina II, acetilcolina (ACh), bradiquinina (Bk) y serotonina (Lahera *et al.*, 2005).

2.2.2.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es uno de los principales factores derivados de endotelio, que está involucrado en el mantenimiento de la integridad y estructura vascular. Sus funciones básicas consisten en la relajación del músculo liso vascular, inhibición de la agregación plaquetaria, del crecimiento y de la proliferación del músculo liso vascular, y la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio (Lahera *et al.*, 2005; Ganong, 2010). El NO es un radical libre involucrado en diversos procesos biológicos, incluyendo procesos de neurotransmisión, motilidad gástrica, cicatrización, respiración mitocondrial, apoptosis e inflamación (Lo Faro *et al.*, 2014).

El NO es producido a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual se conocen tres isoformas: la neuronal (nNOS o NOS₁), expresada constitutivamente por neuronas; la endotelial (eNOS o NOS₃), expresada constitutivamente en células endoteliales vasculares y la inducible (iNOS o NOS₂), expresada en macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios (Ganong, 2010; Lo Faro *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). Las tres enzimas dependen de la presencia de calcio, pero difieren en las concentraciones que requieren para su función y en la cantidad de NO que generan. Tanto eNOS y nNOS requieren elevadas concentraciones intracelulares de calcio en comparación con iNOS. La eficiencia de síntesis de NO por las enzimas eNOS y nNOS es del orden picomolar, mientras que iNOS genera concentraciones nanomolares de NO (Lo Faro *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015).

La síntesis del NO puede ser inducida como respuesta a diferentes moléculas entre las que destaca la acetilcolina (ACh), cuya acción sobre sus receptores membranales genera un aumento de calcio intracelular y la activación de la eNOS. Aunque también puede modular otras hemo proteínas, la acción principal del NO ocurre por unión al grupo hemo del sitio activo de la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), causando un aumento en la concentración de GMPc (Lo Faro *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015; Guyton y Hall, 2016). El NO se libera de células endoteliales en respuesta a estímulos físicos y humorales (Figura 4).

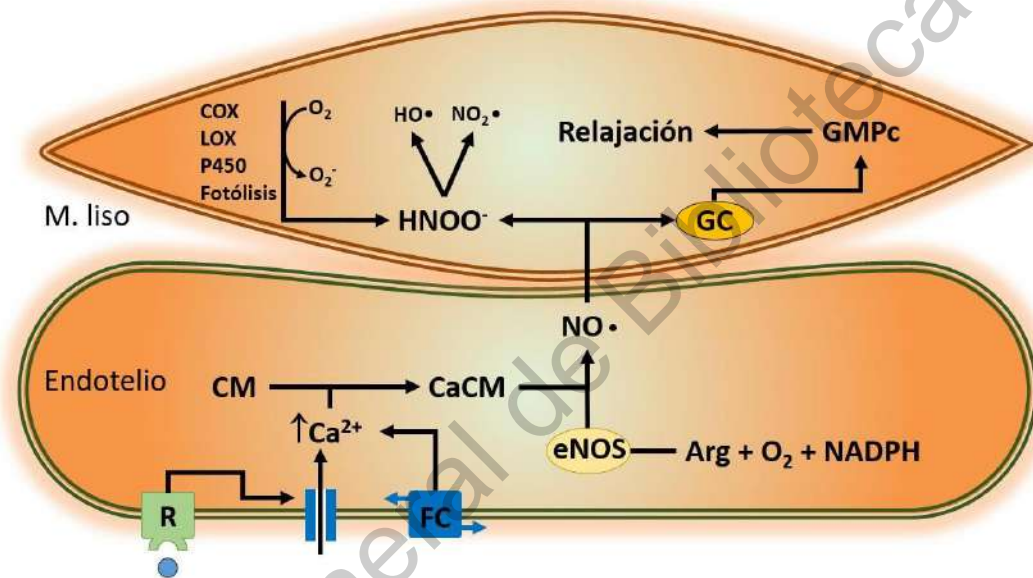


Figura 4. Síntesis de óxido nítrico (NO). La síntesis de NO involucra la activación de receptores (R, por ejemplo, colinérgicos) o fuerzas de cizallamiento (FC) en endotelio vascular que provocan un aumento de calcio intracelular y la formación del complejo CaCM, y la posterior activación de la eNOS. El NO producido por la eNOS a partir de arginina difunde a células musculares lisas, donde incrementa la concentración de GMPc por activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC). El NO puede reaccionar con el anión superóxido (O_2^-), por mecanismos que incluyen a la ciclooxygenasa (COX), la lipooxygenasa (LOX), el citocromo P_{450} (P_{450}) o la fotólisis, generando peroxinitrito ($HNOO^-$). Este último posteriormente será degradado a radicales hidroxilo y nitrito. Modificado de Lahera *et al.*, 2005.

El principal factor físico se conoce como fuerza de cizallamiento, mientras que dentro de los factores humorales se puede mencionar a la ACh, la Bk, las catecolaminas, la angiotensina II, la ET, la vasopresina, la trombina, el ATP, la sustancia P, el ácido araquidónico, la histamina, etc. (Ganong, 2010; Guyton y Hall,

2016). Una vez liberado, el NO tiene una vida de entre 5-10 segundos y puede reaccionar con el anión superóxido (O_2^-), generando peroxinitrito que eventualmente se degrada a anión hidroxilo y nitrato (Ganong, 2010; Zhao *et al.*, 2015; Guyton y Hall, 2016).

2.2.2.3 Sulfuro de hidrógeno

Durante cientos de años, el sulfuro de hidrógeno (H_2S) ha sido considerado una sustancia tóxica; sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que posee propiedades citoprotectoras y moduladoras endógenas, además de jugar un papel crucial en la fisiología celular. El H_2S pertenece a la familia de transmisores gaseosos a la que también pertenecen el NO y el monóxido de carbono (CO) (Lo Faro *et al.*, 2014; Testai *et al.*, 2015; Nagpure y Bian, 2016). En mamíferos, el H_2S es producido por cuatro enzimas: la cistationina- γ -liasa (CSE), la cistationina- β -sintasa (CBS), la cisteína aminotransferasa (CAT) y la mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST). Sin embargo, la CSE es la más importante en sistema vascular, hígado y riñones (Lo Faro *et al.*, 2014; Olas, 2015a; Testai *et al.*, 2015; Nagpure y Bian, 2016). La CSE emplea L-cisteína, L-homocisteína y L-cistationina para producir H_2S , utilizando piridoxal-5-fosfato (Vitamina B₆) como cofactor (Olas, 2015a; Olas, 2015b; Nagpure y Bian, 2016).

El H_2S funciona como una molécula de señalización en muchos órganos, incluyendo los sistemas cardiovascular y nervioso. En el sistema cardiovascular, el H_2S juega un papel esencial en el control de la homeostasis, relajando los vasos sanguíneos. Adicionalmente, se ha demostrado que este gas produce efectos protectores contra daño miocárdico, inducido por isquemia/reperfusión en cultivos de cardiomiocitos, corazón aislado o modelos de infarto agudo. En modelos experimentales de insuficiencia cardíaca, el H_2S incrementa la supervivencia y reduce la disfunción ventricular, mejorando la hemodinámica del corazón e inhibiendo la apoptosis (Olas, 2015b; Testai *et al.*, 2015).

Los efectos inducidos por el H₂S parecen ser a través de varios mecanismos, entre ellos, la participación de canales de potasio sensibles a ATP. Sin embargo, el uso de bloqueadores de estos canales solo reduce el efecto vasodilatador de manera parcial, por lo que se ha sugerido la existencia de mecanismos adicionales (Testai *et al.*, 2015) Se ha propuesto la participación de canales de potasio activados por calcio y se ha demostrado la participación del canal activado por voltaje Kv7 en músculo liso vascular (Lo Faro *et al.*, 2014; Testai *et al.*, 2015).

2.2.2.4 Nitroxilo

En solución acuosa, el H₂S se disocia principalmente en HS⁻, el cual es capaz de reaccionar con múltiples sustratos orgánicos e inorgánicos, incluyendo el NO y sus formas oxidadas (nitratos, nitritos, nitrosotiol y peroxinitratos). Se ha demostrado que uno de los productos de la reacción de H₂S y NO es un compuesto conocido como nitroxilo (HNO) (Nagpure y Bian, 2016).

El HNO, también conocido como hidruro de nitrosilo, oxinitrato de hidrógeno o ácido hiponitroso monomérico, es un compuesto relacionado con el NO, que ha cobrado relevancia, en parte, debido a que puede actuar como un potente vasodilatador en diferentes tipos vasculares. A diferencia del NO, tiene la cualidad de no generar tolerancia, por lo que se ha propuesto como agente terapéutico en trastornos vasculares como la insuficiencia cardiaca congestiva (Andrews *et al.*, 2015; Kemp-Harper *et al.*, 2016).

En cuanto a su mecanismo de acción, se ha propuesto que el HNO requiere de su conversión previa en NO, implicando la activación de la sGC en un mecanismo paralelo al NO. También se ha propuesto que HNO activa directamente a sGC a través de la unión al grupo hemo de la enzima (Andrews *et al.*, 2015; Kemp-Harper *et al.*, 2016).

Por otra parte, el HNO podría unirse a grupos tiol de aminoácidos como la cisteína, modificando el arreglo de puentes disulfuro en proteínas y causando alteraciones conformacionales de las mismas. En este sentido, se ha demostrado

que el HNO puede interactuar directamente con bombas de calcio y con el receptor 2 de rianodina en retículo sarcoplásmico, causando un incremento de calcio intracelular. También, se ha demostrado que HNO estimula la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), mediante la estimulación de canales TRPA₁ en fibras trigeminales, lo cual induce la dilatación de la arteria trigeminal o coronaria (Eberhardt *et al.*, 2014; Kemp-Harper *et al.*, 2016; Nagpure y Bian, 2016).

La activación de canales de potasio por el HNO puede ser debida al incremento en los niveles de GMPc o a la interacción directa del HNO con grupos tiol localizados en estos canales. Este tipo de activación de canales ya ha sido demostrada antes en canales de calcio de músculo esquelético y cardiaco, así como en canales TRPA₁. En este último caso, Eberhardt *et al.* (2014) demostraron que la activación del canal TRPA₁ por HNO involucra la formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas 621-633 y 651-665 del canal TRPA₁ (Eberhardt *et al.*, 2014).

Aún no está claro el mecanismo completo de vasodilatación mediado por HNO. Sin embargo, se han propuesto tres posibles mecanismos por los cuales esta molécula induce la vasodilatación: 1) Generación de HNO en endotelio, el cual se difunde hacia fibras nerviosas, liberando al CGRP y produciendo la relajación vascular. 2) Generación de HNO neuronas perivasculares y activación del canal TRPA₁, lo cual libera al CGRP y produce la relajación vascular. 3) Generación parácrina de NO en astrocitos, el cual reacciona con el H₂S endotelial o neuronal para generar HNO, activando canales TRPA₁ (Eberhardt *et al.*, 2014).

2.2.2.5 Endotelina

Las endotelinas (ET) son péptidos de 21 aminoácidos que se diferencian en un solo aminoácido. En la actualidad, se conocen tres tipos de endotelinas denominadas ET-1, ET-2 y ET-3. Estas moléculas se sintetizan en respuesta a estimulación mecánica, química y humoral. Un elemento clave para iniciar el proceso de síntesis es el aumento de calcio intracelular. Por el contrario, las fuerzas de cizallamiento reducen la liberación de ET. De las tres endotelinas conocidas, solo

ET-1 se encuentra distribuida en las células endoteliales vasculares (Lahera *et al.*, 2005; Guyton y Hall, 2016). Se conocen dos tipos de receptores específicos para endotelina (ET_A y ET_B). Ambos receptores están acoplados a proteínas G. Los receptores ET_A se encuentran en músculo liso vascular y modulan la contracción inducida por endotelina, en tanto que los receptores ET_B, presentes en endotelio, inducen vasodilatación. Además, estos receptores pueden modular la liberación de NO y PGI₂, causando relajación vascular (Lahera *et al.*, 2005; Ganong, 2010).

2.2.2.6 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen la capacidad de inducir vasoconstricción. Una cualidad de cualquier radical libre, es su capacidad de reaccionar con moléculas neutras o con otros radicales libres. Las ROS producen vasoconstricción, debido a que son capaces de reaccionar con el NO, causando su inactivación prematura. Algunos de los radicales libres más importantes son el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el perhidroxilo ($\cdot\text{O}_2\text{H}$), el alcoxilo ($\cdot\text{OR}$), el peroxilo ($\cdot\text{OOR}$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lahera *et al.*, 2005; Guyton y Hall, 2016).

2.2.2.7 Tromboxano y otros factores vasoconstrictores

Otros metabolitos del ácido araquidónico, como el tromboxano A₂ (TXA₂) y la prostaglandina H₂ son otro tipo de agentes constrictores, asociados a hipoxia, hipertensión y diabetes. La síntesis de TXA₂ se incrementa por la acción de noradrenalina, nicotina o por acciones mecánicas. El metabolismo de la prostaglandina H₂ da lugar a la formación de prostaciclina, la cual es capaz de inducir relajación. El ácido acetilsalicílico (AAS) promueve la formación de prostaciclina a costa de una disminución en la síntesis de TXA₂. Por este motivo, el AAS es ampliamente utilizado para prevenir eventos de infarto al miocardio (Ganong, 2010; Guyton y Hall, 2016).

2.2.3 Endocannabinoides

Los endocannabinoides son una clase distinta de moléculas bioactivas que, aunque estructuralmente son diferentes de los cannabinoides, deben su nombre a la capacidad que tienen de activar específicamente a los receptores a cannabinoides CB₁ y/o CB₂ (Montecucco y Di Marzo, 2012; O'Sullivan, 2015). Estos receptores fueron originalmente descritos como blancos específicos de los cannabinoides (Montecucco y Di Marzo, 2012). Los endocannabinoides son moléculas derivadas del ácido araquidónico y químicamente corresponden a amidas, ésteres o éteres. La anandamida fue el primer endocanabinoide descrito, la cual está constituida por una cadena derivada de un ácido graso y de un sustituyente *N*-terminal (2-hidroxietil). El nombre IUPAC aceptado para designar a la anandamida es (5Z,8Z,11Z,14Z)-*N*-(2-hidroxietil)- eicosatetraenamida (Devane *et al.*, 1992). En la actualidad, se sabe que los endocannabinoides pueden causar variaciones en el tono vascular a través de diferentes mecanismos, pero principalmente activando a los receptores a cannabinoides (Randall *et al.*, 2002).

Además de la anandamida, en la actualidad se conocen otros endocanabinoides (Figura 5): 2-araquidonoilglicerol (2-AG), *N*-araquidonoil dopamina (NADA), araquidonil gliceril éter (noladin éter) y virodhamina, y todas ellas tienen la capacidad de inducir vasodilatación en arteria mesentérica de rata aislada, al unirse, por lo menos, a un tipo de receptor a cannabinoides (Bisogno *et al.*, 2000; Porter, 2002; Hoi y Hiley, 2006; Herradón *et al.*, 2007).

Endocannabinoides

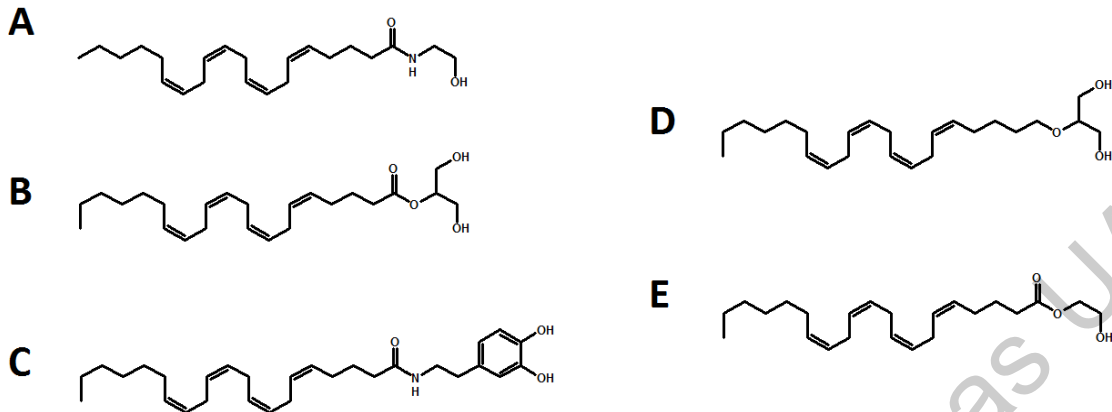


Figura 5. Estructura de los endocannabinoides. Los endocannabinoides son moléculas que químicamente corresponde a amidas, ésteres o éteres. Los endocannabinoides actualmente reconocidos son: A) anandamida, B) 2-araquidonoil glicerol (2-AG), C) *N*-araquidonoil dopamina, D) araquidonil gliceril éter (noladin éter) y E) virodhamina.

2.2.4 Músculo liso vascular

Las células de músculo liso vascular (Figura 6) tienen forma ahusada con un solo núcleo, un diámetro de 2-10 μm y una longitud de 50-400 μm . Estas células, localizadas en la túnica media, se encuentran dispuestas circularmente alrededor de los vasos sanguíneos y son propiamente las responsables de la modificación del diámetro vascular en respuesta a los estímulos provenientes de las neuronas perivasculares simpáticas y parasimpáticas o de las moléculas liberadas por el endotelio vascular (Sherwood, 2016).

De manera similar al músculo esquelético, el músculo liso contiene filamentos de miosina gruesos y filamentos delgados de actina en una proporción actina/miosina de entre 12:1 a 15:1. Los filamentos de actina, contienen tropomiosina pero carecen de troponina (Somlyo y Somlyo, 1994).

Los filamentos de actina se unen a los cuerpos densos intracelulares y se organizan en unidades contráctiles alrededor de los filamentos de miosina. Estos conjuntos de haces o columnas se extienden en la célula, oblicuamente hacia lados opuestos con respecto al eje longitudinal de la célula. Los cuerpos densos se

componen principalmente de α -actinina y son equivalentes a los cuerpos z en el músculo esquelético (Ganong, 2010; Somlyo, 2011; Sherwood, 2016).

Los filamentos intermedios funcionan como andamiaje estructural para mantener a los cuerpos densos en su posición. A su vez, los cuerpos densos se mantienen en patrones cruzados, por lo que en la contracción, la fuerza es transmitida lateral y longitudinalmente (Figura 6) (Somlyo, 2011; Sherwood, 2016).

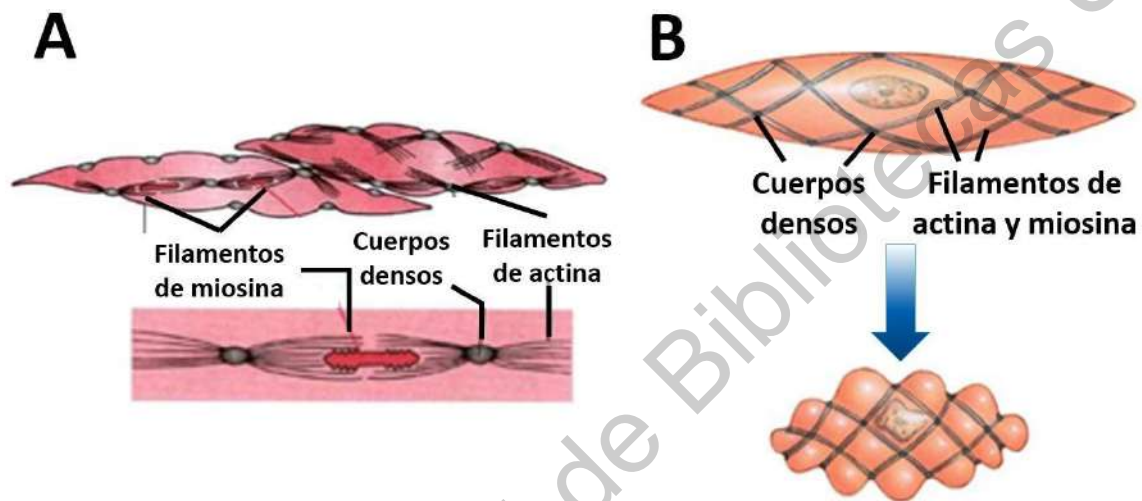


Figura 6. Anatomía de la célula muscular lisa. A) Las células musculares lisas tienen forma ahusada de 2-10 x 50-400 μm y están ubicadas en la túnica media. Presentan filamentos de actina y miosina anclados a unas estructuras denominadas cuerpos densos (equivalentes a las fibras Z en músculo esquelético). B) La tracción ejercida en torno a estas estructuras por las fibras de miosina y actina, en respuesta a estímulos contráctiles, reducen el tamaño de la célula muscular hasta en un 80% del tamaño original, en gran parte debido al arreglo oblicuo de las fibras de actina y miosina y de los cuerpos densos en la célula muscular. Modificado de Sherwood, 2016.

2.2.5 Mecanismos de contracción-relajación vascular

La disposición del endotelio y de las células musculares tienen por objeto principal la modulación del tono vascular, el cual es generado por las células musculares en respuesta a las señales recibidas desde el endotelio o desde las neuronas perivasculares simpáticas. Esto lo hacen por medio de dos procesos contrarios: la vasoconstricción, que es el estrechamiento del vaso sanguíneo por la

contracción del músculo liso vascular y la vasodilatación que está definida como el aumento del diámetro de un vaso sanguíneo como resultado de la relajación del músculo liso (Figura 7) (Sherwood, 2016).

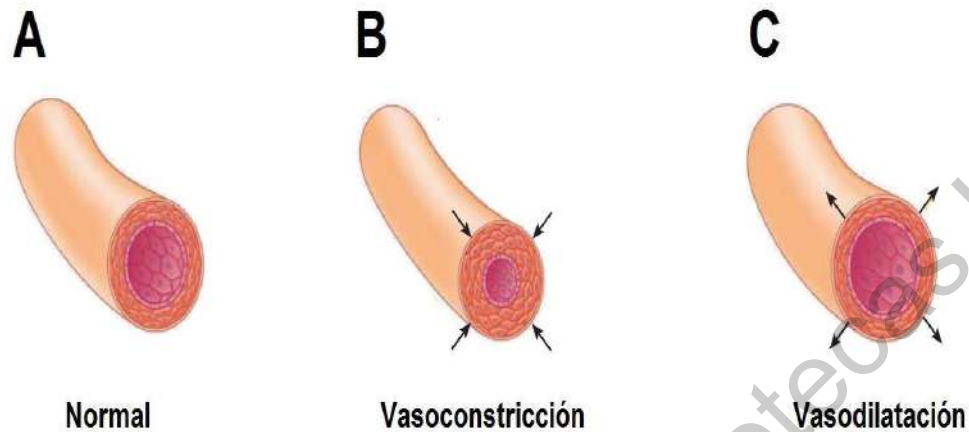


Figura 7. Vasoconstricción y vasodilatación. Los vasos sanguíneos pueden regular el flujo y la presión sanguínea en respuesta a señales locales y generales. Estos procesos son la vasoconstricción (B) que se define como la disminución del radio vascular en respuesta a señales contráctiles y la vasodilatación (C) que es un aumento en el diámetro vascular en respuesta a señales relajantes. Modificado de Sherwood, 2016.

El proceso de contracción requiere de la participación de calcio, por esta razón, es indispensable permitir su entrada a las células musculares lisas. Se requiere que entre el calcio en grandes cantidades desde el retículo sarcoplásmico y del medio extracelular. Esta entrada puede darse a través de canales de calcio (activados por voltaje o por ligando) (Somlyo y Somlyo, 1994; Ganong, 2010). El incremento de calcio citosólico se da en respuesta a señales específicas, ya sea por medio de alguno o algunos de los factores derivados de endotelio o por la acción de los neurotransmisores liberados en la terminal neuromuscular. Muchas de estas moléculas se unen a receptores acoplados a proteínas G (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005; Ganong, 2010).

A excepción de los vasos capilares, todos los vasos sanguíneos están inervados con fibras simpáticas. Esta disposición contribuye de manera importante a mantener la presión arterial media en el cerebro, asegurando una presión sanguínea constante a costa de otros órganos, permitiendo mantener una

resistencia al flujo sanguíneo y disminuyendo la velocidad de flujo en los tejidos. Los nervios simpáticos transportan una gran cantidad de fibras nerviosas vasoconstrictoras y solo algunas vasodilatadoras (Guyton y Hall, 2016).

La contracción del músculo liso vascular involucra mecanismos de control locales y generalizados (Figura 8); sin embargo, una parte importante de las acciones están mediadas por la participación de fibras simpáticas, cuyo principal neurotransmisor es la norepinefrina (NE) (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005; Guyton y Hall, 2016).

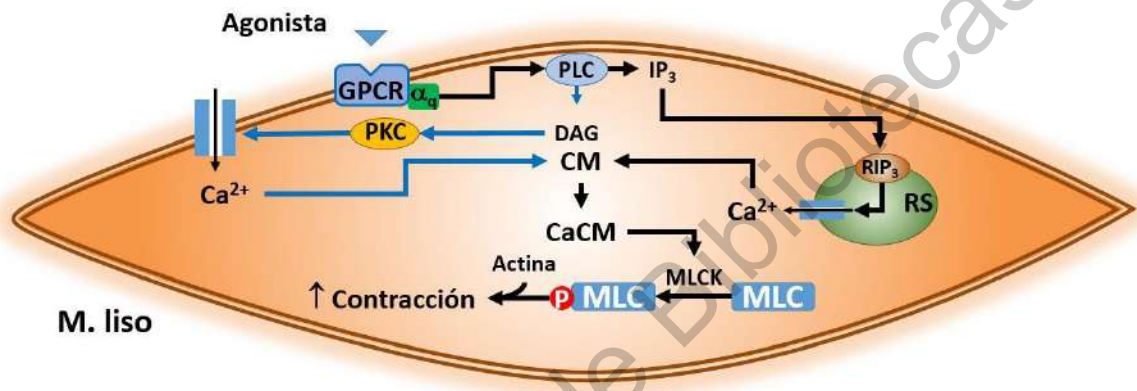


Figura 8. Mecanismo de contracción de una célula muscular lisa. La acción de agonistas (por ejemplo: NE) sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCR) tipo q (α_q) provoca la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). Ambos aumentarán la concentración de calcio en citosol por apertura de canales iónicos (activados por PKC) y por la activación del receptor de IP_3 (RIP_3) en el retículo sarcoplásmico (RS). El calcio se une a la calmodulina (CM), formando el complejo CaCM, el cual se une a la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que se encarga de fosforilar a la miosina, promoviendo la formación de puentes cruzados con la actina y, en última instancia, la generación de la contracción. Modificado de Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005

La norepinefrina y la epinefrina son hormonas vasoconstrictoras potentes. Cuando se estimula el sistema nervioso simpático, las terminales nerviosas liberan NE. Este neurotransmisor se une a receptores α_1 -adrenérgicos en músculo liso vascular, induciendo la contracción de los vasos sanguíneos (Guyton y Hall, 2016). La unión de la NE a su receptor muscular causa la activación de una proteína G con subunidad alfa q, la cual activa a la enzima fosfolipasa C (PLC), enzima que cataliza

la formación de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Al unirse IP_3 a sus receptores se incrementa la concentración de calcio en el citosol proveniente del retículo endoplásmico, mientras que el DAG se encarga de activar a la enzima proteína cinasa C (PKC). La forma activa de PKC puede fosforilar a diferentes proteínas en músculo liso, como por ejemplo canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, favoreciendo el incremento de calcio intracelular, lo cual produce la despolarización de la fibra muscular lisa y, por lo tanto, su contracción (Figura 8) (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005). Alternativamente, puede entrar calcio extracelular mediante la activación de canales iónicos activados por ligando. Por otro lado, la activación de canales de sodio y potasio puede generar cambios en el potencial de membrana, llevando a la apertura de canales de calcio activados por voltaje en retículo sarcoplásmico (Sherwood, 2016).

El calcio citosólico se une a la proteína calmodulina para formar el complejo calcio-calmodulina (CaCM). Este complejo activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), la cual fosforila a la cadena ligera de miosina (MLC), utilizando energía proveniente de la hidrólisis del ATP. Esto promueve la formación de puentes cruzados entre la miosina y la actina, generando fuerza y acortamiento de las células musculares en la contracción muscular. La miosina puede ser desfosforilada por acción de la enzima fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), deteniendo así, la formación de puentes cruzados de miosina-actina y permitiendo la relajación del músculo liso (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005; Sherwood, 2016).

El proceso de relajación implica, en primera instancia, la desaparición del estímulo contráctil (Figura 9). Para llevar a cabo este proceso, la disminución del calcio intracelular resulta esencial, ya que su disminución a niveles inferiores a 10^{-7} mol/L inactiva a la cinasa de miosina (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005).

La vasodilatación puede ser inducida, mediante moléculas que antagonicen a las moléculas vasoconstictoras, por una disminución del calcio intracelular y por un aumento en la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. La disminución intracelular de calcio involucra tanto a la membrana celular como al retículo sarcoplásmico. Este último, captura al calcio, mediante la acción de la

bomba de calcio, que traslada dos iones calcio al lumen del retículo sarcoplásmico en un proceso dependiente de magnesio y ATP. Otro mecanismo involucra un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, localizado en la membrana celular, que también ayuda a la reducción del calcio citosólico (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005; Guyton y Hall, 2016).

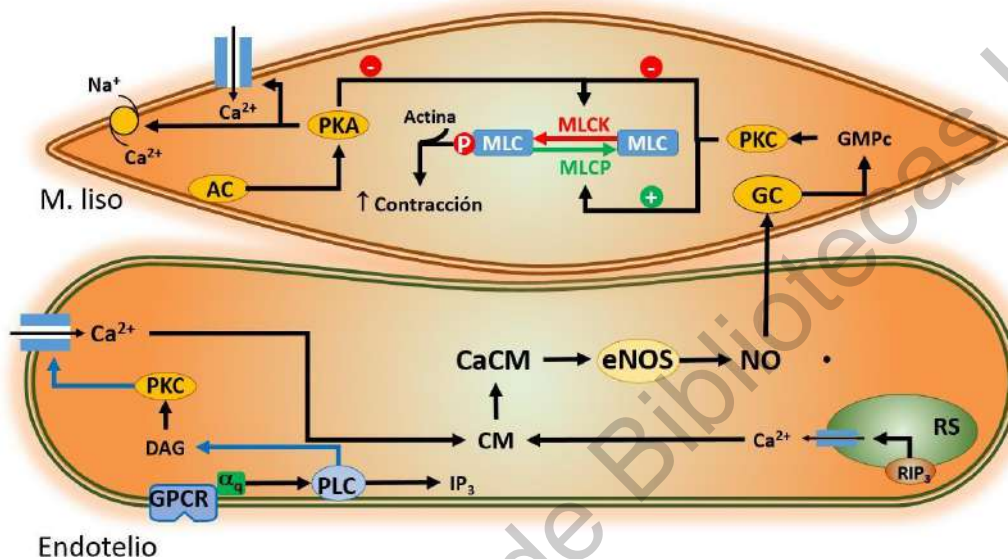


Figura 9. Mecanismo de relajación de una célula muscular lisa. Agonistas vasodilatadores se unen a receptores endoteliales, acoplados a proteínas G_q (por ejemplo: acetilcolina, ACh), provocando un aumento en la concentración de calcio. El calcio forma el complejo calcio calmodulina (CaCM) y activa a la enzima NOS, que produce NO a partir de arginina. El NO difunde a músculo liso y activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs) quien activa a PKG por acción de GMPc. La enzima PKG es la responsable de activar a la MLCP, promoviendo la vasodilatación. Modificado de Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005.

Además de la disminución de calcio intracelular, existen mecanismos no dependientes de calcio que relajan el músculo liso. Por ejemplo, la relajación dependiente de AMPc, generada por agonistas β_2 -adrenergicos, adenosina, PGI_2 etc., que ocurre sin cambios en la concentración de calcio intracelular. En este caso, la PKA puede fosforilar a la MLCK, evitando que el complejo CaCM la active (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005). Sin embargo, la vía del AMPc frecuentemente se sobrelapa con las vías que involucran calcio, influyéndose mutuamente. Por ejemplo, el complejo CaCM puede modular la actividad de la AC y, por tanto, influye en las concentraciones de AMPc. Por el contrario, PKA puede fosforilar canales de

calcio, modificando su actividad (Sherwood, 2016). Otro ejemplo es la enzima sGC (activada por NO), la cual produce GMPc que activa a la protein cinasa G (PKG), encargada de fosforilar diversas proteínas, entre otras a la MLCP, promoviendo así la desfosforilación de la miosina y, por tanto, la relajación de la célula muscular lisa (Muñiz-Murguía y Peraza-Campos, 2005).

2.3 Mecanismos de relajación vascular inducida por endocannabinoides

Las acciones vasodilatadoras de los endocannabinoides dependen principalmente de la activación de los receptores CB₁, CB₂ y eCB. Tanto el receptor CB₁ como el CB₂ son considerados receptores clásicos de cannabinoides, mientras que el receptor a cannabinoides endotelial (eCB) es considerado un atípico. El receptor eCB aún no ha sido clonado, pero existe evidencia proveniente de múltiples ensayos farmacológicos, que sugiere su existencia en endotelio vascular (Devane *et al.*, 1992; Hoi y Hiley, 2006; López-Miranda *et al.*, 2008; Montecucco y Di Marzo, 2012).

Juntos, los receptores a endocannabinoides forman el denominado sistema endocannabinoide (ECS) que incluye, además de los receptores CB₁, CB₂ y eCB, a los ligandos endógenos de estos receptores y a las proteínas que metabolizan y regulan los niveles de endocannabinoides (enzimas anabólicas y catabólicas). El ECS también incluye a los transportadores de cannabinoides y a las proteínas que interaccionan con los receptores a cannabinoides, modulando su actividad (Devane *et al.*, 1992; Hoi y Hiley, 2006; López-Miranda *et al.*, 2008; Montecucco y Di Marzo, 2012).

Los cannabinoides, endocannabinoides y compuestos relacionados interactúan con estos receptores y con otros blancos moleculares, incluyendo a los receptores GPR55, GPR119, canales TRP, receptores opioides, adrenoreceptores y receptores a serotonina (Stanley y O'Sullivan, 2014).

El ECS puede modular la vasodilatación en respuesta a la acción de sus ligandos endógenos y exógenos. Sin embargo, esta acción ocurre a diferentes niveles, involucrando distintos componentes del ECS (Montecucco y Di Marzo, 2012). El perfil farmacológico de los endocannabinoides y cannabinomiméticos es

complicado y sus efectos pueden variar de acuerdo al tipo celular o tisular, si el receptor es nativo o si esta sobreexpresado, si hay moduladores alostéricos, etc. Debido a estas variables no existe una respuesta homogénea de los cannabinoides en la vasculatura (Stanley y O'Sullivan, 2014).

2.3.1 Receptores a endocannabinoides

Los receptores CB₁ y CB₂ son receptores acoplados a proteínas G, formados por 7 dominios transmembranales. La distribución de los receptores CB₁ es amplia, se han identificado en humanos, ratas, ratones, gatos y aves. Estos receptores se han localizado en sistema nervioso central (corteza cerebral, hipocampo, sustancia nigra pars reticulata, putamen-caudado lateral, globo pálido, núcleo entopeduncular y lámina molecular del cerebelo), en tejidos periféricos (útero, testículos, vía eferente, vejiga, corazón), sistema nervioso entérico, nervios sensoriales del ganglio de la raíz dorsal, pulmón, timo y bazo (López-Miranda *et al.*, 2008). En el sistema vascular los receptores CB₁ y CB₂ están ampliamente distribuidos, encontrándose en neuronas perivasculares, músculo liso vascular y células endoteliales (López-Miranda *et al.*, 2008; Stanley y O'Sullivan, 2014; O'Sullivan, 2015). Sin embargo, la distribución de estos receptores en sistema vascular es variable y depende en gran medida del tejido y la especie utilizada. Se ha demostrado la presencia de receptores CB₁ en distintas preparaciones arteriales que incluyen arteriolas renales, arterias mesentéricas de rata, lecho mesentérico perfundido, arterias oftálmicas bovinas, arterias cerebrales de gato y aorta de conejo (Romano y Lograno, 2006).

Por otra parte, los receptores CB₂ han sido localizados en macrófagos y monocitos, astrocitos, neuronas y nervios periféricos nociceptivos. En la vasculatura, los receptores CB₂ están ampliamente distribuidos en músculo liso vascular y células endoteliales (Rajesh *et al.*, 2007; Huffman *et al.*, 2008; López-Miranda *et al.*, 2008).

Además de los ligandos endógenos de los receptores CB₁ (endocannabinoides: anandamida, NADA, OEA y oleamida), se han descrito también diversos cannabinomiméticos naturales y sintéticos que pueden unirse de

manera específica a este receptor, actuando como agonistas o antagonistas. En el primer grupo encontramos a HU-210, WIN55212-2, CP55,940, CP55,244 y JWH-133 (agonista no selectivo), mientras que en el segundo se encuentran rimonabant, AM251, AM281 y SR144528 (antagonista selectivo del receptor CB₂) (Howlett *et al.*, 1988; Devane *et al.*, 1992; Stefano, 2000; Randall *et al.*, 2002; López-Miranda *et al.*, 2008; Stanley y O'Sullivan, 2014).

Los mecanismos de vasodilatación inducidos por receptores CB₁ involucran la participación de proteínas G (Gi y Go) (Figura 10) y la posterior inhibición de la enzima AC que regula canales de calcio y potasio (López-Miranda *et al.*, 2008). También, se ha observado que parte de los efectos vasodilatadores causados por activación de receptores CB₁ se deben a la activación del sistema nervioso simpático, aunque también se ha sugerido que las fuerzas de cizallamiento pueden activar a estos receptores (Stefano, 2000; Randall *et al.*, 2002; Montecucco y Di Marzo, 2012).

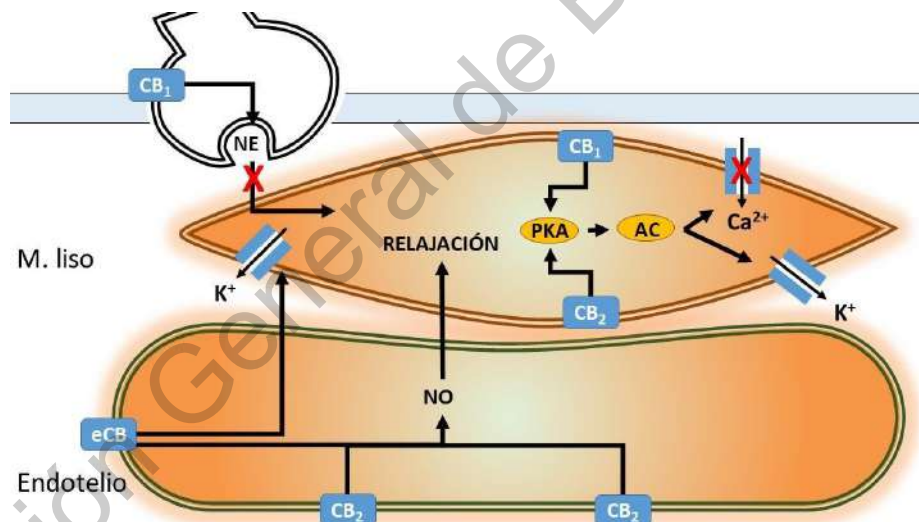


Figura 10. Esquema de relajación inducida por receptores a cannabinoides. En neuronas perivasculares se localizan los receptores CB₁, en endotelio se ubican los receptores CB₁, CB₂ y eCB, en músculo liso se encuentran los receptores CB₁ y CB₂. En los tres casos se trata de receptores acoplados a proteínas Gi/o. En músculo liso, la activación de CB₁ o CB₂ produce la apertura de canales de potasio, o la inhibición de canales de calcio. La activación simpática de CB₁ inhibe la liberación de noradrenalina (NE) y la activación de eCB en endotelio promueve la apertura de canales de potasio en músculo liso.

En general, se considera que los receptores CB₂ no participan en el proceso de relajación vascular. Sin embargo, hay evidencias que sugieren la participación de estos receptores en la vasodilatación inducida por algunos endocannabinoides o cannabinomiméticos (Vanessa Ho y Robin Hiley, 2003; Stanley y O'Sullivan, 2014).

Se ha observado que anandamida y oleoilamida (OEA) pueden causar relajación vascular mediada por activación de receptores CB₂. Algunos cannabinomiméticos, dentro de los que se puede mencionar a JWH-015, THC, CP55,940, Win55,212-2 y HU-210 pueden causar relajación vascular dependiente de CB₂. Se considera que la vasodilatación mediada por endocannabinoides a través de la activación de receptores CB₂ no es el principal mecanismo de acción de los endocannabinoides. Es más probable que CB₂ desempeñe un papel en otras funciones del endotelio como regulación de las moléculas de adhesión, adhesión de monocitos y permeabilidad endotelial (Vanessa Ho y Robin Hiley, 2003; Alsuleimani y Hiley, 2013; Stanley y O'Sullivan, 2014).

Además de los receptores CB₁ y CB₂, se ha propuesto la existencia de un tercer receptor distinto de los anteriores. Este receptor ha sido referido en la literatura con diferentes designaciones como "receptor a cannabidiol anormal", "receptor endotelial a anandamida", "receptor a cannabinoides endotelial atípico", receptor a cannabinoides no-CB₁/no-CB₂ o receptor eCB (endotelial). Este receptor eCB es considerado un receptor no clásico de cannabinoides y a diferencia de los receptores CB₁ y CB₂, el receptor eCB no ha sido clonado y su existencia ha sido justificada en base a una gran variedad de estudios farmacológicos que muestran diferencias con respecto a los receptores clásicos a cannabinoides. Aunque no ha sido aislado, se sabe que este receptor debe estar acoplado a Gi/o, por lo cual se trataría de un receptor acoplado a proteína G de manera similar a los receptores CB₁ y CB₂ (Hoi y Hiley, 2006; López-Miranda *et al.*, 2008; Bondarenko, 2014).

Se ha demostrado farmacológicamente la presencia del receptor eCB en humanos, conejo, rata y bovinos. En sistema vascular se ha localizado el receptor eCB en arteria mesentérica, aorta, arteria pulmonar y arteria oftálmica (Stanley y O'Sullivan, 2014).

Gran parte de la justificación de la existencia del receptor eCB procede de múltiples ensayos farmacológicos sobre los efectos vasodilatadores de diferentes cannabinoides que demuestran actividad distinta a la observada en receptores CB₁ y CB₂. Así, se ha demostrado que la anandamida y metanandamida, en arteria mesentérica, generan vasodilatación que no es causada por otros cannabinoides sintéticos o THC de conocida acción sobre CB₁ o CB₂ (López-Miranda *et al.*, 2008). Aunque estos efectos pueden ser inhibidos por rimonabant, se requieren concentraciones más altas de las necesarias para inhibir CB₁. Además, el receptor eCB debe tener en su estructura un sitio de unión que no se encuentra en receptores CB₁ y CB₂ a cannabidiol anormal (Jarai *et al.*, 1999; López-Miranda *et al.*, 2008; Stanley y O'Sullivan, 2014). El cannabidiol anormal es un regioisomero sintético del cannabidiol y que resulta de la transposición de los grupos hidroxilo y n-pentilo encontrados de forma natural en el cannabidiol (Jarai *et al.*, 1999). La activación del receptor eCB por cannabidiol anormal y anandamida ha sido confirmada por numerosos estudios en diferentes preparaciones vasculares (Jarai *et al.*, 1999; López-Miranda *et al.*, 2008; Stanley y O'Sullivan, 2014).

Los endocannabinoides que han sido asociados a la vasodilatación inducida por activación del receptor eCB incluyen, además de la anandamida, a NADA, oleamida, OEA, ARA-S, N-araquidonoilglicina, noladina éter y virhodamina. Finalmente, el compuesto O-1918 ha sido propuestos y utilizados como antagonistas característico (y específico) del receptor eCB (Hoi y Hiley, 2006; Hiley y Hoi, 2007; López-Miranda *et al.*, 2008; Montecucco y Di Marzo, 2012; Stanley y O'Sullivan, 2014). Los mecanismos de vasodilatación asociados a la activación de eCB involucran la liberación de un factor hiperpolarizante derivado de endotelio, la modulación de canales de potasio sensibles a calcio de tipo BK y la producción de NO (Jarai *et al.*, 1999; Herradón *et al.*, 2007; McCollum *et al.*, 2007; Montecucco y Di Marzo, 2012; Stanley y O'Sullivan, 2014).

En estudios previos, se ha propuesto que el receptor eCB está acoplado a proteínas G y que cuando es activado estimula a la sGC, incrementando la concentración intracelular de GMPc y la activación de la PKG. También, se ha demostrado que en células endoteliales de aorta de conejo, la activación de eCB

produce la activación de Akt, la fosforilación de eNOS y la producción de NO, mediante la activación de la proteína Gi y la fosfatidilinositol 3-cinasa (McCollum *et al.*, 2007; López-Miranda *et al.*, 2008; Stanley y O'Sullivan, 2014).

2.3.2 Canales TRP

Los canales TRP se encuentran entre los canales iónicos más ampliamente distribuidos y diversos en el reino animal, únicamente superados en cuanto a diversidad por la superfamilia de los canales de potasio, con los cuales guardan similitud estructural. En mamíferos, esta superfamilia comprende 28 tipos distintos de subunidades, agrupadas en seis subfamilias en función de su homología en secuencia de aminoácidos (Liao *et al.*, 2013; Earley y Brayden, 2015; Taberner *et al.*, 2015). Estas seis subfamilias incluyen a las familias TRPC (canónica), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPA (ankirina), TRPML (mucopilina) y TRPP (policistina). Algunos integrantes de cada una de estas familias pueden encontrarse tanto en el músculo liso como en el endotelio vascular por lo que pueden causar relajación o contracción de los vasos sanguíneos (Earley y Brayden, 2015).

Los canales TRP son canales catiónicos no selectivos con estructuras homoo o heterotetraméricas, donde cada subunidad, de entre 64 y 230 kDa, está formada por seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un loop reentrante entre S5 y S6 que constituye el poro del canal. Los extremos C-terminal y N-terminal, ubicados intracelularmente, difieren entre los miembros de la superfamilia de canales TRP en cuanto a organización de motivos estructurales como repeticiones de ankirina o dominios con actividad cinasa, por mencionar un par de ejemplos (Cao *et al.*, 2013b; Liao *et al.*, 2013; Earley y Brayden, 2015).

Entre las diferentes familias de canales TRP, se incluyen a los canales TRPA (ankirina), cuyo único miembro es el canal TRPA₁, y los canales TRPV (vaniloide), dentro de la cual se encuentran los canales TRPV₁. Tanto los TRPA₁ como los TRPV₁ son canales catiónicos no selectivos, pero son preferentemente permeables a calcio. En términos generales, estos canales tienen múltiples funciones que incluyen la sensación térmica, la homeostasis de la temperatura corporal, el dolor y

la regulación de la función vascular (Di y Malik, 2010; Earley y Brayden, 2015; Taberner *et al.*, 2015).

El canal TRPV₁ se expresa principalmente en el sistema nervioso periférico, por ejemplo, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, ganglios trigeminal y torácico vagal, y en fibras sensoriales C y A δ . Sin embargo, también se ha localizado en músculo liso vascular y en endotelio vascular de rata, ratón y humano (Salazar *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012).

Los canales TRPA₁ han sido identificados en endotelio vascular humano y de otros mamíferos. También, estos canales han sido localizados en fibras sensoriales C y A δ y en muchas regiones del sistema nervioso. De hecho, el 60-75% de estas fibras expresan tanto a los canales TRPA₁ como a los TRPV₁. La presencia de ambos tipos de canal en la vasculatura sugieren que TRPA₁ y TRPV₁ participan activamente en el control vascular por mecanismos directos e independientes de la participación neurogénica (Salazar *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012; Aubdool *et al.*, 2016).

Los canales TRP pueden ser activados por una gran variedad de estímulos que incluyen temperatura, presión, voltaje, pH, radiación ultravioleta, cambios en la osmolalidad y una gran variedad de moléculas naturales (Taberner *et al.*, 2015). En particular, los canales TRPA₁ y TRPV₁ pueden ser activados por alicina, compuesto irritante de la cebolla y el ajo (Macpherson *et al.*, 2005). Además, los canales TRPV₁ pueden ser activados por alcanfor, de manera irreversible, o por capsaicina, de manera reversible, y mediante un mecanismo dependiente de calcio-calmodulina o por cinamaldehído. Además, se ha observado que los canales TRPV₁ pueden ser activados por cambios de pH intra o extracelular, zingerona, piperina, veneno de algunas especies de cnidarios, cannabinoides y endocannabinoides (Anandamida, NADA, OLDA). En el caso del TRPA₁ también puede ser activado por H₂S, tetrahidrocanabinol, estrés oxidativo, isotiocianatos, acroleína o por activación de fosfolipasa C (Di y Malik, 2010; Eberhardt *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2014; Darré y Domene, 2015; Taberner *et al.*, 2015; Aubdool *et al.*, 2016).

Además de los ligandos mencionados, los canales TRP también pueden ser activados por compuestos de naturaleza lipídica (endógenos o exógenos). En el

caso de los lípidos endógenos, algunos de ellos forman parte de vías metabólicas como la ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX), citocromo P450 (CYP) y lípidos importantes como los fosfolípidos y lisofosfolípidos, el colesterol, el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), ácido araquidónico y los endocannabinoides como la anandamida. Por tanto, los canales TRP son capaces de integrar e interpretar señales de diferentes rutas metabólicas (Taberner *et al.*, 2015).

Tanto los canales TRPA₁ como los TRPV₁ participan en el control vascular, ya sea a través de una respuesta neurogénica de las fibras sensoriales o través de una respuesta directa sobre la vasculatura. La modulación de los receptores TRPV₁ puede ocurrir a través de la activación de múltiples receptores, como por ejemplo, por la activación de receptores con actividad de tirosina cinasa o receptores acoplados a proteínas G (q o s), PKC, PKA o PLC, por mencionar algunos. Estas interacciones convierten a los canales TRP en integradores de señales altamente dinámicos, cuya actividad depende del contexto celular en un momento dado (Earley y Brayden, 2015; Paulsen *et al.*, 2015; Taberner *et al.*, 2015).

Los canales TRPV₁ también están relacionados con el efecto hipotensor de anandamida, en parte debido a que inducen un aumento en la liberación de NO y debido a que la activación de estos canales inducen la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Fernandes *et al.*, 2012; Hopps *et al.*, 2012). La activación por anadamida de los canales TRPV₁ ocurre directamente en neuronas nociceptivas, permitiendo la entrada de calcio y facilitando la despolarización de neuronas, lo cual juega un papel clave en procesos de modulación de hiperalgesia térmica y dolor (López-Miranda *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009).

Los canales TRPA₁ vasculares también pueden ser activados por HNO, produciendo la liberación del CGRP, lo cual induce el proceso de vasodilatación. Por esta razón, se ha relacionado al NO y especies reactivas de nitrógeno, dentro de las que se incluye al nitroxilo, en la relajación vascular mediada por TRPA₁ (Eberhardt *et al.*, 2014; Aubdool *et al.*, 2016).

Los mecanismos endógenos para mantener el tono vascular son sumamente variados y muchos de ellos han sido blanco de fármacos para el control

de patologías vasculares como la hipertensión. Sin embargo, algunas de las estrategias fallan cuando se emplean tratamientos crónicos. El estudio del sistema endocannabinoide y de los canales TRP, permitirá generar nuevas estrategias terapéuticas a las existentes. Una estrategia para la búsqueda de moléculas bioactivas nuevas se apoya en la medicina tradicional de todo el mundo. Una planta empleada en la medicina tradicional mexicana, conocida como chilcuague contiene moléculas que pueden ser potencialmente utilizadas para la activación del sistema endocannabinoide y/o canales TRP. Estas moléculas son conocidas como alcanidas y producen un importante efecto vasodilatador que tiene el potencial de ser empleado como alternativa terapéutica viable para patologías como la hipertensión (Castro-Ruiz *et al.*, 2017; de la Rosa-Lugo *et al.*, 2017).

2.4 Alcanidas

La medicina tradicional proveniente de múltiples culturas en todo el mundo ha empleado una gran variedad de plantas para el tratamiento de diferentes enfermedades cardiovasculares. El estudio sistemático de estas plantas ha llevado a la identificación de moléculas con potencial aplicación en la terapéutica de estas enfermedades (Anwar *et al.*, 2016).

Dentro de las sustancias con potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares destacan las alcanidas, sustancias que de acuerdo a sus propiedades, podrían constituir una valiosa estrategia contra estas enfermedades (García *et al.*, 2016; Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

Las alcanidas pueden definirse como amidas de ácidos grasos de 9 a 18 carbonos; típicamente poseen al menos un doble enlace y en ocasiones pueden incluir triples enlaces (Figura 11). Además, existen alcanidas que poseen únicamente dobles enlaces (alcanidas oleofínicas) o triples enlaces (alcanidas acetilénicas) (Greger, 1984). El nitrógeno, que define al grupo amida, habitualmente se encuentra sustituido con al menos un grupo metilo. Por otro lado, ambas cadenas hidrocarbonadas pueden contener grupos funcionales diversos como sistemas heterocíclicos, aromáticos, cíclicos, etc. (Greger, 1984; Boonen *et al.*, 2012).

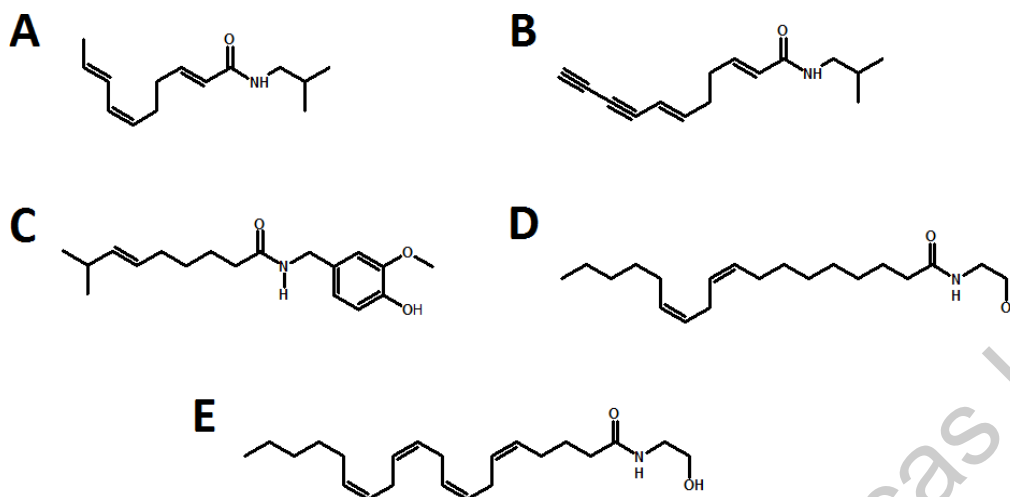


Figura 11. Estructuras representativas de alcaloides de origen vegetal o animal. A) (2E,6Z,8E)-N-isobutildeca-2,6,8-trienamida (afinina), B) (2E,5Z)-N-isobutylundeca-2,5-dien-8,10-dienamida, C) (6E)-N-[(4-Hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metilnon-6-enamida (capsaicina), D) N-linoleoil etanolamina y E) N-(2-hidroxi-etil)-(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenamida (anandamida).

Las alcaloides son generadas por una gran variedad de organismos de los reinos Fungi, Plantae, Animalia. En el reino Fungi, se ha descrito la presencia de alcaloides en los géneros *Claviceps*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Greger, 1984; Molina-Torres *et al.*, 1999; Boonen *et al.*, 2012). En plantas se han encontrado, hasta en 26 familias diferentes comprendiendo alrededor de 100 especies de plantas. Debido a la gran diversidad de compuestos pertenecientes a las alcaloides, se han realizado esfuerzos para organizar la información relevante de estos compuestos en una base de datos que facilite el manejo de la información (Boonen *et al.*, 2012).

Dentro de las alcaloides del reino animal se puede incluir a la anandamida (N-(2-hidroxi-etil)-(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenamida), la cual ha sido clasificada como endocannabinoide clásico y paralelamente se considera dentro de la categoría de alcaloides no proveniente de plantas. Dentro de la categoría de alcaloides también se puede incluir a la capsaicina y capsaicinoides provenientes del género *Capsicum*, debido a que de acuerdo a la definición funcional y

estructural, los capsaicinoides tienen similitudes estructurales con las alcanidas y blancos moleculares específicos (Boonen *et al.*, 2012).

Aunque pueden ser generadas por diferentes organismos, la principal fuente de alcanidas son las plantas. Estos compuestos se han aislado de raíces, flores y en ocasiones de hojas de plantas de la familia Asteraceae, especialmente de las tribus Heliantheae y Anthemideae. En la familia Asteraceae han sido aisladas alcanidas, exclusivamente oleofínicas o acetilénicas. Las tribus Athemideae y Heliantheae cuentan con la mayor diversidad de alcanidas por especie (99 estructuras en 33 especies y 15 estructuras en 13 especies, respectivamente), aunque también han sido descritos compuestos exclusivamente oleofínicos en las familias Piperaceae, Aristolochiaceae y Rutaceae. Se ha especulado que la gran diversidad de plantas capaces de generar alcanidas puede ser indicativo de que las alcanidas podrían tener funciones protectoras para dichas plantas (Greger, 1984; Molinotorres *et al.*, 1996; Molina-Torres *et al.*, 1999).

Muchas de las plantas que poseen alcanidas han sido utilizadas desde tiempos inmemoriales con fines medicinales en todo el mundo para tratar padecimientos como dolor dental, tos, bronquitis, trastornos de la piel, enfermedades gástricas y disfunciones sexuales (Greger, 1984; Boonen *et al.*, 2012). Todas las plantas de la familia Asteraceae son utilizadas por su efecto analgésico en la medicina tradicional mesoamericana, mediterránea, africana, medio oriental y asiática. Estas plantas presentan características similares en cuanto a su sabor, inducción de salivación, acción analgésica entre otras (Cilia-López *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2013). Las plantas, *Heliopsis longipes* y *Spilanthes oleracea*, destacan debido a que en ellas se describió a una de las primeras alcanidas y la más ampliamente estudiada, la afinina (Acree *et al.*, 1945; Boonen *et al.*, 2010).

2.4.1 Afinina en el reino vegetal

La afinina o spilanthol, cuyo nombre IUPAC es (2E,6Z,8E)-N-isobutil decatrienamida, es un compuesto originalmente extraído de la especie vegetal *H. longipes*, la cual ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana durante cientos de años. El término afinina fue asignado debido a que la planta fue identificada originalmente como *Erigeon affinis* DC. Sin embargo, las raíces de esta planta fueron erróneamente identificadas en el trabajo original (Acree *et al.*, 1945). Aunque posteriormente fueron correctamente nombradas como pertenecientes a *Heliopsis longipes*, el término afinina siguió utilizándose para designar a este compuesto (Molina-Torres *et al.*, 1999; García-Chávez *et al.*, 2004; Cilia-López *et al.*, 2013).

Además de *H. longipes* la presencia de afinina se ha descrito en *Spilanthus oleracea* y en una gran cantidad de especies pertenecientes a la Familia Asteraceae (Molinatorres *et al.*, 1996; Molina-Torres *et al.*, 1999). En cuanto a su presencia en otras familias, la información es variable, ya que existen varios reportes en los que se describe su presencia en las familias Aristolochiaceae, Piperaceae y Rutaceae. Otros autores la incluyen también en las familias Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Poaceae y Solanaceae (Greger, 1984; Cilia-López *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2016).

Se ha descrito la presencia de afinina en varios miembros del género *Heliopsis* (*H. scabra* Dunal, *H. parvifolia*, *H. gracilis* Nutt y *H. longipes*). En el género *Spilanthus* se ha identificado la presencia de este compuesto en las especies *S. mauritiana*, *S. alba*, *S. ocymifolia*, *S. oleracea* y *S. acmella*. En el género *Acmella* se ha reportado su presencia en *A. ciliate*, *A. oppositifolia*, *A. radicans*, *A. brachyglossa*, *A. oleracea*, *A. paniculata* y *A. uliginosa*. Además, la afinina constituye el compuesto bioactivo principal de la raíz de *H. longipes*, *Wedelia parviceps*, *Acmella ciliata*, *A. oleracea*, *A. oppositifolia* (Dubey *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2016). Todas estas plantas se utilizan con fines terapéuticos y culinarios en distintas regiones del mundo.

2.4.2 Usos terapéuticos de plantas productoras de afinina

Las plantas productoras de afinina han sido utilizadas dentro de la medicina tradicional de muchas culturas en todo el mundo para tratar distintos padecimientos (Boonen *et al.*, 2010; Cilia-López *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2013). *Spilanthes acmella* ha sido utilizada en Sumatra para tratar el dolor dental y como estimulante; en Java para tratar estomatitis; en Sudán para el tratamiento del dolor dental; en India para tratar heridas, dolor dental, antiinflamatorio, astringente y antianémico y en Camerún para tratar mordeduras de serpiente y reumatismo articular (Pradesh *et al.*, 2010; Pharm *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2013). En Brasil, se ha empleado *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen como tratamiento de la anemia y la dispepsia, así como especia en alimentos (Simas *et al.*, 2013). En el mediterráneo, *Otanthus maritimus* se ha utilizado para tratar la bronquitis asmática, disentería e inflamación de vías urinarias (Ruiu *et al.*, 2013). En México, *H. longipes* se ha empleado como condimento de alimentos, así como para el tratamiento de diferentes padecimientos como el dolor dental, estomatitis, enfermedades de la piel, antiparasitario, antiinflamatorio, analgésico y úlceras orales (Molina-Torres *et al.*, 1999; García-Chávez *et al.*, 2004; Colvard *et al.*, 2006; Boonen *et al.*, 2010; Cariño-Cortés *et al.*, 2010).

Curiosamente, la medicina tradicional no ha considerado el empleo de estas plantas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se ha demostrado que los extractos clorofórmicos de *Spilanthes acmella* inducen relajación, dependiente de endotelio, en ensayos de aorta aislada de rata, parcialmente disminuida con L-NAME, sugiriendo que la afinina (y/o otros componentes de los extractos clorofórmicos de *S. acmella*) estimula la producción de NO endotelial, mediante la activación de la eNOS (Wongsawatkul *et al.*, 2008). De manera adicional, se ha sugerido que los extractos etanólicos de *Acmella oleracea* producen un efecto analgésico, que involucra la activación de canales TRPA₁ y TRPV₁ (Ogata Nomura *et al.*, 2013). Por otro lado, los extractos de diclorometano de *H. longipes* son capaces de inducir vasodilatación, parcialmente dependiente de endotelio, en aorta aislada de rata como consecuencia de la aparente activación de múltiples vías de señalización que incluyen las de los

gasotransmisores NO, H₂S y CO como parte de su mecanismo vasodilatador (Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

En la actualidad existen diversos productos que contienen extractos de plantas productoras de afinina, principalmente *Spilanthes acmella* para uso cosmético y analgésico en pastas dentales (Buccaldol[®], Indolphar[®]), antiarrugas (Gatuline[®], Syn-Coll[®]) e infecciones dérmicas micóticas (A. Vogel Spilanthes[®]) y se han hecho esfuerzos para mejorar la penetración de la afinina en formulaciones tópicas (Boonen *et al.*, 2010; Spiegeleer *et al.*, 2013). Además, se han realizado esfuerzos para determinar la capacidad de la afinina para atravesar la barrera hematoencefálica y la mucosa intestinal para un potencial uso como analgésico de administración oral (Veryser *et al.*, 2016) y se ha demostrado que extractos etanólicos de *H. longipes* no generan daños genotóxicos ni citotóxicos (Boonen *et al.*, 2010; Cariño-Cortés *et al.*, 2010; Spiegeleer *et al.*, 2013; Veryser *et al.*, 2016).

En México, la principal planta productora de afinina, utilizada en la medicina tradicional mexicana es *Heliopsis longipes*. Comúnmente conocida con los nombres de chilcuague, raíz azteca, raíz dorada, chilicuau, chilcuan, pelitre entre otras. *H. longipes* se encuentra distribuida en la zona serrana de los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro (Molina-Torres *et al.*, 1999; García-Chávez *et al.*, 2004; Cilia-López *et al.*, 2010; Cilia-López *et al.*, 2013).

Uno de los primeros efectos biológicos encontrados en la afinina es la actividad insecticida (Acree *et al.*, 1945); sin embargo, se han descrito una gran cantidad de actividades entre las que se puede mencionar su efecto antimicrobiano, fungistático (Molina-Torres *et al.*, 1999; García-Chávez *et al.*, 2004), antinociceptivo (Ogura *et al.*, 1982; Déciga-Campos *et al.*, 2010), analgésico (Rios *et al.*, 2007; Cilia-López *et al.*, 2010), antiinflamatorio (Hernández *et al.*, 2009), antiarrugas, antienvjecimiento, anticanceroso (Barbosa *et al.*, 2016) y antimalárico (Spelman *et al.*, 2011). Además, se ha reportado actividad biocida contra moluscos, moscas, hongos y mosquitos (Cariño-Cortés *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2016). También, se le han adjudicado propiedades espermicidas, aunque también se ha observado que los extractos de *Anacyclus pyrethrum* poseen propiedades espermatogénicas y androgénicas, posiblemente atribuibles a alcanidas distintas a la afinina (Sharma

et al., 2013; Barbosa *et al.*, 2016). Un efecto notable que han mostrado las alcanmidas en lo general y la afinina en lo particular es la posibilidad de actuar como moduladores del sistema endocanabinoide en mamíferos, teniendo el potencial de actuar como agonistas de este sistema y producir efectos biológicos importantes entre los que destacan la posibilidad de inducir vasodilatación por activación de receptores a cannabinoides (Raduner *et al.*, 2006; Ruiu *et al.*, 2013).

2.4.3 Mecanismos de acción involucrados en el efecto vasodilatador producido por afinina

Una de las características más notables de las alcanmidas es su capacidad de ejercer acción cruzada con los endocannabinoides en general y con la anandamida en particular. Por esta razón, las alcanmidas obtenidas de distintas fuentes pueden actuar como ligandos de los receptores a cannabinoides o de otras proteínas que pueden ser activadas por endocannabinoides (Raduner *et al.*, 2006; Ruiu *et al.*, 2013).

Por ejemplo, se ha descrito que diversas alcanmidas tienen la capacidad de actuar como agonistas de receptores CB₁ y/o CB₂. Raduner *et al.* (2006) describieron que las alcanmidas (2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*)-dodecatetraenoilisobutilamida y (2*E*,4*E*)-dodecadienoilbutilamida pueden unirse de manera más específica que la anandamida a receptores CB₁ y CB₂. Especialmente, la (2*E*,4*E*)-dodecadienoilbutilamida parece tener una mayor afinidad por el receptor CB₂ en células HL60. De manera adicional, se mostró que estas dos alcanmidas son capaces de activar los receptores CB₁ y CB₂ (Raduner *et al.*, 2006). Ruiu *et al.* (2013) demostraron que la alcanmida [(2*E*,4*E*,8*Z*)-tetradecatrienoil]piperidina, extraída de *Otanthus maritimus*, puede unirse a receptores CB₂ y mediante estudios *in silico* describieron el posible sitio de unión a estos receptores (Ruiu *et al.*, 2013).

Por otro lado, la anandamida incrementó, de una manera dependiente de endotelio, la relajación de aortas aisladas obtenidas de ratas hipertensas. Esta vasodilatación fue sensible a capsaicina, sugiriendo la participación de canales TRP localizados en los nervios sensoriales (Stefano, 2000; Wheal y Randall, 2009;

Hopps *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha observado que el efecto vasodilatador de la anandamida es insensible a la inhibición de NOS con L-NAME (Randall *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha demostrado que la afinina puede incrementar los niveles de GMPc y la activación de canales de potasio dependientes de ATP en la respuesta antinociceptiva de la afinina, sugiriendo la participación de NO (Déciga-Campos *et al.*, 2010).

En otros estudios, se ha demostrado que la activación de canales TRPV₁ por anadamida ocurre directamente en neuronas nociceptivas, permitiendo la entrada de calcio y facilitando la despolarización de neuronas, lo cual juega un papel clave en procesos de modulación de hiperalgesia térmica y dolor (López-Miranda *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). De manera similar a la anandamida, la relajación inducida por cis-oleoamida se ve disminuida por desensibilización de los canales TRPV₁, presentes en nervios perivasculares, los cuales causan la liberación del CGRP, el cual produce vasodilatación (Hoi y Hiley, 2006). La inhibición de estos receptores con capsaicina también inhibe la liberación de CGRP en arterias basilar, hepática y mesentérica de rata (Randall *et al.*, 2002). Se ha sugerido recientemente que la afinina, la longipinamida A, la longipenamida A y la longipenamida B, extraídas de *H. longipes*, son capaces de activar los canales TRPV₁ en ensayos de nocicepción. Así mismo, se propuso que estas alcanmidas se unen al mismo sitio de unión que la capsaicina (de la Rosa-Lugo *et al.*, 2017). Por otro parte, se ha demostrado que las riparinas, alcanmidas obtenidas a partir de *Aniba riparia* tienen un efecto vasodilatador en arteria mesentérica de ratón. Este efecto involucra la participación de canales de calcio tipo L y canales catiónicos no selectivos, sugiriendo la participación de canales TRP en el mecanismo vasodilatador de las riparinas (García *et al.*, 2016). Finalmente, se ha descrito que la alcanmida *trans*-pelitorina, obtenida de la pimienta negra (*Piper nigrum*) puede activar canales TRPA₁ y TRPV₁ mediante uniones covalentes y no covalentes (Lieder *et al.*, 2017).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que la afinina puede inducir vasodilatación en aorta aislada de rata. Este efecto involucra la participación de las vías del NO/GMPc, H₂S/K_{ATP} y CO/GMPc, así como la vía de señalización de las prostaciclinas (PGI₂/AMPc). Una consecuencia importante de la participación de

estas vías es que involucran un incremento de calcio endotelial, sugiriendo la participación de canales TRP en el mecanismo vasodilatador de la afinina (Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

Además de la posible participación de H₂S y NO en el mecanismo de acción de las alcamidas, es posible suponer que pueda existir una modulación de los canales TRPA₁ por la acción de nitroxilo (HNO), el cual es producido endógenamente, mediante la reacción del H₂S y del NO. La activación de canales TRPA₁ produce la liberación del CGRP, el cual induce vasodilatación (Eberhardt *et al.*, 2014).

Debido a todo lo anterior, en este trabajo nos proponemos determinar la participación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, los receptores a cannabinoides y los canales TRP en el efecto vasodilatador producido por la afinina.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las vías bioquímicas de señalización y los blancos moleculares que están involucrados en el efecto vasodilatador producido por la afinina?

4. HIPÓTESIS

El efecto vasodilatador producido por la afinina involucra la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, los receptores a cannabinoides y los canales TRP.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si el efecto vasodilatador inducido por la afinina en la aorta involucra la participación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, los receptores a cannabinoides y los canales TRP.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar si la afinina produce su efecto vasodilatador, mediante un incremento en los niveles de NO y H₂S, utilizando técnicas bioquímicas.
2. Evaluar la participación de los canales TRP (A₁ y V₁) en el efecto vasodilatador producido por afinina, mediante el ensayo de aorta aislada de rata e inhibidores específicos de estos canales.
3. Determinar si la afinina produce su efecto vasodilatador, mediante el incremento en los niveles de nitroxilo (HNO), utilizando el ensayo de aorta aislada de rata.
4. Evaluar la participación del sistema cannabinoide (CB₁, CB₂ y FAAH) en el efecto vasodilatador producido por afinina, mediante el ensayo de aorta aislada de rata e inhibidores específicos de estos blancos moleculares.
5. Evaluar si el efecto vasodilatador de la afinina involucra el bloqueo de los canales de calcio voltaje dependientes tipo L, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata.
6. Proponer un modelo de interacción molecular entre la afinina y los canales TRP (A₁ y V₁) y el receptor a cannabinoide CB₁.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales de experimentación

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la norma 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). Los animales de experimentación se adquirieron en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Se mantuvieron durante 24-48 horas en un espacio especial para mantenimiento temporal de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999 apartado 6.1) en la planta baja del edificio 2 de la Facultad de Química de la UAQ. El almacenamiento de los animales se realizó en jaulas de acrílico en condiciones de agua y alimento *ad libitum* (NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.1) (SAGARPA, 2001). Los residuos peligrosos biológico infecciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 por un periodo no mayor a 30 días antes de su disposición final conforme a las normativas pertinentes. (PROFEPA, 2003).

6.2 Preparación de las muestras

Las ratas Wistar macho (275-325 g) fueron sacrificadas por decapitación utilizando una guillotina (NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.5.3.3) (SAGARPA, 2001). Posteriormente, se extrajo la aorta torácica descendente, la cual se colocó en una solución fría de Krebs-Henseleit para aorta. A partir de ella, se cortaron anillos de 4 a 5 mm para los ensayos de aorta aislada de rata.

Para la preparación de los homogenados, las muestras de aorta se homogenizaron con PBS a pH 7.4 y se centrifugaron a 10,000 x g por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó el sobrenadante a 100,000 x g por 30 minutos y se filtraron, usando filtros que permiten el paso de moléculas de 10 a 30 kDa (Amicon).

6.3 Ensayos de actividad enzimática

6.3.1 Producción de nitritos totales en homogenados de aorta de rata

Los cambios en la producción de NO inducida por la estimulación de los anillos aórticos con afinina o ACh fue evaluada indirectamente a través de la cuantificación de nitritos totales, los cuales son producidos por la degradación del NO. Para ello, los anillos aórticos fueron homogeneizados en buffer de fosfatos 100 mM (pH 7.4) con inhibidor de proteasas (Tabletas libres de EDTA, Sigmafast protease inhibitor cocktail). Las muestras de homogenados fueron incubadas con afinina 135 μ M o ACh 58.8 μ M (control positivo) y posteriormente centrifugadas a 16945 x g por 15 minutos a 4 °C. La concentración de proteína fue determinada mediante el método de Bradford (Sigma, cat. B6916) sobre el sobrenadante recuperado. Los nitritos totales fueron determinados empleando el ensayo colorimétrico “Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit” (Cayman Chemical. Item: 780001. Batch: 0584154) conforme a las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron expresados como μ mol/ μ g de proteína.

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

Los cambios en la producción de H₂S inducidos por la estimulación de anillos aórticos con afinina fue determinada de acuerdo a reportes previos con algunas modificaciones (Brancaleone *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2018). De manera breve, los anillos de aorta fueron homogeneizados en un buffer helado de lisis (buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.4 e inhibidor de proteasas Sigmafast). Después de la incubación con afinina o ACh, los extractos fueron centrifugados a 16945 x g durante 15 minutos a 4°C y se determinó la concentración de proteína presente en los sobrenadantes recuperados, empleando el método de Bradford (Sigma, cat. B6916). Posteriormente, los homogenados (300 μ L) fueron complementados con 50 μ L de piridoxal-5-fosfato 2 mM, L-cisteína 10 mM y afinina 0.135 mM o ACh 58.8 μ M (control positivo). La reacción se realizó empleando un

tubo central con un papel filtro saturado con acetato de zinc 1% y el sistema fue sellado con un tapón de goma. La reacción fue iniciada por transferencia del sistema completo desde el baño de hielo a la incubadora a 37°C con ligera agitación. Después de 90 minutos de incubación, la reacción fue detenida empleando 500 µL de ácido tricloroacético 10% y nuevamente incubada durante 60 minutos. Posteriormente, el tubo central fue removido del recipiente y se agregaron 200 µL de agua destilada, sulfato de *N,N*-dimetilfenilendiamina (20 mM, 150 µL) en HCl 7.2 M y FeCl₃ (30 mM, 150 µL) en HCl 1.2 M. Finalmente, la absorbancia de las soluciones fue medida después de 20 min a una longitud de onda de 670 nm. Todas las concentraciones de H₂S se calcularon frente a una curva de calibración de NaHS (de 0 a 100 µM). Los resultados se expresaron como µmol/µg de proteína.

6.4 Determinación del efecto vasodilatador

6.4.1 Preparación de las muestras problema

Se prepararon soluciones concentradas de afinina. Posteriormente, se realizaron disoluciones correspondientes para obtener las concentraciones deseadas en las cámaras de tejido aislado (1 a 1,000 µg/mL). Las soluciones concentradas de afinina se prepararon empleando una solución de carboximetilcelulosa (CMC) 1%. Las subsiguientes diluciones de todas las sustancias de prueba se prepararon en agua desionizada.

6.4.2 Ensayo de aorta aislada de rata

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 estabilizó durante 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).

Las diferentes sustancias de prueba se evaluaron en un intervalo de concentraciones de 1 a 1,000 μ g/mL. 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 las sustancias de prueba en la aorta se registró durante un período de 10 min y los cambios en la tensión producidos por las sustancias fueron detectados mediante el empleo de los transductores de fuerza. Las respuestas se expresarán como el porcentaje de relajación, tomando como base la contracción alcanzada al adicionar la fenilefrina.

6.4.3 Participación del endotelio en la respuesta vasodilatadora de la afinina

Para evaluar la participación del endotelio en las respuestas relajantes inducidas por las sustancias de prueba, se realizaron los ensayos conforme a lo descrito en el apartado anterior, pero sin endotelio. Para llevar a cabo estos experimentos, el endotelio de los anillos aórticos fue removido empleando una solución de desoxicolato de sodio 1%. La eliminación del endotelio se realizó con ayuda de una jeringa y una aguja hipodérmica sin bisel; se inyectaron lentamente 2 mL de la solución a través de uno de los extremos de la arteria, enseguida se cambió la arteria a una nueva caja Petri con solución Krebs fresca y se volvieron a inyectar 2 mL de solución Krebs. Finalmente, la arteria fue cortada en anillos y montada en cámaras de incubación como se describe en la sección anterior. Para confirmar la ausencia de endotelio se tomaron aquellos anillos cuya relajación inducida por

acetilcolina fue menor al 5%. La afinina se evaluó en un intervalo de concentraciones de 1-1000 $\mu\text{g/mL}$. Las diferentes concentraciones se adicionaron a las cámaras de incubación y se registró la respuesta inducida durante 10 minutos. Los cambios en la tensión, causados por diferentes concentraciones de los fármacos de prueba, fueron detectados empleando un transductor de fuerza Grass FT03 acoplado a un polígrafo Grass 7D. La vasodilatación se reportó como el porcentaje de relajación tomando como base la contracción generada por fenilefrina.

6.4.4 Evaluación de la participación de los canales TRPA₁ y TRPV₁ en la respuesta vasodilatadora de la afinina

La participación de los canales TRPA₁ y TRPV₁ se evaluó realizando una curva concentración respuesta de la afinina en presencia de los inhibidores HC-030031 (50 μM , inhibidor del canal TRPA₁) o BCTC 10 μM (inhibidor de canales TRPV₁) con y sin endotelio.

6.4.5 Participación del HNO y de la adenilato ciclasa en la respuesta vasodilatadora de la afinina

Para evaluar la participación del HNO en la respuesta vasodilatadora de la afinina, se incubaron anillos aórticos en ausencia y en presencia de L-cisteína (3 mM), un capturador del nitroxilo. Adicionalmente, para determinar la participación de la AC en el efecto vasodilatador producido por esta alcalamida, se incubaron segmentos de aorta en ausencia y en presencia de MDL-12133A, un inhibidor de la AC, y enseguida se adicionaron concentraciones crecientes de afinina de 1-1000 $\mu\text{g/mL}$.

6.4.6 Evaluación de la participación de los receptores CB₁ y CB₂ en la respuesta vasodilatadora de la afinina

Para evaluar la participación de los receptores CB₁ y CB₂, se realizó una curva concentración respuesta de la afinina en ausencia y en presencia de los inhibidores rimonabant (3 μM, inhibidor del receptor CB₁) o AM630 (10 μM, inhibidor del receptor CB₂) con y sin endotelio.

6.4.7 Participación otros blancos moleculares del sistema endocannabinoide en la respuesta inducida por afinina.

Se realizó una curva concentración respuesta de la afinina en anillos de aorta de rata con endotelio y pretratados con URB937 (3 μM, inhibidor de la hidrolasa de amidas de acidos grasos, FAAH). Adicionalmente, se confirmó la participación de proteínas G (asociadas a receptores a cannabinoides), mediante el empleo de suramina (100 μM, inhibidor inespecífico de proteínas G) y de galleina (100 μM, inhibidor del dímero βγ de proteínas G). Finalmente, se evaluó la participación de la PLC en el efecto vasodilatador de la afinina, preincubando anillos aórticos de rata con U73122 (100 μM, inhibidor de PLC).

6.4.8 Evaluación de la participación de los canales dependientes de voltaje tipo L en el efecto vasodilatador de la afinina

Para evaluar si la vasodilatación inducida por afinina implicaba el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (LVCC) presentes en el músculo liso vascular, se estabilizaron los anillos aórticos sin endotelio en solución de Krebs-Henseleit. Luego, la solución se reemplazó con solución de Krebs-Henseleit libre de calcio (NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 30 mM y D-glucosa 5 mM; pH 7.4) y se indujo la contracción con KCl 60 mM. Posteriormente, se construyeron curvas concentración respuesta con CaCl₂

(1×10^{-6} M a 3.16×10^{-6} M) en ausencia (control) o presencia de afinina ($123.7 \mu\text{M}$) o verapamilo ($1 \mu\text{M}$, control positivo).

6.5 Ensayos de acoplamiento molecular utilizando farmacología *in silico*

Estos ensayos permitieron identificar los residuos clave involucrados en el modo de unión de la afinina a los canales TRPA₁, TRPV₁ y CB₁; la información obtenida puede ser utilizada para el diseño posterior de nuevas moléculas bioactivas.

6.5.1 Preparación de los ligandos

Para los ensayos *in silico*, se construyeron los ligandos necesarios para la interacción con cada uno de los receptores en estudio (anandamida para CB₁, capsaicina para TRPV₁ y afinina para TRPA₁, TRPV₁ y CB₁). Los ligandos se construyeron usando el modulo de construcción de moléculas incluido en el visualizador Schrödinger-Maestro 11.0 (visualizador gráfico, <http://www.schrodinger.com>). Una vez construidos los ligandos, se procesaron mediante el programa *LigPrep* 2.5, para asignar los estados de protonación de los compuestos (pH = 7.0 ± 2.0). La quiralidad fue retenida en el proceso de preparación de los ligandos.

6.5.2 Preparación de las estructuras de los canales TRPA₁ y TRPV₁ y del receptor CB₁

La secuencia canónica completa de los canales TRPV₁ y TRPA₁ y del receptor CB₁ humano se obtuvo de la plataforma Uniprot (códigos Q8NER1, O75762, y P21554, respectivamente). Posteriormente, los canales y el receptor se modelaron utilizando el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang

et al., 2014). Las estructuras de los modelos completos generados de TRPV₁, TRPA₁ y CB₁ se alinearon con las respectivas estructuras cristalográficas de TRPV₁ (PDB: 3J5P) (Liao *et al.*, 2013), TRPA₁ (PDB: 3J9P) (Paulsen *et al.*, 2015) y CB₁ (PDB: 5TGZ) (Hua *et al.*, 2016), usando el programa Schrödinger-Maestro 11.0. Posteriormente, las modificaciones postraduccionales relevantes para la activación de los canales TRP se insertaron utilizando la plataforma CHARMM-GUI. Las modificaciones utilizadas fueron: para TRPA₁ [C621-C665 (Wang *et al.*, 2012), N147-GlcNAc, N747-GlcNAc (Uniprot, 2014) y fosforilación de S972 (Kádková *et al.*, 2017)], y para TRPV₁ [N604-GlcNAc (Uniprot, 2014) y fosforilación de T730, S502 y S800 (Oxford *et al.*, 2004)]. Cada blanco molecular fue sometido a una minimización de energía, seguida de diferentes simulaciones de posición restringida para finalmente llevar a cabo una simulación isotérmica-isobárica (NPT, 310.15 K y 1 atm), con la ayuda de gromacs 5.1.5 (Wang *et al.*, 2006) de 50 ns, usando acoplamiento de temperatura y cambio de escala de la velocidad con un término estocástico (Bussi *et al.*, 2007) y barostato Parrinello-Rahman (Parrinello y Rahman, 1981). Finalmente, las trayectorias se analizaron de acuerdo con la desviación media de la posición (RMSD) del carbono alfa para la agrupación de conformaciones. La conformación del grupo más grande de los últimos pasos de la trayectoria se utilizó para el acoplamiento molecular.

6.5.3 Acoplamiento molecular de la afinina con TRPA₁, TRPV₁ y CB₁.

Los cálculos de acoplamiento se realizaron utilizando el software Autodock 4.2.6 (Morris *et al.*, 2009), utilizando diferentes grid para cada proteína con un espaciado de 0.375 Å, generadas con AutoGrid 4.2.6. Para TRPA₁ (Grid 60x40x60 centrada en K710), para TRPV₁ (Grid 60x60x60 centrada en I569) y para CB₁ (Grid 70x65x70 centrada en F102). La selección de los grids mencionados, se basó por un lado, en simulaciones preliminares que sugerían que en estas regiones la afinina se une con menor energía y por otro lado debido a que estos aminoácidos están a 5 Å o menos de la ubicación de la afinina sugiriendo posibles interacciones ligando-receptor. El acoplamiento se realizó con un algoritmo genético Lamarkiano con búsqueda local

durante 25 corridas con 5,000,000 de evaluaciones de energía y 27.000 generaciones para cada corrida. Finalmente, se analizaron con Maestro las conformaciones con la mejor conformación de puntaje de acoplamiento.

6.6 Análisis estadístico

Se realizaron 6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de las sustancias de prueba. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM). Los datos experimentales generados en cada evaluación se ajustaron a una ecuación sigmoïdal 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 determinaron la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}).

Estos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey para evaluar los casos en los que las diferencias entre las medias fueron significativas ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 La afinina incrementa los niveles de NO en aorta de rata

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se demostró que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de la vía del NO/GMPc (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Para confirmar la participación de esta vía, se determinó si esta alcaloide induce el incremento en la producción de NO, mediante la cuantificación de los nitritos totales producidos en los anillos aórticos tratados con afinina (0.135 mM) o ACh (58.8 μ M, control positivo). En ausencia de estimulación, los homogeneizados de anillos aórticos producen 13.50 ± 0.76 μ mol de nitritos/ μ g de proteína (Figura 12). La afinina induce un incremento significativo ($p < 0.0001$) en la producción de NO en aorta (38.6 ± 0.86 μ mol de nitritos/ μ g de proteína), el

cual fue mayor al producido por la ACh (control positivo, 22.0 ± 0.84 μmol nitritos/ μg de proteína).

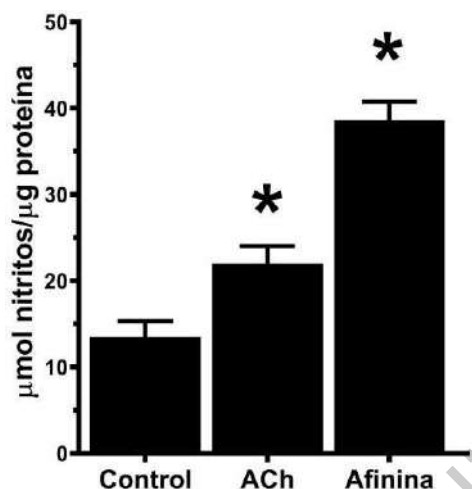


Figura 12. Evaluación de nitritos totales. Producción total de nitritos en extractos aórticos de rata en ausencia (control) y presencia de ACh o afinina (58.8 μM y 0.135 mM , respectivamente). Se observa un aumento significativo en la producción de nitritos inducida por afinina (38.6 ± 0.86 μmol de nitritos/ μg de proteína) y ACh (22.0 ± 0.84 μmol nitritos/ μg de proteína) en comparación con la producción basal (13.50 ± 0.76 μmol de nitritos/ μg de proteína). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.0001$.

Nuestros resultados muestran que la afinina provoca un aumento de 2.9 veces en la producción total de nitritos en comparación con los anillos aórticos sin tratamiento y 1.8 veces más que el observado en los anillos aórticos pretratados con ACh. Nuestros resultados confirman la participación de la vía del NO/GMPc en la vasodilatación producida por la afinina.

7.2 La afinina induce el incremento en los niveles de H_2S en aorta

Previamente, nuestro grupo de trabajo también demostró que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de la vía $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$ (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Para confirmar la participación de esta vía, se determinó la producción

de H₂S en anillos aórticos en ausencia y en presencia de afinina (0.135 mM) o ACh (58.8 μM, control positivo). En condiciones basales, los homogeneizados de anillos aórticos producen 55.15 ± 3.80 μmol de H₂S/μg de proteína (Figura 13). La afinina incrementó de manera significativa ($p < 0.0001$) los niveles de H₂S (189.0 ± 6.12 μmol de H₂S/μg de proteína), los cuales fueron mayores que los producidos por la ACh (control positivo, 88.21 ± 3.14 μmol H₂S/μg de proteína).

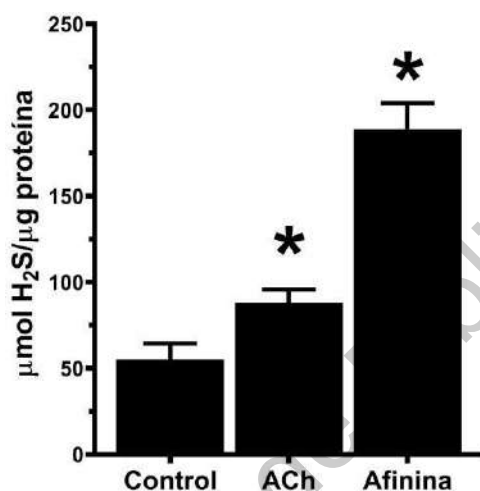


Figura 13. Evaluación de la producción de H₂S. Producción de sulfuros en homogenados aórticos de rata en ausencia (Control) y presencia de ACh o afinina (58.8 μM y 0.135 mM, respectivamente). Se observó un aumento significativo en la producción de H₂S en los anillos aórticos pretratados con afinina (189.0 ± 6.12 μmol de sulfuros/μg de proteína) en comparación con el control (55.15 ± 3.80 μmol de sulfuros / μg de proteína). Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (SEM) (n = 6); * $p < 0.001$.

De acuerdo con nuestros resultados, la afinina incrementa la producción de H₂S en alrededor de 3.4 veces que el observado en condiciones basales y alrededor de 2.1 veces más que el observado en presencia de ACh. Nuestros resultados confirman la participación de la vía del H₂S/K_{ATP} en el efecto vasodilatador producido por la afinina.

7.3 Participación de los canales TRP en el efecto vasodilatador de la afinina

Para determinar si los canales TRPA₁ y TRPV₁ están involucrados en el efecto vasodilatador de la afinina, se incubaron segmentos de aorta en ausencia y en presencia de HC-030031 (100 μM, un inhibidor específico de canales TRPA₁) o de BCTC (10 μM, un inhibidor específico de canales TRPV₁). La inhibición de ambos tipos de canales TRP redujo el efecto vasodilatador de la afinina de manera significativa, indicando que la respuesta vasodilatadora de la afinina involucra la activación de canales TRPA₁ y TRPV₁ presentes en aorta (Figura 14).

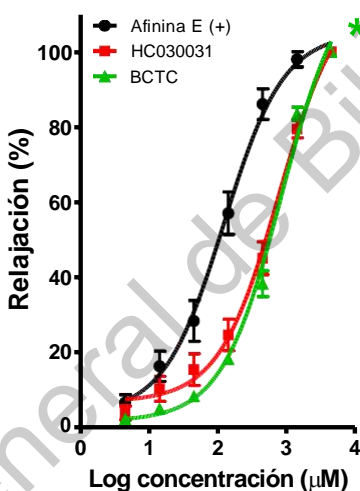


Figura 14. Participación de canales TRPA₁ y TRPV₁ en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de HC-030031 100 μM (inhibidor de canales TRPA₁, curva roja) o de BCTC 10 μM (inhibidor de canales TRPV₁, curva verde). Los valores están expresados como la media ± error estándar de la media (SEM) (n = 6); *p<0.0001.

Para determinar si los canales TRPA₁ y/o TRPV₁ se localizan en endotelio, en músculo liso o en ambos tejidos, se evaluó el efecto vasodilatador de la afinina

en anillos aórticos de rata sin endotelio en ausencia y en presencia de HC-030031 o BCTC.

La ausencia de endotelio no disminuyó de manera significativa el efecto vasodilatador de la afinina en presencia de HC-030031 o de BCTC, lo cual sugiere que la afinina activa principalmente los canales TRPA₁ y TRPV₁ ubicados en el endotelio vascular (Figura 15).

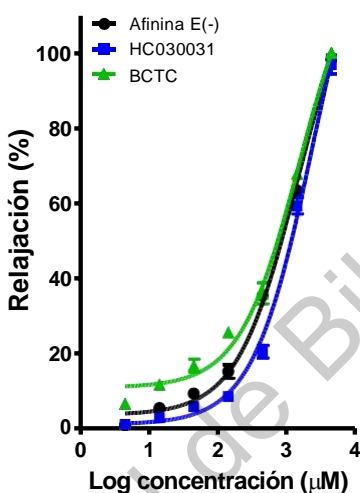


Figura 15. Contribución de los canales TRPA₁ y TRPV₁ endoteliales en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta de la afinina en anillos aórticos sin endotelio en ausencia (curva negra, control) y en presencia de HC-030031 100 µM (inhibidor de canales TRPA₁, curva azul) o de BCTC 10 µM (inhibidor de canales TRPV₁, curva verde). Los valores están expresados como la media ± error estándar de la media (SEM) (n = 6).

7.4 Participación de la vía HNO-TRPA₁-CGRP en el efecto vasodilatador de la afinina

En esta tesis y en un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo (Castro-Ruiz *et al.*, 2017) se demostró que parte del efecto vasodilatador de la afinina es producido por la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}, lo que incrementa los niveles de NO y H₂S, los cuales pueden reaccionar entre si para producir HNO. Asimismo, nuestro grupo de trabajo también determinó que la vasodilatación producida por la afinina involucra la activación de receptores de

CGRP (Castro-Ruiz, 2019), los cuales activan a la AC, relajando el músculo liso vascular. Estos resultados sugieren que la activación de la vía HNO-TRPA₁-CGRP contribuye al efecto vasodilatador de esta alcalamida. Para evaluar esta posibilidad, se pre-incubaron anillos de aorta de rata con cisteína 3 mM, un capturador de HNO, o con MDL-12,133A 10 μ M, un inhibidor de la enzima AC (Pino y Feelisch, 1994; Andrews *et al.*, 2015). La captura de HNO y la inhibición de la AC disminuyeron significativamente la vasodilatación inducida por afinina, confirmando la participación de la vía HNO-TRPA₁-CGRP en el efecto vasodilatador de la afinina (Figura 16).

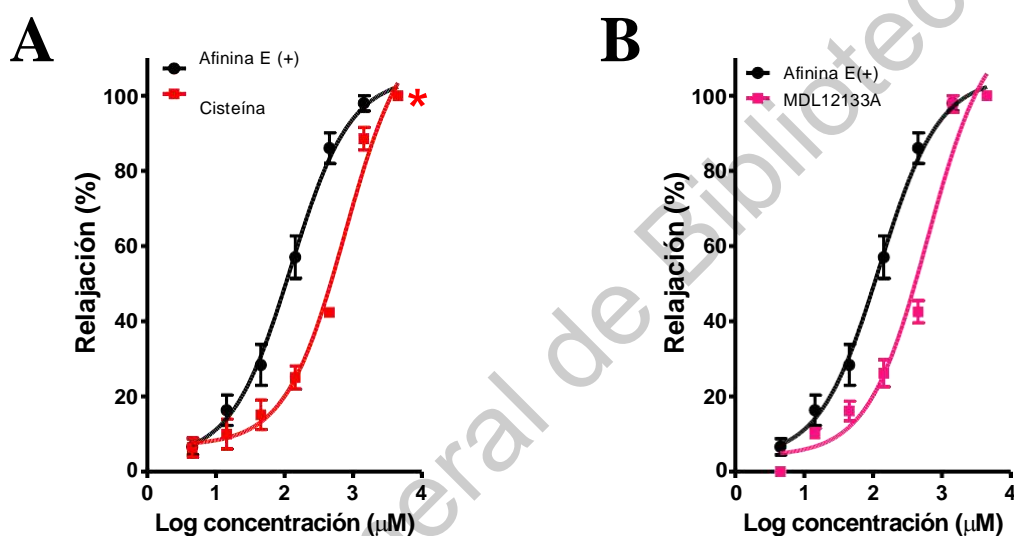


Figura 16. Participación del HNO y AC en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de (A) cisteína 3 mM (capturador de HNO, curva roja) o (B) de MDL-12,133A 10 μ M (inhibidor de AC, curva rosa). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) (n = 6); * p <0.0001.

7.5 Participación del sistema endocannabinoide en la vasodilatación inducida por afinina.

Para evaluar la posible participación de los receptores a cannabinoides CB₁ y CB₂ en el efecto vasodilatador de la afinina, se incubaron segmentos de aorta en ausencia y en presencia de rimonabant 3 μ M (inhibidor de receptores CB₁) o de

AM630 10 μM (inhibidor de receptores CB_2). De acuerdo con nuestros resultados, la inhibición de los receptores CB_1 disminuyó la vasodilatación inducida por afinina de manera significativa (Figura 17), mientras que la inhibición de los receptores CB_2 no disminuyó la relajación producida por esta alcaloide. Estos resultados indicaron que los receptores CB_1 , pero no los CB_2 , están involucrados en el efecto vasodilatador de la afinina.

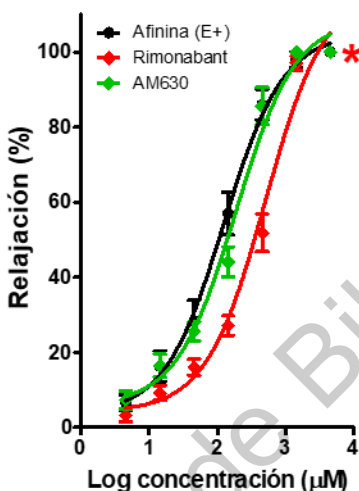


Figura 17. Participación de los receptores CB_1 y CB_2 en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta del efecto vasodilatador de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de rimonabant 3 μM (inhibidor de receptores CB_1 , curva roja) o de AM630 10 μM (inhibidor de receptores CB_2 , curva verde). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.0001$.

Para determinar si los receptores CB_1 estaban localizados en el endotelio o en la musculatura lisa arterial, se evaluó el efecto vasodilatador de la afinina en ausencia y en presencia de rimonabant en segmentos de aorta sin endotelio. La eliminación de las células endoteliales disminuyó de manera significativa el efecto vasodilatador de este metabolito. No obstante, en anillos aórticos sin endotelio, el rimonabant no disminuyó el efecto vasodilatador de la afinina (Figura 18), indicando

que esta molécula produce su efecto vasodilatador principalmente mediante la activación de los receptores CB₁ ubicados en el endotelio vascular.

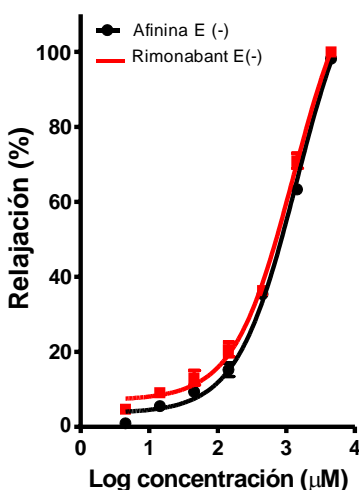


Figura 18. Contribución de los receptores CB₁ endoteliales en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta del efecto vasodilatador de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de rimonabant 3 µM (inhibidor de CB₁, curva roja) en segmentos de aorta sin endotelio, E(-). Los valores están expresados como la media ± error estándar de la media (SEM) (n = 6); *p<0.0001.

Existen reportes previos que sugieren que algunas alcanidas incrementan la disponibilidad de endocannabinoides, debido a que inhiben a la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), una de las principales enzimas que degradan endocannabinoides (Herradón *et al.*, 2007; López-Miranda *et al.*, 2008). Para evaluar si la afinina inhibe a la FAAH, incrementando los niveles de endocannabinoides y, por tanto, la vasodilatación, se incubaron anillos aórticos en ausencia y presencia de URB937 3 µM, un inhibidor de esta enzima. La inhibición de la FAAH no disminuyó el efecto vasodilatador de la afinina, sugiriendo que esta alcanida no involucra la inhibición de esta enzima en su mecanismo de acción vasodilatador (Figura 19).

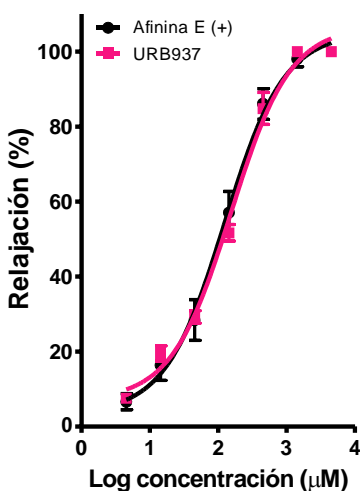


Figura 19. Participación de la FAAH en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta del efecto relajante de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de URB937 3 μM (inhibidor de FAAH, curva rosa) en aorta. Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) (n = 6).

7.6 Participación de proteínas asociadas a vías de señalización activadas por receptores a cannabinoides.

Los receptores a cannabinoides son receptores acoplados a proteínas G y su activación puede inducir la activación de PLC vía el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G asociada a estos receptores (Camps *et al.*, 1992; Turu y Hunyady, 2010). Para confirmar la participación de los receptores a cannabinoides CB1 y la activación de la PLC en el efecto vasodilatador de la afinina, se incubaron anillos de aorta en ausencia y en presencia de suramin 100 μM , un inhibidor inespecífico de proteínas G, o galleina 100 μM , un inhibidor del dímero $\beta\gamma$. La inhibición de proteínas G y de sus dímeros $\beta\gamma$ disminuyó significativamente la vasodilatación inducida por afinina (Figura 20), confirmando la participación de receptores acoplados a proteínas G, posiblemente receptores a cannabinoides CB₁, cuya activación incrementa los

niveles del dímero $\beta\gamma$, los cuales activan proteínas involucradas en diferentes sistemas de transducción de señales, como por ejemplo la PLC.

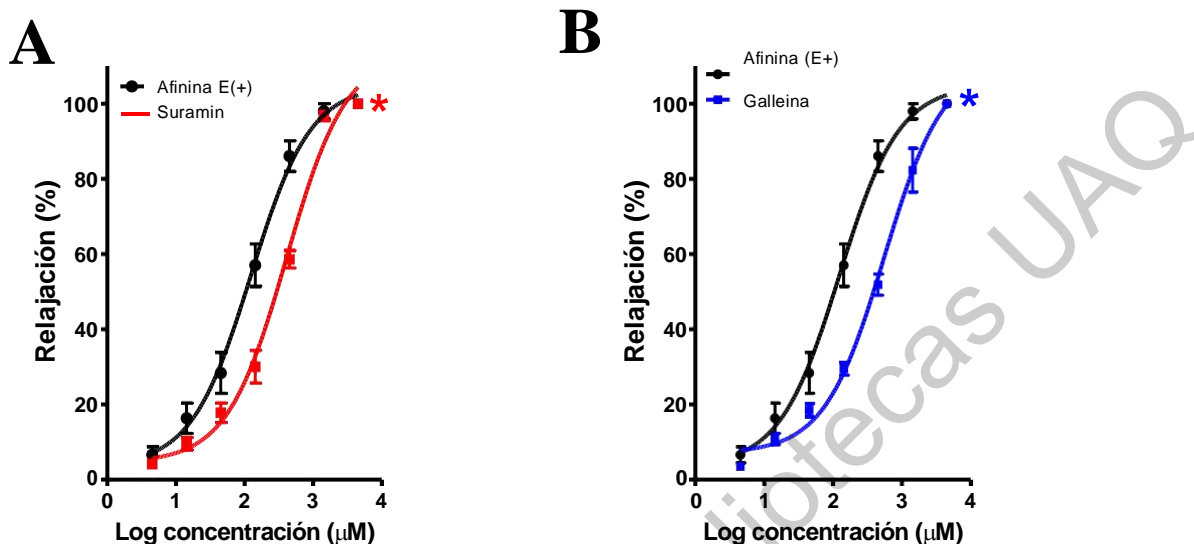


Figura 20. Participación de proteínas G y dímero $\beta\gamma$ en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de Suramin 100 μM (inhibidor de proteínas G, curva roja) o de galleina 100 μM (inhibidor de dímero $\beta\gamma$, curva azul). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.0001$.

Una de las proteínas susceptibles de ser activadas por el dímero $\beta\gamma$ de proteínas G es la PLC, enzima que ha sido asociada a la activación de receptores CB_1 (Camps *et al.*, 1992; Turu y Hunyady, 2010; Lu y Mackie, 2016). Para evaluar su posible participación se incubaron anillos aórticos en ausencia y en presencia de U73122 100 μM , un inhibidor de la PLC. La inhibición de esta enzima disminuyó la actividad vasodilatadora de la afinina, indicando la participación de la PLC en su mecanismo de acción (Figura 21).

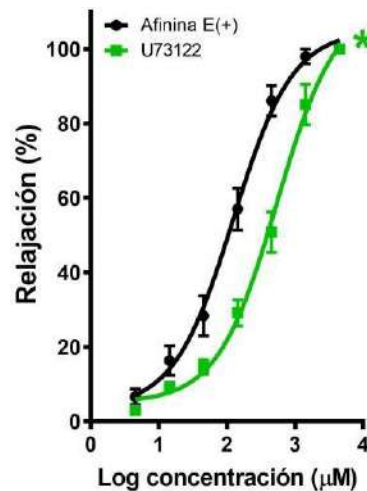


Figura 21. Participación de la PLC en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta del efecto vasodilatador de la afinina en ausencia (curva negra, control) y en presencia de U73122 100 μM (inhibidor de PLC, curva verde). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.0001$.

7.7 Participación de los canales dependientes de voltaje tipo L en el efecto vasodilatador de la afinina.

Para evaluar la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje en el efecto vasodilatador provocado por la afinina, se incubaron anillos aórticos sin endotelio en una solución de Krebs-Henseleit libre de calcio, los cuales fueron incubados con afinina (123.7 μM) o verapamilo (1 μM), empleado como control positivo. Posteriormente, se construyeron curvas concentración respuesta del efecto vasoconstrictor de CaCl_2 (Figura 22). Los resultados derivados de estos experimentos mostraron que la afinina indujo una disminución leve pero significativa de la vasoconstricción inducida por calcio, sugiriendo que la vasodilatación inducida por esta alcalamida implica, al menos parcialmente, un bloqueo de los LVCC.

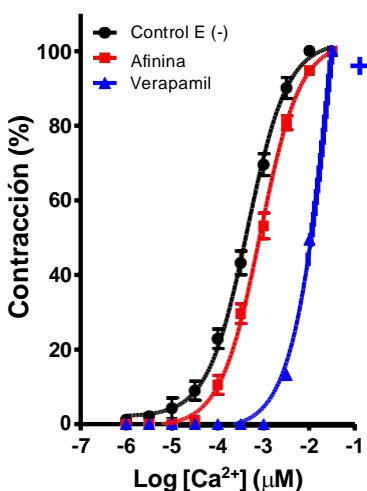


Figura 22. Participación de los LVCC en el efecto vasodilatador de la afinina. Efecto vasoconstrictor de CaCl_2 en ausencia (control E-) y presencia de afinina $123.7 \mu\text{M}$ (curva roja) o verapamilo $1 \mu\text{M}$ (curva azul). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); $*p < 0.0001$.

7.8 Modelo de interacción molecular entre la afinina y los canales TRPA_1 .

Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo es la participación de la vía $\text{HNO}-\text{TRPA}_1-\text{CGRP}$ en el efecto vasodilatador producido por la afinina. Sin embargo, la afinina podría también unirse directamente a los canales TRPA_1 , induciendo la liberación del CGRP y, por tanto, la relajación del músculo liso vascular. Para evaluar esta posibilidad, realizamos ensayos de interacción molecular entre la afinina y los canales TRPA_1 , empleando anandamida como control positivo (De Petrocellis *et al.*, 2012; Redmond *et al.*, 2014). En primer término, se realizó el modelado por homología de la estructura completa del canal TRPA_1 . La construcción del modelo inició con la obtención de la secuencia de aminoácidos canónica del canal TRPA_1 humano (Uniprot O75762). Como era de esperarse, el alineamiento de esta secuencia empleando la plataforma BLAST (Altschul, 1997; Altschul *et al.*, 2005) mostró una identidad de secuencia de 100% con respecto a la estructura 3J9P correspondiente a la criomicroscopía electrónica del canal TRPA_1 (Paulsen *et al.*, 2015) (Figura 23).

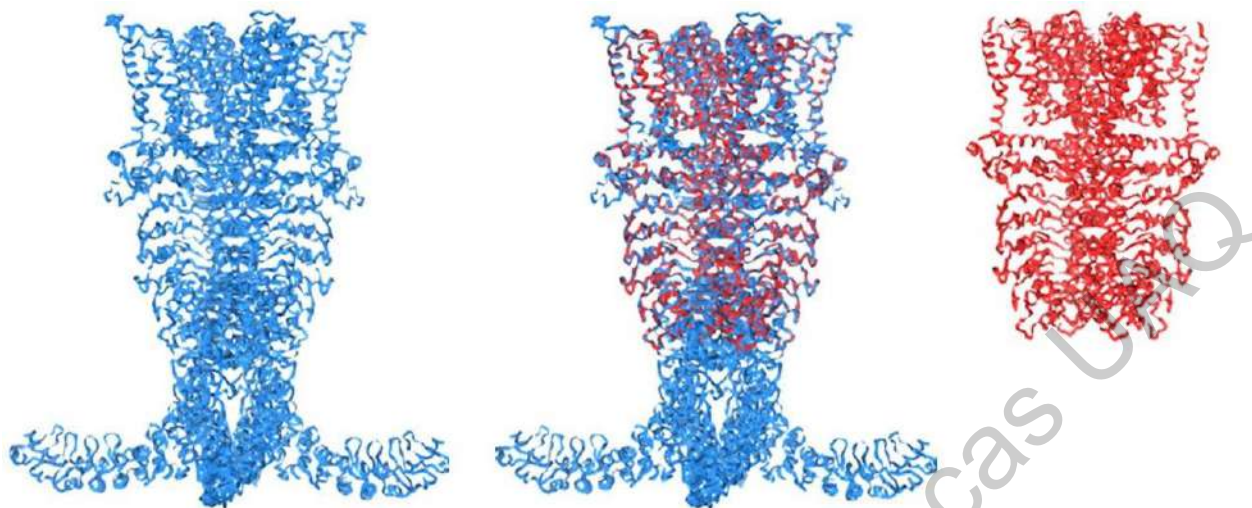


Figura 24. Comparación del modelo por homología del canal TRPA₁ (azul, izquierda) con la estructura 3J9P obtenida por criomicroscopía (rojo, derecha), al centro se muestra el alineamiento de ambas estructuras. En TRPA₁ destaca la presencia de los residuos de ankirina y de *loops* extracelulares.

El modelo tetraédrico de TRPA₁ se sometió a un análisis de Ramachandran para evaluar las torsiones de los residuos de aminoácidos empleando los servidores Molprobit y Procheck (Figura 25).

El análisis en el servidor Molprobit mostró un 57.8 % de torsiones permitidas y 23.81 % de torsiones no permitidas previo a las simulaciones. Por otro lado, en Procheck el porcentaje de torsiones favorecidas y no permitidas previo a las simulaciones fue de 52.5 y 7.0 % respectivamente. No obstante, el máximo de torsiones permitidas puede ser de hasta 93 % si se toma en consideración que las torsiones permitidas y generosamente permitidas son de 28 y 12.5 % respectivamente (Tabla 1).

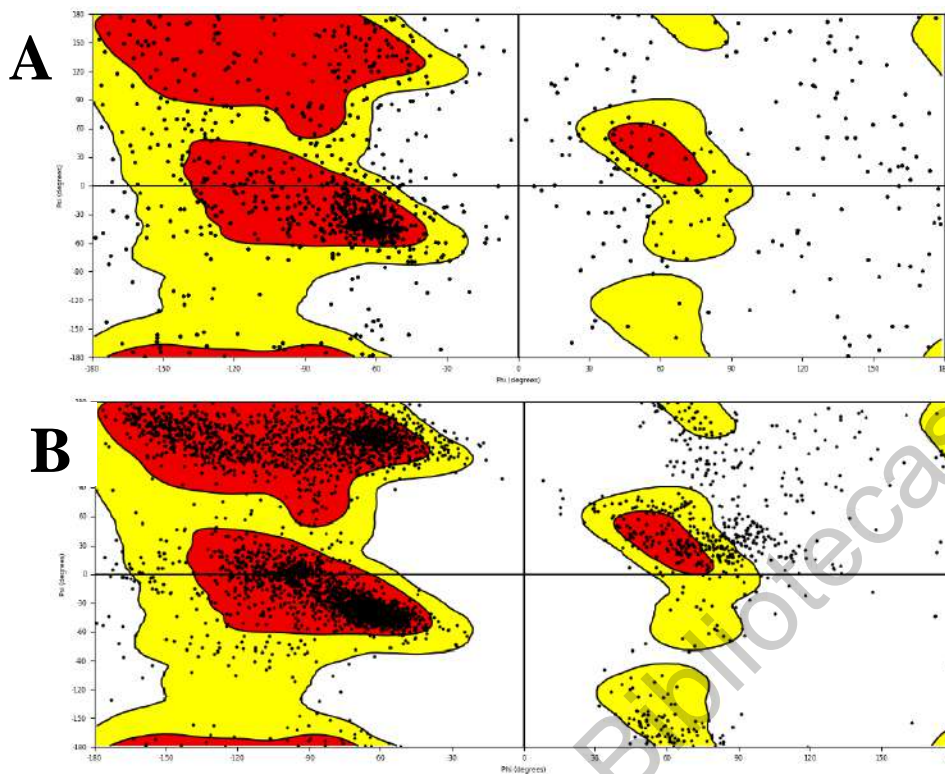


Figura 25. Análisis de Ramachandran del modelo TRPA₁. A) Diagrama de Ramachandran del modelo por homología del canal TRPA₁ al inicio de la simulación (t=0). B) Diagrama de Ramachandran del modelo por homología del canal TRPA₁ después de 50 ns de simulación para permitir la estabilización del canal.

Tabla 1. Resultados de Ramachandran antes y después de 50 ns de simulación. Los resultados se obtuvieron empleando los servidores Molprobit y Procheck respectivamente.

	Resultados Ramachandran TRPA ₁					
	Molprobit		Procheck			
	Permitidas	No permitidas	Favorecidas	Permitidas	Generosamente permitidas	No permitidas
TRPA ₁ (t=0 ns)	57.68 %	23.81 %	52.5 %	28 %	12.5 %	7.0 %
TRPA ₁ (t=50 ns)	81.94 %	7.43 %	77.8 %	14.0 %	5.5 %	2.7 %

El análisis de Ramachandran despues de 50 ns de simulación mostró que el porcentaje de torsiones favorecidas aumentó significativamente en ambos servidores (Molprobit: 81.94 %; Procheck: 77.8 %) mientras que las no permitidas igualmente disminuyeron empleando cualquiera de los dos servidores (Molprobit: 7.43 %; Procheck: 2.7 %) (Figura 25 y Tabla 1). Así mismo, mientras la energía potencial y total disminuyó a lo largo de los 50 ns de simulación, el RMSD y el resto de los parámetros termodinámicos presentó un comportamiento estable durante el mismo periodo (Figura 26 y Tabla 2).

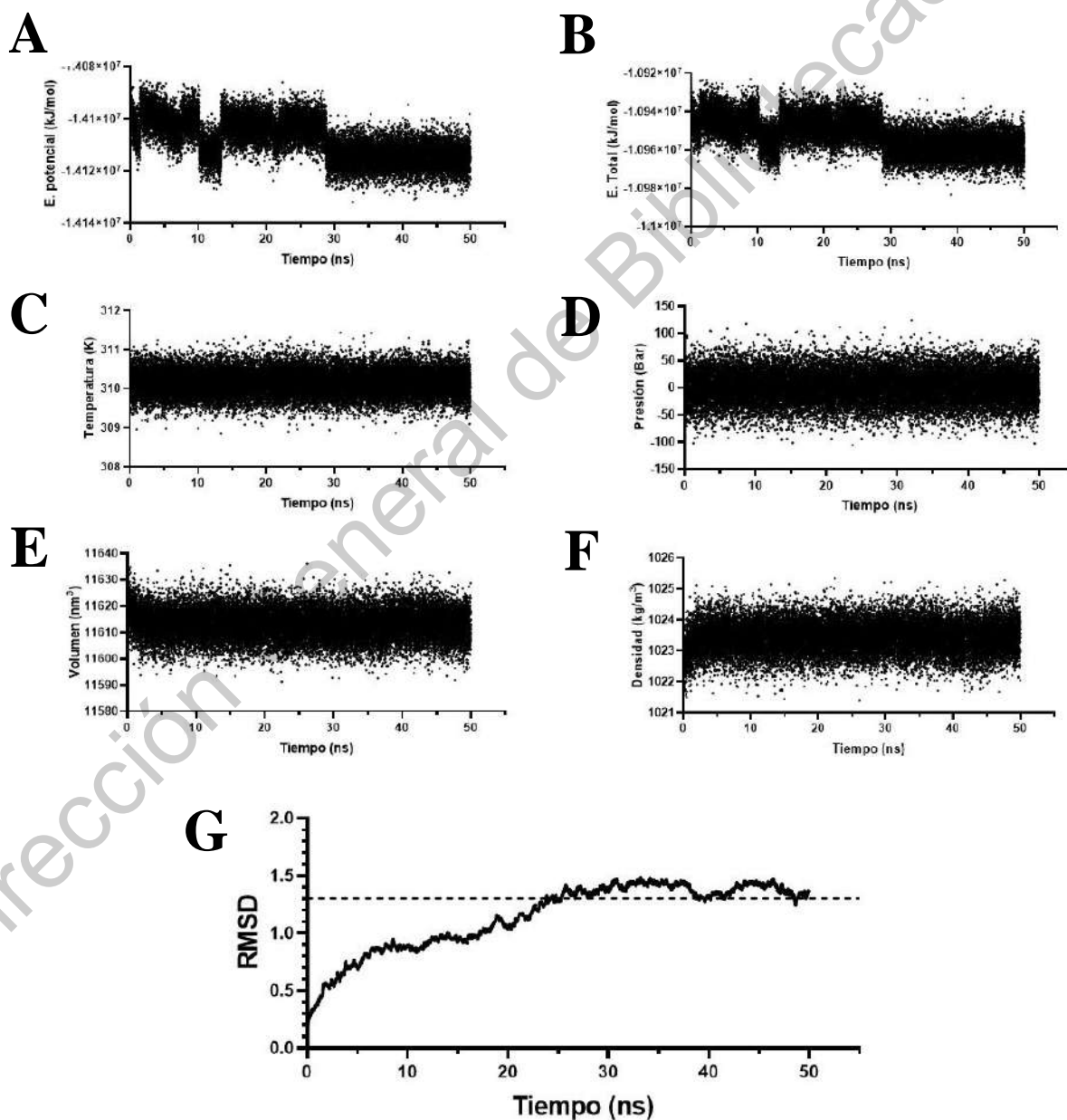


Figura 26. Parámetros termodinámicos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo TRPA₁. A) Energía potencial. B) Energía total. C) Temperatura. D) Presión. E) Volumen. F) Densidad. G) RMSD.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos promedio obtenidos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo TRPA₁.

Parámetro	Promedio	SEM	RMSD	Pendiente
Energía potencial (kJ/mol)	-1.4×10^7	2700	7620	-17239.8
Energía cinética (kJ/mol)	3.2×10^6	22	3267	18.4
Energía Total (kJ/mol)	-1.1×10^7	2700	8646	-17221.4
Temperatura (K)	310.14	0.0022	0.3	0.002
Presión (Bar)	1.12	0.093	29.1	-0.07
Volumen (nm ³)	11612.8	0.2	5.6	-1.02
Densidad (kg/m ³)	1023.4	0.018	0.5	0.09

A partir de estas simulaciones, se obtuvieron 4 conformaciones representativas de la trayectoria, de las cuales la conformación con un tiempo de simulación de 45.27 ns corresponde al estado más relajado de la proteína en toda la simulación (Figura 27).

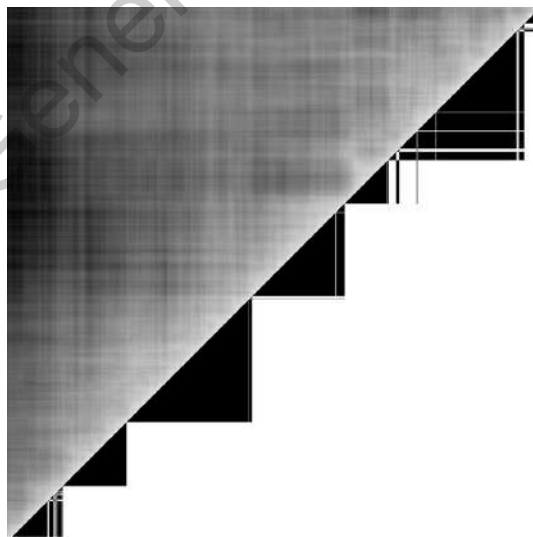


Figura 27. Clustering del modelo de TRPA₁. El área de los triángulos negros continuos representa el número de estructuras con la misma configuración.

Los cálculos de acoplamiento molecular entre la anandamida o la afinina y el canal TRPA₁ se realizaron en un estado relajado. En estas condiciones, observamos que la anandamida se une con una afinidad de -6.11 kcal/mol a un sitio con características principalmente hidrofóbicas, adyacente a la hélice pre-S1 y al segmento transmembrana S1, en la cara citosólica de la membrana (Figura 28).

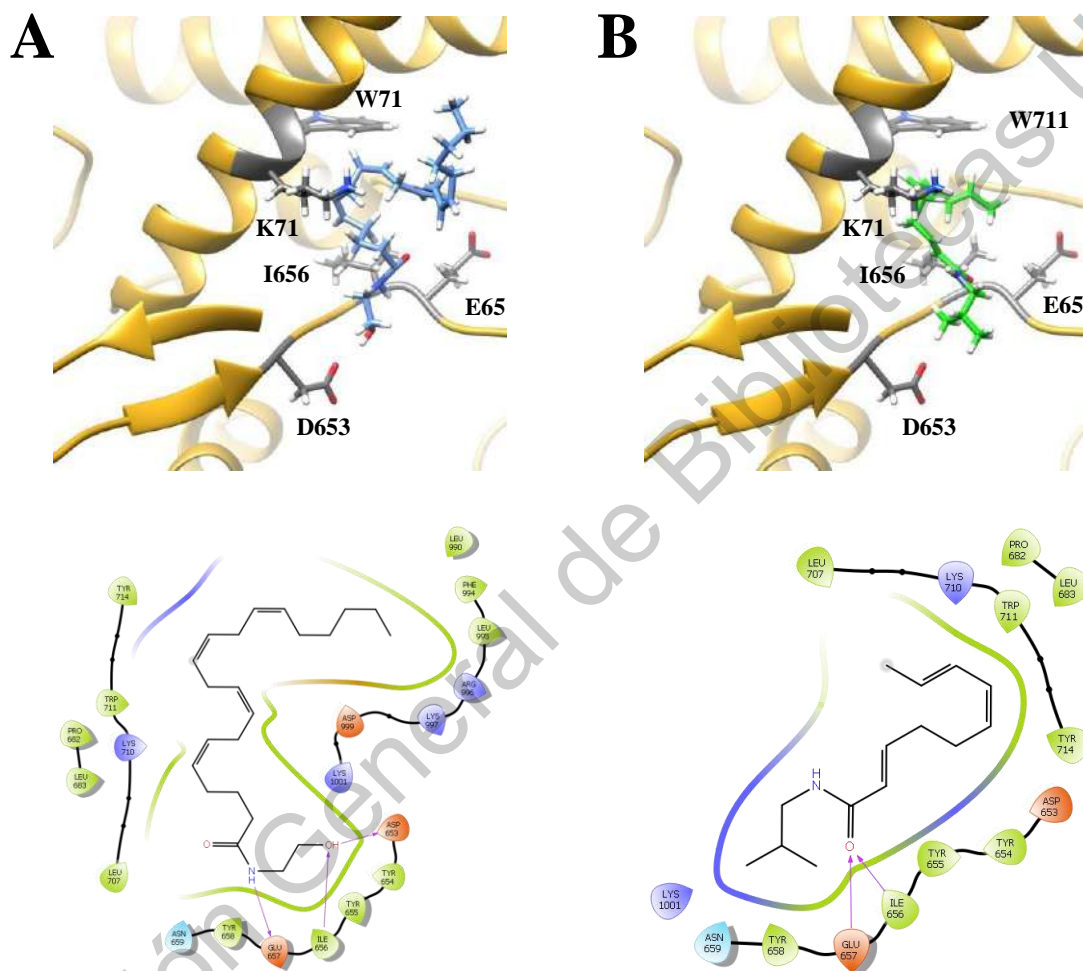


Figura 28. Interacción molecular de alcanamidas con el canal TRPA₁: (A) Anandamida y (B) Afinina. En ambos casos se resaltan las interacciones relevantes.

La anandamida se ubica en posición perpendicular a la membrana y en dirección hacia el citosol, el segmento hidrocarbonado C2-C14 de la anandamida

forma un bucle perpendicular al grupo amida y en dirección al S1. Finalmente, el segmento hidrocarbonado C15-C21 se alinea de manera paralela al grupo amido en dirección a la cara extracelular de la membrana. El grupo (2-hidroxietil)-amino de la anandamida forma tres puentes de hidrógeno, en el primero el nitrógeno forma puente de hidrógeno con E657, mientras que D653 e I656 lo hacen con el grupo hidroxilo de la anandamida. Adicionalmente, observamos interacciones con K710, W711 y Y714 que podrían estar involucradas en la estabilización y/o activación del canal. Por otro lado, observamos que la afinina se une al mismo sitio que la anandamida con una afinidad de -6.55 kcal/mol aunque en forma más compacta (Figura 23). La afinina está en una posición invertida con el grupo amido apuntando al citosol y en una conformación semi-compacta con un ángulo cercano a 60°. Además, se observan dos enlaces de hidrógeno entre I656 y E657 con el oxígeno del carbonilo de la afinina. De manera similar a lo observado con anandamida, se observan interacciones con K710, W711 y Y714. Nuestros resultados sugieren que la afinina se une a los canales TRPA₁ con una afinidad similar a la anandamida, sugiriendo que esta alcalamida activa a este canal.

7.9 Modelo de interacción molecular entre la afinina y los canales TRPV₁.

Puesto que nuestros resultados sugieren la participación de los canales TRPV₁ en el efecto vasodilatador de la afinina, es posible que esta alcalamida active directamente al canal vaniloide. Para evaluar esta hipótesis, se realizó el modelado por homología de la estructura completa del canal TRPV₁ humano. La construcción del modelo inició con la obtención de la secuencia de aminoácidos canónica del canal TRPV₁ humano (Uniprot Q8NER1). Posteriormente, se construyó el modelo del canal TRPV₁ empleando el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014) y tomando como base el modelo 3J5P que corresponde al canal TRPV₁ de rata. A partir de ello, se obtuvo la estructura del canal TRPV₁ humano y que en adelante, simplemente denominaremos TRPV₁. Como era de esperarse, se

Figura 30. Comparación del modelo por homología del canal TRPV₁ humano (izquierda, verde) con el modelo 3J5P (rojo, derecha) que representa al canal TRPV₁ encontrado en células de rata.

Nuestro modelo del canal TRPV₁ se sometió a un análisis de Ramachandran para evaluar las torsiones de los residuos de aminoácidos empleando los servidores Molprobit y Procheck (Figura 31). Nuestro análisis en el servidor Molprobit mostró un 69.7 % de torsiones permitidas y 14.54 % de torsiones no permitidas previo a las simulaciones.

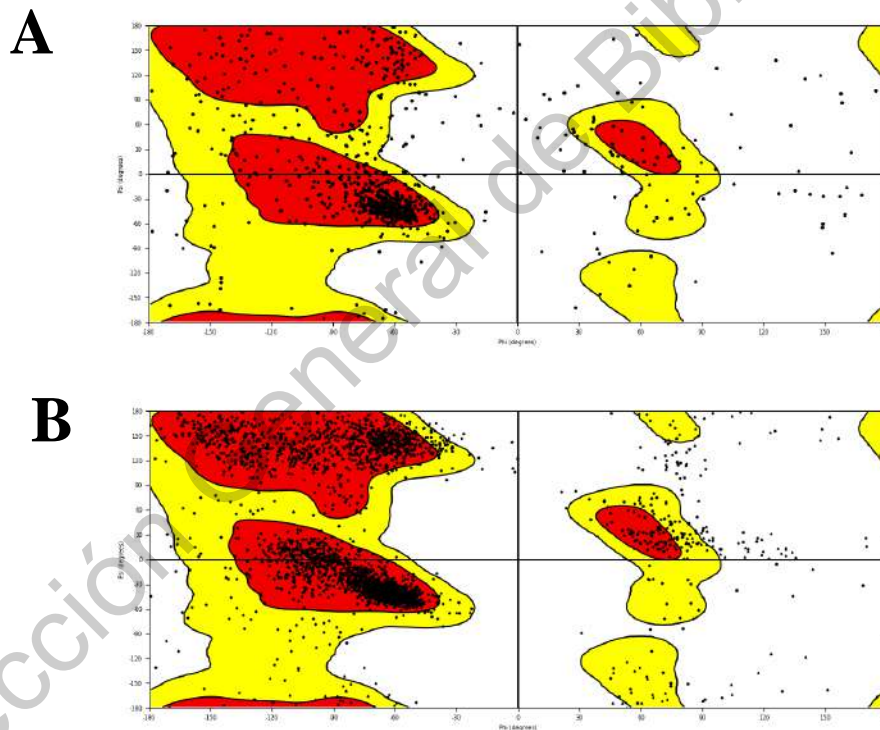


Figura 31. Análisis de Ramachandran del modelo TRPV₁. A) Diagrama de Ramachandran del modelo por homología del canal TRPV₁ al inicio de la simulación (t=0). B) Diagrama de Ramachandran del modelo por homología del canal TRPV₁ después de 50 ns de simulación para permitir la estabilización del canal.

Por otro lado, en Procheck el porcentaje de torsiones favorecidas y no permitidas previo a las simulaciones fue de 79.4 y 3.9 % respectivamente. (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de Ramachandran antes y después de 50 ns de simulación. Los resultados se obtuvieron empleando los servidores Molprobit y Procheck respectivamente.

	Resultados Ramachandran TRPV₁					
	Molprobit		Procheck			
	Permitidas	No permitidas	Favorecidas	Permitidas	Generosamente permitidas	No permitidas
TRPV₁ (t=0 ns)	69.68 %	14.54 %	79.4 %	22.5 %	6.9 %	3.9 %
TRPV₁ (t=50 ns)	88.08 %	3.55 %	84.9 %	11.1 %	2.8 %	1.2 %

El alineamiento de TRPV₁ con 3J5P empleando el programa Schrödinger-Maestro 11.0 obtuvo un score de alineamiento de 0.591 y un RMSD de 3.549. Estos resultados indican una alta similitud de nuestro modelo con la estructura obtenida por criomicroscopía 3J5P.

El análisis de Ramachandran después de 50 ns de simulación mostró que el porcentaje de torsiones favorecidas aumento significativamente en ambos servidores (Molprobit: 88.08 %; Procheck: 84.9 %) mientras que las no permitidas igualmente disminuyeron empleando cualquiera de los dos servidores (Molprobit: 3.55 %; Procheck: 1.2 %) (Figura 31 y Tabla 3). Así mismo, mientras la energía potencial y total disminuyó a lo largo de los 50 ns de simulación, el RMSD y el resto de los parámetros termodinámicos presentó un comportamiento estable durante el mismo periodo (Figura 32 y Tabla 4).

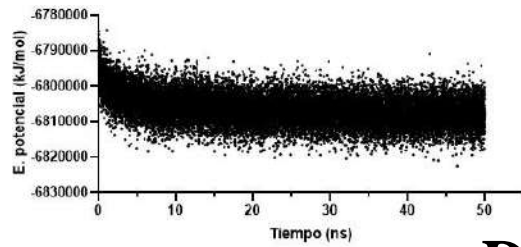
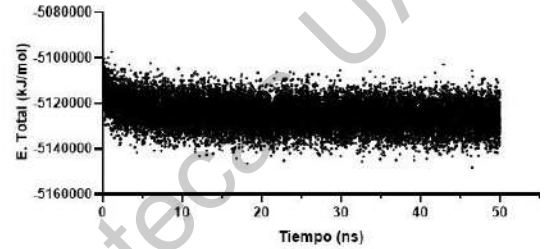
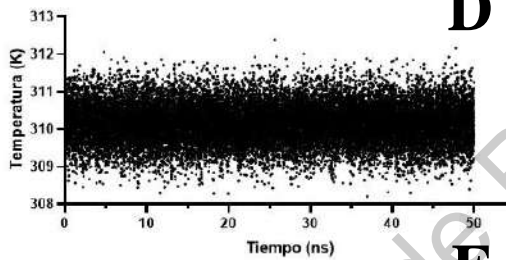
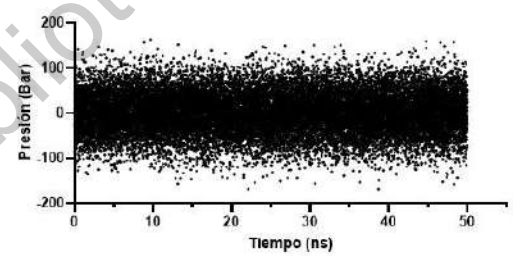
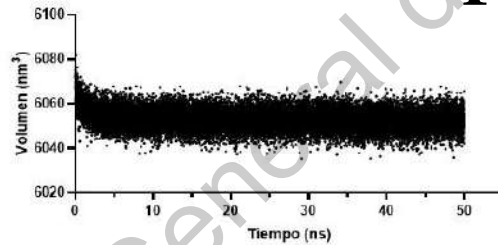
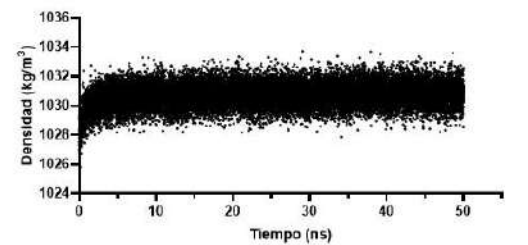
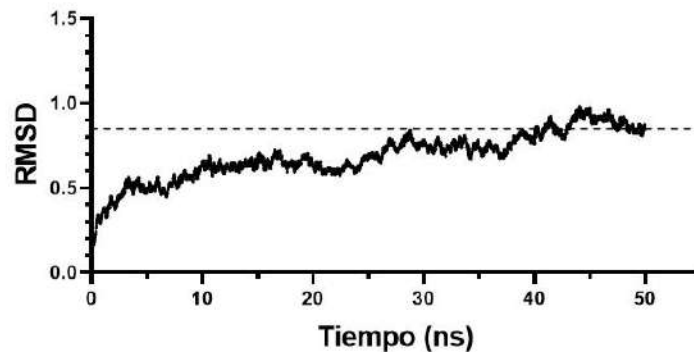
A**B****C****D****E****F****G**

Figura 32. Parámetros termodinámicos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo TRPV₁. A) Energía potencial. B) Energía total. C) Temperatura. D) Presión. E) Volumen. F) Densidad. G) RMSD. Se observa un comportamiento estable en todos los parámetros a lo largo de toda la simulación.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos promedio obtenidos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo TRPV₁.

Parámetro	Promedio	SEM	RMSD	Pendiente
Energía potencial (kJ/mol)	-6.81E+06	870	4316.25	-5714.63
Energía cinética (kJ/mol)	1.68E+06	3.1	2828.14	-1.52377
Energía Total (kJ/mol)	-5.12E+06	870	5960.83	-5716.15
Temperatura (K)	310.15	0.00057	0.521643	-0.00028165
Presión (Bar)	0.946436	0.029	44.7499	0.0635325
Volumen (nm ³)	6052.97	0.57	4.66722	-3.55558
Densidad (kg/m ³)	1030.69	0.096	0.794588	0.605059

A partir de estas simulaciones, se obtuvieron 3 conformaciones representativas de la trayectoria, de las cuales la conformación con un tiempo de simulación de 45.27 ns corresponde al estado más estable en toda la simulación.

A continuación se realizaron cálculos de acoplamiento molecular entre la afinina y los canales TRPV₁. Se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de 50 ns del canal TRPV₁ humano en ausencia de ligando para la relajación de la estructura (Figura 33).

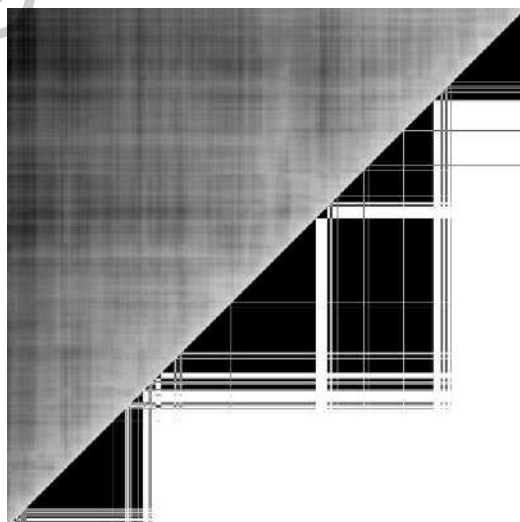


Figura 33. Clustering del modelo de TRPV₁. El área de los triángulos negros continuos representa el número de estructuras con la misma configuración.

Posteriormente, nuestro modelo se alineó con estructuras previamente reportadas (Figura 34) que corresponden a estructuras en ausencia de ligando (pdb: 3J5P), en presencia de capsaicina (pdb: 3J5R) o en presencia de RTX/DkTx (pdb: 3J5Q) (Yang *et al.*, 2015). Los resultados mostraron que nuestro modelo presenta mayor similitud a 3J5P y, por lo tanto, corresponde a un modelo en ausencia de ligando (cerrado).

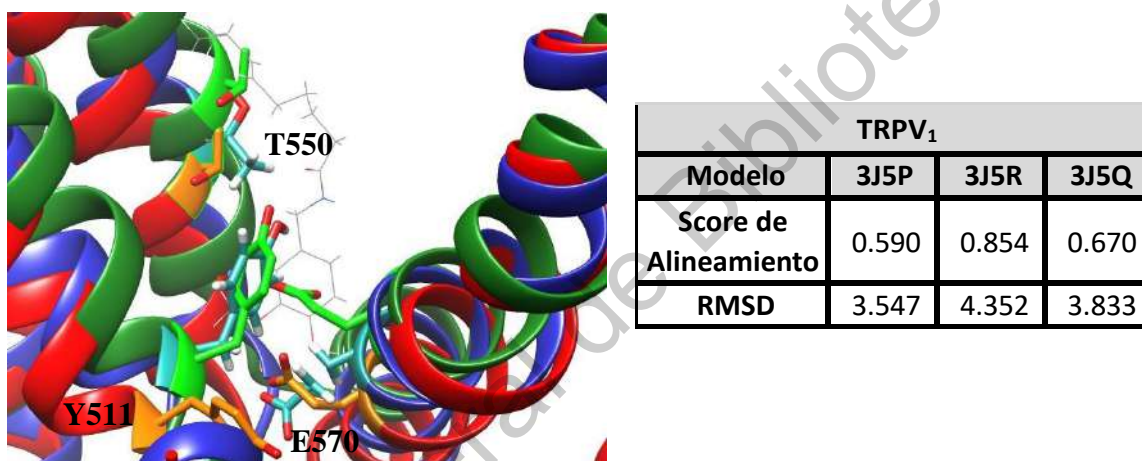


Figura 34. Comparación de nuestro modelo con modelos. Izquierda, alineamiento del modelo TRPV₁ (azul) con 3J5P (rojo, canal cerrado) y con 3J5R (verde, canal abierto). Derecha, nuestro modelo presenta mejor alineamiento con 3J5P. La disposición de los residuos Y511, T550 y E570 (en nuestro modelo en color cian) se asemeja más a la observada en canales abiertos (en verde fluorescente) que en canales cerrados (en naranja).

Las pruebas de acoplamiento molecular se llevaron a cabo utilizando afinina o capsaicina, como control positivo. En este último caso, se observó que la capsaicina se une en posición invertida con un score de acoplamiento de -7.07 kcal/mol a una bolsa hidrofóbica ubicada entre el dominio S4 de una cadena y los segmentos S5 y S6 de la cadena anterior (Figura 35).

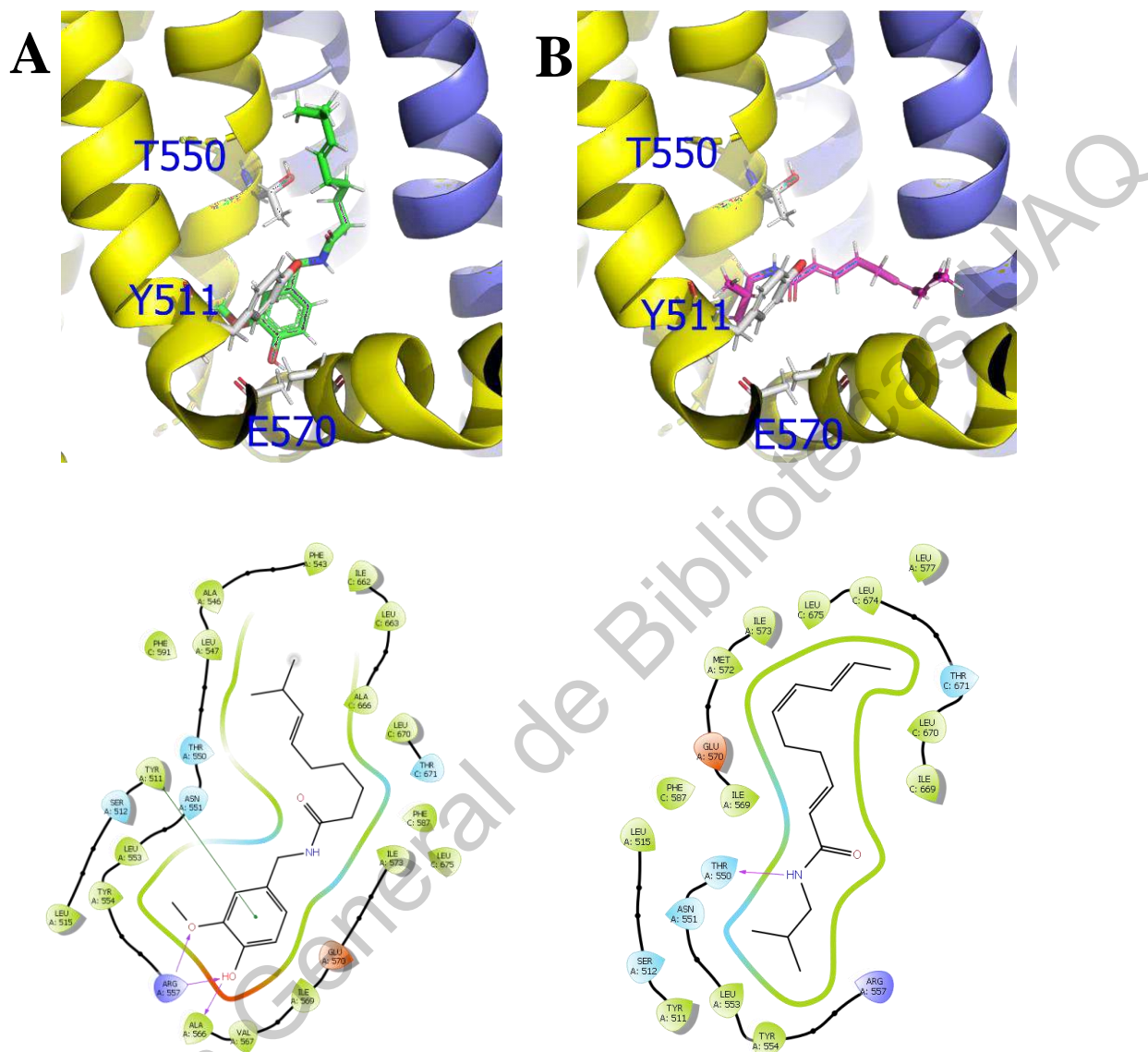


Figura 35. Interacción molecular de alcamidás con el canal TRPV₁: (A) capsaicina y (B) afinina. En ambos casos, la posición de los residuos T550 y E570 es similar a la esperada en canales cerrados. La conformación Y511 es más consistente con un canal abierto. Los diagramas de interacción ligando-receptor relevantes para la interacción con capsaicina y afinina se muestran abajo.

La capsaicina está en una posición similar a la observada previamente y forma interacciones con diferentes residuos, entre las que destacan aquellas formadas con Y511, T550 y E570, las cuales se han descrito como críticas en el proceso de activación del canal TRPV₁ por capsaicina (Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, a diferencia de lo previamente reportado en el complejo TRPV₁-

capsaicina de nuestro modelo, no se observa enlace de hidrógeno entre T550 y el oxígeno del carbonilo, tampoco se observa el puente de hidrógeno entre E670 y el hidroxilo del grupo aromático. Finalmente, se observa un apilamiento π - π entre Y511 y la capsaicina.

La afinina se une con una energía de -7.21 kcal/mol en el mismo sitio, en una posición en la que interacciona de manera similar a la observada con capsaicina, incluida la formación de un puente de hidrógeno entre T550 y el nitrógeno del grupo amido de afinina.

Como en el caso de la capsaicina, no se observan los enlaces de hidrógeno con T550 y E570, aunque estos aminoácidos se encuentran en un radio de 5 Å desde la afinina. Finalmente, la afinina está en una conformación semi-extendida y, a diferencia de la capsaicina, está en un ángulo agudo de aproximadamente 30° con respecto al dominio TRP del canal.

Los resultados obtenidos sugieren que la afinina se une con elevada afinidad al mismo sitio que la capsaicina, en el canal TRPV1, lo que respalda la hipótesis de que la afinina puede activar directamente estos canales.

7.10 Modelo de interacción molecular entre la afinina y los receptores CB₁.

Según nuestros resultados en aorta aislada de rata, el receptor a cannabinoides CB₁ está involucrado en el efecto vasodilatador de la afinina. Por esta razón, se realizó un estudio *in silico* de acoplamiento molecular de la afinina con el receptor CB₁ humano. Para ello, se realizó el modelado por homología de la estructura completa del receptor CB₁ humano partiendo de su secuencia de aminoácidos canónica encontrada en el servidor Uniprot (código P21554).

Posteriormente se construyó el modelo del receptor empleando el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014) y tomando como base el modelo 5TGZ que corresponde a la estructura cristalográfica del receptor CB₁

humano (Hua *et al.*, 2016). A partir de ello, se construyó la estructura del receptor CB₁ humano y (en adelante, CB₁).

Aunque 5TGZ y nuestro modelo corresponden al receptor CB₁ humano resulta interesante notar que, se observaron discrepancias en el alineamiento entre ambas secuencias al emplear la plataforma BLAST (Altschul, 1997; Altschul *et al.*, 2005). El porcentaje de homología calculado para 5TGZ y nuestro modelo es de apenas 57.6% como consecuencia de la presencia de la etiqueta de flavodoxina. No obstante, este porcentaje aumenta a 97.6% si se omite la secuencia de la etiqueta en los calculos (Figura 36).



Figura 36. Alineamiento de la secuencia canónica de CB₁. En amarillo, secuencia canónica de CB₁ (Uniprot P21554), verde secuencia de la estructura 5TGZ, rojo sustituciones de aminoácidos, en gris se muestran los aminoácidos ausentes y en rosa se muestra la secuencia de la flavodoxina empleada en la purificación de CB₁ para generar 5TGZ.

Las diferencias en la homología de secuencia entre 5TGZ y nuestro modelo están asociadas con la presencia de una secuencia de aminoácidos exógena correspondiente a flavodoxina en 5TGZ (Figura 37) la cual fue empleada como etiqueta durante el proceso de purificación del receptor CB₁ (Hua *et al.*, 2016).

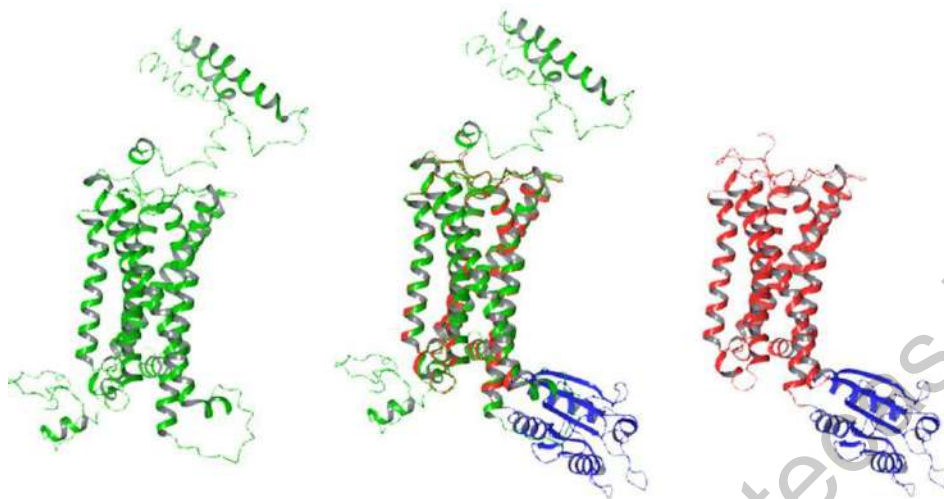


Figura 37. Comparación del modelo por homología del receptor CB₁ humano (izquierda, verde) con el modelo 5TGZ (rojo, derecha). En azul se muestra la etiqueta de flavodoxina. Al centro, se encuentra el alineamiento del receptor CB₁ humano con el modelo 5TGZ.

Posteriormente nuestro modelo fue sometido a un análisis de Ramachandran para evaluar las torsiones de los residuos de aminoácidos empleando los servidores Molprobity y Procheck (Figura 38). Como resultado de ello, observamos que en el servidor Molprobity existe un 82.3 % de torsiones permitidas y 7.4 % de torsiones no permitidas previo a las simulaciones. Por otro lado, en Procheck el porcentaje de torsiones favorecidas y no permitidas previo a las simulaciones fue de 78.5 y 2.1 % respectivamente (Tabla 5).

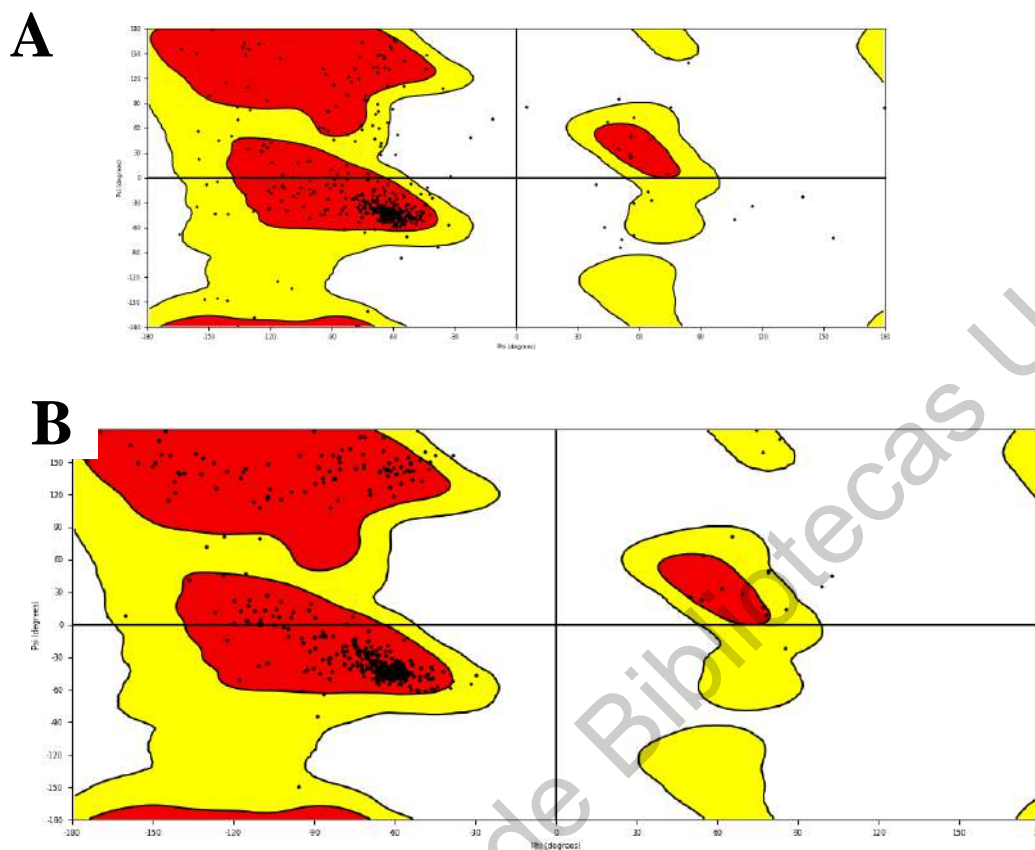


Figura 38. Análisis de Ramachandran del modelo CB₁. A) Diagrama de Ramachandran del modelo por homología del receptor CB₁ al inicio de la simulación (t=0). B) Diagrama de Ramachandran del modelo por homología del receptor CB₁ después de 50 ns de simulación para permitir la estabilización del canal.

Tabla 5. Resultados de Ramachandran antes y después de 50 ns de simulación. Los resultados se obtuvieron empleando los servidores Molprobit y Procheck respectivamente.

Resultados Ramachandran CB₁

	Molprobit		Procheck			
	Permitidas	No permitidas	Favorecidas	Permitidas	Generosamente permitidas	No permitidas
CB ₁ (t=0 ns)	82.34 %	7.45 %	78.5 %	17.3 %	2.1 %	2.1 %
CB ₁ (t=50 ns)	94.43 %	0.43 %	91.9 %	7.4 %	0.7 %	0.0 %

El alineamiento de CB₁ con 5TGZ empleando el programa Schrödinger-Maestro 11.0 obtuvo un score de alineamiento de 0.069 y un RMSD de 1.312. Ambos resultados sugieren una alta similitud de nuestro modelo con la estructura obtenida por 5TGZ.

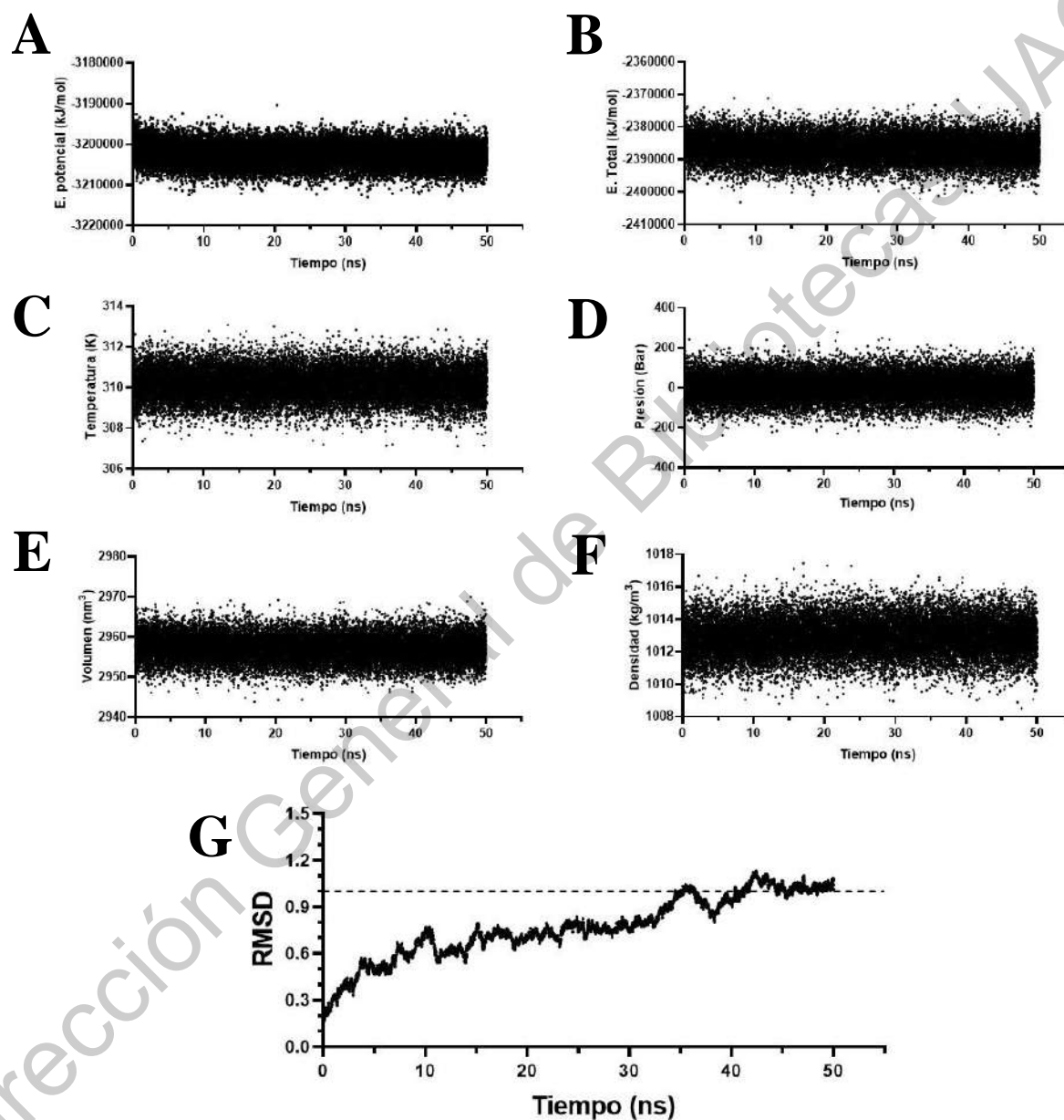


Figura 39. Parámetros termodinámicos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo CB₁. A) Energía potencial. B) Energía total. C) Temperatura. D) Presión. E) Volumen. F) Densidad. G) RMSD. Se observa un comportamiento estable en todos los parámetros a lo largo de toda la simulación.

El análisis de Ramachandran despues de 50 ns de simulación mostró que el porcentaje de torsiones favorecidas aumento significativamente en ambos servidores (Molprobit: 94.43 %; Procheck: 91.9 %) mientras que las no permitidas igualmente disminuyeron empleando cualquiera de los dos servidores (Molprobit: 0.43 %; Procheck: 0.0 %) (Figura 38 y Tabla 5). Asi mismo, mientras la energía potencial y total disminuyó a lo largo de los 50 ns de simulación, el RMSD y el resto de los parámetros termodinámicos presentó un comportamiento estable durante el mismo periodo (Figura 39 y Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros termodinámicos promedio obtenidos a lo largo de 50 ns de simulación del modelo CB₁.

Parámetro	Promedio	SEM	RMSD	Pendiente
Energía potencial (kJ/mol)	-3.20E+06	170	2654.58	-947.291
Energía cinética (kJ/mol)	815827	1.3	1965.15	10.0559
Energía Total (kJ/mol)	-2.39E+06	170	3896.44	-937.236
Temperatura (K)	310.151	0.00048	0.747087	0.00382302
Presión (Bar)	1.13096	0.052	62.8276	-0.0202061
Volumen (nm ³)	2957.15	0.12	3.17302	-0.627692
Densidad (kg/m ³)	1012.87	0.041	1.0868	0.214942

A partir de estas simulaciones, se obtuvieron 3 conformaciones representativas de la trayectoria, de las cuales la conformación con un tiempo de simulación de 32.75 ns corresponde al estado más abundante de la proteína en toda la simulación (Figura 40).

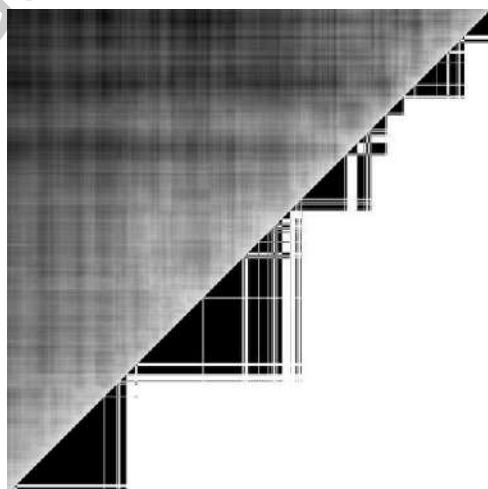


Figura 40. Clustering del modelo de CB₁. El área de los triángulos negros continuos representa el número de estructuras con la misma configuración.

Después de las simulaciones de dinámica molecular de 50 ns del receptor CB₁ en ausencia de ligando para la relajación de la estructura, nuestro receptor se alineó con modelos reportados de CB₁ en conformación inactiva y activa (pdb: 5TGZ y 6KPG-Gi, respectivamente).

Los resultados de esta alineación mostraron que nuestro modelo presenta una analogía mayor con la cristalografía 5TGZ, lo que sugiere que nuestro modelo corresponde al estado inactivo del receptor CB₁ (Figura 41).

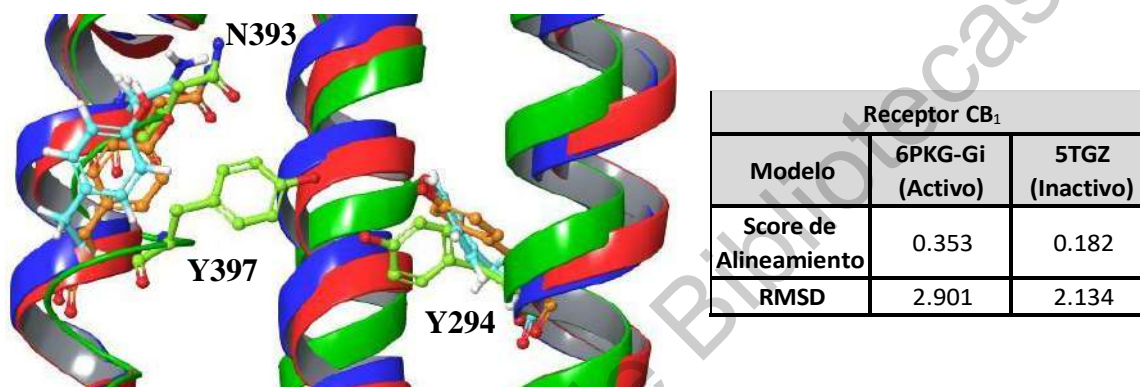


Figura 41. Comparación de nuestro modelo con receptores CB₁ en estado activo e inactivo. Izquierda, alineamiento del modelo del receptor CB₁ (azul) con 5TGZ (rojo, receptor CB₁ inactivo) y con 6KPG (verde, receptor CB₁ activo). Derecha, se observa que nuestro modelo presenta mayor similitud con 5TGZ.

El análisis de acoplamiento mostró que la anandamida, utilizada como control positivo, se une con una energía de unión de -6.88 kcal/mol, mientras que la afinina se une al receptor CB₁ con una energía de -8.57 kcal/mol. Este resultado sugiere que la afinina se une con mayor afinidad al receptor CB₁ que la anandamida.

Tanto la anandamida como la afinina se unen a una bolsa hidrófoba cerca de la cara extracelular de la membrana entre los dominios II, III y VII (Figura 42). En este sitio, tanto la anandamida como la afinina están en forma de U con ambos extremos dirigidos hacia el lado extracelular de la membrana; sin embargo, mientras que la anandamida se asemeja a una V, la afinina tiene una forma más suave.

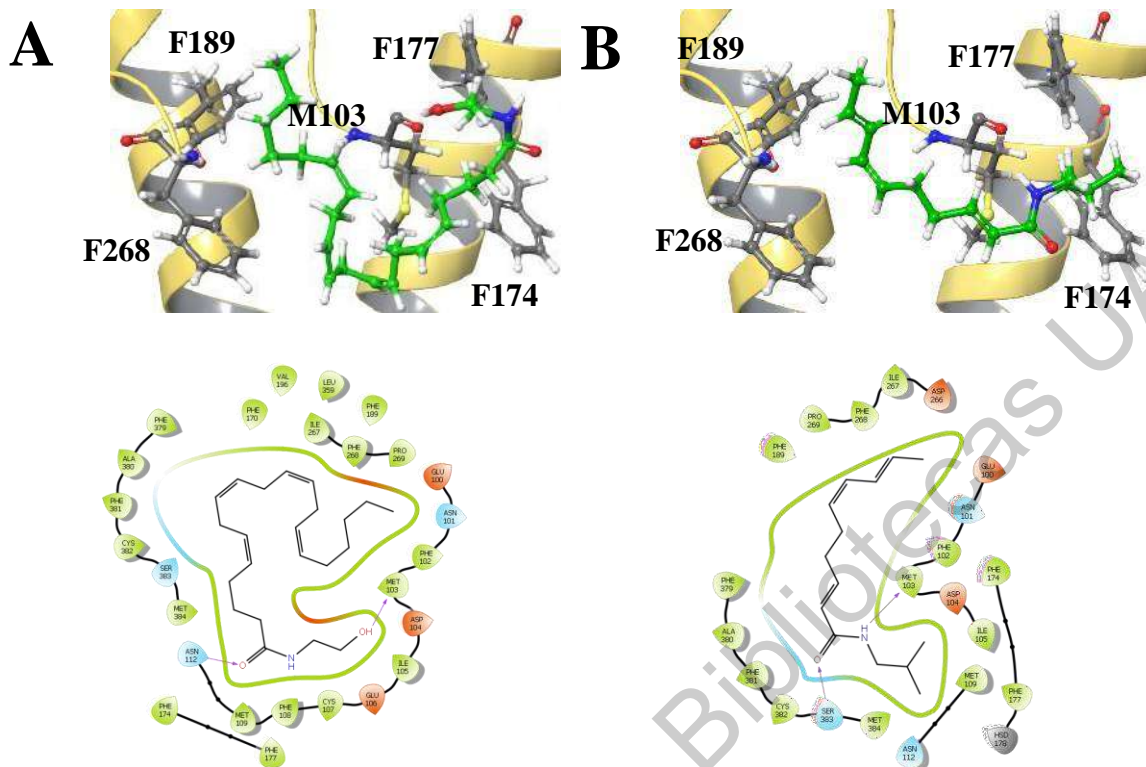


Figura 42. Interacción molecular de alcanmidas con el receptor CB₁. (A) Anandamida y (B) Afinina. Destaca la abundancia de aminoácidos aromáticos en el sitio de unión.

La anandamida forma dos enlaces de hidrógeno, el primero entre el hidroxilo de la anandamida y M103, el segundo se forma entre N112 y el oxígeno del carbonilo de la anandamida. En el caso de la afinina, los enlaces de hidrógeno también se observan a través de los mismos residuos, aunque en ausencia de hidroxilo, el enlace de hidrógeno se forma entre el nitrógeno del grupo amida de la afinina y M103. El resto de las interacciones son principalmente hidrofóbicas con abundantes residuos de fenilalanina (F174, F177, F189, F268, F379) y otros residuos, incluidos L359 y S383, que se han descrito anteriormente, debido a su relevancia en la unión de anandamida con el receptor CB₁ (Hua *et al.*, 2017). Nuestros resultados demuestran que la afinina se une con alta afinidad a CB₁ en el mismo sitio que la anandamida a través de interacciones principalmente hidrofóbicas, lo cual proporciona evidencia adicional de su participación en el efecto vasodilatador producido por esta alcanmida.

8. DISCUSIÓN

La afinina es una de las principales alcaloides producida por plantas como *H. longipes* y *Acmella olearacea* (Ogura *et al.*, 1982; Greger, 1984), la cual presenta una gran variedad de actividades biológicas, incluyendo efectos antinociceptivos asociados con la activación de la vía NO/GMPc (Déciga-Campos *et al.*, 2010) y a la participación de canales TRPV₁ (de la Rosa-Lugo *et al.*, 2017). Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que esta alcaloide produce una vasodilatación dependiente de la presencia de endotelio en aorta aislada de rata, la cual, de acuerdo a nuestros resultados, está relacionada con la activación de las vías de señalización del NO/GMPc, del CO/GMPc, del H₂S/K_{ATP} y de la PGI₂/AMPc (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta el momento no se conocen los receptores y/o canales iónicos que activa la afinina para incrementar el calcio intracelular en el endotelio y producir su efecto vasodilatador.

En este trabajo evaluamos los cambios en la producción de nitritos y sulfuros que se utilizan como indicadores de NO y H₂S (Gilboa Garber, 1971; Bryan y Grisham, 2007). A partir de estas evaluaciones, encontramos que la afinina produce un aumento significativo en la producción de NO y H₂S en homogenados de aorta; este aumento fue aún mayor que el producido por la ACh, utilizada como control positivo. Estos resultados confirman resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo que indican que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP} (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). El NO y el H₂S trabajan de manera conjunta para producir vasodilatación y se ha observado que cuando se elevan los niveles de uno de ellos se incrementan también los niveles del otro (Predmore *et al.*, 2011; Coletta *et al.*, 2012; Olan, 2015a). Actualmente, no existen reportes que indiquen que las alcaloides incrementan la producción de H₂S, aunque algunos estudios han mostrado que estos metabolitos activan la vía PI3K/Akt y aumentan la producción de NO (Choi *et al.*, 2017; Signorello y Leoncini, 2018). De esta manera, nuestros resultados muestran por

primera vez que una alcanida, la afinina, es capaz de incrementar la producción de H₂S.

En la arteria, se requiere de un aumento en los niveles de Ca²⁺ en las células endoteliales para estimular la producción de gasotransmisores (Yang *et al.*, 2008) y las vías de señalización de PGI₂ (Vanhoutte *et al.*, 2017). Aunque nuestros resultados indican que el efecto vasodilatador de la afinina involucra un aumento del calcio endotelial y la consiguiente activación de las vías de los gasotransmisores, no se conoce cuáles son los blancos moleculares de esta alcanida, cuya activación resulte en el aumento de los niveles de Ca²⁺. Varios estudios han demostrado que algunas alcanidas tienen la capacidad de activar los canales TRPA₁ y TRPV₁, ya sea en cultivo celular o en modelos animales de inflamación y dolor (de la Rosa-Lugo *et al.*, 2017; Lieder *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2017). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la afinina, al igual que otras alcanidas, podría activar a este tipo de canales en el endotelio vascular. Por otro lado, la anandamida, un endocannabinoide, que químicamente se ha incluido en la categoría de las alcanidas al igual que la afinina (Boonen *et al.*, 2012), induce un efecto vasodilatador significativo a través de mecanismos que incluyen la activación de los canales TRPV₁ y de los receptores de cannabinoides (Zygmunt *et al.*, 1999). De manera adicional, se ha reportado que el hidroxil- α -sanshool, una alcanida encontrada en plantas del género *Zanthoxylum*, es capaz de unirse a los canales TRPA₁ y TRPV₁, así como a los receptores CB₂ (Koo *et al.*, 2007; Dossou *et al.*, 2013). Con base en estas evidencias y considerando que el efecto antinociceptivo de la afinina se ha relacionado con la activación de los canales TRPV₁ (de la Rosa-Lugo *et al.*, 2017), es posible que los canales TRP y los receptores cannabinoides sean los blancos moleculares de la afinina en el endotelio vascular, los cuales al ser activados induzcan la relajación de la arteria.

Los canales TRP son canales catiónicos no selectivos con múltiples funciones, que comprenden mecanorrecepción, sensación térmica, inflamación y nocicepción, entre otros (Earley y Brayden, 2015). Además, los canales TRP ubicados en el endotelio vascular y el músculo liso son reguladores importantes de

la función vascular (Fernandes *et al.*, 2012; Aubdool *et al.*, 2016). Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que el efecto vasodilatador de la afinina puede ser reducido significativamente en presencia de rojo de rutenio, un inhibidor inespecífico de canales TRP, demostrando la participación de los canales TRP en la vasodilatación inducida por afinina (Castro-Ruiz, 2019). En este trabajo, la inhibición de los canales TRPA₁ con HC-030031 y de los canales TRPV₁ con capsaicina redujo significativamente la vasodilatación inducida por afinina, indicando que ambos canales están involucrados en el efecto vasodilatador producido por esta alcalamida. De manera adicional, la inhibición de estos canales en aortas sin endotelio no disminuyó la vasodilatación producida por afinina, lo cual indicó que este metabolito activa a los canales TRPA₁ y TRPV₁ ubicados principalmente en las células endoteliales. Aunque algunos estudios han demostrado que los canales TRPA₁ y TRPV₁ se encuentran tanto en el endotelio como en el músculo liso (Yang *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2012; Aubdool *et al.*, 2016), existe evidencia de que estos canales están localizados principalmente en el endotelio de la aorta, de arterias cerebrales y de arterias mesentéricas (Earley *et al.*, 2008; Pozsgai *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2014; Earley y Brayden, 2015; Sullivan *et al.*, 2016). La activación de los canales TRPA₁ y TRPV₁ en endotelio de aorta podría explicar, al menos en parte, la activación de las vías de señalización del NO/GMPc, del CO/GMPc, del H₂S/K_{ATP} y de la PGI₂/AMPc reportadas previamente por nuestro grupo de trabajo (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Asimismo, en estudios previos realizados en anillos aórticos de rata, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales microvasculares renales (MVEC) se demostró también que la activación de los canales TRPA₁ y TRPV₁ desencadena la activación de la vía de la eNOS/NO (Zou *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Previamente nuestro grupo de trabajo demostró que el bloqueo de los receptores del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) disminuyen el efecto vasodilatador de la afinina (Castro-Ruiz, 2019). Tomando esto en consideración y, adicionalmente, tomando en cuenta que los resultados mostrados en este trabajo, revelan que la afinina incrementa los niveles de NO y H₂S y activa canales TRPA₁, exploramos la posibilidad de que la afinina sea capaz de activar la

vía del nitroxilo (HNO)-TRPA₁-CGRP, induciendo vasodilatación. En estudios previos, se ha demostrado que el NO y el H₂S, generados en el endotelio, reaccionan entre sí para producir HNO, el cual puede difundir y activar los canales TRPA₁ localizados en las fibras nerviosas perivasculares (Nagpure y Bian, 2016). El HNO activa los canales TRPA₁ a través de la formación de enlaces disulfuro en el extremo amino del canal TRPA₁, lo que induce la liberación del CGRP que relaja el músculo liso vascular (Doi *et al.*, 2001; Aubdool *et al.*, 2014; Eberhardt *et al.*, 2014; Earley y Brayden, 2015; Peixoto-Neves *et al.*, 2019). Con el fin de confirmar la participación de la vía de señalización HNO-TRPA₁-CGRP en el efecto vasodilatador producido por la afinina, incubamos segmentos de aorta con cisteína, un captador específico de HNO (Pino y Feelisch, 1994; Andrews *et al.*, 2015) y determinamos que la captura de HNO disminuyó significativamente la vasodilatación provocada por afinina, confirmando la participación de la vía de señalización HNO-TRPA₁-CGRP en la disminución del tono de la musculatura lisa arterial producida por esta alcalamida.

La vasodilatación producida por CGRP involucra la participación de vías dependientes e independientes de la presencia de endotelio (Brain y Grant, 2004). La vía independiente del endotelio comprende la activación directa de los receptores CGRP presentes en la membrana plasmática de las células musculares lisas, lo cual permite, a través de la G α s de una proteína G, estimular la AC para desencadenar la producción de AMPc y una mayor activación de la proteína quinasa A (PKA). Esta enzima fosforila los canales de K⁺ sensibles al ATP que conducen a su apertura, lo que provoca la relajación del músculo liso vascular (Nelson *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 2014). Alternativamente, CGRP puede operar a través de un receptor endotelial, cuya activación resulta en un aumento en la producción de AMPc y NO, a causa de la fosforilación y la activación de la eNOS por PKA. El NO producido difunde hacia las células del músculo liso y activa la guanilato ciclasa soluble, lo que conduce a la síntesis de GMPc y, por lo tanto, a la vasodilatación (Gray y Marshall, 1992; Russell *et al.*, 2014). En el presente estudio, observamos que el efecto vasodilatador de la afinina se redujo significativamente al inhibir a la AC con MDL-12,133A, lo que respalda aún más que la vasodilatación inducida por

afinina involucra la activación de la vía de señalización del HNO-TRPA₁-CGRP. De hecho, es probable que la estimulación de los receptores de CGRP endoteliales contribuya a la activación de la vía del NO/GMPc inducida por la afinina.

Debido a que algunas alcanidas, como la anandamida, son capaces de activar receptores a cannabinoides (Boonen *et al.*, 2012), realizamos experimentos para evaluar la participación del sistema cannabinoide en el efecto vasodilatador producido por afinina. Nuestros resultados mostraron que la inhibición específica de los receptores CB₁ disminuye el efecto vasodilatador producido por afinina. Sin embargo, la inhibición de los receptores CB₂ no disminuyó la vasodilatación de esta alcanida. Estos resultados indicaron que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de los receptores a cannabinoides CB₁; sin embargo, los receptores CB₂ no juegan un papel importante en la vasodilatación provocada por esta molécula. Aunque los receptores CB₁ se han identificado tanto en el músculo liso como en el endotelio de diferentes lechos vasculares, incluida la aorta (López-Miranda *et al.*, 2008; Stanley y O'Sullivan, 2014; O'Sullivan, 2015), nuestros resultados mostraron que la afinina activa principalmente a los receptores CB₁ presentes en el endotelio vascular, debido a que su efecto relajante de la musculatura lisa arterial no fue afectado por el antagonista CB₁ en aorta sin endotelio. Nuestros resultados están de acuerdo con reportes previos, que indican que la activación de los receptores CB₁ produce vasodilatación a través de la activación de la vía NO/GMPc y la apertura de los canales de K⁺ (Stanley y O'Sullivan, 2014; Kaur *et al.*, 2016; Karpińska *et al.*, 2018). Este estudio muestra por primera vez que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de los receptores cannabinoides CB₁ localizados en el endotelio.

Estudios previos han demostrado que algunas alcanidas pueden modificar la biodisponibilidad de los endocannabinoides, como el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la anandamida, ya sea a través de cambios en la recaptura de endocannabinoides o disminuyendo su degradación (López-Miranda *et al.*, 2008). La hidrólisis de endocannabinoides producida por la enzima hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) es uno de los principales mecanismos de degradación de los endocannabinoides (Herradón *et al.*, 2007; López-Miranda *et al.*, 2008). Se han

realizado experimentos para evaluar la capacidad de diferentes alcaloides sintéticos y naturales para inhibir esta enzima o su susceptibilidad de ser hidrolizadas por FAAH (Herradón *et al.*, 2007; Hajdu *et al.*, 2014; Nicolussi *et al.*, 2014). En este trabajo, no observamos cambios en la vasodilatación inducida por afinina en presencia de URB937, un inhibidor de FAAH, lo que sugiere que la afinina no modifica la actividad enzimática de FAAH. Sin embargo, nuestros experimentos no descartan la posibilidad de que la afinina pueda estar modificando la disponibilidad de endocannabinoides a través de otras vías metabólicas.

Los receptores CB₁ son receptores GPCR que están acoplados a la familia G_{i/o} de proteínas G, las cuales clásicamente son conocidas por inhibir la AC (Howlett *et al.*, 2002). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que la estimulación de los receptores a cannabinoides puede también inducir la activación de AC o PLC (Sugiura *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 2001). En el presente trabajo, demostramos que la inhibición inespecífica de las proteínas G por la suramina disminuye significativamente el efecto vasodilatador inducido por afinina, confirmando la participación de GPCR, como los receptores a cannabinoides CB₁, en su mecanismo de acción. Sorprendentemente, encontramos que la galleina, un inhibidor de la señalización de la subunidad G_{βγ} (Bonacci *et al.*, 2006; Karuppagounder *et al.*, 2018), disminuyó también la vasodilatación inducida por afinina, lo que sugiere que la activación de los receptores CB₁ podría involucrar la señalización del dímero βγ. De hecho, algunos estudios han demostrado que la subunidad βγ activa algunas isoformas de AC y PLC (Camps *et al.*, 1992; Rhee *et al.*, 1998), independientemente de las subunidades alfa G_{αi/o} asociadas a los receptores a cannabinoides (Boyer *et al.*, 1992; Camps *et al.*, 1992; Rhee *et al.*, 1998; Badal *et al.*, 2017). En este trabajo evaluamos si la activación de los receptores CB₁ por afinina inducía la activación de la PLC por acción del dímero βγ. Nuestros resultados indicaron que la inhibición de esta enzima por U73122 disminuyó el efecto vasorrelajante de la afinina, lo que sugiere que la subunidad G_{βγ}, liberada después de la activación de los receptores CB₁ por la afinina, activa a la

PLC, contribuyendo al incremento de calcio intracelular, de NO y, por tanto, de la relajación de la aorta.

Todos los mecanismos descritos anteriormente dependen de la presencia de endotelio. Sin embargo, aún se desconocen los blancos moleculares asociados en la vasodilatación independiente del endotelio producida por afinina. Una de las posibilidades que podría explicar la vasodilatación independiente de endotelio es el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC). Se ha descrito previamente que algunas alcaloides provocan un efecto vasodilatador a través del bloqueo de este tipo de canales (García *et al.*, 2016). Para evaluar esta hipótesis, determinamos la participación de los VDCC en la vasodilatación producida por afinina. Nuestros resultados indicaron que la afinina indujo un bloqueo leve aunque significativo de los VDCC. Por lo tanto, se necesitan más experimentos para determinar los otros blancos moleculares implicados en la vasodilatación, independiente del endotelio, inducida por afinina.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los canales TRPA₁ y TRPV₁ y los receptores a cannabinoides CB₁, localizados en el endotelio vascular, participan en el efecto vasodilatador producido por la afinina. Para determinar la interacción entre la afinina y estos blancos moleculares, se realizó un estudio *in silico* de acoplamiento molecular. En primer término, se construyeron modelos moleculares de los canales TRPA₁ y TRPV₁ y del receptor CB₁. La calidad de estos modelos fue evaluada mediante diferentes metodologías computacionales. Posteriormente, se realizaron simulaciones en ausencia de afinina para permitir la relajación del receptor a su conformación más estable. Para obtener resultados similares a lo que se esperaría *in vivo*, se generó el modelo de la estructura completa de los canales TRPA₁ y TRPV₁ y el receptor CB₁ que incluye algunas de las modificaciones postraduccionales que han sido reportadas como importantes para el proceso de activación de estos blancos moleculares. Cuando fue posible, los modelos obtenidos se compararon con algunos de los modelos generados por criomicroscopía electrónica o cristalografía de rayos x en ausencia de ligando o en

presencia de un agonista para determinar el estado de activación de nuestro modelo.

Hasta donde sabemos, a la fecha no existen modelos computacionales que muestren el sitio de unión de la anandamida en el canal TRPA₁, a pesar de que se ha propuesto que este endocannabinoide activa a este canal (De Petrocellis *et al.*, 2012; Redmond *et al.*, 2014). El análisis de los resultados obtenidos para el canal TRPA₁ permitió identificar un sitio de unión al que potencialmente se unen, con elevada afinidad, la anandamida y la afinina. Este sitio presenta características principalmente hidrófobas, en donde la anandamida forma interacciones con una gran cantidad de aminoácidos entre los que se incluye K710 y puentes de hidrógeno con D653, I656 y E657. Por otro lado, la afinina se une al mismo sitio que la anandamida, formando interacciones comunes, incluyendo K710 y los enlaces de hidrógeno con I656 y E657. El sitio de unión de ambos compuestos, identificado en este trabajo corresponde a la región pre-S1 que se ha descrito como el sitio de unión para los agonistas electrofílicos (Giorgi *et al.*, 2019). Los agonistas electrofílicos son compuestos con la capacidad de formar aductos covalentes con residuos de lisina y cisteína en el dominio N-terminal de los canales TRPA₁ (Chen y Hackos, 2015). Entre los agonistas electrofílicos encontramos sustancias como el alilisotiocianato (AITC), cinamaldehído, alicina, acroleína e incluso tetrahidrocannabinol (THC) (Chen y Hackos, 2015; Giorgi *et al.*, 2019). Algunos de ellos, como el AITC o el cinamaldehído, se caracterizan por ser compuestos de carbonilo alfa-beta insaturado. Este doble enlace puede ser atacado por cisteínas electrofílicas de los canales TRPA₁ a través de la reacción de adición de Michael (Macpherson *et al.*, 2007). Las cisteínas más importantes descritas en estos ataques son C619, C639 y C663, que se encuentran en el extremo amino de estos canales. También se ha sugerido que las lisinas (incluyendo K710) pueden reaccionar con isotiocianatos, lo que permite la activación del canal (Hinman *et al.*, 2006). En este trabajo, observamos que el residuo K710 se encuentra aproximadamente a 3.4 Å del enlace de 6Z de la afinina y a 5 Å del enlace de 8Z de la anandamida, lo que sugiere la formación de un enlace covalente con la afinina a través de una reacción de adición de Michael. No obstante, las características de la afinina y de la anandamida no

parecen ser adecuadas para una reacción de este tipo, por lo que es poco probable que ocurra. Aunque, no se descarta la posibilidad de una reacción covalente con K710 distinta a la descrita aquí, o en algún momento posterior en la simulación, resulta más probable alguna interacción no covalente. Hasta la fecha, no se han descrito alcanidas ni endocannabinoides que se unan al mismo sitio que describimos en este trabajo. Sin embargo, se ha observado que el α -hidroxisanshool y otras alcanidas derivadas de él pueden activar los canales TRPA₁. Estas alcanidas requieren de la presencia del doble enlace 6Z y la ausencia de α - β insaturaciones para activar este tipo de canales (Menozzi-Smarrito *et al.*, 2009; Riera *et al.*, 2009). Este último es uno de los rasgos distintivos de muchos agonistas eletrofílicos (Macpherson *et al.*, 2007). Por otro lado, en experimentos *in vitro* se ha observado que el α -hidroxisanshool y sus derivados forman aductos con glutatión, lo que sugiere la posibilidad de formar enlaces covalentes con cisteínas del canal TRPA₁. En el mismo trabajo, se describe que la sustitución de serina de los aminoácidos C621, C641 y C665, disminuye la sensibilidad de los canales a ser activados por α -hidroxisanshool, lo cual, de acuerdo a los investigadores, apoya la idea de interacciones covalentes con el canal TRPA₁ (Riera *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran que la distancia entre la afinina o la anandamida y los residuos C621, C641 o C665 es muy grande como para considerar una interacción, por lo que resulta muy poco probable la interacción con estos aminoácidos. Si bien los resultados de nuestros experimentos *in silico* no muestran claramente la activación del canal, constituyen un punto de partida para su futura evaluación, por lo que resulta muy importante realizar experimentos adicionales y simulaciones por períodos más largos para determinar la evolución del sistema, lo cual permitirá elucidar el mecanismo de activación del canal TRPA₁ por afinina.

Debido a que nuestros resultados, realizados en tejidos aislados, indicaron que los canales TRPV₁ están involucrados en el efecto vasodilatador de la afinina, llevamos a cabo también un estudio *in silico* de acoplamiento molecular de esta alcanida con el canal TRPV₁. De manera similar que en el caso de TRPA₁, primero, generamos el modelo de estructura completa del canal TRPV₁, incluidas algunas de

las modificaciones postraduccionales importantes para la activación del canal. Los resultados del análisis computacional muestran que nuestro modelo comparte mayor similitud con el canal TRPV₁ cerrado en ausencia de ligando (pdb 3J5P), que con el complejo TRPV₁-capsaicina (pdb 3J5R) que está en un estado parcialmente abierto y presenta aún menos similitud con el modelo RTX/DkTx que representa el canal completamente abierto (pdb: 3J5Q). Considerando estos grados de similitud entre diferentes modelos, nuestros resultados sugieren que nuestro modelo representa las primeras etapas del proceso de activación del canal TRPV₁ (Yang *et al.*, 2015). Al analizar los resultados del acoplamiento con los ligandos en estudio, aunque encontramos que la capsaicina se une al mismo sitio como se describió anteriormente (Cao *et al.*, 2013b), no observamos enlaces de hidrógeno con los aminoácidos T550 y E570. La configuración de T550 y E570 en nuestro modelo está orientada, de manera similar a la observada en canales cerrados; sin embargo, la orientación de Y511 es perpendicular al anillo aromático de capsaicina, similar a la observada en canales parcialmente activados o activados (Gavva *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2013b; Yang *et al.*, 2015; Elokely *et al.*, 2016). Las diferencias en la posición de Y511 en nuestro modelo, con respecto a lo reportado en trabajos previos, se pueden atribuir al uso del entorno de membrana implícita, utilizado en investigaciones anteriores para atrapar la capsaicina, con el fin de simular la presencia de lípidos endógenos en la bolsa de unión del canal, que se ha especulado están presentes en el canal cerrado (Yang *et al.*, 2015). Este modelo contrasta con la conformación observada en nuestro modelo como resultado de las simulaciones de dinámica molecular con membrana explícita sin capsaicina. Por otra parte, se ha descrito que los residuos Y511, T550 y E570 son críticos para el proceso de activación del canal TRPV₁, por lo que las diferencias observadas son consistentes con las primeras etapas del proceso de activación y son interesantes para un profundo análisis posterior (Gavva *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2015). En las condiciones utilizadas en este trabajo, observamos que la afinina se une al mismo sitio y con un patrón de interacciones similar al observado para la capsaicina, aunque en el caso de la afinina se observa el puente de hidrógeno con T550, pero no con E570. Nuestros resultados están de acuerdo con resultados previamente

reportados, los cuales mostraron que la afinina se une en el mismo sitio que la capsaicina y que esta alcalamida y otras alcalamidas naturales interactúan con T550, pero no con E570; la ausencia de interacción con este último residuo se relacionó con la ausencia de pungencia de las alcalamidas estudiadas (de la Rosa-Lugo *et al.*, 2017). Sin embargo, considerando que se ha propuesto que E570 está asociado con la "activación" del canal, resulta más probable que la ausencia de interacciones con este aminoácido represente etapas iniciales de activación (Yang *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta todo lo anterior, nuestros resultados proporcionan evidencia adicional de que la afinina activa directamente a los canales TRPV₁, induciendo un incremento en el calcio intracelular en el endotelio y, por lo tanto, la vasodilatación. De acuerdo con nuestros resultados *in silico*, nuestro modelo representa etapas anteriores en el proceso de activación del canal, lo cual contrasta y complementa el trabajo realizado por otros grupos de investigación. Finalmente, tomando en consideración las condiciones empleadas en este trabajo, es posible que tiempos más largos de simulación de dinámica molecular del complejo permitan observar la interacción entre la afinina con E570, por lo que la perspectiva de este experimento resulta prometedora y debe ser estudiada con mayor profundidad.

Nuestros resultados en el ensayo de aorta aislada de rata indicaron que el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación de los receptores CB₁, por esta razón, realizamos el análisis *in silico* de la interacción molecular entre la afinina y el receptor CB₁, empleando anandamida como control positivo. Al comparar nuestro modelo con modelos anteriores, observamos una mayor similitud con el receptor en un estado inactivo (pdb: 5TGZ) que con el receptor activado por ligando (pdb: 6KPG). Por otro lado, las conformaciones observadas de aminoácidos críticos en el proceso de activación del receptor (Y294, N393, P394 e Y397) resultaron ser similares a las observadas en el receptor en estado activo (6KPG) (Hua *et al.*, 2020). Nuestros resultados sugieren que nuestro modelo corresponde a las etapas iniciales del proceso de activación del receptor CB₁. En nuestro modelo, la anandamida se une en una conformación similar a la sugerida previamente (Jakowiecki y Filipek, 2016; Hua *et al.*, 2017). Sin embargo, observamos que la posición en que se encuentra este endocannabinoide es diferente. El sitio de unión de la anandamida

observado en este trabajo muestra las mismas interacciones descritas en otros trabajos, sin importar el cambio de ubicación con respecto a reportes previos. Esto podría ser consistente con las primeras etapas del proceso de activación del receptor CB₁ (Jakowiecki y Filipek, 2016). Es interesante notar que los residuos involucrados en la unión de la anandamida a nuestro modelo, coincide con modelos anteriores (Hua *et al.*, 2016; Jakowiecki y Filipek, 2016; Hua *et al.*, 2017; Hua *et al.*, 2020). Por ejemplo, tanto F174 como F177 se han relacionado con el proceso de estabilización de anandamida durante su entrada al receptor, y se ha sugerido que F177 es relevante en la activación del receptor CB₁ (Jakowiecki y Filipek, 2016). Además, se ha observado que F268 y F379 interactúan con los agonistas del receptor CB₁ en ensayos *in vitro* e *in silico* (Ahn *et al.*, 2009; Hua *et al.*, 2016). Por otro lado, la afinina se une al mismo sitio de la anandamida en nuestro modelo, aunque en este caso, la unión se produce con un score de unión aproximadamente 2 kcal/mol menor que la observada con anandamida, esto indica que la afinidad de afinina por los receptores CB₁ es mucho mayor que el de la anandamida.

Nuestros resultados farmacológicos *in silico* proporcionan evidencia adicional que sugiere que la afinina se une directamente a los canales TRPA₁ y TRPV₁ y los receptores CB₁, dando como resultado su activación e induciendo, por consiguiente, la vasodilatación. Además, considerando la energía de unión de esta alcaloide con cada uno de estos blancos moleculares, nuestros resultados sugieren que la afinina se une con mayor afinidad al receptor CB₁. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, resulta razonable suponer que este metabolito induce una activación paralela e incluso convergente de estos blancos moleculares en la arteria intacta.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo es posible proponer el mecanismo de acción, por medio del cual la afinina produce su efecto vasodilatador. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que este compuesto es capaz de activar los canales TRPA₁ y TRPV₁, ubicados en el endotelio vascular de la aorta de rata, promoviendo un aumento en los niveles de Ca²⁺ en las células endoteliales, lo que a su vez activa la síntesis de NO y H₂S. Ambas moléculas de señalización gaseosa inducen vasorrelajación. De hecho, demostramos

previamente que el efecto vasodilatador de la afinina comprende la estimulación de las vías de señalización del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP} (Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

De forma paralela, el aumento de la producción de NO y H₂S, inducida por afinina, conduce a un incremento en la formación de HNO en las células endoteliales. El HNO se difunde para alcanzar los nervios sensoriales perivasculares que expresan TRPA₁, provocando la entrada de calcio y la liberación del CGRP. El CGRP liberado activa directamente a sus receptores, los cuales son receptores acoplados a proteínas G_{αs}, que se encuentran en la membrana citoplasmática de los músculos lisos vasculares, activando a la AC e induciendo vasodilatación. De esta manera, la relajación arterial inducida por afinina y/o por HNO puede ser causada por la activación de los canales TRPA₁ localizados en el endotelio vascular o en neuronas perivasculares.

Nuestros resultados también mostraron que la afinina puede activar los receptores CB₁, lo que induce la activación de la PLC, posiblemente a través de la acción del dímero βγ. La PLC induce la liberación de DAG e IP₃ a partir del fosfolípido PIP₂, el cual puede inhibir a los canales TRPA₁ y TRPV₁, por lo que su hidrólisis sensibiliza a estos canales. Además, el IP₃ incrementa el calcio intracelular, contribuyendo a la relajación de la aorta (Trevisani *et al.*, 2007; Rohacs *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2013a) (Figura 43).

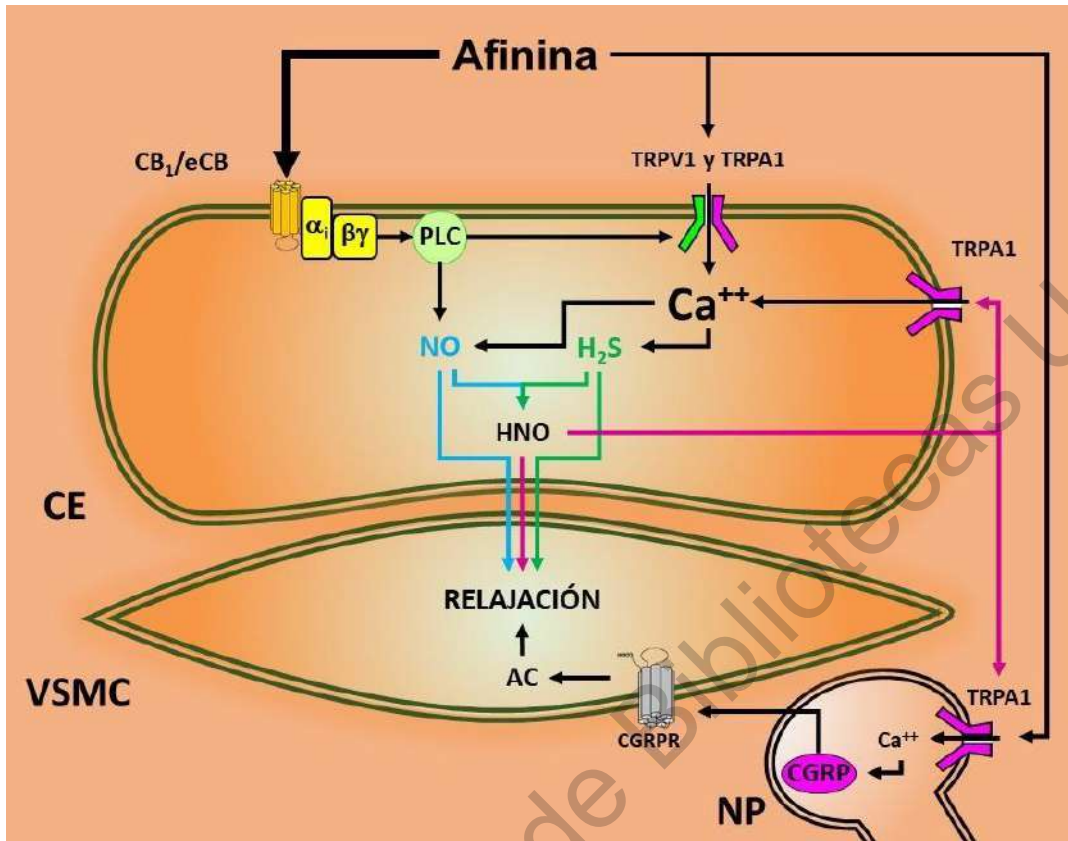


Figura 43. Mecanismo propuesto de la vasodilatación inducida por afinina. EC= célula endotelial; VSMC= célula muscular lisa; NP= Neuron perivascular

9. CONCLUSIONES

1. El efecto vasodilatador de la afinina o espilantol involucra la activación de los canales TRPA₁ y TRPV₁ y de los receptores cannabinoides CB₁, localizados en el endotelio vascular.
2. La afinina eleva los niveles de NO y H₂S, dando como resultado la producción de HNO, el cual produce la activación de los canales TRPA₁ y la liberación del CGRP, induciendo la activación de la AC y la vasodilatación, lo cual confirma la participación de la vía del HNO-TRPA₁-CGRP en la vasodilatación producida por esta alcaloide.
3. El dímero βγ, liberado por la activación de los receptores cannabinoides CB₁ por afinina, activa la PLC, incrementando la producción de transmisores gaseosos y, por tanto, la vasodilatación.
4. El bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L son responsables, al menos en parte, de la vasodilatación, independiente de endotelio, producida por la afinina.
5. La afinina se une con elevada afinidad a los canales TRPA₁ y TRPV₁ y a los receptores cannabinoides CB₁.
6. La afinina representa un candidato prometedor para el desarrollo de fármacos útiles para tratar la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, debido a que relaja la aorta mediante la activación de nuevos blancos moleculares, los cuales involucran sistemas de transducción novedosos.

10. REFERENCIAS

- Acree, F., M. Jacobson, y H. L. Haller. 1945. The Structure of Affinin, the Insecticidal Amide From *Erigeron Affinis* D. C. *J. Org. Chem.* 10:449–451. doi:10.1021/jo01181a010.
- Ahn, K. H., A. C. Bertalovitz, D. F. Mierke, y D. A. Kendall. 2009. Dual role of the second extracellular loop of the cannabinoid receptor 1: Ligand binding and receptor localization. *Mol. Pharmacol.* 76:833–842. doi:10.1124/mol.109.057356.
- Aita, A., M. G. Pinzagli, P. Verdecchia, M. Trapasso, G. Reboldi, F. Angeli, y G. Gentile. 2019. European and US guidelines for arterial hypertension: similarities and differences. *Eur. J. Intern. Med.* 1–6. doi:10.1016/j.ejim.2019.01.016.
- Alsuleimani, Y. M., y C. R. Hiley. 2013. Mechanisms of vasorelaxation induced by oleoylethanolamide in the rat small mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* 702:1–11. doi:10.1016/j.ejphar.2013.01.006.
- Altschul, S. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389.
- Altschul, S. F., J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schaffer, y Y.-K. Yu. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272:5101–5109. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x.
- Andrews, K. L., N. G. Lumsden, J. Farry, A. Jefferis, y B. K. Kemp-harper. 2015. Nitroxyl: a vasodilator of human vessels that is not susceptible to tolerance. *Clin. Sci.* 129:179–186. doi:10.1042/CS20140759.
- Anwar, M. A., S. S. Al Disi, y A. H. Eid. 2016. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I. *Front. Pharmacol.* 6:1–24. doi:10.3389/fphar.2016.00050.
- Aubdool, A. A., R. Graepel, X. Kodji, K. M. Alawi, J. V. Bodkin, S. Srivastava, C. Gentry, R. Heads, A. D. Grant, E. S. Fernandes, S. Bevan, y S. D. Brain. 2014. TRPA1 is essential for the vascular response to environmental cold exposure. *Nat. Commun.* 5:1–13. doi:10.1038/ncomms6732.
- Aubdool, A. A., X. Kodji, N. Abdul-Kader, R. Heads, E. S. Fernandes, S. Bevan, y

S. D. Brain. 2016. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. *Br. J. Pharmacol.* 173:2419–2433. doi:10.1111/bph.13519.

Badal, S., K. N. Smith, y R. Rajnarayanan. 2017. Analysis of Natural Product Regulation of Cannabinoid Receptors in the treatment of Human Disease. *Pharmacol. Ther.* doi:10.1016/j.pharmthera.2017.06.003.

Barbosa, A. F., M. G. de Carvalho, R. E. Smith, y A. U. O. Sabaa-Srur. 2016. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Rev. Bras. Farmacogn.* 26:128–133. doi:10.1016/j.bjp.2015.07.024.

Bisogno, T., D. Melck, M. Y. Bobrov, N. M. Gretskaya, V. V. Bezuglov, L. De Petrocellis, y V. Di Marzo. 2000. N-acyl-dopamines: Novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 351:817. doi:10.1042/0264-6021:3510817.

Bonacci, T. M., J. L. Mathews, C. Yuan, D. M. Lehmann, S. Malik, D. Wu, J. L. Font, J. M. Bidlack, y A. V. Smrcka. 2006. Differential Targeting of G -Subunit Signaling with Small Molecules. *Science (80-)*. 312:443–446. doi:10.1126/science.1120378.

Bondarenko, A. I. 2014. Endothelial atypical cannabinoid receptor: Do we have enough evidence? *Br. J. Pharmacol.* 171:5573–5588. doi:10.1111/bph.12866.

Boonen, J., B. Baert, N. Roche, C. Burvenich, y B. De Spiegeleer. 2010. Transdermal behaviour of the N -alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthos acmella* (Compositae) extracts. *J. Ethnopharmacol.* 127:77–84. doi:10.1016/j.jep.2009.09.046.

Boonen, J., A. Bronselaer, J. Nielandt, L. Veryser, G. De Tré, y B. De Spiegeleer. 2012. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *J. Ethnopharmacol.* 142:563–590. doi:10.1016/j.jep.2012.05.038.

Boyer, J. L., G. L. Waldo, y T. K. Harden. 1992. Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 267:25451–25456. doi:10.1016/S0021-9258(19)74062-9.

Brain, S. D., y A. D. Grant. 2004. Vascular actions of calcitonin gene-related

peptide and adrenomedullin. *Physiol. Rev.* 84:903–934.

doi:10.1152/physrev.00037.2003.

Brancaleone, V., F. Roviezzo, V. Vellecco, L. De Gruttola, M. Bucci, y G. Cirino. 2008. Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br. J. Pharmacol.* 155:673–680. doi:10.1038/bjp.2008.296.

Bryan, N. S., y M. B. Grisham. 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43:645–657.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.

Bussi, G., D. Donadio, y M. Parrinello. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126. doi:10.1063/1.2408420.

Camps, M., A. Carozzi, P. Schnabel, A. Scheer, P. J. Parker, y P. Gierschik. 1992. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits.

Nature. 360:684–686. doi:10.1038/360684a0.

Cao, E., J. F. Cordero-Morales, B. Liu, F. Qin, y D. Julius. 2013a. TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids. *Neuron.* 77:667–679. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.016.

Cao, E., M. Liao, Y. Cheng, y D. Julius. 2013b. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature.* 504:113–118.

doi:10.1038/nature12823.

Cariño-Cortés, R., J. A. Gayosso-De-Lucio, M. I. Ortiz, M. Sánchez-Gutiérrez, P. B. García-Reyna, V. G. Cilia-López, N. Pérez-Hernández, E. Moreno, y H. Ponce-Monter. 2010. Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *J. Ethnopharmacol.* 130:216–221.

doi:10.1016/j.jep.2010.04.037.

Castro-Ruiz, J. E. 2019. Estudio del efecto vasodilatador de la afinina, purificada a partir de las raíces de *Heliopsis longipes* y determinación su mecanismo de acción. Universidad Autónoma de Querétaro.

Castro-Ruiz, J. E., A. Rojas-Molina, F. J. Luna-Vázquez, F. Rivero-Cruz, T. García-Gasca, y C. Ibarra-Alvarado. 2017. Affinin (*Spilanthol*), isolated from *heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1–15. doi:10.3390/ijms18010218.

Chen, J., y D. H. Hackos. 2015. TRPA1 as a drug target - Promise and challenges. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 388:451–463. doi:10.1007/s00210-015-1088-3.

Choi, K. M., W. Kim, J. T. Hong, y H. S. Yoo. 2017. Dodeca-2(E),4(E)-dienoic acid isobutylamide enhances glucose uptake in 3T3-L1 cells via activation of Akt signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 426:9–15. doi:10.1007/s11010-016-2876-x.

Cilia-López, V. G., B. I. Juárez-flores, J. R. Aguirre-rivera, y J. A. Reyes-Agüero. 2010. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharm. Biol.* 48:195–200. doi:10.3109/13880200903078495.

Cilia-López, V. G., J. A. Reyes-Agüero, J. R. Aguirre-rivera, y B. I. Juárez-flores. 2013. Ampliación de la descripción y aspectos taxonómicos de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Polibotánica.* 36:1–13.

Coletta, C., A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Módis, y P. Panopoulos. 2012. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. 109:1–6. doi:10.1073/pnas.1202916109.

Colvard, M. D., G. A. Cordell, R. Villalobos, G. Sancho, D. D. Soejarto, W. Pestle, T. Lobo, K. M. Perkowski, y J. Michel. 2006. Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. *J. Ethnopharmacol.* 107:134–142. doi:10.1016/j.jep.2006.04.005.

Córdova-Villalobos, J., J. Barriguete-Meléndez, A. Lara-Esqueda, S. Barquera, M. Rosas-Peralta, M. Hernández-Ávila, M. De León-May, y C. Aguilar-Salinas. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Publica Mex.* 50:419–427. doi:10.1590/S0036-36342008000500015.

Darré, L., y C. Domene. 2015. Binding of Capsaicin to the TRPV1 Ion Channel. *Mol. Pharm.* 12:4454–4465. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00641.

Déciga-Campos, M., M. Rios, y A. Aguilar-Guadarrama. 2010. Antinociceptive Effect of *Heliopsis longipes* Extract and Affinin in Mice. *Planta Med.* 76:665–670. doi:10.1055/s-0029-1240658.

Devane, W., L. Hanus, A. Breuer, R. Pertwee, L. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson,

A. Mandelbaum, A. Etinger, y R. Mechoulam. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* (80-.). 258:1946–1949. doi:10.1126/science.1470919.

Di, A., y A. B. Malik. 2010. TRP channels and the control of vascular function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10:127–132. doi:10.1016/j.coph.2009.11.010.

Doi, Y., H. Kudo, T. Nishino, K. Kayashima, H. Kiyonaga, T. Nagata, S. Nara, M. Morita, y S. Fujimoto. 2001. Synthesis of calcitonin gene-related peptide (CGRP) by rat arterial endothelial cells. *Histol. Histopathol.* 16:1073–1079. doi:10.14670/HH-16.1073.

Dossou, K. S. S., K. P. Devkota, C. Morton, J. M. Egan, G. Lu, J. A. Beutler, y R. Moaddel. 2013. Identification of CB1/CB2 ligands from *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Nat. Prod.* 76:2060–2064. doi:10.1021/np400478c.

Dubey, S., S. Maity, M. Singh, S. A. Saraf, y S. Saha. 2013. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. *Adv. Pharmacol.Sci.* 2013:1–9. doi:10.1155/2013/423750.

Earley, S., y J. E. Brayden. 2015. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol. Rev.* 645–690. doi:10.1152/physrev.00026.2014.

Earley, S., A. Gonzales, y R Crnich. 2008. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. *Bone.* 23:1–7. doi:10.1038/jid.2014.371.

Eberhardt, M., M. Dux, y B. Namer. 2014. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.* 5. doi:10.1038/ncomms5381.

Elokely, K., P. Velisetty, L. Delemotte, E. Palovcak, M. L. Klein, T. Rohacs, y V. Carnevale. 2016. Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:E137–E145. doi:10.1073/pnas.1517288113.

Lo Faro, M. L., B. Fox, J. L. Whatmore, P. G. Winyard, y M. Whiteman. 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 41:38–47. doi:10.1016/j.niox.2014.05.014.

Fernandes, E. S., M. A. Fernandes, y J. E. Keeble. 2012. The functions of TRPA1

and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br. J. Pharmacol.* 166:510–521. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.

Ganong, W. 2010. *Fisiología médica*. 23a ed. McGraw-Hill-Interamericana, México, D.F.

García-Chávez, A., E. Ramírez Chávez, y J. Molina-Torres. 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Bot. Mex.* 69:115. doi:10.21829/abm69.2004.983.

Garcia, D. C. G., A. C. Pereira, S. J. C. Gutierrez, J. M. Barbosa-filho, V. S. Lemos, y S. F. Côrtes. 2016. Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkalimides in mice mesenteric artery. *Vascul. Pharmacol.* 82:60–65. doi:10.1016/j.vph.2016.05.001.

Gavva, N. R., L. Klionsky, Y. Qu, L. Shi, R. Tamir, S. Edenson, T. J. Zhang, V. N. Viswanadhan, A. Toth, L. V. Pearce, T. W. Vanderah, F. Porreca, P. M. Blumberg, J. Lile, Y. Sun, K. Wild, J. C. Louis, y J. J. S. Treanor. 2004. Molecular Determinants of Vanilloid Sensitivity in TRPV1. *J. Biol. Chem.* 279:20283–20295. doi:10.1074/jbc.M312577200.

Gilboa Garber, N. 1971. Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological materials and in other complex mixtures. *Anal Biochem.* 133:129–133. doi:10.1016/0003-2697(71)90116-3.

Giorgi, S., M. Nikolaeva-Koleva, D. Alarcón-Alarcón, L. Butrón, y S. González-Rodríguez. 2019. Is TRPA1 burning down TRPV1 as druggable target for the treatment of chronic pain? *Int. J. Mol. Sci.* 20:1–20. doi:10.3390/ijms20122906.

Gray, D. W., y I. Marshall. 1992. Human α -calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 107:691–696. doi:10.1111/j.1476-5381.1992.tb14508.x.

Greger, H. 1984. Alkamides: Structural Relationships, Distribution and Biological Activity 1. *Planta Med.* 50:366–375. doi:10.1055/s-2007-969741.

Guyton, A. C., y J. E. Hall. 2016. *Tratado de Fisiología Médica*. 13th ed. Elsevier, Barcelona.

Hajdu, Z., S. Nicolussi, M. Rau, L. Lorántfy, P. Forgo, J. Hohmann, D. Csupor, y J.

Gertsch. 2014. Identification of endocannabinoid system-modulating N-alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. *J. Nat. Prod.* 77:1663–1669. doi:10.1021/np500292g.

Hernández, I., L. Márquez, I. Martínez, R. Dieguez, C. Delporte, S. Prieto, J. Molina-torres, y G. Garrido. 2009. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. *J. Ethnopharmacol.* 124:649–652. doi:10.1016/j.jep.2009.04.060.

Herradón, E., M. MI, y V. López-Miranda. 2007. Characterization of the vasorelaxant mechanisms of the endocannabinoid anandamide in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 152:699–708. doi:10.1038/sj.bjp.0707404.

Hiley, C. R., y P. M. Hoi. 2007. Oleamide: A fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? *Cardiovasc. Drug Rev.* 25:46–60. doi:10.1111/j.1527-3466.2007.00004.x.

Hinman, A., H. -h. Chuang, D. M. Bautista, y D. Julius. 2006. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:19564–19568. doi:10.1073/pnas.0609598103.

Hoi, P. M., y C. R. Hiley. 2006. Vasorelaxant effects of oleamide in rat small mesenteric artery indicate action at a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 147:560–568. doi:10.1038/sj.bjp.0706643.

Hong, S., J. Fan, E. S. Kemmerer, S. Evans, Y. Li, y J. W. Wiley. 2009. Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. *Gut.* 58:202–210. doi:10.1136/gut.2008.157594.

Hopps, J. J., W. R. Dunn, y M. D. Randall. 2012. Enhanced vasorelaxant effects of the endocannabinoid-like mediator, oleamide, in hypertension. *Eur. J. Pharmacol.* 684:102–107. doi:10.1016/j.ejphar.2012.03.027.

Howlett, a C., M. R. Johnson, L. S. Melvin, y G. M. Milne. 1988. Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol. Pharmacol.* 33:297–302.

Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam, y R. G. Pertwee.

2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54:161–202. doi:10.1124/pr.54.2.161.

Hua, T., X. Li, L. Wu, C. Iliopoulos-Tsoutsouvas, Y. Wang, M. Wu, L. Shen, C. A. Johnston, S. P. Nikas, F. Song, X. Song, S. Yuan, Q. Sun, Y. Wu, S. Jiang, T. W. Grim, O. Benchama, E. L. Stahl, N. Zvonok, S. Zhao, L. M. Bohn, A. Makriyannis, y Z. J. Liu. 2020. Activation and Signaling Mechanism Revealed by Cannabinoid Receptor-Gi Complex Structures. *Cell.* 180:655-665.e18. doi:10.1016/j.cell.2020.01.008.

Hua, T., K. Vemuri, S. P. Nikas, R. B. Laprairie, Y. Wu, L. Qu, M. Pu, A. Korde, S. Jiang, J. H. Ho, G. W. Han, K. Ding, X. Li, H. Liu, M. A. Hanson, S. Zhao, L. M. Bohn, A. Makriyannis, R. C. Stevens, y Z. J. Liu. 2017. Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1. *Nature.* 547:468–471. doi:10.1038/nature23272.

Hua, T., K. Vemuri, M. Pu, L. Qu, G. W. Han, Y. Wu, S. Zhao, W. Shui, S. Li, A. Korde, R. B. Laprairie, E. L. Stahl, J. H. Ho, N. Zvonok, H. Zhou, I. Kufareva, B. Wu, Q. Zhao, M. A. Hanson, L. M. Bohn, A. Makriyannis, R. C. Stevens, y Z. J. Liu. 2016. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell.* 167:750-762.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.10.004.

Huffman, J. W., K. Mackie, P. Pacher, M. Rajesh, P. Mukhopadhyay, y G. Hasko. 2008. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF- α -induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br. J. Pharmacol.* 153:347–357. doi:10.1038/sj.bjp.0707569.

INEGI. 2016. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Available from: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Jakowiecki, J., y S. Filipek. 2016. Hydrophobic Ligand Entry and Exit Pathways of the CB1 Cannabinoid Receptor. *J. Chem. Inf. Model.* 56:2457–2466. doi:10.1021/acs.jcim.6b00499.

Jarai, Z., J. A. Wagner, K. Varga, K. D. Lake, D. R. Compton, B. R. Martin, A. M.

Zimmer, T. I. Bonner, N. E. Buckley, E. Mezey, R. K. Razdan, A. Zimmer, y G. Kunos. 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:14136–14141. doi:10.1073/pnas.96.24.14136.

Kádková, A., V. Synytsya, J. Krusek, L. Zímová, y V. Vlachová. 2017. Molecular Basis of TRPA1 Regulation in Nociceptive Neurons. A Review. *Physiol. Res.* 66:425–439. doi:10.33549/physiolres.933553.

Karpińska, O., M. Baranowska-Kuczko, M. Kloza, y H. Kozłowska. 2018. Endocannabinoids modulate Gq/11 protein-coupled receptor agonist-induced vasoconstriction via a negative feedback mechanism. *J. Pharm. Pharmacol.* 70:214–222. doi:10.1111/jphp.12854.

Karuppagounder, V., A. Bajpai, S. Meng, S. Arumugam, R. Sreedhar, V. V. Giridharan, A. Guha, A. Bhimaraj, K. A. Youker, S. S. Palaniyandi, H. Karmouty-Quintana, F. Kamal, K. L. Spiller, K. Watanabe, y R. A. Thandavarayan. 2018. Small molecule disruption of G protein $\beta\gamma$ subunit signaling reprograms human macrophage phenotype and prevents autoimmune myocarditis in rats. *PLoS One.* 13:1–16. doi:10.1371/journal.pone.0200697.

Kaur, R., S. R. Ambwani, y S. Singh. 2016. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Curr. Clin. Pharmacol.* 11:110–117. doi:10.2174/1574884711666160418105339.

Kemp-Harper, B. K., J. D. Horowitz, y R. H. Ritchie. 2016. Therapeutic Potential of Nitroxyl (HNO) Donors in the Management of Acute Decompensated Heart Failure. *Drugs.* 76:1337–1348. doi:10.1007/s40265-016-0631-y.

Koo, J. Y., Y. Jang, H. Cho, C. H. Lee, K. H. Jang, Y. H. Chang, J. Shin, y U. Oh. 2007. Hydroxy- α -sanshool activates TRPV1 and TRPA1 in sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 26:1139–1147. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05743.x.

de la Rosa-Lugo, V., M. Acevedo-Quiroz, M. Déciga-Campos, y M. Y. Rios. 2017. Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 69:884–895. doi:10.1111/jphp.12721.

Lahera, V., N. de las Heras, y V. Cachofeiro. 2005. Fisiología del endotelio. En: *Anatomía Y Fisiología Del Cuerpo Humano.* 3ra ed. McGraw-Hill, Madrid. p. 912.

Liao, M., E. Cao, D. Julius, y Y. Cheng. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 504:107–112.

doi:10.1038/nature12822.

Lieder, B., M. Zaunschirm, A. Holik, J. P. Ley, J. Hans, G. E. Krammer, y V. Somoza. 2017. The Alkamide trans-Pellitorine Targets PPAR γ via TRPV1 and TRPA1 to Reduce Lipid Accumulation in Developing 3T3-L1 Adipocytes. *Front. Pharmacol.* 8:1–11. doi:10.3389/fphar.2017.00316.

López-Miranda, V., E. Herradón, M. I. Martín, V. Lopez-Miranda, E. Herradon, y M. Martin. 2008. Vasorelaxation Caused by Cannabinoids: Mechanisms in Different Vascular Beds. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 6:335–346.

doi:10.2174/157016108785909706.

Lu, H.-C., y K. Mackie. 2016. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry*. 79:516–525. doi:10.1016/j.biopsych.2015.07.028.

Macpherson, L. J., A. E. Dubin, M. J. Evans, F. Marr, P. G. Schultz, B. F. Cravatt, y A. Patapoutian. 2007. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 445:541–545. doi:10.1038/nature05544.

Macpherson, L. J., B. H. Geierstanger, V. Viswanath, M. Bandell, S. R. Eid, S. W. Hwang, y A. Patapoutian. 2005. The pungency of garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* 15:929–934.

doi:10.1016/j.cub.2005.04.018.

Mann, S. J. 2019. Redefining beta-blocker use in hypertension: selecting the right beta-blocker and the right patient. *J. Am. Soc. Hypertens.* 11:54–65.

doi:10.1016/j.jash.2016.11.007.

McCollum, L., A. C. Howlett, y S. Mukhopadhyay. 2007. Anandamide-Mediated CB1/CB2 Cannabinoid Receptor-Independent Nitric Oxide Production in Rabbit Aortic Endothelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321:930–937.

doi:10.1124/jpet.106.117549.

Menzio-Smarrito, C., C. E. Riera, C. Munari, J. Le Coutre, y F. Robert. 2009. Synthesis and Evaluation of New Alkylamides Derived from α -Hydroxysanshool, the Pungent Molecule in Szechuan Pepper. *J. Agric. Food Chem.* 57:1982–1989.

doi:10.1021/jf803067r.

- Molina-Torres, J., y A. G. Chavez. 2016. Alcamidas en plantas: Distribución e importancia Alcamidas en plantas : distribución e importancia.
- Molina-Torres, J., A. García-Chávez, y E. Ramírez-Chávez. 1999. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.* 64:241–248. doi:10.1016/S0378-8741(98)00134-2.
- Molinatorres, J., R. Salgado-Garciglia, E. Ramirez-Chavez, y R. E. Del Rio. 1996. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 24:43–47. doi:10.1016/0305-1978(95)00099-2.
- Montecucco, F., y V. Di Marzo. 2012. At the heart of the matter: The endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 33:331–340. doi:10.1016/j.tips.2012.03.002.
- Morris, G. M., R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, y A. J. Olson. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30:2785–2791. doi:10.1002/jcc.21256.
- Muñiz-Murguía, J., y A. Peraza-Campos. 2005. Fisiología del músculo. En: *Anatomía Y Fisiología Del Cuerpo Humano*. 3ra ed. McGraw-Hill, Madrid. p. 912.
- Nagpure, B. V., y J.-S. Bian. 2016. Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016:1–16. doi:10.1155/2016/6904327.
- Nelson, M. T., Y. Huang, J. E. Brayden, J. Hescheler, y N. B. Standen. 1990. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature.* 344:770–773. doi:10.1038/344770a0.
- NICE, N. I. for H. and C. E. 2018. Hypertension in adults: diagnosis and management.
- Nicolussi, S., J. M. Viveros-Paredes, M. S. Gachet, M. Rau, M. E. Flores-Soto, M. Blunder, y J. Gertsch. 2014. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacol. Res.* 80:52–65. doi:10.1016/j.phrs.2013.12.010.
- O'Sullivan, S. E. 2015. Endocannabinoids and the Cardiovascular System in

Health and Disease. En: Roger G. Pertwee, editor. Endocannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, London. p. 393–422.

Ogata Nomura, C. E., M. R. Alves Rodrigues, C. Francielle da Silva, L. Alencar Hamm, A. Machado Nascimento, L. Mera de Souza, T. Ricardo Cipriani, C. Hatsuko Baggio, y M. F. De Paula Werner. 2013. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen in mice. *J. Ethnopharmacol.* 150:583–589. doi:10.1016/j.jep.2013.09.007.

Ogura, M., G. A. Cordell, M. L. Quinn, C. Leon, P. S. Benoit, D. D. Soejarto, y N. R. Farnsworth. 1982. Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem — oral use of *Heliopsis longipes* — by means of a multidisciplinary approach. *J. Ethnopharmacol.* 5:215–219. doi:10.1016/0378-8741(82)90045-9.

Olas, B. 2015a. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clin. Chim. Acta.* 439:212–218. doi:10.1016/j.cca.2014.10.037.

Olas, B. 2015b. Gasomediators (\cdot NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis. *Clin. Chim. Acta.* 445:115–121. doi:10.1016/j.cca.2015.03.027.

Oxford, G. S., G. Bhave, R. W. Gereau, D. . Brasier, H. Wang, y W. Zhu. 2004. cAMP-Dependent Protein Kinase Regulates Desensitization of the Capsaicin Receptor (VR1) by Direct Phosphorylation. *Neuron.* 35:721–731. doi:10.1016/s0896-6273(02)00802-4.

Parrinello, M., y A. Rahman. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52:7182–7190. doi:10.1063/1.328693.

Paulsen, C. E., J. P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, y D. Julius. 2015. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature.* 520:511–517. doi:10.1038/nature14367.

Peixoto-Neves, D., H. Soni, y A. Adebisi. 2019. CGRPergic Nerve TRPA1 Channels Contribute to Epigallocatechin Gallate-Induced Neurogenic Vasodilation. *ACS Chem. Neurosci.* 10:216–220. doi:10.1021/acchemneuro.8b00493.

Pérez-Vizcaíno, F., y J. Tamargo. 2005. Aspectos generales del sistema vascular. En: *Anatomía Y Fisiología Del Cuerpo Humano*. 3ra ed. McGraw-Hill, Madrid. p. 912.

De Petrocellis, L., A. Schiano Moriello, R. Imperatore, L. Cristino, K. Starowicz, y V. Di Marzo. 2012. A re-evaluation of 9-HODE activity at TRPV1 channels in comparison with anandamide: Enantioselectivity and effects at other TRP channels and in sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* 167:1643–1651. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02122.x.

Pharm, I. J., P. Res, H. Hossain, I. A. Jahan, I. Nimmi, y K. Hasan. 2012.

Evaluation of Antinociceptive and Antioxidant Potential from the Leaves of *Spilanthes paniculata* Growing in Bangladesh. 1:178–186.

Pino, R. Z., y M. Feelisch. 1994. Bioassay Discrimination between Nitric Oxide (NO \cdot) and Nitroxyl (NO $^-$) Using L-Cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:54–62. doi:10.1006/bbrc.1994.1668.

Porter, A. C. 2002. Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:1020–1024. doi:10.1124/jpet.301.3.1020.

Pozsgai, G., J. V. Bodkin, R. Graepel, S. Bevan, D. A. Andersson, y S. D. Brain. 2010. Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo. *Cardiovasc. Res.* 87:760–768.

doi:10.1093/cvr/cvq118.

Pradesh, M., N. Vijendra, y K. P. Kumar. 2010. Traditional knowledge on ethno-medicinal uses prevailing in tribal pockets of Chhindwara and Betul. *African J. Pharm. Pharmacol.* 4:662–670.

Predmore, B. L., D. Julian, y A. J. Cardounel. 2011. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an Akt-dependent mechanism. *Front. Physiol.* 2 DEC:1–5. doi:10.3389/fphys.2011.00104.

PROFEPA. 2003. Protección Ambiental-Salud Ambiental-Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos- Clasificación y Especificaciones De Manejo. México.

Raduner, S., A. Majewska, J. Z. Chen, X. Q. Xie, J. Hamon, B. Faller, K. H.

Altmann, y J. Gertsch. 2006. Alkylamides from *Echinacea* are a new class of cannabinomimetics: Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J. Biol. Chem.* 281:14192–14206.

doi:10.1074/jbc.M601074200.

Rajesh, M., P. Mukhopadhyay, L. Liaudet, J. W. Huffman, A. Csiszar, Z. Ungvari, K. Mackie, y S. Chatterjee. 2007. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 9413:H2210–H2218. doi:10.1152/ajpheart.00688.2007.

Randall, M. D., D. Harris, D. A. Kendall, y V. Ralevic. 2002. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* 95:191–202. doi:10.1016/S0163-7258(02)00258-9.

Redmond, W. J., L. Gu, M. Camo, P. McIntyre, y M. Connor. 2014. Ligand determinants of fatty acid activation of the pronociceptive ion channel TRPA1. *PeerJ.* 2014:1–20. doi:10.7717/peerj.248.

Rhee, M.-H., M. Bayewitch, T. Avidor-Reiss, R. Levy, y Z. Vogel. 1998. Cannabinoid Receptor Activation Differentially Regulates the Various Adenylyl Cyclase Isozymes. *J. Neurochem.* 71:1525–1534. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71041525.x.

Rhodin, J. A. G. 1980. Architecture of the Vessel Wall. *Compr. Physiol.* 1–31. doi:10.1002/cphy.cp020201.

Riera, C. E., C. Menozzi-Smarrito, M. Affolter, S. Michlig, C. Munari, F. Robert, H. Vogel, S. A. Simon, y J. Le Coutre. 2009. Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. *Br. J. Pharmacol.* 157:1398–1409. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00307.x.

Rios, M. Y., A. B. Aguilar-Guadarrama, y M. del C. Gutiérrez. 2007. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 110:364–367. doi:10.1016/j.jep.2006.09.041.

Risler, N. R., N. R. Risler, R. M. Miatello, y R. M. Miatello. 2002. La pared vascular en la hipertensión arterial. *Rev Fed Arg Cardiol.* 1–8.

Rivera, S. L., y J. Martin. 2019. Acute and Chronic Hypertension: What Clinicians Need to Know for Diagnosis and Management. *Crit. Care Nurs. Clin. NA.* 31:97–108. doi:10.1016/j.cnc.2018.11.008.

Rohacs, T., B. Thyagarajan, y V. Lukacs. 2008. Phospholipase C Mediated

Modulation of TRPV1 Channels. *Mol. Neurobiol.* 37:153–163. doi:10.1007/s12035-008-8027-y.

Romano, M. R., y M. D. Lograno. 2006. Cannabinoid agonists induce relaxation in the bovine ophthalmic artery: evidences for CB1 receptors, nitric oxide and potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 147:917–925. doi:10.1038/sj.bjp.0706687.

Roy, A., A. Kucukural, y Y. Zhang. 2010. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5:725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5.

Ruiu, S., N. Anzani, A. Orrù, C. Floris, P. Caboni, E. Maccioni, S. Distinto, S. Alcaro, y F. Cottiglia. 2013. Bioorganic & Medicinal Chemistry N -Alkyl dien- and trienamides from the roots of *Otanthus maritimus* with binding affinity for opioid and cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem.* 21:7074–7082. doi:10.1016/j.bmc.2013.09.017.

Russell, F. A., R. King, S.-J. Smillie, X. Kodji, y S. D. Brain. 2014. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 94:1099–1142. doi:10.1152/physrev.00034.2013.

SAGARPA. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México.

Salazar, H., A. Jara-Oseguera, y T. Rosenbaum. 2009. El canal TRPV como diana para tratar el dolor. *Rev. Neurofarmacología.* 48:357–364.

Sharma, V., J. Boonen, B. De Spiegeleer, y V. K. Dixit. 2013. Androgenic and Spermatogenic Activity of Alkylamide-Rich Ethanol Solution Extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. *Phyther. Res.* 27:99–106. doi:10.1002/ptr.4697.

Sherwood, L. 2016. *Human Physiology: From cells to systems*. 9th ed. Cengage Learning, Canada.

Signorello, M. G., y G. Leoncini. 2018. Anandamide Induces Platelet Nitric Oxide Synthase through AMP-Activated Protein Kinase. *Lipids.* 53:851–861. doi:10.1002/lipd.12100.

Simas, N. K., E. D. C. L. Dellamora, J. Schripsema, C. L. S. Lage, A. M. D. O. Filho, L. Wessjohann, A. Porzel, y R. M. H. Kuster. 2013. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K.

Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. *Phytochem. Lett.* 6:67–72. doi:10.1016/j.phytol.2012.10.016.

Somlyo, A. 2011. Ultrastructure of Vascular Smooth Muscle. *Compr. Physiol.* 4:33–67. doi:10.1002/cphy.c130015.

Somlyo, A. P., y A. V. Somlyo. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 372:231–236. doi:10.1038/372231a0.

Spelman, K., D. Depoix, M. McCray, E. Mouray, y P. Grellier. 2011. The Traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the Alkylamides Spilanthol and Undeca-2 E - ene-8,10-dienoic Acid Isobutylamide, Demonstrate In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity. *Phyther. Res.* 25:1098–1101. doi:10.1002/ptr.3395.

Spiegeleer, B. De, J. Boonen, S. V Malysheva, J. Diana, D. Mavungu, S. De Saeger, N. Roche, P. Blondeel, L. Taevernier, y L. Veryser. 2013. Skin penetration enhancing properties of the plant N -alkylamide spilanthol. *J. Ethnopharmacol.* 148:117–125. doi:10.1016/j.jep.2013.03.076.

Stanley, C., y S. E. O'Sullivan. 2014. Vascular targets for cannabinoids: Animal and human studies. *Br. J. Pharmacol.* 171:1361–1378. doi:10.1111/bph.12560.

Stefano, G. B. 2000. Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta. Pharmacol. Sin.* 21:1071–81.

Sugiura, T., T. Kodaka, S. Kondo, S. Nakane, H. Kondo, K. Waku, Y. Ishima, K. Watanabe, y I. Yamamoto. 1997. Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells. *J. Biochem.* 122:890–895. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021838.

Sullivan, M. N., A. L. Gonzales, P. W. Pires, A. Bruhl, M. D. Leo, W. Li, A. Oulidi, F. A. Boop, Y. Feng, J. H. Jaggar, D. G. Welsh, y S. Earley. 2016. Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral. *Sci Signal.* 8:1–26. doi:10.1126/scisignal.2005659.Localized.

Taberner, F. J., G. Fernández-ballester, A. Fernández-carvajal, y A. Ferrer-montiel. 2015. TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848:1818–1827. doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.022.

Testai, L., V. D'Antongiovanni, I. Piano, A. Martelli, V. Citi, E. Duranti, A. Viridis, C.

- Blandizzi, C. Gargini, M. C. Breschi, y V. Calderone. 2015. Different patterns of H₂S/NO activity and cross-talk in the control of the coronary vascular bed under normotensive or hypertensive conditions. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 47:25–33. doi:10.1016/j.niox.2015.03.003.
- Tóth, A., Á. Czikora, E. T. Pásztor, B. Dienes, P. Bai, L. Csernoch, I. Rutkai, V. Csató, I. S. Mányiné, R. Pórszász, I. Édes, Z. Papp, y J. Boczán. 2014. Vanilloid Receptor-1 (TRPV1) Expression and Function in the Vasculature of the Rat. *J. Histochem. Cytochem.* 62:129–144. doi:10.1369/0022155413513589.
- Trevisani, M., J. Siemens, S. Materazzi, D. M. Bautista, R. Nassini, B. Campi, N. Imamachi, E. Andrè, R. Patacchini, G. S. Cottrell, R. Gatti, A. I. Basbaum, N. W. Bunnett, D. Julius, y P. Geppetti. 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:13519–13524. doi:10.1073/pnas.0705923104.
- Turu, G., y L. Hunyady. 2010. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 44:75–85. doi:10.1677/JME-08-0190.
- Uniprot, C. 2014. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 42:D191–D198. doi:10.1093/nar/gkt1140.
- Vanessa Ho, W.-S., y C. Robin Hiley. 2003. Endothelium-independent relaxation to cannabinoids in rat-isolated mesenteric artery and role of Ca²⁺ influx. *Br. J. Pharmacol.* 139:585–597. doi:10.1038/sj.bjp.0705280.
- Vanhoutte, P. M., H. Shimokawa, M. Feletou, y E. H. C. Tang. 2017. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* 219:22–96. doi:10.1111/apha.12646.
- Velásquez-Monroy, O., M. Rosas-Peralta, A. Lara-Esqueda, G. Pastelín-Hernández, C. Sánchez-Castillo, F. Attié, y R. Tapia-Conyer. 2003. Prevalencia e interrelación de enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México: Resultados finales de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. *Arch. Cardiol. México.* 73:62–77.
- Veryser, L., L. Taevernier, T. Joshi, P. Tatke, E. Wynendaele, N. Bracke, S. Stalmans, K. Peremans, C. Burvenich, M. Risseeuw, y B. De Spiegeleer. 2016.

Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N -alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complement. Altern. Med.* 1–12. doi:10.1186/s12906-016-1159-0.

Walker, J., J. P. Ley, J. Schwerzler, B. Lieder, L. Beltran, P. M. Ziemba, H. Hatt, J. Hans, S. Widder, G. E. Krammer, y V. Somoza. 2017. Nonivamide, a capsaicin analogue, exhibits anti-inflammatory properties in peripheral blood mononuclear cells and U-937 macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 61:1–14. doi:10.1002/mnfr.201600474.

Wang, G. G., Q. Y. Chen, W. Li, X. H. Lu, y X. Zhao. 2015. Ginkgolide B increases hydrogen sulfide and protects against endothelial dysfunction in diabetic rats. *Croat. Med. J.* 56:4–13. doi:10.3325/cmj.2015.56.4.

Wang, J., W. Wang, P. A. Kollman, y D. A. Case. 2006. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* 25:247–260. doi:10.1016/j.jmgm.2005.12.005.

Wang, L., T. L. Cvetkov, M. R. Chance, y V. Y. Moiseenkova-Bell. 2012. Identification of in vivo disulfide conformation of TRPA1 ion channel. *J. Biol. Chem.* 287:6169–6176. doi:10.1074/jbc.M111.329748.

Wang, Y., L. Cui, H. Xu, S. Liu, F. Zhu, F. Yan, S. Shen, y M. Zhu. 2017. TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of eNOS/NO pathway. *Atherosclerosis.* 260:13–19. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.016.

Webb, J. G., P. W. Yates, Q. Yang, Y. V Mukhin, y S. M. Lanier. 2001. Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 281:H1545–H1552. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1545.

Wen, Y. D., H. Wang, y Y. Z. Zhu. 2018. The Drug Developments of Hydrogen Sulfide on Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. doi:10.1155/2018/4010395.

Wheal, A. J., y M. D. Randall. 2009. Effects of hypertension on vasorelaxation to endocannabinoids in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 603:79–85. doi:10.1016/j.ejphar.2008.11.061.

Wiysonge, C. S., H. A. Bradley, J. Volmink, B. M. Mayosi, y L. H. Opie. 2017. Beta-

blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1–93.

doi:10.1002/14651858.CD002003.pub5.

Wongsawatkul, O., S. Prachayasittikul, C. Isarankura-Na-Ayudhya, J. Satayavivad, S. Ruchirawat, y V. Prachayasittikul. 2008. Vasorelaxant and Antioxidant Activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int. J. Mol. Sci.* 9:2724–2744.

doi:10.3390/ijms9122724.

World Health Organization, W. 2013. A global brief on Hypertension World Health Day 2013.

Yang, F., X. Xiao, W. Cheng, W. Yang, P. Yu, Z. Song, V. Yarov-Yarovoy, y J. Zheng. 2015. Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat. Chem. Biol.* 11:518–524.

doi:10.1038/nchembio.1835.

Yang, G., L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder, y R. Wang. 2008. H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine -Lyase. *Science* (80-.). 322:587–590. doi:10.1126/science.1162667.

Yang, J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, y Y. Zhang. 2014. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods.* 12:7–8.

doi:10.1038/nmeth.3213.

Yang, X. R., M. J. Lin, L. S. McIntosh, y J. S. K. Sham. 2006. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 290. doi:10.1152/ajplung.00515.2005.

Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9:1–8. doi:10.1186/1471-2105-9-40.

Zhao, Y., P. M. Vanhoutte, y S. W. S. Leung. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129:83–94. doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002.

Zhu, L., M. Ren, T. Yang, y C. Qiao. 2015. Four new alkylamides from the roots of *Zanthoxylum nitidum*. *J. Asian Nat. Prod.* 17:711–716.

doi:10.1080/10286020.2015.1049161.

Zou, Q., S. W. S. Leung, y P. M. Vanhoutte. 2015. Transient receptor potential

channel opening releases endogenous acetylcholine, which contributes to endothelium-dependent relaxation induced by mild hypothermia in spontaneously hypertensive rat but not Wistar-Kyoto rat arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354:121–130. doi:10.1124/jpet.115.223693.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sørsgård, V. Di Marzo, D. Julius, y E. D. Högestätt. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400:452–457. doi:10.1038/22761.

Dirección General de Bibliotecas UAQ