

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VASODILATADORES  
QUE SE UNEN CON ALTA AFINIDAD A LAS ENZIMAS eNOS  
Y CSE, A PARTIR DE LA EXPLORACIÓN VIRTUAL DE  
BASES DE DATOS DE COMPUESTOS COMERCIALES”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**BERENICE ERREGUIN LUNA**

DIRIGIDA POR

**Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VASODILADORES  
QUE SE UNEN CON ALTA AFINIDAD A LAS ENZIMAS eNOS  
Y CSE, A PARTIR DE LA EXPLORACIÓN VIRTUAL DE  
BASES DE DATOS DE COMPUESTOS COMERCIALES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

BERENICE ERREGUIN LUNA

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODALES

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

DIRECTOR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODAL

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

SINODAL

Dr. FRANCISCO JAVIER LUNA VÁZQUEZ

SINODAL

## **Agradecimientos**

A mis abuelitos, por ser mi fuerza, mi soporte y mi guía en el camino. Por enseñarme que toda persona necesita un propósito, que el éxito y la felicidad se construyen a base de trabajo y honestidad. Pero sobre todo que la verdad es el valor más importante que toda persona debe poseer.

A mi mamá por todo el esfuerzo, su ejemplo, sus consejos y el apoyo para poder llegar al término de esta etapa.

A Miriam Luna, Iridian Luna, Grisel Erreguin, Araceli Erreguin, Filimón Erreguin, Jocelyn Maldonado y toda mi familia por cada palabra de aliento, por las sonrisas, el amor y el sustento que me brindaron.

Al Dr. César Ibarra Alvarado y la Dra. Alejandra Rojas Molina, por darme la oportunidad de participar en este proyecto, confiar en mí y compartirme su experiencia.

Al Dr. Francisco Luna Vázquez, por todo su apoyo, su sencillez, paciencia y comprensión. Por mostrarme siempre una alternativa, ayudarme a razonar y nunca dejarme sola.

Al Dr. Antonio, por su tiempo, su amistad y su orientación en este trabajo.

A David V. Peterson, por confiar en mí, mostrarme su buena voluntad y darme la oportunidad de seguir estudiando. Por enseñarme a valorar las cosas y mostrarme la noble acción de poder ayudar a las personas.

A mis amigos de toda la vida: Diana, Luis, Carlos, Ana, Dulce e Iván, por escucharme, apoyarme en cada momento de frustración, por el cariño que me brindaron, confiando en mí siempre y alentándome a seguir.

A mis amigos de la universidad: Pau, Romi, Andrea Herrera, Ale, Andrea Reyes, Aye y Lim, por cada lección de humildad, por ayudarme a ver el lado bueno y positivo de la vida, soportar mi temperamento, por todos sus consejos, las acampadas juntos y formar siempre un buen equipo de trabajo.

A Mariel, Vane, Gaby y Brenda, por su amistad, por cuidarme, escucharme y siempre motivarme.

A Lalo y Dani, por toda la ayuda que me brindaron para realizar este proyecto.

A mis grandes inspiradores: Albert Einstein, Stephen Hawking y Miguel Alcubierre, por ayudarme a no olvidar que me falta un largo camino, pero que no es imposible llegar a mi objetivo.

Al espacio infinito, por la probabilidad de existir y por ser mi motivo diario de querer hondar en la verdad y emprender mí camino en la investigación.

*"I have loved the stars too fondly to  
be fearful of the night..."*

*Galileo Galilei*

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Enfermedades cardiovasculares y su importancia en México.	1
1.2. Sistema vascular.	2
1.3. Endotelio vascular y factores endoteliales.	3
1.4. Músculo liso vascular.	4
1.5. Mecanismos de relajación.	5
1.5.1. Vía de la PGI <sub>2</sub> /AMPc.	5
1.5.1.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación generado por PGI <sub>2</sub> .	5
1.5.2. Vía del CO/GMPc.	6
1.5.2.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación generado por CO.	7
1.5.3. Vía del NO/GMPc.	8
1.5.3.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación generado por NO.	9
1.5.4. Vía del H <sub>2</sub> S/K <sub>ATP</sub> .	11

1.5.4.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación inducido por H <sub>2</sub> S.	12
1.5.5. Colaboración del NO y H <sub>2</sub> S en el efecto vasodilatador.	13
1.5.5.1. Generación de HNO como mediador en la vasodilatación.	14
1.6. Estudios <i>in silico</i> .	16
1.6.1. Cribado virtual de alto rendimiento (HTVS).	16
1.6.1.1. Acoplamiento molecular.	17
1.6.2. Estudios <i>in silico</i> en eNOS y CSE.	19
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo general.	23
3.2. Objetivos específicos.	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1. Materiales y métodos.	24
4.1.1. Modelo de interacción molecular <i>in silico</i> .	24
4.1.1.1. Preparación de las estructuras de las enzimas (eNOS y CSE).	24
4.1.1.2. Acoplamiento molecular.	24
4.2. Determinación del efecto vasodilatador.	25
4.2.1. Animales de experimentación.	25
4.2.2. Evaluación farmacológica: Ensayo de aorta aislada de rata.	25

4.2.2.1. Equipo.	25
4.2.2.2. Solución fisiológica para el ensayo de aorta aislada de rata.	26
4.2.2.3. Preparación de los compuestos para el ensayo de aorta aislada de rata.	26
4.2.2.4. Ensayo de aorta aislada de rata.	26
4.2.2.5. Elucidación del mecanismo de acción vasodilatador de los compuestos puros: determinación de la participación de las vías del NO/GMP <sub>c</sub> , H <sub>2</sub> S/ K <sub>ATP</sub> , PGI <sub>2</sub> /AMP <sub>c</sub> y CO/GMP <sub>c</sub> .	27
4.2.3. Cuantificación de la liberación de transmisores gaseosos (NO y H <sub>2</sub> S).	28
4.2.3.1. Ensayos de actividad enzimática.	28
4.2.3.1.1. Equipo.	28
4.2.3.1.2. Actividad de la CSE.	28
4.2.3.1.2.1. Preparación de las muestras.	28
4.2.3.1.2.2. Cuantificación de sulfuros.	28
4.2.3.1.3. Actividad de la eNOS.	29
4.2.3.1.3.1. Preparación de la muestra.	29
4.2.3.1.3.2. Cuantificación de nitritos.	29
4.2.4. Análisis Estadístico.	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Búsqueda virtual de nuevos compuestos con posible afinidad a eNOS y CSE.	31



5.1.2. Preparación de las bases de datos de compuestos.	31
5.1.3. Acoplamiento molecular.	31
5.1.3.1. Cribado virtual de alto rendimiento.	31
5.1.3.2. Consensus de acoplamiento molecular.	32
5.1.3.3. Diagramas de interacción con la eNOS y CSE de los compuestos seleccionados para la evaluación farmacológica.	36
5.2. Ensayos farmacológicos.	48
5.2.1. Evaluación del efecto vasodilatador producido por los compuestos seleccionados a partir de los estudios <i>in silico</i> mediante el ensayo de aorta aislada de rata.	48
5.2.2. Participación de la activación de la vía del NO/GMPc y H <sub>2</sub> S/K <sub>ATP</sub> en el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina, sitagliptina, fenoterol y midodrina.	50
5.2.3. Cuantificación del incremento en los niveles de NO y H <sub>2</sub> S producido por los compuestos seleccionados en la búsqueda computacional.	53
5.2.4. Evaluación del efecto vasodilatador de la isoxsuprina.	54
5.2.4.1. Confirmación de la participación de la vía NO/GMPc.	55
5.2.4.2. Evaluación de la participación de la activación de los canales de potasio.	56
5.2.4.3. Determinación de la activación de la vía de la PGI <sub>2</sub> /AMPc sobre el efecto vasodilatador de la isoxsuprina.	57
5.2.4.4. Evaluación de la participación de la vía del CO/GMPc en el efecto vasodilatador de la isoxsuprina.	58

5.2.4.5. Evaluación de la participación de la isoxsuprina como bloqueador de los canales de calcio.	59
6. DISCUSIÓN	61
7. CONCLUSIONES	67
8. REFERENCIAS	68

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	<i>Docking</i> consenso para los mejores 30 compuestos obtenidos en la búsqueda.	34
2	Sustancias de naturaleza farmacéutica obtenidas del <i>docking</i> consenso.	35
3	Lista de compuestos seleccionados para la evaluación farmacológica.	36
4	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador del fenoterol, midodrina, isoxsuprina, sitagliptina, SNP, ACh, NaHS y propanolol.	49
5	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina, en presencia de inhibidor L-NAME.	52
6	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina, en presencia de inhibidor PPG.	52
7	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio.	55
8	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia del inhibidor ODQ.	56
9	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia de glibenclamida y TEA.	57

10	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia de indometacina.	58
11	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia de MESO-IX.	59
12	Valores de $CE_{50}$ y $E_{max}$ de las curvas de $CaCl_2$ en presencia de la isoxsuprina y verapamilo como control positivo.	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Disposición de las proteínas actina y miosina en el músculo liso.	4
2	Mecanismo de vasodilatación mediado por PGI <sub>2</sub> .	6
3	Mecanismo de vasodilatación mediado por CO.	7
4	Esquema de la eNOS.	8
5	Mecanismo de vasodilatación mediado por NO y H <sub>2</sub> S.	10
6	Esquema de la CSE.	11
7	Esquema de la colaboración entre NO y H <sub>2</sub> S.	14
8	Ruta del HNO en la regulación neurovascular.	15
9	Esquema de unión e interacción entre el ácido ursólico y los residuos de aminoácidos de la eNOS.	20
10	Esquema de unión e interacción entre el ácido ursólico y los residuos de aminoácidos de la CSE.	21
11	Diagrama de obtención de los 30 compuestos con mayor afinidad por las enzimas.	33
12	Diagramas de interacción del fenoterol con las enzimas eNOS y CSE.	40
13	Diagramas de superficie del fenoterol con las enzimas eNOS y CSE.	41

14	Diagramas de interacción de la midodrina con las enzimas eNOS y CSE.	42
15	Diagramas de superficie de la midodrina con las enzimas eNOS y CSE.	43
16	Diagramas de interacción de la isoxsuprina con las enzimas eNOS y CSE.	44
17	Diagramas de superficie de la isoxsuprina con las enzimas eNOS y CSE.	45
18	Diagramas de interacción de la sitagliptina con las enzimas eNOS y CSE.	46
19	Diagramas de superficie de la sitagliptina con las enzimas eNOS y CSE.	47
20	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos obtenidos a partir de la búsqueda computacional; fenoterol, midodrina, sitagliptina, isoxsuprina, y el SNP, ACh, NaHS y propanolol como controles positivos.	49
21	Curva concentración-respuesta inducida por isoxsuprina, en presencia de L-NAME y PPG.	50
22	Curva concentración-respuesta inducida por sitagliptina, en presencia de L-NAME y PPG.	51
23	Curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador del fenoterol, en presencia de L-NAME y PPG.	51
24	Curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador de la midodrina, en presencia de L-NAME y PPG.	52

25	Concentraciones totales de nitritos y sulfuros inducidos por la estimulación de tejidos de aorta con isoxsuprina, midodrina, fenoterol y sitagliptina.	53
26	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio.	55
27	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de ODQ.	56
28	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de TEA y glibenclamida.	57
29	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de Indometacina.	58
30	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de MESO-IX.	59
31	Curvas concentración-respuesta del % de contracción inducido por $\text{CaCl}_2$ en presencia de isoxsuprina y verapamilo.	60

## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs), entre las que destaca la hipertensión, son la principal causa de muerte en México. La etiología de la hipertensión se asocia con la disfunción endotelial, la cual se caracteriza por el desacoplamiento de la liberación de factores vasodilatadores derivados de endotelio, entre los que se encuentran los transmisores gaseosos, tales como el óxido nítrico (NO) y sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), y la relajación del músculo liso vascular. Estudios preliminares indican que algunos compuestos orgánicos producen su efecto vasodilatador, mediante la liberación de este tipo de factores. Por otro lado, el diseño de fármacos asistido por computadora se ha convertido en una herramienta indispensable en la investigación en química medicinal para el descubrimiento, diseño y optimización de moléculas activas. En este proyecto se plantea el uso de un método computacional, el acoplamiento molecular automatizado, para explorar bases de datos de compuestos con el objetivo de identificar moléculas que se unan con alta afinidad a enzimas involucradas en la producción de transmisores gaseosos. Estas enzimas son la NO sintasa endotelial (eNOS) y la cistationina gamma liasa (CSE), cuya activación se traduce en un efecto vasodilatador. La búsqueda computacional y la evaluación farmacológica indicaron que la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina se unen y activan las enzimas eNOS y CSE, involucrando la participación de la vía NO/GMPc y del  $H_2S/K_{ATP}$  en el efecto vasodilatador. Asimismo, los resultados de esta tesis indicaron que la isoxsuprina produce su efecto vasodilatador, no solo activando receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como se creía anteriormente, sino que también activa las vías del NO/GMPc, del  $H_2S/K_{ATP}$  y del CO/GMPc, y los canales de potasio, activados por voltaje y dependientes de ATP, y bloquea canales de voltaje dependientes de  $Ca^{2+}$  tipo L.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Enfermedades cardiovasculares y su importancia en México.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2012, las enfermedades no transmisibles causaron más de 68% de las muertes a nivel global, lo que representa un aumento en comparación con el 60% registrado en el año 2000. Las cuatro entidades nosológicas principales de este grupo son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y las neumopatías crónicas (Dhungana y col., 2016; WHO, 2016).

Las enfermedades cardiovasculares causaron casi 17.5 millones de muertes en 2012; es decir, 3 de cada 10. De éstas, 7.4 millones se atribuyeron a la cardiopatía isquémica, y 6.7 millones, a los accidentes cerebrovasculares (WHO, 2016).

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es una de las condiciones más comunes que se observan en la atención primaria de la enfermedad cardiovascular, cuyas consecuencias afectan a órganos secundarios. De 2003 a 2013, la tasa de mortalidad atribuida a la hipertensión fue de 34.7% (Shouk y col., 2014; Mozaffarian y col., 2015).

En todo el mundo, un pilar en las enfermedades cardiovasculares es la hipertensión, la cual afecta alrededor del 22% de las personas mayores de 18 años y es responsable de 9.4 millones de muertes por año. En México en particular, la mayoría de los pacientes con presión arterial elevada se encuentran asintomáticos, lo cual aumenta el riesgo de la enfermedad cardíaca, el accidente cerebrovascular e insuficiencia renal. La presión arterial alta contribuye por lo menos al 45% de las muertes por enfermedades del corazón y el 51% de las muertes como consecuencia del accidente cerebrovascular. Además, alrededor del 10% de la asistencia médica está directamente relacionada con la hipertensión y sus complicaciones (Gaziano y col., 2009; Lim y Vos, 2013).

Existen una serie de factores que aumentan el riesgo de desarrollar hipertensión. Una de ellas es el consumo de tabaco que aumenta la incidencia a esta

enfermedad. El consumo de alcohol está relacionado del 5% al 3% de los casos de hipertensión en la población en general. De manera similar, aproximadamente el 30% de los casos se atribuye a un mayor consumo de sal y el 20% a la inactividad física. La hipertensión también se ha relacionado con la diabetes y la obesidad. Los informes recientes han proporcionado pruebas de que las crecientes tasas de enfermedades no transmisibles, incluyendo la hipertensión, están asociadas con otros factores determinantes como los aumentos de la rápida urbanización no planificada, la globalización y la transición sociodemográfica y nutricional (Abbasi y col., 2002; Contractor y col., 2014; Campbell y col., 2015).

Son muchos los factores fisiopatológicos que han sido considerados en la génesis de la hipertensión. Sin embargo, se conoce que la disfunción endotelial es uno de los mecanismos que influyen sobre la elevación de la presión arterial y está caracterizada por un estado de vasodilatación reducida, vasoconstricción aumentada y pérdida de la integridad de la monocapa endotelial de los vasos sanguíneos del sistema vascular (Gamboa, 2006; Montezano y col., 2015).

## 1.2. Sistema vascular.

El sistema vascular está formado por vasos sanguíneos que construyen una red tubular en todo el cuerpo, la cual permite que la sangre fluya desde el corazón hacia todas las células vivas del organismo y después de regreso hacia el corazón. La sangre que entra al corazón pasa a través de vasos como las arterias, arteriolas y capilares. Los capilares son los vasos microscópicos que unen el flujo arterial al flujo venoso. La sangre que regresa al corazón desde los capilares pasa por vasos de diámetro progresivamente mayores como vénulas y venas (Fox y col., 2011).

Las arterias son vasos que posee tres capas o túnicas: túnica interna, túnica media y túnica externa. La capa interna consiste en un revestimiento de endotelio. El endotelio es una capa continua de células que reviste la superficie interna de todo el sistema vascular (todos los vasos sanguíneos). La capa media, es la más gruesa. Está constituida por fibras elásticas y células musculares lisas. Debido a su contenido en fibras elásticas, las arterias normalmente poseen alta distensibilidad,

lo que significa que sus paredes se estiran con facilidad o que se expanden sin romperse en respuesta a incrementos en la presión. La capa más externa, está compuesta en su mayor parte por fibras elásticas y colágenas (Tortora y col., 2009).

### 1.3. Endotelio vascular y factores endoteliales.

El endotelio de la túnica interna produce varios reguladores paracrinos que hacen que el músculo liso de la túnica se relaje o se contraiga. Su grosor es de 1  $\mu\text{m}$  en las grandes arterias, y de 0.1  $\mu\text{m}$  en la microvasculatura; su superficie total es de 300 a 1000  $\text{m}^2$  y su peso total es de alrededor de 1.5 kg. Hoy se conoce que esta monocapa percibe y responde activamente a un conjunto de señales fisicoquímicas variadas, sintetizando y liberando factores que regulan el tono vascular, la adhesión celular, la agregación plaquetaria, el control de la proliferación del músculo liso vascular y, en general, el fenotipo de la pared vascular (Avendaño, 2008; Beltowski y Jamroz-Wiśniewska, 2014).

La alteración global del endotelio, situación conocida como disfunción endotelial, conlleva a la pérdida de las funciones homeostáticas endoteliales que se manifiesta a nivel clínico. Así, se considera que esta disfunción es un factor común a enfermedades prevalentes como la arterioesclerosis, la hipertensión o la vasculopatía diabética (Avendaño, 2008).

Con frecuencia, la disfunción endotelial se acompaña de un aumento en la síntesis de mediadores que participan en la respuesta al daño endotelial, a veces, contribuyendo a perpetuarlo y, en otras ocasiones, a limitarlo. La contracción y la relajación del músculo liso es el resultado de los efectos locales de varias moléculas producidas por el endotelio del vaso sanguíneo, entre ellas los gasotransmisores como el óxido nítrico (NO), el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), el nitroxilo (HNO), el monóxido de carbono (CO), algunos derivados del ácido araquidónico como la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) y el tromboxano ( $\text{TXA}_2$ ), así también enzimas implicadas en la generación de hormonas vasoactivas como angiotensina II y algunos péptidos como la endotelina y el péptido natriurético C (Coletta y col., 2012; Beltowski y Jamroz-Wiśniewska, 2014).

#### 1.4. Músculo liso vascular.

El músculo liso está dispuesto en capas circulares de las paredes de los vasos sanguíneos y los bronquiolos. En tracto digestivo tubular, uréteres, los conductos eferentes y las trompas uterinas el músculo liso está dispuesto en capas circulares y longitudinales (Tortora y col., 2009; Fox y col., 2011).

Las células del músculo liso no contiene sarcómeros, contiene actina y miosina, en una proporción entre filamentos delgados y gruesos de 16:1. Las proteínas de miosina de los filamentos gruesos están apiladas verticalmente de modo que su eje largo es perpendicular al eje largo del filamento grueso. De esta manera, las cabezas de miosina pueden formar puentes con actina a todo lo largo de los filamentos gruesos (Figura 1).

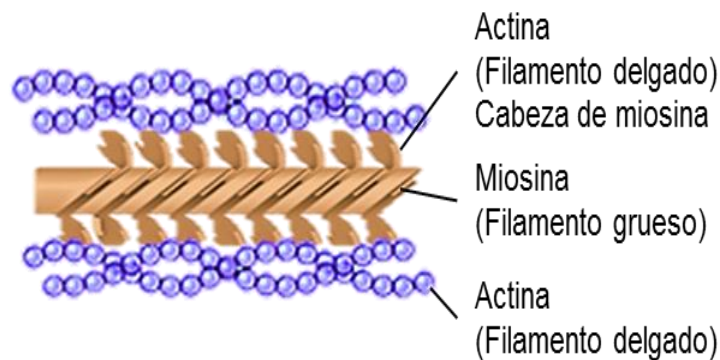


Figura 1. Disposición de las proteínas actina y miosina en el músculo liso.

La contracción del músculo liso se desencadena por un aumento agudo de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del citoplasma de las células musculares. Las contracciones sostenidas dependen de la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular hacia el músculo liso a través de la membrana plasmática. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  entra al citoplasma se une a calmodulina y el complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). La MLCK activada fosforila las cadenas ligeras de miosina, lo que activa los puentes actina-miosina para causar contracción. La contracción termina cuando se cierran los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , al disminuir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La calmodulina se disocia de la MLCK, lo que la desactiva y los grupos fosfato que se añadieron a la miosina son eliminados por la fosfatasa de la cadena ligera de

miosina. La defosforilación inhibe la unión del puente a la actina, desactivando los puentes, produciendo la relajación del músculo liso (Fox y col., 2011).

## 1.5. Mecanismos de relajación.

### 1.5.1. Vía de la PGI<sub>2</sub>/AMPc.

La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), formada dentro del endotelio vascular y el músculo liso por la vía de la ciclooxigenasa (COX), es un potente regulador del tono vascular y de agregación de plaquetas (Orie y col., 2006).

La producción y liberación de PGI<sub>2</sub> se puede generar en respuesta a la tensión de cizallamiento, la hipoxia, entre otros. La PGI<sub>2</sub> es derivada del ácido araquidónico, el cuál es rápidamente oxigenado por 4 sistemas enzimáticos: a) Las lipoxigenasas; b) el citocromo P450; c) la vía del isoprostano y d) la ciclooxigenasa (COX) 1 y 2, de cuya acción enzimática proceden los prostanoideos; término que engloba las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Flores y col., 2014).

La actividad de la COX es requerida para la generación de prostanoideos. Existen dos isoformas de la COX, una forma constitutiva (COX-1) y una forma inducible (COX-2). La COX-1 denominada como la isoforma constitutiva puede ser sobreexpresada en ciertas condiciones, tal como el aumento de la tensión de cizallamiento. La actividad de la COX-2 aumenta en el proceso de inflamación. Sin embargo, cada día existen más ejemplos de una expresión constitutiva de la COX-2 en riñón, médula espinal, cerebro y endotelio (tang y Vanhoutte, 2010).

#### 1.5.1.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación generado por PGI<sub>2</sub>.

Después de la producción de PGI<sub>2</sub> en las células endoteliales, este factor puede cruzar las membranas de las células endoteliales y llegar a las células del músculo liso, ya que es soluble en lípidos, y actuar como un vasorrelajante local. La PGI<sub>2</sub> se une al receptor IP en la membrana plasmática de las células del músculo liso, lo que induce la activación de la vía adenilato ciclasa (AC)/AMPc/PKA, lo que conduce a la vasorrelajación (Figura 2) (Tang y Vanhoutte, 2010; Kang, 2014).

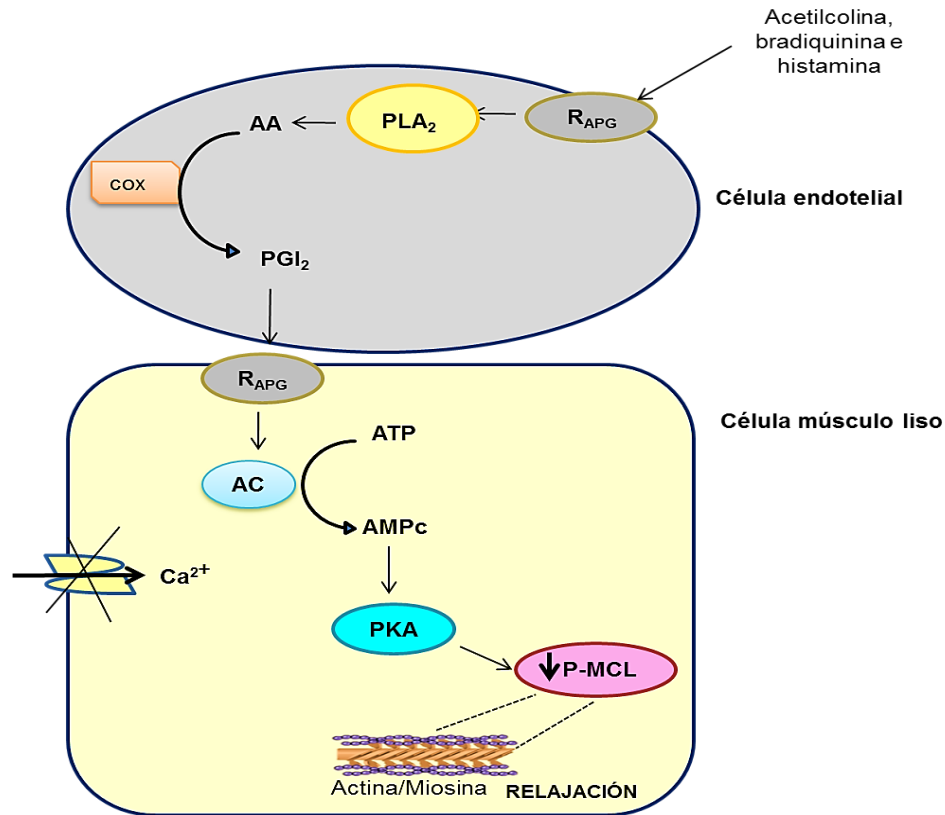


Figura 2. Mecanismo de vasodilatación mediado por PGI<sub>2</sub>. Modificado de Kang, 2014.

El paso limitante de la síntesis de PGI<sub>2</sub> es la metabolización del ácido araquidónico por las vías alternas de oxigenación, produciendo moléculas vasoconstrictoras (Kang, 2014).

### 1.5.2. Vía del CO/GMPc.

El monóxido de carbono (CO) es un gasotransmisor producido por las diferentes enzimas hemoxigenasas (HO) como un producto del metabolismo del grupo hemo. El hemo se convierte en biliverdina, hierro y CO por la HO. Existen tres isoformas diferentes de la HO: la forma inducible, HO-1, y las isoformas constitutivas, HO-2 y HO-3. La HO-1 y HO-2 son fisiológicamente activas, mientras que el papel de HO-3 en la fisiología humana sigue siendo poco claro (Kikuchi y col., 2005; Zsabo, 2010; Papapetropoulos y col., 2015).

El CO tiene numerosas funciones fisiológicas, incluyendo la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria (Zsabo, 2010).

#### 1.5.2.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación generado por CO.

La exposición de células del músculo liso vascular (CMLV) a CO, eleva las concentraciones de GMPc. En presencia de Mesoporfirina IX (MESO-IX), inhibidor de la HO, disminuye los niveles de CO en aorta porcina (Ryter y Otterbein, 2004).

El CO puede dilatar los vasos sanguíneos mediante la activación de los canales de potasio dependientes de calcio ( $K_{Ca}$ ). Se ha demostrado que la disminución de la producción de CO está acompañada por una disminución del número de canales de potasio abiertos en células musculares lisas y un aumento de la contractilidad vascular; estos efectos se revirtieron con CO exógeno. El mecanismo por el cual el CO produce estos efectos aún no está clara. Sin embargo, sí se conoce la participación de la vía HO/GMPc/PKG (Figura 3) (Ryter y Otterbein, 2004; Zsabo, 2010).

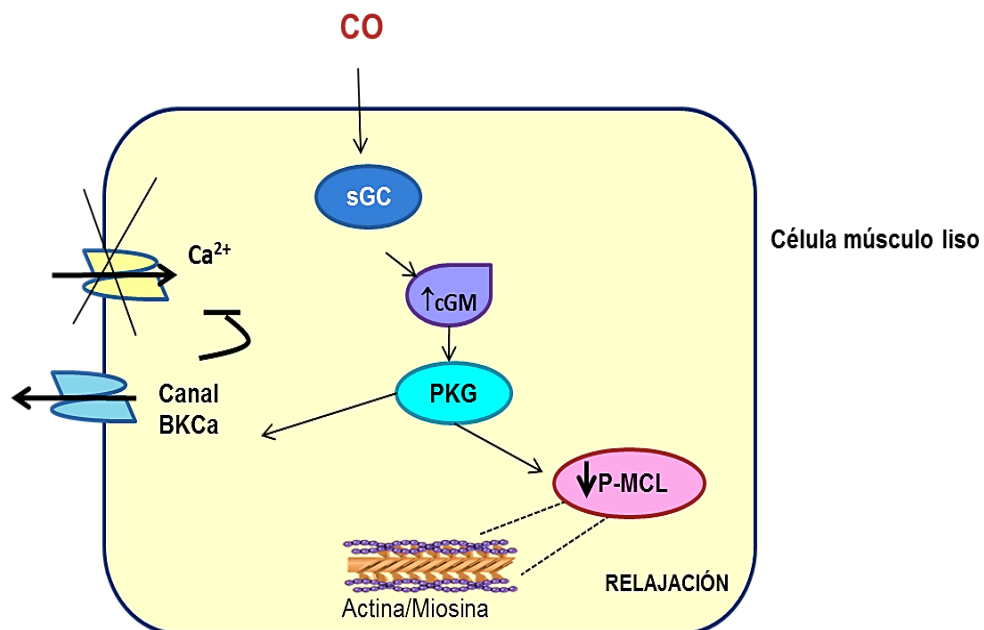


Figura 3. Mecanismo de vasodilatación mediado por CO. Modificado de Zsabo, 2010.

### 1.5.3. Vía del NO/GMPc.

La vía de la eNOS-NO-GMPc-PKG es el mecanismo mejor caracterizado de vasodilatación dependiente de endotelio. El NO puede ser generado por tres diferentes isoformas de la enzima NO sintasa (NOS). Las isoenzimas son denominadas como NO sintasa neuronal (nNOS o NOS I), inducible (iNOS o NOS II) y endotelial (eNOS o NOS III). Todas las isoformas de NOS utilizan L-arginina como sustrato y oxígeno molecular y fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida reducida (NADPH) como cosustratos. El dinucleótido de adenina flavina (FAD), el mononucleótido de flavina (FMN) y la tetrahidro-L-biopterina (BH4) son cofactores de todas las isoenzimas. Todas las proteínas NOS son homodímeros (Förstermann y Sessa, 2012; Qian y Fulton, 2013; Beltowski y Jamroz-Wiśniewska, 2014).

Todas las NOS tienen un grupo zinc-tiolato formado por un ion zinc que se coordina tetrahédricamente a dos regiones CysXXXXCys (una por cada monómero) en la interfaz del dímero de la NOS (Figura 4).

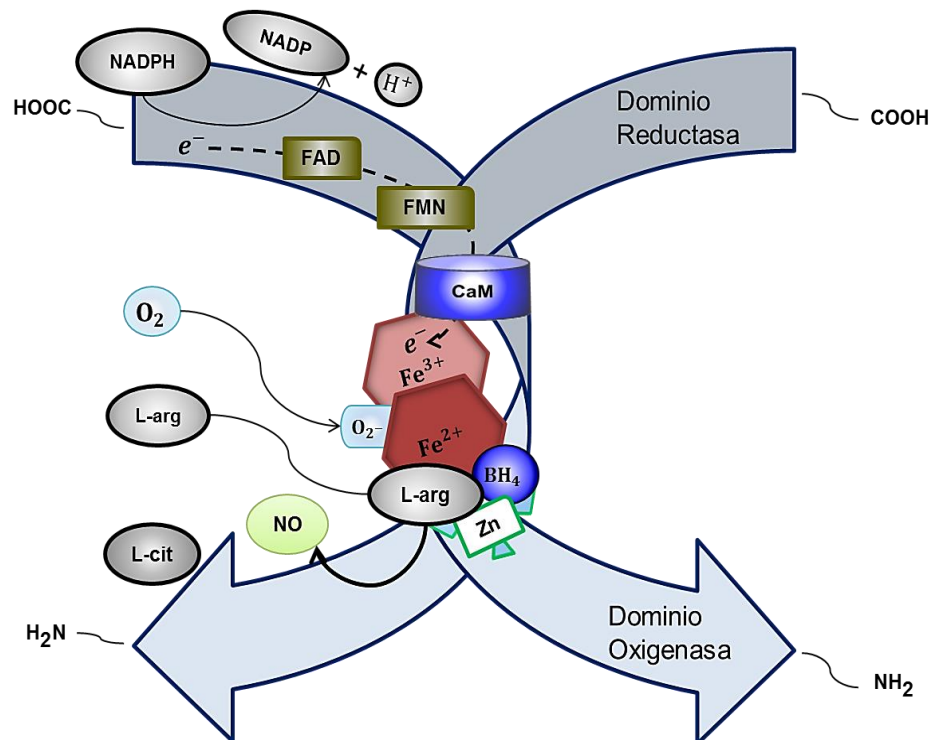


Figura 4. Esquema de la eNOS. Modificado de Förstermann y Sessa, 2012.



La eNOS se expresa principalmente en las células endoteliales. Sin embargo, la isoenzima también se ha detectado en los miocitos cardíacos, plaquetas, ciertas neuronas del cerebro y en las células epiteliales tubulares renales (Förstermann y Sessa, 2012).

El NO formado por NOS puede actuar sobre una serie de enzimas y proteínas diana. La vía de señalización fisiológica más importante estimulada por NO es la activación de guanilato ciclasa soluble (GCs), la cual produce GMPc, generando la relajación del músculo liso. El incremento en los niveles de GMPc disminuye la presión arterial (Förstermann y Sessa, 2012; Santhanam y col., 2012).

El NO es la molécula de señalización implicada en muchos procesos fisiológicos y patológicos, tales como la migración de las células endoteliales, la proliferación, la degradación de la matriz extracelular y la angiogénesis (Cooke y Losordo, 2002).

Cuando se generan alteraciones en la actividad de eNOS, se puede reducir la síntesis de NO. La reducción en los niveles de este gas también puede ocurrir por el estrés oxidativo o la disfunción endotelial. La disminución en la biodisponibilidad de NO es la causa de varios trastornos cardiovasculares (Liu y col., 2016).

#### 1.5.3.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación generado por NO.

En las células endoteliales de los vasos sanguíneos, agonistas como la acetilcolina (ACh) y la bradicinina se unen a los receptores acoplados a proteína G (RAPG). La estimulación de estos receptores activa la fosfolipasa C (PLC), induciendo la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual se une a receptores sobre el retículo endoplásmico y origina la liberación de Ca<sup>2+</sup>. Esta elevación transitoria de Ca<sup>2+</sup> promueve la unión de calcio a calmodulina y forma un complejo que activa a la eNOS. La eNOS produce NO hasta que la concentración de calcio disminuye, manteniendo el tono vascular. El NO generado por eNOS se difunde libremente desde las células endoteliales a las células del músculo liso adyacentes, donde activa a sGC, catalizando la conversión del trifosfato de guanosina (GTP) a monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). El GMPc modula directa e indirectamente diferentes objetivos, siendo el principal la proteína quinasa G (PKG).

La PKG activa la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), que defosforila la cadena ligera de miosina del músculo liso. Este proceso inhibe la contracción y genera vasodilatación (Figura 5) (Coletta y col., 2012; Durand y Gutterman, 2013; Kang, 2014).

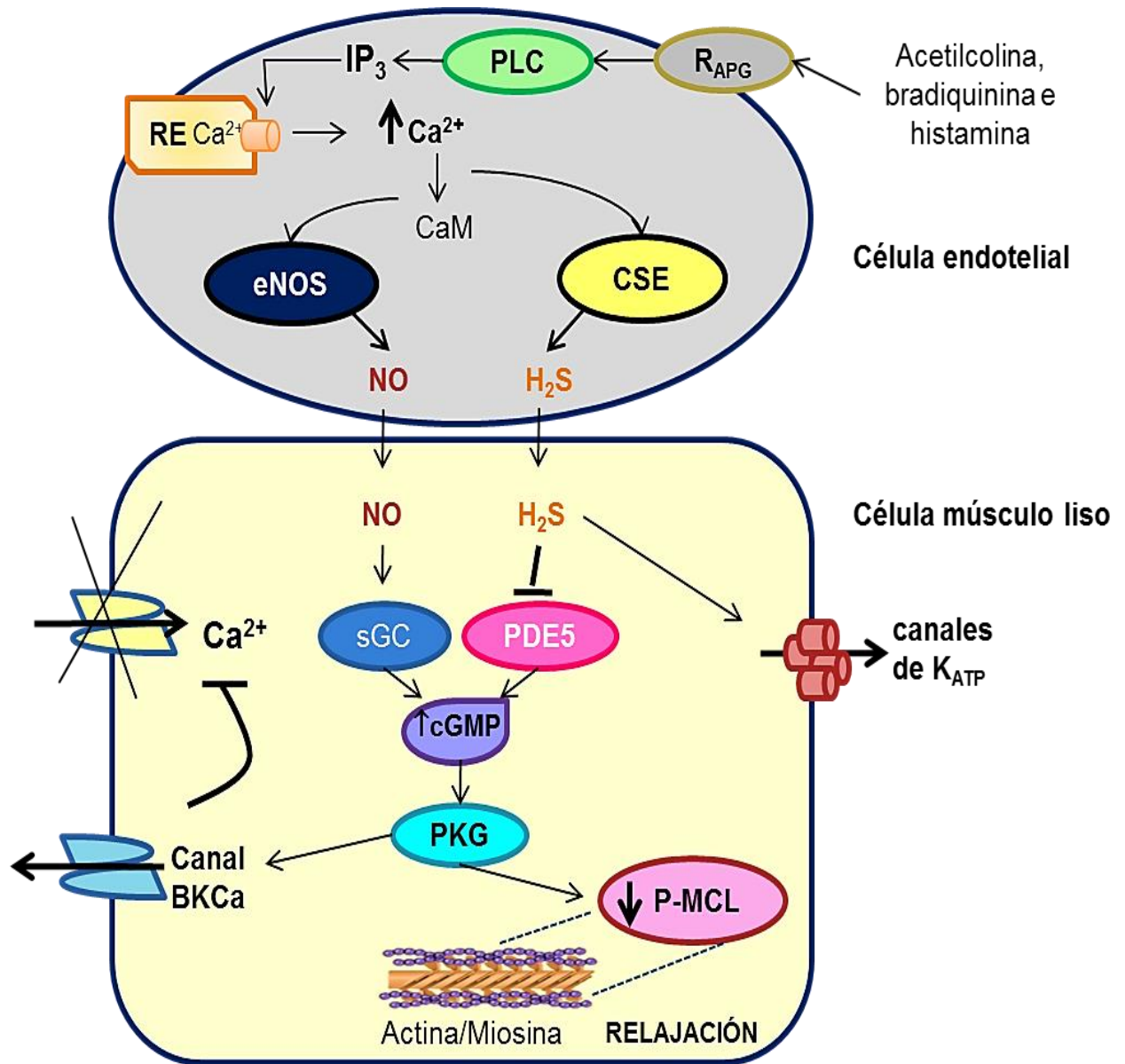


Figura 5. Mecanismo de vasodilatación mediado por NO y H<sub>2</sub>S. Modificado de Coletta y col., 2012.

#### 1.5.4. Vía del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>.

El H<sub>2</sub>S es sintetizado endógenamente a partir de la L-cisteína por 3 enzimas: cistationina-β-sintasa (CBS), cistationina-γ-liasa (CSE) y la 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (3-MST) en cooperación con la cisteína aminotrasferasa (CAT) (Kimura, 2011).

La CSE y CBS son enzimas citosólicas con distribuciones específicas en el tejido; la CBS está localizada predominantemente en el sistema nervioso central, mientras que la CSE predomina en el sistema cardiovascular, especialmente en miocardio y células musculares lisas. La CAT y la 3-MST se expresan principalmente en la mitocondria. La producción de H<sub>2</sub>S impulsado por la CBS implica la condensación de la homocisteína con L-cisteína para generar cistationina. En el proceso activo es liberado H<sub>2</sub>S. La CSE cataliza la conversión de L-cisteína a piruvato, tiocisteína y amoniaco. Entonces, la tiocisteína se descompone no enzimáticamente para formar cisteína y H<sub>2</sub>S (Figura 6). La CBS y la CSE utilizan los aminoácidos L-cisteína, L-homocisteína y L-cistationina con piridoxal-5-fosfato como cofactor para producir el H<sub>2</sub>S (Yu y col., 2014; Olas, 2015).

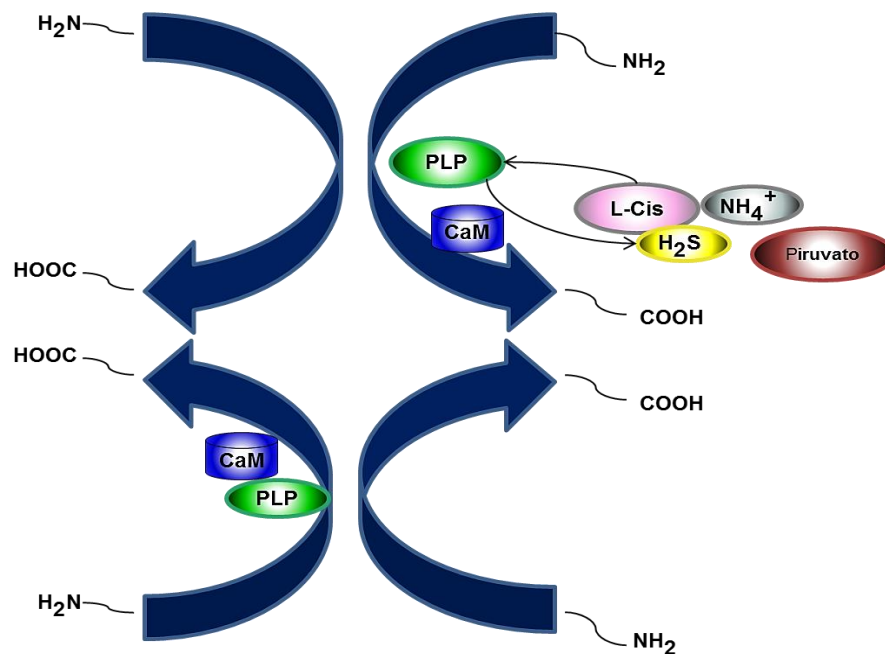


Figura 6. Esquema de la CSE. Basado en el modelo reportado por Sun y col., 2009.

Después de la liberación, cuatro quintas partes de  $H_2S$  existen como  $HS^-$  y una pequeña cantidad de  $S^{2-}$ , pero sólo una quinta parte existe como  $H_2S$  no disociado en condiciones fisiológicas. El exceso de  $H_2S$  se puede almacenar en dos formas diferentes: azufre elemental y especies de azufre que pueden eliminarlo en medio ácido (Yu y col., 2014).

Para obtener un equilibrio fisiológico apropiado de su metabolismo, el  $H_2S$  puede ser eliminado a través de 3 vías. En primero lugar, el  $H_2S$  es oxidado en la mitocondria a tiosulfato, seguido de la conversión adicional en sulfito y finalmente en sulfato, el principal producto final del metabolismo de  $H_2S$ . La segunda vía metabólica es la metilación en el citosol a sulfato de dimetilo por la Tiol S-metiltransferasa. Por último, la unión de  $H_2S$  a la hemoglobina conduce a la formación de sulfahemoglobina (Kimura, 2012; Kimura, 2013).

#### 1.5.4.1. Mecanismo involucrado en la vasodilatación inducido por $H_2S$ .

El NaHS es un donante de  $H_2S$  y se ha demostrado que relaja la arteria de ratón. Se cree que el  $H_2S$  funciona como un factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y su actividad vasodilatadora ha sido atribuida primeramente a la activación de canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) (Figura 5). Lo efecto del  $H_2S$  sobre la relajación de vasos sanguíneos es sensible a la presencia del inhibidor de canales  $K_{ATP}$ , glibenclamida y se piensa que este gas es capaz de activar directamente este canal. En presencia de apamina y caribdotoxina, inhibidores de los canales de potasio activados por calcio de pequeña e intermedia conductancia (SKCa e IKCa), la vasodilatación también se ve reducida (Jiang y col., 2010; Yu y col., 2014).

Se ha demostrado que el  $H_2S$  actúa como inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), la cual es una enzima que se encarga de convertir el GMPc a GMP. Al encontrarse inhibida la PDE5, impide que los niveles de GMPc disminuyan amplificando la respuesta celular mediada por PKG (Figura 5) (Coletta y col., 2012).

Estudios recientes sugieren la existencia de un mecanismo alterno para explicar el papel vasodilatador del  $H_2S$ , que involucra a la PKG, ya que se observó que el  $H_2S$

en presencia de oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno, reacciona para formar polisulfuros, los cuales inducen la oxidación de la PKG, activándola e induciendo vasodilatación (Stubbert y col., 2014).

#### 1.5.5. Colaboración del NO y H<sub>2</sub>S en el efecto vasodilatador.

Recientemente, se reportó que el H<sub>2</sub>S puede cooperar de manera positiva con el NO en el sistema vascular. El NaHS incrementó la concentración de GMPc en células endoteliales y la producción de este fue inhibida por L-NAME y ODQ. El NaHS no tuvo efecto sobre la sGC purificada y no mejoró la estimulación de esta enzima por DEA-NONOato. Sin embargo, se observó que el NaHS reduce la actividad de la PDE5 (Zhao y Wang, 2002; Kida y col., 2013).

La colaboración entre el NO y el H<sub>2</sub>S se observa en la angiogénesis y la vasodilatación dependiente del endotelio. La unión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la acetilcolina a su receptor en la célula endotelial moviliza el calcio intracelular y activa eNOS, así como CSE (dos enzimas dependientes de calcio), resultando en una elevación simultánea de niveles intracelulares de NO y de H<sub>2</sub>S en las células endoteliales (en la angiogénesis) o en la célula del músculo liso (en la vasodilatación). El NO estimula la sGC, mientras que el H<sub>2</sub>S, producido endógenamente, inhibe a la PDE5, lo que retrasa la degradación de GMPc y permite la señalización fisiológica de GMPc (Coletta y col., 2012).

Estas dos acciones simultáneas aseguran que GMPc tenga una vida media larga para activar PKG y estimular la señalización dependiente de PKG. Se conoce también que NO y H<sub>2</sub>S activan los canales K<sub>ATP</sub>, que están implicados en la angiogénesis y la relajación dependiente del endotelio (Figura 7) (Coletta y col. 2012; Beltowski y Jamroz-Wiśniewska, 2014).

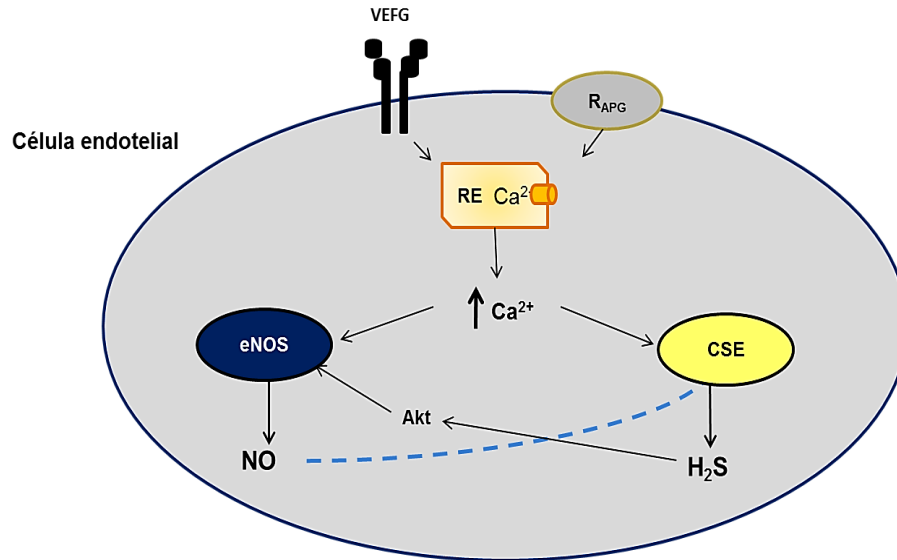


Figura 7. Esquema de la colaboración entre NO y H<sub>2</sub>S. Modificado de Medina, 2016  
 1.5.5.1. Generación de HNO como mediador en la vasodilatación.

El Nitroxilo (HNO) es la forma reducida del NO. Sin embargo, sigue una vía de señalización completamente independiente (Andrews y col., 2009).

Se ha comprobado que el H<sub>2</sub>S puede reaccionar con NO para formar nitroxilo. El HNO induce la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) de neuronas perivasculares, el cual actúa como agonista endógeno del canal receptor de potencial transitorio ankirina 1 (TRPA1) (Coletta., 2012; Eberhardt y col., 2014).

La activación de receptores del CGRP sobre células de músculo liso, está acoplado a la producción de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) por la adenilato ciclasa (AC). El incremento en la concentración de AMPC intracelular ([AMPC]<sub>i</sub>) estimula a la PKA, la cual abre los canales de potasio y activa los mecanismos de secuestro de Ca<sup>2+</sup> para causar la relajación de músculo liso (Eberhardt y col., 2014; Walsh y col., 2015).

Estos efectos están completamente ausentes en los ratones que carecen de TRPA1 o cuando se encuentra bloqueado este canal por un inhibidor como el HC030031, y no es inducido por un donante de NO puro. También se ha observado

que HNO se forma intracelularmente si se incuban células con solución de H<sub>2</sub>S, y esto no se observa si las células son tratadas con inhibidores de la eNOS o secuestradores de NO. Lo que lleva a la conclusión de que el canal quimiosensorial TRPA1 es el principal objetivo de la liberación de CGRP inducida por HNO y da como resultado efectos cardiovasculares, como la relajación de músculo liso vascular (Figura 8) (Eberhardt y col., 2014).

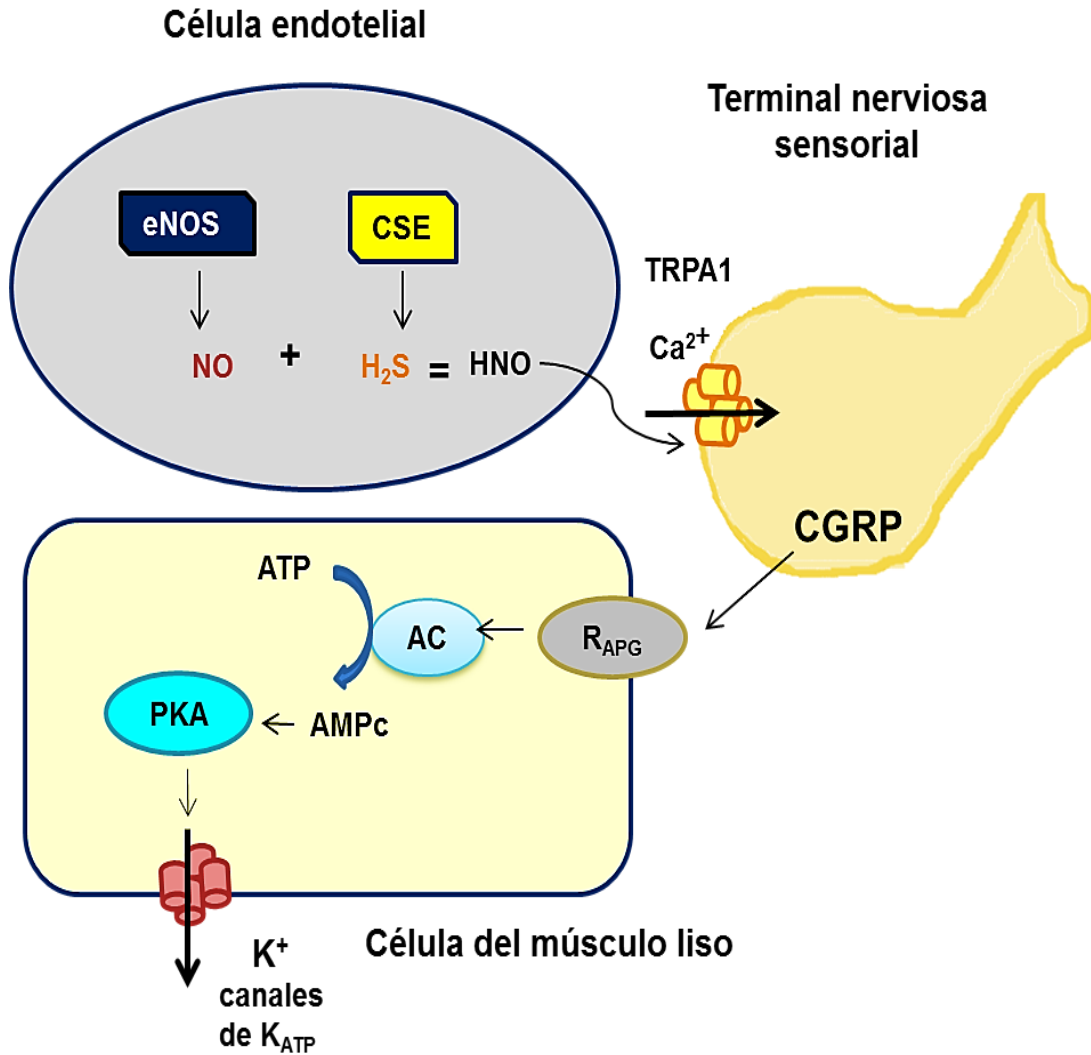


Figura 8. Ruta del HNO en la regulación neurovascular. Modificado de Eberhardt y col., 2014.

## 1.6. Estudios *in silico*.

### 1.6.1. Cribado virtual de alto rendimiento (HTVS).

El descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas ha aumentado exponencialmente en los últimos años, debido a los avances en las técnicas de biología molecular y genómica. Los métodos experimentales y computacionales se aplican de manera efectiva para acelerar el proceso de identificación y optimización en la búsqueda de compuestos líderes. Un compuesto líder es una molécula prototipo que potencialmente puede ser desarrollada como un fármaco, la cual es capaz de modular la función de una proteína diana, cuando se le somete a un proceso de optimización y, finalmente, puede actuar como un agente quimioterapéutico contra una enfermedad específica (Subramaniam y col., 2008).

Una de las interacciones más importantes en los procesos biológicos tiene lugar entre las macromoléculas (receptores) y las moléculas pequeñas (ligandos) correspondientes. El estudio de tales interacciones moleculares es uno de los principales objetivos para comprender el mecanismo de acción de los medicamentos, descubrimiento de nuevos fármacos e interpretación de vías de señalización. El descubrimiento de compuestos bioactivos con un perfil de interacción controlada hacia un objetivo de interés con nivel mínimo de efectos adversos es de gran importancia para la ciencia actual (Kim y Goddard III, 2016).

Los métodos experimentales convencionales como la selección de alto rendimiento, del inglés “High Throughput Screening” (HTS), siguen siendo el mejor método para la rápida identificación de opciones potenciales a fármaco. El HTS identifica moléculas líder, mediante la realización de ensayos bioquímicos individuales con más de un millón de compuestos. Sin embargo, el enorme costo y el tiempo consumido con esta tecnología ha dado lugar al desarrollo de metodologías de cálculo más barata y eficaz, como el cribado virtual de alto rendimiento, del inglés “High Throughput Virtual Screening” (HTVS). El HTVS es un método de cribado computacional ampliamente aplicado a la búsqueda *in silico* de bibliotecas de compuestos para comprobar la afinidad de unión del receptor diana con los



compuestos de la biblioteca. Esto se logra mediante el uso de una función de puntuación que calcula la complementariedad, es decir, una buena evaluación (del inglés *score*) del acoplamiento del receptor diana con un compuesto, lo cual indica que es potencialmente un buen ligando. El HTS y HTVS son métodos complementarios, y el HTVS ha demostrado reducir los falsos positivos en HTS. Varias estrategias se han practicado en HTVS y la técnica está siendo optimizada para un mejor rendimiento de forma continua (Bajorath, 2002; Jenkins y col., 2003; Shoichet, 2004; McInnes, 2007).

El desarrollo del HTVS amplía las posibilidades de utilizar moléculas que no necesariamente existen físicamente en una colección de investigación, pero que pueden obtenerse fácilmente a través de la compra o de síntesis. Otra ventaja evidente es que, como resultado de la predicción computacional por la afinidad de unión, solamente un subconjunto relativamente pequeño de compuestos se requieren para el ensayo biológico. Si bien este tipo de métodos que incluyen la búsqueda del farmacóforo, del inglés “*pharmacophore searching*” (PS) y el acoplamiento de alto rendimiento, del inglés “*high-throughput docking*” (HTD) no son perfectos en la predicción de la actividad biológica, siendo el “enriquecimiento de activos” el objetivo deseado y se ha logrado en numerosos estudios *in silico* (Subramaniam y col., 2008).

#### 1.6.1.1. Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular, del inglés “*docking*”, se emplea para la predicción de estos procesos moleculares. Esta técnica considera a los átomos y a los enlaces como una serie de vectores o coordenadas atómicas y predice la asociación más “acertada” entre ellas. Dentro del diseño de fármacos asistido por computadora, está clasificada como una técnica basada en el conocimiento del blanco biológico y permite conocer tanto los sitios como las formas de unión posibles de los ligandos a una proteína (poses) (Kitchen y col., 2004).

En los métodos basados en la estructura, se requiere que la estructura tridimensional del blanco biológico haya sido reportada, ya sea por cristalografía de

rayos X, por espectroscopía de resonancia magnética nuclear o predicha por modelado por homología y uso “implícito” de información estructural 3D (Ripphausen y col., 2010).

Los métodos de acoplamiento pueden ser clasificados como: acoplamiento de cuerpo rígido y aplicaciones flexibles dependientes del acoplamiento, dependiendo del grado de flexibilidad que se considere entre el ligando y la proteína durante el proceso de acoplamiento. En los protocolos de docking se incluyen un algoritmo de búsqueda y una función de evaluación para generar y evaluar las poses del ligando. Los algoritmos de búsqueda se clasifican de acuerdo a la metodología de búsqueda empleada para explorar la flexibilidad del ligando: sistemática, estocástica y determinística (Sliwosky y col., 2014).

Algunos de los métodos que emplean el acoplamiento flexible, mediante búsqueda estocástica, son el GOLD, AutoDock y Glide, los cuales utilizan cualquiera de los algoritmos genéticos para evaluar conformaciones ligando flexibles en el sitio de unión. Glide se ha diseñado para llevar a cabo una búsqueda exhaustiva de la posición espacial, orientación y conformación disponible para el ligando, al mismo tiempo que conserva suficiente velocidad de cálculo para cribar grandes bibliotecas (Buzko y col., 2002; Cavasotto y Abagyan, 2004; Friesner y col, 2004).

Para identificar la “pose” (forma o modo de acoplamiento entre receptor-ligando) más favorable, cada pose es evaluada con base en su complementariedad al blanco en términos de forma y propiedades, tales como las electrostáticas. Una buena evaluación (del inglés *score*) para una molécula dada indica que es potencialmente un buen ligando (Kroemer, 2007).

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

evaluación basadas en el conocimiento y (4) funciones de evaluación por consenso (Sliwosky y col., 2014).

#### 1.6.2. Estudios *in silico* en eNOS y CSE.

En un estudio de acoplamiento molecular realizado para cinco ácidos triterpénicos (ursólico, morónico, morólico, betulínico y 3,4-seco-olean-18-en-3,28-dioico) y la eNOS, se propuso que el carboxilo en el carbono 28 del esqueleto pentacíclico es importante para la interacción de los triterpenos con la enzima eNOS, así como la presencia de aceptores de puentes de hidrógeno en el carbono 3. Además, sugirieron que estos compuestos preferentemente se unen en dos sitios de la eNOS denominados C1 y C2, que fueron identificados como de acceso al sitio catalítico y se cree que dicha unión activa a la eNOS (Ríos y col., 2012).

En nuestro grupo de trabajo, también se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular entre el ácido ursólico y la eNOS y se incluyó en este estudio el acoplamiento de este triterpeno con la CSE (Ibarra-Alvarado y col., 2014).

Los resultados indicaron que el ácido ursólico no tiene afinidad por los sitios catalíticos de la eNOS y la CSE, pero presenta una tendencia a unirse en los sitios C1 y C2 de la eNOS, como se describió previamente (Ríos y col., 2012).

En la eNOS, los sitios C1 y C2 están ubicados ligeramente fuera del sitio catalítico y forman el canal de acceso del sustrato al interior de la proteína. La estabilización del ácido ursólico en estos sitios se da por la interacción con residuos sobre los sitios C1 y C2 y por puentes de hidrógeno con los residuos de ácido aspártico 480 (Asp480) e histidina 373 (His373) y una interacción electrostática con la arginina 367 (Arg367) (Figura 9) (Ibarra-Alvarado y col., 2014).

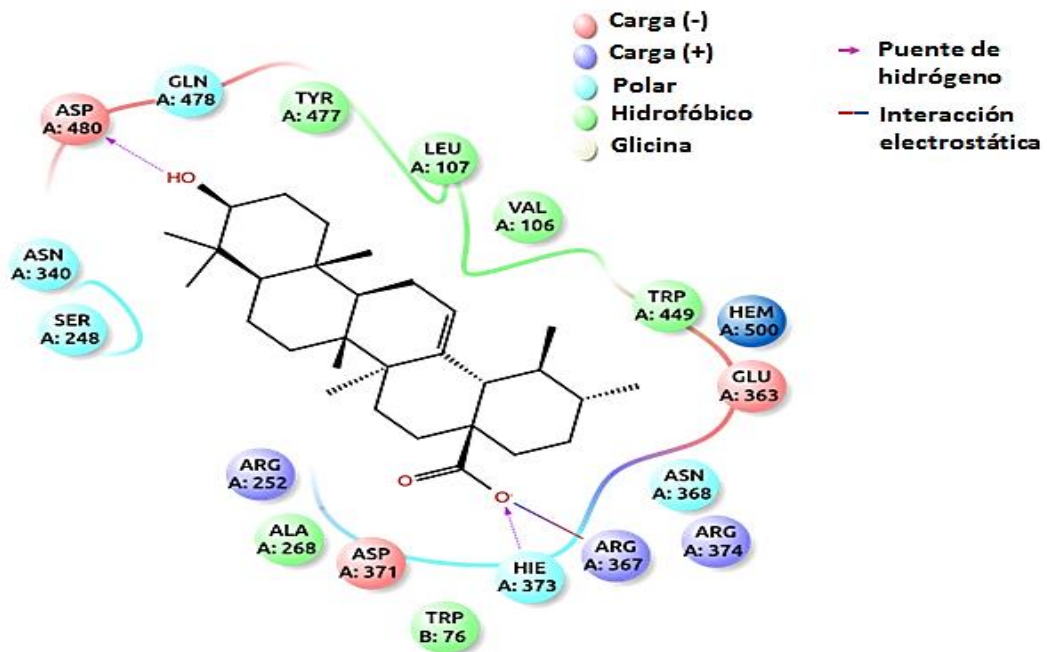
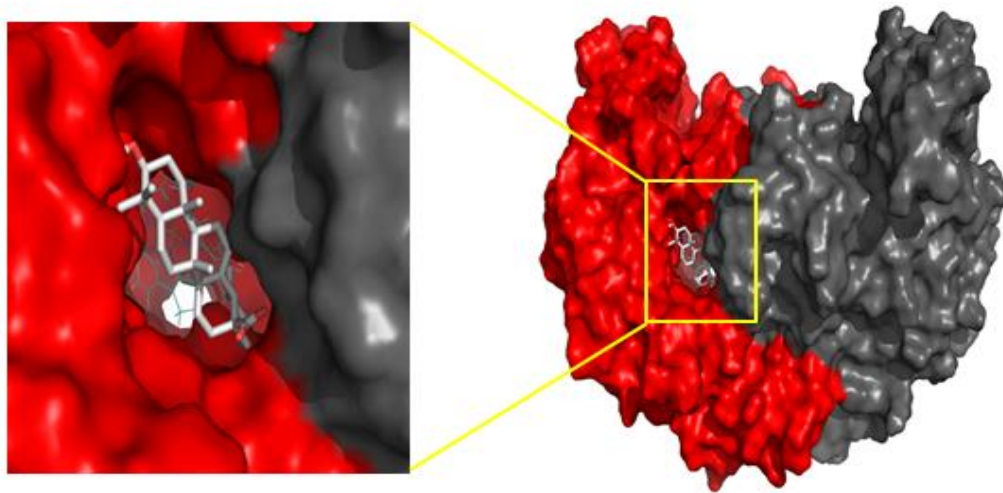


Figura 9. Esquema de unión e interacción entre el ácido ursólico y los residuos de aminoácidos de la eNOS. Modificado de Ibarra-Alvarado y col., 2014.

En la interacción entre el ácido ursólico y la CSE, este triterpeno tiene afinidad por un sitio que comparte residuos de las cadenas A y B de la proteína y su acoplamiento es estabilizado por un puente de hidrógeno e interacciones de corta distancia (Figura 10) (Ibarra-Alvarado y col., 2014).

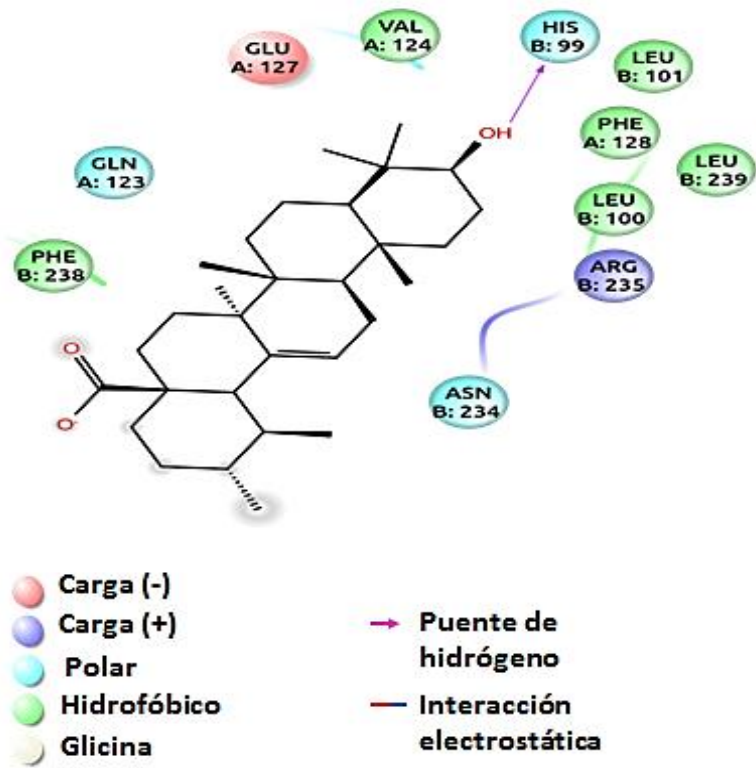
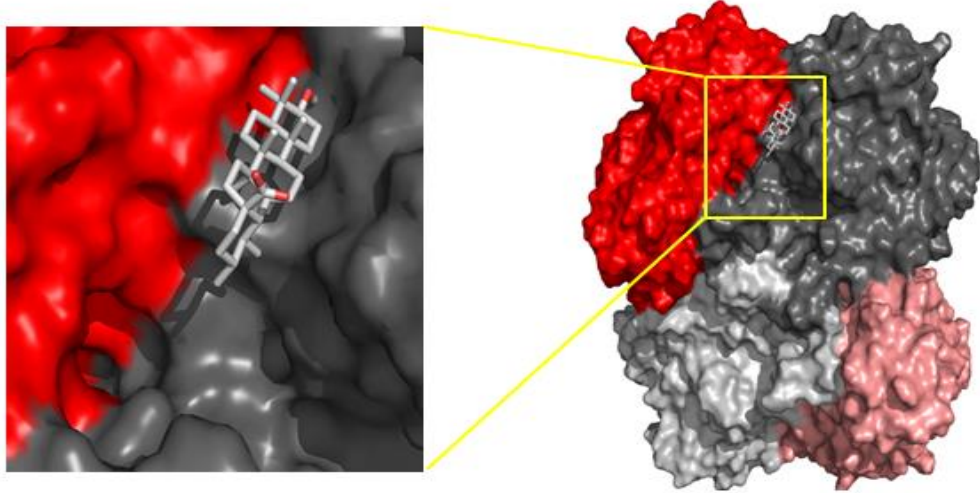


Figura 10. Esquema de unión e interacción entre el ácido ursólico y los residuos de aminoácidos de la CSE. Modificado de Ibarra-Alvarado y col., 2014.

## **2. HIPÓTESIS**

La exploración virtual en bases de datos de compuestos, mediante el acoplamiento molecular, permite identificar activadores de las enzimas eNOS y CSE con efecto vasodilatador.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo general.

Identificar nuevos compuestos vasodilatadores que actúen a través de la activación de las enzimas eNOS y CSE.

#### 3.2. Objetivos específicos.

- Identificar, mediante el método de acoplamiento molecular automatizado (docking), compuestos con alta afinidad por las enzimas eNOS y CSE, usando como fuente de moléculas algunas bases de datos de compuestos comerciales de origen natural y sintético.
- Determinar, mediante el ensayo de aorta aislada de rata, la participación de las enzimas eNOS y CSE en el efecto vasodilatador inducido por los compuestos seleccionados por métodos computacionales.
- Determinar, mediante ensayos bioquímicos, si los compuestos seleccionados por métodos computacionales producen la activación de las enzimas eNOS y CSE.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Materiales y métodos.

#### 4.1.1. Modelo de interacción molecular *in silico*.

##### 4.1.1.1. Preparación de las estructuras de las enzimas (eNOS y CSE).

Ambas enzimas de *H. sapiens* se han resuelto por cristalografía de rayos X y sus coordenadas atómicas se encuentran depositadas en la base de datos de proteínas (Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>). En este proyecto se usaron las estructuras de la eNOS (PDB: 3NOS) (Fischmann y col., 1999) y de la CSE (PDB: 3COG) (Sun y col., 2009) que presentaron la mejor resolución disponible para estas estructuras, además de contar con los cofactores necesarios para su actividad en estado nativo.

Es normal que las estructuras resueltas por cristalografía de rayos X presenten errores y cuenten con información adicional, por lo que las estructuras fueron sometidas a un proceso de corrección y preparación usando el módulo Protein preparation wizard disponible en el conjunto de programas Maestro (Schrödinger Inc. <http://www.schrodinger.com>), asignando órdenes de enlace, adicionando átomos faltantes, borrando moléculas de agua, iones accesorios y ligandos, así como completando residuos faltantes y eligiendo la conformación más adecuada de cadenas laterales ambiguas.

##### 4.1.1.2. Acoplamiento molecular.

Este procedimiento se llevó a cabo con el programa Glide 6.9 en su modo XP de la suite Maestro y AutoDock-Vina 1.0. Los dos programas dieron como resultados diversas estructuras, de las cuales sólo se consideraron aquellas que presentaron un consenso entre los 2 programas. Estos se usaron con los parámetros normales de uso en las estructuras cristalográficas de las 2 proteínas (Friesner y col., 2006; Lang y col., 2009; Morris y col., 2009).



## 4.2. Determinación del efecto vasodilatador.

### 4.2.1. Animales de experimentación.

Ratas de la cepa Wistar, machos (250-300 g), fueron proporcionadas por el instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla.

En base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, los animales se mantuvieron en jaulas de policarbonato con medidas 54.5 cm (largo) x 39.5 cm (ancho) x 20.0 cm (alto), con tapa de reja metálica con separaciones de 1.5 cm entre cada una. Se utilizó cama sanitaria suave de aserrín con comprimidos sanitarios, la cual se cambió tres veces a la semana. Los animales se alojaron en un cuarto bien ventilado a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, bajo un ciclo de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad (luz de 7:00 a.m. a 7 p.m.), con un 30 % de humedad. Para el ensayo de aorta aislada de rata se utilizaron 30 ratas. Los animales se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la UAQ, de dimensiones 9 m (largo) x 4.5 m (ancho) x 3.2 m (alto). 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. Posteriormente, se contrató un servicio especial dedicado al tratamiento y procesamiento de estos residuos.

### 4.2.2. Evaluación farmacológica: Ensayo de aorta aislada de rata.

#### 4.2.2.1. Equipo.

La tensión originada por la contracción del músculo liso arterial se registró por medio de un transductor de fuerza Grass modelo FTO3 unido a un polígrafo Grass de 6 canales Modelo 7D (Astro-med, Inc. West Warwick, RI. USA).

#### 4.2.2.2. Solución fisiológica para el ensayo de aorta aislada de rata.

Solución de Krebs-Heinseleit para aorta, a pH fisiológico (pH 7.4): NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM y D-glucosa (Feelischet al., 1999).

#### 4.2.2.3. Preparación de los compuestos para el ensayo de aorta aislada de rata.

Se prepararon soluciones stock (11.9 mg/mL) de los compuestos, a partir de las cuales se realizaron diluciones correspondientes a las concentraciones a evaluar en las cámaras de tejido aislado (0.001 µg/mL a 1 µg/mL para evaluar bajas concentraciones y de 1 µg/mL a 1000 µg/mL para evaluar altas concentraciones). En la preparación de la solución stock se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los compuestos insolubles en medio acuoso. Es importante señalar que la concentración de este compuesto en la cámara de tejido aislado no excedió del 0.20% v/v. Los otros compuestos se prepararon directamente en agua. Las subsiguientes diluciones de cada una de las sustancias de prueba se prepararon en agua destilada.

#### 4.2.2.4. Ensayo de aorta aislada de rata.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación utilizando una guillotina (NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.5.3.3). Se removió la aorta torácica y se colocó en una solución fría de Krebs-Heinseleit (pH 7.4). Se removió de la aorta el tejido adiposo y conectivo y se cortó en anillos de 4-5 mm. Los anillos de aorta fueron montados en cámaras de incubación de 5 mL con solución Krebs-Heinseleit a 37°C y burbujeo constante de una mezcla de 95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>. Los tejidos se estabilizaron durante 60 min bajo una tensión de 1.5 g a 37°C. Durante este período, el medio del baño se cambió cada 10 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta se contrajeron con KCl (100 mM) para sensibilizar el tejido. Una vez estable la contracción con el KCl, el medio del baño se cambió hasta recuperar la tensión basal de 1.5 g. Posteriormente, los tejidos se contrajeron con L-fenilefrina (1 µM) y se registró el grado de contracción. La integridad del endotelio

fue evaluada periódicamente en un segmento de aorta representativo mediante la determinación de la relajación inducida por acetilcolina (1  $\mu$ M) (mayor a 60%). Los compuestos de prueba, seleccionados en la parte computacional, se adicionaron a las cámaras 20 min después de haber agregado la L-fenilefrina, dejando estabilizar 10 min entre cada adición para la construcción de la curva concentración-respuesta. Los cambios en la tensión isométrica se midieron por medio de transductores de fuerza Grass Modelo FT03, acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales Modelo 7-8P y la información fue procesada por el programa GraphPad Prism 6. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de relajación, tomando como base la contracción inicial alcanzada al adicionar la L-fenilefrina (Ibarra-Alvarado et al., 2007).

4.2.2.5. Elucidación del mecanismo de acción vasodilatador de los compuestos puros: determinación de la participación de las vías del NO/GMPc, H<sub>2</sub>S/ K<sub>ATP</sub>, PGI<sub>2</sub>/AMPc y CO/GMPc.

Se realizaron experimentos, mediante el ensayo de aorta aislada de rata, para obtener información acerca del mecanismo, mediante el cual los compuestos puros ejercieron su efecto vasodilatador. Los experimentos con segmentos de aorta libres de endotelio se realizaron mediante la remoción química de la capa de células endoteliales con ácido desoxicólico al 0.2%. Los experimentos en los que fue necesario inhibir enzimas importantes de las vías del NO/GMPc, H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>, PGI<sub>2</sub>/AMPc y CO/GMPc se realizaron incubando los tejidos durante 20 minutos en presencia de los siguientes inhibidores, antes de contraer y agregar los compuestos puros: a) L-NAME (100  $\mu$ M) para inhibir la vía del NO/GMPc, b) PPG (10 mM) para inhibir la vía del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>, c) ODQ (10  $\mu$ M) para inhibir la vía del NO/GMPc, d) MESO-IX (15  $\mu$ M) para inhibir la vía del CO/GMPc, e) indometacina (10  $\mu$ M) para inhibir la vía de la PGI<sub>2</sub>/AMPc, f) cloruro de tetraetilamonio (TEA)(1 mM) y glibenclamida (10  $\mu$ M) para inhibir los K<sub>ATP</sub>, (Galle et al., 1999; Ryter y Otterbein, 2004; Ibarra-Alvarado et al., 2007; Luna-Vazquez et al., 2016) .

### 4.2.3. Cuantificación de la liberación de transmisores gaseosos (NO y H<sub>2</sub>S).

#### 4.2.3.1. Ensayos de actividad enzimática.

##### 4.2.3.1.1. Equipo.

La cuantificación de las muestras se realizó por medio de un lector de placas Bio-Rad Benchmark Plus Microplate Reader.

##### 4.2.3.1.2. Actividad de la CSE.

###### 4.2.3.1.2.1. Preparación de las muestras.

Los anillos de aorta se homogenizaron en PBS (solución salina amortiguadora) con inhibidor de proteasas a pH 7.4. Posteriormente, se dejaron en agitación moderada durante 90 min en hielo y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 20 minutos.

###### 4.2.3.1.2.2. Cuantificación de sulfuros.

Se realizó una cuantificación de la concentración de H<sub>2</sub>S por un método colorimétrico. En tubos Eppendorf de 2 mL en un baño de hielo, se agregaron 350 µL de homogenado de tejido, 25 µL de piridoxal-5'-fosfato (2 mM), 25 µL de L-cisteína (10 mM) y 250 µL de acetato de zinc (ZnAc) (1%) para formar la trampa de H<sub>2</sub>S. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de cada uno de los compuestos de prueba en diferentes concentraciones y la mezcla se dejó reposando por 1 h en un baño con agitación baja a 37°C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 200 µL de sulfato de *N,N*-dietil-*p*-fenilendiamina (DPD) (20 mM) diluido en ácido clorhídrico (HCl) (1.2 M), seguido de 200 µL de cloruro de hierro III (FeCl<sub>3</sub>) (30 mM) diluido en HCl (1.2 M), y después de 10 minutos 250 µL de ácido tricloroacético (10%). Se dejó reposar la reacción a temperatura ambiente por 20 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 670 nm. Se realizó la curva de calibración siguiendo el mismo procedimiento, la cual se efectuó con estándares de NaHS en concentraciones de 5-200 µM (Bucci y col., 2010; Coletta y col., 2012).

#### 4.2.3.1.3. Actividad de la eNOS.

##### 4.2.3.1.3.1. Preparación de la muestra.

Se realizó un ensayo normal de aorta. Las aortas se contrajeron con fenilefrina y se agregó la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de los compuestos de prueba. En el caso de nuestro control positivo se utilizó acetilcolina ( $1 \mu\text{M}$ ). Se dejaron estabilizar durante 10 min y se desmontaron los anillos de aorta. Cada uno se trituró en nitrógeno líquido y se colocaron en tubos Eppendorf. Posteriormente se homogenizaron los tejidos individualmente en  $600 \mu\text{L}$  de PBS a pH 7.4. Una vez homogenizados se centrifugaron a 15,000 rpm durante 20 minutos.

##### 4.2.3.1.3.2. Cuantificación de nitritos.

Se realizó el ensayo de Griess para cuantificar los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en un proceso de dos pasos. El primer paso fue la conversión de nitrato a nitrito utilizando nitrato reductasa. El segundo paso fue la adición del reactivo de Griess, el cual convirtió los nitritos a un compuesto azo, cuya medida fotométrica de la absorbancia determinó la concentración de nitritos.

Para reducir los nitratos a nitritos se utilizó nitrato reductasa de *Aspergillus niger*, de la cual se preparó una solución de almacenamiento de 50 U/mL, disolviendo el polvo liofilizado en agua destilada y agitando por 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar la completa disolución de la enzima.

De las muestras centrifugadas se extrajeron  $150 \mu\text{L}$  y se colocaron en un tubo Eppendorf, se adicionaron  $10 \mu\text{L}$  de NADPH ( $80 \mu\text{M}$ ) y  $10 \mu\text{L}$  de Nitrato reductasa ( $50 \text{ mU}/100 \mu\text{L}$  de muestra). Esta reacción se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 h.

Después del tiempo de incubación, se agregaron  $50 \mu\text{L}$  de ácido sulfanílico al 1% en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5% para formar el intermediario y se dejaron 10 minutos. Posteriormente, se añadieron  $50 \mu\text{L}$  de NED al 0.02% en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%. Se esperó 30 minutos para que se completara la reacción. Transcurrido ese tiempo se leyó a 540 nm. Adicionalmente, se generó una curva estándar con nitrito de sodio en

concentraciones de 1 a 100  $\mu\text{M}$  (Grisham y col. 1996; Sun y col., 2003; Bryan y Grisham, 2007).

#### 4.2.4. Análisis Estadístico.

Se realizaron 6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de las sustancias de prueba. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio (S.E.M.).

Los datos experimentales generados en cada evaluación se ajustaron a una ecuación sigmoideal y graficaron mediante el programa PRISMA 6.01 Graph Pad (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA EU) para la obtención de las curvas concentración-respuesta. En cada caso se calculó la  $CE_{50}$  y el  $E_{\text{max}}$ .

La  $CE_{50}$ , es definida como la concentración de sustancia de prueba ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) necesaria para producir el 50% de la relajación máxima sobre el tejido precontraído con fenilefrina. Este parámetro fue utilizado para evaluar la variación del efecto relajante en las diferentes condiciones de valoración de las curvas concentración-respuesta.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y  $t$  de student mediante el programa Prisma 6.01 Graph Pad, seguido por las pruebas post hoc como Bonferroni y Tukey para evaluar la diferencia significativa entre las medias. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con  $p \leq 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

5.1. Búsqueda virtual de nuevos compuestos con posible afinidad a eNOS y CSE.

5.1.2. Preparación de las bases de datos de compuestos.

Para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad vasodilatadora, se usaron las siguientes bases de datos, depurándose para eliminar la presencia de compuestos repetidos:

- Productos Naturales (ZINC-Natural Products: 180,313 estructuras).
- Fármacos aprobados (ZINC-DrugBank: 11, 421 estructuras).
- Librerías comerciales (ZINC-Maybridge Commercial vendor library: 54, 298 estructuras).
- Base de datos diversa del Instituto Nacional del Cáncer de E.U. (NCI Diversity 3:1, 597 estructuras).

En total, se exploró una base de datos conformada por un total de 247,629 estructuras. La preparación de estos ligandos se realizó utilizando LigPrep de Maestro (LigPrep, Schrödinger release 2015-4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015) y consistió en la generación de todas las formas tautoméricas en el rango de pH dado ( $7.0 \pm 0.5$ ), estereoisómeros si éstos no fueron especificados en el código SMILES extraído de la base de datos original. Así mismo, se aplicaron criterios de exclusión *lead-like* considerando propiedades moleculares, contenidos de aceptores y donadores de puente de hidrógeno, y topología molecular. Una vez aplicados los criterios de exclusión para depurar la base de datos y generación de estereoisómeros cuando fuera necesario, se obtuvo un total de 237,713 estructuras a evaluar.

5.1.3. Acoplamiento molecular.

5.1.3.1. Cribado virtual de alto rendimiento.

La búsqueda en las bases de datos se realizó con el módulo HTVS (*High Throughput Virtual Screening*) disponible en Glide Schrödinger release 2015-4

(Friesner y col., 2006; Halgren y col., 2004; Friesner y col., 2004) (Glide, versión 6.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015), utilizando los parámetros predeterminados para este módulo. La función de este módulo es hacer una búsqueda rápida de los mejores candidatos para un estudio de acoplamiento molecular (*docking*). Con esta búsqueda, la base de datos original de 237,713 estructuras se seccionó para estudiar los mejores candidatos con procedimientos más finos de *docking*. Para la siguiente fase del acoplamiento molecular, se seleccionaron las mejores 2,000 estructuras para cada proteína para evaluar su viabilidad como estructuras afines a las proteínas de estudio.

#### 5.1.3.2. Consensus de acoplamiento molecular.

El *docking* consenso es una técnica en la cual se utilizan varios algoritmos, generalmente eligiendo varios programas, para realizar acoplamiento molecular. En este procedimiento se consideraron *hits* aquellos en los cuales todos los algoritmos coincidieron en que fueron buenos candidatos, ya que cada algoritmo cuenta con su propia forma de evaluar los resultados (*docking scores*) (Houston y Walkinshaw, 2013).

Para este procedimiento se utilizaron los siguientes programas:

- Glide 6.9 en su modo XP, que es un cálculo de extra-precisión para la evaluación de los resultados.
- AutoDock-Vina 1.0 (Trott and Olson, 2010), que es un programa que emplea una *scoring function* basada en campos de fuerza y un método rápido de búsqueda de conformaciones.

Obtenido el consenso, se seleccionaron las estructuras con la mejor evaluación (*scores*), generando un total de 30 compuestos (Figura 11).



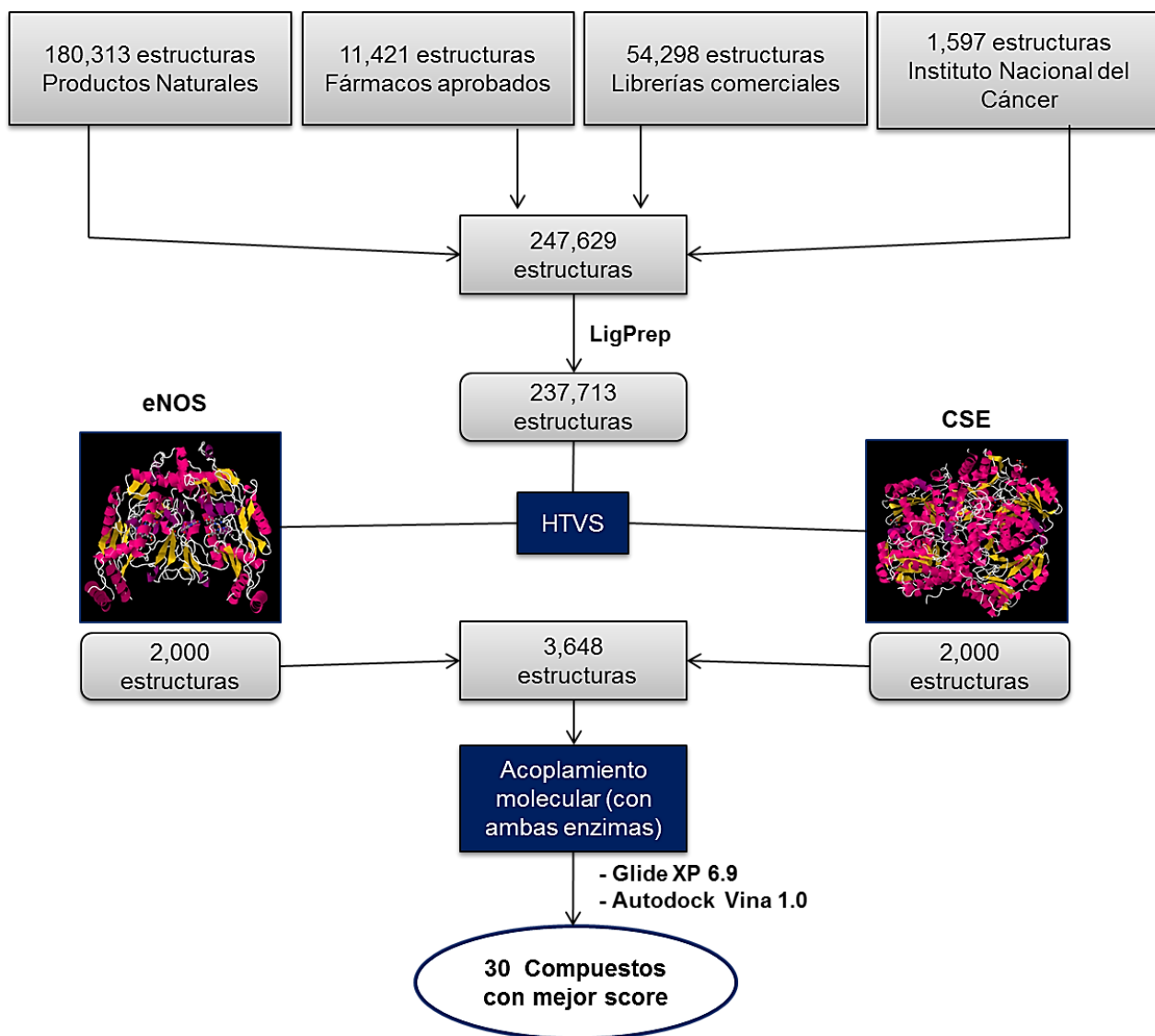


Figura 11. Diagrama de obtención de los 30 compuestos con mayor afinidad por las enzimas.

En el Cuadro 1 y Cuadro 2 se presentan los resultados consenso para las mejores 30 moléculas obtenidas en la búsqueda.

Cuadro 1. Docking consenso para los mejores 30 compuestos obtenidos en la búsqueda.

Clave ZINC	Scores para eNOS			Scores para CSE		
	Glide	AutoDock Vina	Percentil Consensus	Glide	AutoDock Vina	Percentil Consensus
ZINC15668997	-8.16	-8.4	0.02	-6.11	-7.2	0.12
ZINC00057321	-7.80	-7.9	0.04	-6.62	-6.2	0.30
ZINC00403079	-7.68	-7.3	0.10	-4.87	-5.5	0.50
ZINC01530764	-6.51	-7.6	0.12	-2.78	-7.6	0.64
ZINC01536779	-6.78	-7.4	0.12	-4.68	-6.9	0.28
ZINC00056556	-6.63	-7.4	0.13	-4.68	-6.7	0.32
ZINC35801098	-7.17	-7.2	0.13	-4.19	-7.9	0.24
ZINC00527386	-6.76	-7.3	0.14	-4.35	-7.9	0.21
ZINC11616526	-6.04	-7.6	0.17	-5.87	-6.1	0.33
ZINC00057278	-5.76	-7.9	0.18	-4.75	-6.5	0.35
ZINC01542113	-5.99	-7.4	0.19	-4.91	-8.3	0.09
ZINC01530611	-6.67	-7.0	0.20	-2.94	-6.6	0.69
ZINC01530688	-5.98	-7.3	0.21	-3.18	-7.5	0.50
ZINC01530977	-5.33	-8.1	0.22	-4.04	-6.8	0.45
ZINC00000294	-6.14	-7.1	0.22	-4.92	-6.7	0.29
ZINC01530580	-7.79	-6.7	0.22	-6.29	-6.9	0.17
ZINC00056646	-6.05	-7.1	0.23	-4.87	-6.1	0.41
ZINC01530654	-7.36	-6.7	0.24	-3.61	-6.7	0.57
ZINC02599970	-6.48	-6.9	0.24	-4.88	-6.0	0.43
ZINC03775644	-5.81	-7.2	0.25	-3.40	-6.9	0.57
ZINC01489478	-6.02	-7.0	0.26	-5.16	-7.0	0.20
ZINC00001899	-5.66	-7.0	0.30	-4.05	-5.3	0.69
ZINC01530863	-6.25	-6.7	0.31	-5.89	-6.5	0.26
ZINC00002281	-5.12	-7.2	0.34	-4.60	-5.6	0.52
ZINC00897089	-4.94	-7.3	0.34	-5.61	-7.8	0.06
ZINC03872738	-4.71	-7.5	0.35	-4.14	-6.4	0.50
ZINC00057255	-4.27	-7.7	0.40	-3.54	-7.5	0.44
ZINC00004076	-5.65	-6.6	0.40	-4.02	-6.5	0.51
ZINC00034157	-6.67	-6.2	0.40	-5.40	-5.5	0.44
ZINC00056653	-6.23	-6.3	0.41	-3.66	-5.5	0.76

Cuadro 2. Sustancias de naturaleza farmacéutica obtenidas del *docking* consenso.

Nombre	Scores para eNOS			Scores para CSE		
	Glide	AutoDock Vina	Percentil Consensus	Glide	AutoDock Vina	Percentil Consensus
(+)-Nebivolol	-8.16	-8.4	0.02	-6.11	-7.2	0.12
Hidrobromuro de fenoterol	-7.80	-7.9	0.04	-6.62	-6.2	0.30
(-)-Clorhidrato de midodrina	-7.68	-7.3	0.10	-4.87	-5.5	0.50
Protriptilina	-6.51	-7.6	0.12	-2.78	-7.6	0.64
Clorhidrato de duloxetina	-6.78	-7.4	0.12	-4.68	-6.9	0.28
Clorhidrato de propanolol	-6.63	-7.4	0.13	-4.68	-6.7	0.32
Indacaterol	-7.17	-7.2	0.13	-4.19	-7.9	0.24
Clorhidrato de paroxetina	-6.76	-7.3	0.14	-4.35	-7.9	0.21
Isoxsuprina	-6.04	-7.6	0.17	-5.87	-6.1	0.33
Clorhidrato de dobutamina	-5.76	-7.9	0.18	-4.75	-6.5	0.35
Vilazodona	-5.99	-7.4	0.19	-4.91	-8.3	0.09
Clorhidrato de desipramina	-6.67	-7.0	0.20	-2.94	-6.6	0.69
Clorhidrato de Maprotilina	-5.98	-7.3	0.21	-3.18	-7.5	0.50
Clorhidrato de naftifina	-5.33	-8.1	0.22	-4.04	-6.8	0.45
(+)-Fenfluramina	-6.14	-7.1	0.22	-4.92	-6.7	0.29
Carvedilol	-7.79	-6.7	0.22	-6.29	-6.9	0.17
(R)-(+)-Pindolol	-6.05	-7.1	0.23	-4.87	-6.1	0.41
Sulfato de hidroxiclороquina	-7.36	-6.7	0.24	-3.61	-6.7	0.57
(-)-Formoterol	-6.48	-6.9	0.24	-4.88	-6.0	0.43
Hemisulfato de Proflavina	-5.81	-7.2	0.25	-3.40	-6.9	0.57
Sitagliptina	-6.02	-7.0	0.26	-5.16	-7.0	0.20
Penciclovir	-5.66	-7.0	0.30	-4.05	-5.3	0.69
(+)-Primaquina	-6.25	-6.7	0.31	-5.89	-6.5	0.26
Terbutalina	-5.12	-7.2	0.34	-4.60	-5.6	0.52
(-)-Mefloquina	-4.94	-7.3	0.34	-5.61	-7.8	0.06
Clorhidrato de guanfacina	-4.71	-7.5	0.35	-4.14	-6.4	0.50
Clortalidona	-4.27	-7.7	0.40	-3.54	-7.5	0.44
Naratriptán	-5.65	-6.6	0.40	-4.02	-6.5	0.51
Levonordefrina	-6.67	-6.2	0.40	-5.40	-5.5	0.44
Clorhidrato de isoprenalina	-6.23	-6.3	0.41	-3.66	-5.5	0.76

De los 30 compuestos obtenidos, se eligieron 4 compuestos para su posterior evaluación farmacológica. Éstos fueron elegidos por su afinidad a ambas enzimas, su disponibilidad comercial y factibilidad de compra (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lista de compuestos seleccionados para la evaluación farmacológica.

Nombre	Scores para eNOS			Scores para CSE		
	Glide	AutoDock Vina	Consensus	Glide	AutoDock Vina	Consensus
Hidrobromuro de fenoterol	-7.80	-7.9	0.04	-6.62	-6.2	0.30
(-)-Clorhidrato de midodrina	-7.68	-7.3	0.10	-4.87	-5.5	0.50
Isoxsuprina	-6.04	-7.6	0.17	-5.87	-6.1	0.33
Sitagliptin	-6.02	-7.0	0.26	-5.16	-7.0	0.20

5.1.3.3. Diagramas de interacción con la eNOS y CSE de los compuestos seleccionados para la evaluación farmacológica.

A partir de la información obtenida mediante los cálculos computacionales en el acoplamiento molecular en los programas Glide 6.9 y AutoDock-Vina 1.0, se generaron diagramas del ligando con la proteína, para observar las posibles interacciones de los 4 compuestos seleccionados con las enzimas eNOS y CSE, basados en los residuos de aminoácidos cercanos a las conformaciones obtenidas de las dos enzimas.

Las Figuras 12 a 19 muestran los diagramas de interacción y de superficie del fenoterol, la midodrina, la isoxsuprina y la sitagliptina, con la enzima eNOS y CSE en los programas Glide 6.9 y AutoDock-Vina 1.0 respectivamente.

Para el fenoterol, las principales interacciones que se observan con la eNOS (estructura 3NOS) en el programa Glide 6.9 son puentes de hidrógeno entre grupo OH con la cadena lateral de los aminoácidos Arg365, Asn338 y Asp478 de la cadena A, así como un puente de hidrógeno entre el grupo fenólico con el esqueleto peptídico de la proteína en Gln476 de la cadena A, además se presentan

interacciones hidrofóbicas y es posible que se formen interacciones de contacto tipo Van der Waals. Con la enzima CSE (3COG) las interacciones más fuertes se generan con aminoácidos de la cadena B, hay una interacción catión- $\pi$  entre el anillo fenólico y la Lys102, tres puentes de hidrógeno entre el esqueleto peptídico en His99, Arg235 y Leu101 con dos grupos OH y el grupo amino respectivamente (Figura 12A y 13A).

En el diagrama del fenoterol con la eNOS generado en el programa AutoDock-Vina 1.0, hay un apilamiento aromático por las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre Arg474, Try 475 y Arg107 con el resorcinol de la molécula, se genera un interacción Cati3n- $\pi$  entre la Arg183 y el sistema  $\pi$  que se crea en el grupo amino, se presentan dos puentes de hidrógeno entre el esqueleto peptídico en Phe473 y Try47 producidos por la interacción con grupos fen3licos, adem3s de generarse posibles interacciones hidrof3bicas y de Van der Waals. El diagrama de la CSE presenta mayores interacciones con amino3cido de la cadena B, hay una interacci3n  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo fen3lico con la Arg235, otra interacci3n cati3n- $\pi$  entre la Phe238 con el grupo amino y se forman dos puentes de hidr3geno entre el esqueleto peptídico en His99 y Leu100 con grupos OH (Figura 12B y 13B).

La uni3n de la midodrina a la eNOS con el programa Glide 6.9, muestra una interacci3n  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo arom3tico de la midodrina y el Trp74 de la cadena B, se forman dos puentes de hidr3geno de cadena lateral entre el ox3geno del anisol con Arg365 de la cadena A y entre el grupo hemo de la enzima con los dos grupos amino. Mientras que el diagrama de interacci3n con la CSE s3lo muestra interacciones con los amino3cidos de la cadena A, en particular dos puentes de hidr3geno de cadena lateral entre el Glu127 con los dos grupos amino y un puente de hidr3geno entre el esqueleto peptídico en Gln123 con un grupo OH (Figura 14A y 15A).

En AutoDock-Vina 1.0, la uni3n la midodrina y la enzima eNOS muestra dos interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo arom3tico de la midodrina con Phe468 y Arg107, dos puentes de hidr3geno entre el grupo amino con la Asn180 y la Leu469, as3 como una amplia distribuci3n de interacciones hidrof3bicas que pueden generar

posibles interacciones de contacto tipo Van der Waals. Con la enzima CSE, se presenta una interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo anisol y la Phe238 de la cadena B, un puente salino entre el grupo amino y Glu127 de la cadena A, un puente de hidrógeno entre el esqueleto peptídico de Leu127 de la cadena B con el grupo amino, además de posibles interacciones tipo Van der Waals (Figura 14B y 15B).

La isoxsuprina, en su diagrama de interacción con la eNOS en el programa Glide 6.9, presenta interacción doble en sus dos anillos aromáticos, formando en uno una interacción  $\pi$ - $\pi$  y catión- $\pi$  con la Arg365 con el grupo fenilo, de manera similar el anillo fenólico de la molécula forma el mismo tipo de interacciones con la Arg372, se presentan dos puentes de hidrógeno de cadena lateral entre grupos OH con Aps396 y el grupo hemo de la enzima; todas las interacciones son con aminoácidos de la cadena A. En la enzima CSE, la molécula de isoxsuprina interacciona con aminoácidos de la cadena B, formando una interacción  $\pi$ - $\pi$  con el anillo fenólico y la Phe238, una interacción catión- $\pi$  entre la Arg235 con el benceno y se generan tres puentes de hidrógeno uno entre el grupo OH y dos entre el grupo amino con His99, Leu100 y Leu101 respectivamente (Figura 16A y 17A).

En el diagrama obtenido con la eNOS en el programa AutoDock Vina 1.0 se forma un apilamiento aromático por las interacciones  $\pi$ - $\pi$  con Arg107 y Try475 con el benceno, se presenta un puente salino entre en grupo amino y el grupo hemo de la enzima, hay generación de un puente de hidrógeno entre el esqueleto peptídico en Leu469 con el grupo fenólico, además de haber una amplia distribución de interacciones hidrofóbicas y posibles interacciones de contacto de tipo Van der Waals. Con la enzima CSE las interacciones son pocas, se presenta un puente de hidrógeno entre el esqueleto peptídico en Leu101 con el grupo OH y probables interacciones hidrofóbicas (Figura 16B y 17B).

Para la sitagliptina, en el diagrama generado con la eNOS en el programa Glide 6.9 se forman dos interacciones  $\pi$ - $\pi$ , una entre el grupo trifluorofenilo con el Trp74 de la cadena B y otra entre el anillo triazol con la His371 de la cadena A, además se presentan dos interacciones fuertes con el grupo amino formando puentes salinos entre la Glu75 de la cadena B y Asp369 de la cadena A, así como un puente de

hidrógeno entre el esqueleto peptídico en Hie461 con el grupo amino. Por otro lado, al interaccionar la sitagliptina con la enzima CSE se produce una interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo triazólico con la Phe238 de la cadena B, un puente de hidrógeno entre el esqueleto peptídico en la Arg235 con el oxígeno del grupo carbonilo y se forman tres puentes de hidrógeno de cadena lateral entre el grupo amino con la His99, Leu100 y Leu101 de la cadena B (Figura 18A y 19A).

En el diagrama con la enzima eNOS en el programa AutoDock-Vina 1.0 se forma un puente salino entre el grupo amino con la Asp129, un puente de hidrógeno entre el esqueleto peptídico en Gln87 con ese mismo grupo y presenta una distribución de interacciones de tipo Van der Waals con aminoácido polares. En el diagrama con la enzima CSE no hay interacciones marcadas con los grupos funcionales de la molécula, sólo posibles interacciones hidrofóbicas y de tipo Van der Waals (Figura 18B y 19B).

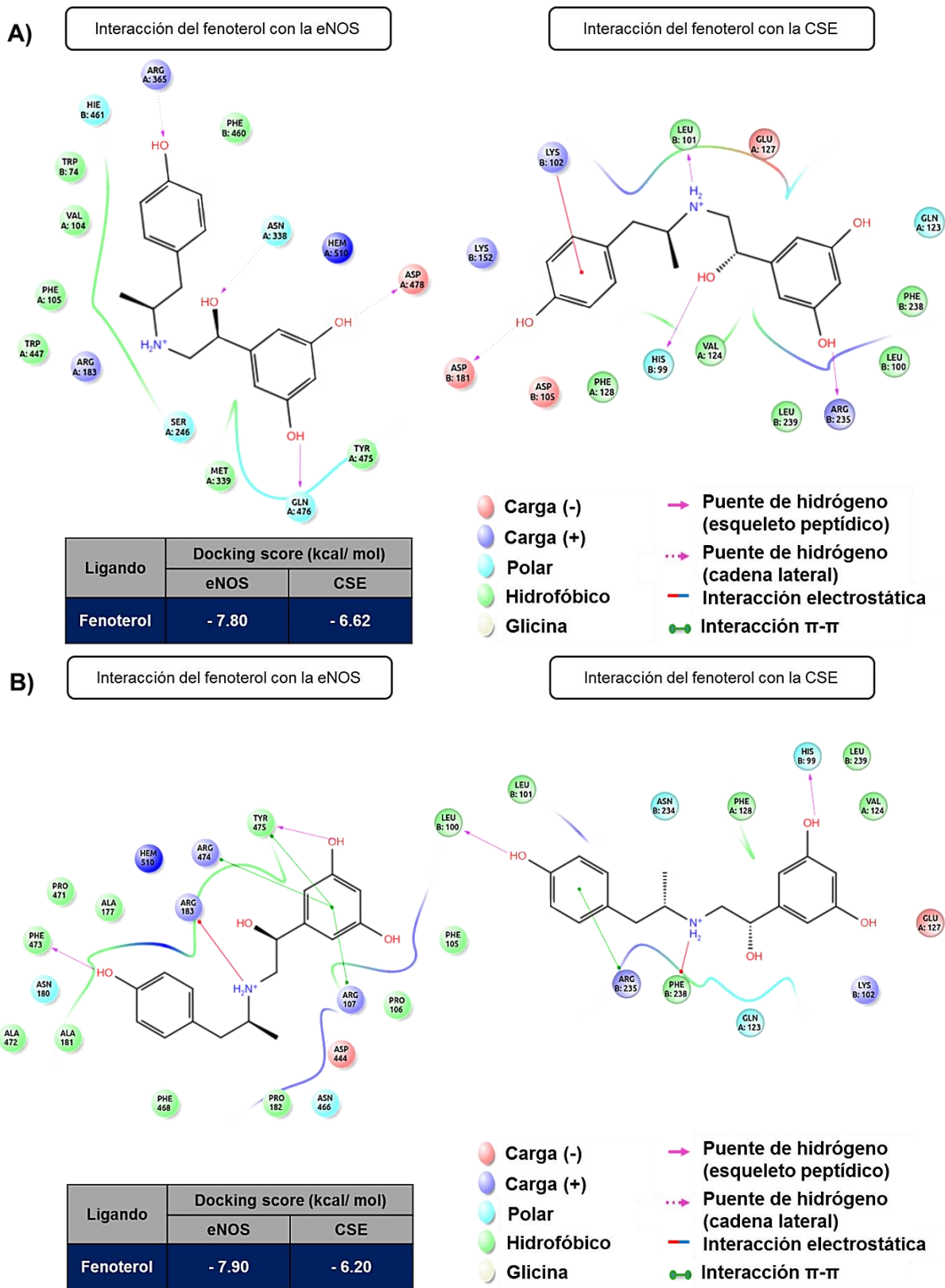


Figura 12. Diagramas de interacción del fenoterol con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.



A)

Diagrama de superficie del fenoterol con la eNOS

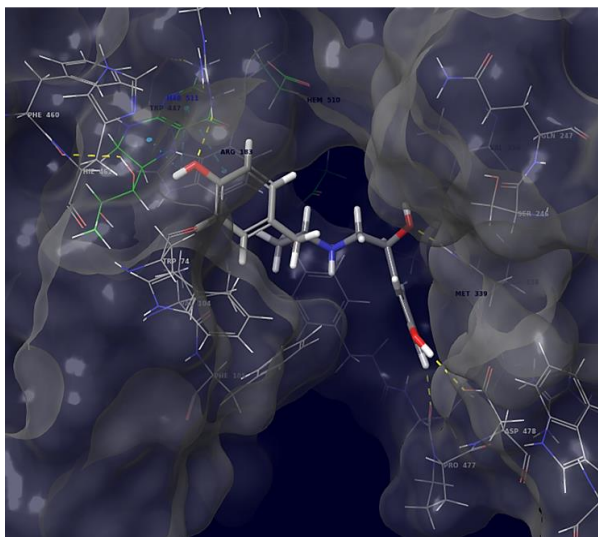
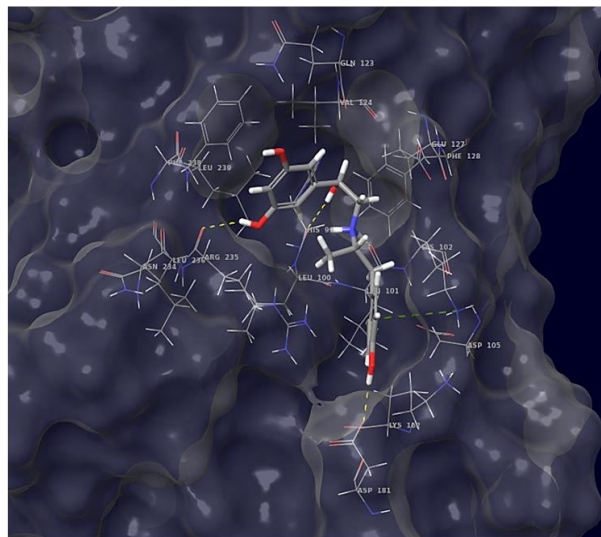


Diagrama de superficie del fenoterol con la CSE



 Puente de hidrógeno

 Interacción  $\pi$ -catión

 Interacción  $\pi$ - $\pi$

B)

Diagrama de superficie del fenoterol con la eNOS

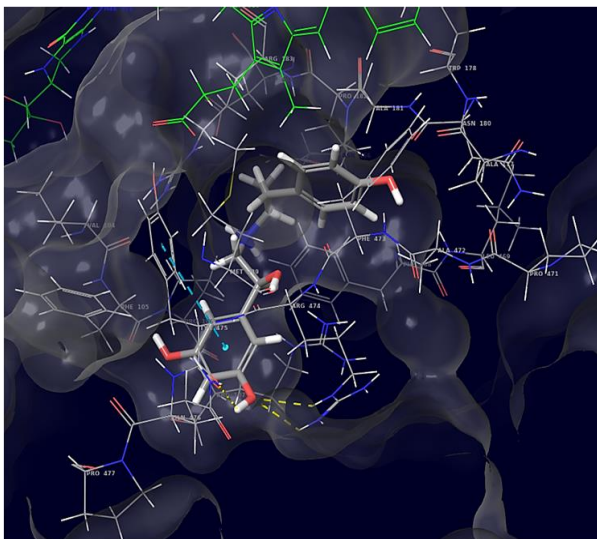
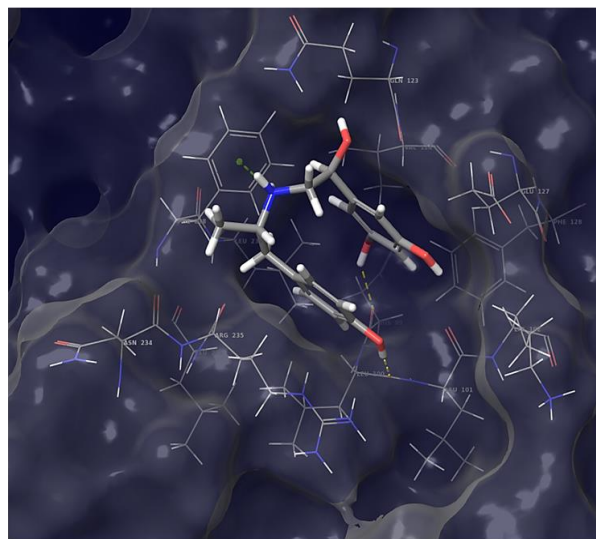


Diagrama de superficie del fenoterol con la CSE



 Puente de hidrógeno

 Interacción  $\pi$ -catión

 Interacción  $\pi$ - $\pi$

Figura 13. Diagramas de superficie del fenoterol con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.

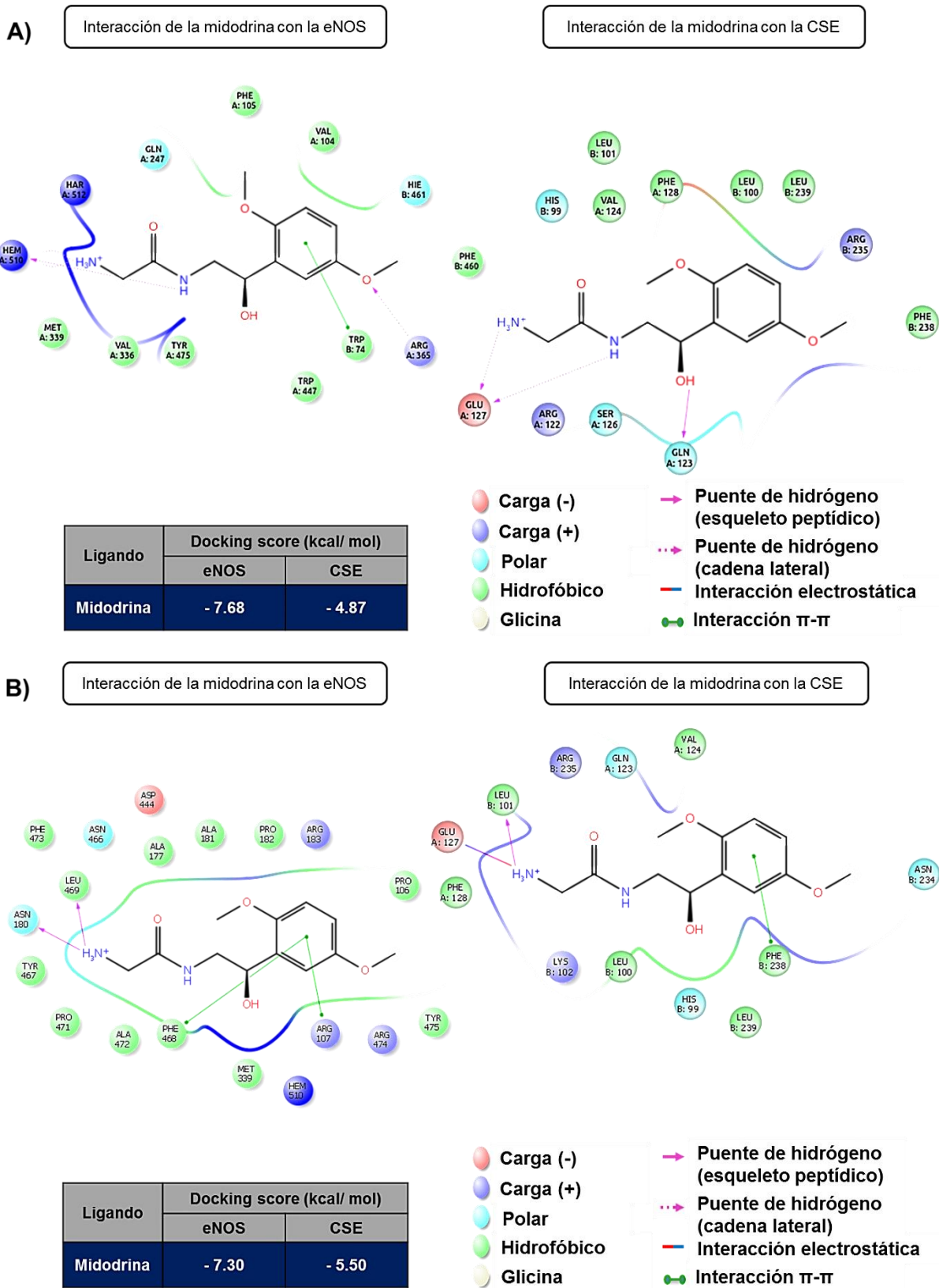
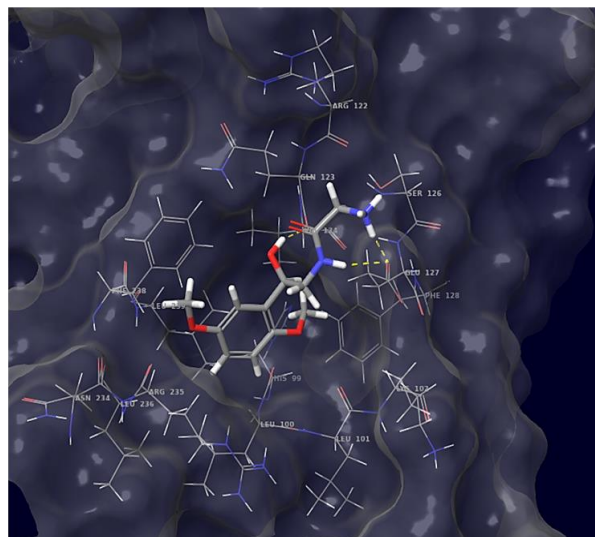
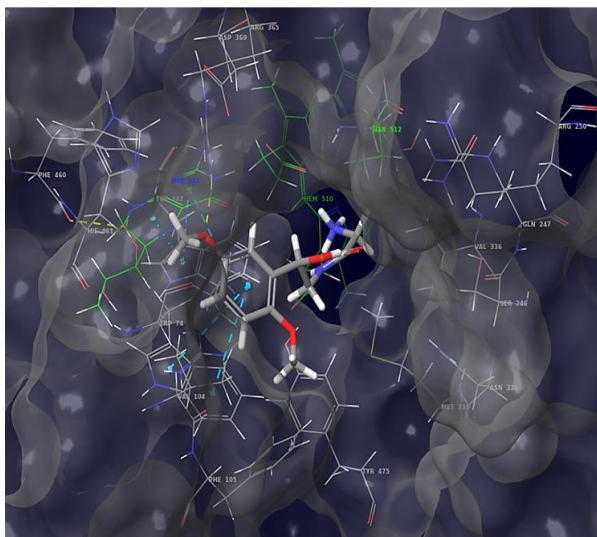





Figura 14. Diagramas de interacción de la midodrina con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.

A)

Diagrama de superficie de la midodrina con la eNOS

Diagrama de superficie de la midodrina con la CSE

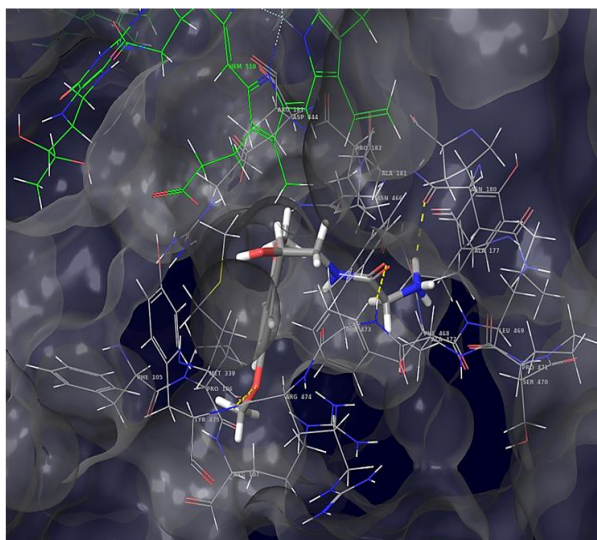


-  Puente de hidrógeno
-  Interacción  $\pi$ -catión
-  Interacción  $\pi$ - $\pi$

B)

Diagrama de superficie de la midodrina con la eNOS

Diagrama de superficie de la midodrina con la CSE



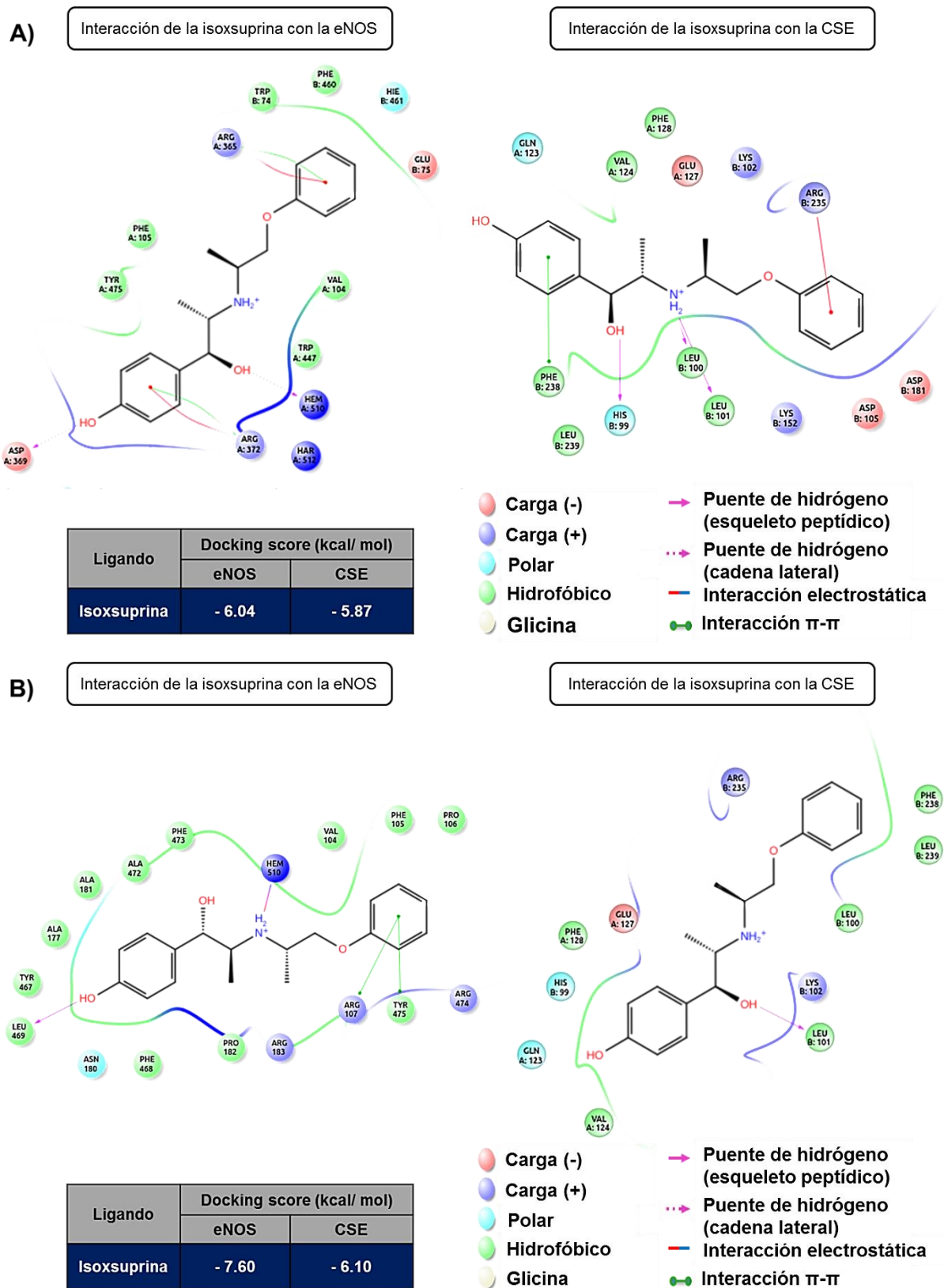
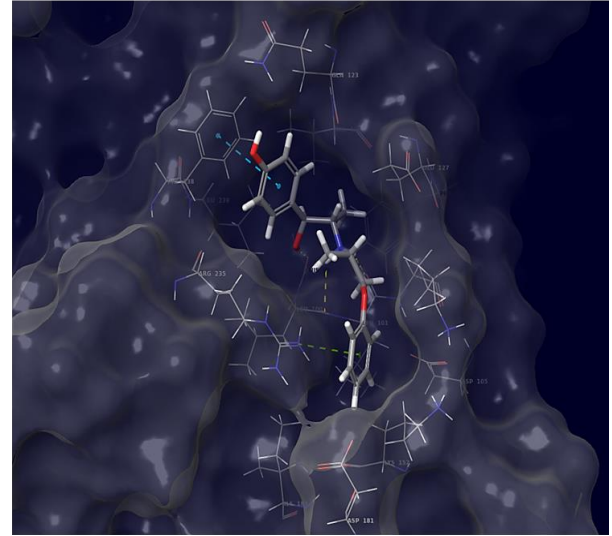
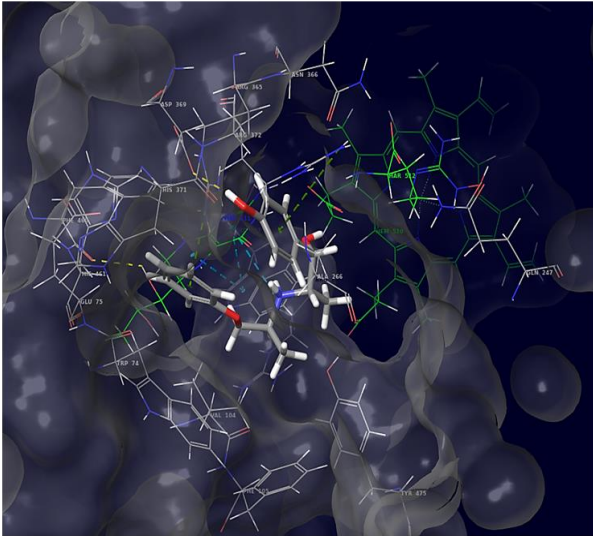





Figura 16. Diagramas de interacción de la Isoxsuprina con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.

A)

Diagrama de superficie de la isoxsuprina con la eNOS

Diagrama de superficie de la isoxsuprina con la CSE

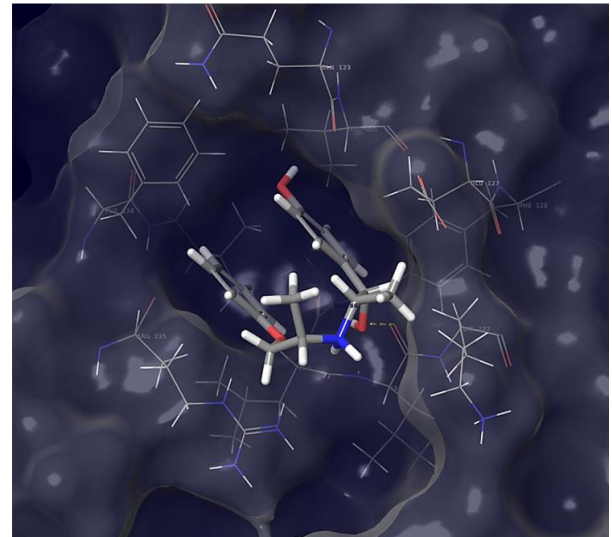
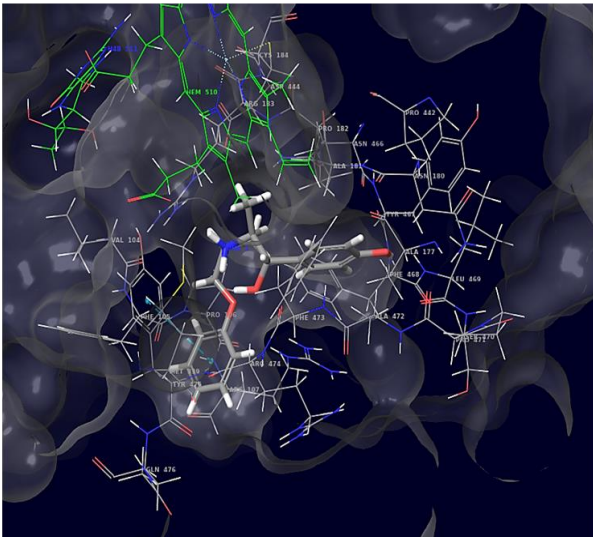


-  Puente de hidrógeno
-  Interacción  $\pi$ -catión
-  Interacción  $\pi$ - $\pi$

B)

Diagrama de superficie de la isoxsuprina con la eNOS

Diagrama de superficie de la isoxsuprina con la CSE






-  Puente de hidrógeno
-  Interacción  $\pi$ -catión
-  Interacción  $\pi$ - $\pi$

Figura 17. Diagramas de superficie de la Isoxsuprina con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.

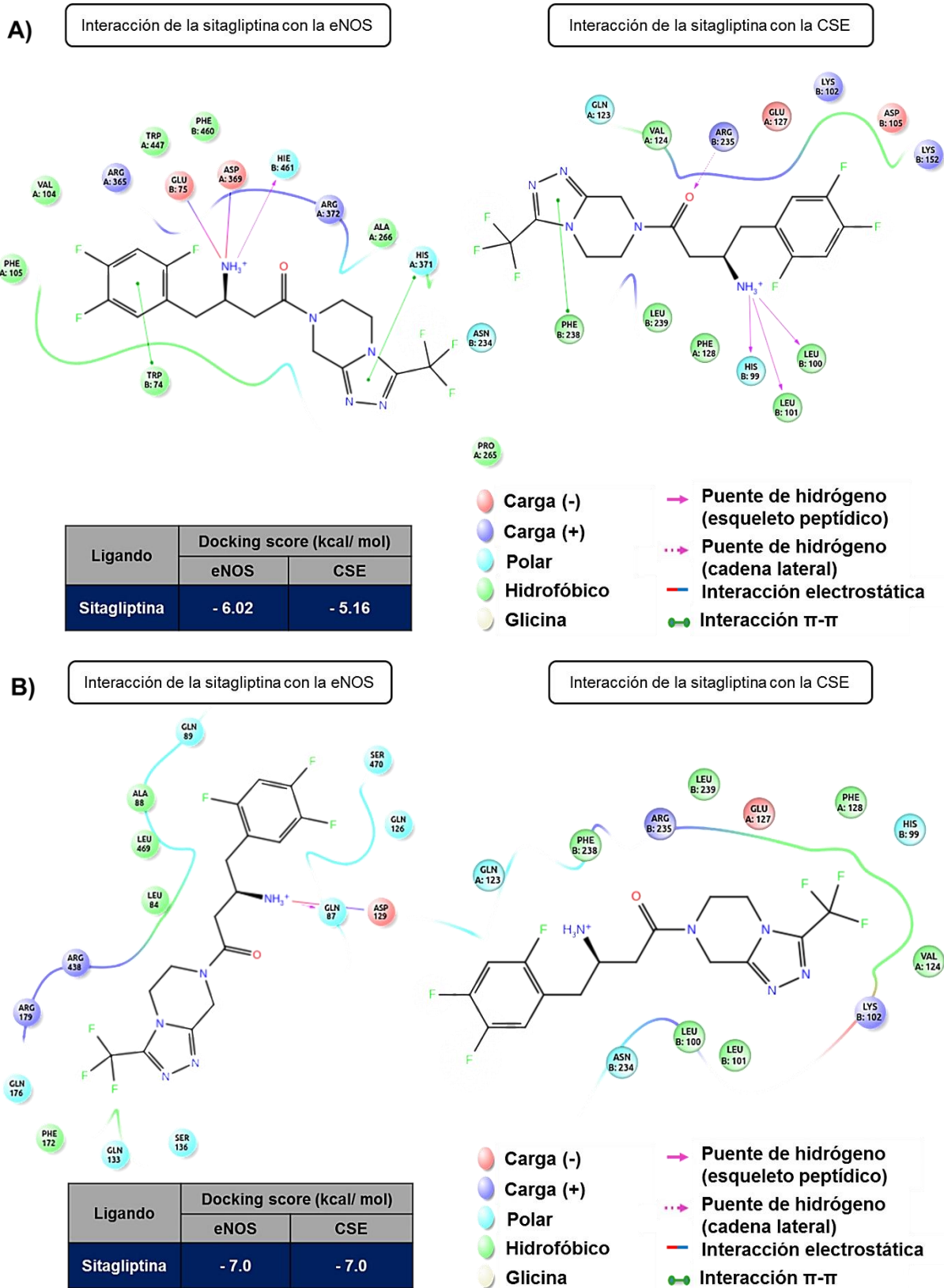
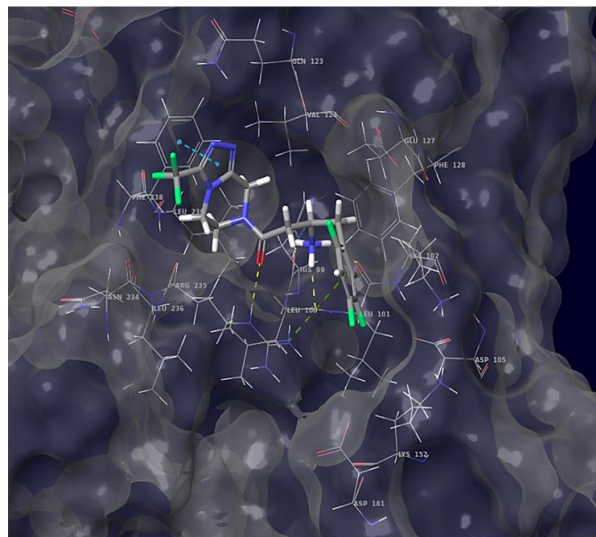
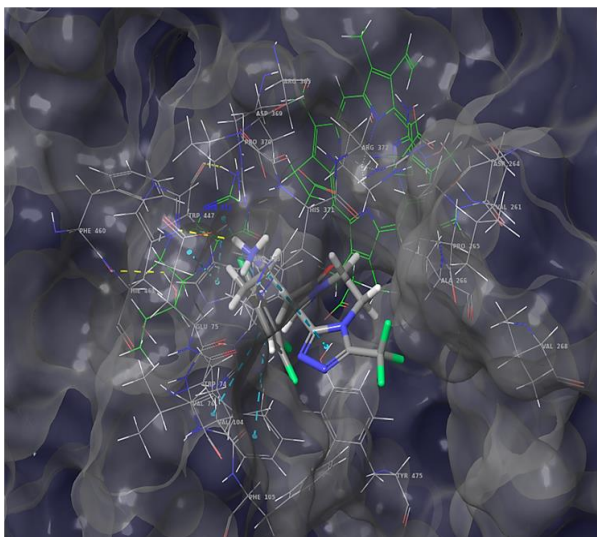


Figura 18. Diagramas de interacción de la sitagliptina con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.

A)

Diagrama de superficie de la sitagliptina con la eNOS

Diagrama de superficie de la sitagliptina con la CSE



 Puente de hidrógeno

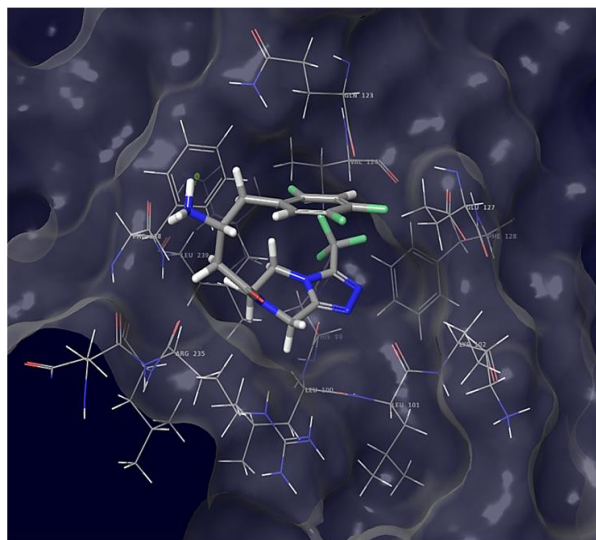
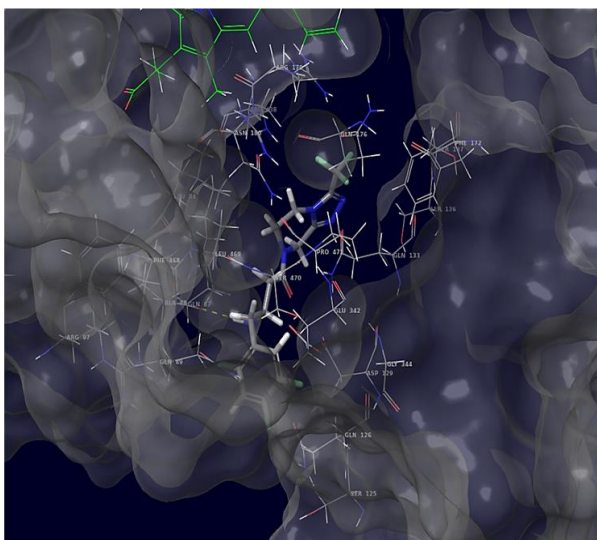
 Interacción  $\pi$ -catión

 Interacción  $\pi$ - $\pi$

B)

Diagrama de superficie de la sitagliptina con la eNOS

Diagrama de superficie de la sitagliptina con la CSE



 Puente de hidrógeno

 Interacción  $\pi$ -catión

 Interacción  $\pi$ - $\pi$

Figura 19. Diagramas de superficie de la sitagliptina con las enzimas eNOS y CSE en los programas A) Glide 6.9 y B) AutoDock Vina 1.0.

## 5.2. Ensayos farmacológicos.

5.2.1. Evaluación del efecto vasodilatador producido por los compuestos seleccionados a partir de los estudios *in silico* mediante el ensayo de aorta aislada de rata.

El fenoterol, la midodrina, la isoxsuprina y la sitagliptina, compuestos seleccionados en la búsqueda computacional, fueron evaluados para determinar su efecto vasodilatador.

El Cuadro 4 muestra los valores de  $E_{max}$  y de  $CE_{50}$  de estos compuestos, así como del nitroprusiato de sodio (SNP), la Acetilcolina (ACh), el hidrosulfuro de sodio (NaHS) y el propanolol, como controles positivos.

Los resultados muestran que los cuatro compuestos, inducen una relajación, dependiente de la concentración, en la aorta aislada de rata. En todos los casos el efecto máximo inducido por estas sustancias de prueba alcanzó el 100%. También los controles presentaron una eficacia del 100%, a excepción del NaHS y la ACh que presentaron un  $E_{max}$  aproximado de 90 y 67%, respectivamente. Al comparar la  $EC_{50}$  de los cuatro compuestos, el fenoterol, la midodrina y la sitagliptina presentaron una potencia significativamente menor que los controles. Sin embargo, la potencia de la isoxsuprina presentó diferencia significativa comparada con la de la ACh siendo 20 veces más potente y solo 10 veces menos potente que la del SNP. Este compuesto resultó ser el compuesto que produjo el efecto vasodilatador más potente ( $0.02602 \pm 0.0027 \mu\text{g/mL}$ ).

Las curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de estos compuestos se muestran en la Figura 20.



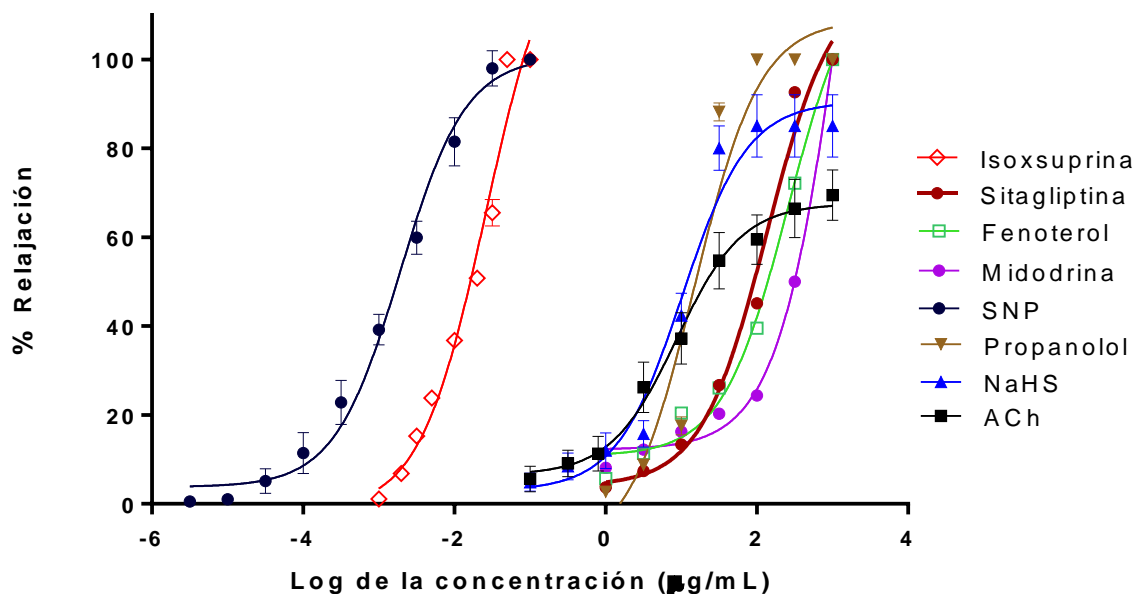


Figura 20. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos obtenidos a partir de la búsqueda computacional; fenoterol, midodrina, sitagliptina, isoxsuprina, y el SNP, ACh, NaHS y propanolol como controles positivos.

Cuadro 4. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador del fenoterol, midodrina, isoxsuprina, sitagliptina, SNP, ACh, NaHS y propanolol.

Compuesto	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{max}$ (%)
Isoxsuprina	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$
Sitagliptina	$135.5 \pm 2.5322$	$100 \pm 0.4838$
Fenoterol	$259 \pm 3.2729$	$100 \pm 0.2352$
Midodrina	$1557 \pm 4.4271$	$100 \pm 0.0843$
SNP	$0.001923 \pm 1.1545$	$100 \pm 2.675$
Propanolol	$14.98 \pm 0.6226$	$100 \pm 0.2512$
NaHS	$10.30 \pm 1.2820$	$90.56 \pm 3.618$
ACh	$8.674 \pm 1.3693$	$67.57 \pm 3.110$

5.2.2. Participación de la activación de la vía del NO/GMPc y H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub> en el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina, sitagliptina, fenoterol y midodrina.

La evaluación de la actividad vasodilatadora de los 4 compuestos seleccionados en la búsqueda computacional indicó que todos los compuestos relajan la aorta aislada de rata. Tomando en cuenta que estos compuestos se unieron con alta afinidad al sitio de unión alostérico en las enzimas eNOS y CSE en los estudios *in silico*, se determinó la participación de las vías del NO/GMPc y H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub> mediante el empleo de los inhibidores correspondientes (L-NAME y PPG, respectivamente) en el ensayo de aorta aislada de rata.

Las curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de cada uno de los compuestos en presencia de los inhibidores L-NAME y PPG se muestran de las Figuras 21 a 24.

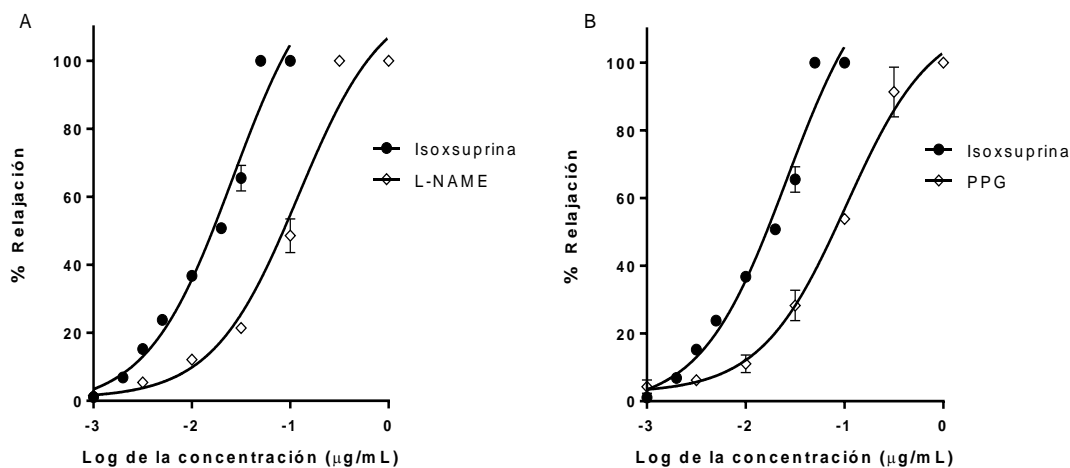


Figura 21. Curva concentración-respuesta inducida por isoxsuprina, en presencia de A) L-NAME y B) PPG.

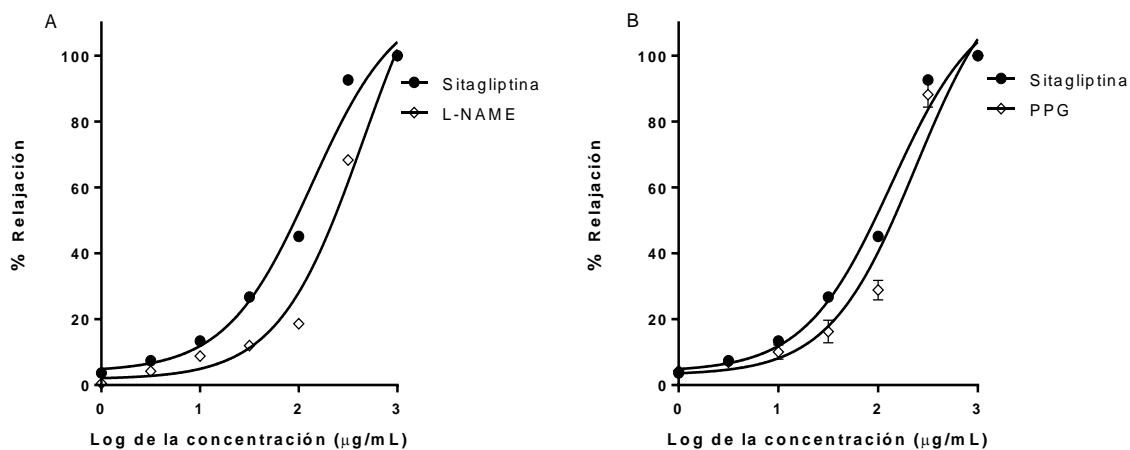


Figura 22. Curva concentración-respuesta inducida por sitagliptina, en presencia de A) L-NAME y B) PPG.

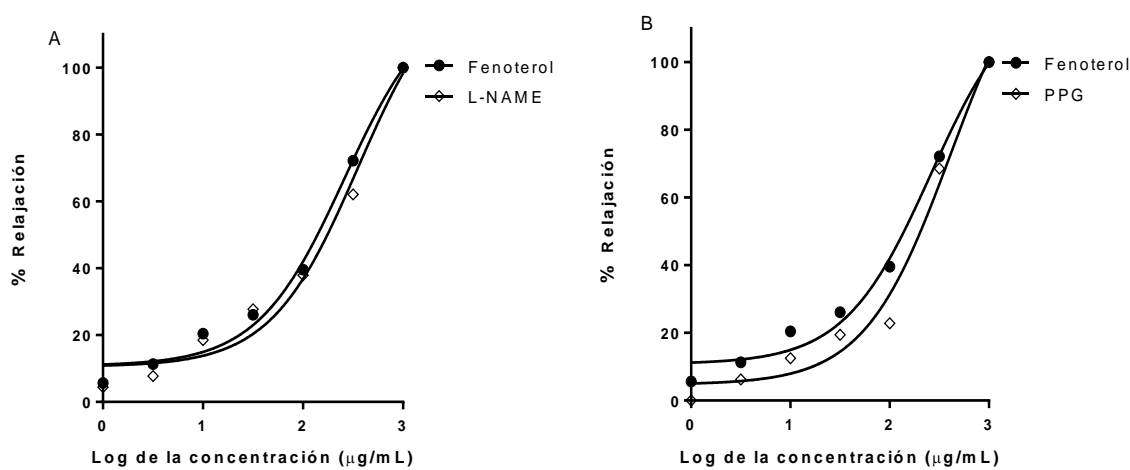


Figura 23. Curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador del fenoterol, en presencia de A) L-NAME y B) PPG.

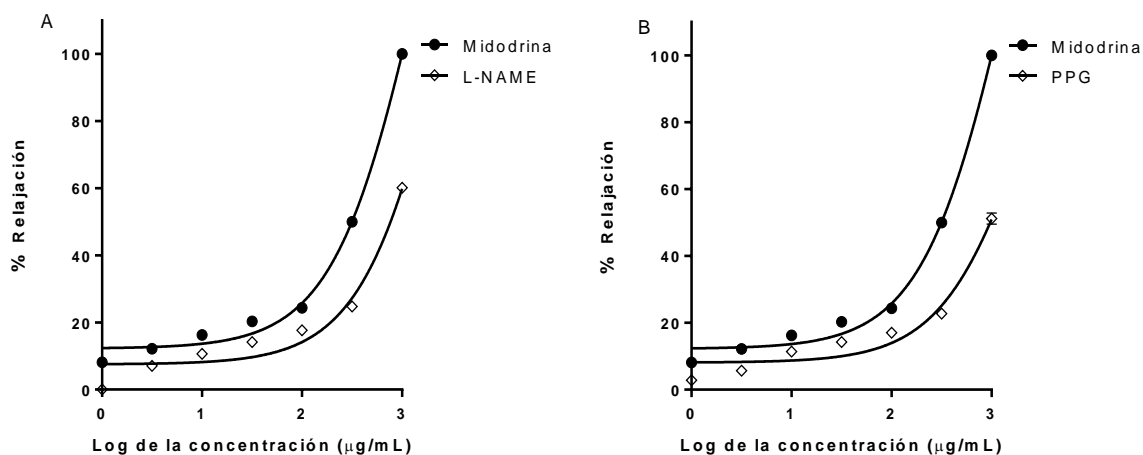


Figura 24. Curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador del midodrina, en presencia A) L-NAME y B) PPG.

La  $CE_{50}$  y el  $E_{max}$  obtenidos en presencia de L-NAME se muestran en el Cuadro 5 y en presencia de PPG en el Cuadro 6.

Cuadro 5. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador de la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina, en presencia de L-NAME.

Compuesto	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{max}$	L-NAME	
			$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{max}$
Isoxsuprina	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$	$0.1206 \pm 0.0156$	$100 \pm 1.8827$
Sitagliptina	$135.5 \pm 2.5322$	$100 \pm 0.4838$	$452.7 \pm 4.5567$	$100 \pm 0.7445$
Fenoterol	$259 \pm 3.2729$	$100 \pm 0.2352$	$351.7 \pm 3.9862$	$100 \pm 0.5643$
Midodrina	$1557 \pm 4.4271$	$100 \pm 0.0843$	$3222 \pm 0.0000$	$60.1146 \pm 0.4237$

Cuadro 6. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador de la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina, en presencia de PPG.

Compuesto	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{max}$	PPG	
			$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{max}$
Isoxsuprina	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$	$0.1045 \pm 0.0087$	$100 \pm 3.0015$
Sitagliptina	$135.5 \pm 2.5322$	$100 \pm 0.4838$	$238.7 \pm 3.7069$	$100 \pm 2.1173$
Fenoterol	$259 \pm 3.2729$	$100 \pm 0.2352$	$411.3 \pm 4.4630$	$100 \pm 0.8326$
Midodrina	$1557 \pm 4.4271$	$100 \pm 0.0843$	$2347 \pm 0.0000$	$51.207 \pm 4.9324$

La presencia de los inhibidores L-NAME y PPG desplazó a la derecha las curvas concentración-respuesta de todos los compuestos en estudio, presentándose un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la  $CE_{50}$ . Estos resultados sugieren la participación de las vías del NO/GMPc y  $H_2S/K_{ATP}$  en el efecto vasodilatador de estos compuestos; sin embargo, también se debe considerar la participación de otros mecanismos debido a que la presencia de los inhibidores empleados no abatió por completo la respuesta vasodilatadora de los compuestos de prueba.

### 5.2.3. Cuantificación del incremento en los niveles de NO y $H_2S$ producido por los compuestos seleccionados en la búsqueda computacional.

Con la finalidad de determinar si la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina producen su efecto vasodilatador mediante la activación de las enzimas eNOS y la CSE, se cuantificaron los niveles de NO y  $H_2S$ , mediante la determinación de nitritos y sulfuros, respectivamente. Los resultados indicaron que los compuestos evaluados incrementaron de manera significativa la concentración tanto de nitritos como de sulfuro de hidrógeno (Figura 25), sugiriendo que el efecto vasodilatador de los compuestos evaluados involucra la activación de ambas enzimas.

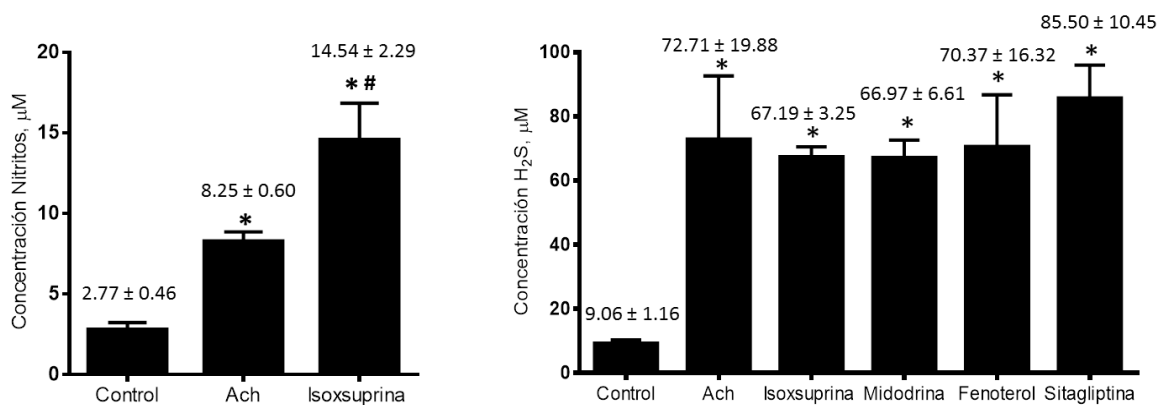


Figura 25. Concentraciones totales de nitritos y sulfuros inducidos por la estimulación de tejidos de aorta con isoxsuprina, midodrina, fenoterol y sitagliptina. Se realizó un análisis estadístico usando ANOVA de una vía, seguido por un test de Tukey (\* $p < 0.0001$  vs. Control; #  $p < 0.05$  vs. ACh).

#### 5.2.4. Evaluación del efecto vasodilatador de la isoxsuprina.

De los compuestos generados en la búsqueda computacional, la isoxsuprina fue el compuesto con mayor potencia ( $CE_{50} = 0.02602 \pm 0.0027 \mu\text{g/mL}$ ) y eficacia ( $E_{\text{max}} = 100\% \pm 2.7988 \%$ ). Estudios previos sugieren que el efecto vasodilatador de la isoxsuprina es producido por el bloqueo de receptores  $\beta$ -adrenérgico, actuando a nivel del músculo liso (Belloli y col., 2000; Terranova y col., 2014), sin embargo, no existen reportes que describan con detalle su mecanismo de acción, en particular, si participan transmisores gaseosos en su efecto vasodilatador. Por lo tanto, se realizaron los experimentos correspondientes para elucidar el mecanismo de acción de este compuesto. En primer término, se determinó la participación del endotelio en la relajación de la musculatura lisa arterial (Figura 26).

La  $CE_{50}$  y el  $E_{\text{max}}$  obtenidos en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio se muestran en el Cuadro 7.

La ausencia de endotelio desplaza hacia la derecha la curva concentración-respuesta de la isoxsuprina sugiriendo la participación de factores endoteliales en el mecanismo vasodilatador. En una curva concentración-respuesta, un desplazamiento hacia la derecha implica una disminución en la potencia de la sustancia de prueba debido principalmente al bloqueo de los receptores involucrados en la respuesta biológica, en este caso, el desplazamiento señalado en ausencia de endotelio sugiere un abatimiento en la respuesta debido probablemente a la ausencia y/o disminución en la liberación de algún factor endotelial como el NO y  $\text{H}_2\text{S}$ .

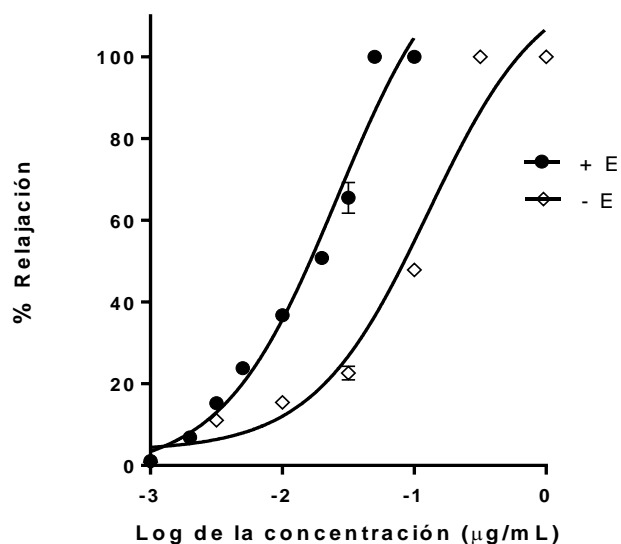


Figura 26. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia (E+), en ausencia (E-) de endotelio.

Cuadro 7. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio.

Compuesto	$CE_{50}$ (µg/mL)	$E_{max}$
Isoxsuprina con endotelio (E+)	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$
Isoxsuprina sin endotelio (E-)	$0.1269 \pm 0.0039$	$100 \pm 0.6293$

#### 5.2.4.1. Confirmación de la participación de la vía NO/GMPc.

Con el objeto de evaluar si el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina involucraba la activación de la vía NO/GMPc a nivel de músculo liso arterial, específicamente activando a la sGC, receptor principal del NO, se evaluó el efecto de la isoxsuprina en presencia de ODQ, un inhibidor de la sGC.

La  $CE_{50}$  y el  $E_{max}$  obtenidos en presencia de ODQ se muestran en el Cuadro 8. Puede observarse que la presencia del bloqueador modificó la actividad vasodilatadora de la isoxsuprina, presentando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 27).

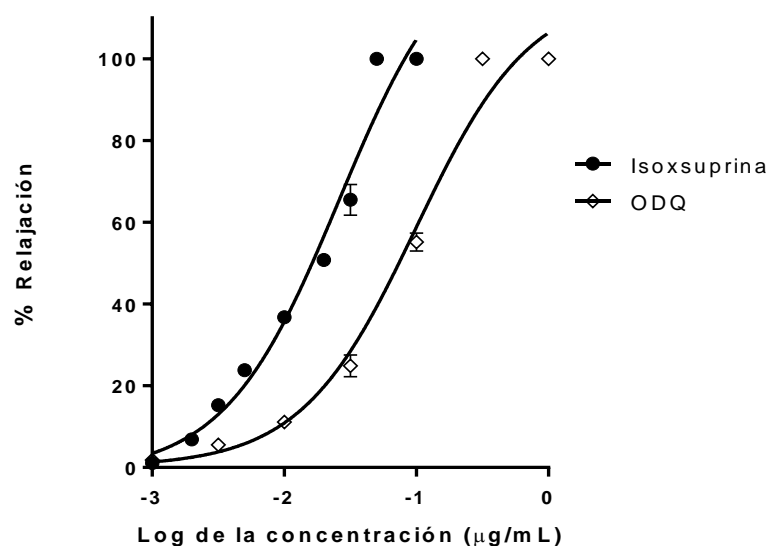


Figura 27. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de ODQ.

Cuadro 8. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia del inhibidor ODQ.

Compuesto	$CE_{50}$ (µg/mL)	$E_{max}$
Isoxsuprina	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$
ODQ	$1.152 \pm 0.0335$	$100 \pm 3.0104$

#### 5.2.4.2. Evaluación de la participación de la activación de los canales de potasio.

Para comprobar la participación de la activación de los canales de potasio en el mecanismo de vasodilatación inducido por la isoxsuprina se evaluó su efecto en presencia de glibenclamida, un bloqueador de canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) y de cloruro de tetraetilamonio, TEA, un bloqueador de canales de potasio voltaje dependientes ( $K_{Ca}$ ).

Los resultados obtenidos en la respuesta vasodilatadora de la isoxsuprina en presencia de glibenclamida y TEA muestran un desplazamiento significativo de las curvas concentración-respuesta ( $p < 0.05$ ) (Figura 28 y Cuadro 9), lo cual indicó que



ambos tipos de canales participan en el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina.

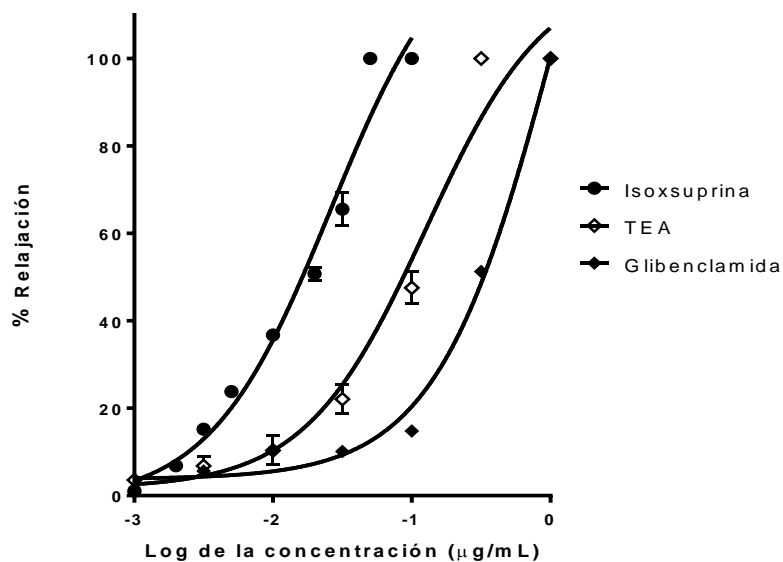


Figura 28. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de TEA y glibenclamida.

Cuadro 9. Valores de CE<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia de glibenclamida y TEA.

Compuesto	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	E <sub>max</sub>
Isoxsuprina	0.02602 ± 0.0027	100 ± 2.7988
TEA	0.1265 ± 0.0128	100 ± 1.9302
Glibenclamida	1.152 ± 0.0335	100 ± 3.0104

5.2.4.3. Determinación de la activación de la vía de la PGI<sub>2</sub>/AMPc sobre el efecto vasodilatador de la isoxsuprina.

La vía de la PGI<sub>2</sub>/AMPc es otra vía importante que regula la vasodilatación del músculo liso vascular. Para evaluar la participación se construyó la curva concentración-respuesta en presencia de indometacina, un inhibidor inespecífico de la COX (Figura 29). Los resultados de este experimento no muestran diferencia

significativa ( $p < 0.05$ ), lo que sugiere que la vía  $PGI_2/AMPc$  no participa en el efecto vasodilatador de la isoxsuprina. El Cuadro 10 muestra la  $CE_{50}$  y el  $E_{max}$  obtenidos en presencia de indometacina.

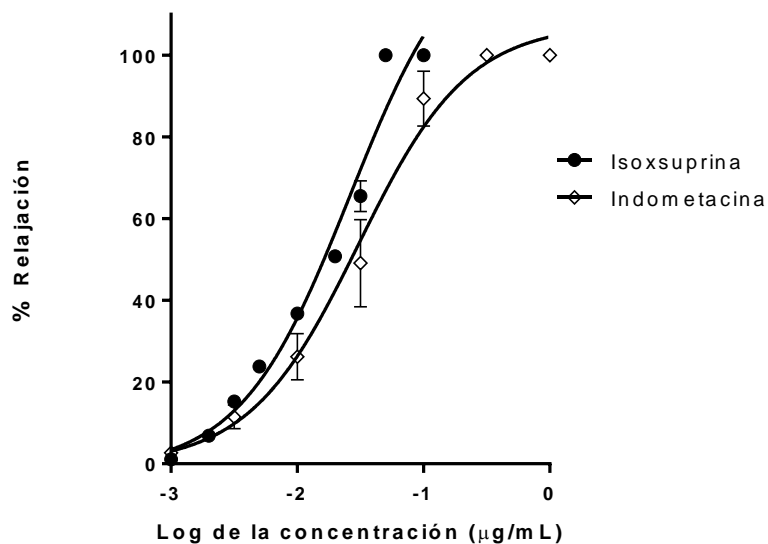


Figura 29. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de Indometacina.

Cuadro 10. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia de indometacina.

Compuesto	$CE_{50}$ (µg/mL)	$E_{max}$
Isoxsuprina	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$
Indometacina	$0.03055 \pm 0.0137$	$100 \pm 2.0536$

#### 5.2.4.4. Evaluación de la participación de la vía del CO/GMPc en el efecto vasodilatador de la isoxsuprina.

La vía del CO/GMPc participa en la regulación de la vasodilatación activando a la sGC por el CO producido por la enzima hemoxigenasa. Para determinar si esta vía participa en el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina, se inhibió la enzima hemoxigenasa con MESO-IX (Figura 30). La inhibición de esta enzima

redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) el efecto relajante de este compuesto, lo que sugiere que la vía del CO/GMPc participa en la generación del efecto vasodilatador de la isoxsuprina. Los valores de  $EC_{50}$  y  $E_{max}$  de estos experimentos se muestran en el Cuadro 11.

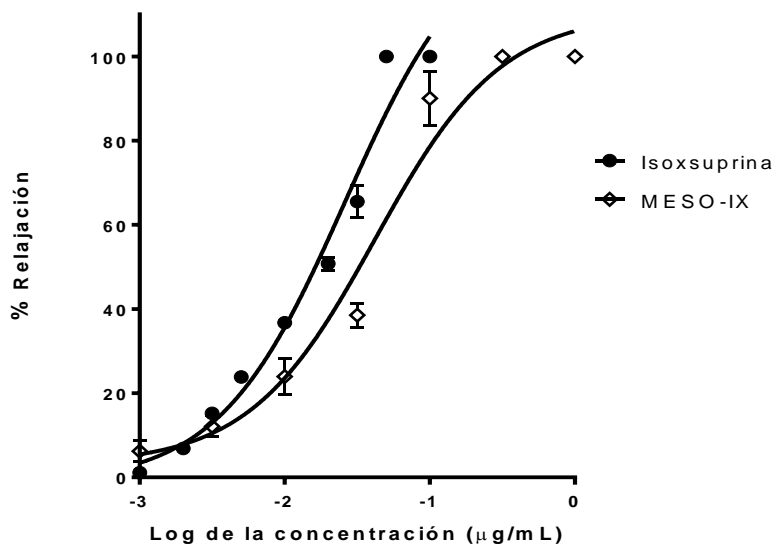


Figura 30. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por la isoxsuprina en presencia de MESO-IX.

Cuadro 11. Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{max}$  del efecto vasodilatador de la isoxsuprina en presencia de MESO-IX.

Compuesto	$CE_{50}$ (µg/mL)	$E_{max}$
Isoxsuprina	$0.02602 \pm 0.0027$	$100 \pm 2.7988$
MESO-IX	$0.04206 \pm 0.0075$	$100 \pm 0.7671$

5.2.4.5. Evaluación de la participación de la isoxsuprina como bloqueador de los canales de calcio.

Los compuestos que bloquean los canales de calcio dependientes de voltaje en el músculo liso vascular producen vasodilatación. Con la finalidad de evaluar si la

isoxsuprina produce su efecto vasodilatador, mediante el bloqueo de este tipo de canales, se construyó una curva concentración respuesta de calcio en presencia y en ausencia de isoxsuprina y su efecto fue comparado con el efecto del verapamilo, un bloqueador de los canales de calcio dependientes de voltaje (Figura 31 y Cuadro 12). Los resultados muestran que la isoxsuprina bloquea este tipo de canales de manera similar a como lo hace el verapamilo, ya que ambos compuestos desplazaron la curva concentración-respuesta hacia la derecha.

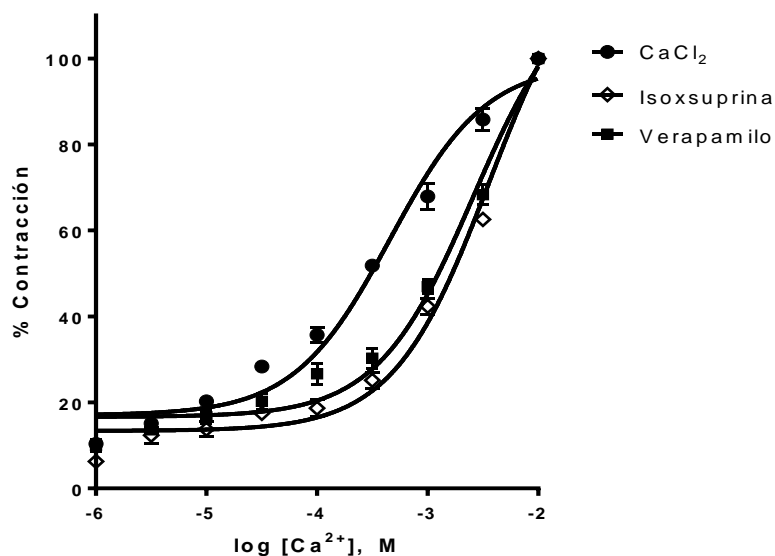


Figura 31. Curvas concentración-respuesta del % de contracción inducido por  $\text{CaCl}_2$  en presencia de isoxsuprina y verapamilo.

Cuadro 12. Valores de  $\text{CE}_{50}$  y  $\text{E}_{\text{max}}$  de las curvas de  $\text{CaCl}_2$  en presencia de la isoxsuprina y verapamilo como control positivo.

Compuesto	$\text{CE}_{50}$ (mol/L)	$\text{E}_{\text{max}}$
$\text{CaCl}_2$	$0.0004563 \pm 0.00003$	$98.90 \pm 1.4610$
Isoxsuprina	$0.003591 \pm 0.0002$	$100 \pm 1.4988$
Verapamilo	$0.002584 \pm 0.0003$	$100 \pm 3.2229$

## 6. DISCUSIÓN

Actualmente, existe un interés creciente en el desarrollo de fármacos alternativos que posean mecanismos de acción novedosos para el tratamiento de las enfermedades que más aquejan a la población, como son las enfermedades cardiovasculares. Una estrategia muy importante para llevar a cabo esta búsqueda son los métodos computacionales de acoplamiento molecular. En trabajos previos, se ha reportado que el efecto vasodilatador producido por triterpenos de origen natural, involucra la activación de la enzima eNOS. Al parecer estos compuestos se unen con alta afinidad al sitio C1 y C2 de la eNOS, dando como resultado la relajación del músculo liso vascular (Rios y col., 2012).

Recientemente, nuestro grupo de investigación caracterizó un sitio alostérico de unión del ácido ursólico y del uvaol, a la eNOS y la CSE (Luna-Vázquez., 2016; Rios y col., 2012). Sin embargo, a pesar del interés en el desarrollo de compuestos alternativos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, no se había realizado una búsqueda computacional de compuestos vasodilatadores que interaccionaran con la eNOS y la CSE mediante el acoplamiento molecular a estos sitios de unión.

Las técnicas computacionales en el diseño de fármacos son herramientas muy poderosas para la agilización de la búsqueda y optimización de nuevas sustancias con actividad biológica. En este trabajo se realizó una búsqueda masiva de compuestos de bases de datos para encontrar nuevos candidatos como agentes vasodilatadores. De todas las estructuras evaluadas en la búsqueda virtual se seleccionaron las que obtuvieran un mejor *score*, estas fueron comparadas con la base de datos de fármacos aprobados, de las cuales se encontraron 30 compuestos que presentaron la mayor afinidad a las enzimas eNOS y CSE, mediante el programa Glide 6.9 y AutoDock-Vina 1.0. Se seleccionaron 4 compuestos que presentaron el mejor percentil consenso, para posteriormente ser evaluados mediante ensayos farmacológicos.

Los resultados de los estudios *in silico* indicaron que el fenoterol, la midodrina, la isoxsuprina y la sitagliptina se unen con mayor afinidad a las enzimas eNOS y CSE.

En los diagramas generados se destaca, en el caso del fenoterol, el apilamiento aromático por las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre Arg474, Try 475 y Arg107 con el grupo resorcinol presente de la molécula, así como interacción catión- $\pi$  entre el grupo amino de la Arg183 y el sistema  $\pi$  del compuesto. En la midodrina dos interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo anisol de la molécula con la Phe468 y la Arg107. En el caso de la isoxsuprina se produce una interacción doble en sus dos anillos aromáticos; por una parte, se produce una interacción  $\pi$ - $\pi$  y catión- $\pi$  con la Arg365 con el grupo fenilo y, por otra parte, el anillo fenólico con la Arg372. En la sitagliptina se producen dos interacciones  $\pi$ - $\pi$ , una entre el grupo trifluorofenilo con el Trp74 de la cadena B y otra entre el anillo triazol con la His371 de la cadena A. Además, se presentan dos interacciones fuertes con el grupo amino, formando puentes salinos entre la Glu75 de la cadena B y Asp369 de la cadena A. Por lo anterior, es posible que estos compuestos fueran los más afines a las enzimas y sustentándonos en esta información se prosiguió a su evaluación biológica.

Desde el punto de vista farmacológico se ha reportado que el fenoterol es un agonista  $\beta$ -adrenérgico, que se emplea como broncodilatador y tocolítico (Jozwiak y col., 2009), la midodrina es un agonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, empleado para el tratamiento de la hipotensión ortostática (Tsuda y col., 2006; Kurihara y col., 2016), la sitagliptina es un inhibidor de la dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4) que se utiliza como hipoglucemiante para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Karasik y col., 2008) y la isoxsuprina es un agonista  $\beta$ -adrenérgico, utilizado como agente tocolítico y vasodilatador (Belloli y col., 2000; Terranova y col., 2014). Debido a que los estudios *in silico* indicaron que estos compuestos se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE, sugiriendo su activación y, por lo tanto, produciendo un efecto vasodilatador, se determinó si estos compuestos eran capaces de relajar el musculo liso vascular, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata. Los cuatro compuestos evaluados presentaron efecto vasodilatador, dependiente de la concentración. El siguiente paso fue confirmar si el efecto vasodilatador producido por los compuestos seleccionados involucraba la participación de las vías del NO/GMPc y del H<sub>2</sub>S/KATP, como lo sugerían nuestros estudios de acoplamiento molecular.

Como la habían sugerido los estudios *in silico*, el efecto vasodilatador de los cuatro compuestos dependió de la activación de las vías del NO/GMPc y del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>, ya que la inhibición de las enzimas eNOS y CSE redujo significativamente dicho efecto. Los ensayos de actividad enzimática, confirmaron la participación de estas vías bioquímicas, sugiriendo una posible activación directa de las enzimas eNOS y CSE, debido a que los compuestos aumentaron de manera significativa las concentraciones de NO y H<sub>2</sub>S. Estos resultados indicaron que los estudios *in silico* corresponden con los estudios de mecanismo de acción realizados utilizando el ensayo de aorta aislada de rata. Es importante señalar, que la cuantificación de nitritos sólo se realizó con la isoxsuprina por falta de tiempo para realizar los experimentos; sin embargo, se llevarán a cabo para completar este estudio posteriormente.

Aunque los cuatro compuestos relajaron la aorta de rata, el orden de afinidad no coincidió con la potencia y el E<sub>max</sub> de cada uno de los fármacos. La isoxsuprina fue el fármaco que presentó el mayor efecto vasodilatador con una potencia 20 veces mayor a la ACh y solo 10 veces menos potente que un liberador de NO, el SNP. En estudios previos, se reportó que la isoxsuprina actúa como agonista de los receptores β-adrenérgicos (Belloli y col., 2000; Terranova y col., 2014); sin embargo, su mecanismo de acción no se ha elucidado completamente, ya que su efecto vasodilatador podría involucrar la participación de otros mecanismos. Es posible que la isoxsuprina produzca su efecto vasodilatador no solo activando receptores β-adrenérgicos, como se pensaba anteriormente, sino también activando las vías del NO/GMPc y del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>, como lo sugieren nuestros resultados de acoplamiento molecular y los ensayos farmacológicos utilizando tejidos aislados.

Es importante profundizar en el mecanismo de acción de este compuesto y evaluar la participación de las vías de señalización de gasotransmisores, ya que recientemente se ha determinado que moléculas que bloquean a los receptores β-adrenérgicos, también son capaces de activar la vía del NO/GMPc, lo cual hace más eficaces estos fármacos con relación a otros que no incrementan los niveles

de NO. Un ejemplo de este tipo de fármacos es el nebivolol, un antagonista selectivo de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, que además de bloquear estos receptores en el corazón, también produce un efecto vasodilatador, mediante la generación de NO. Este efecto adicional incrementó su efectividad para revertir la disfunción endotelial y proporcionó un efecto protector en diversas enfermedades cardiovasculares (Moens y col., 2010; Wang y Dong, 2016). Por esta razón, el siguiente paso fue realizar un estudio más detallado del mecanismo de acción de la isoxsuprina.

Para iniciar con la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de la isoxsuprina, se realizaron experimentos en ausencia y en presencia de endotelio, con el fin de determinar si este compuesto activaba receptores localizados en el endotelio o en el músculo liso. El endotelio representa el primer punto de referencia, cuando se habla de enfermedades cardiovasculares, ya que es un órgano vital y paracrino. El endotelio sintetiza y libera factores vasodilatadores como la  $PGI_2$  y los transmisores gaseosos: el NO, el  $H_2S$  y el CO (Coletta y col., 2012; Bełtowski y Jamroz-Wiśniewska, 2014). La relajación del músculo liso vascular es desencadenada por una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos que interactúan con receptores endoteliales o localizados en el músculo liso vascular, generando así segundos mensajeros que reducen el tono vascular (Zsabo, 2010; Coletta y col., 2012). En este trabajo, se determinó que la eliminación del endotelio no abatió por completo el efecto vasodilatador, sólo desplazó la curva concentración-respuesta hacia la derecha, lo que sugirió que otros mecanismos estaban involucrados en el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina. Por lo tanto, nuestros resultados indicaron que este compuesto produce su efecto vasodilatador, mediante mecanismos dependientes e independientes de endotelio.

El NO, generado en endotelio, se difunde al músculo liso subyacente y activa a la sGC, o bien actúa sobre canales de potasio activados por ATP o dependientes de calcio, localizados en el músculo liso, relajando el vaso sanguíneo (Coletta y col., 2012). Nuestros resultados en los que se inhibieron el receptor del NO, la sGC con ODQ y los canales de potasio con glibenclamida y TEA indicaron que el efecto



vasodilatador producido por la isoxsuprina involucra también la activación de los canales activados por ATP y dependientes de calcio y confirmaron la participación de la vía del NO/GMPc.

El CO es otro gasotransmisor importante en la generación del efecto vasodilatador, mediante la vía CO/GMPc (Zsabo, 2010). Los resultados generados en los experimentos realizados en este trabajo sugieren que también hay una participación de la vía CO/GMPc, ya que la inhibición de la enzima que produce el CO, la hemooxigenasa con Meso IX produjo un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador de la isoxsuprina.

Los prostanoideos son una familia de mediadores lipídicos bioactivos. La PGI<sub>2</sub> es otro factor vasodilatador derivado de endotelio, el cual, por estimulación de su receptor en la célula muscular lisa, activa a la AC que genera un incremento en la concentración intracelular de AMPc, provocando la activación de PKA, produciendo la relajación del músculo liso (vía PGI<sub>2</sub>/AMPc) (Kang, 2014). Los resultados obtenidos en esta tesis, mediante la inhibición de COX con indometacina, no mostraron una disminución en el efecto vasodilatador de la isoxsuprina, lo cual indicó que la vía de la PGI<sub>2</sub>/AMPc no participa en el efecto vasodilatador producido por este compuesto.

Algunos fármacos tienen la capacidad de bloquear los canales de calcio tipo L, localizados en las células del músculo liso, reduciendo la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>, lo cual disminuye la contracción y aumenta la relajación de las células del músculo liso vascular (Stojic y col., 2016). Nuestros resultados sugieren que la isoxsuprina también bloquea los canales de calcio, ya que desplazó la curva concentración-respuesta de CaCl<sub>2</sub> hacia la derecha, de manera similar al efecto producido por el verapamilo, utilizado como control positivo.

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que la determinación de la participación de las vías NO/GMPc y del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub> en el efecto vasodilatador producido por la isoxsuprina, la sitagliptina, el fenoterol y la midodrina, confirma que los compuestos obtenidos en la búsqueda computacional

interactúan con las enzimas eNOS y CSE, posiblemente activándolas y, por lo tanto, produciendo un efecto vasodilatador. Adicionalmente, se determinó que el efecto vasodilatador de la isoxsuprina, además de activar receptores  $\beta$ -adrenérgicos, también involucra la liberación de los tres gasotransmisores; NO, H<sub>2</sub>S y CO, la activación de los canales de potasio activados por ATP y dependientes de calcio y el bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L.

## 7. CONCLUSIONES

- La búsqueda computacional condujo a la selección de cuatro compuestos que se unen con alta afinidad a las enzimas eNOS y CSE: el fenoterol, la midrodina, la isoxsuprina y la sitagliptina.
- Los cuatro compuestos seleccionados inducen una relajación, dependiente de la concentración, de la aorta aislada de rata. El compuesto con la mayor potencia vasodilatadora fue la isoxsuprina.
- Las moléculas que presentaron mayor efecto vasodilatador no coincidieron con las moléculas que se unieron con mayor afinidad a las enzimas eNOS y CSE.
- Los cuatro compuestos seleccionados producen un efecto vasodilatador, mediante un mecanismo que involucra la activación de las vías NO/GMPc y del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>, posiblemente a través de una activación directa de las enzimas eNOS y CSE.
- El efecto relajante de la musculatura lisa arterial inducido por la isoxsuprina involucra mecanismos dependientes e independientes de endotelio.
- El efecto vasodilatador de la isoxsuprina, además de activar receptores β-adrenérgicos y las vías del NO/GMPc y del H<sub>2</sub>S/K<sub>ATP</sub>, involucra también la activación de la vía del CO/GMPc, de canales de potasio dependientes de calcio y activados por ATP y el bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, pero no involucra la participación de la vía de la PGI<sub>2</sub>/AMPc.

## 8. REFERENCIAS

**Abbasi** F, Brown BW, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *JACC* **2002**;40:937-943.

**Andrews** KL, Irvine JC, Tare M, Apostolopoulos J, Favaloro JL, Triggle CR, Kemp-Harper BK. A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries. *BJP* **2009**;157:540-550.

**Avendaño** LH, Aljama P, Arias M, Caramelo C, Egido J, Lamas S. Nefrología clínica. 3a. edición. Madrid: Editorial Panamericana, **2008**:202.

**Bajorath** J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2002**;1:882-894.

**Belloli** C, Carcano R, Arioli F, Beretta C. Affinity of isoxsuprine for adrenoreceptors in equine digital artery and implications for vasodilatory action. *Equine Vet J*, **2000**;32:119-124.

**Bełtowski** J, Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules* **2014**;19:21184-21199.

**Bryan** NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* **2007**;43:645-657.

**Bucci** M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Cirino G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *ATVB* **2010**;10:1998-2004.

**Buzko** OV, Bishop AC, Shokat KM. Modified AutoDock for accurate docking of protein kinase inhibitors. *J Comput Aid Mol Des* **2002**;16:113-127.

**Campbell** NR, Lackland DT, Niebylski ML. 2014 dietary salt fact sheet of the world hypertension league, international society of hypertension, pan American health organization technical advisory group on cardiovascular disease prevention through

dietary salt reduction, the world health organization collaborating centre on population salt reduction, and world action on salt & health. *J Clin Hypertens* **2015**;17:7-9.

**Cavasotto** CN, Abagyan RA. Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. *J Mol Biol* **2004**;337:209-225.

**Coletta** C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *PNAS* **2012**;109:9161-9166.

**Contractor** A, Sarkar BK, Arora M, Saluja K. Addressing cardiovascular disease burden in low and middle income countries (LMICs). *Curr Cardiovasc Risk Rep* **2014**;8:1-9.

**Cooke** JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* **2002**;105:2133-2135.

**Dhungana** RR, Pandey AR, Bista B, Joshi S, Devkota S. Prevalence and Associated Factors of Hypertension: A Community-Based Cross-Sectional Study in Municipalities of Kathmandu, Nepal. *Int J Hypertens* **2016**;2016:1-11.

**Durand** MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* **2013**;20:239-247.

**Feelish** MP, Kotsonis J, Siebe B, Clement, Schmidt HH. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H- [1, 2, 4]oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol* **1999**;56:243-253.

**Fischmann** TO, Hruza A, Da Niu X, Fossetta JD, Lunn CA, Dolphin E, Weber PC. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Mol Biol* **1999**;6:233-242.

**Fleming** I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2003**;284:R1-R12.

**Flórez** J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología humana*. 5ª. edición. Elsevier Masson. España, **2008**:391-393.

**Förstermann** U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* **2012**;33:829-837.

**Fox** S. *Fisiología humana*. 12 ed. MacGrawHill. México, **2011**:427- 428.

**Friesner** RA., Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Shaw DE. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* **2004**;7:1739-1749.

**Friesner** RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Mainz DT. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* **2006**;47:6177-6196.

**Gamboa** R. *Fisiología de la Hipertensión Arterial esencial*. *Acta med peruana* **2006**;23:76-82.

**Galle** J, Zabel U, Hübner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, Schmidt HH. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *BJP* **1999**;127:195-203.

**Gaziano** TA, Bitton A, Anand S, Weinstein MC. The global cost of nonoptimal blood pressure. *J Hypertens* **2009**;27:1472-1477.

**Grisham** MB, Johnson GG, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods in enzymology*, **1996**:237-246.

**Heiss** E, Dirsch V. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Current pharmaceutical design*, **2014**;22:3503-3513.

**Houston** DR, Walkinshaw MD. Consensus docking: improving the reliability of docking in a virtual screening context. *J Chem Inf Model* **2013**;53:384-390.

**Ibarra-Alvarado** C, García JA, Aguilar MB, Rojas A, Falcón A, de la Coteria EPH. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *CBP* **2007**;146:511-518.

**Ibarra-Alvarado** C, López-Vallejo F, Solís-Gutiérrez M, Luna-Vázquez FJ, Rojas-Molina A. P76: Vasorelaxation induced by naturally occurring triterpenes involves NO and H<sub>2</sub>S releasing: Ex vivo and in silico studies. *Nitric Oxide* **2014**;39:S38-S39.

**Jenkins** JL, Kao RY, Shapiro R. Virtual screening to enrich hit lists from high-throughput screening: A case study on small-molecule inhibitors of angiogenin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2003**;50:81-93.

**Jiang** B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H<sub>2</sub>S-induced activation of KATP channels. *Antioxidants & redox signaling*, **2010**;12:1167-1178.

**Jozwiak** K, Woo AYH, Tanga MJ, Toll L, Jimenez L, Kozocas JA, Wainer IW. Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives: a platform towards highly selective and effective  $\beta$  2-adrenergic receptor agonists. *Bioorg Med Chem*, **2010**;18:728-736.

**Kang** KT. Endothelium-derived relaxing factors of small resistance arteries in hypertension. *Toxicol Res* **2014**;30:141-148.

**Karasik** A, Aschner P, Katzeff H, Davies MJ, Stein P P. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials. *Curr Med Res Opin*, **2008**;24:489-496.

**Kida** M, Sugiyama T, Yoshimoto T, Ogawa Y. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *EUFEPS* **2013**;48:211-215.

**Kikuchi** G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *BBRC* **2005**;338:558-567.

**Kim SK, Goddard III WA.** Molecular-Docking-Based Drug Design and Discovery: Rational Drug Design for the Subtype Selective GPCR Ligands. In Applied Case Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design. IGI Global **2016**:158-185.

**Kimura H.** Hydrogen sulfide: its production, release and functions. Amino acids **2011**;41:113-121.

**Kimura H.** Metabolic turnover of hydrogen sulfide. Gasotransmitters: novel regulators of ion channels and transporters. Front Physiol **2012**;284:64.

**Kimura H.** Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. NCI **2013**;63:492-497.

**Kroemer RT.** Structure-based drug design: docking and scoring. Current Protein and Peptide Science, **2007**;8:312-328.

**Kuck D, Singh N, Lyko F, Medina-Franco JL.** Novel and selective DNA methyltransferase inhibitors: docking-based virtual screening and experimental evaluation. Bioorg Med Chem Lett **2010**;18:822-829.

**Kurihara R, Imazumi K, Takamatsu, H, Ishizu, K, Yoshino, T, Masuda N.** Effect of Selective Prostaglandin E2 EP2 Receptor Agonist CP-533,536 on Voiding Efficiency in Rats with Midodrine-Induced Functional Urethral Obstruction. LUTS, **2016**;8:130-135.

**Lang PT, Brozell SR, Mukherjee S, Pettersen EF, Meng EC, Thomas V, Kuntz ID.** DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes. RNA **2009**;15:1219-1230.

**Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Aryee M.** A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet **2013**;380:2224-2260.



**Liu Z**, Xu Q, Tang Y, Shi R. Research progress in the regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and cardiovascular diseases. *Med Sci* **2016**;41: 632.

**Luna-Vázquez FJ**, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Romo-Mancillas A, López-Vallejo FH, Solís-Gutiérrez M, Rivero-Cruz F. Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Vasodilator Effect of Ursolic Acid and Uvaol from Black Cherry *Prunus serotina* Fruits. *Molecules* **2016**;21:78.

**McInnes C**. Virtual screening strategies in drug discovery. *Current Opin Chem biol* **2007**;11:494-502.

**Moens AL**, Yang R, Watts VL, Barouch LA. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *JMCC* **2010**;48:1088-1095.

**Montezano AC**, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *CJC* **2015**;31:631-641.

**Morris GM**, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **2009**;30:2785-2791.

**Mozaffarian D**, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Howard VJ. Heart Disease and Stroke statistics. *AHA Statistical Update* **2015**:1-324.

**Olas B**. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta* **2015**;439:212-218.

**Orie NN**, Fry CH, Clapp LH. Evidence that inward rectifier K<sup>+</sup> channels mediate relaxation by the PGI<sub>2</sub> receptor agonist cicaprost via a cyclic AMP-independent mechanism. *Cardiovasc Res* **2006**;69:107-115.

**Papapetropoulos A**, Foresti R, Ferdinandy P. Pharmacology of the 'gasotransmitters' NO, CO and H<sub>2</sub>S: translational opportunities. *BJP* **2015**;172: 1395-1396.

**Qian J, Fulton D.** Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol* **2013**;4:1-11.

**Rios MY, López-Martínez S, López-Vallejo F, Medina-Franco JL, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S.** Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: Ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia* **2012**;83:1023-1029.

**Ripphausen P, Nisius B, Peltason L, Bajorath J.** Quo vadis, virtual screening? A comprehensive survey of prospective applications. *J Med Chem* **2010**;53:8461-8467.

**Ryter SW, Otterbein LE.** Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* **2004**;26:270-280.

**Santhanam AVR, d'Uscio LV, Smith, LA, Katusic ZS.** Uncoupling of eNOS causes superoxide anion production and impairs NO signaling in the cerebral microvessels of hph-1 mice. *JNC* **2012**;6:1211-1218.

**Shoichet BK.** Virtual screening of chemical libraries. *Nature* **2004**;432:862-865.

**Shouk R, Abdoub A, Shetty K, Sarkar D, Eid, AH.** Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives. *Nutr. Res* **2014**;34:106-108.

**Stojic I, Srejavic I, Zivkovic, V, Jeremic, N, Djuric, M, Stevanovic A, Jakovljevic, V.** The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *J Physiol Biochem* **2016**;1;1-13.

**Stubbert D, Prysyazhna O, Rudyk O, Scotcher J, Burgoyne JR, Eaton P.** Protein kinase G  $\alpha$  oxidation paradoxically underlies blood pressure lowering by the reductant hydrogen sulfide. *Hypertens* **2014**;64:1344-1351.

**Subramaniam S, Mehrotra M, Gupta D.** Virtual high throughput screening (vHTS)-a perspective. *Bioinformation* **2008**;3:14-17.

**Sun** J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* **2003**;3:276-284.

**Sun** Q, Collins R, Huang S, Holmberg-Schiavone L, Anand GS, Tan CH, Sivaraman J. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine  $\gamma$ -lyase, an enzyme responsible for the production of H<sub>2</sub>S. *JBC* **2009**;284:3076-3085.

**Szabo**, C. Gaseotransmitters: new frontiers for translational science. *Sci Transl Med* **2010**;2:59ps54-59ps54.

**Tang** EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension?. *Pflügers Archiv-Eur J of Physiol* **2010**;459:995-1004.

**Terranova** C, Petrella C, Improta G, Severini C, Signore F, Damiani P, Angioli R. Relaxant effect of proton pump inhibitors on in vitro myometrium from pregnant women. *Eur J Pharm Sci* **2014**:52;125-131.

**Tortora** J, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 11 ed. Panamericana, **2009**:740-743.

**Trott** O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J comput Chem* **2010**:31;455-451.

**Tsuda** M, Terada T, Irie M, Katsura, T, Niida, A, Tomita, K, Inui KI. Transport characteristics of a novel peptide transporter 1 substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *JPET* **2016**:318; 455-460.

**Walsh** DA, Mapp PI, Kelly S. Calcitonin gene-related peptide in the joint: contributions to pain and inflammation. *BJCP* **2015**;8:965-978.

**Wang** Y, Dong X. Nebivolol ameliorates asymmetric dimethylarginine-induced vascular response in rat aorta via  $\beta$ 3 adrenoceptor-mediated mechanism. *Clin Exp Hypertens* **2016**:38; 252-259.

**WHO.** World Health Organization. A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. World [serie en internet] **2016** [consultado 2016 julio]:[aprox. 2 pp]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.

**Yu** XH, Cui, LB, Wu K, Zheng XL, Cayabyab FS, Chen ZW, Tang CK. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Anal Chim Acta* **2014**;437: 78-87.

**Zhao** W, Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2002**;283:H474-H480.