

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

**“PARTICIPACIÓN DE TRANSMISORES GASEOSOS Y
RECEPTORES A CANNABINOIDES EN EL EFECTO
VASODILATADOR PRODUCIDO POR β -CARIOFILENO”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFB MARIANA GARCÍA CAMARGO

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

QUERÉTARO
NOVIEMBRE 2018
MÉXICO



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

“PARTICIPACIÓN DE TRANSMISORES GASEOSOS Y RECEPTORES A
CANNABINOIDES EN EL EFECTO VASODILATADOR PRODUCIDO POR
 β -CARIOFILENO”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFB MARIANA GARCÍA CAMARGO

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

Dr. César Ibarra Alvarado

Presidente

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Secretario

Dra. Juana Isela Rojas Molina


Vocal

Dra. Alejandra Rojas Molina

Suplente

Dr. Francisco J. Luna Vázquez


Suplente

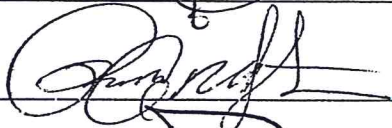



Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química



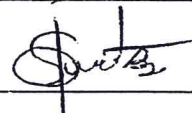
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado







Alejandra Rojas M.



AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca a la QFB Mariana García Camargo (CVU: 781498) para poder llevar a cabo sus estudios de posgrado, así como la realización de este proyecto.

Al Dr. César Ibarra Alvarado por su asesoramiento, guía y enseñanza durante estos dos años como su estudiante de maestría.

Al Dr. Antonio Romo, por escucharme y por sus consejos, por su enseñanza y siempre mostrarme el lado positivo de las situaciones.

A mis compañeros del laboratorio de Investigación farmacológica de productos naturales por hacer más amena mi estancia, por los buenos momentos y alegrías que compartimos.

A mis amigas, en especial a Aranza y Raquel, porque juntas logramos alcanzar un objetivo más en nuestra vida.

A mi familia por siempre creer en mí y en mis capacidades y habilidades.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) constituyen una de las principales causas de muerte en nuestro país y en el mundo. Es importante encontrar fármacos alternativos para el tratamiento de estas enfermedades, ya que los que se utilizan actualmente son ineficaces, su costo es elevado y producen efectos adversos graves. Recientemente, se han reportado evidencias científicas que indican que el sistema cannabinoide juega un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular, ya que la activación de receptores a cannabinoides relaja el músculo liso arterial. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen los mecanismos intracelulares involucrados en el efecto vasodilatador producido por la activación del sistema cannabinoide. Existe varios compuestos, obtenidos de plantas, que poseen actividad cannabinoimimética. Entre estos compuestos destaca el β -cariofileno, un agonista del receptor CB2 que ejerce un efecto analgésico y antiinflamatorio, sin embargo, hasta ahora se desconoce si, de manera adicional, es capaz de relajar los vasos sanguíneos. Por esta razón, en el presente estudio se planteó evaluar el efecto vasodilatador del β -cariofileno, así como determinar la participación de los receptores a cannabinoides (CB1, CB2 y eCB) y de las vías del NO/GMP_C y del H₂S/K_{ATP} en este efecto. Para cumplir estos objetivos, se evaluó el efecto vasodilatador del β -cariofileno, mediante el ensayo de aorta aislada de rata. De manera adicional, utilizando este mismo ensayo e inhibidores específicos, se determinó la participación de los receptores a cannabinoides (CB1, CB2 y eCB) y las vías del NO/GMP_C y del H₂S/K_{ATP} en el efecto vasodilatador producido por este cannabinoimimético. Finalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular del β -cariofileno con los receptores a cannabinoides y las enzimas productoras de los transmisores gaseosos: eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) y CSE (cistationina- α -liasa, productora de H₂S), con el fin de determinar si el β -cariofileno produce su efecto vasodilatador, activando de manera directa a estos blancos moleculares. Los resultados de estos experimentos indicaron que el β -cariofileno relaja la aorta ($CE_{50} = 75.3 \pm 15.1$ μ g/ml; $E_{max} = 46.6 \pm 2.2\%$), de una manera dependiente de la concentración, mediante la activación de los receptores a cannabinoides CB2 y eCB y de las vías del NO/GMP_C y H₂S/K_{ATP}. Por otra parte, los estudios de acoplamiento molecular sugieren que el β -cariofileno interactúa de manera directa con los receptores CB2 y eCB, así como con la enzima CSE para producir su efecto vasodilatador. En esta tesis se determinó que el β -cariofileno relaja la aorta de rata, activando receptores a cannabinoides y las vías del NO/GMP_C y H₂S/K_{ATP}. Este compuesto vasodilatador constituye un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de ECVs.

SUMMARY

Cardiovascular diseases (CVDs) constitute one of the main causes of death in our country and in the world. It is important to find alternative drugs to treat these diseases, since those that are currently used are inefficient, their cost is high and produce serious side effects. Recently, it has been reported scientific evidences, which indicate that the cannabinoid system plays an important role in the regulation of cardiovascular system, since the activation of cannabinoid receptors relaxes the arterial smooth muscle. However, so far the intracellular mechanisms involved in the vasodilator effect elicited by cannabinoid system activation is unknown. There are several compounds, obtained from plants, which possess cannabinomimetic activity. Among these compounds highlights β -caryophyllene, an agonist of the CB2 receptor that produces analgesic and antiinflammatory effects. However, until now it is not known whether this compound is additionally able to relax the blood vessels. For this reason, in the present study it was proposed to evaluate the vasodilator effect of β -caryophyllene, as well as to determine the participation of the cannabinoid receptors (CB1, CB2 and eCB) and the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways in this effect. In order to fulfil these objectives, the vasodilator effect of β -caryophyllene was evaluated by using the rat aortic ring assay. Moreover, through this assay and specific inhibitors, the participation of cannabinoid receptors (CB1, CB2 and eCB) and the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways in the vasodilator effect elicited by this cannabinomimetic agent was determined. Finally, a molecular docking study of β -caryophyllene with cannabinoid receptors and the enzymes, which produce gasotransmitters: eNOS (endothelial nitric oxide synthase) and CSE (cystathionine-gamma-lyase, that produces H₂S), in order to determine whether β -caryophyllene induces its vasodilator effect by a direct activation of these molecular targets. The findings of these experiments indicated that β -caryophyllene relaxes the rat aorta ($EC_{50} = 75.3 \pm 15.1 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 46.6 \pm 2.2\%$), in a concentration-dependent manner, by means of the activation of the cannabinoid receptors: CB2 and eCB and the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways. On the other hand, the molecular docking study suggested that β -caryophyllene directly interacts with the cannabinoid receptors: CB2 and eCB, as well as with the enzyme CSE to produce its vasodilator effect. In the present thesis, it was determined that β -caryophyllene relaxes rat aorta, activating cannabinoid receptors and the NO/cGMP and H₂S/K_{ATP} pathways. This cannabinomimetic vasodilator constitutes a novel structural prototype to develop alternative drugs to treat CVDs.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Importancia de las enfermedades cardiovasculares.....	4
2.1.1. Alternativas terapéuticas: el sistema endocannabinoide	5
2.2. Sistema endocannabinoide	6
2.2.1. Receptores CB1 y CB2	7
2.2.2. Endocannabinoides	9
2.2.3. Captación y degradación de los endocannabinoides	11
2.2.4. Investigación farmacológica y búsqueda de fármacos que modulan el sistema endocannabinoide	13
2.3. Mecanismos de vasodilatación.....	15
2.3.3. Papel del sistema endocannabinoide en el sistema cardiovascular	19
2.4. Técnicas para medir vasodilatación	20
2.5. Química computacional y modelado molecular	22
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	28
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos específicos.....	28

6. METODOLOGÍA	29
6.1. Animales en experimentación.....	29
6.2. Evaluación del efecto vasodilatador: ensayo de aorta aislada de rata. ...	29
6.3. Determinación de la participación de los receptores a cannabinoides CB1, CB2, eCB y de las enzimas eNOS y CSE en el efecto vasodilatador del β -cariofileno.	30
6.4. Estudio de acoplamiento molecular para la elaboración de modelos de interacciones moleculares del β -cariofileno con los receptores CB2, eCB y las enzimas eNOS y CSE.....	30
7. RESULTADOS	33
7.1. Efecto vasodilatador de β -cariofileno en aorta aislada de rata	33
7.2. Participación de receptores a cannabinoides en el efecto vasodilatador de β -cariofileno	34
7.3. Participación de las vías de señalización del NO/cGMP y del H ₂ S/K _{ATP} en el efecto vasodilatador del β -cariofileno.....	34
7.4. Elaboración de modelos de interacción molecular de β -cariofileno con los receptores a cannabinoides CB1, CB2, eCB y las enzimas eNOS y CSE.....	36
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIÓN	45
10. REFERENCIAS	46
11. APÉNDICE	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema endocannabinoide. Este sistema incluye a los receptores CB1 y CB2, sus ligandos endógenos y las enzimas que metabolizan o degradan estos ligandos. CBR, receptor a cannabinoides; NAPE-PLD, N-araquidonilfosfoetanolamina fosfolipasa D; NAT, N-araquidonil transferasa; DAGL, diacilglicerol lipasa; EMT, transportador de membrana de etanolamidas; FAAH, hidrolasa de ácidos grasos amida; EtNH ₂ , etanolamida; AA, ácido araquidónico; 2-AG, 2-araquidonilglicerol; AEA, anandamida (Fonseca y col., 2013).	6
Figura 2. Estructura tridimensional del receptor CB1 en complejo con el antagonista AM6538 (Hua y col., 2016).	7
Figura 3. Estructuras químicas de los endocannabinoides. Se muestra la afinidad por los receptores CB1 y CB2 de cada una de las moléculas.	9
Figura 4. Síntesis de los principales endocannabinoides producidos por los humanos. NAT, N-aciltransferasa; NAPE-PLD, fosfolipasa D de N-araquidonilfosfatidiletanolamina; PLC, fosfolipasa C; DAGL, diacilglicerol lipasa. R ₁ : grupo alquil, R ₂ : grupo acil, R ₃ : inositol.	10
Figura 5. Degradación de AEA y 2-AG por las enzimas FAAH y MAGL, respectivamente. Con la degradación de los endocannabinoides, se inactivan y controlan los mecanismos de señalización. FAAH, hidrolasa de ácido grasos amino; MAGL, monoacilglicerol lipasa.	12
Figura 6. Estructura molecular del β-cariofileno.	14
Figura 7. Composición de la pared de los vasos sanguíneos.	15
Figura 8. Mecanismo de vasodilatación causado por la activación de receptores colinérgicos muscarínicos (ACh, M ₃). Estos receptores están acoplados a una proteína G con subunidad α _q , cuya activación genera la producción de NO, que difunde desde las células endoteliales hasta las células del músculo liso y activa a	iii

la guanilato ciclasa soluble (GCs) para la producción de GMPc, el cual activa a la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), produciendo un efecto vasodilatador y la reducción de la presión arterial..... 17

Figura 9. Mecanismo de vasodilatación producido por H₂S. Este gas se une a los canales de potasio dependientes de ATP, mediante una reacción de S-sulfhidración de una cisteína del canal con H₂S, lo que causa la subsecuente hiperpolarización de este canal; la producción de H₂S endógeno es llevada a cabo por la enzima cistationina γ -liasa a partir de L- cisteína (Van Goor y col., 2016). . 18

Figura 10. Representación de la presencia de receptores cannabinoides en las distintas capas de los vasos sanguíneos (adaptado de Montecucco y Di Marzo, 2012)..... 19

Figura11. Mecanismo de acción vasodilatador de los cannabinoides por activación de los receptores CB1 y eCB. CB1, receptor a cannabinoides tipo 1; eCB, receptor a cannabinoides endotelial; PI3K, proteína quinasa de fosfatidilinositol trifosfato; Akt, proteína cinasa B; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; NO, óxido nítrico; GTP, guanosina trifosfato; cGMP, guanosina monofosfato cíclico; PKG, proteína cinasa G; K_{ATP}, canal de potasio dependiente de ATP..... 21

Figura12. Curva concentración respuesta del efecto vasodilatador del β -cariofileno y la acetilcolina, utilizada como control positivo. 33

Figura13. Curva concentración-respuesta del β -cariofileno en presencia de inhibidores a receptores cannabinoides: rimonabant, inhibidor de receptores CB1; AM630, inhibidor de receptores CB2 y O-1918, inhibidor del receptor eCB..... 35

Figura 14. Curva concentración-respuesta del β -cariofileno en ausencia y en presencia de L-NAME (inhibidor de la eNOS) o PPG (inhibidor de la CSE). 36

Figura 15. Modelo de interacción del β -cariofileno y el receptor CB2. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y el receptor CB2 y B) Diagrama de interacción molecular entre β -cariofileno y el receptor CB2. 38

Figura16. Modelo de interacción del β -cariofileno y el receptor GPR18. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y el receptor GPR18 y B) Diagrama de interacción molecular entre el β -cariofileno y el receptor GPR18. ... 39

Tabla 17. Acrónimos. 53

Figura 17. Modelo de interacción del β -cariofileno y el receptor GPR55. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y el receptor GPR55 y B) Diagrama de interacción molecular entre el β -cariofileno y el receptor GPR55... 40

Figura 18. Modelo de interacción del β -cariofileno y la enzima CSE. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y la enzima CSE y B) Diagrama de interacción molecular entre el β -cariofileno y la enzima CSE.....41

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión es considerada como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Forouzanfar et al., 2017), las cuales representan la principal causa de muerte a nivel mundial (WHO, 2018). En México, la hipertensión es uno de los principales problemas de salud pública, la cual incrementa el riesgo de padecer ECV, tales como la insuficiencia cardiaca, la isquemia cardiaca, la aterosclerosis o el ataque cardiaco (Colín-Ramírez et al., 2017). Aunque existen numerosos fármacos para el tratamiento de la hipertensión, su eficacia es baja, su costo es elevado y presentan efectos adversos graves (Al Disi et al., 2016). Por esta razón, es necesario buscar nuevas moléculas para el desarrollo de fármacos antihipertensivos alternativos con mayor efectividad y menos efectos adversos (Ried y Fakler, 2014). En estudios previos, se ha mostrado que los cannabinoides son capaces de modular el sistema cardiovascular, reduciendo el tono vascular y la presión sanguínea (Ho y Kelly, 2017). Estudios realizados durante las últimas décadas han demostrado que los receptores CB1 y CB2, así como algunos endocannabinoides y las enzimas que los sintetizan y los degradan están presentes en los vasos sanguíneos y juegan un papel importante en su fisiopatología (Maccarrone *et al.*, 2015). Los mecanismos de acción que participan en los efectos cardiovasculares producidos por cannabinoides, son complejos e involucran la activación de receptores a cannabinoides CB1, CB2 y no CB1/no CB2 (Ho y Kelly, 2017). De manera adicional, algunos endocannabinoides como la anandamida, pueden interactuar con los canales de potencial transitorio (TRP), los cuales, al igual que los receptores CB1 y CB2, desempeñan un papel importante en el sistema cardiovascular (Di Marzo y De Petrocellis, 2012). Asimismo, se ha observado que la activación de receptores CB1 endoteliales por este endocannabinoide induce la relajación del músculo liso vascular, la cual es producida por la activación de la óxido nítrico (NO) sintasa endotelial (eNOS) y de los canales de potasio activados por calcio (Stanley et al., 2016). Debido a que existen reportes que indican que el

NO actúa, de manera conjunta, con el sulfuro de hidrógeno (H₂S) para producir vasodilatación (Coletta et al., 2012), resulta interesante determinar si la activación de receptores a cannabinoides involucra simultáneamente la activación de las vías del NO/cGMP y del H₂S/canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}).

Estudios preclínicos y clínicos sugieren que la modulación del sistema cannabinoide puede mejorar las funciones cardiovasculares en diversas condiciones patológicas, incluyendo la hipertensión (Ho y Kelly, 2017). Por esta razón, resulta muy importante la búsqueda de nuevas moléculas, de origen natural y sintético, que modulen este sistema, ya sea, interaccionando directamente con los receptores CB1, CB2, TRP o eCB, o bien inhibiendo la degradación o recaptura de los endocannabinoides. Indudablemente dichas moléculas podrían representar nuevas alternativas terapéuticas para la prevención y/o el tratamiento de diversas ECVs (Di Marzo, 2009).

Se han encontrado diversas moléculas provenientes de plantas con actividad cannabimimética, entre las cuales se encuentra el β-cariofileno, un sesquiterpeno presente en la canela y la pimienta negra, que produce efecto antiinflamatorio (Gertsch *et al.*, 2008) y analgésico (Fidyt *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado su efecto vasodilatador. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto vasodilatador del β-cariofileno y determinar la participación de los receptores a cannabinoides y las enzimas eNOS (enzima encargada de la síntesis del NO) y CSE (cistationina- \square -liasa, enzima encargada de la síntesis del H₂S) en su mecanismo de acción. De manera adicional, con el fin de determinar si el β-cariofileno produce su efecto vasodilatador, activando de manera directa a estos blancos moleculares, se realizó un estudio de acoplamiento molecular de este compuesto con los receptores a cannabinoides y las enzimas productoras de los transmisores gaseosos: eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial, productora de NO) y CSE (cistationina- \square -liasa, productora de H₂S). En esta tesis se determinó que el β-cariofileno relaja la aorta de rata, activando receptores a cannabinoides (CB2 y

eCB) y las vías del NO/GMPc y H₂S/K_{ATP}. Este compuesto vasodilatador constituye un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de ECVs.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) constituyen la principal causa de muerte a nivel mundial (17.7 millones cada año), seguidas del cáncer (8.8 millones), las enfermedades respiratorias (3.9 millones) y la diabetes (1.6 millones) (WHO, 2018).

En México, a las ECVs se les atribuye el 19.6% de las muertes registradas en 2016. Estas enfermedades comparten algunos factores de riesgo que es importante atender, dentro de las que destacan el sobrepeso y la obesidad, que afecta a más del 70% de la población de 20 años o más, el tabaquismo, el colesterol elevado y la hipertensión arterial (INEGI, 2016).

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica que predispone a las personas que la padecen a desarrollar ECVs, tales como la insuficiencia cardíaca, la isquemia cardíaca, la aterosclerosis o el ataque cardíaco (Colín-Ramírez et al., 2017). En 1993, se reportó una prevalencia del 25% y para el año 2000, se informó que más de 15 millones de mexicanos de entre 25 y 69 años la padecían. En 2014, se estimó que aproximadamente 24 millones de mexicanos mayores de 20 años padecían hipertensión. El impacto económico-social de las ECVs es devastador para cualquier sistema de salud en el mundo, ya que se trata de padecimientos no curables, que presentan secuelas que en su mayoría son incapacitantes, lo que incrementa de manera considerable los gastos del sector salud (Rosas-Peralta y col., 2016).

La hipertensión se define como la presión arterial mayor a 140/90 mmHg, presente en aproximadamente el 70% de los hombres y en el 80% de las mujeres de 70 años o más. La presión arterial sistólica se encuentra típicamente elevada como resultado del endurecimiento de las arterias importantes, mientras que la presión arterial diastólica es normal o baja (Fleg y col., 2011).

Uno de los factores fisiopatológicos más importantes que dan como resultado la hipertensión es la disfunción del endotelio vascular, la cual se caracteriza por una disminución en la liberación de factores vasodilatadores derivados de endotelio, entre los que destaca el óxido nítrico (NO) y el sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Cirino et al., 2017). Aunque existen numerosos fármacos para el tratamiento de la hipertensión, su eficacia es baja, su costo es elevado y presentan efectos adversos graves (Al Disi et al., 2016). Por esta razón, es necesario buscar nuevas moléculas para el desarrollo de fármacos antihipertensivos alternativos con mayor efectividad y menos efectos adversos (Ried y Fakler, 2014). En estudios previos, se ha mostrado que los cannabinoides son capaces de modular el sistema cardiovascular, reduciendo la presión sanguínea (Ho y Kelly, 2017).

2.1.1. Alternativas terapéuticas: el sistema endocannabinoide

Se ha observado que alteraciones en el sistema endocannabinoide están asociadas con ECVs. En particular, cambios en las concentraciones tisulares de dos de los endocannabinoides más estudiados (anandamida y 2-araquidonilglicerol) se han observado en este tipo de enfermedades (Di Marzo, 2008).

En tratamiento de ECVs mediante la modulación del sistema cannabinoide debe ser explorada cuidadosamente, tomando en cuenta los beneficios potenciales y los efectos adversos que pueden ocurrir por la activación o inhibición exógena de este sistema, mediante el uso de cannabinoides. Estos compuestos pueden producirse de manera endógena (endocannabinoides), en plantas (fitocannabinoides) o mediante síntesis orgánica (Sharma y col., 2015). Por lo tanto, la modulación del sistema endocannabinoide constituye una estrategia terapéutica novedosa en el tratamiento de ECVs, en particular de algunos trastornos para los que no existe un tratamiento satisfactorio hasta la fecha.

2.2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide comprende a los receptores a cannabinoides (CB1 y CB2, principalmente), sus ligandos endógenos (endocannabinoides: anandamida y 2-araquidonoilglicerol, principalmente) y las enzimas que llevan a cabo su síntesis y su degradación (Figura 1) (Svízenská, 2008).

Los endocannabinoides son moléculas anfipáticas que se sintetizan a partir de fosfolípidos de membrana (Medeiros y col., 2017).

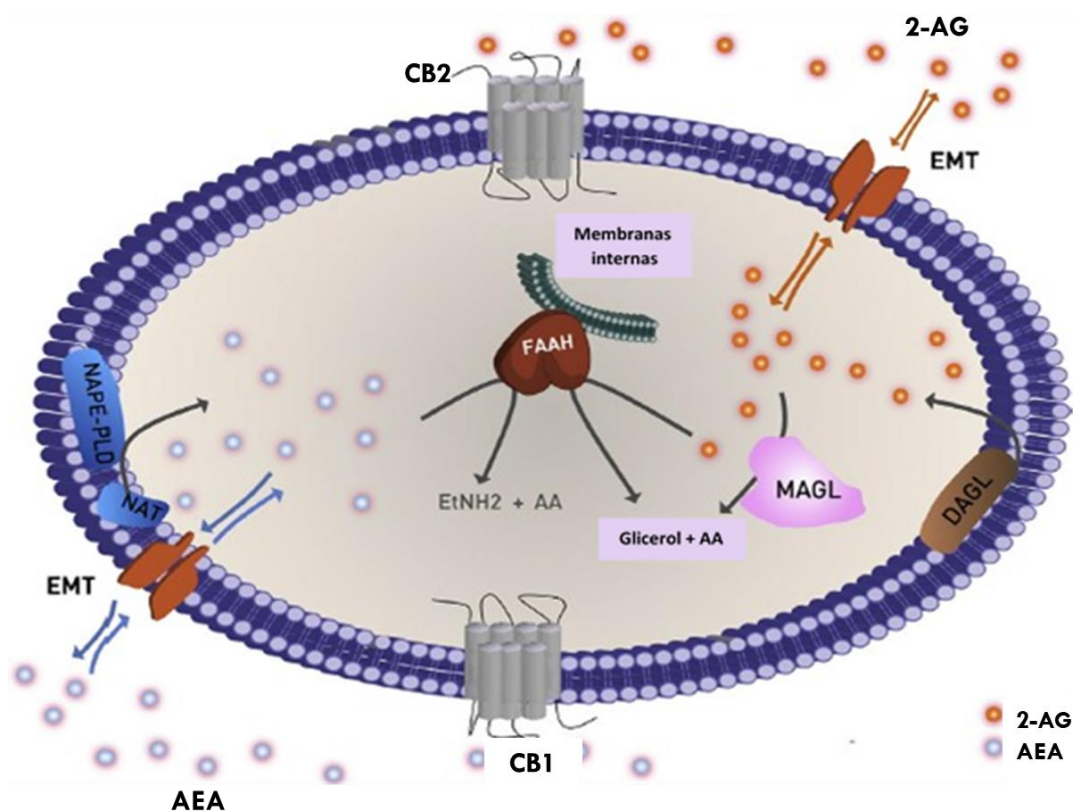


Figura 1. Sistema endocannabinoide. Este sistema incluye a los receptores CB1 y CB2, sus ligandos endógenos y las enzimas que metabolizan o degradan estos ligandos. CBR, receptor a cannabinoides; NAPE-PLD, N-araquidonoil-fosfoetanolamina fosfolipasa D; NAT, N-araquidonoil transferasa; DAGL, diacilglicerol lipasa; EMT, transportador de membrana de etanolamidas; FAAH, hidrolasa de ácidos grasos amida; EtNH₂, etanolamida; AA, ácido araquidónico; 2-AG, 2-araquidonoilglicerol; AEA, anandamida (Fonseca y col., 2013).

2.2.1. Receptores CB1 y CB2

Los receptores a cannabinoides pertenecen a una gran familia de receptores acoplados a proteínas G y contienen siete segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por asas extracelulares e intracelulares alternadas; su dominio N-terminal se encuentra en la región extracelular y posee sitios de glicosilación, mientras que el dominio C-terminal, localizado intracelularmente está acoplado al complejo de proteína G (Svízenská y col., 2008).

El primer receptor en ser descubierto, clonado y expresado es el receptor CB1, el cual se clasifica dentro de los receptores acoplados a proteína G con subunidad $\alpha_{i/o}$. Este receptor está conformado por 7 dominios transmembrana de α -hélices (I a VII) (Figura 2), conectados por tres asas extracelulares (ECL1 a 3) y tres asas intracelulares (ICL1 a 3), con una hélice VIII anfipática. Además, dadas las características de su sitio de unión a ligando (sitio ortostérico) establece interacciones hidrofóbicas e interacciones π - π , principalmente (Hua y col., 2016).

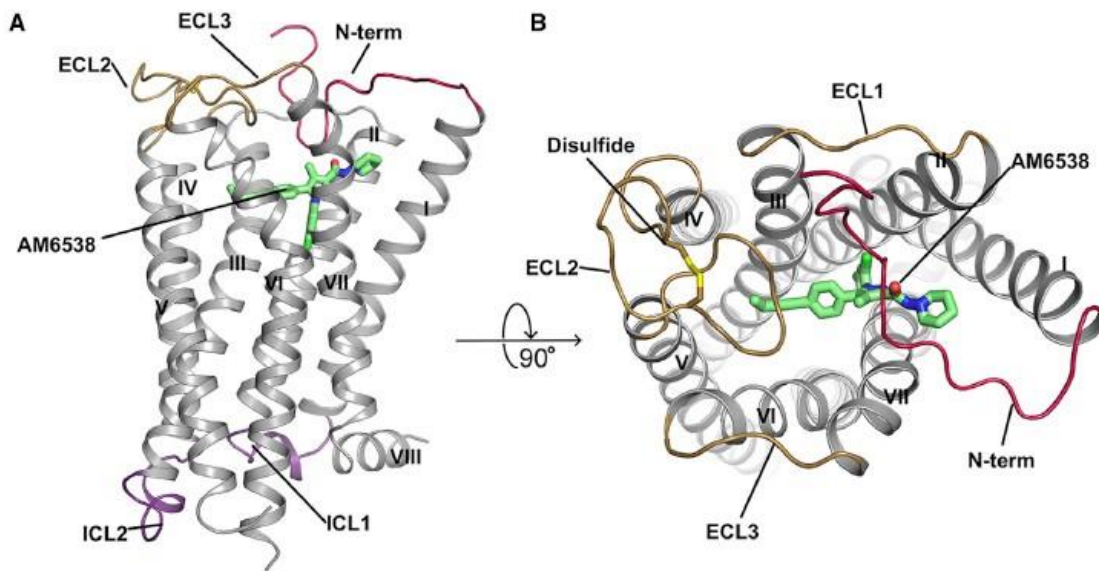


Figura 2. Estructura tridimensional del receptor CB1 en complejo con el antagonista AM6538 (Hua y col., 2016).

Estos receptores se expresan en diversas regiones donde influye a un número de funciones clave, incluidas estado anímico, coordinación motora, funciones

autónomas, memoria, sensaciones y cognición; estos receptores se encuentran en el hipocampo, algunas regiones olfatorias, putamen caudado, núcleo accumbens (estriado ventral), sustancia negra pars reticulata, globo pálido, y en el extremo horizontal de la banda diagonal (Svízenská y col., 2008).

En el sistema nervioso (central y periférico), los receptores CB1 se distribuyen en las terminales presinápticas de las neuronas, en donde participan en la inhibición de los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente y en la formación de endocannabinoides. La activación de otros receptores acoplados a proteínas G hace al sistema endocannabinoide una herramienta natural ideal para la modulación de la liberación de neurotransmisores (Di Marzo y col., 2004).

El receptor CB2 fue encontrado inicialmente en múltiples órganos linfoides, principalmente en linfocitos B, de manera moderada en monocitos y neutrófilos polimorfonucleares y en menor cantidad en linfocitos T, aunque estudios subsecuentes también lo identificaron en células microgliales (Rodríguez de Fonseca y col., 2005; Svízenská y col., 2008).

Estudios recientes han demostrado que los receptores CB1 y CB2 están presentes en los vasos sanguíneos y juegan un papel importante en su fisiopatología (Maccarrone y col., 2015).

Diversos estudios describen que la activación de los receptores CB1 y CB2 estimulan la cascada de señalización de la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK) por la activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la producción de NO. Otros estudios revelan que el receptor CB1 estimula la producción de AMPc por su acoplamiento a proteína G con subunidad α_s . Estudios farmacológicos revelan la existencia de otros blancos de los endocannabinoides incluidos los receptores vaniloides y, al menos, dos receptores a cannabinoides no-CB1 y no-CB2 (Rodríguez de Fonseca y col., 2005).

2.2.2. Endocannabinoides

El cerebro produce al menos cinco compuestos que poseen afinidad submicromolar por los receptores a cannabinoides: la anandamida y el 2-araquidonilglicerol principalmente, así como noladina éter, virodamina y la N-araquidonildopamina (Svíženská y col., 2008). Los endocannabinoides más estudiados son la *N*-aciletanolamina (NAE), mejor conocida como anandamida (AEA), y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Figura 3). Estos compuestos consisten en una cabeza amida o éster, conjugada con una cadena de araquidonilo (20 carbonos con 4 insaturaciones, ω^6). Aunque es bien aceptado que sus actividades fisiológicas se producen principalmente por la unión a receptores cannabinoides o canales TRP, la AEA y el 2-AG también pueden producir efectos que no son mediados por estos blancos moleculares. La modulación de la actividad de diferentes tipos de proteínas de membrana con diversas secuencias de aminoácidos y topologías de membrana sugiere la falta de un sitio de unión específico para los endocannabinoides en esas proteínas (Medeiros y col., 2017).

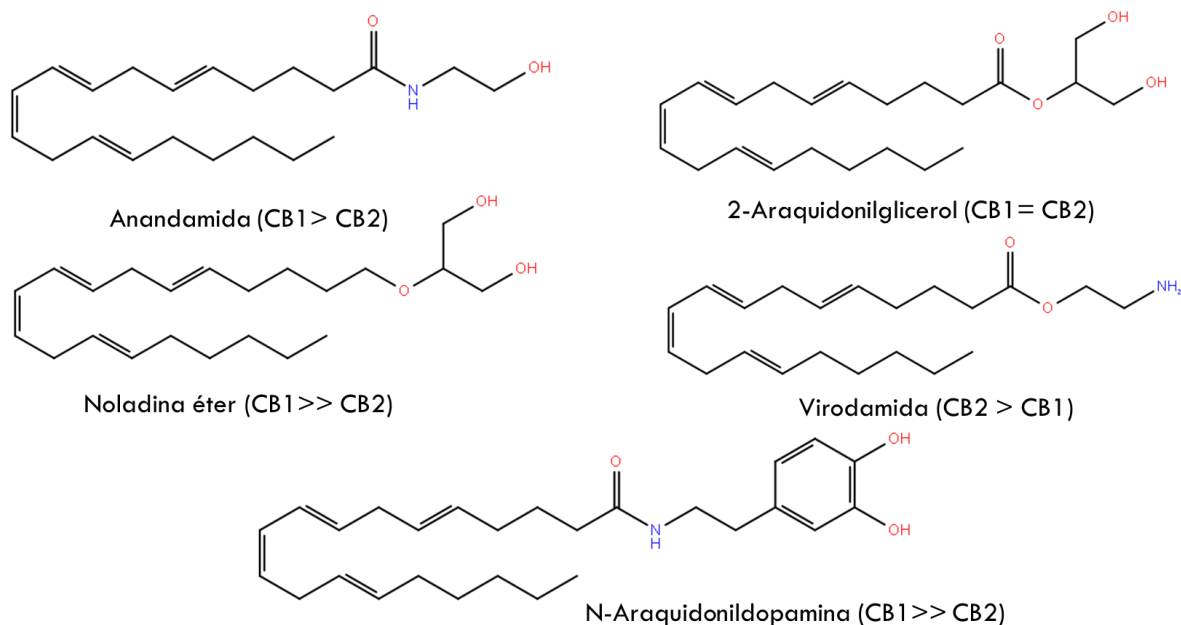


Figura 3. Estructuras químicas de los endocannabinoides. Se muestra la afinidad por los receptores CB1 y CB2 de cada una de las moléculas.

Para la síntesis de la AEA se lleva a cabo en una reacción que consta de dos etapas, en primer término, el fosfolípido de membrana *N*-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE) se obtiene de la reacción en la que se transfiere el ácido araquidónico de la fosfatidilcolina a la cabeza del grupo fosfatidiletanolamina, la cual es catalizada por la *N*-acetiltransferasa (NAT). En una segunda etapa, el NAPE es hidrolizado por la fosfolipasa D para dar como resultado a la AEA (Figura 4). Estas reacciones ocurren cuando incrementa la concentración de calcio intracelular, ya sea por la entrada de calcio extracelular o por liberación de calcio de almacenes intracelulares. Una vez formada, la AEA es liberada de la capa interna de la membrana celular (Fonseca y col., 2013).

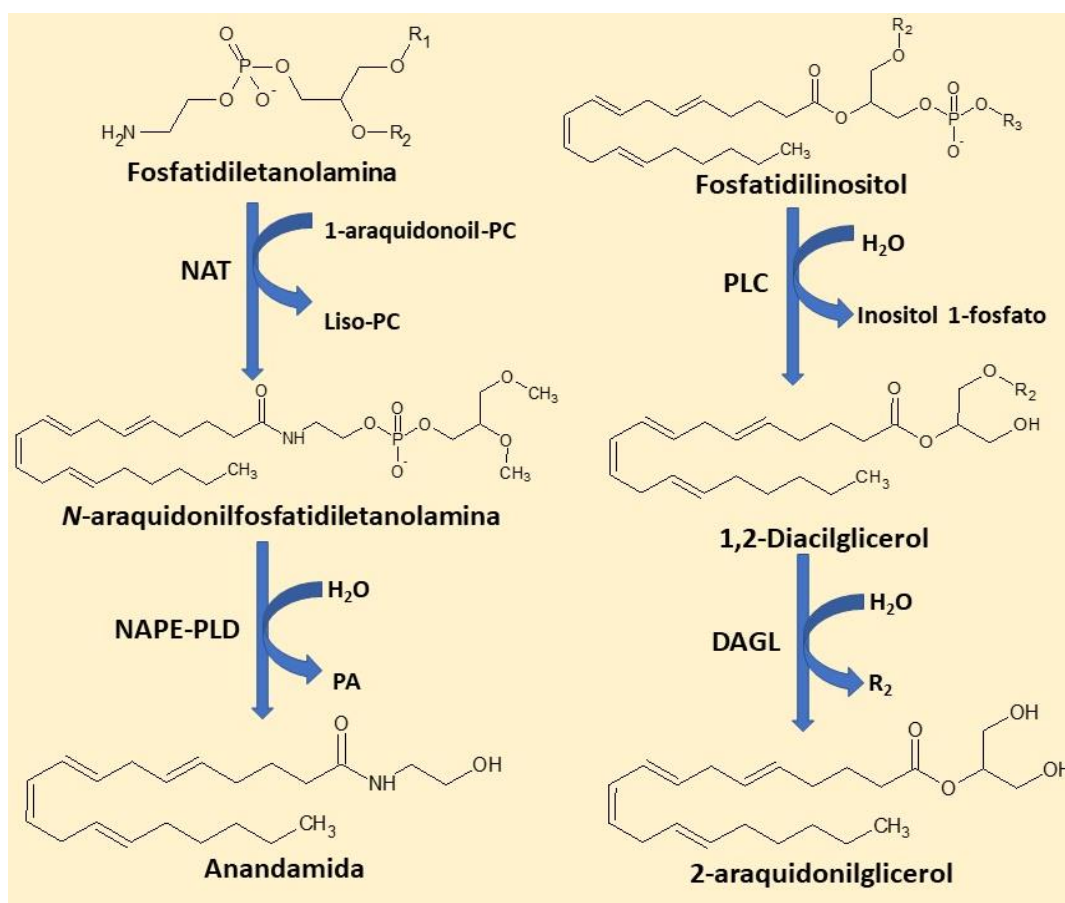


Figura 4. Síntesis de los principales endocannabinoides producidos por los humanos. NAT, N-aciltransferasa; NAPE-PLD, fosfolipasa D de *N*-araquidonilfosfatidiletanolamina; PLC, fosfolipasa C; DAGL, diacilglicerol lipasa. R_1 : grupo alquil, R_2 : grupo acil, R_3 : inositol.

La AEA se encuentra involucrada en procesos cognitivos, memoria, ansiedad, control del apetito, vómito, funcionamiento motor y respuestas autonómicas y neuroendócrinas. También induce hipotensión y bradicardia, inhibe el crecimiento celular, afecta el metabolismo energético y modula respuestas inmunes (Svízenská y col., 2008).

El 2-AG tiene un ciclo de vida similar a la AEA, ya que ambos son sintetizados “a demanda”, participan en los mismos procesos y son rápidamente degradados para terminar su acción biológica. Por otra parte, el 2-AG tiene mayor afinidad por los receptores CB1 y CB2 que la AEA y es sintetizado a partir de fosfolípidos de membrana, los cuales son hidrolizados por la fosfolipasa C, produciendo 1,2-diacilglicerol, que puede ser subsecuentemente convertido en 2-AG por la diacilglicerol lipasa (Figura 4) (Fonseca y col., 2013).

Las actividades biológicas del 2-AG que se han reportado están relacionadas con el sistema inmune, la proliferación celular, el desarrollo embrionario, la potenciación a largo plazo en el hipocampo, la neuroprotección y la neuromodulación, la función cardiovascular y las respuestas inflamatorias (Svízenská y col., 2008).

2.2.3. Captación y degradación de los endocannabinoides

Después de la biosíntesis, los endocannabinoides se liberan al espacio extracelular, ya sea por difusión simple a través de las membranas plasmáticas o por medio de transportadores, para activar a los receptores de cannabinoides. Regularmente, los niveles extracelulares de endocannabinoides son más altos que los intracelulares, debido a la actividad de la FAAH, la cual degrada estos compuestos y mantiene el gradiente necesario para que continúe el proceso de liberación por difusión simple (Fonseca y col., 2013).

Existe evidencia de la presencia de una proteína en las membranas celulares capaz de recapturar endocannabinoides, ya que se había observado que el

transporte de AEA en las células es bidireccional. Después de la recaptura de endocannabinoides, la AEA y el 2-AG son metabolizados por la serina hidrolasa (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente (Figura 5). Además, los endocannabinoides pueden ser oxidados por la ciclooxygenasa-2 (COX-2) y las lipooxigenasas 12 y 15 (12-LOX y 15-LOX). La FAAH hidroliza a la AEA en ácido araquidónico y etanolamina. De esta enzima se han identificado dos isoformas: FAAH1 y FAAH2, ambas enzimas se localizan de manera integral en la membrana plasmática, aunque su orientación difiere, pues FAAH1 se localiza hacia el citoplasma, mientras que FAAH2 de cara al lumen. FAAH1 se ha encontrado en ratones, ratas y humanos, en cerebro, testículos e intestino, mientras que FAAH2 no se expresa en ratones y se encuentra predominantemente en tejido cardíaco. MAGL es la enzima responsable del metabolismo de 2-AG, mediante una reacción de hidrólisis que produce ácido araquidónico y glicerol. Esta enzima es capaz de hidrolizar otros ácidos grasos de cadena media y larga y se expresa en tejidos de ratas, ratones y humanos (Yates y Baker, 2009).

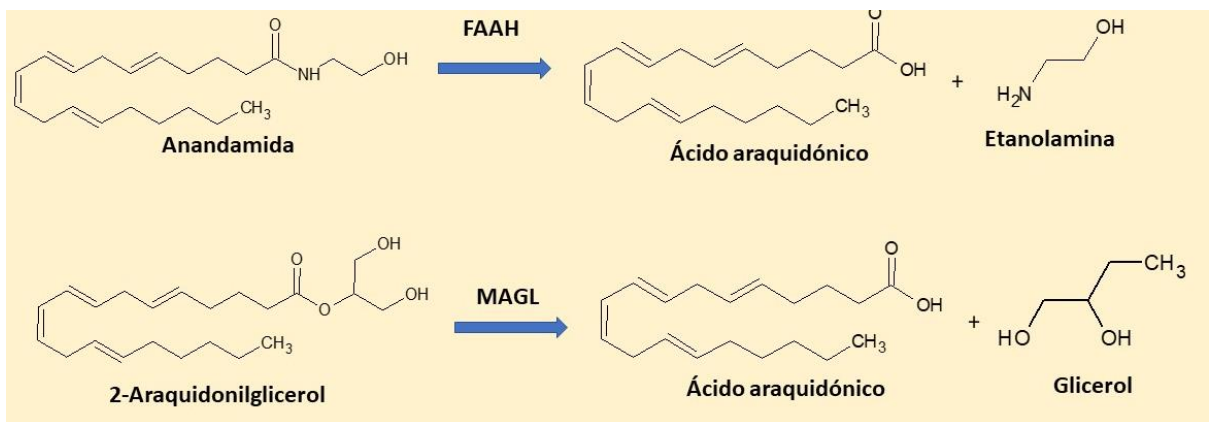


Figura5. Degradación de AEA y 2-AG por las enzimas FAAH y MAGL, respectivamente. Con la degradación de los endocannabinoides, se inactivan y controlan los mecanismos de señalización. FAAH, hidrolasa de ácido grasos amino; MAGL, monoacilglicerol lipasa.

2.2.4. Investigación farmacológica y búsqueda de fármacos que modulan el sistema endocannabinoide

Los cannabinoides se agrupan de la siguiente manera: el primer grupo (cannabinoides clásicos) comprende a los derivados del anillo dibenzopirano que forma parte de los constituyentes de la Cannabis (Δ^9 -THC y (-)- Δ^8 -THC) y sus análogos sintéticos (HU210). La primera generación de cannabinoides clásicos carece de selectividad a los receptores CB1/CB2, pero se desarrollaron realizando cambios estructurales menores a la molécula de THC (por ejemplo, los agonistas selectivos a CB2: JWH-133 y HU-308). El segundo grupo (cannabinoides no clásicos) se desarrollaron como análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC sin el anillo de pirano; este grupo incluye los principales agonistas a cannabinoides, por ejemplo, el compuesto CP55940, que se une a CB1 y CB2 con similar afinidad y alta actividad *in vivo*. Este compuesto es 10-50 veces más potente que el Δ^9 -THC y es un agonista puro de ambos receptores. El tercer grupo de compuestos cannabinomiméticos agrupa a los aminoalquilindoles, representados por WIN 55,212-2, con alta afinidad a ambos tipos de receptores, aunque con moderada selectividad en favor de los receptores CB2; algunos aminoalquilindoles exhiben una significativa selectividad a los receptores CB2. El cuarto grupo se encuentran prototipos de eicosanoides, el cual incluye al ácido araquidónico y sus derivados, siendo la anandamida, el primer cannabinoide endógeno aislado de cerebro de mamífero (Svíženská y col., 2008).

En los últimos 30 años, el descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales ha ido en aumento, pues tan sólo en el periodo de 1981 al 2014, de los 1562 fármacos nuevos aprobados por la FDA, el 40% son compuestos derivados de productos naturales. De acuerdo con esta perspectiva, es evidente que los productos naturales constituyen una extensa fuente de estructuras moleculares, las cuales pueden ser utilizadas para el desarrollo de nuevos fármacos (Newman y Cragg, 2016).

Actualmente, se han reportado diversos metabolitos secundarios, provenientes de plantas medicinales o alimenticias, que modulan el sistema cannabinoide. Estos compuestos se denominan “fitocannabinoides” y son capaces de interactuar directamente con los receptores a cannabinoides y/o compartir similitudes químicas con cannabinoides (Gertsch y col., 2010). Un ejemplo de este tipo de compuestos es el β -cariofileno (Figura 6), un sesquiterpeno considerado como un cannabinomimético proveniente de la dieta, pues se encuentra en el orégano, la canela y la pimienta negra. Se ha evaluado el efecto antiinflamatorio, neuroprotector y analgésico del β -cariofileno (Gertsch y col., 2008), sin embargo, hasta la fecha no se conoce si presenta efectos cardiovasculares.

Actualmente, existen pocos estudios que indiquen que el mecanismo de acción de compuestos vasodilatadores, derivados de productos naturales, involucra la activación del sistema cannabinoide. El cannabidiol, uno de los principales compuestos presentes en *Cannabis sativa*, ejerce actividad vasodilatadora en anillos de aorta mesentérica humana, mediante la activación de la cascada de señalización CB1/ERK/Akt/eNOS (Stanley y col., 2015).

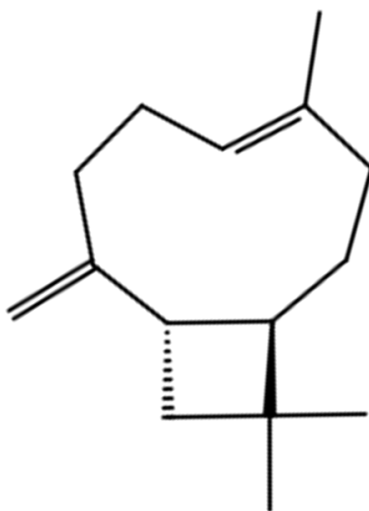


Figura 6. Estructura molecular del β -cariofileno.

2.3. Mecanismos de vasodilatación

2.3.1 Fisiología del vaso sanguíneo: regulación del tono del músculo liso vascular

Los vasos sanguíneos forman una red tubular en todo el cuerpo, que permite que la sangre fluya desde el corazón a todas las células vivas del organismo y después de regreso al corazón. Estos vasos se subdividen de acuerdo a su diámetro y se denominan arterias, arteriolas, capilares, venas y vénulas. Las paredes de las arterias y venas están compuestas por tres cubiertas o túnicas (Figura 7): la túnica externa está compuesta de tejido conjuntivo, la túnica media consta principalmente de músculo liso y la túnica interna consta de tres partes: 1) el endotelio, que reviste la luz de todos los vasos sanguíneos, 2) la membrana basal, constituida de glucoproteínas que se encuentra sobre algunas fibras de tejido conjuntivo y 3) una capa de fibras de elastina que forma una lámina elástica interna (Fox, 2012).

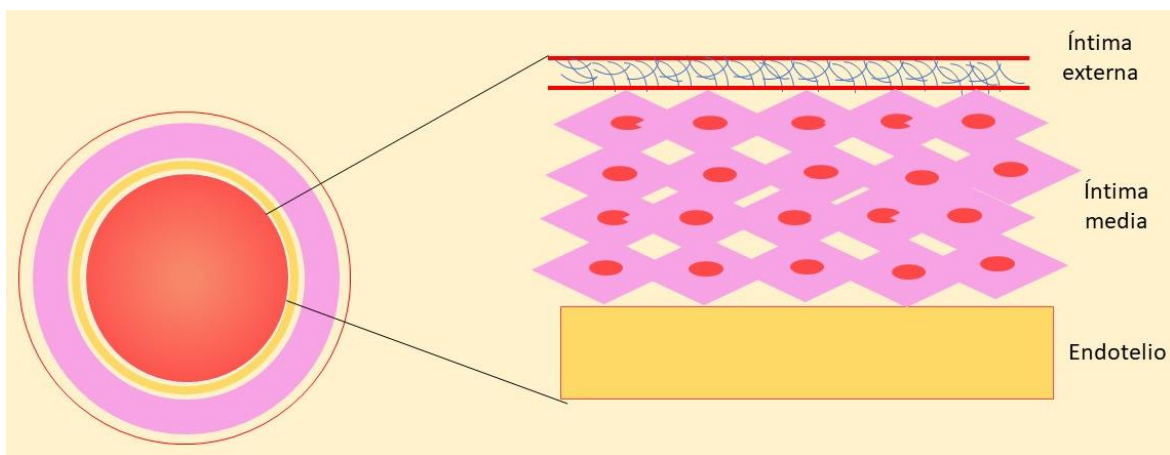


Figura 7. Composición de la pared de los vasos sanguíneos.

El aumento de la rigidez del vaso sanguíneo debido al envejecimiento y a los factores de riesgo cardiovascular se asocia con cambios estructurales y funcionales de la pared vascular. Los cambios estructurales incluyen el aumento

del contenido de materiales rígidos de la pared vascular como el colágeno, asociado con alteraciones de las fibras de elastina, inflamación, alteraciones de las células del músculo liso (hipertrofia, modulación del fenotipo) y el aumento de la permeabilidad endotelial con la subsiguiente difusión de macromoléculas dentro de la pared del vaso sanguíneo (Yannoutsos y col., 2014).

El endotelio además de revestir el interior de los vasos sanguíneos, proporcionando una barrera mecánica, realiza importantes funciones parácrinas, endocrinas y autócrinas, indispensables para el mantenimiento de la homeostasis vascular en condiciones fisiológicas. Las funciones múltiples del endotelio vascular incluyen la regulación de la integridad del vaso sanguíneo, el crecimiento vascular y la remodelación, el crecimiento y el metabolismo de tejidos, las respuestas inmunes, la adhesión celular, la angiogénesis, la hemostasia y la permeabilidad vascular. El endotelio desempeña un papel fundamental en la regulación del tono vascular, el control del flujo sanguíneo del tejido y las respuestas inflamatorias y el mantenimiento de la fluidez de la sangre. Los factores derivados del endotelio con efectos vasodilatadores y antiproliferativos incluyen el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF), el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂) (Sena y col., 2013).

2.3.2 Factores vasodilatadores derivados de endotelio: transmisores gaseosos (NO y H₂S)

El NO es un factor crucial en la homeostasis vascular. Esta molécula se sintetiza dentro de las células endoteliales a través de la conversión de la L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El NO se libera de las células endoteliales principalmente en respuesta al estrés, provocado por la sangre circulante o a causa de los agonistas de los receptores endoteliales como la acetilcolina, la bradicinina o la serotonina. Este gas se difunde a las células musculares lisas vasculares y activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), produciendo mayores niveles de guanosina-3,5-monofosfato cíclico (cGMP)

(Figura 8). El cGMP activa a la proteína cinasa G (PKG), la cual se encarga de fosforilar a la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (PPT), lo que produce un efecto relajante de las células musculares lisas. De manera adicional, la PKG fosforila canales de potasio, causando una hiperpolarización de las células del músculo liso, causando el cierre de los canales de calcio y disminuyendo la concentración de calcio intracelular (Sena y col., 2013).

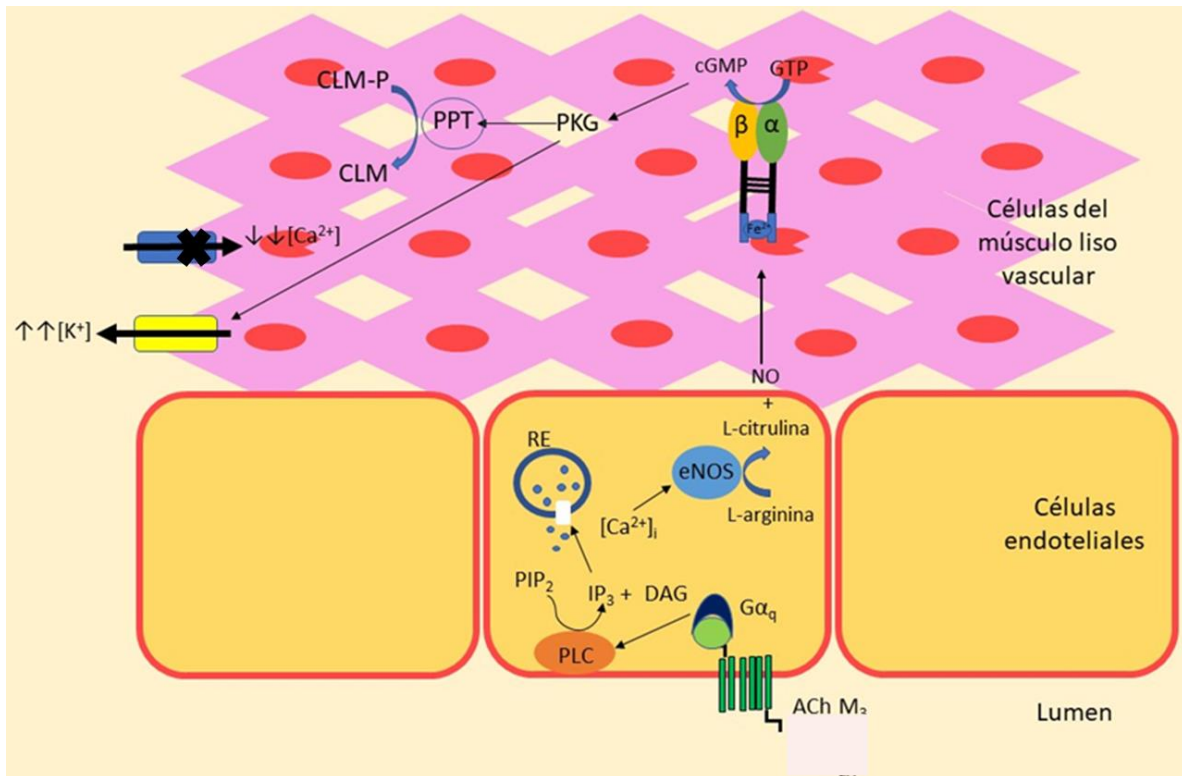


Figura 8. Mecanismo de vasodilatación causado por la activación de receptores colinérgicos muscarínicos (ACh, M₃). Estos receptores están acoplados a una proteína G con subunidad α_q, cuya activación genera la producción de NO, que difunde desde las células endoteliales hasta las células del músculo liso y activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs) para la producción de GMPc, el cual activa a la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), produciendo un efecto vasodilatador y la reducción de la presión arterial.

Existen reportes que indican que el endotelio vascular produce otro transmisor gaseoso, el sulfuro de hidrógeno (H₂S), el cual actúa, de manera conjunta, con el NO para producir vasodilatación (Coletta et al., 2012). El H₂S juega un papel

importante en la homeostasis de la función endotelial. Esta molécula reduce el tono vascular, mediante la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), localizados en las células de músculo liso (Figura 9) (Wang y col., 2015).

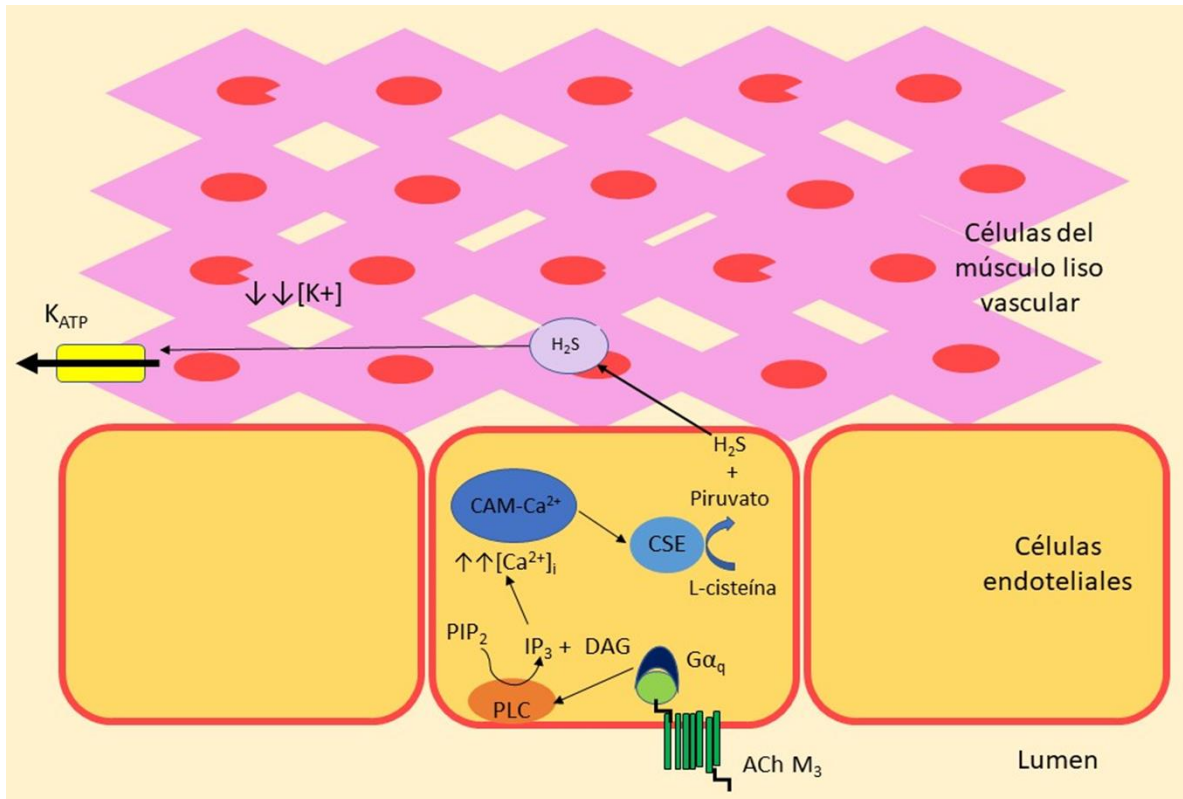


Figura 9. Mecanismo de vasodilatación producido por H_2S . Este gas se une a los canales de potasio dependientes de ATP, mediante una reacción de S-sulfhidración de una cisteína del canal con H_2S , lo que causa la subsecuente hiperpolarización de este canal; la producción de H_2S endógeno es llevada a cabo por la enzima cistationina γ -liasa a partir de L- cisteína (Van Goor y col., 2016).

La enzima cistationina- γ -liasa (CSE) cataliza la reacción de conversión de L- cisteína en piruvato y H_2S (Figura 9). El H_2S puede ser almacenado en un clúster de Fe-S en la mitocondria y su liberación se lleva a cabo solo en microambientes ácidos ($pH=5.4$). Debido a la alta inestabilidad de este clúster, el H_2S es liberado rápidamente cuando se necesita. Por otra parte, el H_2S es eliminado por varias rutas en condiciones fisiológicas: por oxidación en la mitocondria, donde la forma

desprotonada (HS^-) es convertida en tiosulfato, el cual es convertido en sulfito y eventualmente en sulfato; este compuesto es el principal producto obtenido del metabolismo del H_2S (Nagpure y Bian, 2016).

2.3.3 Papel del sistema endocannabinoide en el sistema cardiovascular

En estudios previos se determinó que el THC posee un efecto antinociceptivo tanto en humanos como en animales y, más tarde, se observó que este compuesto también produce un efecto hipotensor. Este efecto es complejo e involucra la modulación del sistema nervioso autónomo, así como el efecto directo en el miocardio y la vasculatura (Figura 10) (Pacher y Bátkai, 2005).

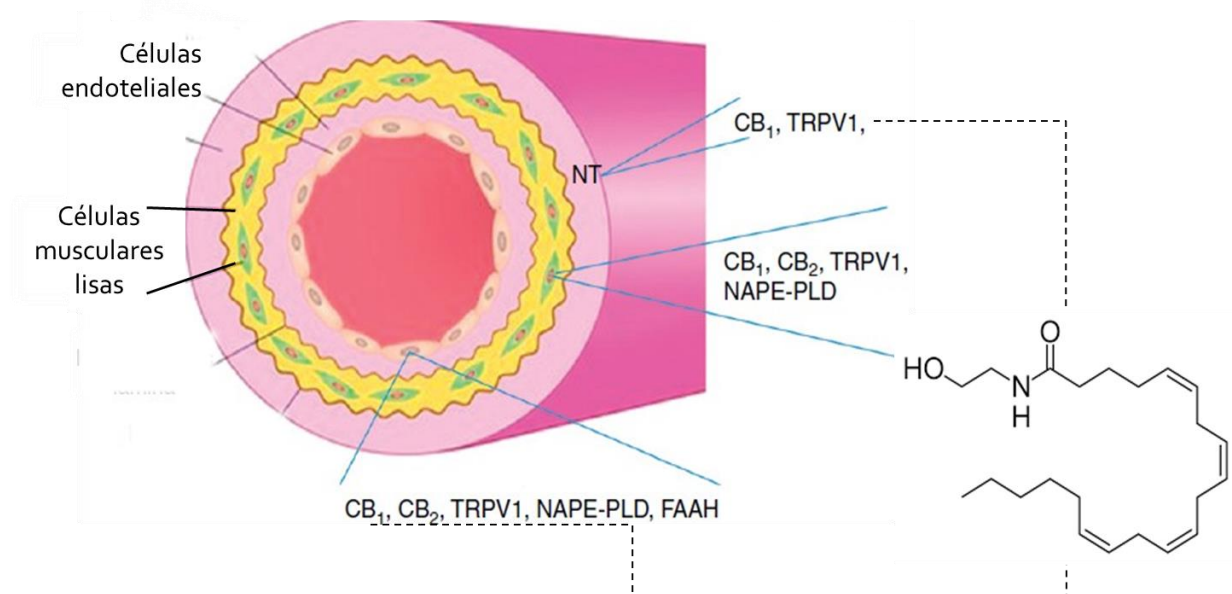


Figura 10. Representación de la presencia de receptores cannabinoides en las distintas capas de los vasos sanguíneos (adaptado de Montecucco y Di Marzo, 2012).

Ho y Hiley (2003) evaluaron el efecto vasodilatador de la anandamida y algunos aminoalquilindoles en arteria mesentérica aislada de rata, dando como resultado un efecto relajante independiente del endotelio, causado principalmente por la inhibición del influjo de calcio dentro de la célula del músculo liso vascular. Asimismo, la vasodilatación producida por anandamida involucró la activación de

los receptores TRPV; sin embargo, no hubo evidencia de la participación de los receptores CB1 o CB2 en la respuesta de estos compuestos (Ho y Hiley, 2003).

El grupo de McCollum y col. (2007) estudiaron el efecto vasodilatador de la anandamida en aorta aislada de conejo y determinaron que este efecto involucra la activación de un novedoso receptor a anandamida, al que denominaron no-CB1 y no-CB2, localizado en las células endoteliales, el cual está acoplado a proteína $G_{\alpha i}$ y activa al sistema PI3K/Akt y a la eNOS (Figura 11). La activación de esta enzima eleva los niveles de NO, el cual produce un efecto vasodilatador, por lo que este estudio es importante para el entendimiento del sistema de señalización de los endocannabinoides en las células endoteliales en particular y en la pared del vaso sanguíneo en general (McCollum y col., 2007a y b).

En un estudio realizado por Stanley y col. (2015) evaluaron el efecto relajante del cannabidiol en arterias mesentéricas humanas y determinaron que el cannabidiol causa vasodilatación en arteria mesentérica humana, mediante la activación de receptores CB1, de canales TRPV1 y de canales de potasio. Estos investigadores también reportaron que el efecto vasodilatador producido por este cannabinoide disminuye en pacientes con hipercolesterolemia o con diabetes tipo II, causado posiblemente por la disminución de receptores TRPV1 en este tipo de pacientes. En este mismo estudio se reportó que el cannabidiol incrementó la fosforilación de proteínas de señalización que explicarían su efecto vasodilatador (ERK, Akt, eNOS) (Figura 11), antiinflamatorio (JNK y NF- κ B) y antiangiogénico (p70s6K y STAT5) que ejercen los cannabinoides (Stanley y col., 2015).

2.4. Técnicas para medir vasodilatación

La investigación con animales de experimentación es una herramienta valiosa para comprender la fisiopatología y el desarrollo de terapias para una enfermedad. La reproducción de estos animales se controla de manera estricta y son utilizados en base a la investigación médica y veterinaria, muchos de los cuales se han reportado como modelos para el estudio de enfermedades que afectan a humanos

y/o animales. La investigación en animales incluye ratones, ratas, conejos, cerdos de guinea, ovejas, cabras, primates, perros, gatos, aves, peces y ranas. Las similitudes y diferencias entre los modelos animales deben ser tomada en consideración en cada proyecto. El modelo animal más apropiado para responder la pregunta de investigación específica de un estudio debe tomar en cuenta sus características particulares (Leong y col., 2015).

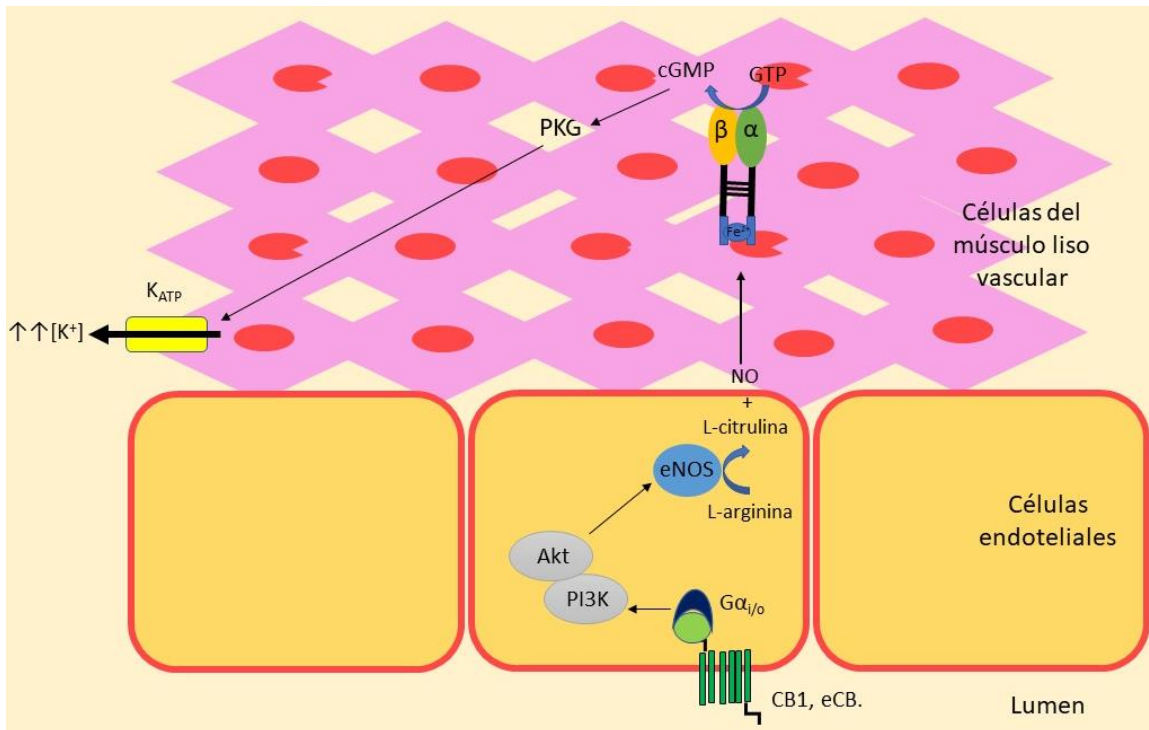


Figura11. Mecanismo de acción vasodilatador de los cannabinoides por activación de los receptores CB1 y eCB. CB1, receptor a cannabinoides tipo 1; eCB, receptor a cannabinoides endotelial; PI3K, proteína quinasa de fosfatidilinositol trifosfato; Akt, proteína cinasa B; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; NO, óxido nítrico; GTP, guanosina trifosfato; cGMP, guanosina monofosfato cíclico; PKG, proteína cinasa G; K_{ATP}, canal de potasio dependiente de ATP.

Los animales son utilizados en la investigación biomédica por las razones siguientes: 1) factibilidad: el modelo animal es relativamente fácil de manejar, el efecto de los componentes de la dieta ingerida y las condiciones medioambientales son controladas, además hay menor variación comparados con

los estudios humanos. Vasos sanguíneos y tejidos cardíacos pueden ser aislados para una detallada experimentación e investigación biomolecular; 2) similitud al humano: muchos animales son adecuados por su similitud anatómica y en funciones fisiológicas con los humanos y 3) seguridad farmacológica: pruebas de toxicidad preclínicas, perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de los fármacos son evaluados en animales, antes de que estos compuestos o fármacos sean administrados en humanos; la efectividad de un fármaco como potencial tratamiento en humanos necesita llevarse a cabo primero en animales de experimentación (Leong y col., 2015).

Los ensayos con tejidos aislados son una herramienta farmacológica clásica muy efectiva para evaluar el efecto farmacológico, dependiente de la concentración, de fármacos en diversos tejidos. El sistema para mantener al tejido aislado en solución está disponible para una gran variedad de ensayos, formas y tamaños, permitiendo al científico evaluar el efecto farmacológico de fármacos en arterias pequeñas como las mesentéricas, o tan grandes como las de porcino. Con los resultados obtenidos mediante este ensayo se puede calcular la eficacia y la potencia de compuestos vasodilatadores, así como caracterizar su mecanismo de acción, utilizando inhibidores específicos de proteínas involucradas en varias vías de señalización (Jespersen y col., 2015).

2.5. Química computacional y modelado molecular

El modelado molecular permite a los científicos visualizar moléculas por computadora (*in silico*) para descubrir nuevos compuestos líder (*lead compounds*), con el fin de desarrollar nuevos fármacos o para optimizar los ya existentes, permitiendo a los químicos computacionales el estudio riguroso del comportamiento molecular que no puede ser posible estudiar en el laboratorio de bioquímica o farmacología. El término “modelado molecular” se refiere a la capacidad de un software computacional de exhibir y manipular una simple estructura molecular y estudiar su interacción con proteínas, lípidos o ADN, así como predecir su posible efecto biológico. En la actualidad, el modelado molecular

se ha expandido en las últimas décadas como una herramienta para visualizar las estructuras moleculares tridimensionales (3D) y así simular, predecir y analizar las propiedades y comportamiento de las moléculas a nivel atómico para el diseño de fármacos *in silico* (Lemke y col., 2008).

Las herramientas computacionales se han convertido en componentes cruciales en diversos proyectos encaminados al descubrimiento de nuevos fármacos, desde la identificación de moléculas “*hit*”, a la optimización de moléculas “*lead*” y más, así como su aprovechamiento para realizar “screenings” virtuales para la búsqueda de ligandos o estructuras con potencial uso en investigación farmacológica. El acoplamiento molecular (*molecular docking*) de pequeñas moléculas en sitios de unión de proteínas es una metodología clave que se comenzó a emplear desde inicios de 1980 y actualmente se utiliza con éxito en el área de la investigación, donde sólo la estructura de un blanco y su sitio activo están disponibles. El acoplamiento de alto rendimiento (*high-throughput docking*) es principalmente utilizado como una herramienta de identificación de compuestos “*hit*” (Kitchen y col., 2004).

El acoplamiento molecular involucra la predicción de la conformación de los ligandos y su orientación dentro del sitio de unión de la proteína blanco. En general, hay dos principales objetivos en los estudios de *docking*: el modelado estructural preciso y la correcta predicción de la afinidad. Además, la identificación de las características moleculares responsables del reconocimiento biológico específico o la predicción de las modificaciones del compuesto que aumentan la potencia son cuestiones complejas que frecuentemente dificultan el entendimiento y la simulación en una computadora. El proceso comienza con la aplicación del algoritmo de *docking* que “coloca” (pose: orientación y conformación de un ligando que encajará en el sitio activo) a las moléculas en el sitio activo; los algoritmos son complementados por funciones de puntaje (Scoring: la posición y clasificación involucran un puntaje, el cual mide cómo encaja un ligando dentro del sitio activo) que son diseñadas para predecir la actividad biológica a través de la evaluación de

las interacciones de los compuestos y sus potenciales blancos. Las funciones de puntaje evalúan la entrada de los compuestos en base a cálculos de forma aproximada de las complementariedades electrostáticas. Los conformeros preseleccionados son frecuentemente promovidos para su evaluación, utilizando esquemas de puntaje más complejos y evaluando con un mayor detalle sus interacciones electrostáticas de Van Der Waals y la inclusión de, al menos, algún efecto por la solvatación o la entropía (Kitchen y col., 2015).

El acoplamiento molecular (*docking*), de manera general, consiste en cuatro pasos:

- a) Preparación de las coordenadas: en este paso se preparan las coordenadas del ligando y del receptor para brindar la información necesaria a los softwares y herramientas de *docking*, las cuales son almacenadas; dicho archivo de coordenadas contiene información como: número de átomos de hidrógeno (formadores de puentes de hidrógeno), cargas parciales, tipos de átomos e información acerca de la flexibilidad de la molécula.
- b) Cálculos por algoritmos: en este paso se requiere de la evaluación rápida de la energía, que se logra precalculando los potenciales de afinidad atómica para cada tipo de molécula de ligando que se encuentra acoplada. En este paso, la proteína se coloca en una especie de cuadrante tridimensional y un átomo sonda se coloca en cada cuadrante. A la energía de interacción de ese único átomo con la proteína se le asigna un punto en el cuadrante. Los cuadrantes de afinidad se calculan para cada tipo de átomo en el ligando, típicamente carbono, oxígeno, nitrógeno o hidrógeno, así como los cuadrantes de potenciales electrostáticos y de solvatación. A continuación, durante el cálculo del algoritmo, se evalúa la energía de una configuración de ligando particular utilizando los valores de los cuadrantes.
- c) Acoplamiento molecular (*docking*): El acoplamiento se realiza utilizando uno de varios métodos de búsqueda. El método más eficiente es un algoritmo

genético lamarckiano (LGA), pero también están disponibles algoritmos genéticos tradicionales. Para sistemas típicos, el *docking* se ejecuta varias veces para dar varias conformaciones acopladas, y el análisis de la energía predicha y la consistencia de los resultados se combinan para identificar la mejor solución.

Análisis de datos: en esta etapa se evalúan y clasifican las conformaciones predichas del ligando, la visualización de las conformaciones y las interacciones entre ligandos y proteínas, así como la visualización de las afinidades potenciales creadas por el algoritmo (Morris y col., 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión es considerada como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECVs) (Forouzanfar et al., 2017), las cuales representan la principal causa de muerte a nivel mundial (WHO, 2018). Aunque existen numerosos fármacos para el tratamiento de la hipertensión, su eficacia es baja, su costo es elevado y presentan efectos adversos graves (Al Disi et al., 2016). Por esta razón, es necesario buscar nuevas moléculas para el desarrollo de fármacos antihipertensivos alternativos con mayor efectividad y menos efectos adversos (Ried y Fakler, 2014). En este sentido, diversos estudios han proporcionado evidencias que indican que el sistema cannabinoide y las vías de señalización por transmisores gaseosos, en particular el NO y el H₂S, juegan un papel crucial en la fisiopatología de las ECVs. Con base en estos hallazgos es evidente que fármacos que activen los receptores a cannabinoides y/o las enzimas que producen transmisores gaseosos (NOS α y CSE) constituyen una alternativa terapéutica novedosa para el tratamiento de este tipo de enfermedades. Por ejemplo, existen reportes que muestran que la activación del sistema endocannabinoide produce hipotensión, estimulando los receptores CB₁ en varias condiciones patológicas (shock, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatías, entre otras). De manera adicional, se ha mostrado que la activación de los receptores a cannabinoides CB₂ en el corazón y la vasculatura inducen un efecto cardioprotector y limitan la inflamación (Pacher y Kunos, 2013). Por otra parte, existe evidencia de que los transmisores gaseosos actúan de manera sinérgica en el mantenimiento del tono vascular, ya que el bloqueo de la producción de NO endógeno o la remoción de endotelio disminuye el efecto vasodilatador producido por H₂S (Nagpure y Bian, 2016).

Los productos naturales constituyen una fuente de estructuras químicas biológicamente relevantes con patrones farmacóforicos que proporcionan una mayor eficacia en la unión de un ligando a un blanco molecular. Por esta razón, estos compuestos se han explorado durante mucho tiempo como fuentes

invaluables para el diseño de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las ECVs (Rodrigues y col., 2016).

Se han encontrado diversas moléculas provenientes de plantas con actividad cannabinomimética, entre las cuales se encuentra el β -cariofileno, un sesquiterpeno presente en la canela y la pimienta negra, que produce efecto antiinflamatorio (Gertsch *et al.*, 2008) y analgésico (Fidyt *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado su efecto vasodilatador. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto vasodilatador del β -cariofileno y determinar la participación de los receptores a cannabinoides y las enzimas eNOS (enzima encargada de la síntesis del NO) y CSE (cistationina- \square -liasa, enzima encargada de la síntesis del H₂S) en su mecanismo de acción. Este compuesto vasodilatador podría constituir un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de ECVs, el cual involucra mecanismos de acción novedosos tales como la activación de receptores a cannabinoides y la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El β -cariofileno produce un efecto vasodilatador que involucra la activación de receptores a cannabinoide y la participación de transmisores gaseosos?

4. HIPÓTESIS

El β -cariofileno relaja la aorta, mediante un mecanismo de acción que involucra la participación de receptores a cannabinoides (CB1, CB2 y eCB) y los transmisores gaseosos (NO y H₂S).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto vasodilatador del β -cariofileno y determinar si su mecanismo de acción involucra la participación de receptores a cannabinoides (CB1, CB2 y eCB) y los transmisores gaseosos (NO y H₂S).

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto vasodilatador del β -cariofileno, mediante el ensayo de aorta aislada de rata.
2. Determinar si el β -cariofileno ejerce su efecto vasodilatador, mediante la activación de los receptores a cannabinoides CB1, CB2 o eCB.
3. Determinar si el β -cariofileno produce su efecto vasodilatador a través de la activación de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}.
4. Proponer un modelo de interacción del β -cariofileno con los receptores CB1, CB2 y eCB y las enzimas que sintetizan transmisores gaseosos (eNOS y CSE), mediante un estudio de acoplamiento molecular.

6. METODOLOGÍA

6.1. Animales en experimentación

Con base en la NOM-062-ZOO-1999, los animales se mantuvieron en jaulas de policarbonato con medidas 54.5x39.5x20.0 cm con tapa de reja metálica con separaciones de 1.5 cm entre cada una. Se utilizó cama sanitaria de aserrín, la cual se cambió tres veces a la semana. Los animales se alojaron en un cuarto bien ventilado a una temperatura de 22 ± 2 °C, bajo un ciclo de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad (luz de 7:00 a.m. a 7 p.m) con un 30 % de humedad. A los animales se les proporcionó alimento (Rodent chow 5001) y agua *Ad libitum*. En total, se utilizaron 30 ratas Wistar macho para el ensayo de aorta aislada de rata. Posteriormente, se contrató un servicio de recolección de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBIs) para el tratamiento y procesamiento de los residuos generados.

6.2. Evaluación del efecto vasodilatador: ensayo de aorta aislada de rata.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, utilizando una guillotina (NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.5.3.3) y se extrajo la aorta torácica quirúrgicamente, la cual se colocó en una caja Petri con solución de Krebs-Henseleit y hielo (4°C). Después, el lumen de la aorta se limpió para prevenir o retirar coágulos sanguíneos. Una vez limpia, se cortaron en anillos de 3-4 mm de longitud y se colocaron entre dos ganchos metálicos, de manera que un extremo de la aorta quedara fijo en la parte inferior de la cámara de ensayo y el otro extremo fijado a un gancho acoplado a un transductor isométrico. Posteriormente, los segmentos de aorta se sumergieron en una cámara con solución de Krebs-Heseleit a 37°C, gasificada con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) y se dejaron equilibrar por 60 minutos bajo una tensión de reposo de 1.5 g. Durante este tiempo se cambió la solución de Krebs cada 10 minutos. Para estimular las células del músculo liso vascular, se contrajeron los tejidos con solución de KCl (100 mM). Una vez que se alcanzó un tono contráctil estable, se realizaron cambios de la solución cada 10 minutos para reestablecer la tensión inicial. Los anillos de aorta se contrajeron con

fenilefrina (1 μ M), cuya respuesta contráctil fue tomada como el 100%. Se construyó una curva concentración respuesta del efecto vasodilatador del β -cariofileno y de la acetilcolina, la cual se utilizó como control positivo. Los cambios en la tensión causados por los compuestos de prueba, adicionados a las cámaras de manera acumulativa en diferentes concentraciones, se detectaron por medio de transductores de fuerza Grass FT03 acoplados a un polígrafo Grass 7D. El porcentaje de vasodilatación se expresó con base en la respuesta contráctil de la fenilefrina (Castro-Ruíz y col., 2017).

6.3. Determinación de la participación de los receptores a cannabinoides CB1, CB2, eCB y de las enzimas eNOS y CSE en el efecto vasodilatador del β -cariofileno.

Para determinar si el efecto vasodilatador del β -cariofileno involucraba la participación de los receptores a cannabinoides y las enzimas que producen los transmisores gaseosos, se realizaron los ensayos de aorta aislada de rata en presencia de inhibidores específicos de los receptores a cannabinoides CB1, CB2 y eCB, y de las enzimas eNOS y CSE. Los inhibidores utilizados para este ensayo fueron: SR141716A (inhibidor del receptor CB1), SR144528 (inhibidor del receptor CB2), O-1918 (inhibidor del receptor eCB), L-NAME (inhibidor de la eNOS) y DL-propargilglicina (PPG, inhibidor de la CSE).

6.4. Estudio de acoplamiento molecular para la elaboración de modelos de interacciones moleculares del β -cariofileno con los receptores CB2, eCB y las enzimas eNOS y CSE.

El estudio de acoplamiento molecular o “docking” permite la elaboración de un modelo de las interacciones moleculares del β -cariofileno con los receptores a cannabinoides (CB2 y eCB) y las enzimas NOSe y CSE.

a) Preparación de las estructuras de los receptores CB2, eCB y de las enzimas eNOS y CSE.

Las estructuras tridimensionales de las enzimas, se obtuvieron de la base de datos UNIPROT (www.uniprot.org), considerando para el estudio las estructuras cristalográficas de las proteínas de humanos. Mientras que las estructuras de los receptores a cannabinoides se obtuvieron, realizando un modelo por homología con ayuda del servidor para la predicción de estructura de proteínas I-TASSER (www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER, Universidad de Michigan).

b) Construcción y preparación del β -cariofileno

Debido a que el ligando es un compuesto derivado de un producto natural, se obtuvo la estructura tridimensional cristalográfica de la base de datos de estructuras químicas PubChem. Posteriormente, esta estructura se preparó con el módulo *Ligand preparation* disponible en el conjunto de programas Maestro, donde se asignaron ordenes de enlace y se calcularon estados de ionización a pH 7.0 ± 0.5 con ayuda del módulo Epik. La estructura molecular de este compuesto se determinó con base en su elucidación estructural por técnicas de NMR en todas sus modalidades ($^1\text{H-NMR}$, DEPT 135° , 90° , COSY, HMQC, HMBC, HSQC, INADEQUATE, etc.), por lo que cada uno de sus átomos y sus centros quirales contaban con la orientación en el espacio correcta.

c) Acoplamiento molecular

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el programa AutoDock (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA) (Forli y col., 2016).

7.5. Análisis estadístico

Se construyeron las curvas concentración respuesta de los compuestos de prueba en ausencia o en presencia de inhibidores específicos en al menos tres ratas diferentes ($n=6$). Todos los valores están expresados como la media \pm SEM (error estándar de la media), los datos obtenidos se analizaron, utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 y se calculó la concentración efectiva media (EC_{50}) y el efecto

máximo (E_{\max}), así como la significancia estadística, mediante la prueba de ANOVA y post-hoc Tukey (Castro-Ruíz y col., 2017).

7. RESULTADOS

7.1. Efecto vasodilatador de β -cariofileno en aorta aislada de rata

El β -cariofileno relajó, de una manera dependiente de la concentración, la aorta de rata precontraída con fenilefrina ($EC_{50} = 75.31 \pm 15.11 \mu\text{g/ml}$ y $E_{\text{max}} = 46.58 \pm 2.15\%$), mientras que la acetilcolina, utilizada como control positivo, produjo un mayor efecto vasodilatador ($EC_{50} = 22.23 \pm 13.67 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 73.23 \pm 4.12\%$). Estos resultados indicaron, por primera vez, que el β -cariofileno presenta un efecto vasodilatador, cuya potencia fue más de tres veces menor que la de la acetilcolina (Figura 12).

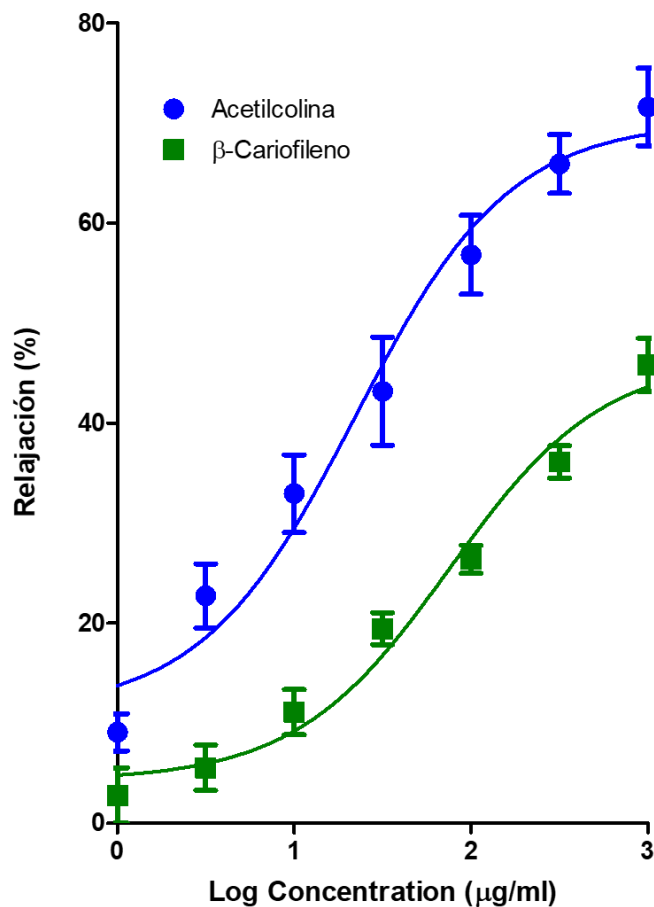


Figura12. Curva concentración respuesta del efecto vasodilatador del β -cariofileno y la acetilcolina, utilizada como control positivo.

7.2. Participación de receptores a cannabinoides en el efecto vasodilatador de β -cariofileno

Para determinar si el efecto vasodilatador producido por el β -cariofileno involucraba la participación de los receptores a cannabinoides, se evaluó el efecto de este compuesto en presencia de inhibidores específicos de los receptores CB1, CB2 y eCB, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata. Los resultados de estos experimentos indicaron que los receptores a cannabinoides CB1 no están involucrados en el efecto vasodilatador producido por el β -cariofileno, ya que la inhibición de estos receptores con rimonabant, no disminuyó su efecto vasodilatador ($EC_{50} = 52.28 \pm 27.31 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 40.00 \pm 5.62\%$). Sin embargo, la inhibición de los receptores a cannabinoides CB2, AM630 ($EC_{50} = 47.03 \pm 10.15 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 15.31 \pm 3.36\%$) o de los receptores a cannabinoides endoteliales eCB, O-1918 ($EC_{50} = 9.36 \pm 6.87 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 14.54 \pm 2.23\%$) desplazaron significativamente la curva concentración respuesta del efecto vasodilatador del β -cariofileno a la derecha, indicando que ambos receptores participan en el efecto vasodilatador de este compuesto (Figura 13).

7.3. Participación de las vías de señalización del NO/cGMP y del H_2S/K_{ATP} en el efecto vasodilatador del β -cariofileno.

Para determinar si las vías del NO/cGMP y del H_2S/K_{ATP} estaban involucradas en el efecto vasodilatador del β -cariofileno, se incubaron anillos de aorta en presencia de L-NAME, un inhibidor de la enzima eNOS y de propargilglicina (PPG), un inhibidor de la enzima CSE, productora del H_2S . Los resultados de estos experimentos indicaron que estas dos vías de señalización participan en el efecto vasodilatador de este compuesto, ya que la inhibición de la eNOS ($EC_{50} = 1289.00 \pm 14.47 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 27.12 \pm 3.24\%$) y de la CSE ($EC_{50} = 2507.00 \pm 4.15 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 33.30 \pm 2.75\%$) redujeron significativamente el efecto vasodilatador del β -cariofileno (Figura 14).

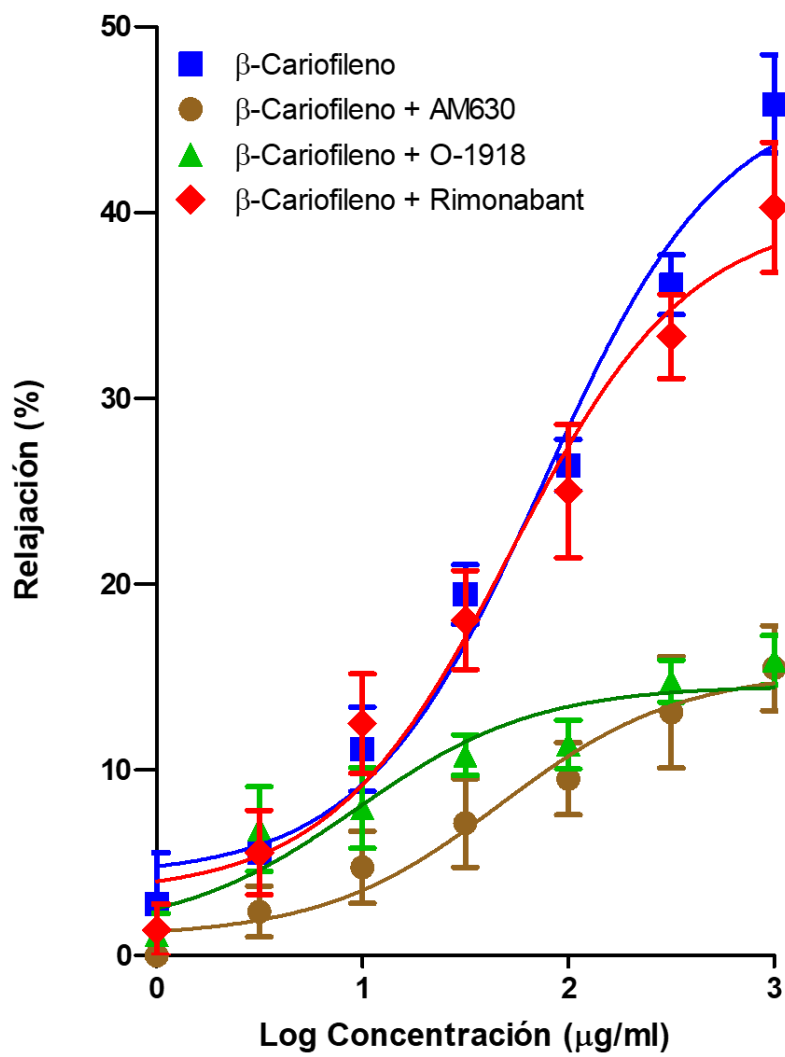


Figura13. Curva concentración-respuesta del β-cariofileno en presencia de inhibidores a receptores cannabinoides: rimonabant, inhibidor de receptores CB1; AM630, inhibidor de receptores CB2 yO-1918, inhibidor del receptor eCB.

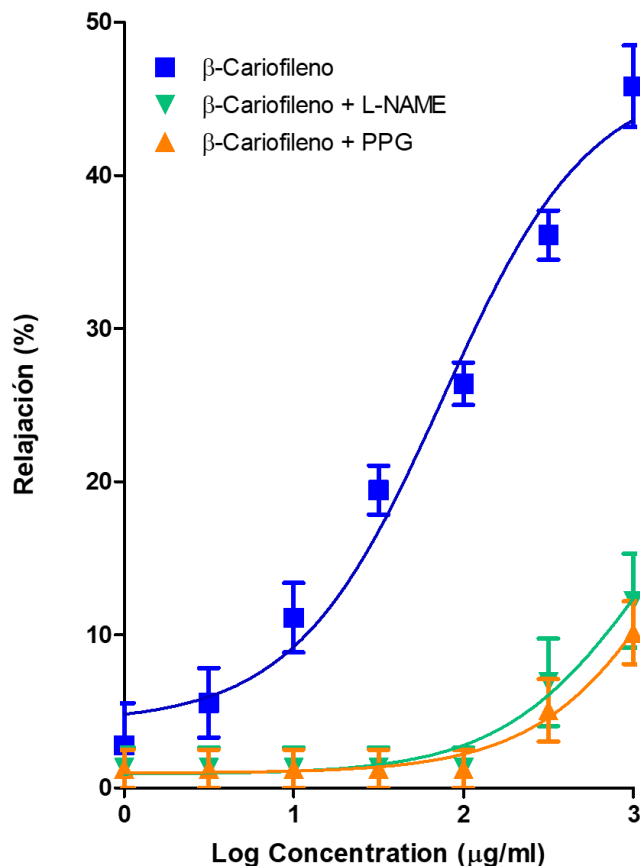


Figura 14. Curva concentración-respuesta del β -cariofileno en ausencia y en presencia de L-NAME (inhibidor de la eNOS) o PPG (inhibidor de la CSE).

7.4. Elaboración de modelos de interacción molecular de β -cariofileno con los receptores a cannabinoides CB1, CB2, eCB y las enzimas eNOS y CSE.

Los resultados obtenidos en los experimentos farmacológicos realizados en este trabajo indicaron que el efecto vasodilatador del β -cariofileno es debido a su interacción con los receptores CB2 y eCB, sin embargo, no se conoce el tipo de interacciones que se presentan entre el receptor y el ligando, así como en qué sitio del receptor se está llevando a cabo la unión para provocar el cambio conformacional que dará como consecuencia su activación.

Asimismo, se sabe que la activación de las vías de señalización del NO/GMPc y del H_2S/K_{ATP} se encuentran involucradas en el efecto vasodilatador del β -

cariofileno, sin embargo, no se sabe si la activación de los receptores a cannabinoides por este compuesto active estas vías bioquímicas o si su activación se deba a la interacción directa del β -cariofileno con las enzimas productoras de los transmisores gaseosos (eNOS y CSE).

Por esta razón, se llevó a cabo la elaboración de modelos de interacción molecular por medio de un estudio de acoplamiento molecular (docking). Se realizó una búsqueda en la base de datos de PubChem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) de la estructura tridimensional del β -cariofileno, asimismo, se realizó la búsqueda de las estructuras cristalográficas tridimensionales de las enzimas eNOS y CSE, así como de los receptores CB2 y eCB en la página UNIPROT (www.uniprot.org). Sin embargo, dado que no se cuenta con una estructura cristalográfica tridimensional de estos receptores, por medio de las secuencias de aminoácidos (UNIPROT) de los receptores, obtenida de células humanas, se realizó un modelo por homología con ayuda del servidor para la predicción de estructura de proteínas I-TASSER (www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER, Universidad de Michigan). Una vez obtenidas las estructuras, se realizó la preparación de las moléculas con el software Maestro 11.0 (Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016).

Para la realización de este estudio de acoplamiento molecular se empleó el software Autodock 4 (The Scripps Research, La Jolla, California, USA) y de acuerdo al protocolo de Forli y col., 2016 se procedió a la preparación de las conformaciones del ligando y de la grid box (área de la proteína donde se realizará el acoplamiento con el ligando). Una vez terminada la grid box, se llevó a cabo el estudio de acoplamiento molecular, el cual, una vez finalizado, se analizaron los datos obtenidos en los softwares Autodock 4 y Maestro 11.0.

En la figura 15 se muestran los modelos de interacción molecular del β -cariofileno con el receptor CB2, donde se observa su interacción con los aminoácidos localizados en el sitio de unión a ligando. De acuerdo al código de colores del software Maestro, los aminoácidos cargados negativamente se representan con el color rojo, los aminoácidos cargados positivamente en color morado, los

aminoácidos polares en azul y los aminoácidos hidrofóbicos en verde. Como resultado, podemos ver que las interacciones que prevalecen entre ligando y receptor son del tipo hidrofóbicas, sin embargo, podemos ver que existe la proximidad de una cisteína (Cys179), lo que podría ocasionar a nivel de interacción, una posible reacción entre el doble enlace de la molécula con el grupo tiol (-SH), produciendo un enlace irreversible entre el β -cariofileno y el receptor y como consecuencia, un efecto más duradero.

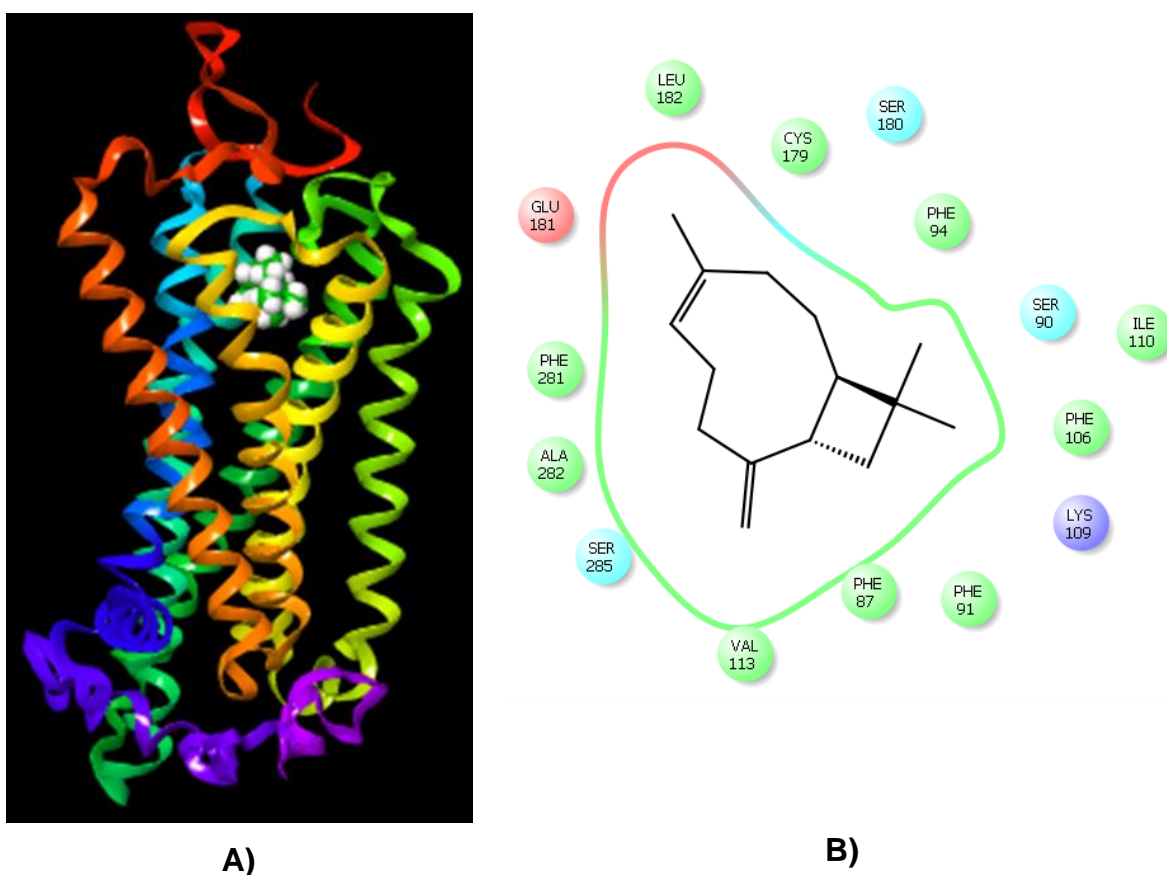


Figura 15. Modelo de interacción del β -cariofileno y el receptor CB2. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y el receptor CB2 y B) Diagrama de interacción molecular entre β -cariofileno y el receptor CB2.

Actualmente, no se conoce la identidad del receptor eCB, pero existen evidencias que indican que podría pertenecer a la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), en particular los receptores GPR18 o GPR55 (De Petrocellis

y Di Marzo, 2010; Bondarenko, 2014). Por esta razón, se realizaron modelos de interacción del β -cariofileno con ambos receptores. En la figura 16 se observa la interacción entre el β -cariofileno y el receptor GPR18, donde las uniones son en su mayoría del tipo hidrofóbicas, las cuales son características de este sesquiterpeno.

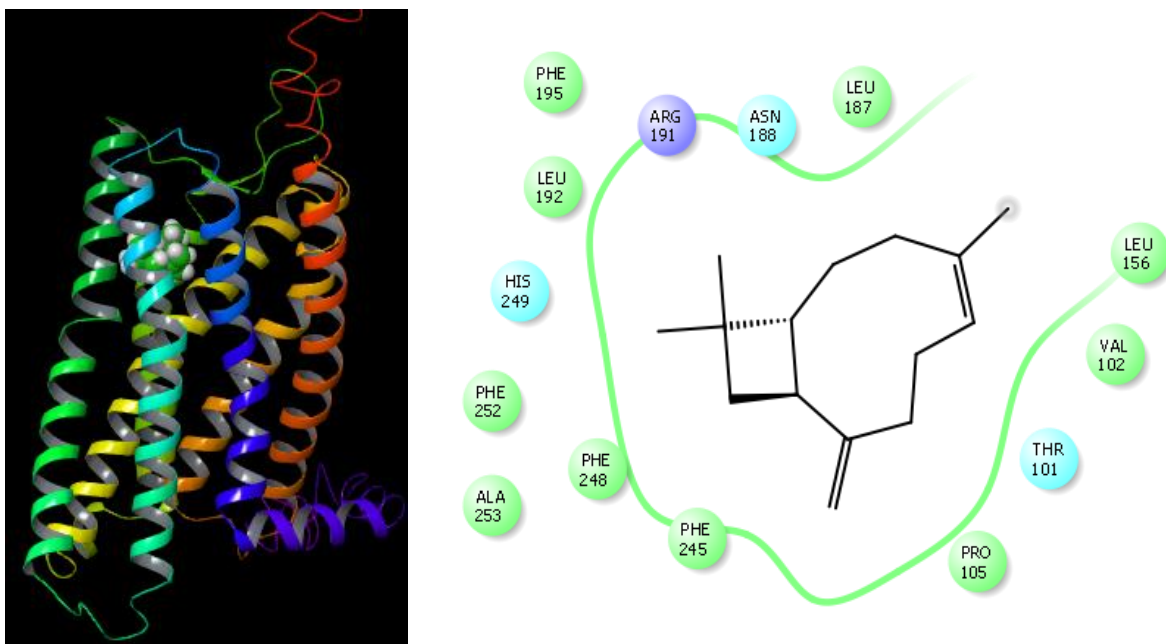
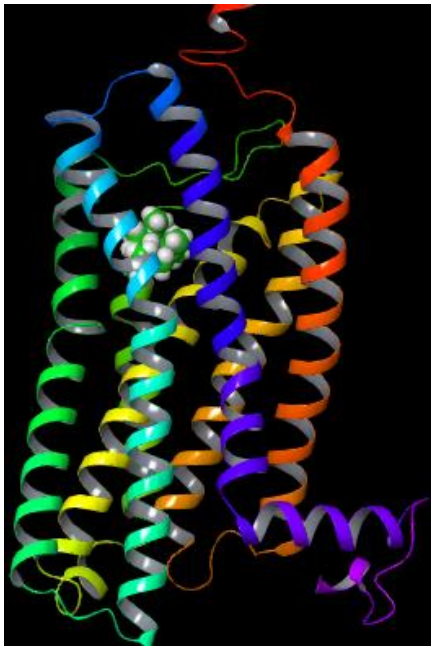
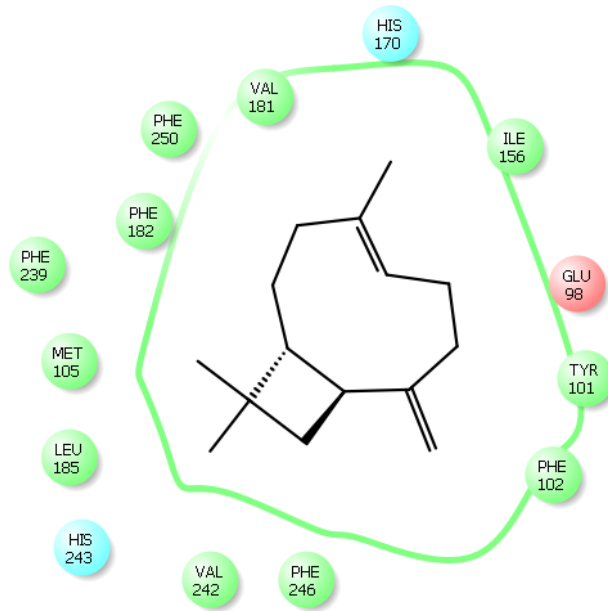


Figura16. Modelo de interacción del β -cariofileno y el receptor GPR18. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y el receptor GPR18 y B) Diagrama de interacción molecular entre el β -cariofileno y el receptor GPR18.

En la figura 17, se ilustran las interacciones entre el β -cariofileno y el receptor GPR55. Es evidente que las interacciones predominantes son del tipo hidrofóbicas, sin embargo, se encuentran próximas a este compuesto dos aminoácidos polares (His170 e His243) y uno cargado negativamente (Glu98), lo que permite un mayor número de interacciones que estabilizan la posición del β -cariofileno en el receptor GPR55.



A)



B)

Figura17. Modelo de interacción del β -cariofileno y el receptor GPR55. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y el receptor GPR55 y B) Diagrama de interacción molecular entre el β -cariofileno y el receptor GPR55.

El diagrama de interacción del β -cariofileno con la enzima CSE muestra que la mayoría de sus interacciones son del tipo hidrofóbicas, pero algunas de ellas se realizan con aminoácidos polares (Gln299, His297, Gln164 y Thr163), así como con aminoácidos cargados (Lys165 y Lys288) (Figura 18). Este resultado sugiere que existe una interacción directa del β -cariofileno con la enzima CSE, que podría incrementar la actividad enzimática de la CSE.

Por otra parte, no se logró obtener un diagrama de interacción del β -cariofileno y la enzima eNOS, debido a que se trabajó con un modelo de la proteína incompleto y no hubo interacción con esa parte de la enzima. Sin embargo, no se descarta la

posibilidad de una interacción molecular del β -cariofileno con la otra parte de la enzima no presente en el modelo que se utilizó en este trabajo.

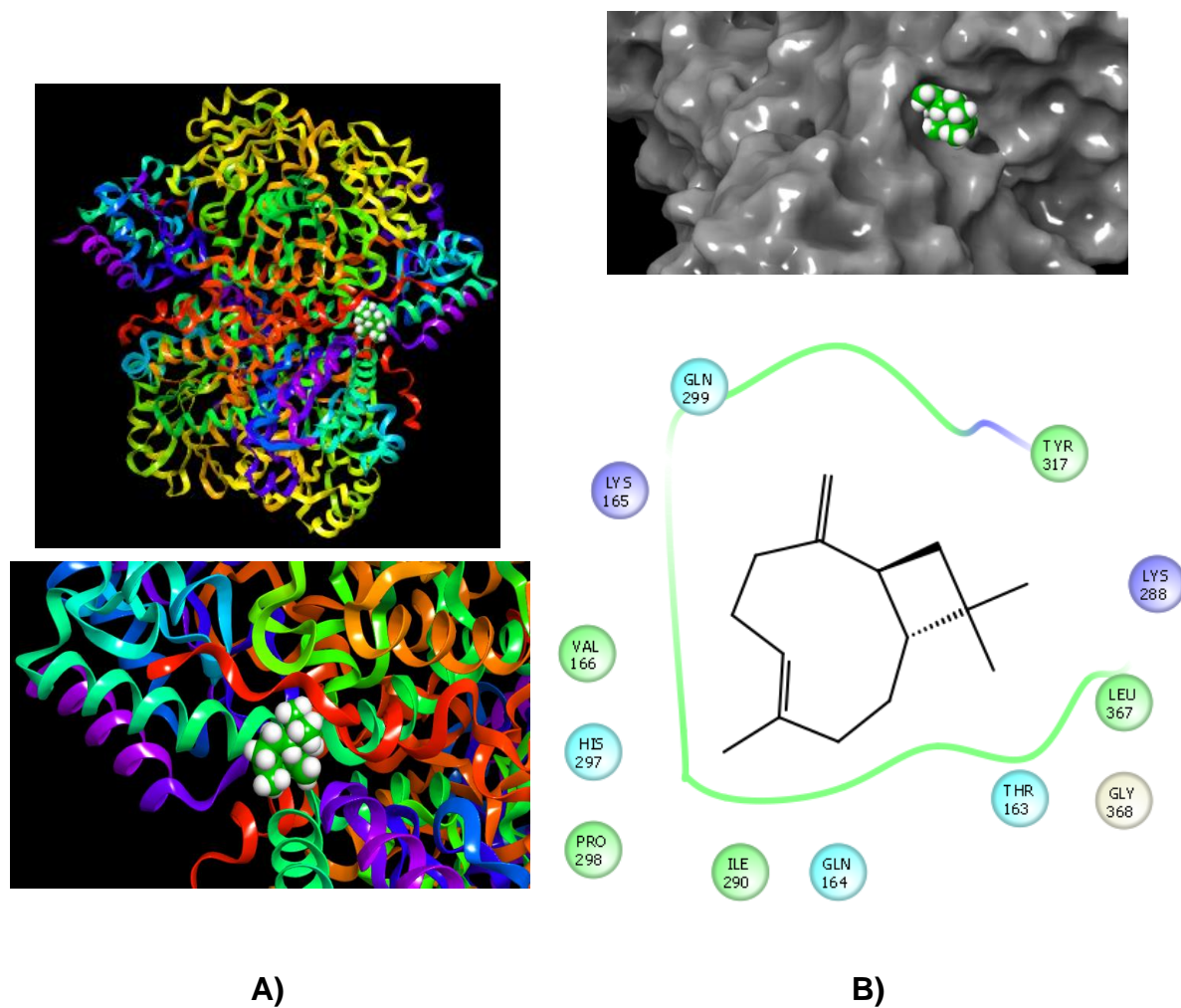


Figura18. Modelo de interacción del β -cariofileno y la enzima CSE. A) Modelo tridimensional de la interacción del β -cariofileno y la enzima CSE y B) Diagrama de interacción molecular entre el β -cariofileno y la enzima CSE.

8. DISCUSIÓN

Los cannabinoides ejercen diversos efectos biológicos, incluyendo efectos vasodilatadores (Maccarrone *et al.*, 2015). En la actualidad, existe controversia con relación a los mecanismos propuestos para explicar el efecto vasodilatador de los cannabinoides (Sánchez-Pastor y col., 2014). Hay estudios que sugieren que los efectos son mediados por los receptores CB1 o CB2 (Stanley y col., 2015) y otros sugieren la existencia de un receptor cannabinoide endotelial (McCollum y col., 2007a y b; Bondarenko, 2014). Estas diferencias son debidas principalmente a los distintos modelos animales en los que se han realizado las evaluaciones, los tejidos utilizados, así como los compuestos de prueba (Maccarrone y col., 2015).

En el presente estudio, se evaluó el efecto vasodilatador del β -cariofileno, un agonista del receptor a cannabinoides CB2, que ejerce efectos antiinflamatorios (Gertsch y col., 2008), analgésicos (Fidyt y col., 2016) y neuroprotectores (Cheng y col., 2014). Sin embargo, hasta ahora no se había determinado si este compuesto presentaba también un efecto vasodilatador. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron, por primera vez, que el β -cariofileno es capaz de relajar, de una manera dependiente de la concentración, la aorta torácica de rata. Este compuesto relajo la aorta con una potencia 3 veces menor que la de la acetilcolina, utilizada como control positivo. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios en los que se observó que la anandamida (AEA), un endocannabinoide, produce un efecto vasodilatador, el cual es mediado por la activación de receptores a cannabinoides (Stanley y col., 2016; López-Dyck y col., 2017).

En este estudio se determinó que la actividad vasodilatadora producida por el β -cariofileno es causada por la activación de los receptores a cannabinoides, en específico el CB2 y el eCB. Asimismo, se mostró también que los receptores CB1 no participan en la relajación arterial producida por este compuesto. López-Dyck y col. (2017) obtuvieron resultados similares al evaluar el efecto vasodilatador del

compuesto JWH-133 (análogo sintético de THC), el cual presentó un efecto vasodilatador, que involucra la activación de receptores CB2 (López-Dyck y col., 2017). En un estudio realizado por McCollum y col. (2007b) en aorta de conejo deficiente de receptores CB1 y CB2, se evaluó el efecto vasodilatador de la AEA y se determinó que este efecto es causado por la presencia de un receptor a cannabinoides alternativo, el cual se denominó no-CB1 y no-CB2 o eCB. Este nuevo receptor está acoplado a una proteína G, la cual induce la activación de la vía de señalización IP3K/Akt, la fosforilación de eNOS y la producción de NO (McCollum y col., 2007b).

El mecanismo de acción de diversos cannabinoides como la AEA y el cannabidiol se han vinculado a la vía de señalización del NO (Stanley y col., 2015; López-Dyck y col., 2017), un gasotransmisor con actividad vasodilatadora que se produce a partir de la activación de la enzima eNOS localizada en el endotelio. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado que el efecto vasodilatador de cannabinoides este asociado a la vía de señalización del H₂S/K_{ATP}, por lo que es de suma importancia determinar si estas dos vías participan en el mecanismo vasodilatador producido por el β-carbocariofileno. En la presente tesis, se determinó que el efecto vasodilatador de este compuesto depende de la activación de las vías de señalización del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP}. Este resultado constituye la primera evidencia que indica la participación del H₂S en el efecto vasodilatador de un cannabinomimético y abre la posibilidad de determinar las distintas vías de señalización que participan en la modulación del tono vascular producida por la activación de receptores a cannabinoides.

Considerando que nuestros experimentos farmacológicos indicaban la participación de los receptores a cannabinoides CB2 y eCB y de las vías del NO/GMPc y del H₂S/K_{ATP} en el efecto vasodilatador producido por el β-carbocariofileno, era altamente probable que este compuesto interaccionara con estos receptores y las enzimas que producen los transmisores gaseosos: la NOS, productora del NO y la CSE, productora del H₂S. Por esta razón, se elaboraron modelos de

interacción molecular para determinar si existía una interacción directa del β -cariofileno con los blancos moleculares anteriormente mencionados. Nuestros resultados *in silico* mostraron que este compuesto se une con alta afinidad a los receptores a cannabinoides CB2 y eCB y a la enzima CSE, productora de H₂S, en su mayoría, mediante interacciones hidrofóbicas, lo que corresponde para una molécula altamente lipofílica como lo es este sesquiterpeno. Este tipo de unión puede representar una ventaja para moléculas rígidas como el β -cariofileno, ya que puede provocar un cambio conformacional estable en su blanco molecular, que active por periodos más largos a estos receptores o a esta enzima.

En el diagrama de interacción del receptor CB2, se pudo apreciar la proximidad de una cisteína al sitio de unión del β -cariofileno. Esta interacción resulta de interés, ya que se podría llevar a cabo una reacción entre el grupo tiol de la cisteína y alguno de los dobles enlaces de la molécula en condiciones fisiológicas, formando un enlace covalente que provoque la estimulación permanente del receptor.

Por otra parte, el modelo de interacción del β -cariofileno y la CSE sugiere que este compuesto no se une a un sitio cercano a la región catalítica de la enzima, lo cual garantiza que esta unión no interfiere directamente con su cinética enzimática, pero si puede inducir un cambio conformacional en la enzima que incremente los niveles de H₂S. Con relación a la enzima eNOS, no se logró obtener un diagrama de interacción de esta enzima con el β -cariofileno, ya que este compuesto no se unió con alta afinidad a ningún sitio localizado en la región oxidasa de la enzima. Sin embargo, no se descarta la interacción directa del β -cariofileno a un sitio localizado en la región reductasa de la eNOS, la cual se encuentra en proceso de elaboración, debido a su complejidad estructural.

9. CONCLUSIÓN

-El β -cariofileno relaja la aorta de rata, de una manera dependiente de la concentración.

-El efecto vasodilatador del β -cariofileno involucra la participación de los receptores CB2 y eCB, así como las vías de señalización del NO/GMPc y H₂S/K_{ATP}.

-El β -cariofileno interactúa de manera directa, de acuerdo a nuestros estudios *in silico*, con los receptores CB2, eCB y con la enzima CSE (enzima encargada de la síntesis del H₂S).

-El β -cariofileno no interactúa de manera directa con la región oxidasa de la eNOS (enzima encargada de la síntesis del NO), como lo sugieren nuestros resultados de acoplamiento molecular. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que este compuesto se una con alta afinidad a algún sitio localizado en la región reductasa de la enzima.

10. REFERENCIAS

Al Disi, S. S., Anwar, M. A., Eid, A. H. Anti-hypertensive Herbs and their Mechanisms of Action: Part I. *Front Pharmacol*, (2016); 6:323.

Bondarenko, A. I. Endothelial atypical cannabinoid receptor: Do we have enough evidence? *Br J Pharmacol*, (2014); 171(24), 5573–5588.

Castro-Ruíz, L., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F., Rivero-Cruz, F., García-Gasca, T., Ibarra-Alvarado, C. Affinin (Spilanthol), isolated from *Heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *Int J Mol Sci*, (2017); 18: 1-15.

Cheng, Y., Dong, Z. y Liu, S. β -caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. *Pharmacol*, (2014); 94(1–2), pp. 1–12.

Cirino, G., Vellecco, V., Bucci, M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. *Br J Pharmacol*, (2017); 174(22), 4021-4031.

Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gerö, D., Sharina, I., Martin, E., Szabo, C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Nat Acad Sci USA*, (2012) 109: 9161–9166.

Colín-Ramírez, E., Rivera-Mancía, S., Infante-Vázquez, O., Cartas-Rosado, R., Vargas-Barrón, J., Madero, M., Vallejo, M. Protocol for a prospective longitudinal study of risk factors for hypertension incidence in a Mexico City population: the Tlalpan 2020 cohort. *BMJ Open*, (2017); 7(7).

De Petrocellis, L. y Di Marzo, V. Non-CB1, Non-CB2 receptors for

endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: Focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroim Pharmacol*, (2010); 5(1), 103–121.

Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat rev drug discov*, (2004); 3: 771-784.

Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat rev drug discov*, (2008); 7: 438-455.

Di Marzo, V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res*, (2009); 60(2), 77–84.

Di Marzo, V., Bifulco, M. y De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat rev drug discov*, (2004); 3(9), 771–784.

Di Marzo, V. y De Petrocellis, L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Biolog Sci*, (2012); 367(1607), 3216–3228.

Fidyt, K., Fiedorowicz, A., L. y Szumny, A. β -Caryophyllene and Caryophyllene Oxide: Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties. *Cancer Medicine*, (2016); 5(10), 3007–3017.

Fleg, J., Aronow, W., Frishman, W. Cardiovascular drug therapy in the elderly: benefits and challenges. *Nat Rev Cardiol*, (2011); 8: 13-28.

Fonseca, B., Costa, M., Alamda, M., Correida-da-Silva G, Teixeira N. Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. *Prostag oth lipid m*, (2013); 13-30.

Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S. y Olson, A. J. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protocol*, (2016); 11, p. 905.

Forouzanfar, M. H. *et al.* Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. *JAMA*, (2017); 317(2): 165-182.

Fox S. Fisiología Humana. Editorial McGraw Hill. De: Fisiología, (2014); 13ª edición: 178-182.

Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., Altmann, K.-H., Karsak, M. y Zimmer, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *PNAS*, (2008); 105(26), pp. 9099–9104.

Gertsch, J., Pertwee, R. G. y Di Marzo, V. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - Do they exist? *Br J of Pharmacol*, (2010); 160(3), pp. 523–529.

Ho, V., Hiley, R. Endothelium-independent relaxation to cannabinoids in rat isolated mesenteric artery and role of Ca²⁺ influx. *Br J of Pharmacol*, (2003); 139: 585-597.

Ho, W. S. V., Kelly, M. E. M. Cannabinoids in the Cardiovascular System. *Adv Pharmacol*, (2017); 80:329-366.

Hua, T., Vemuri, K., Pu, M., Qu, L., Won-Ha, G., Wu, Y., Zhao, S., Shui, W., Li, S., Korde, A., Laprairie, R., Stahl, E., Ho, J., Zvonok, N., Zhou, H., Kufareva, I., Wu, B., Zhao, Q., Hanson, M., Bohn, L., Makriyannis, A., Steve, R., Liu, Z. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*, (2016); 167: 750-762

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2016). Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107>.

Jespersen, B., Tykocki, N., Watts, S., Cobbett, P. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath applications to pharmacology research. *J Vis Exp*, (2015); 95: 1-9.

Kitchen, D., Decornez, H., Furr., J., Bajorath, J. Docking and scoring virtual screening for drug Discovery: methods and applications. *Nature*, (2004); 3: 935-940.

Lemke, T., Williams, D., Roche, V., Zito, W. Foye's Principle of Medicinal Chemistry. Sixth edition, Wolters Klumer. De: Química Medicinal, (2008); 54-56.

Leong, X., Ng, C., Jaarin, K. Animal models in cardiovascular research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int*, (2015); 1-11.

López-Dyck, E., Andrade-Urzúa, F., Elizalde, A., Ferrer-Villada, T., Dagnino-Acosta, A., Huerta, M., Osuna-Calleros, Z., Rangel-Sandoval, C. y Sánchez-Pastor, E. ACPA and JWH-133 modulate the vascular tone of superior mesenteric arteries through cannabinoid receptors, BK_{Ca} channels, and nitric oxide dependent mechanisms. *Pharmacol Rep*, (2017); 69(6), 1131–1139.

Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., Konje, J. C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A. y Zimmer, A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacol Sci*, (2015); 36(5), 277–296.

McCollum, L., Howlett, A. C., Mukhopadhyay, S. y Carolina, N. Anandamide-Mediated CB1 / CB2 Cannabinoid Receptor- Independent Nitric Oxide Production in Rabbit Aortic Endothelial Cells. *Pharmacol*, (2007a); 321(3), 930–937.

McCollum, L., Howlett, A. C., Mukhopadhyay, S. y Carolina, N. Anandamide-Mediated CB1 / CB2 Cannabinoid Receptor- Independent Nitric Oxide Production in Rabbit Aortic Endothelial Cells. *Pharmacol*, (2007b); 321(3), 930–937.

Medeiros, D., Silva-Gonçalves, L., Brito da Silva, A., dos Santos, M., Arcisio-Miranda, M. Membrane-mediated action of the endocannabinoid anandamide on membrane proteins: implications for understanding the receptor-independent mechanism. *Sci Rep*, (2017); 1-9.

Morris, G., Goodsell, D., Pique, M., Lindstrom, W., Huey, R., Forli, S., Hart, W., Halliday, S., Bellew, R., Olson., A. Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors: User Guide. AutoDock 4, (2012); 12-24.

Montecucco, F. y Di Marzo, V. At the heart of the matter: The endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. *Trends in Pharmacol Sci*, (2012); 33(6), 331–340.

Nagpure, B. V. y Bian, J.-S. Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *Ox Med and Cell Long*, (2016); 1–16.

Newman, D., Cragg, G. Natural Products as sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, (2016); 79: 629-661.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. DOF: 22/08/2001, www.dof.gob.mx.

Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G. Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, (2005); 168: 599-625.

Pacher, P. y Kunos, G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease - Successes and failures. *FEBS Journal*, (2013); 280(9), 1918–1943.

Ried, K., Fakler, P. Potential of garlic (*Allium sativum*) in lowering high blood pressure: mechanisms of action and clinical relevance. *Integr Blood Press Control*, (2014); 7:71-82.

Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G. Counting on natural products for drug desing. *Nat Chem*, (2016); 1-11.

Rodríguez-De Fonseca, F., Del Arco, I., Bermúdez-Silva, F., Bilbao, A., Cippitelli, A., Navarro, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcoh and Alcoholism*, (2005); 40: 2-14.

Rosas-Peralta, M., Palomo-Piñón, S., Borrayo-Sánchez, G., Madrid-Miller, A., Almeida-Gutiérrez, E., Galván-Osegura, H., Magaña-Serrano, J., Saturno-Chiu, G., Ramírez-Arias, E., Santos-Martínez, E., Díaz-Díaz, E., Salgado-Pastor, J., Morales-Mora, G., Molina-Concebida, L., Mejía-Rodríguez, O., Pérez-Ruíz, C., Chapa-Mejía, L., Álvarez-Aguilar, C., Pérez-Rodríguez, G., Castro-Martínez, M., López-Bárcena, J., Paniagua-Sierra, R. Consenso de Hipertensión arterial sistémica en México. *Rev Med Inst Seguro Soc*, (2016); 54: S6-S51.

Sánchez-Pastor, E., Andrade, F., Sánchez-Pastor, J. M., Elizalde, A., Huerta, M., Virgen-Ortiz, A., Trujillo, X. y Rodríguez-Hernández, A. Cannabinoid receptor type 1 activation by arachidonylcyclopropylamide in rat aortic rings causes vasorelaxation involving calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 and calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit. *Europ J Pharmacol*, (2014); 729(1), 100–106.

Sena, C. M., Pereira, A. M. y Seíça, R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Mol Basis of Dis*, (2013); 1832(12), 2216–2231.

Sharma, C., Sadek, B., Goyal, S., Sinha, S., Kamal, M., Ojha, S. Small molecules from nature targeting G-protein coupled cannabinoid receptors: potential leads from drug discovery and development. *Biomed Res Int*, (2015);1-26.

Stanley, C. P., Hind, W. H., Tufarelli, C. y O'Sullivan, S. E. Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB1 activation. *Cardiovasc Res*, (2015); 107(4), 568–578.

Stanley, C. P., Hind, W. H., Tufarelli, C. y O'Sullivan, S. E. The endocannabinoid anandamide causes endothelium-dependent vasorelaxation in human mesenteric arteries. *Pharmacol Res*, (2016); 113, 356–363.

Sviženská, I., Dubový, P., Šulcova, A. Cannabinoid receptors 1 and 2, (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharma, Biochem and behav*, (2008); 90: 501-511.

Van Goor, H., Van den Born, J. C., Hillebrands, J.-L. y Joles, J. A. Hydrogen sulfide in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hy*, (2016); 25(2), 107–13.

Wang, R., Szabo, C., Ichinose, F., Ahmed, A., Whiteman, M., Papapetropoulos, A. The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction. *Cell*, (2015); 36: 568-578.

WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (revisado 06/08/2018).

Yannoutsos, A., Levy, B., Safar, M., Slama. G., Blacher, J. Pathophysiology of hypertension: interaction between macro y microvascular alterations through endothelial dysfunction. *J Hypertens*, (2014); 32: 216-224.

Yates, M., Barker, E. Inactivation and Biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol*, (2009); 76: 11-17.

11. APÉNDICE

Tabla 17. Acrónimos.

CB1	Receptor a cannabinoides tipo 1	SNP	Sistema nervioso periférico
		THC	Δ^6 - Tetrahidrocannabinol
CB2	Receptor a cannabinoides tipo 2	cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
		cGMP	Guanosil monofosfato cíclico
eCB	Receptor a cannabinoide endotelial	NO	Óxido nítrico
		H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
AEA	Anandamida	eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
2-AG	2-Araquidonilglicerol	CSE	Cistationina γ -liasa
SNC	Sistema nervioso central	PAG	Área gris periacueductal
		DRG	Ganglio de la raíz dorsal