



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

TESIS

ESTUDIOS *IN SILICO* DE LA INTERACCIÓN DEL CANNABIDIOL
CON LAS ENZIMAS COX-1 Y COX-2

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:
ISAAC RAFAEL RAMÍREZ RIVERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. ILHUICAMINA DANIEL LIMÓN PÉREZ DE LEÓN
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA

CODIRECTOR DE TESIS:
DR. ELIUD MORALES DÁVILA
LABORATORIO DE BIOFÍSICA COMPUTACIONAL DE MACROMOLÉCULAS

PUEBLA, PUE. MARZO 2026

“Deja de estudiar farmacología un día y lo notarás tú, deja de estudiarla dos días y lo notará tu profesor, deja de estudiarla tres días y lo notarán tus pacientes”



Analogía de Jimmy Page

Dedicatoria

A mi madre Olivia Rivera Hidalgo por ser la mayor motivación para no rendirme y seguir alentándome para seguir adelante, a mi abuelita Ernestina Hidalgo Ríos, quien ser más que mi abuelita es una segunda madre para mí, y una motivadora para poder lograr salir adelante, a todos aquellos que creyeron en mí.

Agradecimientos

Agradezco a mis asesores el Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León y al Dr. Eliud Morales Dávila por el apoyo y guía, además de la paciencia durante la realización de la tesis.

Agradezco al Laboratorio de Biofísica Computacional de Macromoléculas por los recursos computacionales asignados, principalmente al Dr. José Manuel Pérez Aguilar y al M.C Mario Fernando.

Agradezco a mis sinodales la dedicación que prestaron al revisar el presente trabajo.

Agradezco a los miembros del Laboratorio de Neurofarmacología por el apoyo en cada uno de los seminarios realizados, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo de tesis, a los que ya no están en el laboratorio: mi buen amigo Jonathan, Fernanda, Nancy, Rubí, Leonardo, José María, Alondra, Jovana y Francisco, a los que aún continúan en el laboratorio: Mariana, Elizabeth, Dulce, Edgar, Steven, Tamara, Carolina, Enoc, Ángel, Jessica, Montserrat, a los doctores Felipe y Aleidy, por la manera de mostrar su conocimiento mediante los seminarios, que sin sus comentarios esto no hubiera sido un trabajo de tesis, además de sus comentarios en cada uno de los carteles presentados. Además, a la maestra Tere Pacheco, por ser guía y tenerme paciencia en cada una de las clases impartidas.

Contenido

Lista de figuras	vi
Listado de tablas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	5
1.1 Ciclooxigenasas (COXs).....	5
1.2 Inflamación	9
1.3 Ligantes que interactúan con las ciclooxigenasas (COXs)	10
1.3.1 Ácido araquidónico (AA).....	12
1.3.2 AINEs.....	14
1.3.3 Cinética de los AINEs	17
1.3.4 Cannabinoides	18
1.4 Métodos computacionales.....	22
1.5 Análisis de secuencias lineales de aminoácidos y estructuras tridimensionales de las COXs.....	22
1.6 Predicción de estructuras tridimensionales de proteínas	24
1.7 Métodos de validación para modelos proteicos.....	26
1.8 Acoplamiento molecular.....	28
2. Justificación	31
2.1 Hipótesis	32
2.2 Objetivo general.....	33
2.3 Objetivos particulares	33
2.4 Metodología	34
3. Resultados y discusión.....	36
4. Conclusiones.....	51

5. Perspectivas	52
Bibliografía	53

Lista de figuras

Figura 1. Estructuras tridimensionales de (A) COX-1 y (B) COX-2.	5
Figura 2. A) Sitios catalíticos de las enzimas COX-1 y COX-2, B) interacción entre los AINEs y las COX	7
Figura 3. Estructura química del (A) ácido araquidónico y (B) anandamida.	9
Figura 4. Ruta biosintética de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.	13
Figura 5. Clasificación de los AINEs	15
Figura 6. Blancos terapéuticos reportados del cannabidiol (CBD)	20
Figura 7. Vías de síntesis de endocannabinoides.	22
Figura 8. Representación de los métodos de predicción.	26
Figura 9. Representación gráfica de los ángulos diedros ϕ (<i>phi</i>) y ψ (<i>psi</i>).	28
Figura 10. Representación del diagrama de Ramachandran..	29
Figura 11. Representación gráfica del acoplamiento molecular.	30
Figura 12. Alineamiento de las secuencias de la ciclooxigenasa 1 y la ciclooxigenasa 2 de la especie <i>Homo sapiens</i> (hCOX-1 y hCOX-2)	35
Figura 13. Alineamiento de las secuencias de la (A) ciclooxigenasa 1 y la (B) ciclooxigenasa 2	35
Figura 14. Ejemplo de los valores de fiabilidad dados por el servidor <i>AlphaFold</i> para los modelos de mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2..	37
Figura 15. Diagramas de Ramachandran calculados para los modelos de A) mCOX-1, B) rCOX-1 y C) rCOX-2.	37
Figura 16. Vista superior de las estructuras tridimensionales de hCOX-1(PDB: 6Y3C), hCOX-2 (PDB: 5F1A), mCOX-1 (Modelo), mCOX-2 (PDB: 3HS5), rCOX-1 (Modelo) y rCOX-2 (Modelo).	38
Figura 17. Ligantes utilizados en el acoplamiento molecular con la COX-1 y COX-2.	39
Figura 18. Ejemplo de la caja de búsqueda (<i>grid box</i>) para realizar acoplamientos moleculares ciegos.	40
Figura 19. Ejemplo de la caja de búsqueda (<i>grid box</i>) para realizar acoplamientos moleculares en los canales hidrofóbicos de las COX.	41
Figura 20. Comparación de los resultados de los AINEs representados en <i>licorice</i>	42

Figura 21. Representación de los sitios donde interactúa el cannabidiol (CBD)	43
Figura 22. Vista lateral de la estructura representativa de la ciclooxigenasa (COX)	45
Figura 23. Vista lateral de la estructura representativa de la ciclooxigenasa (COX). El cannabidiol (CBD) se representa en <i>licorice</i> color rosa fuerte..	45
Figura 24. Vista superior de la estructura representativa de la ciclooxigenasa (COX)..	46

Listado de tablas

Tabla 1. Características de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2).	7
Tabla 2. Ligantes seleccionados para realizar acoplamiento molecular con las enzimas COX-1 y COX-2 para las especies <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> y <i>Rattus norvegicus</i> .	12

Lista de abreviaturas

2-AG: 2-araquidonil glicerol

5HTA1: receptor de serotonina

AA: ácido araquidónico

AEA: anandamida

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ASA: ácido acetilsalicílico

CBe: receptor cannabinoide endotelial

COX: ciclooxigenasa

DAGL: diacilglicerol lipasa

ECb: endocannabinoides

FAAH: hidrolasa de amidas de ácidos grasos

GPR55: receptor huérfano acoplado a proteínas G 55

Il-1: interleucina 1

INF- γ : interferón gama

LBT4: leucotrieno b4

LOX: lipooxigenasa

MAGL: monoacilglicerol lipasa

MBD: dominio de unión a la membrana

MIP: proteínas inflamatorias de los macrófagos

NarPE: *n*-araquidonil fosfatidiletanolamina

NAT: *n*-acetiltransferasa

NF- κ B: factor nuclear kappa B

PGE2: prostaglandinas

PGHS: sintasa de endoperóxido de prostaglandina H

PGI2: prostaciclina

PMN: polimorfonucleares

PPAR- γ : receptor activado por proliferación de peroxisoma γ

RCB: receptor cannabinoide

ROS: especies reactivas de oxígeno

SEC: sistema endocannabinoide

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TRPV1: receptores de potenciales transitorios subtipo vanilloide tipo 1

TxA₂: tromboxano a₂

Introducción

Las COX, o ciclooxigenasas, son enzimas que se encargan de producir las prostaglandinas, compuestos importantes en procesos como la inflamación y el dolor. Estas enzimas funcionan al oxigenar un sustrato natural llamado ácido araquidónico. Las COX están formadas por homodímeros, es decir, dos monómeros iguales que están estrechamente unidos. Cada monómero tiene funciones específicas: uno actúa en el proceso catalítico (oxigenación del ácido araquidónico), mientras que el otro tiene un papel alostérico que regula la actividad del primero. La interacción entre estos monómeros permite que la enzima funcione correctamente. La actividad de las enzimas COX puede ser modulada por otros ácidos grasos, como el ácido palmítico, que no son sustratos directos, sino que influyen en la regulación de la enzima. Los medicamentos conocidos como AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) pueden inhibir esta actividad. En el caso de la COX-2, lo hace en un modo muy específico cuando el inhibidor se une a ambos monómeros del homodímero, se produce una inhibición selectiva. Esto significa que la inhibición afecta la producción de ciertos compuestos, como los endocannabinoides, sin bloquear completamente la producción del ácido araquidónico (Orlando & Malkowski, 2016).

En particular las prostaglandinas (PG) son importantes en el proceso inflamatorio y su producción es catalizada por la ciclooxigenasa (COX). Los principales objetivos de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son las enzimas COX, además de ser uno de los tipos de fármacos más recetados a nivel global, actualmente existe una aceptación general de que los AINEs ejercen sus efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos al inhibir en diferentes grados a COX-1 y COX-2 (Cosentino *et al.*, 2023). Sin embargo, los AINEs pueden producir efectos secundarios y en algunos casos adversos. En este contexto, se ha demostrado en ensayos preclínicos que, el cannabidiol (un fitocannabinoide no psicotrópico) puede modular la actividad de las células inmunes, inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias y reducir el estrés oxidativo, elementos clave dentro de la fisiopatología inflamatoria (Nichols & Kaplan 2020).

Además, pueden interferir de manera indirecta en rutas asociadas a las ciclooxigenasas (COX), disminuyendo la síntesis de prostaglandinas, lo que sugiere un papel como modulador no clásico del eje eicosanoide-inflamación (Borrelli *et al.*, 2009).

La importancia de modular los procesos inflamatorios se debe a las implicaciones patológicas que puede desencadenar la respuesta inmunitaria crónica asociada a enfermedades como la artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas, cáncer o enfermedades cardiovasculares (Medzhitov, 2008).

La presencia y distribución de ambas enzimas varían, la COX-1 se encuentra a nivel constante de actividad, se detecta en los vasos sanguíneos, riñones y estómago. Sin embargo, a diferencia de la COX-1, la COX-2 no aparece en grado importante en los tejidos humanos, con la excepción de cerebro y riñones, salvo que su expresión se genere por inflamación local (Rella *et al.*, 2018).

La prostaglandina H₂ (PGH₂) actúa como principal sustrato para las sintasas posteriores que dan lugar a esta potente clase de moléculas de señalización, que son responsables del control de las funciones fisiológicas de “mantenimiento”, incluida la del metabolismo renal del agua y el sodio, el parto y la secreción del ácido estomacal. Para la producción de PGH₂, el ácido araquidónico (AA) se une dentro del canal de la ciclooxigenasa con su porción carboxilato ubicada cerca de R-120 y Y-355 en la entrada del canal y con su extremo ω ubicado en el surco hidrofóbico sobre la cadena lateral de S-530 cerca de G-533. En esta posición, el carbono 13 se coloca debajo del oxígeno fenólico de Y-385 (Lucido *et al.*, 2016).

Existen 3 modos de unión a la COX-1: unión rápida y reversible, unión de baja afinidad reversible, seguida de una unión más lenta dependiente del tiempo de gran afinidad y lentamente reversible, unión rápida y reversible seguida de una modificación irreversible covalente. Sobre la COX-2, los agentes específicos producen una inhibición reversible dependiente del tiempo (Leza & Lizasoain, 2005).

El elemento clave de la biosíntesis de prostaglandinas (PGE) y tromboxanos (TxA) es la conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandina G₂ (PGG₂) catalizada por la ciclooxigenasa (COX). Los productos resultantes son responsables de muchas condiciones fisiopatológicas como la inflamación, dolor, fiebre y la homeostasis (Redzicka *et al.*, 2019).

La COX-1 tiene 599 aminoácidos de longitud e incluye en el extremo N un péptido señal de 24 aminoácidos que dirige la proteína al retículo endoplásmico para su modificación postraducciona (Miciaccia *et al.*, 2021).

Para explicar la selectividad de los AINEs parece crítica la presencia de un aminoácido clave en la posición 523 del sitio activo de ambas enzimas, concretamente la isoleucina (I) para la COX-1 y valina (V) para la COX-2, la cual al tener un menor volumen determina una apertura en la pared

del canal del sitio activo de la COX-2 también llamado bolsillo adicional o pocket, lo cual permite un acceso a un lugar del acoplamiento de muchas estructuras selectivas como lo son las sulfonas o sulfonamidas (**Figura 2A**) (Rowlinson *et al.*, 2003).

El docking molecular o acoplamiento molecular es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligante y un blanco usualmente proteico a partir de representaciones tridimensionales. Mientras más estable, específica y favorable sea la unión entre un ligante (fármaco) y su blanco proteico (diana terapéutica), mayor será su actividad biológica (fármaco más efectivo). Por lo tanto, este método bioinformático juega un rol importante en el descubrimiento de nuevos principios activos o fármacos. El acoplamiento molecular emplea dos algoritmos por separado. Un primer algoritmo de muestreo que predice todas las configuraciones o conformaciones estructurales (poses) que un ligante puede asumir dentro de un dominio o sitio activo en el blanco proteico, y un segundo algoritmo con una función de puntuación que predice las energías de unión entre un ligante y un receptor para cada una de las configuraciones establecidas por el primer algoritmo. Con base en la función de estos dos algoritmos, todas las configuraciones de unión del ligante y su receptor son clasificadas (jerarquizadas) de acuerdo con sus energías de unión (Puacara & Torrez, 2019).

Las herramientas computacionales han evolucionado de tal forma que se han transformado en tecnologías cada vez más importantes para la búsqueda de moléculas candidatas a fármacos, mediante la selección de moléculas denominadas cabezas de serie o leads a partir de bases de datos. Entre estas herramientas se encuentra el modelado molecular, técnica que permite obtener moléculas reales o virtuales que poseen una gran probabilidad de exhibir una acción específica y que hace posible, incluso, predecir su biodisponibilidad y toxicidad. A su vez, dentro de las herramientas de modelado molecular se encuentra el acoplamiento molecular (docking), técnica de gran utilidad para predecir la estructura de complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más moléculas. Uno de los casos más estudiados es la interacción proteína-ligante, cuyo objetivo principal es predecir energías y modos de enlace, y que suele hacerse previamente a un estudio experimental. En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular usualmente se considera la mejor pose aquella que reporta menor energía de unión. Alternativamente, puede ser seleccionada del cluster más poblado entre los clusters obtenidos después del acoplamiento molecular y, en ocasiones, también se selecciona al menor valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) con respecto a la estructura de referencia (Velásquez *et al.*, 2013). Este trabajo tiene

como propósito demostrar la interacción del cannabidiol (CBD) con las enzimas COX (COX-1 y COX-2) de los modelos experimentales *Homo Sapiens*, *Mus Musculus* y *Rattus Norvegicus*, mediante técnicas computacionales, ya que se sabe que en algunas especies no hay cristales resueltos por rayos X o resonancia electromagnética nuclear (RMN), algunas estructuras se generaron mediante modelos de inteligencia artificial de *AlphaFold*, que permite establecer una estructura tridimensional con mayor precisión y mayor confiabilidad, además se conoce que existe un sitio donde se interaccionan los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) uniéndose con tal de bloquear el sitio de unión con el sustrato ácido araquidónico (AA) y a su vez inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, se espera que el cannabidiol (CBD) presente una inhibición similar o diferente a la de los AINEs mediante técnicas *in silico*. Dentro de este enfoque permitirá evaluar el potencial inhibitorio del CBD sobre las enzimas COX, así como la afinidad estructural respecto a los ligantes clásicos, aportando evidencia computacional que respalde su uso como alternativa terapéutica con un perfil menor de efectos secundarios.

Capítulo 1

1. Antecedentes

1.1 Ciclooxygenasas (COXs)

Las enzimas ciclooxygenasa (COX) también conocidas como sintasas de endoperóxido de prostaglandina H (PGH), son enzimas que determinan la biosíntesis de prostanoides, su función principal consiste en transformar el ácido araquidónico (AA) en prostaglandina H₂ (PGH₂). Estas enzimas se encuentran incrustadas en la monocapa luminal del retículo endoplásmico y en la membrana interna de la envoltura nuclear (Dong *et al.*, 2011). Se conocen dos isoformas de la ciclooxygenasa: COX-1 y COX-2 (**Figura 1**).

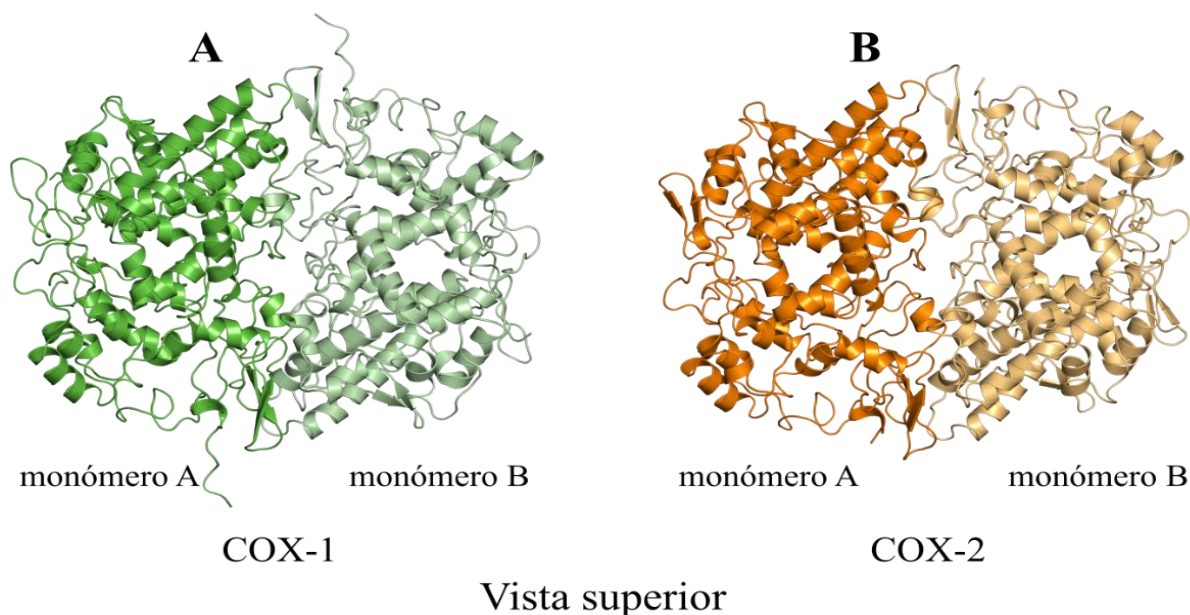


Figura 1. Estructuras tridimensionales de (A) COX-1 y (B) COX-2.

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, y se presenta con dos isoformas principales: COX-1 y COX-2. Aunque ambas comparten una alta homología estructural y actividad catalítica, difieren en su expresión, distribución tisular y función biológica, lo cual ha sido determinante para el estudio de su participación en procesos fisiológicos y patológicos. La COX-1 es una isoforma de expresión constitutiva, detectada de forma constante en la mayoría de los tejidos, especialmente en los vasos sanguíneos, riñones y estómago. Participa en funciones esenciales para el mantenimiento de la homeostasis, como la agregación plaquetaria, la protección de la mucosa gástrica y la regulación de la función renal, a través de la producción de prostaglandinas citoprotectoras. Por su parte, la COX-2 es una isoforma de expresión inducible, cuya síntesis se activa en respuesta a estímulos como citoquinas proinflamatorias, hormonas, factores de crecimiento y oncogenes. Aunque su expresión basal en tejidos normales es baja, con excepción del cerebro y los riñones, aumenta significativamente en contextos de inflamación, daño tisular y neoplasias. Esta regulación ha posicionado a COX-2 como un marcador de procesos inflamatorios crónicos y como blanco terapéutico relevante en diversas patologías, incluido el cáncer (Sanz 2016; Rella *et al.*, 2018).

Existen varios mecanismos que explican la sobreexpresión de COX-2 en estos tipos celulares: la expresión de COX-2 está generalmente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional, aunque también puede ser regulada por la tasa de síntesis/degradación de la proteína; el promotor de COX-2 contiene múltiples sitios de unión a factores transcripcionales, incluyendo el elemento de respuesta a cAMP y sitios de unión potenciales para Myb, para factores moleculares interleucina 6 (NFIL-6) y kB (NFkB) y para factores ETS (Díaz-Prado *et al.*, 2009).

Estructuralmente, las COX son homodímeros compuestos por monómeros estrechamente asociados que interactúan de manera asimétrica y poseen un conjunto de sitios alostérico/catalítico. En este arreglo, la oxidación del sustrato ocurre en uno de los monómeros, mientras que el otro monómero tiene una función alostérica, modulando la actividad del sitio catalítico mediante la interacción con ácidos grasos no sustratos (como el ácido palmítico) o con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Además, el sitio ciclooxigenasa se localiza en un canal hidrofóbico en el cual interactúan algunos residuos como la R120, Y385, H207, S530 y que el sitio peroxidasa (**Figura 2A**) incluye residuos como H388 y Y385, esenciales para transportar electrones. Dicha similitud estructural entre ambas enzimas explica que sus productos sean los mismos (**Tabla 1**). En la COX-1 el sitio activo y la entrada en el canal hidrofóbico son más pequeños que los de la COX-2, de

modo que acepta menos estructuras como sustratos. Esto significa que casi todos los AINEs inhibidores de la COX-1 también inhiben la COX-2, pero que los inhibidores de la COX-2 tienen un escaso poder inhibidor sobre la COX-1, esto se debe al tamaño del bolsillo de unión de la COX-2, lo cual tiene interesantes implicaciones clínicas (**Figura 2B**).

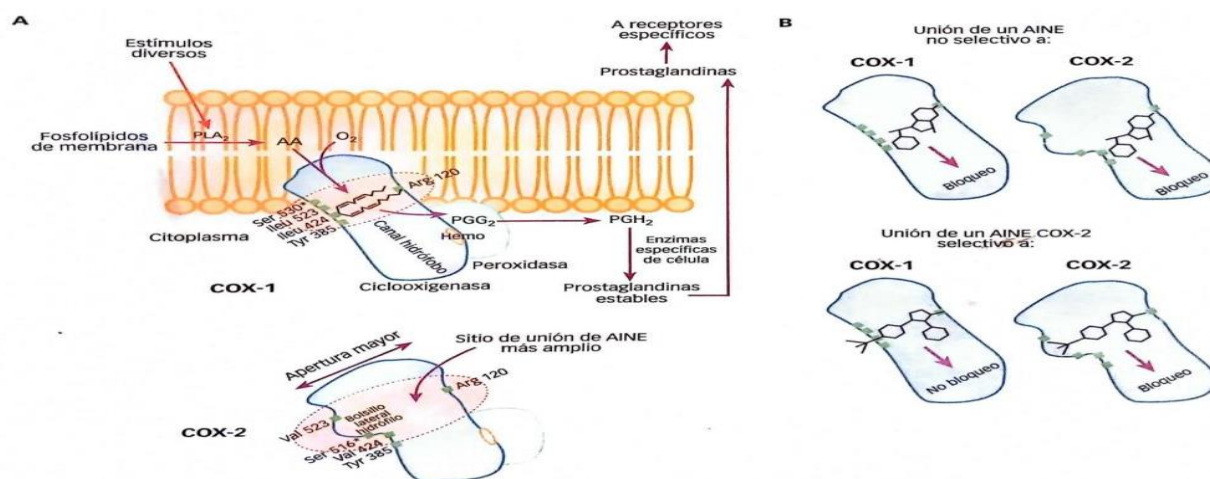


Figura 2. A) sitios catalíticos de las enzimas COX-1 y COX-2, B) interacción entre los AINEs y las COX (Leza & lizasoain 2005).

Características de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2)

	COX-1	COX-2
Forma de expresión	Constitutiva	Inducida (constitutiva en SNC, riñón, próstata)
Localización cromosómica	Cromosoma 9	Cromosoma 1
Espectro de actividad	↑ 2-4 veces	↑ 10-20 veces
Glucocorticoides	No afectan su actividad	Inhiben su actividad
Funciones biológicas	Procesos fisiológicos	Procesos inflamatorios
AINE no selectivo	Inhiben ambas enzimas	Inhiben ambas enzimas
AINE selectivo	Coxibs, no afectan su actividad o apenas influyen	Coxibs inhiben la actividad selectivamente de COX-2 evitando efectos secundarios

Tabla 1. Características de las enzimas ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) (Terragno & Terragno, 2003).

El reclutamiento de las células inflamatorias a los sitios de lesión también involucra las interacciones concertadas de varios tipos de mediadores solubles. Estos incluyen los factores del complemento C5a, PAF y el eicosanoide LTB₄. Todos actúan como agonistas quimioterápicos. Varias citocinas desempeñan funciones esenciales en la organización del proceso inflamatorio, en especial el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1). Otras citocinas y factores

de crecimiento (p. ej., IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF) contribuyen a las manifestaciones de la respuesta inflamatoria. Las concentraciones de muchos de estos factores se incrementan en el tejido sinovial del paciente con artritis inflamatoria. Los glucocorticoides interfieren con la síntesis y acciones de las citocinas, como IL-1 y TNF- α . Aunque algunas acciones de estas citocinas se acompañan de la liberación de prostaglandinas y tromboxano A₂ (TxA₂), los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) parecen bloquear solo los efectos pirógenos (Hilal-Dandan & Brunton, 2015).

Hoy en día se supone que la eficacia de los AINEs está más relacionada con su efecto sobre la COX-2, mientras que las reacciones adversas están involucradas con el bloqueo de la actividad enzimática de la COX-1. Los AINEs bloquean el sitio de unión del ácido araquidónico (sustrato natural) en la enzima, lo que evita que se convierta en prostaglandinas.

En general, las prostaglandinas tienen usos terapéuticos potenciales, entre ellos mediadores importantes en la inflamación y el dolor. Como se mencionó anteriormente, su producción es catalizada por la ciclooxigenasa (COX) que son las dianas terapéuticas principales de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (un tipo de fármacos más empleados a nivel global), hoy en día existe una aceptación particular de que los AINEs provocan sus efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos al inhibir en diferentes grados a las COX-1 y COX-2 (Cosentino *et al.*, 2023).

Debido a la similitud fisiológica y su estructura química entre el ácido araquidónico (**Figura 3.A**) y los endocannabinoides que corresponden a la anandamida (AEA) (**Figura 3.B**) y al 2-araquidonilglicerol (2-AG) (**Figura 3.C**). Ya que se puede observar que en su estructura la cadena carbonada es igual, por otro lado, la única diferencia notable es el grupo extremo que en el AA es un ácido carboxílico, mientras que en el AEA es una amida.

Dicho eso, los cannabinoides (endocannabinoides, fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos) podrían interactuar con las COXs.

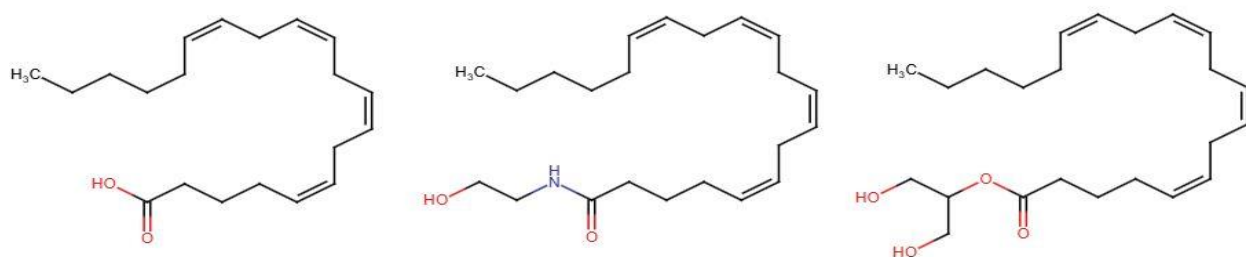


Figura 3. Estructura química del (A) ácido araquidónico, (B) anandamida y (C) 2-araquidonilglicerol.

Adicionalmente, existen similitudes fisiológicas, ya que los cannabinoides y los endocannabinoides tienen unión a los receptores cannabinoides específicos (CB1 y CB2) los endocannabinoides como la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) se derivan del ácido araquidónico (AA) y tiene una estructura similar a ese compuesto (Ruhaak *et al.*, 2011).

1.2 Inflamación

Una de las respuestas fisiológicas moduladas por las enzimas ciclooxigenasa, y que resulta de particular interés, es la inflamación. Esta es una respuesta fisiológica a una lesión o una infección de los tejidos; no obstante, se debe entender que inflamación no es sinónimo de infección.

Los romanos describieron las características de esta respuesta hace casi más de dos milenios: dolor, calor, rubor, hinchazón. Minutos después de la lesión e infección en el tejido, las proteínas de membrana median un incremento en el diámetro vascular (vasodilatación) y permeabilidad vascular. La vasodilatación incrementa el flujo sanguíneo del sitio de la lesión, lo cual genera calor y enrojecimiento en los tejidos afectados. El aumento de la permeabilidad vascular permite la fuga del líquido que va desde los vasos sanguíneos hacia el tejido dañado, lo que provoca hinchazón (edema). Unas horas después de estos cambios vasculares, los leucocitos llegan a la zona de lesión, se adhieren a las células del endotelio previamente activadas en la zona inflamada y atraviesan por las paredes capilares hacia el tejido (extravasación). Los leucocitos fagocitan a los patógenos y liberan los mediadores solubles (citoquinas, prostaglandinas y leucotrienos) que atribuyen también a la respuesta inflamatoria, a la atracción y activación de las células efectoras, la inflamación se puede clasificar como aguda, como respuesta a una lesión física, o crónica, lo que provoca una destrucción progresiva de los tejidos, como se observa en las diferentes infecciones crónicas, los padecimientos autoinmunitarios y en algunos tipos de cáncer (David, 2022).

La inflamación es un sello distintivo de muchos trastornos neurológicos, incluyendo el dolor crónico, la lesión cerebral traumática, las enfermedades neurodegenerativas y el accidente cerebrovascular. Las prostaglandinas, sintetizadas por las enzimas ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) en las neuronas y las células gliales, son importantes estímulos proinflamatorios en el sistema nervioso. Estudios en roedores han mostrado que el tratamiento con inhibidores de la COX o la deficiencia de estas enzimas proporciona protección en modelos experimentales de trastornos

neurodegenerativos, como el Alzheimer. Sin embargo, la toxicidad gastrointestinal y cardiovascular asociada con los inhibidores de la COX han limitado su aplicación en el tratamiento de síndromes neuroinflamatorios (Nomura *et al.*, 2011).

La inflamación se puede clasificar en:

- La respuesta inflamatoria aguda proporciona protección posterior a una lesión o infección hística. Se caracteriza por una serie de reacciones musculares y celulares con el objetivo de restablecer la homeostasis del tejido afectado. La liberación de histamina, prostaglandinas y leucotrienos atribuyen a los cambios vasculares que producen vasodilatación e incrementa la permeabilidad vascular. Las prostaglandinas y los leucotrienos también actúan como quimiotácticos para los neutrófilos. La patología hística resultante suele ser leve o moderada y localizada (David, 2022).
- La inflamación crónica se debe a la prolongada exposición al elemento agresor, a diferencia de la naturaleza transitoria de la inflamación aguda. Este estado se caracteriza por la coexistencia de daño tisular continuo, activación de células inmunitarias y reparación tisular simultánea. La liberación permanente de mediadores proinflamatorios (factores solubles liberados por los macrófagos y los linfocitos) perpetúa el ciclo de daño y reparación que contribuyen en el desarrollo de la inflamación crónica. La inflamación crónica también puede conllevar a la generación de granulomas, tumores celulares consistentes en macrófagos activados rodeados de linfocitos activos (David, 2022).

1.3 Ligantes que interactúan con las ciclooxigenasas (COXs)

Existen diversos compuestos químicos que interactúan con las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). Mientras que el ácido araquidónico (AA) se une a dichas enzimas de manera endógena, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son administrados exógenamente para inhibir su actividad catalítica. No obstante, se ha observado que las COXs interaccionan con compuestos estructuralmente similares al AA, como el 2-araquidonilglicerol (2-AG), un endocannabinoides. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo investigar el posible sitio de interacción del cannabidiol (CDB) con las ciclooxigenasas. Para lograr este objetivo, se realizaron estudios computacionales de acoplamiento molecular en las ciclooxigenasas 1 y 2 de las especies relevantes

en la investigación biomédica: *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*. Se evaluó la interacción del CBD con estas enzimas y para validar el método se realizaron acoplamientos moleculares de un grupo de AINEs (ácido acetilsalicílico (AAS), ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam, celecoxib), ácido salicílico (AS), ácido araquidónico (AA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG) como compuestos de referencia (**Tabla 2**).

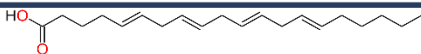
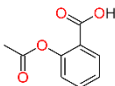
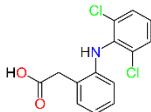
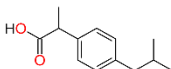
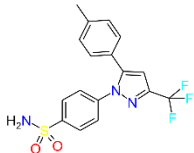
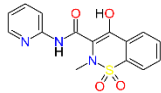
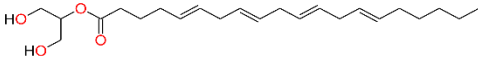
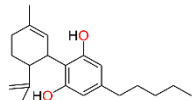
Nombre	Estructura	Familia
Ácido araquidónico (AA)		Eicosanoides
Ácido acetilsalicílico (AAS)		Salicilatos
Ácido salicílico (AS)		Salicilatos
Diclofenaco		Arilo-acéticos
Ibuprofeno		Arilpropiónicos
Colecoxib		Coxibs
Piroxicam		Ácidos enólicos
2-Araquidonoilglicerol (2-AG)		Endocannabinoides
Cannabidiol (CBD)		Cannabinoides

Tabla 2. Ligantes seleccionados para realizar acoplamiento molecular con las enzimas COX-1 y COX-2 para las especies *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*.

1.3.1 Ácido araquidónico (AA)

El ácido araquidónico (AA), también conocido como ácido eicosatetraenoico, es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos perteneciente a la familia de los omega-6. Este ácido graso forma parte de los fosfolípidos de las membranas celulares de los mamíferos y se sintetiza a partir del ácido linoleico (Cantú *et al.*, 2017).

La concentración de ácido araquidónico (AA) libre en el organismo es extremadamente baja, del orden de 10^{-6} molar. El primer paso en su metabolismo consiste en la liberación de AA desde los fosfolípidos de la membrana celular, reacción catalizada por la fosfolipasa A2 (PLA2). La actividad de esta enzima puede ser estimulada tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Entre los estímulos fisiológicos que promueven la liberación del ácido araquidónico sn-2 se encuentran las hormonas como la angiotensina, la bradiquina y la epinefrina, así como proteínas como la trombina y el complejo Ag-Ac. En condiciones patológicas, se observa un incremento significativo en el ácido araquidónico libre, al igual que otros ácidos grasos como el linoleato y el oleato en su posición sn-2. Estos cambios pueden ser inducidos por diversos factores, incluyendo el daño mecánico, isquemia, toxinas que actúan sobre las membranas celulares, promotores tumorales y algunos ionóforos de calcio. El ácido araquidónico libre es el precursor de la biosíntesis de compuestos con gran actividad biológica, entre los cuales se encuentran las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos (TxA₂), sintetizados a través de la vía de la ciclooxigenasa (COX), así como los leucotrienos (LT) y las lipoxinas (LX), obtenidas por la acción de la lipooxigenasa (LOX) (Companioni-Gásquez, 1995).

Posteriormente, tras la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2), el ácido araquidónico (AA) es liberado al citosol (**Figura 4**). Una vez allí, el AA es metabolizado por diversas vías enzimáticas, dando lugar a una amplia variedad de eicosanoides. La vía de las ciclooxigenasas (COXs) es una de las más importantes en este proceso. Específicamente, tras su liberación de la membrana plasmática por la acción de la PLA2, el AA es metabolizado por las enzimas ciclooxigenasa (COX). Estas son enzimas bifuncionales que catalizan la conversión del AA en prostanoides, un grupo de mediadores lipídicos involucrados en procesos inflamatorios. Los prostanoides tiene efecto a través de mecanismos autocrina y paracrina, que incluyen tanto a las prostaglandinas (PG) como a los tromboxanos (TxA₂) (Cantú *et al.*, 2017).

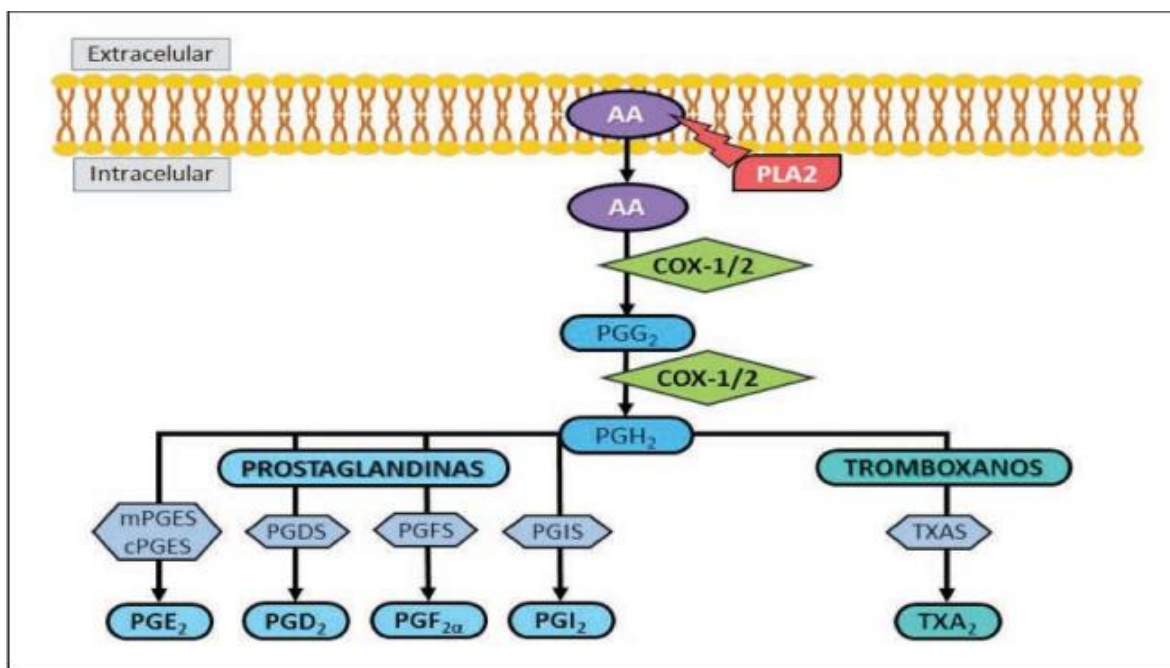


Figura 4. Ruta biosintética de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos desde la liberación del ácido araquidónico de la membrana lipídica (Cantú *et al.*, 2017).

La liberación del ácido araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de la membrana celular es un paso importante en la síntesis de diversos mediadores lipídicos con actividad fisiológica. Dicho proceso consta de tres fases principales:

- La fase uno, la liberación del AA, dicho proceso puede desencadenarse mediante estímulos fisiológicos regulado por hormonas como la bradiquinina y la adrenalina, así como por proteasas como la trombina o estímulos patológicos como en el caso de la inflamación. Este proceso ocurre debido a la acción de las enzimas conocidas como fosfolipasas. La fosfolipasa A2 (PLA2) hidroliza la fosfatidilcolina para liberar araquidonato o puede actuar en conjunto con la fosfolipasa C que actúa sobre el fosfatidilinositol, generando diacilglicerol, que se convierte en araquidonato.
- La fase dos, el metabolismo del AA por la ciclooxigenasa (COX), donde una vez que el araquidonato se encuentra libre es metabolizado por la enzima COX (también conocida como PGH sintasa). La COX es una enzima bifuncional: primero, introduce oxígeno para formar un anillo y un grupo hidroperóxido en la molécula de araquidonato; segundo, se

reduce el hidroperóxido para producir PGH_2 , el cual tiene un grupo hidroxilo en una posición específica (carbono 15).

- La fase tres, transformación de las prostaglandinas y tromboxanos. En esta fase, otras enzimas convierten PGH_2 en diferentes prostaglandinas y el tromboxano A_2 . Una serie de enzimas específicas catalizan la transformación de PGH_2 en diferentes prostaglandinas, que desempeñan un papel fundamental en la regulación de diversos procesos fisiológicos y patológicos, como la inflamación, el dolor y la fiebre, por ejemplo, el leucotrieno C: el cual se descubrió en un tipo de glóbulos blancos llamados polimorfonucleares (PMN), este compuesto tiene un efecto potente en la contracción muscular y se cree que está involucrado en la patología del asma ya que puede provocar constricción en las vías respiratorias (Mathews, Van Holde & Ahern, 2002).

1.3.2 AINEs

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen uno de los grupos farmacológicos más prescritos, con diversas aplicaciones terapéuticas, se utilizan extensamente en el tratamiento de dolencias musculoesqueléticas, debido a sus efectos analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios y antiagregantes plaquetarios. Sin embargo, su uso se ve limitado por la aparición de efectos adversos, algunos de ellos graves, como la enfermedad ulcerosa péptica y la insuficiencia renal (Gris *et al.*, 2009).

Los AINEs se clasifican principalmente con base a su mecanismo de acción en dos grupos (**Figura 5B**):

1. **AINEs no selectivos:** Inhiben la actividad de la enzima COX-1 y COX-2.
2. **AINEs selectivos:** Se enfocan principalmente en inhibir la actividad de la COX-2. La mayoría de los AINEs selectivos para la isoforma COX-2 se caracterizan por tener un grupo lateral voluminoso que facilita su unión e interacción en la cavidad donde normalmente el ácido araquidónico (AA) se une. Sin embargo, esta estructura molecular dificulta su orientación en el conducto de unión más pequeño presente en la COX-1.

Tanto los AINEs no selectivos como los selectivos para COX-2, son fármacos con naturaleza hidrofóbica, lo que permite acceder al conducto de unión al ácido araquidónico, dando lugar a propiedades farmacocinéticas (Grosser, Ricciotti & FitzGerald, 2022).

Además, los AINEs se pueden clasificar de acuerdo con la reversibilidad de su inhibición:

- **Inhibidores reversibles:** Interactúan temporalmente con la enzima COX.
- **Inhibidores irreversibles:** Se unen permanentemente en el sitio activo de la enzima mediante un enlace covalente. El único AINE irreversible es el ácido acetilsalicílico (aspirina), la cual acetila un residuo específico en el sitio activo de la COX, bloqueado así la unión del ácido araquidónico.

En cuanto a su farmacocinética, los AINEs son ácidos orgánicos que se absorben bien a través por vía oral. Tras su ingestión, se unen a proteínas plasmáticas, lo que facilita su distribución y eliminación del organismo. La excreción ocurre principalmente a través de los riñones, ya sea por filtración glomerular o secreción tubular.

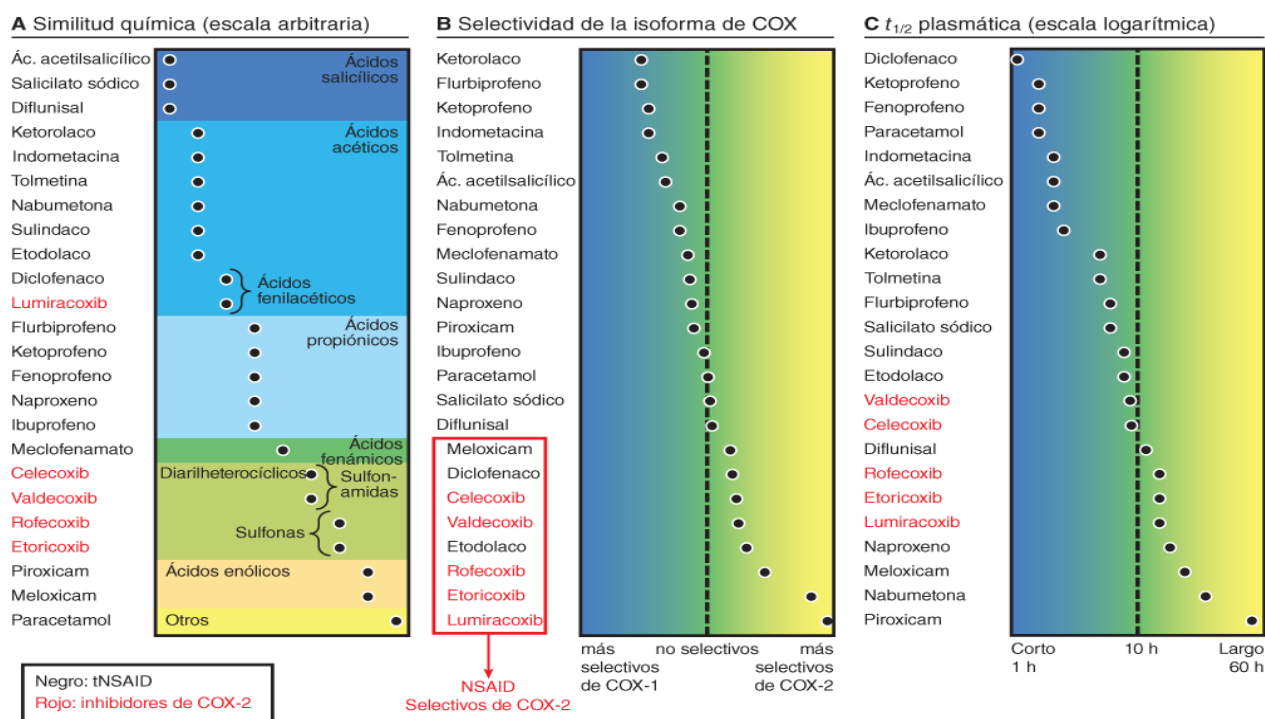


Figura 5. Clasificación de los AINEs por: A) similitud química, B) selectividad de la isoforma COX-2, C) $t_{1/2}$ plasmática (Grosser, Ricciotti & FitzGerald 2022).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son fármacos empleados para el tratamiento de diversas afecciones, como la artritis reumatoide, dolor menstrual y el dolor de cabeza. Aunque los AINEs selectivos para la COX-2 se han diseñados para minimizar los efectos secundarios relacionados con la inhibición de la COX-1, el uso crónico de los AINEs, tanto selectivo como no selectivo, puede estar limitado a la presencia de efectos adversos a nivel gastrointestinal.

Estos efectos adversos incluyen síntomas leves como dispepsia y dolor abdominal, hasta complicaciones graves como perforación y sangrado gástrico. La patogénesis de estos efectos adversos está relacionada con la inhibición de la COX-1, que realiza un rol importante en la protección de la mucosa gástrica y en la homeostasis celular.

La inhibición indiscriminada de las ciclooxigenasas (COX) puede provocar una serie de eventos que problemas que encausan a la disminución de prostaglandinas protectoras en el estómago (FitzGerald & Patrono 2001; Pérez-Ruíz *et al.*, 2002).

Para poder abordar esta situación, se desarrollaron los inhibidores selectivos de la COX-2, los denominados “coxibs”. Estos medicamentos ofrecen una eficacia comparable a la de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tradicionales, pero con una mejor tolerancia gastrointestinal. Hasta la fecha, se han aprobado seis coxibs para su uso clínico: celecoxib, rofecoxib, valdecoxib y sus profármacos parecoxib, etoricoxib y lumiracoxib. Sin embargo, varios de estos fármacos han sido restringidos o retirados del mercado debido a su perfil de riesgo vascular adverso. Actualmente, el celecoxib es el único inhibidor selectivo de la COX-2 autorizado en Estados Unidos. Tanto los AINEs tradicionales como los coxibs actúan inhibiendo las enzimas COX, que convierten el ácido araquidónico en mediadores lipídicos como las prostaglandinas y tromboxanos. Los AINEs tradicionales afectan tanto la actividad de la enzima COX-1 como de COX-2, mientras que los coxibs son selectivos únicamente para COX-2. Algunos AINEs más antiguos, como el diclofenaco, etodolaco, meloxicam y nimesulida (actualmente no disponibles en EE. UU.), presentan una selectividad hacia COX-2 similar a la del celecoxib (Grosser, Ricciotti & FitzGerald, 2022).

Los inhibidores selectivos de la COX-2 también tienen potencial prometedor para proporcionar efectos beneficiosos en el incremento de endocannabinoides, como la disminución de la ansiedad, depresión y dolor, evitando al mismo tiempo los efectos gástricos y cardiovasculares negativos asociados a la inhibición del ácido araquidónico (Orlando & Malkowski, }2016).

La inhibición de prostaglandinas dependientes de COX-2 representa el efecto antiinflamatorio y analgésico de los AINEs. Aunque se pensaba que la COX-1 era predominante responsable de la síntesis de prostaglandinas protectoras en el estómago, mientras que la COX-2 se inducía en procesos inflamatorios. La mayoría de los AINEs se utilizan para afecciones no consideradas inflamatorias; sin embargo, los inhibidores de la COX-2 también actúan como analgésicos en estas condiciones (Hawkey 1999; Lopez-Zaragoza *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2008).

Además, no se observan interacciones directas entre los inhibidores y los residuos exclusivos de COX-2, lo que complica la racionalización de su selectividad únicamente a partir de estructuras cristalinas. Esta selectividad podría depender de parámetros cinéticos y otras características estructurales que influyen en la especificidad del inhibidor (Luong *et al.*, 1996).

Los productos de la enzima COX-2 son esenciales para la regulación de la presión arterial y la hemostasia (coagulación sanguínea). La inhibición total de COX-2 puede provocar efectos adversos, como la hipertensión arterial y un mayor riesgo de eventos trombóticos. Entre los AINEs, el ácido acetilsalicílico (AAS), el cual destaca por su mecanismo de acción único: realiza una acetilación covalente en las subunidades catalíticas de COX-1 y COX-2, inhibiendo de manera irreversible su actividad enzimática. Este proceso bloquea el acceso del ácido araquidónico (AA) al sitio activo de la enzima, deteniendo así la síntesis de prostaglandinas. Además, la COX-2 acetilada produce el metabolito 15 (R)-HETE, que puede transformarse en compuestos con propiedades antiinflamatorias, lo que añade un beneficio adicional al uso del AAS (Grosser, Ricciotti & FitzGerald, 2022).

1.3.3 Cinética de los AINEs

La cinética enzimática es el estudio de las velocidades en la que ocurren las reacciones catalizadas por enzimas y de los factores que los regulan. Este análisis permite comprender no solo la eficiencia catalítica de una enzima, sino también su regulación, su especificidad y su respuesta frente a diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. Desde una perspectiva de investigación, la cinética enzimática constituye una herramienta esencial que contribuye al estudio de procesos biológicos complejos y para el diseño racional de estrategias terapéuticas (Nelson & Cox, 2017). Los parámetros clásicos, como la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}), permiten cuantificar la afinidad de una enzima, su sustrato y su capacidad catalítica máxima, respectivamente. Estos valores no son solo fundamentales para caracterizar la función de una enzima en condiciones normales, sino también para detectar las alteraciones funcionales en condiciones patológicas o frente a la presencia de inhibidores (Berg *et al.*, 2019).

La comprensión de la cinética enzimática, tanto reversible como irreversible, es particularmente relevante en farmacología, ya que numerosos fármacos actúan como inhibidores enzimáticos específicos. Este es el caso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que bloquean la

actividad de las isoformas de COX-1 y COX-2, regulando la síntesis de prostaglandinas. El análisis de la cinética de la inhibición de estas enzimas permite no solo comprender el mecanismo de acción de estos fármacos, sino también predecir su eficacia y su perfil de seguridad (Vane & Botting, 1998).

Desde una perspectiva de investigación, el estudio de la cinética de los AINEs, es decir los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, resulta ser esencial para comprender su comportamiento en el organismo y optimizar su uso clínico. La mayoría de estos fármacos se absorben de manera rápida tras la administración oral y presentan una elevada biodisponibilidad. Su extensa unión a proteínas plasmáticas, particularmente a la albúmina, determina un volumen de distribución reducido y potenciales interacciones farmacológicas (Brune & Hinz, 2004).

El metabolismo de los AINEs ocurre principalmente en el hígado, mediado por las enzimas del citocromo P-450 (especialmente de la isoforma CYP2C9), mientras que su eliminación se da predominantemente por vía renal. Estas características varían entre diferentes compuestos: por ejemplo, el ibuprofeno presenta una vida media corta (~ 2 h), en contraste con el meloxicam o piroxicam, cuyos efectos se prolongan más allá de las 20 horas (Rainsford, 2004).

1.3.4 Cannabinoides

Los cannabinoides son sustancias químicas que se clasifican en tres categorías: fitocannabinoides (producidos por la planta del *cannabis sativa*), cannabinoides sintéticos (creados en un laboratorio) y endocannabinoides (producidos por el cuerpo humano). La planta *cannabis sativa* ha sido importante en la medicina tradicional debido a su capacidad para sintetizar compuestos farmacológicamente activos, entre los que destacan el CBD (cannabidiol) y el Δ -9-THC (tetrahidrocannabinol). El Δ -9-THC es conocido por sus efectos psicoactivos, que incluyen alteración en la percepción y, en algunos casos, alucinaciones. Por el contrario, el CBD no tiene efectos psicoactivos y se ha estudiado ampliamente por sus propiedades terapéuticas. Ambos cannabinoides se utilizan en el tratamiento de la artritis reumatoide debido a sus efectos antiinflamatorios, los cuales ayudan a disminuir la inflamación asociados con la enfermedad (Takeda *et al.*, 2008).

El dolor crónico es una de las razones más comunes para el uso de *cannabis* medicinal. La especie *cannabis sativa*, que crece de manera natural en regiones tropicales y subtropicales, contiene entre 400 y 537 componentes químicos, incluyendo casi 100 cannabinoides. Estos compuestos son los responsables de los efectos tanto psicotrópicos como terapéuticos de la planta.

Mientras que los fitocannabinoides como el CBD (cannabidiol) y el Δ -9-THC (tetrahidrocannabinol), se extraen directamente de la planta, los endocannabinoides son producidos en el interior del cuerpo.

Los endocannabinoides, fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos tienen mecanismos de acción ligeramente distintos. Los endocannabinoides interactúan principalmente sobre los receptores CB1 y CB2, mientras que los fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos interactúan con una gama más amplia de dianas terapéuticas, como los receptores 5-HT1A de serotonina, los receptores opioides, los receptores de dopamina y los receptores GABA.

Estudios preliminares han demostrado la eficacia del *cannabis* en el tratamiento de diversos problemas de salud física y mental. Investigaciones realizadas en el instituto Dent en Buffalo, Nueva York, han destacado que el CBD puede ser particularmente beneficioso para pacientes geriátricos que presenten dolor crónico asociado con trastornos del sueño, ansiedad, neuropatía, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, lesiones de la columna vertebral y esclerosis múltiple (Islas-Andrade *et al.*, 2023).

El CBD actúa sobre varios receptores, incluyendo al receptor huérfano acoplado a proteínas G (GPR55), el receptor cannabinoide endotelial (CBe), el receptor potencial transitorio de potencial vanilloide tipo 1 (TRPV1), receptores adrenérgicos α -1, receptores μ opioides y el receptor 5-HT1A, también activa respuestas fisiológicas mediadas por los peroxisomas y el receptor activado por proliferación γ (PPAR γ) (**Figura 6**), causando diversos efectos bioquímicos, moleculares y conductuales debido a la amplia gama de receptores que activa en el SNC. Las acciones del CBD son reguladas por enzimas que metabolizan los cannabinoides endógenos (endocannabinoides), como la lipooxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Wheal *et al.*, 2014; Patricio *et al.*, 2020).

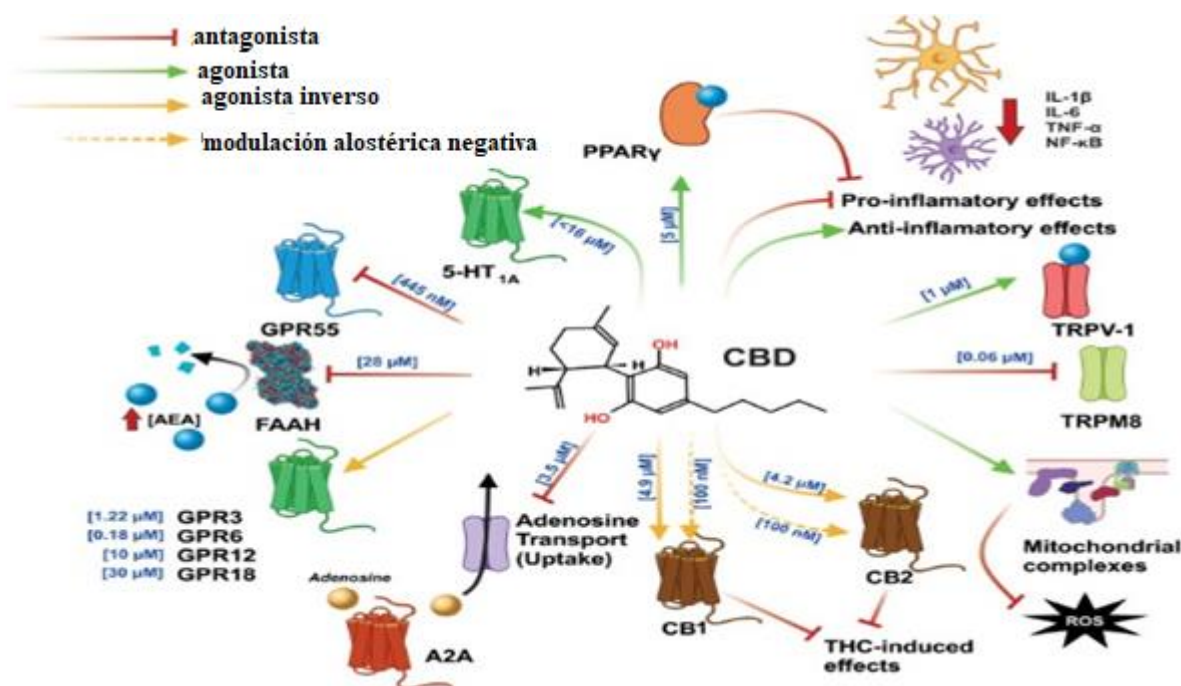


Figura 6. Blancos terapéuticos reportados del cannabidiol (CBD) (Patricio *et al.*, 2020).

A pesar de que el *cannabis* y sus cannabinoides se emplean para tratar enfermedades crónicas, particularmente, el dolor asociado a diversas condiciones médicas, la evidencia de su eficiencia es limitada y se basa en un número reducido de ensayos clínicos. Se ha demostrado que los cannabinoides aislados de *cannabis sativa* pueden inhibir la actividad de las enzimas ciclooxigenasa (COX), lo que sugiere un mecanismo de acción para sus efectos analgésicos.

Los endocannabinoides (eCB) y prostaglandinas (PG) son factores claves en la percepción del dolor, y existe evidencia que sugiere una fuerte conexión entre ambos sistemas, por ejemplo, los neutrófilos humanos, células del sistema inmunitario, expresan enzimas COX que sintetizan PGE₂, un mediador proinflamatorio. Dado que, estudios han demostrado que el CBD inhibe eficazmente funciones de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), como la migración celular, el metabolismo oxidativo y la síntesis del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lo que sugiere un efecto antiinflamatorio adicional.

Evaluar los efectos de los cannabinoides sobre la actividad enzimática de la COX-1 y COX-2 en comparación con los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) podría ayudar a aclarar los mecanismos implicados en la reducción del dolor inducida por el CBD. Esta comparación es relevante porque, al igual que los AINEs, los cannabinoides podrían modular la síntesis de prostaglandinas, aunque a través de mecanismos potencialmente diferentes (Cosentino *et al.*, 2023).

Los endocannabinoides (eCB) son moléculas de producción endógena que interaccionan con los receptores cannabinoides CB1 y CB2, desempeñando roles cruciales en diversas funciones cerebrales, como memoria, aprendizaje, transmisión sináptica y plasticidad neuronal. Entre los principales eCB se encuentran la anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG), que están ampliamente distribuidos en los tejidos de los mamíferos, aunque han sido estudiados en mayor proporción en el sistema nervioso. Aunque la AEA fue uno de los primeros ligantes identificados para los receptores cannabinoides y actúa como agonista parcial (**Figura 7**), sus concentraciones en el cerebro son relativamente bajas. En contraste, el 2-AG es considerado el eCB más dominante debido a su expresión endógena aproximadamente 200 veces superior a la de AEA. El 2-AG actúa como agonista pleno en los receptores cannabinoides en comparación con la AEA. Además, se predice que aproximadamente el 90% del 2-AG presente en el cerebro existe asociado a la membrana, funcionando como un depósito para el ácido araquidónico (AA), que luego se utiliza como sustrato para sintetizar prostaglandinas neuroinflamatorias (Ruhaak *et al.*, 2011; Orlando & Malkowski, 2016; Soria-Lara *et al.*, 2019; Hill & Mackie, 2022; Vanderah & Largent-Milnes, 2024).

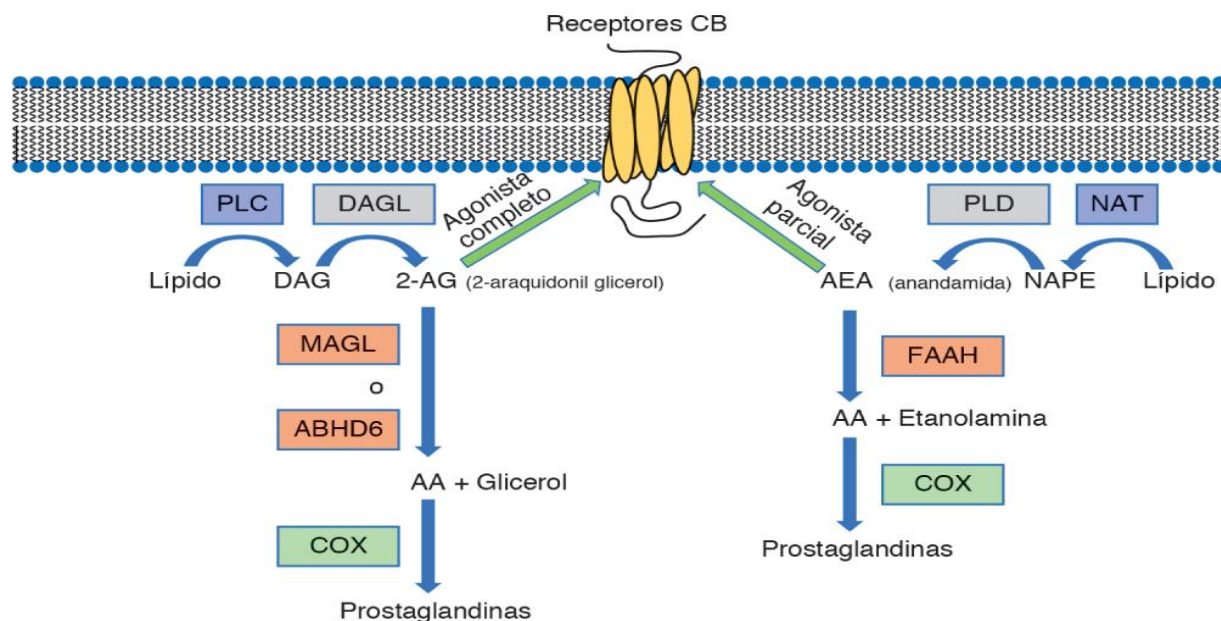


Figura 7. Vías de síntesis de prostaglandinas a partir de los endocannabinoides; AEA y 2-AG, interacción de los endocannabinoides para generar prostaglandinas (Vanderah & Largent-Milnes 2024).

Diversos estudios han demostrado que el CBD puede influir en la vía de la ciclooxigenasa a través de múltiples mecanismos, incluyendo la inhibición directa (débil) de COX-2, la modulación de su expresión genética a través de la vía NK-kB, y la alteración indirecta de la síntesis de prostaglandinas (Ruhaak *et al.*, 2011; Takeda *et al.*, 2008).

1.4 Métodos computacionales

La bioinformática y la biología computacional son disciplinas clave en la investigación biológica moderna, aunque cada una tiene su enfoque distinto.

Por un lado, la bioinformática se centra en el manejo de grandes volúmenes de datos biológicos. Utiliza las capacidades de almacenamiento y procesamiento de las computadoras para recopilar, organizar y almacenar información sobre procesos biológicos. Estos datos, accesibles globalmente a través de internet, se estructuran en bases de datos o bibliotecas digitales con datos uniformes que facilitan su manipulación y análisis mediante algoritmos computacionales. Este enfoque permite a los investigadores extraer patrones y conocimientos útiles a partir de datos ya existentes. Por otro lado, la biología computacional adopta un enfoque más experimental. Su objetivo es crear modelos computacionales basados en principios físicos, químicos y biológicos para simular y predecir el comportamiento de sistemas biológicos. A diferencia de la bioinformática, que principalmente trabaja con datos ya disponibles, la biología computacional realiza experimentos virtuales (*in silico*). Este método no sólo acelera el ritmo de los descubrimientos científicos, sino también aumenta la eficiencia al reducir la dependencia de los experimentos físicos en los laboratorios (Kennelly & Rodwell, 2008).

1.5 Análisis de secuencias lineales de aminoácidos y estructuras tridimensionales de las COXs

Las proteínas se pueden clasificar en cuatro niveles estructurales:

1. Estructura primaria. Es la disposición espacial más simple que adopta una proteína, donde las secuencias de aminoácidos se unen en largas cadenas mediante enlaces peptídicos. Existen 20 aminoácidos que se combinan para formar una proteína.

2. Estructura secundaria. Es la disposición espacial donde las cadenas polipeptídicas se pliegan por la interacción intermolecular e intramolecular de los átomos que forman el enlace peptídico. En dichos plegamientos se producen hélices alfa y las hojas plegadas beta.
3. Estructura terciaria. Es la estructura tridimensional de las proteínas que están compuestas por la unión de diversos polipéptidos.
4. Estructura cuaternaria. Es la estructura más compleja y donde existe la unión de distintas cadenas polipeptídicas.

Para obtener información de los distintos niveles estructurales de una proteína existen diversas herramientas computacionales y bases de datos.

Particularmente, para este trabajo se utilizaron las secuencias lineales de aminoácidos de las enzimas ciclooxigenasa de tres especies; *Homo sapiens* (hCOX-1 y hCOX-2), *Mus musculus* (mCOX-1 y mCOX-2) y *Rattus norvegicus* (rCOX-1 y rCOX-2) que se obtuvieron de la base de datos Uniprot con los códigos P23219, P35354, P22437, Q05769, Q63921 y P35355 respectivamente.

Para el análisis de dichas secuencias se utilizó el servidor Blastp que nos ayuda a encontrar las similitudes y diferencias entre las secuencias lineales de aminoácidos, lo que se conoce como alineamiento de secuencias.

Por otra parte, utilizamos la información contenida en la base de datos de proteínas (PDB por sus siglas en inglés) donde encontramos las estructuras tridimensionales de las enzimas ciclooxigenasa de humano; hCOX-1y hCOX-2 con los códigos 6Y3C y 5F1A respectivamente y de la ciclooxigenasa de ratón mCOX-2 con el código 3HS5.

Es relevante destacar que existe más información estructural de COX-2 que de COX-1, por ejemplo, hCOX-1 se cristalizó recientemente en el año 2020. Además, para mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2 no existen estructuras resueltas de manera experimental.

1.6 Predicción de estructuras tridimensionales de proteínas

En la actualidad existen diversos programas y protocolos para obtener estructuras tridimensionales de las proteínas que tienen implicaciones revolucionarias en la medicina. Desde métodos computacionales tradicionales como el modelado por homología o el Ab initio hasta los métodos más modernos que utilizan inteligencia artificial (IA) (**Figura 8**).

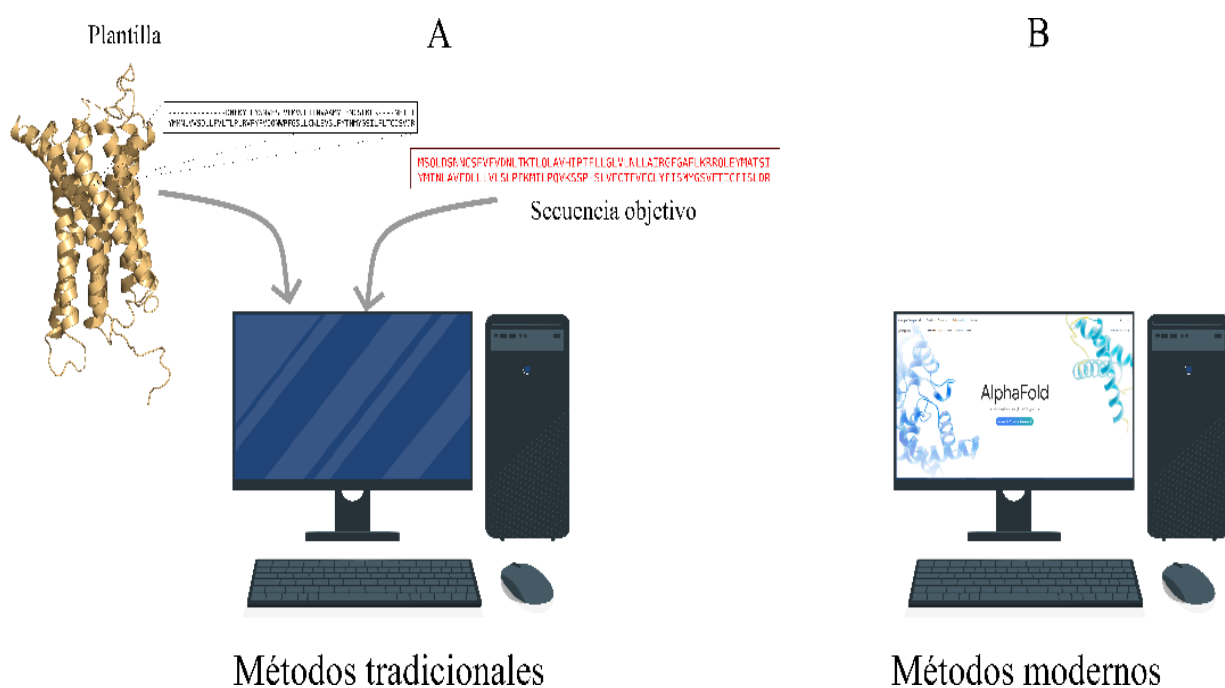


Figura 8. Representación de los métodos de predicción de las estructuras tridimensionales de proteínas A) tradicionales y B) modernos.

Del modelado por homología se conocen herramientas como Swiss-model, MODELLER, entre otros, que se basan en la suposición de que proteínas con secuencias homólogas adoptan estructuras similares. Para utilizar dicho protocolo es necesario conocer la secuencia lineal de aminoácidos de una proteína con estructura conocida que se denomina plantilla (la cual debe tener una identidad mayor al 30% con la secuencia objetivo) y alinearla con la secuencia objetivo (de la que se desea construir su estructura) de esta manera se generan modelos tridimensionales mediante ajustes estereoquímicos. Mientras que, si la identidad es menor al 30%, se utilizan métodos ab

inicio para predecir el plegamiento de la proteína desde cero, uno de los programas más conocidos es Rosetta que implementa campos de fuerzas simplificados y algoritmos de predicción mediante simulaciones de Monte Carlo (nos ayuda a predecir posibles resultados de un evento incierto).

Por otro lado, métodos recientes incorporan inteligencia artificial para poder predecir las estructuras tridimensionales de las proteínas. El protocolo más conocido es *AlphaFold* que utiliza una arquitectura compleja que se puede dividir en tres secciones:

1. Módulo de incrustación evolutiva, que analiza secuencias múltiples para identificar residuos que coevolucionan y que tienen probabilidad de interactuar en el espacio tridimensional.
2. Módulo de geometría espacial, que ayuda a predecir descriptores geométricos como las distancias interatómicas y ángulos de torsión.
3. Optimización física, que ajusta el modelo mediante mecánica molecular, de esta manera asegurando una minimización de la energía de Van der Waals y puentes de hidrógeno para tener una estereoquímica realista.

Además, para cada modelo nos proporciona métricas de confianza por residuo conocido como pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*) que estima la confianza en cada residuo de la estructura proteica predicha, en otras palabras, evalúa la posición de un aminoácido en particular e indica si es correcta.

Con *AlphaFold* se han predicho más de 350,000 proteínas humanas y ha alcanzado una excelente precisión comparable a métodos experimentales tradicionales.

En particular, en este trabajo se utilizó *AlphaFold* para obtener las estructuras tridimensionales de mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2, al obtener las secuencias de aminoácidos a través del banco de datos de Uniprot, ya que no se encuentran estructuras resueltas de manera experimental.

Los modelos generados por *AlphaFold* tienen ventajas en comparación con los métodos tradicionales, ya que permiten una predicción rápida y precisa de las estructuras de proteínas de interés. Además, se abren nuevas perspectivas en la investigación médica y farmacéutica, por ejemplo:

- **El desarrollo de fármacos:** el conocimiento de las estructuras tridimensionales de proteínas específicas (dianas farmacológicas) facilita el diseño de medicamentos. Debido a que se puede explorar la forma en la que interactúan en contexto de proteínas específicas involucradas en diversas enfermedades.

- **La biología sintética:** los científicos pueden crear proteínas nuevas a partir de secuencias lineales de aminoácidos mediante servidores especializados con funciones específicas para aplicaciones industriales o medioambientales.
- **La investigación básica:** entender mejor las estructuras de las proteínas ayuda a explicar los mecanismos biológicos subyacentes y a descubrir nuevos objetivos terapéuticos.

1.7 Métodos de validación para modelos proteicos

Cada programa de predicción estructural de proteínas proporciona una métrica de confianza para validar su modelo. Sin embargo, existen otros métodos para validar las estructuras tridimensionales obtenidas, uno de los métodos más utilizado es el diagrama de Ramachandran, el cual proporciona información que ayuda a identificar los ángulos diedros ϕ (*phi*) y ψ (*psi*) de los enlaces peptídicos.

Las regiones conformacionalmente no permitidas para cada aminoácido se deben a que ciertas combinaciones de *phi* y *psi* causan choques estéricos entre átomos (**Figura 9**).

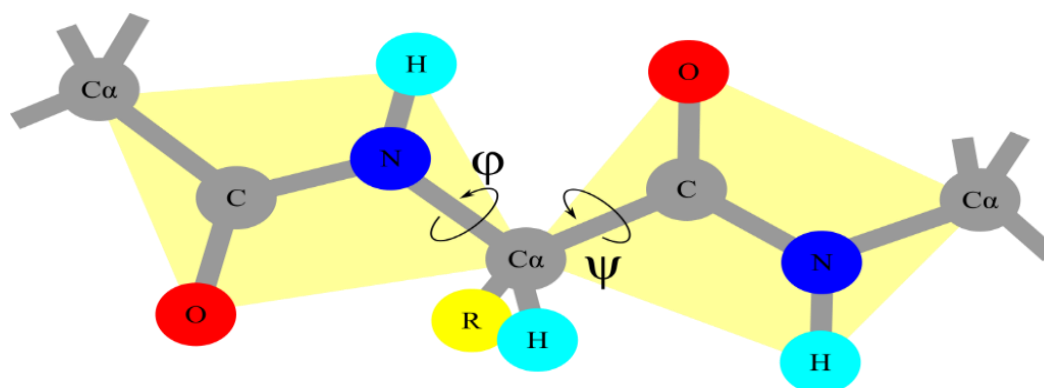


Figura 9. Representación gráfica de los ángulos diedros ϕ (*phi*) y ψ (*psi*) de los enlaces peptídicos utilizados para generar el diagrama de Ramachandran.

Aunque las estructuras se describen como si un enlace simple uniera los átomos de carbono α y nitrógeno α , este enlace, de hecho, exhibe un carácter de doble enlace parcial (**Figura 9**).

El enlace que conecta un carbono carbonilo con nitrógeno α no puede rotar, ya que eso requeriría romper el doble enlace parcial. En consecuencia, los átomos de O, C, N y H de un enlace peptídico son coplanares. La semirrigidez impuesta del enlace peptídico tiene consecuencias importantes

para la forma en la que los péptidos y las proteínas se pliegan para generar órdenes estructurales superiores (**Figura 9**).

El principio de Ramachandran establece que las hélices α , las hojas β y los giros son las conformaciones más probables para una cadena polipeptídica debido a la minimización de impedimentos estéricos entre átomos (**Figura 10**).

En el primer cuadrante se encuentran las combinaciones de la hélice α izquierda, en el segundo cuadrante se localizan las combinaciones de la hoja β , mientras que en el tercer cuadrante se encuentran la hélice α derecha y los giros o bucles (loops).

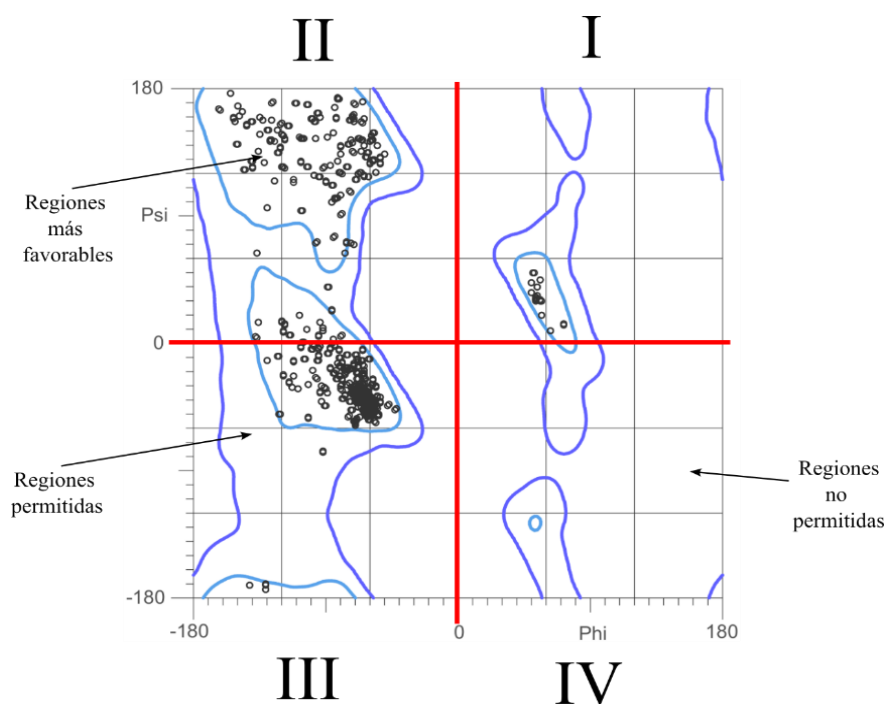


Figura 10. Representación del diagrama de Ramachandran. Se muestran las diferentes regiones que los residuos pueden explorar.

Este diagrama es una forma de visualizar las regiones energéticamente permitidas para los ángulos diedros del esqueleto de una proteína, lo que permite predecir cuál será la estructura secundaria del polipéptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura. Asimismo, permite saber si la estructura peptídica de la proteína es correcta.

1.8 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular, también conocido como *docking* molecular es una técnica computacional que nos ayuda a predecir las poses (conformaciones y orientaciones) más favorables de un ligante respecto a una macromolécula (receptor, enzima, entre otros) (**Figura 11**). La selección de dichas poses se basa en un conjunto de parámetros que contribuyen a la estabilidad de la unión entre el ligante y la macromolécula. El proceso se basa en algoritmos que contemplan funciones de energía y descriptores conformacionales que evalúan la complementariedad entre las superficies de la macromolécula y el ligante, de esta manera se selecciona el mejor modo de enlace.

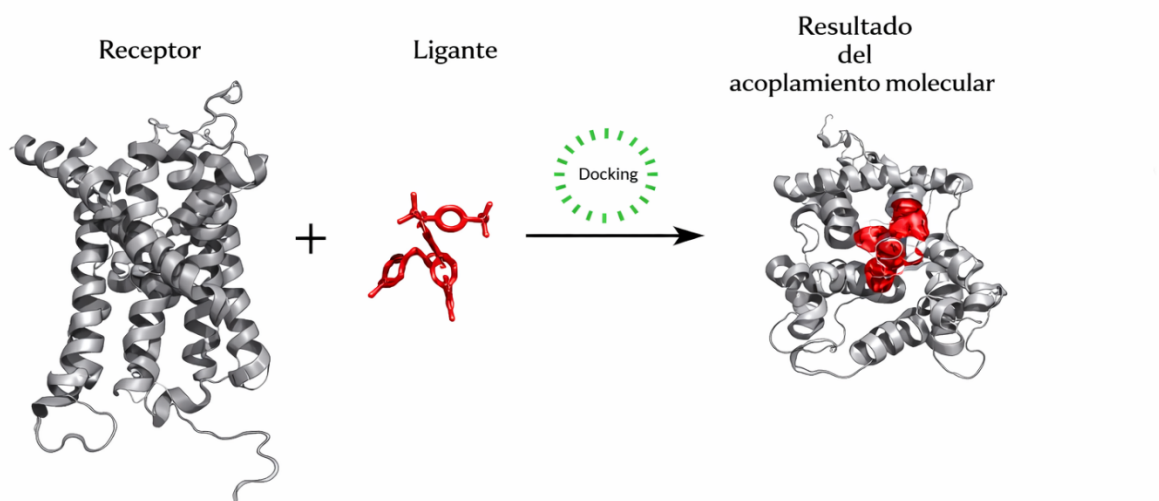


Figura 11. Representación gráfica del acoplamiento molecular (Morales-Dávila 2024).

Existen diversos programas y servidores *online* para realizar acoplamiento molecular, sin importar qué programa utilices el protocolo tradicional se puede dividir en:

1. **Preparación de la macromolécula.** Es necesario tener una estructura tridimensional de la macromolécula que será nuestra diana, para este paso existen bases de datos o métodos de predicción estructural de proteínas. Dependiendo de cómo se obtuvo la estructura, será necesario eliminar moléculas de agua, detergentes, lípidos y cualquier compuesto que no corresponda a la macromolécula. Una vez “limpia” la macromolécula se procede a añadir hidrógenos polares y calcular las cargas para cada aminoácido.
2. **Preparación del ligante.** Los ligantes pueden ser moléculas conocidas y estar almacenadas en una base de datos o ser predicha por medio computacionales. Dependiendo del modo en el que se obtuvo el ligante se tendrá que calcular la carga para la molécula y añadir hidrógenos polares.
3. **Asignación del espacio de búsqueda (*grid box*).** Un paso crucial para explorar un espacio determinado en la macromolécula es la formación de una caja de búsqueda, donde obtendremos parámetros del tamaño de la caja en los ejes X, Y y Z, el centro de dicha caja y el espaciado de búsqueda. Dependiendo de las dimensiones del espacio de búsqueda el acoplamiento molecular se puede clasificar en dos:
 - **El acoplamiento molecular ciego.** El espacio de búsqueda es lo suficientemente grande como para cubrir toda la superficie de la macromolécula. Esto significa que el ligante explora las cavidades y sitios de unión de la macromolécula sin sesgos.
 - **El acoplamiento molecular dirigido.** El espacio de búsqueda se define en una región determinada de la macromolécula.
4. **Realizar el acoplamiento molecular.** Tras finalizar los pasos anteriores se utiliza un programa para integrar y realizar el acoplamiento molecular.
5. **Análisis de datos.** En este paso se analizan los resultados que genera el programa computacional que realiza el acoplamiento molecular, donde obtenemos la información de las interacciones que forma el complejo macromolécula/ligante.

Para realizar el acoplamiento molecular se usó el programa *Autodock Vina* y para realizar la preparación del sistema (las macromoléculas, los ligantes y los espacios de búsquedas) se utilizó la interfaz gráfica *Autodock tools*.

El acoplamiento molecular ha evolucionado significativamente, convirtiéndose en una etapa clave para la búsqueda de moléculas prometedoras como posibles fármacos. Este enfoque es esencial para optimizar sustancias químicas, mejorando su afinidad y selectividad hacia objetivos

específicos, lo que acelera el desarrollo de medicamentos más seguros y eficaces (Velásquez *et al.*, 2013; Puacara & Torrez, 2019; Vargas-Aguilar & Fuentes-Condori, 2021).

Capítulo 2

2. Justificación

El presente trabajo de investigación tiene como finalidad proporcionar información detallada a nivel atómico-molecular sobre los sitios de interacción y los modos de unión del cannabidiol (CBD) a las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). La importancia de este estudio consiste en la función esencial de las ciclooxigenasas en el metabolismo del ácido araquidónico, mecanismo que produce prostaglandinas y tromboxanos, mediadores lipídicos asociados con la inflamación y el dolor.

Es importante resaltar que, si bien existen inhibidores de la función enzimática de las ciclooxigenasas, la mayoría de ellos presentan efectos adversos. En este contexto, el cannabidiol (CBD) surge como un potencial inhibidor alternativo, con la posibilidad de minimizar los efectos adversos relacionados a los inhibidores tradicionales.

Para llevar a cabo el estudio sobre los sitios de interacción y los modos de unión del cannabidiol (CBD) a las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) se utilizarán métodos computacionales que proporcionan información detallada sobre las características de la formación del complejo CBD/COX. Estos métodos incluirán la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas y acoplamiento molecular.

2.1 Hipótesis

El cannabidiol (CBD) interactúa alostéricamente sobre las ciclooxigenasas (COX), induciendo cambios conformacionales en el sitio activo. Dichos cambios impiden la apertura del sitio activo o competir con componentes necesarios en el proceso catalítico, como el cofactor enzimático. Dichas alteraciones conducen a la posible disminución en la producción de prostaglandinas y tromboxanos, mediadores lipídicos asociados a la inflamación y el dolor. El estudio computacional de las interacciones moleculares permitirá esclarecer los sitios y modos de interacción del CBD.

2.2 Objetivo general

- I. Demostrar la interacción del cannabidiol (CBD) con las enzimas COX-1 y COX-2 a través de acoplamiento molecular en los modelos enzimáticos de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*).

2.3 Objetivos particulares

1. Obtener las estructuras tridimensionales de las enzimas ciclooxygenasa 1 (COX-1) y ciclooxygenasa 2 (COX-2) correspondientes a las especies *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, mediante el análisis de bases de datos estructurales.
2. Construir modelos tridimensionales mediante *AlphaFold* para aquellas estructuras no disponibles experimentalmente y validar su calidad mediante herramientas de evaluación.
3. Realizar estudios de acoplamiento molecular entre las enzimas COX seleccionadas y sus diversos ligantes: sustrato endógeno: ácido araquidónico (AA); endocannabinoide: 2-araquidonilglicerol (2-AG); fármacos inhibidores: ácido acetilsalicílico (ASA), ácido salicílico (AS), ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam y celecoxib.
4. Validar los resultados obtenidos del acoplamiento molecular mediante la comparación con complejos cristalográficos disponibles en bases de datos experimentales y analizar los sitios de unión preferenciales del cannabidiol (CBD) sobre COX-1 y COX-2.

2.4 Metodología

1. Obtención de estructuras proteicas

Se obtuvieron las estructuras cristalinas de las enzimas ciclooxigenasas de humano (hCOX-1 y hCOX-2) y la ciclooxigenasa 2 de ratón (mCOX-2) a partir del banco de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank). Las estructuras que se seleccionaron tienen una resolución de difracción de rayos X entre 2.3 y 3 Å, y se comprobó que correspondieran a secuencias nativas (sin mutaciones). Las secuencias primarias correspondientes se consultaron en el banco de datos de Uniprot.

2. Predicción de estructuras tridimensionales

En vista de la ausencia de información estructural para las enzimas ciclooxigenasas de rata (rCOX-1 y rCOX-2) y de la ciclooxigenasa 1 de ratón (mCOX-1), se generaron modelos tridimensionales usando *AlphaFold*, herramienta de predicción de estructuras proteicas basada en inteligencia artificial. La calidad y precisión de los modelos se validó mediante el parámetro pLDDT proporcionado por *AlphaFold* y por los diagramas de Ramachandran.

3. Preparación de los sistemas para el acoplamiento molecular.

Los sistemas enzimáticos para el acoplamiento molecular se prepararon utilizando el programa *Autodock Tools*. Se añadieron hidrógenos polares y se calcularon las cargas parciales de Kollman. Por otro lado, los ligantes se obtuvieron de la base de datos ZINC20 y se prepararon de forma similar a las enzimas, es decir, se agregaron hidrógenos polares y cargas parciales de Gasteiger. Los archivos de las estructuras preparadas se guardaron en formato PDBQT.

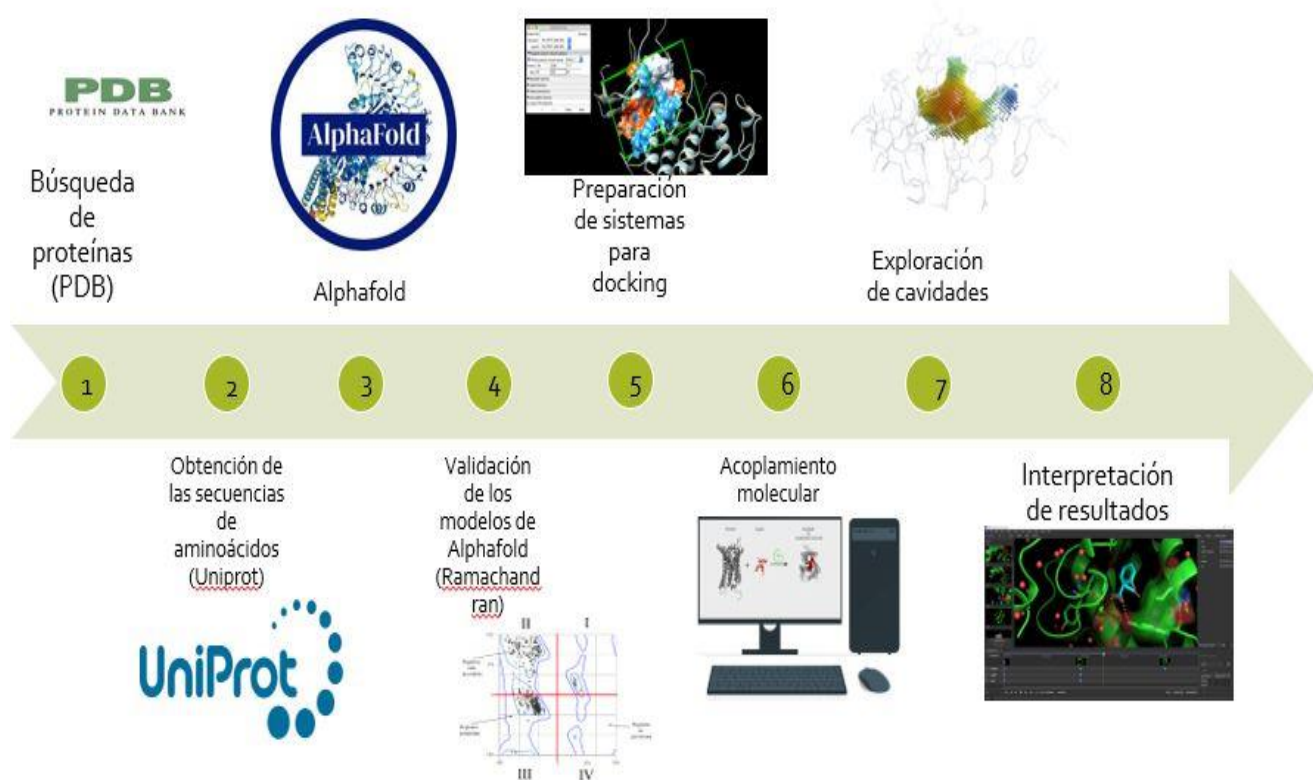
4. Acoplamiento molecular

Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron con el programa *Autodock Vina*. Se definieron dos espacios de búsqueda, el primero que cubriera un monómero de las ciclooxigenasas homodiméricas (para realizar un acoplamiento molecular ciego) y el segundo que cubriera el sitio de activo conocido para cada enzima (para realizar un acoplamiento molecular dirigido). Se realizaron acoplamientos moleculares para nueve ligantes y seis enzimas, lo que dio un total de 54 arreglos enzima/ligante para cada tipo de acoplamiento.

5. Análisis de resultados

Los resultados del acoplamiento molecular se analizaron con el visualizador *PyMol*. Se identificaron las poses para cada ligante. Particularmente, para el ácido araquidónico (AA), el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), el ácido acetilsalicílico (AAS), el ácido salicílico (AS), ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam, celecoxib se compararon con información experimental. Por otra parte, para el caso del cannabidiol (CBD), se evaluó el sitio y los modos de interacción con las ciclooxygenasas.

Para analizar las cavidades se utilizó un subprograma denominado *CavitOmix* implementado en *Pymol*.



Capítulo 3

3. Resultados y discusión

Siguiendo la metodología establecida para realizar el estudio computacional de las enzimas ciclooxigenasas en *Homo sapiens* (hCOX), *Mus musculus* (mCOX) y *Rattus norvegicus* (rCOX), se procedió a estudiar las secuencias primarias con el objetivo de identificar diferencias y similitudes, tanto entre las dos isoformas hCOX-1 y hCOX-2 (**Figura 12**) como entre la misma isoforma de COX para las especies estudiadas (**Figura 13**).

El alineamiento de las secuencias de hCOX-1 (código Uniprot P23219) y hCOX-2 (código Uniprot P35354) se realizó a través servidor Blastp. Los resultados demostraron que la identidad entre hCOX-1 y hCOX-2 es de aproximadamente el 65%, de forma análoga sucede con las demás especies estudiadas. Si bien, existen diferencias en sus secuencias, los residuos de aminoácidos cruciales en la actividad catalítica de ambas isoformas se conservan. Así mismo, un número significativo de las diferencias encontradas corresponden a residuos con propiedades fisicoquímicas semejantes.

Basado en lo mencionado antes, y a pesar de las diferencias en la secuencia primaria, las estructuras tridimensionales de COX-1 y COX-2 muestran una similitud notable.

Posteriormente, se realizaron alineamientos de las secuencias de COX-1 y COX-2 entre las tres especies de interés. Con ese propósito, se usaron las secuencias primarias almacenadas en la base de datos Uniprot con los siguientes códigos de acceso: P23219 (hCOX-1), P35354 (hCOX-2), P22437 (mCOX-1), Q05769 (mCOX-2), Q63921 (rCOX-1) y P35355 (rCOX-2).

Los resultados mostraron una identidad aproximada del 90% para COX-1 y del 86% para COX-2 entre las tres especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

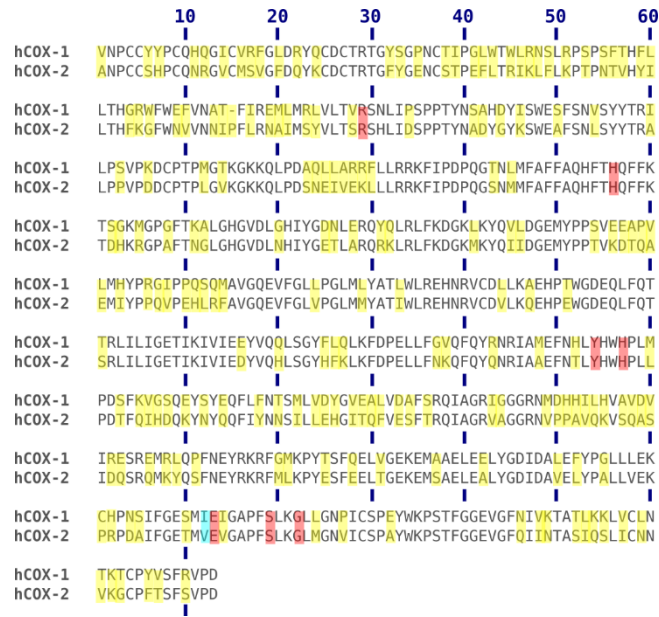


Figura 12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la ciclooxigenasa 1 y la ciclooxigenasa 2 de la especie *Homo sapiens* (hCOX-1 y hCOX-2). Las diferencias en las secuencias se resaltan en color amarillo, los aminoácidos implicados en la catálisis y actividad de la enzima se resaltan en color rojo y un aminoácido implicado en la apertura del canal hidrofóbico de la enzima se resalta en color cian.

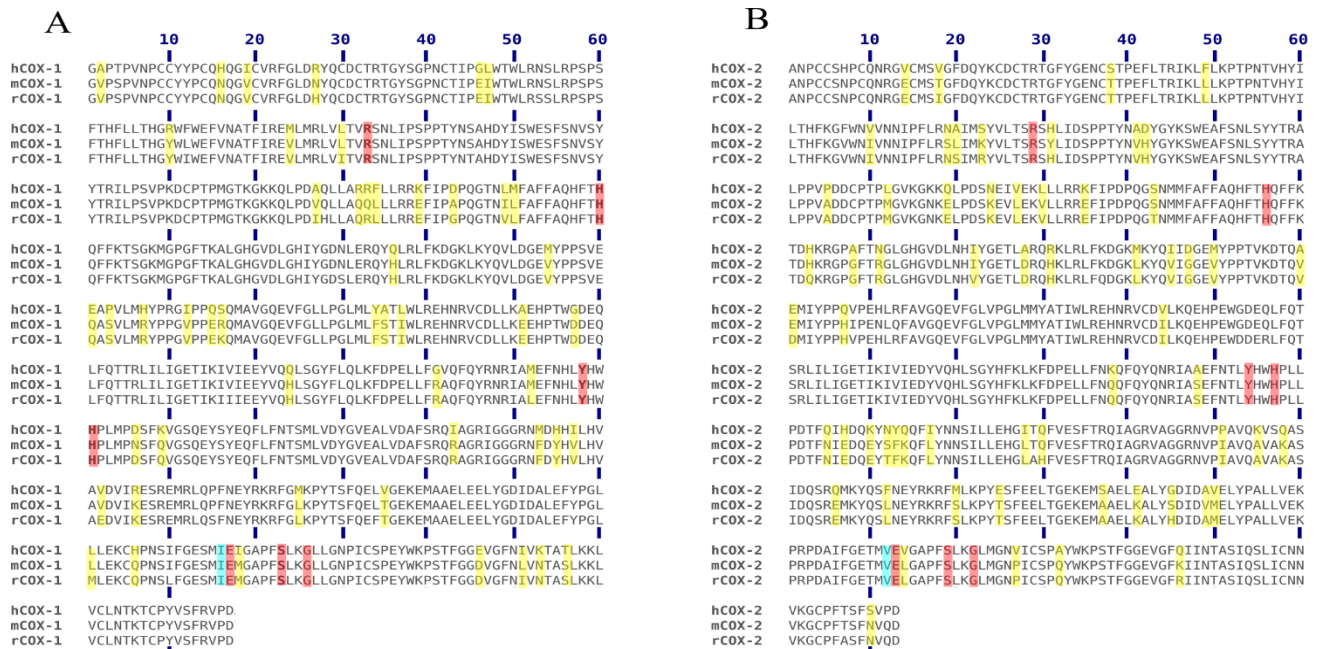


Figura 13. Alineamiento de las secuencias de la (A) ciclooxigenasa 1 y la (B) ciclooxigenasa 2 de las especies *Homo sapiens* (hCOX-1 y hCOX-2), *Mus musculus* (mCOX-1 y mCOX-2) y *Rattus norvegicus* (rCOX-1 y rCOX-2). Las diferencias en las secuencias se resaltan en color amarillo, los aminoácidos implicados en la catálisis y actividad de la enzima se resaltan en color rojo y un aminoácido implicado en la apertura del canal hidrofóbico de la enzima se resalta en color cian.

Basándose en las estructuras primarias de las proteínas, podemos destacar la diferenciación de aminoácidos clave en el bolsillo de unión entre las diferentes especies. Estas diferencias corresponden a la sustitución de isoleucina por valina, cuyas características estructurales son distintas; además ambos son aminoácidos esenciales. Aunque ambos residuos son constituidos por aminoácidos alifáticos, apolares y esenciales, presentan diferencias estructurales en su longitud y ramificación de sus cadenas laterales, lo cual puede modificar la conformación tridimensional del bolsillo de unión, así como el volumen y las propiedades estéricas del sitio activo. Estas variables podrían influir en la afinidad y la orientación del ligante, afectando potencialmente los parámetros cinéticos y la interacción ligante-proteína.

Posteriormente del análisis de las secuencias primarias de las ciclooxigenasas, se procedió a buscar las estructuras tridimensionales ya existentes en la base de datos de proteínas, PDB. Se encontraron las siguientes estructuras: para *Homo sapiens* se encontró la estructura de hCOX-1 con el código PDB 6Y3C y para hCOX2 se encontró más de una estructura, sin embargo, seleccionamos la estructura con el código PDB 5F1A, para *Mus musculus* solo se encontró información estructural para mCOX-2 y seleccionamos la información contenida en el código PDB 3HS5, mientras que para *Rattus norvegicus* no se encontró información estructural.

La falta de estructuras tridimensionales para mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2 se debe a la complejidad que conlleva obtener datos experimentales obtenidos por difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN).

Debido a la ausencia de información experimental para mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2, se utilizó un método computacional para generar estructuras tridimensionales de proteínas. Particularmente, se empleó el servidor *AlphaFold*, una herramienta que permite predecir un modelo tridimensional a partir de la secuencia primaria.

Se usaron las secuencias primarias previamente analizadas y disponibles en la base de datos Uniprot con los siguientes códigos: P22437 (mCOX-1), Q63921 (rCOX-1) y P35355 (rCOX-2).

Una vez finalizado el protocolo de *AlphaFold* se proporciona un parámetro denominado como pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*) que ayuda a evaluar la calidad de los modelos generados. El parámetro pLDDT estima la confianza de cada residuo en la estructura proteica predicha, es decir, que evalúa la posición de un aminoácido en particular e indica si es

correcta. Un valor alto de pLDDT indica una alta confianza en la posición de los residuos y en la interfase entre cadenas.

Los modelos para mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2 mostraron valores de pLDDT mayores a 90, lo que indica una muy alta fiabilidad (**Figura 14**).

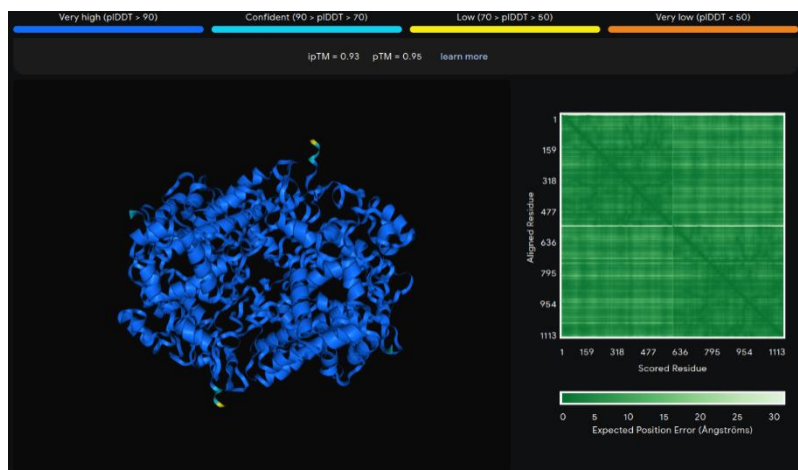


Figura 14. Ejemplo de los valores de fiabilidad dados por el servidor *AlphaFold* para los modelos de mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2. Los tres modelos muestran un valor de pLDDT similar. El color azul indica una fiabilidad muy alta, el cian una fiabilidad aceptable, el color amarillo una fiabilidad baja y el color naranja una fiabilidad muy baja.

El análisis del modelo estructural mostro valores elevado de pLDDT (>90) en la mayoría de los residuos, indicando un valor alto de confiabilidad en la predicción tridimensional. El mapa de error alineado (PAE) presento baja variabilidad inter-residuo, lo que sugiere coherencia estructural global y ausencia de dominios con movilidad independiente significativa. Estos resultados validan la idoneidad del modelo para estudios de interacción molecular posteriores. Con el propósito de validar la precisión de los modelos tridimensionales de mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2 generados por *AlphaFold*, se calcularon los diagramas de Ramachandran para cada modelo, evaluando la distribución de los ángulos diedros *psi* y *phi* para cada residuo. Los resultados indican que la mayoría de los residuos se encuentran dentro de regiones permitidas, lo que sugiere que los modelos predijeron de manera correcta las estructuras tridimensionales (**Figura 15**). La combinación permitida de un par de ángulos *phi* y *psi* corresponde a regiones favorables que evitan colisiones estéricas entre los átomos de la cadena principal y las cadenas laterales.

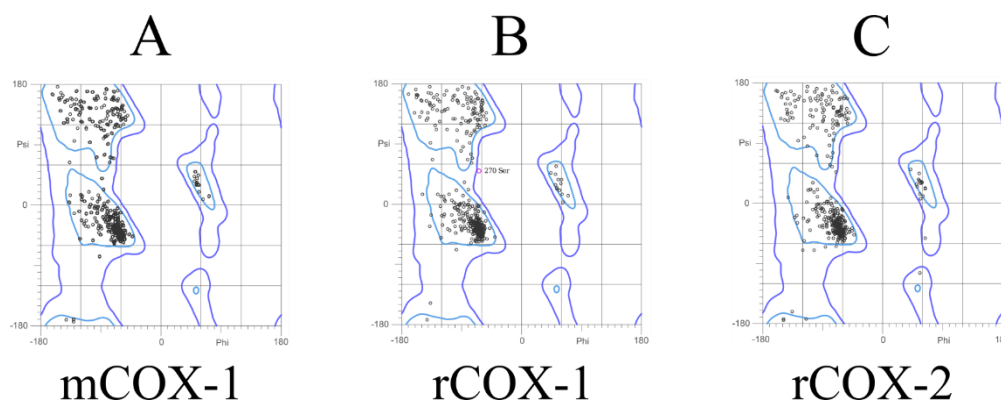


Figura 15. Diagramas de Ramachandran calculados para los modelos de A) mCOX-1, B) rCOX-1 y C) rCOX-2. El diagrama indica las regiones permitidas basadas en los ángulos diedros *psi* y *phi* que pueden explorar los aminoácidos al plegarse.

El análisis de los diagramas de Ramachandran demostró que más del 90% de los residuos se encuentran en regiones favorecidas y permitidas para las tres estructuras evaluadas (**Figura 15**), lo cual indica una adecuada calidad estereoquímica de los modelos estructurales. La distribución predominante en las regiones correspondientes a α -hélice y lámina β confirma la estabilidad conformacional global. No se observaron desviaciones significativas que comprometieran la validez estructural para los posteriores estudios de interacción molecular. Las estructuras evaluadas presentan predominancia de conformaciones correspondientes a α -hélices dextrógiras, consistentes con la configuración L de los aminoácidos naturales, lo que confirma la estabilidad estructural y el plegamiento correcto de las enzimas COX analizadas.

Una vez validada la calidad y precisión de los modelos tridimensionales para mCOX-1, rCOX-1 y rCOX-2, y utilizando las estructuras experimentales disponibles en la base de datos de proteínas con los códigos 6Y3C (hCOX-1), 5F1A (hCOX-2) y 3HS5 (mCOX-2) (**Figura 16**), se procedió a identificar los sitios de interacción del cannabidiol (CBD).

Así mismo, con el fin de corroborar la precisión del acoplamiento molecular en la predicción de los sitios de unión de las ciclooxygenasas (COX), se seleccionaron nueve ligantes que interactúan con estas enzimas. La selección de dichos ligantes permitió comparar los resultados del acoplamiento molecular con datos experimentales, de esta manera se validó la metodología empleada.

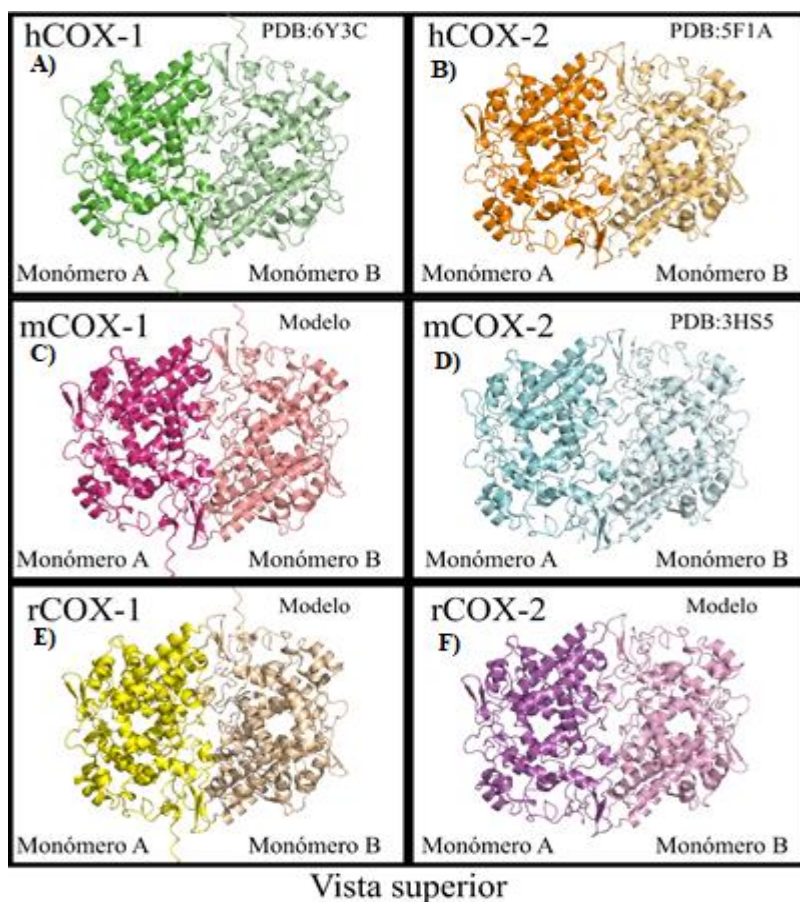


Figura 16. Vista superior de las estructuras tridimensionales de: A) hCOX-1(PDB: 6Y3C), B) hCOX-2 (PDB: 5F1A), C) mCOX-1 (Modelo), D) mCOX-2 (PDB: 3HS5), E) rCOX-1 (Modelo) y F) rCOX-2 (Modelo).

Los ligantes seleccionados incluyen tanto el sustrato endógeno: ácido araquidónico (AA) como inhibidores farmacológicos: el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), el ácido acetilsalicílico (AAS), el ácido salicílico (AS), ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam, celecoxib y el cannabidiol (CBD), véase **Figura 17**.

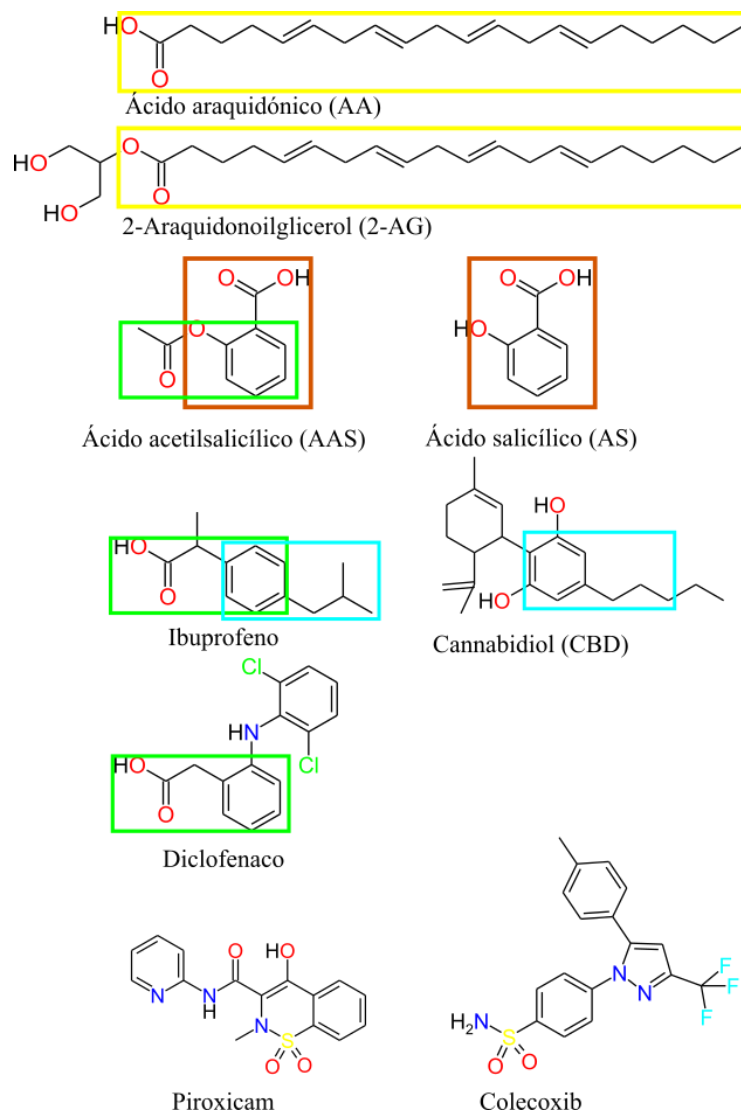


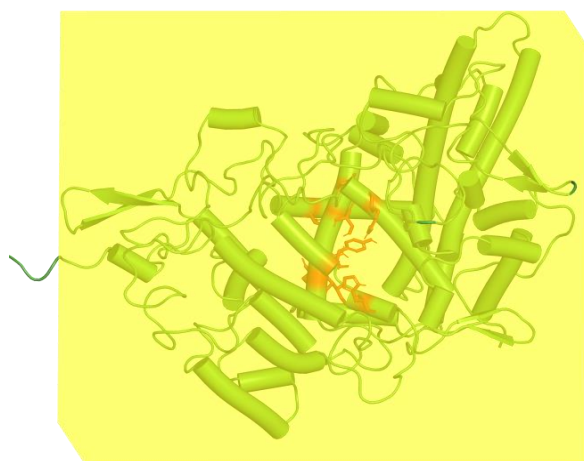
Figura 17. Ligantes utilizados en el acoplamiento molecular con la COX-1 y COX-2 de las especies *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*. Los recuadros en color amarillo muestran las similitudes entre el ácido araquidónico (sustrato natural de las ciclooxygenasas) y el 2-araquidonilglicerol (endocannabinoide). Los recuadros rojos muestran las similitudes entre el ácido acetilsalicílico y el ácido salicílico. El recuadro verde muestra las similitudes entre el ibuprofeno, diclofenaco y el ácido acetilsalicílico. El recuadro cian muestra las similitudes entre el ibuprofeno y el cannabidiol.

Para realizar acoplamiento molecular con el programa *Autodock Vina*, es necesario preparar adecuadamente el sistema, es decir, agregar solo hidrógenos polares y calcular las cargas para cada ligante y cada enzima.

Una vez realizado lo anterior se requiere que las estructuras de los ligantes y enzimas se guarden en un formato PDBQT, el cual incluye la información de las coordenadas atómicas, tipo de átomos y cargas.

Otro paso fundamental es la asignación de una caja de búsqueda (*grid box*), donde los ligantes exploraran diferentes conformaciones hasta encontrar las más favorables y de menor energía.

Para el estudio de las ciclooxigenasas y con el fin de simplificar las cajas de búsqueda (considerando que las estructuras tridimensionales de las ciclooxigenasas son semejantes), se realizó un alineamiento estructural para las COX-1 y COX-2 de las tres especies, así se utilizaron las mismas coordenadas y las dimensiones de la caja. Además, para reducir el tiempo de búsqueda, se empleó solo un monómero de la estructura homodimérica de las ciclooxigenasas. Inicialmente, se realizaron acoplamiento molecular ciegos con una caja de búsqueda de dimensiones de 60 Å, 70 Å y 62 Å en los ejes X, Y y Z respectivamente (**Figura 18**).



Vista superior

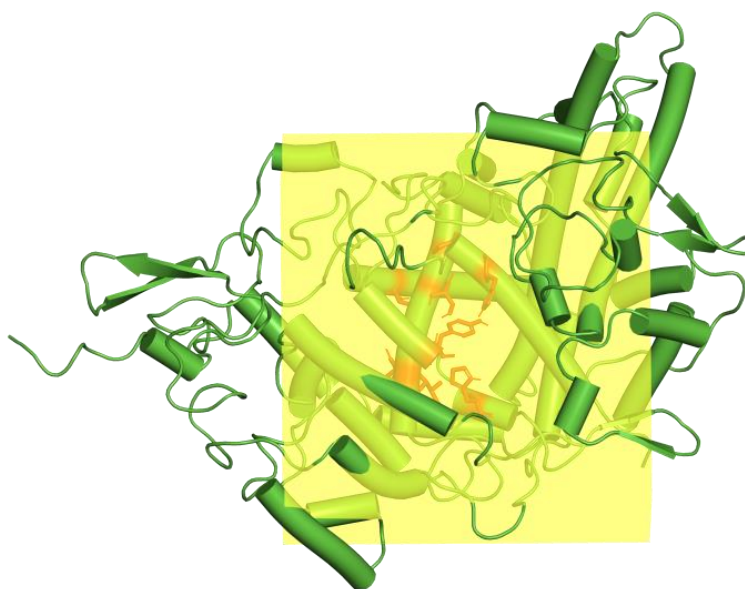
Figura 18. Ejemplo de la caja de búsqueda (*grid box*) para realizar acoplamiento molecular ciegos, la enzima se representa en *cartoon* color verde con las hélices en forma de tubos, los aminoácidos del canal hidrofóbico se representan en color rojo en *licorice*.

Además, utilizamos un espaciado de búsqueda de 1.0 Å y una alta exhaustividad (64) para compensar el tamaño de la caja.

Sin embargo, los resultados de esta aproximación no fueron favorables, ya que los sitios que exploran los ligantes no son comparables con los datos experimentales disponibles en estructuras cristalizadas con los mismos ligantes. En la información experimental, los ligantes

(AINEs y sustrato natural) exploran un canal hidrofóbico que está bien caracterizado y corresponde al sitio activo de la enzima.

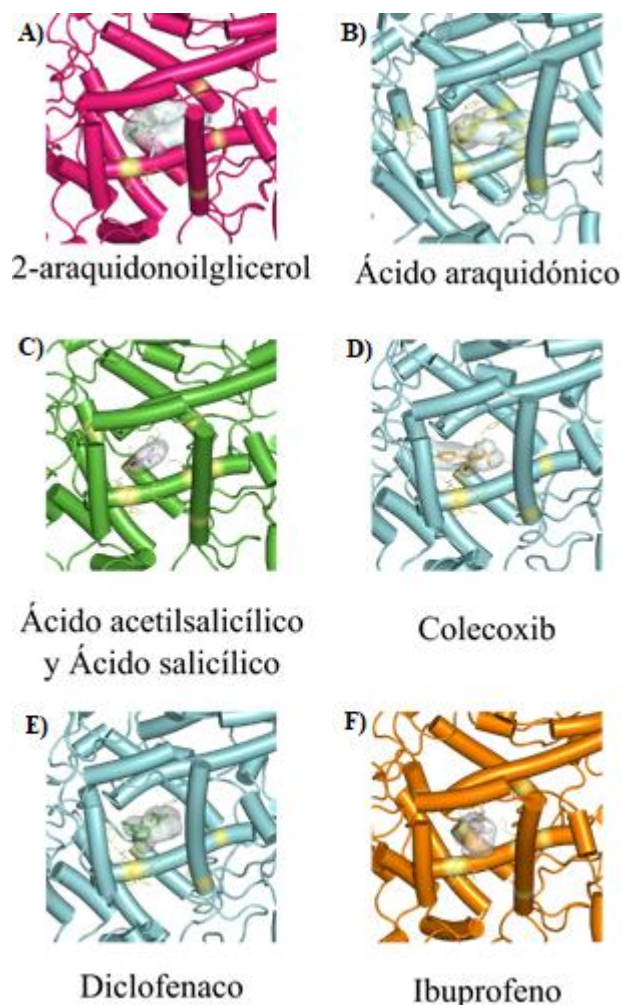
La diferencia entre los resultados del acoplamiento molecular y los datos experimentales pueden generarse por las grandes dimensiones de la caja de búsqueda ($260,400 \text{ \AA}^3$) y aunado a los diversos grados de libertad que tienen los ligantes. Con esto en mente, se realizó una segunda aproximación, donde se redujeron las dimensiones de la caja de búsqueda (a $40 \text{ \AA}$ para los tres ejes) y el espaciado de búsqueda (a $0.375 \text{ \AA}$). La exhaustividad (de 64) se mantiene y la caja de búsqueda se situó en la proximidad del canal hidrofóbico (**Figura 19**).



Vista superior

Figura 19. Ejemplo de la caja de búsqueda (*grid box*) para realizar acoplamientos moleculares en los canales hidrofóbicos de las COX, la enzima se representa en *cartoon* color verde con las hélices en forma de tubos, los aminoácidos del canal hidrofóbico se representan en color rojo en *licorice*.

Los resultados del acoplamiento molecular para la segunda aproximación (al disminuir el tamaño de la caja) mostraron que los ligantes seleccionados (AINEs, ácido araquidónico y 2-araquidonilglicerol) exploran sitios similares a los obtenidos de forma experimental (**Figura 20**). Por lo cual se confirma que, el acoplamiento molecular predice de manera correcta los sitios de interacción entre las COXs y los ligantes seleccionados, con esto en mente se analizaron los resultados obtenidos para el cannabidiol (CBD).



Vista inferior

Figura 20. Comparación de los resultados de los AINEs representados en *licorice*, A) el 2-araquidonoilglicerol en color blanco, B) ácido araquidónico en color amarillo, C) el ácido acetilsalicílico en color violeta, D) el celecoxib en color naranja, E) el diclofenaco en color verde, F) ibuprofeno en color salmón. En todos los casos se representaron los aminoácidos de importancia en el canal hidrofóbico en líneas color amarillo y el sitio de los ligantes cristalizados en estructuras de ciclooxigenasas se representan en superficies transparentes color cian.

Se obtuvieron un total 54 poses para el cannabidiol (CBD), es decir, nueve poses por cada ciclooxigenasa, dichas poses se ubicaron en una estructura tridimensional representativa de las seis COXs, recordando que las COXs guardan una similitud estructural y fueron alineadas entre sí. Al situar las 54 poses se observó que el CBD explora con mayor frecuencia tres sitios. Por lo tanto, se procedió a estudiar las cavidades de las enzimas ciclooxigenasas. Para ello se utilizó el subprograma CavitOmix implementado en el visualizador Pymol. En dicho estudio se encontraron cuatro cavidades con mayor superficie, las cuales denominamos: cavidad A con un

volumen de 2,859 Å³, cavidad B con un volumen de 1,590 Å³, cavidad C con un volumen de 760 Å³ y sitio activo con 154 Å³ (**Figura 21**).

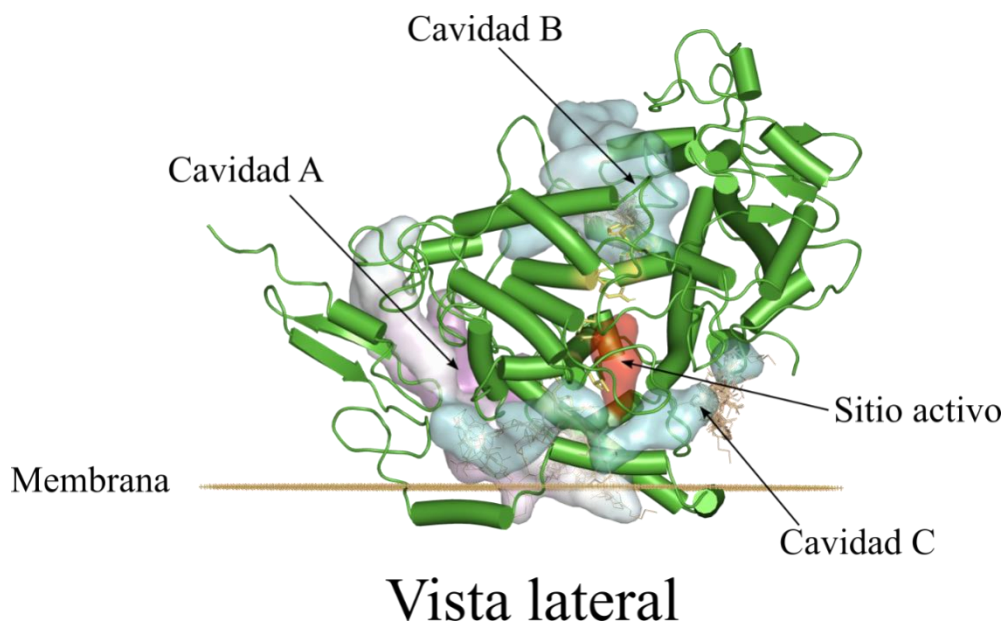


Figura 21. Representación de los sitios donde interactúa el cannabidiol (CBD) representado en líneas color *wheat*, se observan tres posiciones con mayor frecuencia que corresponden a las cavidades A, B y C (representadas en superficies en un degradado de mayor a menor de magenta-blanco-cian). El sitio activo se representa en superficie roja.

Los sitios que explora el CBD concuerdan con las cavidades con mayor volumen. De estas, la que tiene una mayor frecuencia es la cavidad C con un 43%, seguida de la cavidad A con un 41% y por último la cavidad B con 13%.

La cavidad B concuerda con el sitio que ocupa el cofactor en las estructuras tridimensionales almacenadas en PDB, mientras que la cavidad A corresponde a la entrada del canal hidrofóbico de la enzima. Por otro lado, la cavidad C se encuentra cercana al sitio activo y comparten una hélice alfa.

De los resultados de los análisis antes mencionados, se sugiere que el CBD se enlaza a las ciclooxigenasas de manera alostérica, en consecuencia, modificando de alguna forma tanto la entrada del canal hidrofóbico como la cavidad del sitio activo. De modo que la producción de prostaglandinas se vea afectada y con ello los efectos de la inflamación y el dolor.

Por otra parte, se observó con más detalle los sitios de unión del cannabidiol (CBD). Para ello se seleccionó una pose representativa del CBD para cada sitio. La pose fue seleccionada bajo el criterio de la energía de unión estimada por el programa *Autodock Vina*, es decir, la pose más favorable y para definir el bolsillo de unión se seleccionaron los aminoácidos una distancia de 4 Å respecto a la estructura del cannabidiol (CBD).

En la cavidad C, identificada como la de mayor frecuencia de interacción con el CBD, se observaron tres de puente de hidrógeno cruciales para que estabilice la pose del CBD. Las interacciones son formadas por:

- Uno de los grupos hidroxilo (-OH) de la estructura del CBD y el átomo de oxígeno de la cadena principal del residuo Y355.
- El mismo -OH de la estructura del CBD y los átomos de oxígeno de la cadena principal y el nitrógeno de la cadena lateral del residuo Q350.

Estas interacciones de puente de hidrógeno desempeñan un papel fundamental en la estabilización de la posición que adopta el CBD dentro de la cavidad C (**Figura 22**).

Además, la posición del CBD podría afectar el reordenamiento y el volumen del sitio activo, de manera que se inhiba la producción de prostaglandinas de forma indirecta.

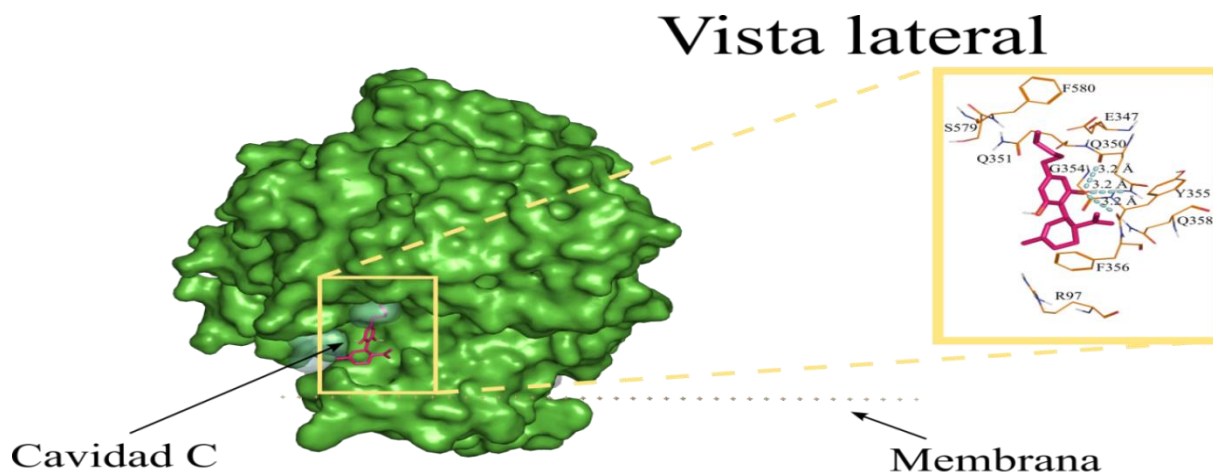


Figura 22. Vista lateral de la estructura representativa de la ciclooxygenasa (COX). El cannabidiol (CBD) se representa en *licorice* color rosa fuerte. La enzima COX se representa en superficie color verde. El espacio de la cavidad C se representa en superficie transparente color cian. Los aminoácidos del bolsillo se representan en líneas color naranja. Los puentes de hidrógeno se representan en líneas punteadas color cian.

En la cavidad A, identificada como la segunda con mayor frecuencia de interacción con el CBD, se observaron dos puentes de hidrógeno fundamentales para estabilizar la posición del CBD en la proximidad de la entrada del canal hidrofóbico de la enzima COX (**Figura 23**). Los puentes de hidrógeno fueron formados por:

- Uno de los grupos hidroxilo (-OH) de la estructura del CBD y uno de los átomos nitrógeno del grupo guanidinio (H-N=(NHR)NH₂) del residuo R120.
- El mismo -OH de la estructura del CBD y uno de los oxígenos del grupo carboxilo (-COOH) del residuo E524.

Dichas interacciones de puente de hidrógeno desempeñan un papel importante en la estabilización de la posición que adopta el CBD dentro de la cavidad A y es posible que impidan la entrada del sustrato natural de las ciclooxigenasas, de esa manera inhibiendo la actividad de la enzima.

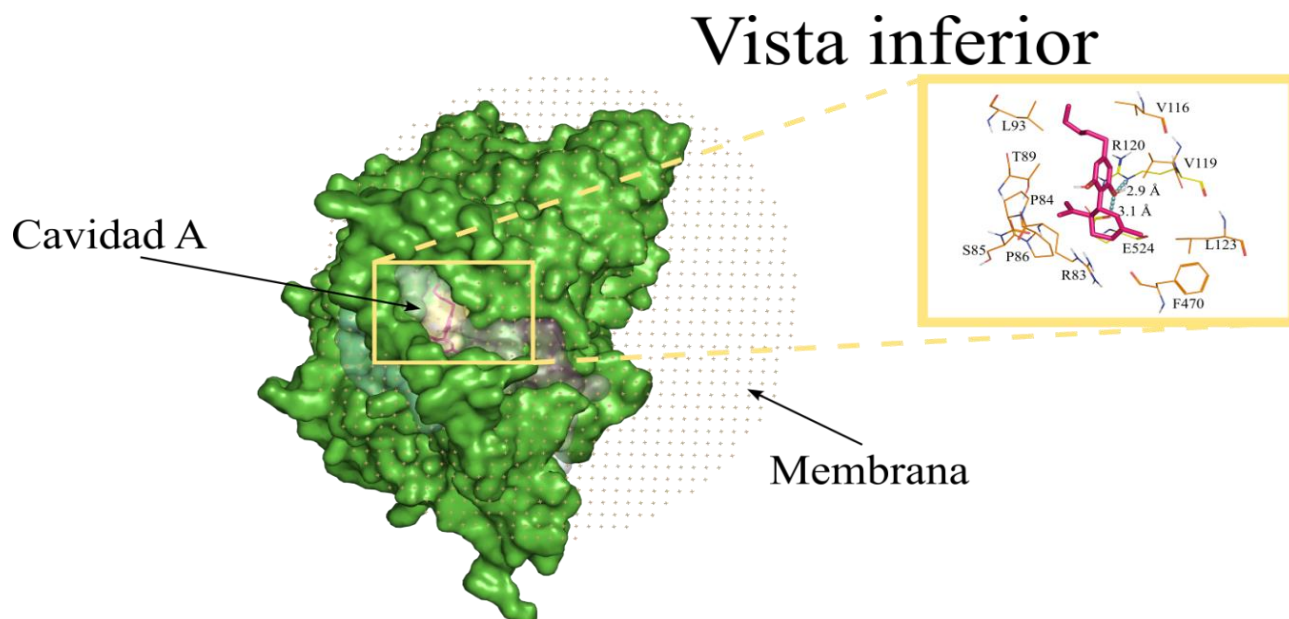


Figura 23. Vista lateral de la estructura representativa de la ciclooxigenasa (COX). El cannabidiol (CBD) se representa en *licorice* color rosa fuerte. La enzima COX se representa en superficie color verde. El espacio de la cavidad C se representa en superficie transparente color cian. Los aminoácidos del bolsillo se representan en líneas color naranja y los aminoácidos que son relevantes en la función de la enzima ciclooxigenasa se diferencian en color amarillo. Los puentes de hidrógeno se representan en líneas punteadas color cian.

En la cavidad B, identificada como la de menor frecuencia de interacción con el CBD, se observaron dos puentes de hidrógeno que estabilizan la posición del CBD en el sitio que

normalmente es utilizado por el cofactor enzimático de la enzima COX (**Figura 24**). Los puentes de hidrógeno fueron formados por:

- Uno de los grupos hidroxilo (-OH) de la estructura del CBD y el un átomo de nitrógeno del grupo imidazol (C₃H₄N₂) del residuo H207.
- El mismo -OH de la estructura del CBD y el grupo amino (-NH₂) del residuo Q203.
- El otro grupo hidroxilo (-OH) de la estructura del CBD y el átomo de nitrógeno de la cadena principal del residuo W387.

Estas interacciones de puente de hidrógeno desempeñan un papel fundamental en la estabilización de la posición que adopta el CBD dentro de la cavidad B. Asimismo, es posible que el CBD compita por ese sitio de unión con el cofactor enzimático interrumpiendo sus funciones y de esa manera inhibiendo la actividad enzimática.

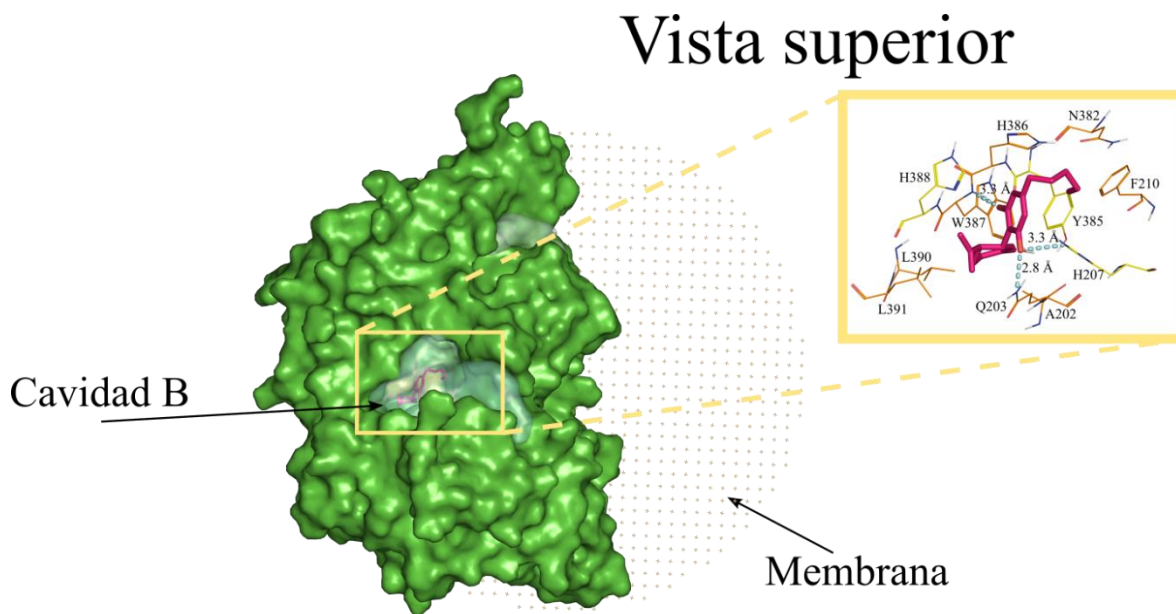


Figura 24. Vista superior de la estructura representativa de la ciclooxigenasa (COX). El cannabidiol (CBD) se representa en *licorice* color rosa fuerte. La enzima COX se representa en superficie color verde. El espacio de la cavidad C se representa en superficie transparente color cian. Los aminoácidos del bolsillo se representan en líneas color naranja y los aminoácidos que son relevantes en la función de la enzima ciclooxigenasa se diferencian en color amarillo. Los puentes de hidrógeno se representan en líneas punteadas color cian.

Al analizar con más detalle los bolsillos de unión entre el cannabidiol (CBD) y las ciclooxigenasas, se sustentaron más las ideas de que la unión alostérica podría modificar tanto el acceso al canal hidrofóbico por la interacción del CBD con los residuos R120 y E524 (aminoácidos que funcionan como una compuerta en la entrada del canal hidrofóbico) como el espacio del sitio activo por el impedimento indirecto que podría generar el CBD en la cavidad C. Además, es importante señalar que la interacción del CBD en el sitio de unión del cofactor enzimático alteraría la función de las ciclooxigenasas, debido a la competencia por dicho sitio. Lo anterior conduce a una alteración en la producción de prostaglandinas y con ello los efectos sobre la inflamación y el dolor.

Capítulo 4

4. Conclusiones

1. Se obtuvieron las estructuras tridimensionales de COX-1 y COX-2 en *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* y se generaron modelos enzimáticos a través del modelo de *AlphaFold* para aquellas no disponibles de manera experimental, las cuales presentaron calidad estructural adecuada según herramientas de validación computacional.
2. El acoplamiento molecular de ligantes endógenos, fármacos inhibidores y el cannabidiol (CBD) permitió caracterizar sus interacciones con las ciclooxygenasas, revelando afinidades variables y patrones específicos de unión entre especies e isoformas.
3. La validación mediante estructuras cristalográficas disponibles confirmó la confiabilidad del enfoque computacional empleado, respaldando la utilidad de las herramientas *in silico* para el estudio comparativo de los inhibidores y sustratos de COX en investigación preclínica.
4. El CBD mostró interacciones relevantes con COX-1 y COX-2, incluyendo sitios catalíticos y posibles regiones alostéricas, lo que sugiere un potencial modulador sobre estas enzimas más allá de los mecanismos tradicionales de los AINEs.

Capítulo 5

5. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación han demostrado que existen diferentes modos de interacción a nivel molecular entre el CBD (cannabidiol) y las enzimas COX (ciclooxigenasas).

A futuro, será posible profundizar en el análisis de los sitios de unión que se observaron en este trabajo de investigación mediante otras aproximaciones computacionales como son las simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Esto permitirá observar el comportamiento de las COXs en presencia de estos ligantes seleccionados en un ambiente fisiológico, es decir, a una temperatura de 37 °C, una atmósfera de presión y una concentración salina de 0.15 M de NaCl.

De esta manera, una de las aplicaciones más prometedoras de estos resultados es el desarrollo de posibles fármacos que exploten la afinidad del CBD por las diferentes cavidades de la ciclooxigenasa (COX), que generaría estudios en modelos *in vivo* e *in vitro*.

.

Bibliografía

- [1] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2019). *Bioquímica* (9.^a ed.). Reverté.
- [2] Borrelli, F., Aviello, G., Romano, B., Orlando, P., Capasso, R., Maiello, F., Guadagno, F., Petrosino, S., Capasso, F., Di Marzo, V., & Izzo, A. A. (2009). Cannabidiol, a safe and non-psychoactive ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87(11), 1111–1121.
- [3] Brune K, Hinz B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol*.
- [4] Cantú, S. M., Donoso, A., Lee, H. J., Puyó, A. M., & Paredo, H. A. (2017). el ácido araquidónico y sus derivados. Generalidades de los prostanoïdes en relación con procesos inflamatorios.
- [5] Chalarca-Vélez, Julia Rosa y Gaviria, Duverney. (2020). Modelamiento por homología in silico de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa unida a membrana en *Pseudomonas fluorescens*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44 (173), 1099-1112.
- [6] Companioni Gásquez, Mirtha. (1995). Ácido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1).
- [7] Cosentino, M., Legnaro, M., Luini, A., Ferrari, M., Sodergren, M., Pacchetti, B., & Marino, F. (2023). Effect of Cannabidiol on Cyclooxygenase Type 1 and 2 Expression and Function in Human Neutrophils. *Cannabis and cannabinoid research*, 8(6), 999–1007.
- [8] David M (2022). Introducción a la inmunidad y a la inflamación. Brunton L.L., & Knollman B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 14e. McGraw-Hill Education.
- [9] Díaz Prado, S., Gallego Guadalupe, A., López-Cedrún, J.L., Ferreras Granado, J., & Antón Aparicio, L. (2009). La ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en lesiones epiteliales orales premalignas. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 31(3), 170-181.
- [10] Dong, L., Vecchio, A. J., Sharma, N. P., Jurban, B. J., Malkowski, M. G., & Smith, W. L. (2011). Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer. *The Journal of biological chemistry*, 286(21), 19035–19046.

- [11] Eberhardt J., Santos-Martins D., Tillack A. F., and Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings, *J. Chem. Inf. Model.* (2021) DOI 10.1021/acs.jcim.1c00203.
- [12] FitzGerald, G. A., & Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England journal of medicine*, 345(6), 433–442.
- [13] Gómez-Luque, A. (2005). Inhibidores de la COX ¿hacia dónde vamos? *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 12(6), 321-325.
- [14] Gris, Javier H, Dragonetti, Martín A, Fernández, Beatriz M, & Moglioni, Albertina G. (2009). Modelado Molecular e Interacción Enzima-Ligando (Docking) de Antiinflamatorios Derivados de 4-Hidroxi 1,2-Benzotiazinas-3-Carboxamidas, 1,1-Dióxido. *Información tecnológica*, 20(4), 51-61.
- [15] Grosser T, & Ricciotti E, & FitzGerald G.A. (2022). Farmacoterapia de la inflamación, fiebre, dolor y gota. Brunton L.L., & Knollman B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 14e. McGraw-Hill Education.
- [16] Hawkey C. J. (1999). COX-2 inhibitors. *Lancet (London, England)*, 353(9149), 307–314.
- [17] Hilal-Dandan R, & Brunton L.L.(Eds.), Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica, 2e. (2015). Farmacoterapia de la inflamación, fiebre, dolor y gota. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=1468§ionid=93495680>
- [18] Hill M.N., & Mackie K (2022). Cannabinoides. Brunton L.L., & Knollman B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 14e. McGraw-Hill Education.
- [19] Islas-Andrade, Sergio, Rocha-Arrieta, Luisa L., Arrieta, Oscar, Celis, Miguel A., Domínguez-Cherit, Judith, Lifshitz, Alberto, Mansilla-Olivares, Armando, Martínez, Iris, Mimenza, Alberto José, Moreno, Mucio, Reyes-Sánchez, Alejandro A., Ruiz-Argüelles, Guillermo J., Soda-Merhy, Antonio, Sotelo, Julio, Toussaint, Sonia, Vilar-Compte, Diana, & Verástegui, Emma. (2023). Cannabinoides y su uso terapéutico. *Gaceta médica de México*, 159(1), 1-2. Epub 02 de mayo de 2023.
- [20] Innophore (2024). CavitOmiX Copilot (Version 1.0) [Web Application]. <https://copilot.cavitomix.bio/>
- [21] Jumper, J. et al. “Predicción de la estructura de proteínas con alta precisión mediante AlphaFold”. *Nature*, 596, páginas 583–589 (2021)

- [22] Kennelly, P. J., & Rodwell, V. W. (2008). *harper bioquímica ilustrada* (28a ed., Vols. 85–88). Mc Graw Hill.
- [23] Kennelly P.J., & Rodwell V.W. (2022). Aminoácidos y péptidos. Kennelly P.J., & Botham K.M., & McGuinness O.P., & Rodwell V.W., & Weil P(Eds.), Harper. *Bioquímica ilustrada*, 32e. McGraw Hill Education. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3284§ionid=272016773>
- [24] Leza, J. C., & Lizasoain, I. (2005). fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros analgésicos-antipiréticos. En *Velázquez farmacología básica y clínica* (17a ed., Vol. 31, pp. 514-515). panamericana.
- [25] López-Zaragoza, José Luis, Gulias-Herrero, Alfonso, Gutiérrez-Cirios, Carlos, Cárdenas-Cortés, Ma. del Carmen, Carrillo-Maravilla, Eduardo, Terrazas-Solís, Hiram, Catzin-Kuhlmann, Andrés, Flores-Rebollar, Armando, & Villegas-Jiménez, Armando. (2005). Actitud ante los inhibidores selectivos de COX-2. *Revista de investigación clínica*, 57(1), 6-12.
- [26] Lucido, M. J., Orlando, B. J., Vecchio, A. J., & Malkowski, M. G. (2016). Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. *Biochemistry*, 55(8), 1226–1238.
- [27] Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., & Browner, M. F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature structural biology*, 3(11), 927–933.
- [28] Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica, metabolismo lipídico II: lípidos de membrana, esteroides, isoprenoides y eicosanoides* (3.ª ed., Vols. 784–786). Addison Wesley.
- [29] Mayes, P. A. (1987). *metabolismo de los ácidos grasos insaturados y de eicosanoides* (11.ª ed., Vol. 24). El manual moderno, S.A de C.V.
- [30] Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.
- [31] Miciaccia, M., Belviso, B. D., Iaselli, M., Cingolani, G., Ferorelli, S., Cappellari, M., Loguercio Polosa, P., Perrone, M. G., Caliendo, R., & Scilimati, A. (2021). Three-dimensional structure of human cyclooxygenase (hCOX)-1. *Scientific reports*, 11(1), 4312.

- [32] Morales Dávila, E. [Investigación de receptores neuronales asociados a las enfermedades de Alzheimer y Parkinson utilizando métodos computacionales]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- [33] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principios de Bioquímica* (7.^a ed.). Omega.
- [34] Nichols, J. M., & Kaplan, B. L. F. (2020). Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis and cannabinoid research*, 5(1), 12–31.
- [35] Nomura, D. K., Morrison, B. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Kinsey, S. G., Marcondes, M. C., Ward, A. M., Hahn, Y. K., Lichtman, A. H., Conti, B., & Cravatt, B. F. (2011). Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6057), 809–813.
- [36] Orlando, B. J., & Malkowski, M. G. (2016). Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone. *The Journal of biological chemistry*, 291(29), 15069–15081.
- [37] Patricio, F., Morales-Andrade, A. A., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2020). Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Frontiers in pharmacology*, 11, 595635. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>
- [38] Paucara, W. G. B., & Torrez, R. E. G. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55-72.
- [39] Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*. 2009 Dec;17(6):275-342
- [40] Redzicka, A., Szczukowski, Ł., Kochel, A., Wiatrak, B., Gębczak, K., & Czyżnikowska, Ż. (2019). COX-1/COX-2 inhibition activities and molecular docking study of newly designed and synthesized pyrrolo[3,4-c]pyrrole Mannich bases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(17), 3918–3928.
- [41] Rella JG, Carter WA. Rella J.G., & Carter W.A. Rella, Josepha G., and Wallace A. Carter. (2018). Fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Tintinalli JE, Stapczynski J, Ma O, Yealy DM, Meckler GD, Cline DM. Tintinalli J.E., & Stapczynski J, & Ma O, & Yealy D.M., & Meckler G.D., & Cline D.M.(Eds.), Eds. Judith E. Tintinalli, et al. *Tintinalli. Medicina de urgencias*, 8e. McGraw-Hill Education.

- [42] Rowlinson, S. W., Kiefer, J. R., Prusakiewicz, J. J., Pawlitz, J. L., Kozak, K. R., Kalgutkar, A. S., Stallings, W. C., Kurumbail, R. G., & Marnett, L. J. (2003). A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with S530 and Y385. *The Journal of biological chemistry*, 278(46), 45763–45769.
- [43] Ruhaak, L. R., Felth, J., Karlsson, P. C., Rafter, J. J., Verpoorte, R., & Bohlin, L. (2011). Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 34(5), 774–778.
- [44] Santiago Cervera. *AlphaFold aprende a predecir las estructuras de los ligandos de las proteínas* - APPDEMECUM – 03NOV2023.
- [45] Sanz, P. M. (2016). Papel dual de Cox-2 en la fisiopatología hepática. *SEBBM*. https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_anc.2016.04.1
- [46] Smith, W. L., Urade, Y., & Jakobsson, P. J. (2011). Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoïd biosynthesis. *Chemical reviews*, 111(10).
- [47] Soria-Lara, Dulce María, Gaitán-Vélez, Brayan Vladimir, Jiménez-Islas, Hugo, & Miranda-López, Rita. (2019). El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la Mangiferina. *Revista biomédica*, 30(2), 83-102.
- [48] Sterling e Irwin, *J. Chem. Inf. Model*, 2015.
- [49] Takeda, S., Misawa, K., Yamamoto, I., & Watanabe, K. (2008). Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 36(9), 1917–1921
- [50] Terragno, N. A., & Terragno, A. (2003). Farmacología de los eicosanoides. En *Velázquez farmacología básica y clínica* (17a ed., Vol. 30, pp. 503-504). panamericana.
- [51] The PyMOL Molecular Graphics Systems, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
- [52] Trott O., Olson A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461.
- [53] Vanderah T.W., & Largent-Milnes T.M. (2024). Fármacos cannabinoides. Vanderah T.W.(Ed.), *Katzung. Farmacología básica y clínica*, 16e. McGraw Hill Education.
- [54] Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *International Journal of Tissue Reactions*, 20(1), 3–15.

- [55] Vargas Aguilar, Alvaro Andre, & Fuentes Condori, Rosy. (2021). Estudios in Silico, Simulando Vida en un Entorno Virtual. *Gaceta Médica Boliviana*, 44(2), 278-279. Epub 00 de diciembre de 2021.
- [56] Velásquez, Margarita, Drosos, Juan, Gueto, Carlos, Márquez, Johana y Vivas-Reyes, Ricardo. (2013). Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*, 42 (1), 101-124.
- [57] Wheal, A. J., Cipriano, M., Fowler, C. J., Randall, M. D., & O'Sullivan, S. E. (2014). Cannabidiol improves vasorelaxation in Zucker diabetic fatty rats through cyclooxygenase activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 351(2), 457–466.