



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Estudio del efecto vasodilatador de la afinina, purificada a partir de las raíces de *Heliopsis longipes*, y determinación de su mecanismo de acción

Tesis

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

Presenta:

Jesús Eduardo Castro Ruiz

Codirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dr. César Ibarra Alvarado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio de 2019

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Estudio del efecto vasodilatador de la afinina, purificada a partir de las raíces de *Heliopsis longipes*, y determinación de su mecanismo de acción

Tesis

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

Presenta:

Jesús Eduardo Castro Ruiz

Codirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dr. César Ibarra Alvarado

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Firma

Dr. César Ibarra Alvarado
Secretario

Firma

Dra. María Alejandra Rojas Molina
Vocal

Alejandra Rojas M.
Firma

Dr. Francisco Javier Luna Vázquez
Suplente

Firma

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente

Firma

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio de 2019

RESUMEN

Las raíces de chilcuague (*Heliopsis longipes*) se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento del dolor, principalmente el dolor dental. Esta especie, la cual también se emplea como condimento, sintetiza en sus raíces una clase de compuestos bioactivos llamados alcanidas o alquilamidas que en estudios previos han demostrado que la afinina, la alcanida mayoritaria presente en estas raíces, induce una potente actividad antinociceptiva y antiinflamatoria. La afinina es capaz de permear mucosas y piel, de llegar a la circulación sanguínea, e incluso cruzar la barrera hematoencefálica, generando sus efectos farmacológicos a nivel local, central, sistémico y, posiblemente, sobre la vasculatura. Sin embargo, los efectos de extractos orgánicos de *H. longipes* y de la afinina sobre el sistema vascular, no han sido investigados. Por esta razón, se planteó en esta tesis determinar si los extractos y la afinina, obtenidos de *H. longipes*, modulan el tono del músculo liso de la aorta aislada de rata. En el presente estudio se demuestra que los extractos etanólico y de diclorometano, obtenidos a partir de las raíces de *H. longipes*, así como la afinina, producen un efecto vasodilatador dependiente de la concentración, en segmentos de aorta aislada de rata. se pudo observar que la vasodilatación inducida por afinina dependió parcialmente de la presencia de endotelio vascular y fue significativamente bloqueada en presencia de inhibidores de la síntesis de óxido nítrico, sulfuro de hidrógeno y monóxido de carbono (L-NAME, PAG y CrMP, respectivamente), bloqueadores de canales K⁺ (Gli y TEA), bloqueadores de canales TRPA1 y TRPV1 (HC003003, capsazepina, rojo de rutenio y SKF96365), un inhibidor del receptor a cannabinoides tipo endotelial (O-1918), un inhibidor del receptor CGRP (CGRP₈₋₃₇) e inhibidores de la guanilato ciclasa soluble y de la ciclooxigenasa (ODQ e INDO, respectivamente). Los resultados demuestran, por primera vez, que la afinina es el compuesto vasodilatador más abundante presente en las raíces de *H. longipes*. La inhibición de canales TRPA1 produjo la mayor disminución del efecto vasodilatador provocado por afinina, sugiriendo que la activación de estos canales podría ser el principal mecanismo involucrado en la respuesta vasomotora inducida por la alcanida. Adicionalmente, los resultados obtenidos sugieren que las vías de señalización de los gasotransmisores (NO, CO y H₂S), de la prostaciclina y de los canales TRPV1 contribuyen, de manera importante, al efecto vasodilatador inducido por esta alcanida. La presente investigación muestra, por primera vez, que la afinina produce un intenso efecto vasodilatador, que involucra la participación de transmisores gaseosos, prostaciclina, receptores a cannabinoides y canales TRP. Esta alcanida de origen natural constituye un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: Afinina, vasodilatación, prostaciclina, gasotransmisores, canales TRP, receptores a cannabinoides, *Heliopsis longipes*.

Summary

Chilcuague roots (*Heliopsis longipes*) have been widely used in Mexican traditional medicine to relieve pain, mainly, toothache. This species, which is also commonly used as a spice, synthesizes highly active compounds in its roots, called alkamides or alkylamides. Previous studies have shown that affinin, the major alkamide present in these roots, induces potent antinociceptive and anti-inflammatory activities. Affinin is able to permeate oral mucosa and skin, to penetrate into the blood stream, and even to cross the blood-brain barrier to produce its pharmacological effects at local, systemic, central and perhaps at vascular level. However, the effects of *H. longipes* root extracts and affinin on cardiovascular system have not so far been investigated. For this reason, it was proposed to test the hypothesis that extracts and affinin, both obtained from *H. longipes* roots, modulate the arterial vascular tone of rat isolated vessels. In the present study, it is demonstrated that the dichloromethane and ethanolic extracts of *H. longipes* roots, as well as purified affinin, produce a concentration-dependent vasodilation of rat aorta segments. Affinin-induced vasorelaxation was partly dependent on the presence of endothelium and was significantly blocked in the presence of inhibitors of NO, H₂S and CO synthesis (L-NAME, PAG, and CrMP, respectively), K⁺ channel blockers (Gli and TEA), TRPA1 and TRPV1 channels blockers (HC003003, capsazepine, ruthenium red, SKF96365), an endothelial type cannabinoid receptor inhibitor (O-1918), a CGRP receptor inhibitor (CGRP₈₋₃₇) and guanylate cyclase and cyclooxygenase inhibitors (ODQ and INDO, respectively). The results demonstrate, for the first time, that affinin is the main vasodilator compound present in *H. longipes* roots. Blockade of TRPA1 channels produced the major inhibition of the vasodilator effect induced by affinin, suggesting that the activation of these channels may be the main mechanism involved in the vasomotor response induced by affinin. Additionally, the obtained results suggest that the gasotransmitters (NO, CO and H₂S), prostacyclin and TRPV1 signaling pathways contribute, importantly, in the vasodilator effect induced by this alkamide. The present investigation shows, for the first time, that affinin produces an intense vasodilator effect, which involves the participation of gaseous transmitters, prostacyclin, cannabinoid receptors and TRP channels. This natural occurring alkamide represents a structural prototipe for the development of useful drugs to treat cardiovascular diseases.

Key words: Affinin, vasodilation, prostacyclin, gasotransmitters, TRP channels, cannabinoid receptors, *Heliopsis longipes*.

Para Pita

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de la beca N° 298404

En particular, a la Dra. Teresa García Gasca, quien me recibió en su grupo de trabajo con gran interés y optimismo. Gracias por todo su amor, paciencia y dedicación durante el desarrollo de la presente investigación...gracias por estar Dra.

Mi más profundo agradecimiento y admiración al Dr. César Ibarra, gracias por su paciencia, su tiempo y dedicación al proyecto chilcuague. Ha sido un honor compartir la pasión por la farmacología.

A la Dra. Alejandra Rojas Molina, pilar del proyecto chilcuague, su contribución al presente estudio ha sido invaluable... gracias por creer en mí.

Francisco Luna, agradezco sinceramente tú amistad, compañerismo y constancia. Aprendí de ti, que es de gran importancia ser multidisciplinario, gracias por compartir tú gran talento, compromiso y pasión en la investigación.

Al Dr. Roberto Ferriz, quien me recibió con gran entusiasmo cuando recién llegué al laboratorio. Siempre es grato contar con alguien que te brinde un saludo gentil y amigable, un consejo e incluso una sonrisa cuando eres el nuevo. Gracias por la ayuda brindada en el desarrollo de la presente investigación.

A mi hermana académica y gran amiga, Ronna Delgado, porque compartimos dichas y fracasos en el laboratorio. Gracias por tu amistad y gran cariño.

Agradezco a los técnicos de laboratorio y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias Químicas, su colaboración fue invaluable y me hicieron sentir como en casa.

A Irma Rojas Ríos, colega y entrañable amiga. Gracias por la amistad, tu apoyo, la confianza y por brindarme el espacio que me ayudó a no dejar de ser odontólogo. Siempre seremos amigos.

Agradezco a mis padres y hermanos por su gran cariño, por apoyarme siempre en mis proyectos.

A mis hijos, Oscar y Emiliano, por representar lo mejor que he realizado en la vida. Gracias por todo su amor, frescura, diversión y franqueza. Me hacen sentir orgulloso cada día.

A Miriam, mi esposa, gracias por su paciencia y tolerancia durante este período de mi vida. Gracias por ser mi compañera y cómplice en mis proyectos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Plantas medicinales en México	4
2.2. El chilcuague (<i>Heliopsis longipes</i> S.F. Blake)	5
2.3. Farmacología de <i>Heliopsis longipes</i> y de la afinina.	7
2.4. Alcamidas	10
2.5. Métodos cromatográficos empleados para análisis y purificación de afinina	12
2.5.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	13
2.5.2. Cromatografía HPLC	14
2.6 Gasotransmisores y vasodilatación.....	15
2.6.1. Óxido nítrico en la vasculatura.....	17
2.6.3. Monóxido de carbono en la vasculatura	19
2.6.4. Sulfuro de hidrógeno en el sistema vascular	21
2.6.6. Interacción entre gasotransmisores	22
2.7. La prostaciclina en la vasodilatación.....	24
2.9. Canales receptores de potencial transitorio (TRP).....	26
2.9.1. Estructura de los canales TRP.....	27
2.9.2. Distribución de los canales TRP	28
2.9.3. Canales TRP en el sistema vascular	28
2.9.4. Participación de canales TRPA1 y TRPV1 en la regulación del tono vascular	29
2.9.5. Canales TRPV1	31
2.9.6. Intercomunicación entre canales TRPA1 y TRPV1.....	33
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo General	36

5.2 Objetivos específicos	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1 Reactivos y solventes	37
6.2 Animales	37
6.3 Material vegetal.....	37
6.4 Preparación de los extractos empleados para la evaluación farmacológica	39
6.5 Fraccionamiento del extracto de diclorometano obtenido de las raíces de <i>H. longipes</i> y purificación de la afinina.....	40
6.6 Determinación de la estructura química de la afinina.....	43
6.7 Determinación de efecto vasodilatador y elucidación del mecanismo de acción de la afinina.	43
6.7.1 Ensayo de aorta aislada de rata	43
6.7.2 Participación del endotelio en el efecto vasodilatador de la afinina	44
6.7.3 Evaluación de la participación de las vías de señalización de los gasotransmisores, la prostaciclina y los canales de potasio en la respuesta vasodilatadora producida por la afinina	45
6.7.4 Determinación de la participación de canales TRP y del receptor eCB en el efecto vasodilatador producido por la afinina.....	45
6.8 Análisis estadístico.....	46
7. RESULTADOS.....	47
7.1 Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano obtenido de las raíces de <i>H. longipes</i> y purificación de la afinina.....	47
7.2 Efecto vasodilatador de extractos de <i>H. longipes</i> y de la afinina	52
7.3 Dependencia del endotelio vascular en la vasodilatación inducida por afinina	54
7.4 Participación de los gasotransmisores en el efecto vasodilatador producido por la afinina	55
7.5 Apertura de los canales de potasio en la vasodilatación inducida por afinina	58
7.6 Activación de la vía de la PGI ₂ /cAMP en la dilatación de aorta de rata inducida por la afinina	59
7.7 Apertura de canales TRPA1 en la vasodilatación inducida por la afinina. ...	60
7.8 Activación de los canales TRPV1 en el efecto vasodilatador de la afinina ..	63

7.9 Participación del receptor a cannabinoides de tipo endotelial en el efecto vasodilatador de la afinina.	66
8. DISCUSIÓN	68
9. CONCLUSIONES	79
10. BIBLIOGRAFÍA	80
11. ANEXOS	100
11.1. Solicitud de registro de patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad intelectual (IMPI).	100
11.2. Artículo científico: “Affinin (spilanthol), isolated from <i>Heliopsis longipes</i> , induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling phatways”.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: La especie <i>Heliopsis longipes</i> S.F. Blake.....	6
Figura 2: Estructura química de la afinina	12
Figura 3: Mecanismo de acción vasodilatador del óxido nítrico..	19
Figura 4: Actividad vasodilatadora del monóxido de carbono	20
Figura 5: Efecto vasodilatador del sulfuro de hidrógeno	22
Figura 6: Interacción entre el NO y el H ₂ S en la vasodilatación.	24
Figura 7: Mecanismo de acción vasodilatador de la prostaciclina.....	26
Figura 8. Estructura de la subunidad de los canales TRP	27
Figura 9. Canales TRP en terminaciones nerviosas perivasculares	33
Figura 10: Espécimen de herbario de <i>Heliopsis longipes</i> (raíces).....	38
Figura 11: Espécimen de herbario de <i>Heliopsis longipes</i> (partes aéreas).	38

Figura 12: Raíces de chilcuague (<i>Heliopsis longipes</i>).....	39
Figura 13: Proceso de obtención de extractos orgánicos a partir de la raíz de <i>Heliopsis longipes</i>	40
Figura 14: Cromatografía en columna abierta del extracto de diclorometano de <i>Heliopsis longipes</i>	41
Figura 15: Cromatografía en columna abierta a la que fue sometida la fracción concentrada de alcaloides (FCA)	42
Figura 16: Diagrama del proceso de purificación de la afinina a partir del extracto de diclorometano	47
Figura 17: Secuencia de fraccionamiento en columna abierta por medio de cromatografía en capa fina.....	48
Figura 18: Placas de cromatografía en capa fina que muestran la purificación de la afinina	48
Figura 19: Espectro ¹ H-NMR de la afinina (CDCL ₃ , 400 MHz).....	50
Figura 20: Espectro ¹³ C-NMR de la afinina (CDCL ₃ , 400 MHz).....	50
Figura 21: Cromatograma GC de la afinina purificada	51
Figura 22: Cromatograma HPLC de la afinina purificada	51
Figura 23: Espectro UV-VIS de la afinina	52
Figura 24: Efecto vasodilatador de extractos y afinina obtenidos de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	53
Figura 25: Efecto vasodilatador provocado por el vehículo carboximetilcelulosa (CMC).....	54
Figura 26: Efecto vasodilatador de la afinina en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio.....	55

Figura 27: Participación de las vías de los gasotransmisores y la sGC en el efecto vasodilatador de la afinina.....	56
Figura 28: Intercomunicación entre NO y H ₂ S en el efecto vasodilatador de la afinina.....	57
Figura 29: Estimulación de la sGC en el efecto vasodilatador de la afinina	58
Figura 30: Activación de canales de K ⁺ en el efecto vasodilatador de la afinina ...	59
Figura 31: Participación de la prostaciclina (PGI ₂) en la vasodilatación provocada por afinina.....	60
Figura 32: Activación de canales TRPA1 en la actividad vasodilatadora de la afinina.....	61
Figura 33: Contribución del CGRP al efecto vasomotor mediado por la afinina....	62
Figura 34: Participación del endotelio y de canales TRPA1 en la vasodilatación provocada por afinina.....	63
Figura 35: Activación de los canales TRPV1 en la vasodilatación causada por afinina.....	64
Figura 36: Efecto vasodilatador de la afinina en presencia del bloqueador específico de canales TRPV1, BCTC (10 μM)	64
Figura 37: Vasodilatación provocada por afinina en presencia del bloqueador de canales TRPV, rojo de rutenio (10 μM)	65
Figura 38: Influencia del bloqueador de canales TRPV, SKF96365 (30 μM) en la vasodilatación producida por afinina	65
Figura 39: Respuesta vasodilatadora de la afinina en presencia del inhibidor del receptor a cannabinoides endotelial (eCB), O-1918 (10 μM)	66

Figura 40: Mecanismo de acción propuesto para el efecto vasodilatador de la afinina.....	77
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sistema de solventes propuestos para monitorear el compuesto afinina en cromatografía en capa fina.....	14
Tabla 2: Criterios y clasificación de los gasotransmisores	16
Tabla 3: Vías de señalización de los gasotransmisores en la vasculatura	17
Tabla 4: Datos espectrales de la afinina ¹³ C NMR (400 MHz) y ¹ H NMR (400 MHz).....	49

1. INTRODUCCIÓN

Heliopsis longipes (A. Gray) S. F. Blake (Asteraceae) es una planta mexicana herbácea conocida comúnmente en los estados de Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí con el nombre de “chilcuague” (Little, 1948). Esta especie se ha utilizado con propósitos medicinales (Correa y col., 1971; Molina-Torres y col., 1996; Ríos, 2013), así como condimento en las áreas de donde es originaria (Little, 1948; Molina-Torres y col., 1995; Greger, 2016; de la Rosa-Lugo y col., 2017). En la medicina tradicional mexicana los extractos de estas raíces se emplean para el tratamiento de algunos padecimientos como odontalgias y para el tratamiento del dolor inflamatorio (Cariño-Cortés y col., 2010; Cilia-López y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; de la Rosa-Lugo y col., 2017). Su consumo por vía oral produce una intensa sensación de entumecimiento y hormigueo en los labios, lengua y boca, además de estimular la salivación (Correa y col., 1971; Fabricant y Farnsworth, 2001; López-Martínez y col., 2011).

La afinina o spilanthol (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida) es el principal componente bioactivo presente en las raíces de *H. longipes* (Acree y col., 1945; Jacobson y col., 1947; Ríos y col., 2007; Aguilar y col., 2015; Hernández-Morales y col., 2015). La afinina es una alcanamida o alquilamida olefínica formada por un ácido graso de una cadena alifática de diez carbonos con tres insaturaciones, unido a una isobutilamina por un enlace amida (Molina-Torres y col., 1999; Ramírez-Chávez y col., 2000; Boonen y col., 2012; Ríos y Olivo, 2014).

Este compuesto se ha propuesto como el principal responsable de los efectos biológicos y farmacológicos (Molina-Torres y col., 1999; Wu y col., 2008; Sharma y col., 2011; Martínez-Loredo y col., 2015; Gerbino y col., 2016). Dentro de las actividades biológicas más estudiadas, se encuentran: la antinociceptiva (Ogura y col., 1982; Déciga-Campos y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; de la Rosa-Lugo y col., 2017), la analgésica (Ríos y col., 2007; Cilia-López y col., 2010), la antimutagénica (Déciga-Campos y col., 2012; Arriaga-Alba y col., 2013), la antihiperalgésica (Acosta-Madrid y col., 2009), la ansiolítica (Déciga-Campos y col., 2012), así como efectos fungistático sobre *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*,

Phytophthora infestans y *Rhizoctonia solana*; bacteriostático sobre *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Molina-Torres y col., 2004) y molusquicida (Johns y col., 1982).

El efecto farmacológico más estudiado de la afinina es el efecto antinociceptivo. La mayoría de las investigaciones se han centrado en la estimación de la respuesta dolorosa a un algógeno en presencia de la afinina o de extractos que la contienen, en modelos animales (Acosta-Madrid y col., 2009; Ortiz y col., 2009; Cariño-Cortés y col., 2010; Cilia-López y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; Nomura y col., 2013; de la Rosa-Lugo y col., 2017). Sin embargo, existen muy pocos estudios que hayan indagado en el posible mecanismo de acción antinociceptivo de la afinina. Déciga-Campos y cols. (2010) han realizado algunos experimentos de nocicepción en presencia de algunos inhibidores farmacológicos con resultados muy interesantes que sugieren la participación de varias vías de señalización en el efecto analgésico, tales como las vías serotoninérgica, GABAérgica, opioide, así como activación de la vía del óxido nítrico y de canales TRPV1 (Déciga-Campos y col., 2010; de la Rosa-Lugo y col., 2017). Cabe destacar que tanto la vía del óxido nítrico, como la activación de canales TRPV1, no sólo están involucradas en la regulación del dolor, sino también en el proceso de regulación del tono vascular y del flujo sanguíneo en las arterias (Wang y col., 2017). Adicionalmente, los canales TRPV1 también interactúan con el endocannabinoide anandamida, un compuesto endógeno con estructura química similar a la de las alcanidas, para producir efectos analgésicos, antiinflamatorios y vasoactivos, de tal forma que algunos autores catalogan al TRPV1 como un receptor a cannabinoides atípico (Zygmunt y col., 1999).

La afinina, al igual que otras alcanidas con estructuras químicas similares, puede permear tejidos como piel y mucosa oral y, de esta forma, penetrar en el torrente circulatorio con facilidad, lo cual indica que posee propiedades farmacocinéticas que le proporcionan ventajas cuando se administra por vía oral (Boonen y col., 2010a; Boonen y col., 2010b; De Spiegeleer y col., 2013). Estudios recientes del mismo grupo de investigadores han demostrado que la afinina también posee la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en roedores, y así ejercer sus efectos a

nivel de sistema nervioso central (Veryser y col., 2014; Veryser y col., 2016a; Veryser y col., 2016b). Un gran número de estudios científicos han demostrado que la afinina es un compuesto con gran potencial farmacológico, que por sus propiedades farmacocinéticas es capaz de ingresar al torrente circulatorio e interactuar con el sistema vascular. Presumiblemente, en las arterias, esta alcalamida pudiera activar la vía del óxido nítrico y/o interactuar con canales TRPV1 para provocar una respuesta sobre el tono del músculo liso arterial. No obstante, el posible efecto de extractos de *H. longipes* y de la afinina sobre el tono vascular no había sido descrito.

La presente investigación tuvo como objetivo, evaluar los efectos vasodilatadores de los extractos orgánicos de *H. longipes* y de la afinina y determinar el mecanismo de acción de esta alcalamida. Los resultados de este estudio demostraron por primera vez, que los extractos orgánicos de *H. longipes*, obtenidos de la raíz de chilcuague, y su alcalamida mayoritaria, la afinina, son capaces de relajar la aorta de rata y que el efecto vasodilatador de este compuesto involucra la participación de los gasotransmisores, la prostaciclina y los canales TRP. Con base en este estudio, la afinina se propone como un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de fármacos alternativos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales en México

Las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de numerosas enfermedades desde hace cientos de años y en muchas partes del mundo. Las especies vegetales representan fuentes valiosas para el desarrollo de nuevos fármacos (Hamilton, 2004; Chen y col., 2016). En áreas rurales de países en desarrollo se siguen utilizando como la fuente principal de medicina y en países industrializados cerca del 80% de las personas utilizan medicinas basadas en productos naturales para el cuidado de su salud (Chitme y col., 2004; Balunas y Kinghorn, 2005). Los productos naturales derivados de plantas medicinales han probado ser una abundante fuente de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido la base para el desarrollo de moléculas novedosas importantes para la industria farmacéutica. Por citar un ejemplo, la morfina se aislaba del opio a partir de cortes producidos en las vainas de la planta de amapola (*Papaver somniferum*), desde hace 200 años aproximadamente (Katiyar y col., 2012; Chen y col., 2016). Así pues, los productos naturales y sus análogos continúan jugando un rol prominente en la medicina, contándose dentro de las dos terceras partes de las terapias nuevas aprobadas de 1981 a 2010. Todo esto demuestra que los productos naturales y/o estructuras químicas derivadas de productos naturales continúan jugando un papel destacado en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Newman and Cragg, 2007; Newman y Cragg, 2012).

México es considerado un país “megadiverso”, ya que forma parte del selecto grupo de naciones poseedoras de la mayor cantidad y diversidad de animales. Alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tiene atributos medicinales, es decir, que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio

desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda y col., 2005; Jiménez-Sierra y col., 2014).

En México, algunas plantas que han sido utilizadas con propósitos medicinales poseen el valor agregado de generar efectos sensoriales únicos al consumirlas, razón por la cual también se emplean para condimentar los alimentos. Estos efectos son la sensación pungente, de hormigueo, entumecimiento y adormecimiento que ofrecen al consumidor. Un ejemplo representativo es el uso culinario del chile (*Capsicum spp*), que ha sido utilizado en numerosas culturas como una parte importante de la dieta y de la medicina tradicional. Otra especie mexicana muy apreciada es el chilcuague (*Heliopsis longipes*), cuyas raíces han sido utilizadas como condimento, insecticida, así como analgésico y antiinflamatorio desde la cultura Náhuatl (Acree y col., 1945; Little, 1948; Correa y col., 1971; Molina-Torres y col., 1999; Yang y col., 2010; Rios, 2013). Estas dos especies vegetales tienen en común la síntesis de alcaloides, compuestos naturales responsables de sus efectos farmacológicos y sensoriales (Molina-Torres y col., 1999; Riera y col., 2009; Rohm y col., 2015a; Rohm y col., 2015b; J. Castro-Ruiz y col., 2017).

2.2. El chilcuague (*Heliopsis longipes* S.F. Blake)

Heliopsis longipes S.F. Blake es una hierba perenne endémica de la Sierra Gorda, que incluye algunas regiones de Querétaro, San Luis Potosí y Guanajuato (Little, 1948; Molina-Torres y col., 1996; Cilia-López y col., 2008; Cilia-López y col., 2014). Popularmente, se le conoce con varios nombres, como chilcuague, chilcuán, raíz azteca, raíz de oro y pelitre, entre otros (Acree y col., 1945; Jacobson y col., 1947; Little, 1948; Correa y col., 1971; Molina-Torres y col., 1999; López-Martínez y col., 2011). Sus raíces se utilizan como condimento en platillos, salsas y bebidas alcohólicas. En la medicina tradicional, la raíz de chilcuague se emplea en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias y de lesiones bucales, y

además se utiliza como anestésico para odontalgias y dolores musculares, así como desparasitante (Cilia-López y col., 2008; Cilia-López y col., 2014).

Aunque no se cuenta con registros del uso del chilcuague en la época prehispánica, puede encontrarse en la literatura de la época colonial, por ejemplo en los extractos de la obra de Francisco Hernández “Qvatro libros de la natvraleza”, editada por Ximénez en el año 1615 (Ximénez, 1888). *H. longipes* fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcanida olefínica (Figura 1). Acree y col. aislaron de las raíces de esta planta un compuesto al que nombraron afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida) (Acree y col., 1945), el cual se ha identificado como el metabolito mayoritario y al cual se le atribuyen los efectos biológicos observados tras su consumo, entre los que se pueden considerar la actividad anestésica local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida (Molina-Torres y col., 1999; Ramírez-Chávez y col., 2000; García-Chávez y col., 2004).

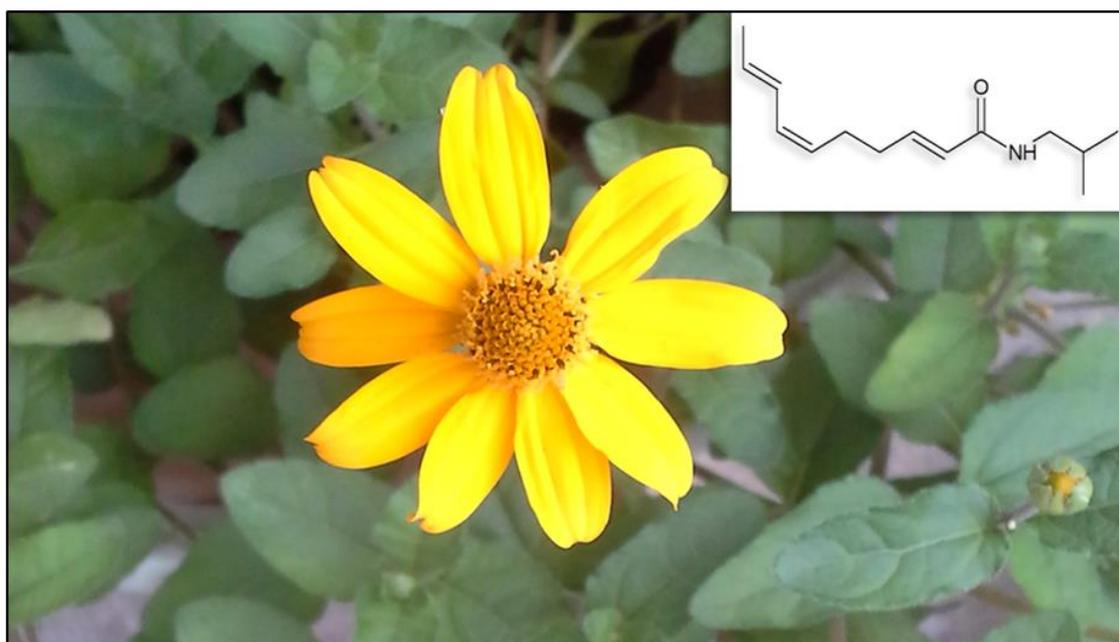


Figura 1: La especie *Heliopsis longipes* S.F. Blake, cuyas raíces se conocen con el nombre común de chilcuague e imagen de la estructura química de su principal metabolito secundario, la afinina.

La afinina y diversos extractos de *H. longipes* han demostrado tener capacidad insecticida, por ejemplo sobre la mosca doméstica, mosquitos y sus larvas (Acree y

col., 1945; Hernández-Morales y col., 2012; Hernández-Morales y col., 2015). Además, se ha reportado que la afinina posee actividad molusquicida (Johns y col., 1982), fungicida (Ramírez-Chávez y col., 2000; Molina-Torres y col., 2004; Salgado-Garciglia y col., 2008; Cárdenas-Flores y col., 2017) y antimicrobiana (Molina-Torres y col., 1999; Molina-Torres y col., 2004).

2.3. Farmacología de *Heliopsis longipes* y de la afinina.

Las raíces de chilcuague se han empleado para el tratamiento del dolor en la medicina tradicional de la región central de México. Diversas investigaciones se han centrado en el estudio de dos actividades farmacológicas principales de extractos de *H. longipes* y de la afinina, la antinocicepción y el efecto antiinflamatorio.

El efecto antinociceptivo de la afinina es la actividad farmacológica más estudiada de los extractos orgánicos de *H. longipes* y de la afinina obtenida de las raíces de esta especie. En la década de 1980, el Dr. Ogura y colaboradores, reportaron la actividad antinociceptiva del extracto etanólico de *H. longipes* y de la afinina, mediante el ensayo de contracciones abdominales inducidas por ácido acético en rata (Ogura y col., 1982). El efecto antinociceptivo provocado por la afinina, incluye algunos de los principales mecanismos de modulación del dolor, mostrando efectos antinociceptivos comparables y, en algunos casos, aún mayores a los efectos producidos por fármacos ampliamente utilizados en la terapéutica del dolor en humanos. Por ejemplo, la afinina mostró efectos antiinflamatorios comparables con la nimesulida (un antiinflamatorio selectivo de la COX-2 con actividad analgésica y antipirética) en el ensayo de edema inducido por ácido araquidónico en oreja de ratón, donde el efecto máximo de la afinina fue de 72.6% a una dosis de 3 mg/oreja, mientras la nimesulida (1 mg/oreja) mostró un efecto máximo de 66.7%. En ese mismo estudio, se reportó también el efecto antiinflamatorio de la afinina en el ensayo de edema de oreja de ratón inducida por forbol miristato acetato (PMA). La afinina mostró un efecto del 72.4% a una dosis entre 2 y 3 mg/oreja, mientras que el fármaco control, la indometacina (3 mg/oreja) mostró un efecto máximo de 98.6% (Hernández y col., 2009).

Ríos y col. (2007) realizaron un estudio de gran interés acerca de la capacidad de la afinina y diferentes fracciones del extracto de diclorometano de *H. longipes* para generar analgesia, mediante el ensayo de liberación de GABA en rebanadas de cerebro de ratón. Este estudio reveló que la afinina es el principal compuesto, presente en el extracto y las fracciones, capaz de provocar la liberación de GABA a una concentración de 1×10^{-4} M (Ríos y col., 2007).

Cilia-López y col. (2008) estudiaron también el efecto analgésico de la administración intraperitoneal del extracto etanólico de *H. longipes* y de afinina en tres modelos de dolor en ratones: la prueba de contracciones abdominales, inducidas por ácido acético, la prueba de placa caliente y la prueba de Irving. En tales pruebas, la afinina y el extracto etanólico de *H. longipes* presentaron una actividad analgésica similar al ketorolaco. También se observó un incremento en el tiempo de respuesta a estímulo térmico, el cual se mantuvo por 1 hora después de la administración de la afinina y del extracto. Conductualmente, los animales analizados mostraron un incremento en la actividad motora espontánea, estado de alerta, irritabilidad, exoftalmos, apertura palpebral y pasividad. Estas conductas fueron más evidentes en el grupo tratado con afinina, en comparación con el grupo tratado con el extracto etanólico. Paralelamente, se observó una disminución a la reacción táctil y sobresalto al ruido (Cilia-López y col., 2010), lo que sugiere una posible actividad ansiolítica que dos años más tarde sería comprobada por otro grupo de trabajo (Déciga-Campos y col., 2012).

En una investigación conducida por el grupo de la doctora Déciga-Campos y col. (2010), se reportó que mediante el ensayo de contracciones abdominales, inducidas por ácido acético en ratones, la afinina produjo mejor efecto antinociceptivo que la morfina, ambas administradas a una concentración logarítmica de 1.875 mg/kg i.p. De modo interesante, en ese mismo estudio el extracto de acetona a una concentración logarítmica de 1 mg/kg i.p. exhibió mayor efecto antinociceptivo que la afinina y la morfina (Déciga-Campos y col., 2010). En el mismo estudio también se reportó la capacidad de la afinina y el extracto de acetona, provenientes de *H. longipes*, para disminuir la nocicepción neurogénica inducida por capsaicina en pata

de ratón. Dicha disminución fue del 65.8% para el extracto y del 46.75% para la afinina. Los autores concluyeron que la posible razón por la cual el extracto fue más efectivo que la afinina en reducir el dolor neurogénico e inflamatorio, es porque el extracto posee otras alcanidas que podrían estar ejerciendo un efecto sinérgico o aditivo (Déciga-Campos y col., 2010).

Este estudio representa el primer reporte científico en el que se realizan ensayos farmacológicos en presencia de inhibidores de diferentes vías moleculares con el fin de elucidar el mecanismo de acción involucrado en el efecto analgésico producido por esta alcanida. El efecto antinociceptivo de la afinina (30 mg/kg, i.p.) disminuyó notablemente en presencia de naltrexona (1 mg/kg, s.c.), p-clorofenilalanina (80 mg/kg, i.p.) y flumazenilo (5 mg/kg s.c.), lo que sugiere que la actividad analgésica producida por la afinina involucra la activación de vías de señalización opioide, de serotonina y de GABA, respectivamente. También se determinó que la vía del óxido nítrico contribuye al efecto analgésico de la afinina, debido a que en presencia de ODQ, un inhibidor de la guanilato ciclase soluble (sGC), dicho efecto disminuyó significativamente (Déciga-Campos y col., 2010).

En un estudio realizado por Cariño-Cortés y col. (2010), se reportó el efecto antinociceptivo del extracto etanólico del chilcuague, administrado por vía oral (*p.o.*) a ratones CD1⁺, mediante el ensayo de contracciones abdominales inducidas por ácido acético y el ensayo de la placa caliente. Los resultados revelaron que el extracto etanólico de *H. longipes* (10-30 mg/kg *p.o.*) ejerce un efecto analgésico, dependiente de la dosis, mayor al del ácido acetilsalicílico (200 mg/kg *p.o.*). En la prueba de placa caliente, el extracto de *H. longipes* mostró mayor efecto antinociceptivo que el diclofenaco (20 mg/kg, *p.o.*), pero menor que la morfina (10 mg/kg *p.o.*) (Cariño-Cortés y col., 2010).

Mediante el modelo de Hargreaves (ensayo para estimar la hiperalgesia térmica) en ratones Balb/c, el extracto etanólico de *H. longipes* (10-30 mg/kg *p.o.*) produjo una reducción, dependiente de la dosis, del efecto hiperalgésico inducido por carragenina, lo cual sugiere que la administración sistémica del extracto etanólico de *H. longipes* es efectiva en el tratamiento del dolor inflamatorio (Ortiz y col., 2009).

En otro reporte del mismo grupo de trabajo se determinó la interacción entre el extracto etanólico de *H. longipes* y el diclofenaco, mediante el ensayo de Hargreaves en ratones Balb/c. Los investigadores observaron que tanto el diclofenaco ($EC_{50} = 3.4 \pm 0.8$ mg/kg), como el extracto etanólico de chilcuague ($EC_{50} = 105.3 \pm 18.7$) disminuyeron el efecto hiperalgésico, producido por la carragenina, mientras que la combinación de ambas sustancias mostró mayor eficacia ($ED_{30} = 8.6 \pm 4.0$ mg/kg). Con base en estos resultados, se concluyó que la administración simultánea del extracto etanólico y el diclofenaco produce un efecto antihiperalgésico sinérgico a nivel sistémico (Acosta-Madrid y col., 2009).

Por otra parte, se ha demostrado la capacidad antiinflamatoria del extracto etanólico de *H. longipes* y de la afinina en modelos *in vitro* e *in vivo* en murinos (Hernandez y col., 2009; Hernández y col., 2009b).

2.4. Alcamidas

Las alcamidas son productos naturales formados por una cadena alifática de ácido graso, mayormente insaturada, unida a un grupo amina a través de un enlace amida (Greger, 2016). Las alcamidas, también llamadas *N*-alquilamidas, son consideradas moléculas bioactivas, debido a que una pequeña cantidad del compuesto produce una respuesta notable en diversas células (García-Chávez y col., 2004; Boonen y col., 2012).

Históricamente, el interés en las alcamidas proviene de su capacidad única para producir una sensación de pungencia y hormigueo, al ser consumidas vía oral. Usualmente, el estímulo sensorial producido, viene acompañado de anestesia local y un aumento en la salivación. Así pues, plantas productoras de alcamidas, principalmente del género *Acmella* (*Spilanthes*), *Anacyclus*, *Echinaceae* y *Heliopsis* de la familia *Asteraceae*, así como *Zanthoxylum* de la familia *Rutaceae* se han empleado por generaciones con fines medicinales, particularmente para el tratamiento del dolor dental (Greger, 1984; Greger, 2016).

Las alcanidas forman una clase distinta de productos naturales, en los cuales diferentes partes de aminas están combinadas por medio de amidas enlazadas con varios ácidos grasos insaturados. Estos últimos se pueden derivar del ácido oleico y contener una cadena alquilo no ramificada de 9 a 18 átomos de carbono con uno o más enlaces dobles, acompañados con frecuencia por uno a tres enlaces acetilénicos. Estas amidas derivadas de plantas contienen principalmente cadenas de ácidos alifáticos poliinsaturados y un sustituyente más corto del lado de la amida. Ambos podrían incluir sistemas cíclicos y/o otras moléculas (nitrógeno, sulfuro, oxígeno). En el núcleo está la unión amida, el cual se asemeja a la unión peptídica -C(CO)NH- tal como se observa en polipéptidos y proteínas. Debido a sus características de resonancia, las uniones amida son planares y relativamente estables, poseen enlaces parciales y se encuentran en el origen de sus dipolos (Boonen y col., 2012).

Con respecto al origen biogenético, esta clase de compuestos claramente se desvían de otras amidas de origen natural, cuyos restos de ácido pueden ser derivados, ya sea del ácido siquímico (por ejemplo, la piperina) o vía acetato-malonato (policétidos), como la capsaicina. Generalmente, las aminas surgen de diversos aminoácidos por descarboxilación y, algunas veces, por un proceso adicional de transformación (Greger, 1984; Greger, 2016).

Una de las ventajas de obtener sustancias tales como la afinina, producidas por biosíntesis de plantas es que no tienen efectos secundarios en el ecosistema, dado que pueden ser metabolizadas por uno u otro organismo, a diferencia de los fungicidas químicos comúnmente utilizados (Molina-Torres y col., 2004; Campos-Cuevas y col., 2008).

El interés biomédico de las *N*-alquilamidas se ha incrementado de manera importante en los últimos años, debido a que se pueden administrar por vía oral o dérmica. Cuando se aplican de manera tópica, las alcanidas permean piel y/o mucosas y alcanzan la circulación sanguínea para generar así sus actividades biológicas (Boonen y col., 2010a; Boonen y col., 2010b; De Spiegeleer y col., 2013; Veryser y col., 2014; Veryser y col., 2016a; Veryser y col., 2016b). Matthias y cols.

(2005), investigaron el transporte de algunas alcanidas purificadas de *Echinacea* a través de monocapas de células Caco-2. Los investigadores determinaron que más del 50% de las alcanidas penetraron la monocapa celular, lo cual sugiere que estos compuestos se pueden absorber vía oral y generar así sus efectos biológicos (Matthias y col., 2005).

2.5. Métodos cromatográficos empleados para análisis y purificación de afinina

La afinina (*N*-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida) es una alcanida olefínica, la cual constituye el principal componente bioactivo presente en las raíces de *H. longipes* (Jacobson y col., 1947; Ríos y col., 2007; Déciga-Campos y col., 2010; López-Martínez y col., 2011) y se ha identificado como el principal metabolito responsable de sus actividades biológicas. La afinina está conformada por un ácido graso de una cadena alifática de diez carbonos con tres insaturaciones unido a una isobutilamina (Figura 2), posee un peso molecular de 221.3, una solubilidad acuosa de 18.63 mg/L y un $\log P_{ow} = 3.4$ (Boonen y col., 2010b).

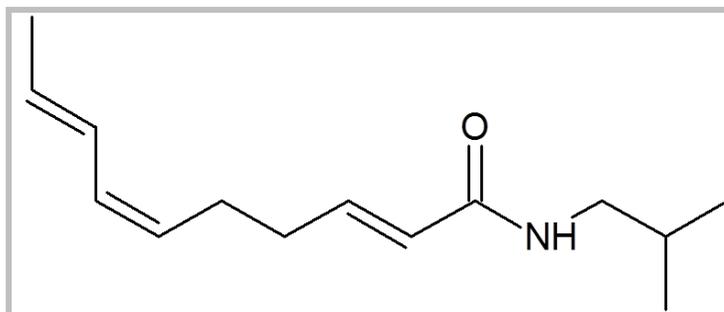


Figura 2: Estructura química de la afinina, la alcanida mayoritaria presente en las raíces de *Heliopsis longipes*.

Las alcanidas son capaces de absorber luz UV debido al sistema conjugado de electrones pi a lo largo de su cadena alquilo insaturada, por lo cual pueden ser visibles a una longitud de onda de 254 nm (Bae y col., 2010). Por esta razón, se pueden emplear técnicas cromatográficas como la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía en columna (CC) y cromatografía líquida (LC) como estrategia para la purificación de la afinina.

2.5.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Es una cromatografía de tipo planar que se emplea para la separación de compuestos orgánicos por adsorción, utilizando capas delgadas de adsorbentes sobre una base de vidrio, papel o aluminio a la cual se denomina fase estacionaria. La TLC es la más utilizada debido a su sencillez y bajo costo y a la facilidad con la que nos puede aportar datos. En esta cromatografía suceden dos fenómenos que son los responsables de la separación: la adsorción y la absorción. La adsorción es la deposición y retención selectiva de sustancias sobre la superficie de sólidos finamente divididos, por acción de fuerzas fisicoquímicas (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, etc.). Luego cuando la capa es expuesta a un flujo, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la muestra con el solvente por acción capilar (Bauer y col., 1988; Bauer y Remiger, 1989; Joshi, 2012a).

La separación por TLC se lleva a cabo por la aplicación de la muestra a analizar sobre la placa que contiene el adsorbente, después la placa se coloca en una cámara de revelado que contiene suficiente solvente o fase móvil, el cual migrará a través de la capa adsorbente por capilaridad; a este proceso se le llama revelado. Un factor en la cuantificación de la migración de un compuesto sobre un adsorbente particular y un sistema de solventes se conoce como valor R_f , el cual se puede definir de la siguiente manera:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto desde el origen}}{\text{distancia recorrida por el solvente desde el origen}}$$

Para comprobar la pureza se puede probar más de un sistema de solventes (preferentemente cuatro), ya que a veces una mancha aparentemente “pura”, puede consistir de varios compuestos con el mismo R_f . En el caso de la afinina, por ejemplo, se pueden utilizar los siguientes sistemas de solventes (Tabla 1).

Tabla 1: Sistema de solventes propuestos para monitorear el compuesto afinina en cromatografía en capa fina.

Solventes	Proporción (v/v)	Referencia
Hexano: acetato de etilo	2: 1	(Molina-Torres y col., 1999)
Hexano: acetona	8: 1	(Déciga-Campos y col., 2010)
Hexano: acetato de etilo	3: 2	(Castro-Ruiz y col., 2017)
Ciclohexano: acetona	7: 3	Datos no reportados

2.5.2. Cromatografía HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución, también llamada HPLC (del inglés *high-performance liquid chromatography*), es una de las técnicas más utilizadas para la separación de mezclas complejas. Esta técnica está basada en la afinidad que los componentes tienen entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, líquida, que fluye sobre otra estacionaria, sólida, empaquetada en una columna. La fase móvil se compone generalmente de una mezcla de disolventes con distinta fuerza eulotrópica. La separación es una consecuencia de la diferencia de coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, que produce sucesivas etapas de adsorción y desorción de los mismos a través de la fase estacionaria. La separación de los componentes ocurre debido a su atracción relativa a la fase estacionaria por polaridad. Para aumentar la eficiencia en las separaciones por HPLC, el tamaño de las partículas de la fase estacionaria se disminuye hasta los micrones y se utilizan altas presiones para lograr que la fase móvil fluya. Esta condición es crítica cuando se quieren separar compuestos mezclados, ya que entre menor sea el tamaño de la partícula, mejor será la capacidad de separación (resolución) entre los compuestos; esto es de gran utilidad en la purificación de productos naturales (Bae, 2007; Joshi, 2012b).

El HPLC permite al analista identificar compuestos por medio de la comparación de sus tiempos de retención. La purificación de productos naturales por HPLC utiliza una de las cuatro principales técnicas cromatográficas: fase normal, fase reversa, cromatografía de exclusión (permeación en gel) y cromatografía de intercambio iónico (Joshi, 2012b).

HPLC fase-normal utiliza una fase estacionaria polar (generalmente sílica) y una fase móvil menos polar. Los compuestos se separan por medio de la adsorción sobre la superficie polar de la fase estacionaria a la vez que se eluyen por la columna por la afinidad que presenten para eluirse en solventes no polares. En general el compuesto más polar es el último en eluir, mientras que compuestos menos polares serán los primeros en eluirse. Esta técnica se emplea para compuestos lipofílicos (Jandera, 2011).

HPLC fase reversa es la técnica inversa de la fase normal, donde la fase estacionaria es más no-polar que el solvente de elución. Los adsorbentes de fase reversa a base de sílica empleados en esta técnica, también llamados materiales de “adsorbente enlazado”, consisten en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Una desventaja es el costo de las columnas que en comparación con las de fase normal, es alto. El eluato empleado en esta técnica comúnmente comprende una mezcla de agua con solventes orgánicos miscibles, usualmente acetonitrilo (MeCN), metanol (MeOH), o tetrahidrofurano (THF). Adicionalmente, esta técnica requiere de la adición de soluciones amortiguadoras, ya sean ácidas o básicas para suprimir la ionización de la muestra y así mejorar la resolución de las señales. Mediante la técnica de HPLC fase reversa se han purificado muchos productos naturales y ha sido empleada ampliamente para analizar y purificar compuestos a partir de una mezcla compleja (Jandera, 2011; Siddiqui y col., 2017).

2.6 Gasotransmisores y vasodilatación

El término gasotransmisor fue acuñado por el Dr. Rui Wang en la década pasada (Wang, 2002). El descubrimiento del óxido nítrico (NO) como una molécula gaseosa

sintetizada y secretada por el endotelio para generar relajación vascular (Furchgott y Zawadzki, 1980), impulsó la búsqueda de otras moléculas similares, ya que esto representó un mecanismo de señalización celular adicional a los mecanismos de señalización que requieren receptores membranales (Wang, 2002). El monóxido de carbono (CO) fue propuesto como otra molécula gaseosa importante en la señalización celular, después de que se demostró su participación en la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), de manera similar a como lo hace el NO (Durante y col., 2006; Decaluwé y col., 2012). Recientemente, el sulfuro de hidrógeno (H₂S) se propuso como el tercer miembro de la familia de los gasotransmisores, debido al papel tan importante que desempeña en la regulación de importantes procesos fisiológicos y patofisiológicos que van desde la angiogénesis y el cáncer, hasta la cardioprotección y la aterosclerosis (Wang, 2002; Wang y col., 2015).

A diferencia de los neurotransmisores, los gasotransmisores no se almacenan en vesículas, ni está involucrado el proceso de exocitosis para su liberación, tampoco pueden ser contenidos por las membranas, por lo que pueden difundirse libremente por la célula. Los criterios actuales para establecer una molécula de señalización como un gasotransmisor, se describen en la Tabla 2 (Wang, 2002; Wang, 2014).

Tabla 2: Criterios y clasificación de los gasotransmisores

1	Son moléculas gaseosas pequeñas como NO, CO y H ₂ S, disueltas o no en el medio biológico.
2	Son moléculas que permean libremente las membranas plasmáticas. Como tales, sus movimientos intra e intercelulares no dependen de receptores de membrana, ni de otros sistemas de transporte o liberación para efectuar sus efectos fisiológicos.
3	Se sintetizan de manera endógena en células de mamífero con sustratos y enzimas específicas; más que productos del metabolismo, su producción se regula para realizar funciones fisiológicas.
4	Poseen funciones específicas bien definidas a concentraciones fisiológicas.
5	Están involucrados en señales de transducción y deben tener blancos moleculares y celulares específicos. Por ejemplo, NO y CO pueden activar sGC y así incrementar las concentraciones celulares de cGMP.
6	Las funciones de los gases endógenos pueden ser imitadas por la aplicación de estos gases de manera exógena.

(modificado de Wang, 2014).

Adicionalmente, en la Tabla 3 se describen el metabolismo y los blancos moleculares de los tres principales gasotransmisores.

Tabla 3: Vías de señalización de los gasotransmisores en la vasculatura.

Gasotransmisor	NO	H ₂ S	CO
Síntesis (enzimas)	Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)	Cistationina γ -liasa (CSE)	Hemo-oxigenasa (HO)
Localización endotelial	Si	Si	Si
Señal de activación	ACh	ACh	ACh
Regulación por Ca²⁺-CaM	Si	Si	Si
Blancos moleculares	sGC-cGMP*	Canales K _{ATP} , PDEs	sGC-cGMP
Localización de blancos	CML	CML	CML
Modificación química (Cys)	S-nitrosilación	S-sulfhidración	?
Vasodilatación	Si	Si	Si
Fenotipo KO	Hipertensión	Hipertensión	?
Inhibidores	L-NAME	DL- propargilglicina	MesoIX

ACh: acetilcolina; sGC: guanilato ciclasa soluble; cGMP: guanosín mono-fosfato cíclico; CML, células de músculo liso; MesoIX, mesoporfirina-IX de cromo; L-NAME, N^G-nitro-L-arginina metil éster; PDEs, fosfodiesterasas.

*El NO posee varios blancos en la musculatura lisa vascular además de la sGC

2.6.1. Óxido nítrico en la vasculatura

El óxido nítrico (NO) fue el primer gasotransmisor identificado. Es un gas diatómico e hidrofóbico capaz de permear las membranas celulares y otras estructuras hidrofóbicas. Debido a esta gran capacidad de difusión, el NO ejerce un impacto importante en la biología celular, ya que este gas está presente en la mayoría de las células y tejidos, además de estar involucrado en procesos fisiológicos y patológicos, por lo cual, tanto el NO como las moléculas capaces de donarlo, se han propuesto como agentes terapéuticos potenciales en aplicaciones biomédicas (Csonka y col., 2015). En mamíferos se conocen tres enzimas que sintetizan NO, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), las cuales utilizan como sustrato L-arginina (Forstermann y Sessa, 2012; Wang, 2014). La activación de la eNOS es iniciada por un incremento en el calcio intracelular. Dentro del endotelio, el NO se genera

como un producto de la reacción enzimática de la eNOS con su sustrato L-arginina, junto con oxígeno molecular y NADPH reducido como co-sustratos. Una vez que el NO se ha generado dentro de las células endoteliales, difunde a las células musculares lisas y se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (sGC), lo cual provoca, la conversión de GTP a cGMP. Este segundo mensajero activa a la proteína cinasa G (PKG), que a su vez desencadena una cascada de señalización que induce una disminución de la concentración de calcio intracelular. Esta disminución previene la fosforilación de la miosina por parte de la cinasa de la cadena ligera de la miosina con la consecuente vasodilatación (Figura 3) (Förstermann y Li, 2012; Coletta y col., 2012; Bohlen, 2015; Cirino y col., 2017).

El bloqueo de los canales de calcio también causa vasodilatación por la reducción en el calcio intracelular (Ogut y Brozovich, 2003). En la vasculatura, la activación de la vía NO/GC/cGMP/PKG contribuye a la recaptura del ($[Ca^{2+}]_i$) en el retículo sarcoplásmico. Por otra parte, PKG también desencadena la salida de potasio a través de los canales de potasio de gran conductancia sensibles a calcio (BK_{Ca}) para hiperpolarizar la célula, y así reducir la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (CCVL) (Farah y col., 2018).

El NO es necesario para el mantenimiento de la fisiología cardiaca normal, sin embargo, ejerce otras funciones fisiológicas independientes de cGMP en su trayecto a través de las células. Por ejemplo, la reacción redox que se presenta entre el NO y el grupo tiol de la L-cisteína, generan una modificación covalente con la formación de S-nitrositioles (SNO). Esta reacción rápida y reversible se conoce como S-nitrosilación, la cual es importante debido a que está involucrada en mecanismos moduladores de la función y la señalización de la célula; por ejemplo: la actividad enzimática y la estabilidad de las proteínas (Bohlen, 2015; Cirino y col., 2017). El NO generado de manera fisiológica o adicionado de manera exógena se metaboliza rápidamente. El nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-) son los productos finales del metabolismo del NO en células de mamífero (Sánchez y col., 2014).

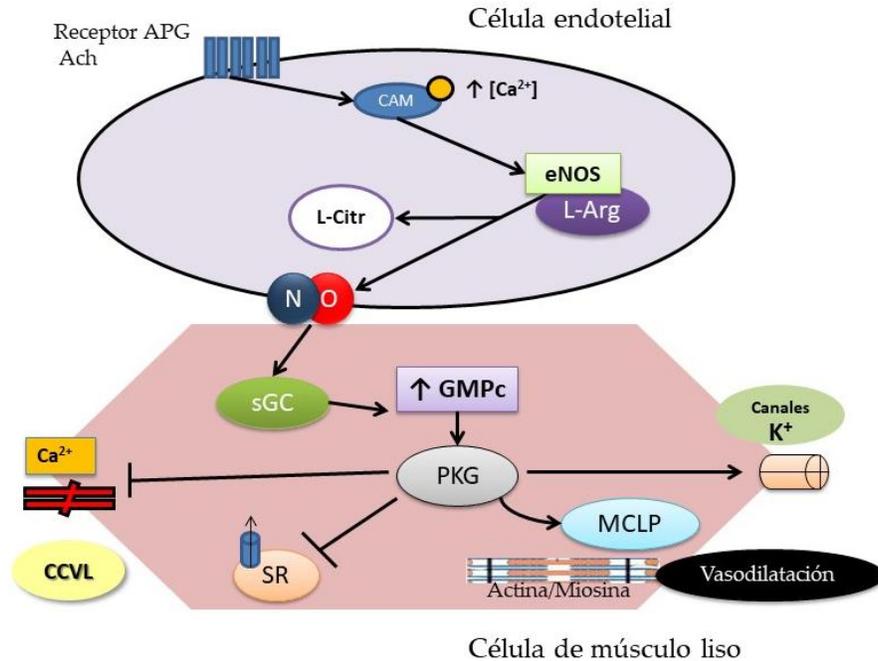


Figura 3: Mecanismo de acción vasodilatador del óxido nítrico. En los vasos sanguíneos, la eNOS expresada en el endotelio convierte a la L-arginina en L-citrulina y NO. El NO difunde hacia la musculatura lisa vascular para estimular a la sGC y el subsecuente aumento de cGMP en las células musculares lisas vasculares. Este segundo mensajero, a través de un mecanismo dependiente de la PKG, produce una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$, activa a la MPLC, la cual inhibe la fosforilación de la cadena ligera de miosina, induciendo así vasodilatación. Ach, acetilcolina; receptor APG, receptor acoplado a proteína G; CAM, calmodulina; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; L-Arg, L-arginina; L-Citr, L-citrulina; NO, óxido nítrico; sGC, guanilato ciclasa soluble; GMPc, guanosín monofosfato cíclico; PKG, proteína cinasa G; SR, retículo sarcoplásmico; CCVL, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L; MCLP, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.

2.6.3. Monóxido de carbono en la vasculatura

El monóxido de carbono (CO) es un gas diatómico incoloro, inodoro y sin sabor. Es sintetizado endógenamente a través del catabolismo del grupo hemo por la hemo-oxigenasa (HO). Existen tres isoformas de HO: HO-1, HO-2 y HO-3. La HO-1 es una isoforma inducible, mientras que las otras dos isoformas son constitutivas en la vasculatura. El CO muestra propiedades biológicas similares a las del NO, incluyendo la capacidad de activar a la sGC (Durante y col., 2006). El CO es un vasodilatador parácrino y autócrino en la circulación cerebral y sistémica. Se conoce que a concentraciones bajas (1-100 nM), el CO produce vasodilatación dependiente del endotelio y que altas concentraciones (1- 10 μ M) producen vasoconstricción a

través de la inhibición de eNOS (Johnson y Johnson, 2003). En los mamíferos, el CO no es metabolizado, sino que se exhala a través de la vía pulmonar sin sufrir modificaciones bioquímicas (Kreck y col., 2001). El CO provoca hiperpolarización del músculo liso vascular vía activación de canales K_{Ca} y también aumenta la sensibilidad al calcio por parte de estos canales (Wang y col., 1997; Jaggar y col., 2002). Adicionalmente, el CO contribuye a la dilatación vascular de arterias y arteriolas cerebrales (Kanu y col., 2006). El CO estimula la vasodilatación por tres principales mecanismos (Figura 4): la activación de la sGC (Achou y col., 2008), la estimulación de los canales de potasio de alta conductancia activados por calcio (BK_{Ca}) (Li y col., 2008) y la inducción a través de la NOS (Foresti y col., 2004).

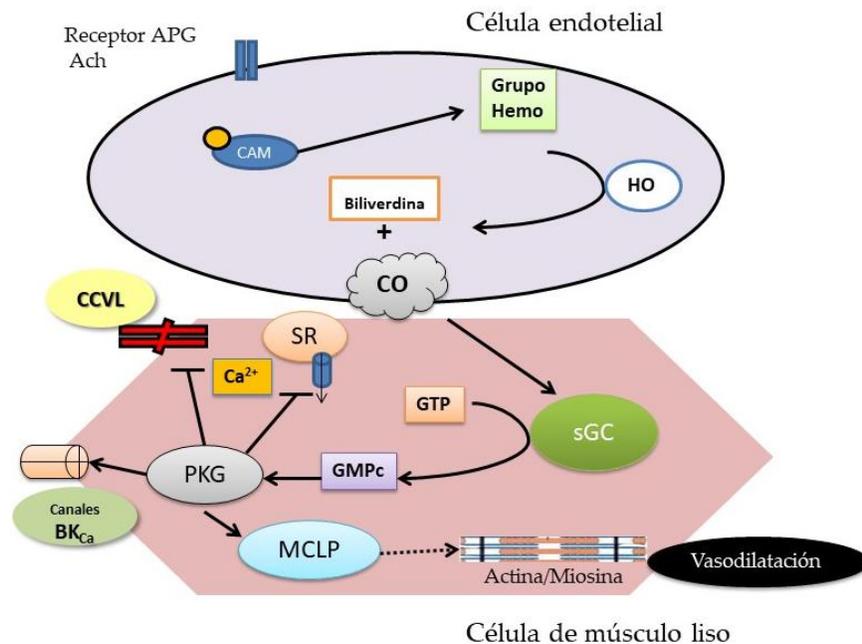


Figura 4: Actividad vasodilatadora del monóxido de carbono. Ach, acetilcolina; receptor APG, receptor acoplado a proteína G; CAM, calmodulina; HO, hemo-oxigenasa; CO, monóxido de carbono; sGC, guanilato ciclasa soluble; GTP, guanósín trifosfato; GMPC, guanósín monofosfato cíclico; PKG, proteína cinasa G; SR, retículo sarcoplásmico; CCVL, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L; MCLP, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.

En un estudio se determinó que el CO produce dilatación, dependiente de endotelio, de vasos sanguíneos aislados de humano y que esta respuesta no fue mediada por la presencia de NO, ya que se utilizaron inhibidores de la NOS (Achou y col., 2008). También se ha descrito el mecanismo de vasodilatación a través de la activación de

canales BK_{Ca} en arteriolas cerebrales de lechones a través del incremento en la producción de CO por parte de astrocitos (Li y col., 2008). En un estudio realizado por Foresti y col. (2004), se demostró que el efecto vasodilatador de moléculas liberadoras de CO (CORMs) es dependiente de la NOS y de otros factores presentes en el endotelio, ya que al bloquear esta enzima o al remover el endotelio, el efecto vasodilatador se abatió.

2.6.4. Sulfuro de hidrógeno en el sistema vascular

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) fue la tercera molécula gaseosa incluida en la familia de los gasotransmisores. Las enzimas productoras de H_2S son la cistationina β -sintasa (CBS) y la cistationina γ -liasa (CSE). Ellas utilizan L-cisteína y homocisteína como sustratos. Similar al NO, el H_2S posee la capacidad de difundir libremente a través de las membranas celulares sin la necesidad de receptores de membrana específicos y producir vasodilatación (Wang, 2002). En los tejidos de mamíferos, el H_2S se produce por vía enzimática y no enzimática, aunque la vía enzimática (trans-sulfuración) genera la mayoría del H_2S en el cuerpo. Dentro de los vasos sanguíneos, el H_2S es producido por diferentes enzimas expresadas en el endotelio y en el músculo liso vascular, a diferencia de del NO, el cual se genera sólo dentro del endotelio por la eNOS (Cirino y col., 2017). El primer blanco molecular identificado para la actividad vasodilatadora del H_2S fue el canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}). Zhao y col. encontraron que la vasodilatación producida por H_2S se inhibía de manera específica con glibenclamida (Gli), un inhibidor selectivo de canales K_{ATP} (Zhao y col., 2001).

El H_2S puede producirse y liberarse desde el endotelio, difundir y causar hiperpolarización del músculo liso vascular por medio de la activación de canales K_{ATP} y así producir vasodilatación. El mecanismo propuesto es la activación, dependiente de calcio, de la enzima CSE en la célula endotelial y la subsecuente producción de H_2S , el cual se difunde libremente a la célula muscular lisa y activa directamente a los canales K_{ATP} , además de inhibir a la fosfodiesterasa 5 (PDE5A), enzima encargada de degradar el cGMP. El mantenimiento de niveles elevados de

cGMP asegura la activación de PKG, que va a actuar sobre canales K_{ATP} , sobre la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, sobre canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y BK_{Ca} y bloqueando la liberación de calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico (Figura 5) (Coletta y col., 2012).

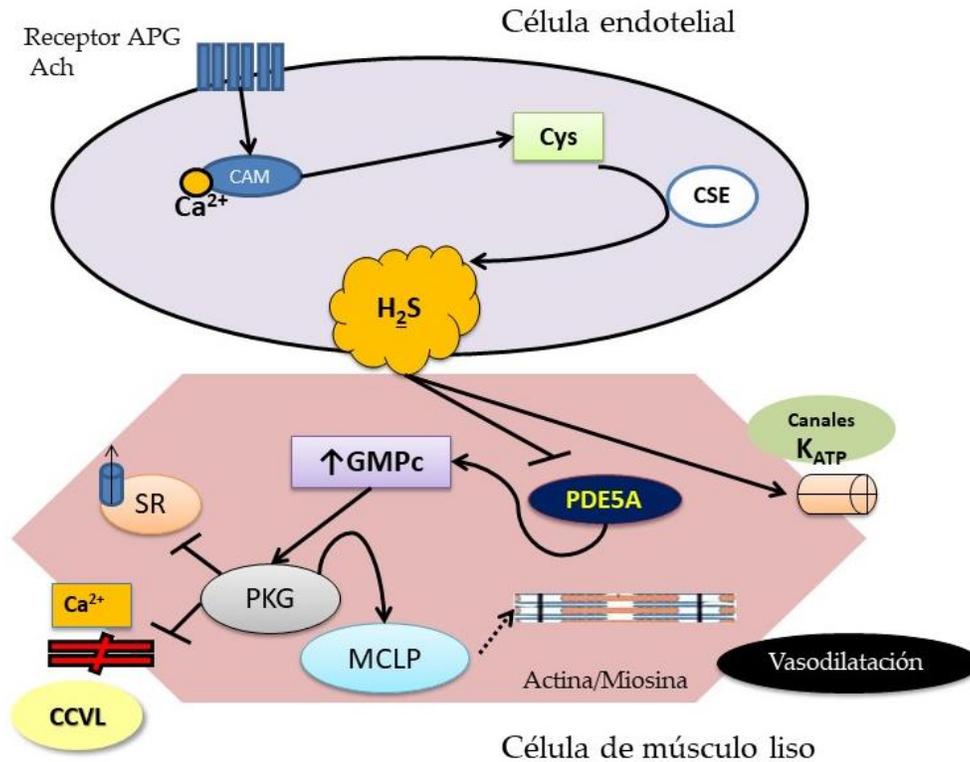


Figura 5: Efecto vasodilatador del sulfuro de hidrógeno. Ach, acetilcolina; receptor APG, receptor acoplado a proteína G; CAM, calmodulina; Cys, cisteína; CSE, cistationina-γ liasa; H_2S , sulfuro de hidrógeno; PDE5A, fosfodiesterasa 5ª; $GMPc$, guanosín monofosfato cíclico; PKG, proteína cinasa G; SR, retículo sarcoplásmico; CCVL, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L; MCLP, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.

El uso de animales manipulados genéticamente ha sido de gran utilidad para esclarecer los mecanismos funcionales del H_2S , ya que ratones que no expresan CSE presentan hipertensión y tienen disminuida la capacidad de producir vasodilatación dependiente del endotelio (Yang y col., 2008).

2.6.6. Interacción entre gasotransmisores

Los gasotransmisores poseen dianas moleculares en común que involucran la modulación de su actividad por diferentes mecanismos (Wang, 2012). Por ejemplo,

en 2012 Coletta y cols. reportaron la interdependencia entre el NO y el H₂S en la angiogénesis, pues encontraron que el efecto angiogénico y la cicatrización producido por compuestos liberadores de H₂S, se encontraban disminuidos en ratones *knockout* para eNOS. Por otro lado, en ese mismo estudio, se realizaron experimentos donde se redujo la expresión de la CSE, lo cual dio como resultado una alteración en el efecto angiogénico inducido por NO (Coletta y col., 2012). Otro mecanismo de convergencia entre los gasotransmisores en el proceso de vasodilatación tiene que ver con la sGC: si bien, el NO y el CO son capaces de activar a la sGC para la generación de cGMP, el NO posee mayor afinidad que el CO para unirse a esta enzima (Wu y Wang, 2005). Por otra parte, H₂S contribuye de una forma indirecta en este proceso, 1) inhibiendo a la PDE5, enzima encargada de la degradación de cGMP y, 2) actuando como un factor hiperpolarizante derivado de endotelio al activar canales de potasio (K_{ATP}), favoreciendo la hiperpolarización de la célula de músculo liso vascular (Coletta y col., 2012) (Figura 6).

El NO también regula la expresión de HO-1, lo cual estimula la producción de CO. El NO es uno de los inductores más potentes de este gas (Motterlini y col., 2002). En hepatocitos estimulados con IL-1 β , el CO atenúa la actividad de la iNOS, fijándose a la porción hemo de la enzima, por lo que el CO podría estar actuando como un promotor de la degradación de la iNOS, cuando a causa de condiciones patológicas se genera una sobreproducción de NO inducible, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Kim y col., 2008).

En la vasculatura del cerebro el NO y H₂S dilatan las arterias cerebrales para aumentar el flujo sanguíneo, mientras que el CO, el cual dilata vasos periféricos, actúa provocando vasoconstricción en el cerebro. Esto sugiere que el H₂S y el CO son requeridos para un mantenimiento apropiado del flujo sanguíneo en el cerebro, proporcionando un efecto protector en caso de hipoxia (Morikawa y col., 2012). Se ha reportado que tanto el NO como el CO activan canales BK_{Ca}; mientras el NO actúa sobre la subunidad β , el CO lo hace sobre la subunidad α de estos canales (Wu y col., 2002).

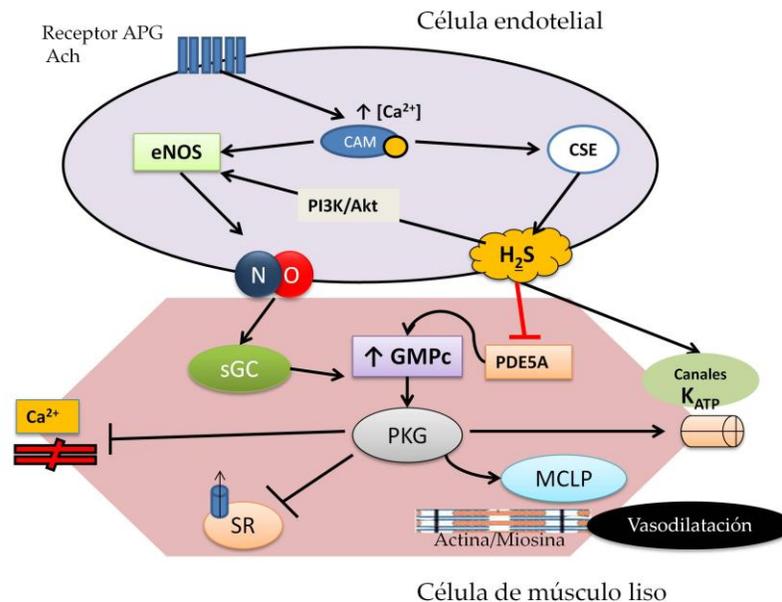


Figura 6: Interacción entre el NO y el H₂S en la vasodilatación (modificado de Coletta y col. 2012). Ach, acetilcolina; receptor APG, receptor acoplado a proteína G; CAM, calmodulina; eNOS, Óxido nítrico sintasa endotelial; CSE, cistationina-γ liasa; NO, óxido nítrico; H₂S, sulfuro de hidrógeno; sGC, guanilato ciclasa soluble; PDE5A, fofodiesterasa 5A; GMPC, guanosín monofosfato cíclico; PKG, proteína cinasa G; SR, retículo sarcoplásmico; CCVL, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L; MCLP, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina

El NO y el H₂S pueden reaccionar entre sí para formar nitroxilo (HNO) el cual provoca liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), vía canales TRPA1, en nervios sensoriales, el cual induce una disminución del tono vascular (Eberhardt y col., 2014). Otro estudio confirmó que el HNO es capaz de liberar al neuropéptido CGRP en preparaciones tisulares frescas del área trigeminal de ratas. El incremento en los niveles del CGRP podría utilizarse para tratar la migraña, debido a su importante participación en el curso de esta afección (Wild y col., 2015).

2.7. La prostaciclina en la vasodilatación

La prostaciclina (PGI₂), junto con el NO, ejercen acciones que contribuyen al mantenimiento de la función endotelial y a la regulación vasomotora de la

vasculatura (Zardi y col., 2005). La PGI₂ es un miembro del grupo de los prostanoídes que regulan la homeostasis, la hemostasis, la función de la musculatura lisa y la inflamación. Los prostanoídes son derivados del ácido araquidónico por acciones secuenciales de la fosfolipasa A₂, la ciclooxigenasa y prostaglandin-sintasas específicas. La PGI₂ se produce por células endoteliales y actúa principalmente sobre el receptor de prostaciclina (IP). La activación del receptor IP por la PGI₂ estimula la producción de cAMP, el cual activa a la proteína-kinasa A (PKA), lo que produce la hiperpolarización de la membrana y la subsecuente disminución del [Ca²⁺]_i, resultando en la relajación de la musculatura lisa vascular. Adicionalmente, la PGI₂ contrarresta la actividad vasoconstrictora y el efecto de agregación plaquetaria inducido por el tromboxano A₂ (TXA₂) (Vane y Corin, 2003).

La PGI₂ puede, a su vez, activar canales K⁺, incluyendo los dependientes de Ca²⁺ de larga y corta conductancia (BK_{Ca} y SK_{Ca}), así como los K_{ATP}, los dependientes de voltaje (KV), los rectificadores (KIR), hiperpolarizando la membrana de las células musculares lisas vasculares y disminuyendo el influjo de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L (Vang y col., 2010; Stott y col., 2014).

El efecto vasodilatador de la PGI₂ es mediado principalmente por la vía de señalización PGI₂/IP/cAMP como se muestra en la Figura 7.

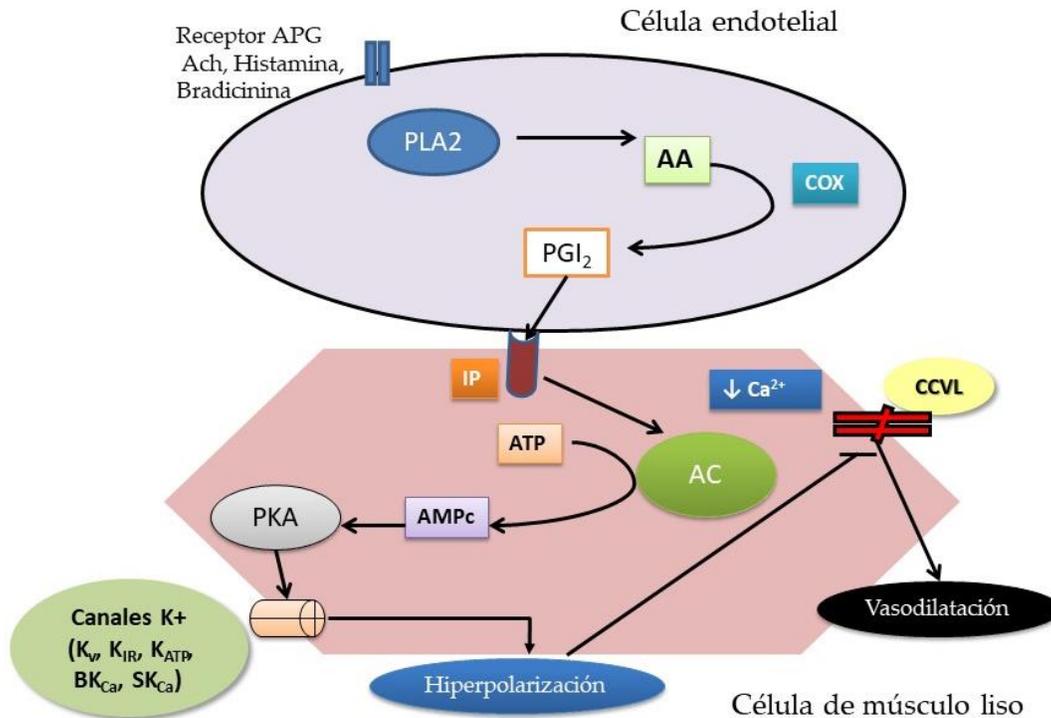


Figura 7: Mecanismo de vasodilatación de la prostaciclina. Ach, acetilcolina; receptor APG, receptor acoplado a proteína G; PLA2, fosfolipasa A2; AA, ácido araquidónico; COX ciclooxigenasa; PGI₂, prostaciclina; IP, receptor a prostaciclina; AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosín trifosfato; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína cinasa A; SR, retículo sarcoplásmico; CCVL, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L; MCLP, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina

2.9. Canales receptores de potencial transitorio (TRP)

Los canales receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés *Transient Receptor Potential*) constituyen una numerosa familia de canales iónicos, los cuales exhiben varios grados de selectividad para diferentes especies iónicas. En mamíferos, esta familia consta de 28 integrantes agrupados en 6 sub-familias en base a su secuencia de aminoácidos: TRPC (canónico, 7 miembros), TRPV (vanilloide, 6 miembros), TRPM (melastatina, 8 miembros), TRPA (ankirina, 1 miembro), TRPP (policistina, 3 miembros) y TRPML (mucolipína, 3 miembros) (Benemei y col., 2015; Moran, 2018). Estos canales se expresan de manera ubicua en todo el cuerpo, con miembros representativos de todas o de la mayoría de las diferentes familias, presentes en la mayoría de las células. Los canales TRP se pueden activar por una gran cantidad de señales y, de forma poco selectiva, son

permeables a cationes calcio (Ca^{2+}), Magnesio (Mg^{2+}) y sodio (Na^+) (Nilius y col., 2007). Estos canales se expresan ampliamente en el sistema nervioso central, así como en una gran cantidad de células periféricas y están implicados en numerosas funciones celulares fundamentales (Pedersen y col., 2005; Premkumar, 2009; Alonso-Carbajo y col., 2017).

2.9.1. Estructura de los canales TRP

Los canales TRP son proteínas de estructura cuaternaria, conformadas por homo o heterotetrámeros. Cada una de las cuatro subunidades, está formada por seis segmentos transmembranales α -hélice (S1-S6), así como por dos dominios intracelulares amino y carboxilo terminales (Figura 8). El poro del canal está formado por los segmentos transmembranales S5 y S6 y el asa conectora (Zierler y col., 2017). En la porción citoplasmática del poro, los segmentos S6 forman la compuerta que, a través de su apertura o cierre, regula la entrada de cationes (Pedersen y col., 2005; Benemei y col., 2015; Mulier y col., 2017).

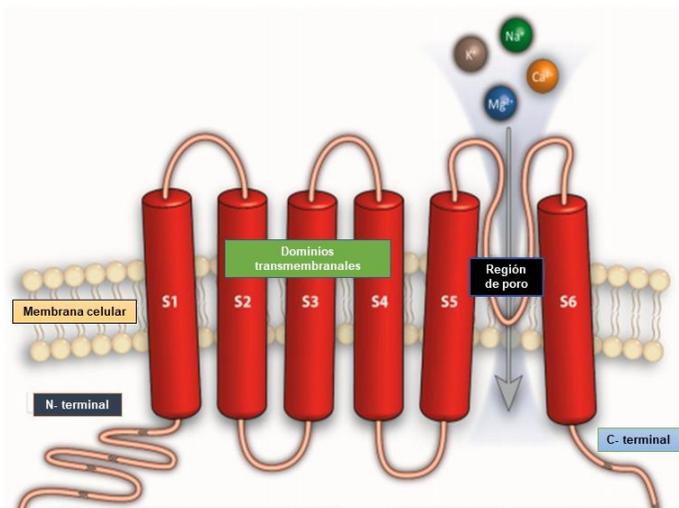


Figura 8. Estructura de la subunidad de los canales TRP. En general, los canales TRP se componen de cuatro subunidades similares, cada una compuesta de 6 segmentos transmembranales (S1-S6) con un poro formado entre los segmentos 5 y 6, el cual es permeable a cationes, principalmente a calcio.

2.9.2. Distribución de los canales TRP

Se ha reportado la presencia de canales TRPC en el sistema nervioso central, sistema vascular, músculo esquelético y pulmones; de canales TRPV en el sistema nervioso periférico, corazón, piel, vejiga, músculo esquelético, riñón e intestino; de los canales TRPA1 en el sistema nerviosos periférico, en arterias cerebrales, en piel y en mucosas (Atoyán y col., 2009; Pozsgai y col., 2010; Aisah A. Aubdool y col., 2016) y de TRPM en el sistema nervioso periférico, sistema inmune, piel, próstata, riñón, páncreas e hígado (Fonfria y col., 2006).

Por esta razón, el estudio de la respuesta de estos canales a diferentes estímulos fisiológicos y farmacológicos es de gran relevancia clínica y terapéutica, principalmente en áreas como la biomedicina y el desarrollo farmacéutico (Kaneko y Szallasi, 2013; Huang y Szallasi, 2017). Se ha reportado la presencia de canales TRPA1 en el endotelio de arterias cerebrales, localizados principalmente en las uniones mioendoteliales. Se ha propuesto que la activación de estos canales produce la dilatación arterial por medio de un mecanismo que incluye la participación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que al activarse generan la hiperpolarización de las células de músculo liso (Earley y col., 2009; Earley, 2011).

2.9.3. Canales TRP en el sistema vascular

Un gran y creciente cúmulo de evidencia, claramente demuestra la importancia de los canales TRP en la iniciación, modulación e integración de vías regulatorias que controlan los diversos tipos celulares dentro del sistema vascular para regular el flujo sanguíneo y el tono vasomotor en los tejidos (Hill-Eunbanks y col., 2014). En el sistema circulatorio, los canales TRP se encuentran en células de músculo liso vascular, células endoteliales, neuronas perivasculares y astrocitos (Earley y col., 2015). Se ha reportado la presencia de canales TRP de distintas subfamilias en diferentes tejidos del complejo vascular, los cuales, según su ubicación, contribuyen con el balance del tono vascular ejerciendo efectos vasodilatadores y/o vasoconstrictores (Liu y col., 2014).

Se ha reportado que canales TRPC presentes en el músculo liso vascular contribuyen a la entrada de Ca^{2+} a través de la activación de vías que involucran reservorios intracelulares de este catión, lo cual resulta en la despolarización de la membrana, la cual representa el mecanismo primario a través del cual estos canales ejercen vasoconstricción (Liu y col., 2014).

Existe evidencia científica de la presencia de canales TRP en el endotelio. Por ejemplo, existen estudios que han demostrado que la mutación dirigida en canales de la familia TRPC puede alterar el influjo de calcio inducido por acetilcolina y ATP en células endoteliales (Freichel y col., 2001; Zhang y Saffen, 2001; Yao y Garland, 2005). Un incremento en el influjo de calcio, en cambio, puede optimizar la liberación de factores hiperpolarizantes derivados del endotelio como gasotransmisores, prostaciclina y resultar en vasodilatación. Por otra parte, los canales TRP presentes en el endotelio pueden activar canales de potasio y así generar una hiperpolarización del músculo liso (Earley y col., 2009; Earley, 2011). De manera adicional, se ha demostrado que los canales TRPV1 y TRPA1 se coexpresan y están involucrados en procesos de regulación del tono del músculo liso arterial (Story y col., 2003; Kobayashi y col., 2005).

2.9.4. Participación de canales TRPA1 y TRPV1 en la regulación del tono vascular

La primera evidencia que demostró la participación de los canales TRPA1 en la regulación del tono vascular fue descrita por Bautista y colaboradores, quienes reportaron que estos canales están presentes en fibras nerviosas localizadas cerca de la capa adventicia en arterias mesentéricas de rata y que compuestos como el alil-isotiocianato (AITC), extractos crudos de ajo, alicina purificada y dialil-disulfuro (DADS) provocan relajación de anillos de arterias mesentéricas pre-contraídas con fenilefrina (Bautista y col., 2005). La relajación inducida por estos extractos y compuestos fue bloqueada, cuando los tejidos estudiados se pre-incubaron con rojo de rutenio, capsaicina y el antagonista del receptor al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP_{8-37}). De manera interesante, la respuesta no fue

alterada con el pretratamiento con capsazepina. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por Pozsgai y colaboradores, quienes reportaron que el cinamaldehído (CA) es capaz de generar vasodilatación en segmentos de arterias mesentéricas aisladas de ratón (Pozsgai y col., 2010). Otro grupo de investigadores, estudiaron la participación de canales TRPA1 en la vasodilatación meníngea. Dentro de sus hallazgos, reportaron que el AITC, el CA y la acroleína estimularon la liberación del CGRP en cultivos de neuronas trigeminales de rata y que tal respuesta fue bloqueada por el antagonista específico de canales TRPA1, HC-0330031 (Kunkler y col., 2011). La administración por vía nasal de AITC más el contaminante ambiental acroleína incrementaron el flujo sanguíneo meníngeo en ratas. Este efecto fue inhibido por el CGRP₈₋₃₇ y el HC-030031, lo cual sugirió la participación del CGRP y de los canales TRPA1. También se ha descrito que la activación de canales TRPA1 conduce a una vasodilatación neurogénica que involucra especies reactivas de oxígeno, CGRP y NO. En este estudio, se empleó la flujometría de láser Doppler para estimar el flujo sanguíneo en orejas de ratones normales y ratones incapaces de expresar canales TRPA1 y TRPV1. Los resultados de estos experimentos revelaron que la administración tópica de CA disminuyó el flujo sanguíneo en animales que no expresan el canal TRPA1, así como en animales normales pretratados con HC-0330031, mientras que en animales que no expresan TRPV1 no se presentó ningún efecto significativo, producido por la administración de CA (Aubdool y col., 2016). Estas investigaciones reafirman que la estimulación de canales TRPA1 por agonistas químicos causan el influjo de Ca²⁺, lo cual resulta en la liberación del CGRP en las terminaciones perivasculares presentes en las paredes arteriales (Bautista y col., 2005).

Por otra parte, Earley y col. reportaron que los canales TRPA1 están presentes en endotelio de rata y que la expresión de estos canales era más abundante en las proyecciones de la membrana plasmática de la célula endotelial, las cuales se prolongan y penetran en la lámina elástica interna de las células de músculo liso vascular. A estas estructuras también se les conoce como uniones mioendoteliales, las cuales participan en la hiperpolarización dependiente de endotelio y la vasodilatación de arterias de resistencia (Sandow y col., 2002; Earley y col., 2009;

Earley, 2011). El mecanismo propuesto para esta vía de señalización incluye la activación de canales TRPA1, que provoca la entrada de calcio, estimulando la actividad pulsátil dentro de las uniones mioendoteliales, lo cual aumenta la actividad de los canales $K_{Ca3.1}$ e hiperpolariza la membrana plasmática. Esta respuesta presumiblemente es transmitida a los miocitos arteriales subyacentes a través de las uniones gap para inducir su hiperpolarización (Earley y col., 2009; Earley y col., 2010).

Adicionalmente, se ha reportado que agonistas de canales TRPA1 producen vasodilatación en células musculares lisas vasculares, lo cual sugiere la presencia de este tipo de canales en este tejido. Yanaga y col. examinaron el efecto vasodilatador del CA sobre anillos de aorta aislada de rata y encontraron que la remoción endotelial disminuía, más no abatía, el efecto vasodilatador de CA. La respuesta relajante, independiente de endotelio, provocada por el CA en arterias de conducción sugirió un efecto farmacológico directo sobre la musculatura lisa vascular, atribuido hipotéticamente al bloqueo de canales de Ca^{2+} (Yanaga y col., 2006).

2.9.5. Canales TRPV1

La activación de canales TRPV1 por agonistas genera un incremento en la entrada de calcio intracelular, la cual resulta en la liberación de neuropéptidos como el CGRP y la sustancia P. En estudios previos, se ha reportado que los canales TRPV1 se expresan en tejido vascular de roedores y que diferentes agonistas de canales TRPV1 están implicados en la vasodilatación en diferentes lechos vasculares (Zygmunt y col., 1999; Akerman y col., 2003; Hopps y col., 2012; Ho, 2013). Los canales TRPV1 están presentes tanto en células endoteliales como en células de músculo liso vascular (Bratz y col., 2008). En particular, TRPV1 se expresa abundantemente en el endotelio. En arterias mesentéricas aisladas de roedor, la activación de canales TRPV1 con el agonista capsaicina, provocó un incremento en la liberación de NO en células endoteliales, así como vasodilatación, la cual fue inhibida con diferentes inhibidores (L-NAME, CGRP₈₋₃₇ y L-NAME + CGRP₈₋₃₇) y

estuvo ausente en arterias provenientes de animales deficientes en TRPV1 (Yang y col., 2010). TRPV1 se coexpresa con TRPA1 en neuronas sensitivas y desempeñan un papel central en la regulación de las vías de nocicepción, no obstante, existen evidencias que han demostrado que ambos canales ejercen una actividad prominente en la regulación del tono vascular.

En segmentos aislados de arterias coronarias porcinas con endotelio intacto, la activación de canales TRPV1 provocó una dilatación dependiente de la dosis. Tal dilatación arterial fue bloqueada en presencia de L-NAME, inhibidor de la eNOS y en presencia de iberitoxina, un inhibidor de canales de potasio dependientes de calcio (BK_{Ca}), sugiriendo la participación del NO y de canales BK_{Ca} en la vasodilatación mediada por la activación del canal TRPV1 (Bratz y col., 2008). Con relación al sistema cannabinoide, la anandamida, un cannabinoide endógeno, es capaz de relajar los vasos sanguíneos. Este efecto fue inhibido por capsazepina, un inhibidor específico de TRPV1 (Zygmunt y col., 1999).

Adicionalmente, en otro estudio se demostró que en células endoteliales de aorta de ratón, la activación de TRPV1 con capsaicina estimula el influjo de calcio, el cual induce la fosforilación de la eNOS y el subsecuente incremento en la producción de NO. En ese mismo estudio, se observó que la capsaicina también es capaz de relajar arterias mesentéricas, un efecto que estuvo ausente en arterias provenientes de ratones TRPV1^{-/-} (Yang y col., 2010). Otro estudio reveló que la entrada de calcio, inducida por capsaicina, a través de canales TRPV1 incrementa el flujo sanguíneo en ratones. Este efecto no se observó en ratones TRPV1^{-/-} (Guarini y col., 2012). Los canales TRPV1 también están relacionados con la vasodilatación producida por la activación de terminaciones nerviosas. Se ha descrito la localización de canales TRPV1 en las terminaciones nerviosas perivasculares, los cuales al ser activados inducen la liberación del CGRP. Esta interacción entre canales TRPV1 y la actividad de CGRP, se ha reportado más frecuentemente en arterias de resistencia, principalmente en mesentéricas (Zygmunt y col., 1999; Wang y col., 2005; Wang y col., 2006; Sudhahar y col., 2009), aunque también se ha observado la misma actividad en otros lechos vasculares (Zygmunt y col., 1999;

Akerman y col., 2004; Herradón y col., 2007). Un mecanismo similar ha sido reportado para los canales TRPA1 (**Figura 9**) (Earley y Brayden, 2015).

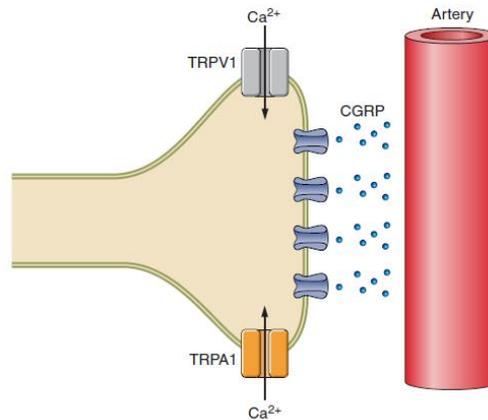


Figura 9. Canales TRP en terminaciones nerviosas perivasculares. El influjo de Ca^{2+} a través de canales TRPA1 o TRPV1 en nervios perivasculares pueden estimular la liberación de CGRP y así provocar vasodilatación (modificado de Earley y Brayden, 2015).

2.9.6. Intercomunicación entre canales TRPA1 y TRPV1

La coexpresión e interacción de canales TRPA1 y TRPV1 en neuronas sensitivas primarias es bien conocido (Trevisani y col.; Story y col., 2003; Raboune y col., 2014; Spahn y col., 2014). Por ejemplo, se ha reportado la desensibilización cruzada de TRPA1 y TRPV1 *in vitro*, sugiriendo que los canales TRPA1 y TRPV1 se encuentran ligados funcionalmente en nociceptores primarios (Ruparel y col., 2008; Ruparel y col., 2011). También, se ha demostrado la participación conjunta de canales TRPA1 y TRPV1 en la regulación de la presión arterial y la relajación vascular en ratones (Pozsgai y col., 2010; Horváth y col., 2016). Algunos fitoquímicos, como la capsaicina, la nonivamida y la *t*-pellitorina, son capaces de activar simultáneamente canales TRPV1 y TRPA1 y producir diversas actividades biológicas tales como efectos antiinflamatorios en cultivo celular de macrófagos U937 (Walker y col., 2017), reducción de adipogénesis en células 3T3-L1 (Lieder y col., 2017) y propiedades quimioestésicas (Riera y col., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte a nivel mundial y presentan una creciente incidencia y prevalencia en nuestro país. El endotelio vascular desempeña un importante papel en la fisiología del sistema cardiovascular, pues no sólo ofrece una barrera física entre la sangre y los tejidos, sino que participa en procesos como la coagulación, transporte y la regulación de la presión sanguínea. Existe una asociación sólida entre la función del endotelio y la prevención, aparición, desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión. Los tratamientos farmacológicos actuales presentan numerosas desventajas como efectos indeseables, desarrollo de tolerancia, hipersensibilidad, toxicidad y costos elevados, entre otros. Con base en estos antecedentes, es evidente la necesidad de desarrollar fármacos alternativos para tratar este tipo de enfermedades. Las plantas medicinales representan una excelente estrategia para el descubrimiento y desarrollo de fármacos, debido a que biosintetizan numerosos compuestos llamados fitoquímicos, los cuales han demostrado ser de gran valor farmacológico por su bioactividad y gran potencial profiláctico y terapéutico.

Heliopsis longipes es una planta endémica de la zona central de México, cuyas raíces se han empleado durante generaciones para el tratamiento del dolor. Su constituyente químico mayoritario, la afinina, es el principal compuesto responsable de los efectos farmacológicos producidos por esta especie. Diversos estudios farmacológicos han determinado que los extractos y la afinina provenientes de *H. longipes* son capaces de modular la nocicepción tan efectivamente como fármacos de tipo AINE y analgésicos opioides. A pesar de la moderada toxicidad reportada en estudios toxicológicos, tanto para extractos de chilcuague y como de afinina pura, se debe destacar que las concentraciones con las que se alcanza el efecto terapéutico son menores que las reportadas como tóxicas. También, se debe considerar que en la prueba de Ames, ni el extracto, ni la afinina mostraron ser mutagénicos. Por otro lado, se ha demostrado que la afinina posee la capacidad de atravesar la piel y las mucosas, lo cual representa una ventaja desde el punto de

vista farmacocinético y facilita el desarrollo de medicamentos alternativos, debido a que se pueden diseñar formulaciones a base de afinina para uso tópico o transmucoso, evitando así las desventajas de la administración oral. No obstante, se ha demostrado también que la afinina puede alcanzar el torrente circulatorio con gran facilidad, debido a su gran capacidad de difusión tisular, e incluso cruzar la barrera hematoencefálica, pudiendo así ejercer efectos farmacológicos a nivel de sistema nervioso central.

Los pocos estudios que se han realizado para determinar el mecanismo de acción de la afinina se han centrado en su actividad antinociceptiva. Los resultados sugieren una actividad pleiotrópica, es decir, que puede activar varias vías de señalización celular para producir analgesia. Las vías de señalización propuestas incluyen la participación del sistema GABAérgico, la vía opioide, la vía serotoninérgica, la vía del NO/sGC/K_{ATP} y los canales TRPV1. Los resultados obtenidos a la fecha no son concluyentes y es necesario realizar más experimentos para elucidar por completo su mecanismo de acción. Sin embargo, los resultados preliminares que se tienen hasta el momento brindan un panorama general de las posibles dianas moleculares, sobre las cuales pudiera estar actuando la afinina para ejercer actividades farmacológicas, no sólo en el caso de la nocicepción, sino también en otros padecimientos. Por ejemplo, en la vasculatura tanto la vía del NO/sGC/K_{ATP}, como la activación de canales TRPV1, están involucradas en la regulación del tono vascular, en donde una alteración en el funcionamiento de estos sistemas puede dar como resultado enfermedades cardiovasculares. Cabe mencionar, que a la fecha, los efectos de *Heliopsis longipes* y de la afinina sobre el sistema cardiovascular no han sido descritos.

Tomando en cuenta lo anterior, es evidente la necesidad de evaluar el efecto vasodilatador de esta alcaloide y determinar su mecanismo de acción. Esta alcaloide podría constituir un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares.

4. HIPÓTESIS

La afinina produce un efecto vasodilatador que involucra la participación de factores derivados del endotelio y canales TRP.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto vasodilatador de la afinina purificada de las raíces de *H. longipes* y determinar si los factores endoteliales y los canales TRP participan en su mecanismo de acción.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto vasodilatador de los extractos etanólico y de diclorometano, obtenidos a partir de las raíces de *H. longipes*, mediante el ensayo de aorta aislada de rata.
2. Purificar la afinina a partir del extracto de diclorometano de las raíces de *H. longipes*.
3. Investigar el efecto de la afinina sobre el tono del músculo liso arterial, mediante el ensayo de aorta aislada de rata.
4. Determinar la participación de las vías bioquímicas que involucran transmisores gaseosos, prostaciclina y canales de potasio en el efecto vasodilatador de la afinina.
5. Evaluar la participación de los canales TRP en el efecto vasodilatador producido por la afinina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos y solventes

Todos los reactivos y solventes empleados en el estudio fitoquímico de las raíces de *H. longipes* fueron adquiridos de JT Baker (Phillisburg, NJ, USA). Los estándares y reactivos utilizados en las pruebas farmacológicas se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La metaloporfirina de cromo (CrMP) se compró de Porphyrin Products, Inc. (Logan, UT, USA).

6.2 Animales

Todos los protocolos experimentales se desarrollaron en estricto apego a los lineamientos indicados en la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999) para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Diario Oficial de la Federación, 2001). El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Para el estudio farmacológico se utilizaron ratas machos Wistar (250-300 g), las cuales se adquirieron del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro., México. Los animales se alojaron en jaulas estándar bajo condiciones de temperatura controladas, con un ciclo de luz-obscuridad de 12:12 horas. Agua potable y alimento fueron proporcionados *ad libitum*.

6.3 Material vegetal

Las raíces de *Heliopsis longipes* (Asteraceae) se colectaron en Peñamiller, Querétaro, Qro., México. Dos especímenes completos de *H. longipes* se depositaron para su identificación en el Herbario Jerzy Rzedowski (QMEX), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. Tales especímenes fueron identificados como *Heliopsis longipes* e integrados al

acervo del herbario con los números de voucher *H. longipes* J.E. Castro R.1. y R.2. (Figuras 10 y 11).



Figura 10. Espécimen de herbario de *Heliopsis longipes* (raíces).



Figura 11. Espécimen de herbario de *Heliopsis longipes* (partes aéreas).

6.4 Preparación de los extractos empleados para la evaluación farmacológica

Las raíces frescas de *H. longipes* se secaron al aire, en un cuarto oscuro con buena ventilación (Figura 12). Una vez secas, las raíces se segmentaron con tijeras para podar y se molieron en un molino de cuchillas (Thomas Wiley 4 Lab Mill, Thomas Scientific, USA) hasta obtener un polvo fino (criba 0.5 mm). Para la preparación de los extractos de *H. longipes*, muestras representativas del material molido (10 g) se sometieron a un proceso de extracción por maceración con diclorometano o etanol absoluto por una semana en una proporción polvo: solvente 1:10 (w/v). Este proceso se repitió 3 veces con solvente fresco. Después, el material vegetal se filtró y el solvente se removió con ayuda de un rotoevaporador (Heidolph VV 2000, Germany) (Figura 13).



Figura 12. Raíces de chilcuague (*Heliopsis longipes*) empleadas en el estudio.

El rendimiento del extracto de diclorometano fue de 0.019 g de extracto/g de polvo de raíces; mientras que, para el extracto etanólico, el rendimiento fue de 0.017 g de extracto/g de polvo de raíces. Debido a que el extracto de diclorometano mostró mayor rendimiento y bioactividad que el extracto etanólico, se decidió llevar a cabo el fraccionamiento y la purificación de la afinina a partir de este extracto.

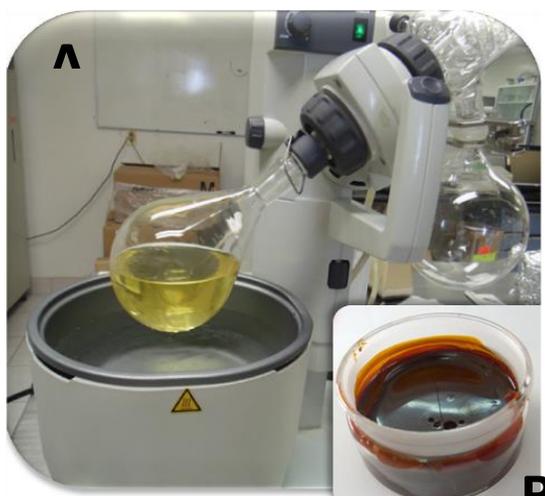


Figura 13. Proceso de obtención de extractos orgánicos a partir de la raíz de *Heliopsis longipes*. A. Concentración del extracto filtrado en rotoevaporador. B. Extracto concentrado y libre de solvente.

6.5 Fraccionamiento del extracto de diclorometano obtenido de las raíces de *H. longipes* y purificación de la afinina

Siete kilogramos de raíces de *Heliopsis longipes* secas y molidas se extrajeron con diclorometano, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Cien gramos de extracto de diclorometano se sometieron a un proceso de fraccionamiento por cromatografía en sílica gel (1 kg, Kiesegel 60 Merck 100-230 mesh, 8 × 110 cm), utilizando una columna abierta. Hexano y acetato de etilo se usaron como eluyentes en proporciones de 100:0 a 40:60 (Figura 14). De este procedimiento, se colectaron 472 fracciones de 250 mL, las cuales se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y se agruparon en 21 pools de acuerdo a su similitud cromatográfica.



Figura 14. Cromatografía en columna abierta del extracto de diclorometano de *Heliopsis longipes*.

Para los análisis en CCF, se emplearon placas de aluminio cubiertas de sílica gel con indicador fluorescente (254 nm). Utilizando una lámpara de luz ultravioleta se visualizaron los pools que revelaron la presencia de una mancha gris oscura ($R_f = 0.3$, hexano: acetato de etilo 3:2). Después, las placas de CCF se revelaron por medio de aspersion con una solución de anisaldehído/ácido sulfúrico (0.5 mL de anisaldehído en 50 mL de ácido acético glacial y 1 mL de ácido sulfúrico al 97%), desarrollando una mancha color violeta brillante, tal como se ha reportado para otras isobutil-amidas olefínicas (Bauer y col., 1989).

Los pools de interés se juntaron (45 g) en una sola fracción denominada fracción concentrada de alcaloides (FCA), la cual fue sometida a un segundo fraccionamiento en columna abierta (450 g de sílica gel Kieselgel 60 Merck, 100-230 mesh, 4.5 x 120 cm), utilizando un gradiente escalonado de hexano:acetato de etilo

de 100:0 a 90:10 (Figura 15). Con base en su similitud cromatográfica, determinada por CCF, las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo 97:3 se juntaron, se evaporaron a sequedad al vacío por medio de un rotoevaporador y se analizaron por medio de cromatografía en capa fina.



Figura 15. Cromatografía en columna abierta a la que fue sometida la fracción concentrada de alcaloides (FCA).

La pureza del compuesto aislado se confirmó por cromatografía de líquidos de alta resolución, acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA), utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Waters 600 Associates, Milford, MA, USA), acoplado a un detector de arreglo de diodos (Waters 2998) (HPLC-PDA). La columna utilizada para este análisis fue una columna C18 modelo XBridge (4.6 × 100 mm 3.5 μm). La velocidad de flujo de la fase móvil (acetonitrilo:agua 44:56 v/v) fue de 0.5 mL/min con una temperatura constante de la columna de 30 °C y una longitud de onda de detección de 229 nm.

6.6 Determinación de la estructura química de la afinina

La estructura química del compuesto purificado se elucidó por medio de análisis espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (NMR) de protón ($^1\text{H-NMR}$) y de carbono-13 ($^{13}\text{C-NMR}$). El espectro de NMR se obtuvo con un espectrómetro Varian VNMRS 400 con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. La afinina se identificó por medio de la comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura (Yasuda y col., 1980; Nakatani y Nagashima, 1992).

6.7 Determinación de efecto vasodilatador y elucidación del mecanismo de acción de la afinina.

6.7.1 Ensayo de aorta aislada de rata

Las ratas se sacrificaron por decapitación. La aorta torácica se removió quirúrgicamente y se colocó en una caja de Petri conteniendo solución fría (4 °C) de Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): 126.8 NaCl; 5.9 KCl; 1.2 KH_2PO_4 ; 1.2 MgSO_4 ; 5.0 D-glucosa; 30 NaHCO_3 ; 2.5 CaCl_2 (pH 7.4), oxigenado con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2).

El espacio intraluminal de la aorta se lavó con solución Krebs-Henseleit fresca para evitar la formación de coágulos en el área intravascular. A continuación, la aorta se limpió de tejido conectivo y adiposo circundante por medio de unas tijeras vansas y unas pinzas finas, cuidando de no ejercer tensión excesiva sobre el vaso, para evitar dañarlo. Una vez limpia la aorta, se cortó en anillos de aproximadamente 3 mm de longitud. Los anillos aórticos se montaron entre dos ganchos metálicos, uno fijo y el otro acoplado a un transductor isométrico, colocados dentro de cámaras para baño de órganos aislados, conteniendo solución Krebs-Henseleit a 37 °C y oxigenada con carbógeno. Entonces, los segmentos aórticos montados y oxigenados se dejaron equilibrar por 60 minutos a una tensión de 1.5 g. Durante este periodo, la solución de los baños de órganos se recambió cada 10 minutos. Posteriormente, con la finalidad de estimular el músculo liso arterial, los tejidos se contrajeron con una solución de KCl (100 mM). Una vez alcanzado un tono contráctil estable, la solución

de inmersión se recambió cada 10 minutos hasta alcanzar la tensión inicial de 1.5 g. Posteriormente, los anillos aórticos se contrajeron con L-fenilefrina (1 μ M); la fuerza contráctil inducida se definió como el 100 %. Cuando se estabilizó el efecto contráctil, se agregaron acumulativamente las sustancias de prueba a la cámara de tejidos. Se utilizó acetilcolina (ACh) como control positivo, la cual se disolvió en agua destilada y fue evaluada en un rango de concentración de 0.2 ng/mL a 2 mg/mL. Por otra parte, la afinina y los extractos se disolvieron en vehículo (carboximetilcelulosa al 1% en agua destilada) para posteriormente probarse en un rango de concentración de 1 μ g/mL a 1 mg/mL. En los experimentos para determinar mecanismo de acción, se emplearon diferentes inhibidores farmacológicos, los cuales se adicionaron a las cámaras de órganos aislados 20 minutos antes de la adición de fenilefrina. Los cambios en la tensión de los segmentos de aorta, provocados por las concentraciones evaluadas, se detectaron con un transductor de fuerza Grass FT03 (Grass Instruments, USA), acoplado a un polígrafo Grass 7D (Grass Instruments, USA). Los valores obtenidos se expresaron como porcentajes de relajación basados en la contracción generada por la adición de fenilefrina (Ibarra-Alvarado y col., 2010).

6.7.2 Participación del endotelio en el efecto vasodilatador de la afinina

Para determinar si la respuesta vasodilatadora de la afinina sobre la aorta de rata era dependiente del endotelio vascular, se realizaron ensayos en segmentos aórticos a los cuales se les removió el endotelio. En tales experimentos, los anillos de aorta se sometieron a enjuagues luminales con una solución de desoxicolato de sodio al 0.2%, disuelto en solución salina al 0.9%, con la finalidad de remover la capa endotelial, tal como se reportó previamente (Ibarra-Alvarado y col., 2010). La ausencia de endotelio se confirmó al inicio del experimento, mostrando que la adición de 1 μ M de ACh no indujo una respuesta vasodilatadora mayor al 5%. Una vez que las concentraciones acumulativas de afinina se agregaron a las cámaras de tejido y se llevó a cabo el experimento en su totalidad, como se describió en párrafos anteriores, se adicionó nitroprusiato de sodio (100 μ M) a las cámaras de tejido para demostrar que la arteria aún poseía la capacidad de relajarse.

6.7.3 Evaluación de la participación de las vías de señalización de los gasotransmisores, la prostaciclina y los canales de potasio en la respuesta vasodilatadora producida por la afinina

La participación de la vía de los principales gasotransmisores en el efecto vasodilatador producido por la afinina, se evaluó a través de la incubación de anillos de aorta de rata con endotelio intacto durante 20 minutos en presencia de inhibidores de enzimas específicas de cada una de esas vías bioquímicas: (1) para la vía del NO/cGMP: 100 μ M *N*^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, inhibidor de la eNOS) y 10 μ M de 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3- α] quinoxalin-1-uno (ODQ, inhibidor de la sGC); (2) vía H₂S/K_{ATP}: 1 mM DL-propargilglicina (PAG, inhibidor de la CSE); (3) vía CO/cGMP 15 μ M de mesoporfirina de cromo IX (CrMP, inhibidor de la HO) (Andresen y col., 2006; Durante y col., 2006; Decaluwé y col., 2012; Bełtowski y Jamroz-Wiśniewska, 2014; Ahmad y col., 2015; Holwerda y col., 2015; Wang y col., 2015; Yoo y col., 2015).

Para determinar la participación de la vía de la prostaciclina en el efecto vasodilatador de la afinina, los segmentos aórticos se incubaron por 20 minutos en presencia de 1 μ M de indometacina (INDO, inhibidor de la COX) (Majed y Khalil, 2012; Gonzalez y col., 2015)

Para determinar si la activación de canales de potasio participa en la vasodilatación producida por la afinina, se incubaron anillos aórticos por 20 minutos con 1 mM de tetraetilamonio (TEA, bloqueador no selectivo de canales de potasio) o 10 μ M de glibenclamida (bloqueador específico de K_{ATP}) y después se adicionó la afinina de manera acumulativa (Shen y col., 2013; Stott y col., 2014).

6.7.4 Determinación de la participación de canales TRP y del receptor eCB en el efecto vasodilatador producido por la afinina

Para identificar si los canales TRP están involucrados en el efecto vasodilatador producido por la afinina, se incubaron segmentos aórticos aislados de rata con los siguientes bloqueadores farmacológicos: el bloqueador selectivo de canales

TRPA1, HC030031 (100 μM); el bloqueador específico de canales TRPV1, BCTC 100 μM ; el agonista de canales TRPV1, capsaicina (10 μM) para desensibilizar terminaciones perivasculares y los bloqueadores inespecíficos de canales TRPV, rojo de rutenio (10 μM) y SKF365 (30 μM). Finalmente, para determinar si la vía de señalización HNO-TRPA1-CGRP está involucrada en el efecto vasodilatador mediado por la afinina, se empleó el inhibidor del receptor al CGRP, CGRP8-37 (3 μM).

Con base en la gran similitud estructural de la afinina con el endocannabinoide anandamida, se decidió evaluar la posible participación de los receptores a cannabinoides de tipo endotelial (eCB). Los segmentos de aorta se incubaron por 30 minutos con el inhibidor O1918 (10 μM) antes de la adición acumulativa de la afinina.

6.8 Análisis estadístico

Las evaluaciones de cada concentración de las sustancias probadas se llevaron a cabo en aortas obtenidas de al menos tres ratas diferentes ($n = 6$). Todos los valores se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los datos resultantes obtenidos de cada evaluación se ajustaron a una ecuación sigmoidea, se graficaron y se analizaron para calcular la EC_{50} con ayuda del software GraphPad Prism 7.02 (San Diego, CA, USA). Estos resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, usando el paquete estadístico GraphPad Prism 7.02, seguido de una prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas entre las medias. Valores de $p < 0.01$ o $p < 0.001$ se consideraron significativos estadísticamente.

7. RESULTADOS.

7.1 Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano obtenido de las raíces de *H. longipes* y purificación de la afinina.

El estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de las raíces de *H. longipes* se muestra esquematizado en la Figura 16. La extracción con diclorometano proporcionó un rendimiento de extracto más alto (19 g/kg de raíces secas), comparado con la extracción con etanol (17 g/kg de raíces secas). Además, considerando su mayor potencia vasodilatadora, se eligió el extracto de diclorometano para purificar compuestos bioactivos. Este extracto (100 g) se fraccionó por cromatografía en columna abierta para obtener 21 fracciones (Figura 17). La subsecuente cromatografía de las fracciones 8-17 resultaron en la purificación de 28.5 g de afinina pura (Figura 18), de aspecto aceitoso y color amarillo pálido, tal como el reportado para la afinina (Jacobson y col., 1947; Jacobson, 1954; Yasuda y col., 1980; Nakatani y Nagashima, 1992; Bedolla-Cázares y col., 2017).

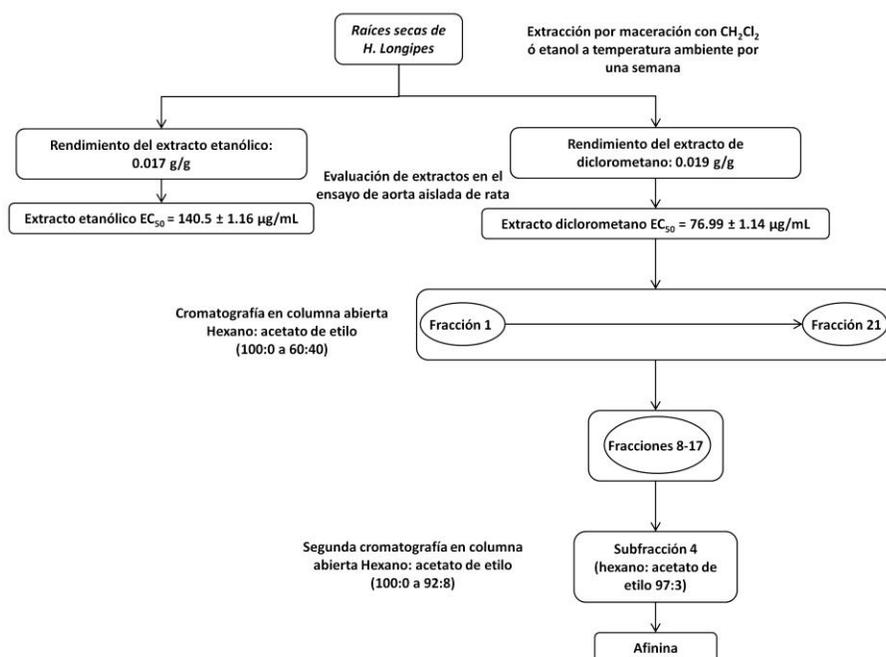


Figura 16. Diagrama del proceso de purificación de la afinina a partir del extracto de diclorometano.

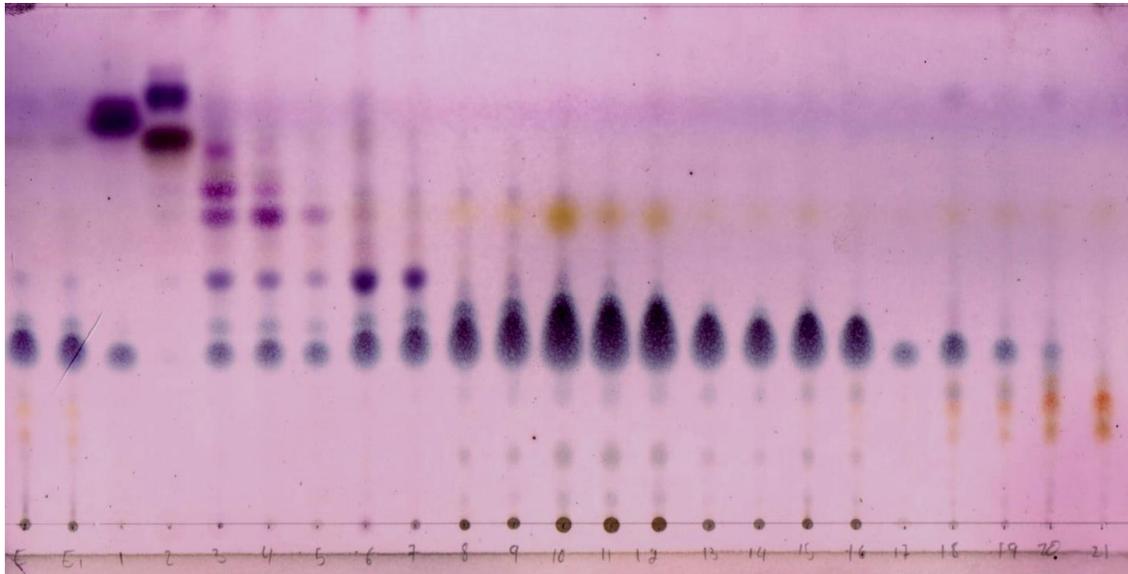


Figura 17. Secuencia de fraccionamiento en columna abierta por medio de cromatografía en capa fina. De las 21 fracciones obtenidas, se juntaron de la 8 a la 17; a esta mezcla se denominó fracción concentrada de alcaloides (FCA), para volver a someter a fraccionamiento por columna abierta.

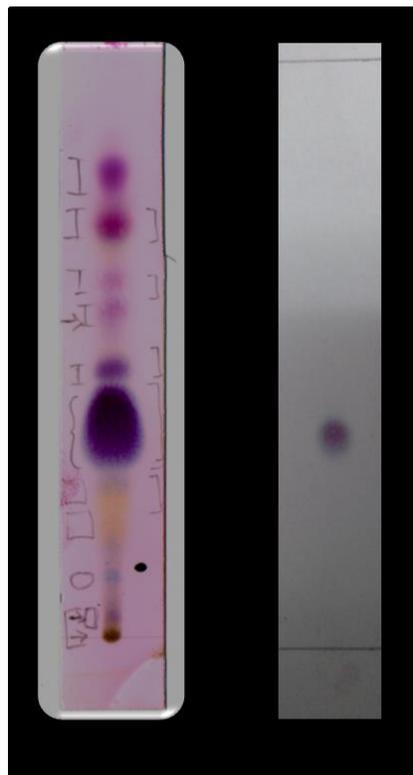


Figura 18. Placas de cromatografía en capa fina que muestran la purificación de la alcalina. Del lado izquierdo, se muestra una placa correspondiente al extracto de diclorometano de *Heliopsis longipes*; del lado derecho, la alcalina purificada, después del segundo fraccionamiento por columna abierta.

La afinina purificada por columna abierta, derivada de la presente investigación, fue identificada a través de análisis espectroscópicos (^1H -NMR y ^{13}C -NMR) (Figuras 19 y 20) y la comparación de las constantes espectrales con aquellas reportadas previamente en la literatura para la afinina (Tabla 4). Los análisis por cromatografía de gases (GC) y de líquidos de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA), revelaron una pureza mayor al 94% (Figuras 21-23).

Tabla 4. Datos espectrales de la afinina ^{13}C NMR (400 MHz) y ^1H NMR (400 MHz)

H	δ_{ppm}	C
1	-	166.15
2	5.80 (1H, br d, $J = 16.0, 8.0$ Hz)	124.30
3	6.80 (1H, dt, $J = 16.0, 8.0$ Hz)	143.51
4	2.28 (4H, m)	32.20
5	2.28 (4H, m)	26.49
6	5.25 (1H, dt, $J = 10.7, 7.1$ Hz)	127.73
7	5.94 (1H, dd, $J = 12.0$ Hz)	129.52
8	6.25 (1H, br dd, $J = 16.0, 4.0$ Hz)	126.79
9	5.67 (1H, dq, $J = 16.0, 6.0$ Hz)	130.00
10	1.76 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	18.39
NH	5.47 (br s)	-
1'	3.13 (2H, dd, $J = 6.0, 6.0$ Hz)	46.97
2'	1.80 (1H, m)	28.68
3'	0.93 (6H, d, $J = 6.7$ Hz)	20.23
4'	0.93 (6H, d, $J = 6.7$ Hz)	18.40

La afinina se disolvió en CDCl_3 .

Las integraciones, multiplicidad y constantes de acoplamiento se muestran entre paréntesis.

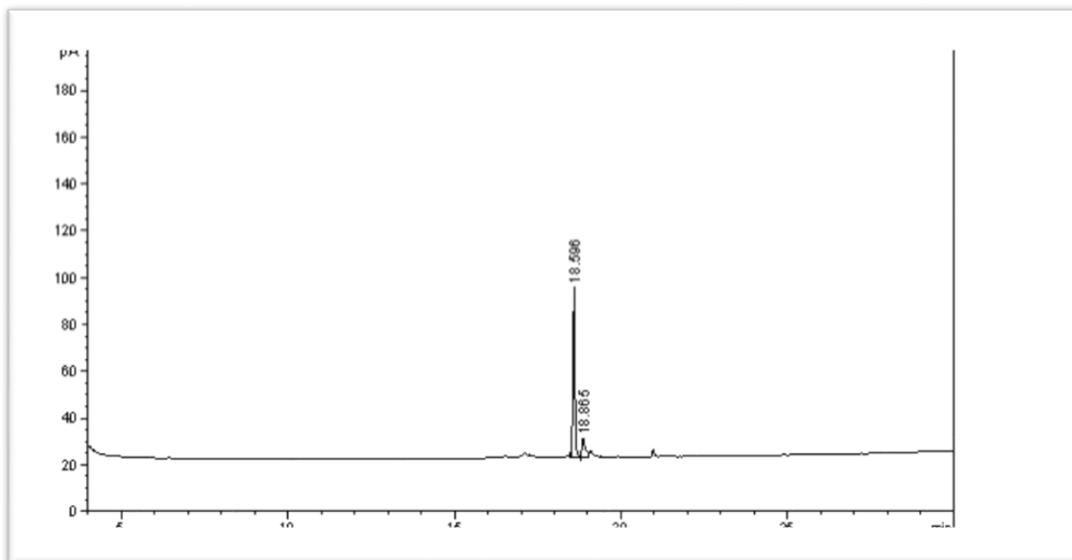


Figura 21. Cromatograma GC de la afinina purificada.

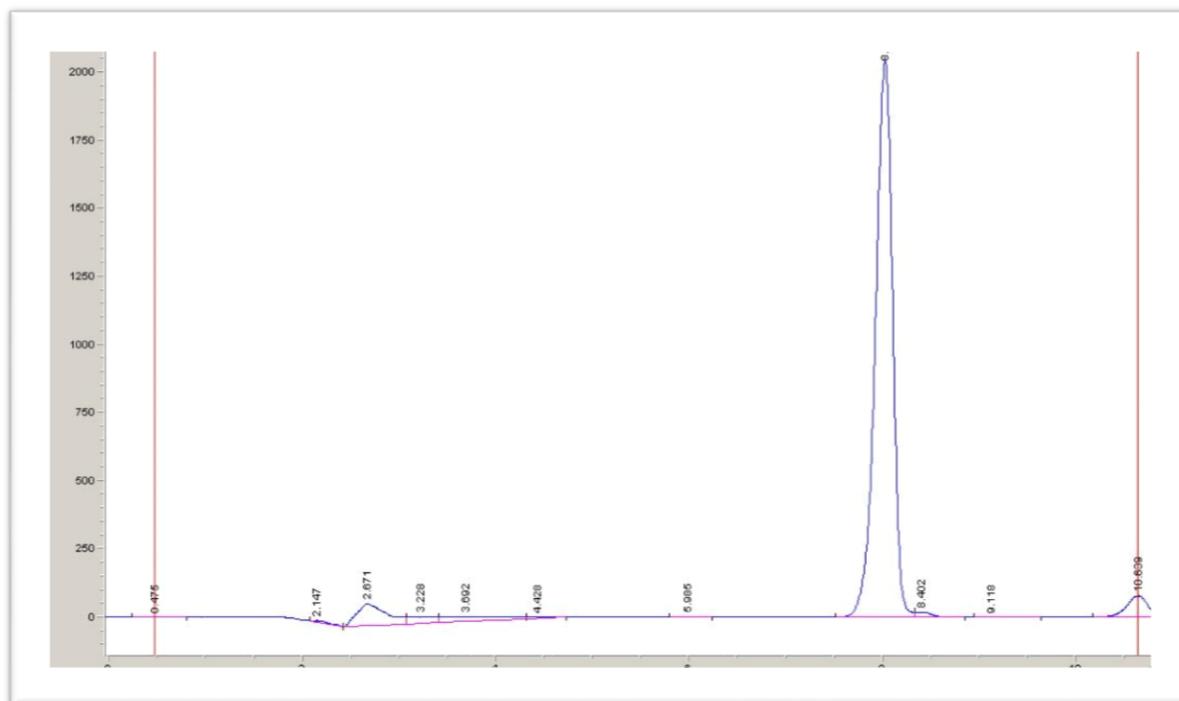


Figura 22. Cromatograma de HPLC de la afinina purificada.

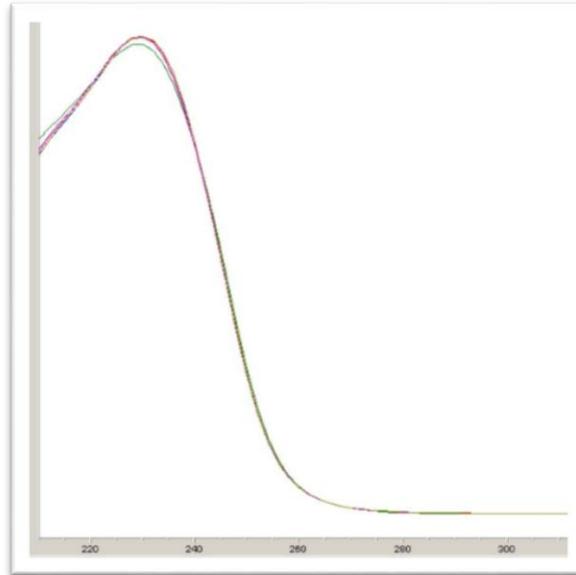


Figura 23. Espectro de absorción UV-VIS de la afinina. Cada color representa una repetición.

7.2 Efecto vasodilatador de extractos de *H. longipes* y de la afinina

Los extractos de diclorometano y etanólico de raíces de *H. longipes*, así como la afinina, indujeron una relajación dependiente de la concentración en anillos aórticos de rata con endotelio funcional. En la Figura 24 se muestran las curvas concentración respuesta de ambos extractos, de la afinina y de acetilcolina, la cual se empleó como control positivo. El extracto de diclorometano ($E_{\max} = 100 \pm 3.11\%$ y $EC_{50} = 76.99 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$) fue aproximadamente dos veces más potente que el extracto etanólico ($E_{\max} = 100 \pm 4.54\%$ y $EC_{50} = 140.5 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$), mientras que la afinina resultó ser significativamente más potente que ambos extractos ($E_{\max} = 100 \pm 3.10\%$ y $EC_{50} = 27.38 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$).

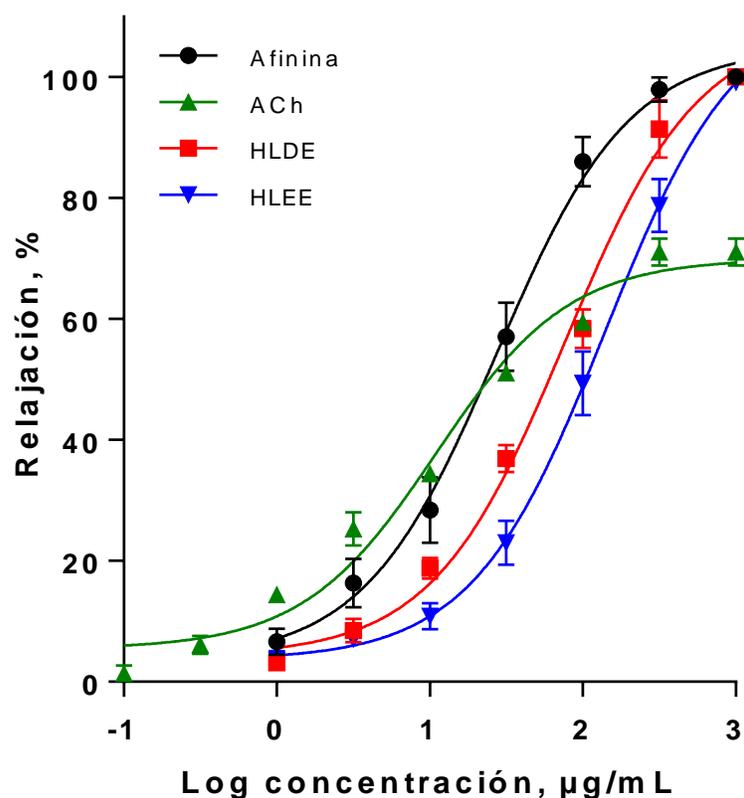


Figura 24. Efecto vasodilatador de extractos y de la afinina, obtenidos de las raíces de *Heliopsis longipes*.

La afinina resultó ser aproximadamente veinticinco veces menos potente que la acetilcolina ($E_{max} = 70.02 \pm 1.43\%$ y $EC_{50} = 1.094 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), sin embargo, esta alcaloide produjo un efecto vasodilatador máximo, mayor que el control positivo. La carboximetilcelulosa 1% (CMC), empleada como vehículo, no mostró efecto vasodilatador significativo como se puede apreciar en la Figura 25.

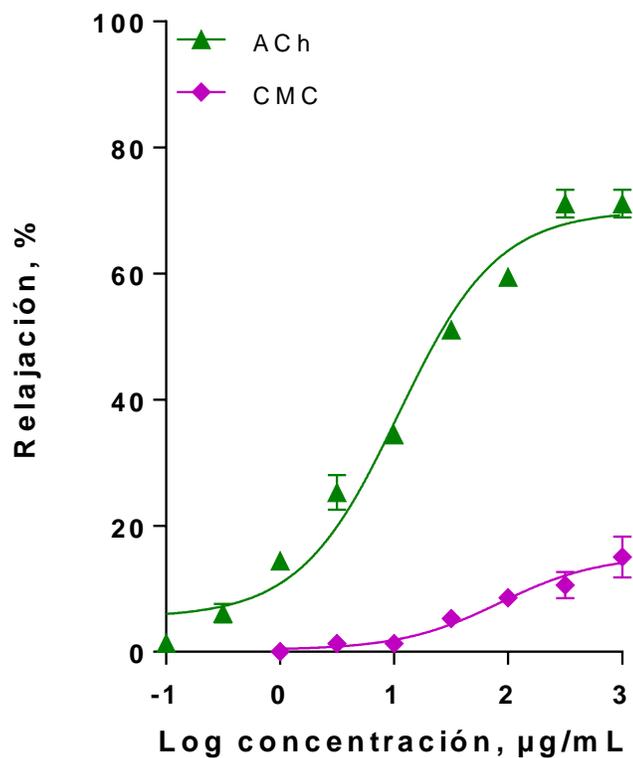


Figura 25. Efecto vasodilatador provocado por el vehículo, carboximetilcelulosa (CMC).

7.3 Dependencia del endotelio vascular en la vasodilatación inducida por afinina

La remoción de la capa endotelial vascular provocó un desplazamiento significativo de la curva concentración respuesta del efecto vasodilatador de la afinina a la derecha, sin afectar la respuesta máxima ($E_{max} = 100 \pm 4.5\%$ y $EC_{50} = 231.2 \pm 1.13 \mu\text{g/mL}$, $P < 0.01$) (Figura 26).

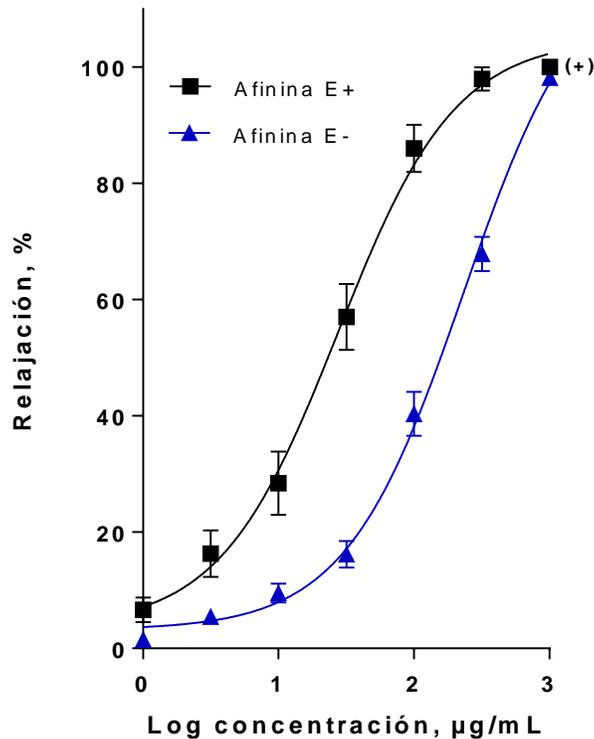


Figura 26. Efecto vasodilatador de la afinina en presencia (E+) y ausencia (E-) de endotelio. Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); + $p < 0.01$.

7.4 Participación de los gasotransmisores en el efecto vasodilatador producido por la afinina

El efecto vasodilatador de la afinina se redujo significativamente, cuando se inhibió la eNOS con L-NAME (100 μ M), la HO con CrMP (15 μ M) y la CSE con PAG (1 mM), lo cual indicó que las vías del NO/cGMP, del CO/cGMP y del H₂S/K_{ATP} están involucradas en este efecto. El efecto vasodilatador de la afinina también se redujo significativamente, inhibiendo a la sGC con ODQ (10 μ M), lo cual confirmó la participación de la vía del NO/cGMP en este efecto. Sin embargo, este resultado también sugiere que la afinina activa directamente a la sGC en la célula muscular lisa, sugiriendo que el efecto vasodilatador de esta alcaloide involucra la participación de un mecanismo independiente de endotelio (Figura 27).

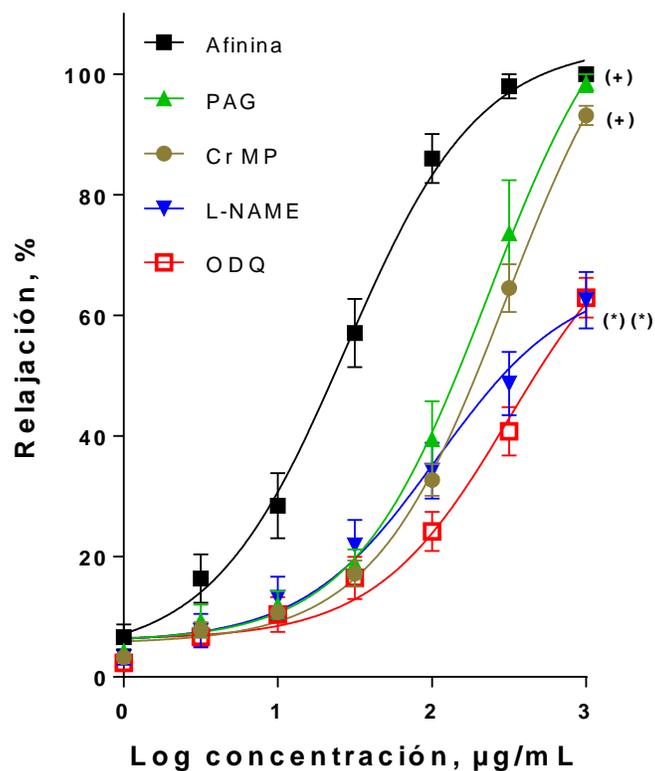


Figura 27. Participación de las vías de los gasotransmisores y de la sGC en el efecto vasodilatador de la afinina. En ausencia (control) y presencia de PAG (1 mM), mesoporfirina de cromo (CrMP, 15 µM), *N*^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 100 µM) y ODQ (10 µM). Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); + $p < 0.01$; * $p < 0.001$.

Con la finalidad de estudiar la interacción entre las vías del NO/cGMP y del H₂S/K_{ATP} en el efecto vasodilatador de la afinina, se inhibieron simultáneamente la eNOS con L-NAME y la CSE con PAG (Figura 28). La inhibición simultánea de estas enzimas produjo un efecto aditivo en la disminución del efecto vasodilatador de la afinina, sin embargo, al aumentar la concentración de este compuesto, se alcanzó el efecto máximo de relajación vascular ($E_{MAX} = 100\%$), lo que sugiere la posible participación de mecanismos vasodilatadores independientes de endotelio.

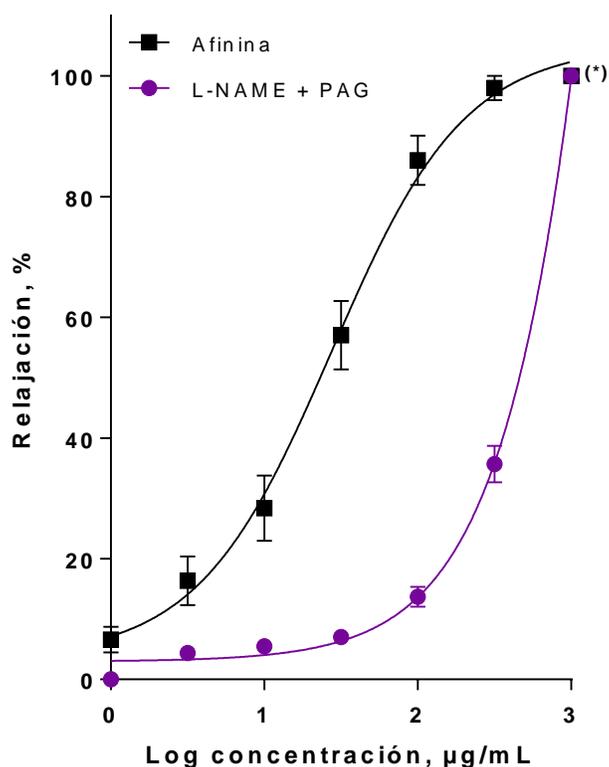


Figura 28. Intercomunicación entre el NO y el H₂S en el efecto vasodilatador de la afinina. Curva concentración respuesta que muestra el efecto vasodilatador de la afinina en presencia de los inhibidores L-NAME y PAG. Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.001$.

Para confirmar si el efecto vasodilatador de la afinina involucra la activación directa de la sGC en el músculo liso arterial, se removió la capa endotelial de anillos de aorta y se incubaron con ODQ (10 μ M), un inhibidor de la sGC. La inhibición de esta enzima disminuyó significativamente el efecto vasodilatador de la afinina, lo cual sugiere que esta alcalamida es capaz de generar vasodilatación, por medio de mecanismos independientes de endotelio y que uno de esos mecanismos es la activación directa de la enzima sGC (Figura 29).

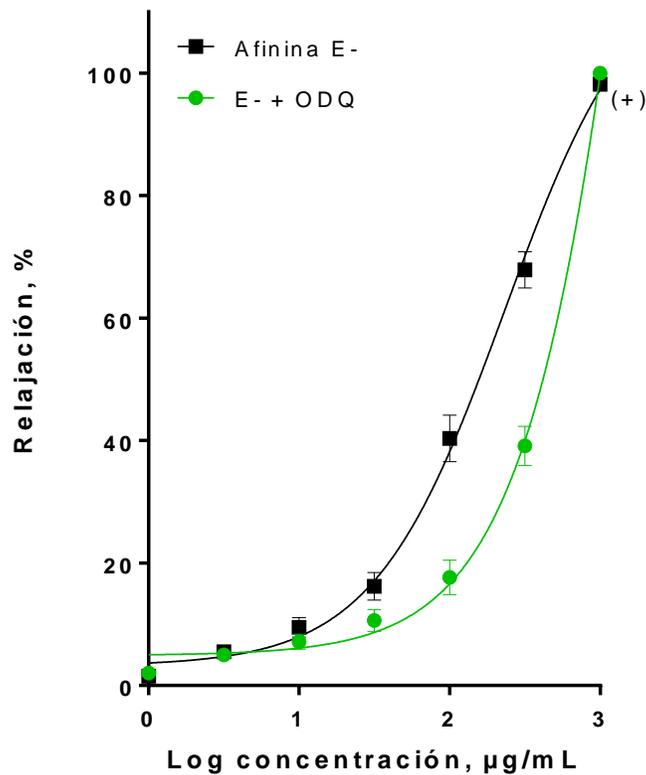


Figura 29. Estimulación de la sGC en el efecto vasodilatador de la afinina. La curva concentración respuesta esquematiza la actividad vasodilatadora de la afinina sobre segmentos de aorta de rata sin endotelio (E-), en ausencia y en presencia de ODQ (10 µM). Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); + $p < 0.001$. ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3- α] quinoxalin-1-uno.

7.5 Apertura de los canales de potasio en la vasodilatación inducida por afinina

Para determinar si la activación de canales de potasio participaba en el efecto vasodilatador de la afinina, se evaluó el efecto relajante de esta alcaloide en presencia de glibenclamida (Gli, un bloqueador específico de canales K_{ATP}) y tetraetilamonio (TEA, bloqueador inespecífico de canales de potasio) en aorta de rata. Ambos bloqueadores provocaron una disminución del efecto vasodilatador de la afinina (Figura 30), lo cual indicó que la activación de estos canales contribuye a producir este efecto.

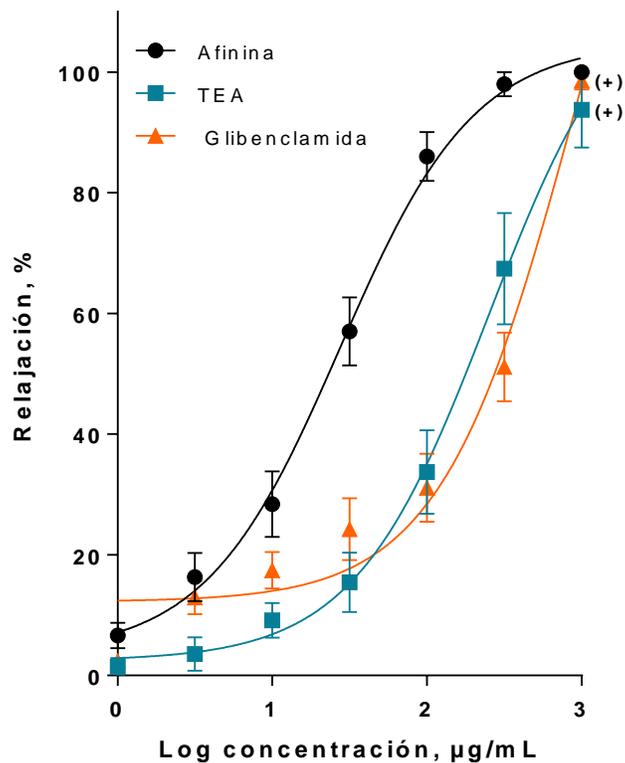


Figura 30. Activación de canales K⁺ en el efecto vasodilatador de la afinina. Experimentos llevados a cabo en ausencia (control) y presencia de los bloqueadores de canales K⁺, glibenclamida (10 µM) y tetraetilamonio (1 mM) en aorta de rata. Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); + $p < 0.01$

7.6 Activación de la vía de la PGI₂/cAMP en la dilatación de aorta de rata inducida por la afinina

Para determinar si la vía de la PGI₂/cAMP estaba implicada en la relajación arterial inducida por afinina, se incubaron segmentos de aorta de rata con indometacina (INDO, 10 µM) para inhibir a la ciclooxigenasa (COX). La inhibición de esta enzima redujo significativamente el efecto vasodilatador de la afinina (Figura 31), lo cual indicó que la activación de la vía de la PGI₂/cAMP contribuye al efecto vasodilatador de esta alcaloide.

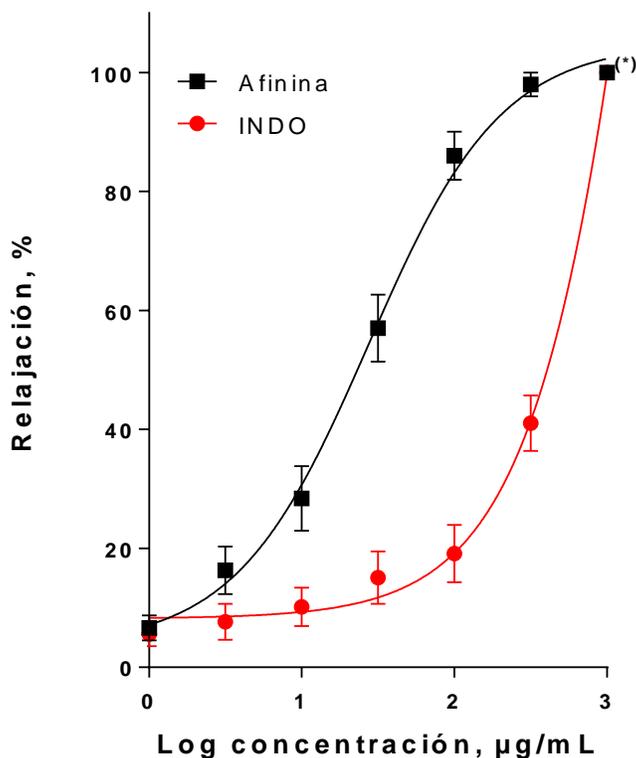


Figura 31. Participación de la prostaciclina (PGI_2) en la vasodilatación provocada por afinina. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de indometacina (INDO, $10 \mu\text{M}$). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.001$.

7.7 Apertura de canales TRPA1 en la vasodilatación inducida por la afinina.

Para determinar si la activación de los canales TRPA1 estaba involucrada en el efecto vasodilatador producido por la afinina, se incubaron segmentos aórticos de rata con HC030031 ($100 \mu\text{M}$), un bloqueador específico de canales TRPA1. La inhibición de estos canales disminuyó drásticamente el efecto vasodilatador de la afinina ($\text{EC}_{50} = 199.1 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$; $E_{\text{MAX}} = 36.88 \pm 3.61 \%$) (Figura 32), indicando que los canales TRPA1 juegan un papel muy importante en la vasodilatación producida por esta alcaloide.

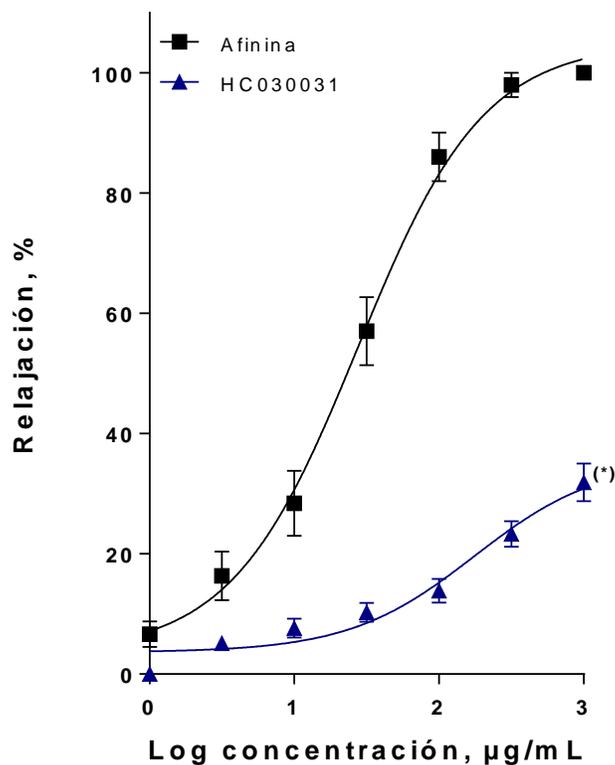


Figura 32. Activación de canales TRPA1 en la actividad vasodilatadora de la afinina. Curvas concentración respuesta que muestran el efecto vasodilatador de la afinina en ausencia (negro) y en presencia del bloqueador de canales TRPA1, HC300331 (100 µM) (azul). Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.001$

Para determinar si la respuesta vasomotora provocada por la afinina involucra la activación de la vía del HNO-TRPA1-CGRP (Eberhardt y col., 2014; Aubdool y col., 2016), se construyó la curva concentración respuesta de la afinina en presencia del CGRP₈₋₃₇ (3 µM), antagonista del receptor CGRP. La respuesta vasodilatadora de la afinina disminuyó, de manera significativa, en presencia de este antagonista ($EC_{50} = 76.32 \pm 1.65$ µg/mL), sin afectar la respuesta máxima ($E_{MAX} = 100 \pm 2.65$ %) (Figura 33). Los resultados de estos experimentos sugieren que la vía del HNO-TRPA1-CGRP participa en el efecto vasodilatador de la afinina.

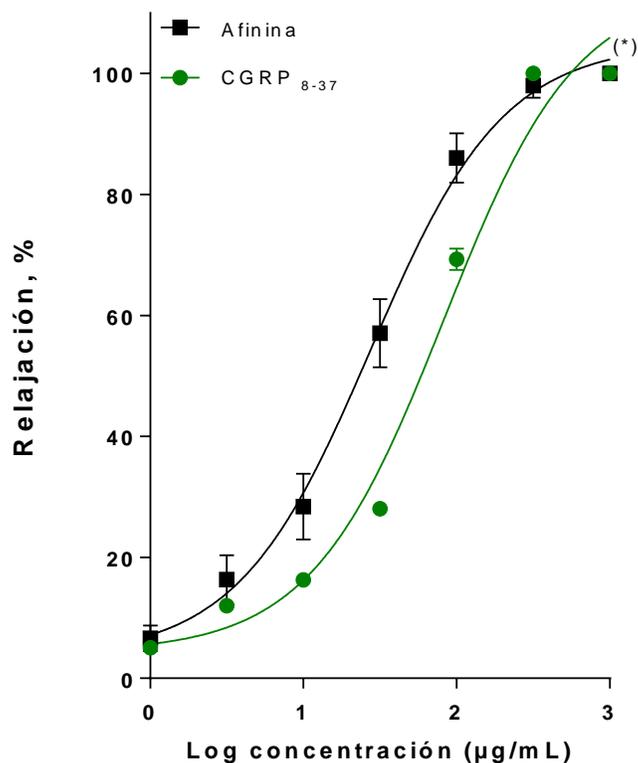


Figura 33. Contribución del CGRP al efecto vasomotor mediado por la afinina. Se empleó CGRP₈₋₃₇ (3 µM) como inhibidor del receptor a CGRP. Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.01$.

Para determinar si el efecto vasodilatador producido por la afinina involucra la activación de canales TRPA1 presentes en el endotelio, se realizaron experimentos en segmentos aórticos de rata sin endotelio en presencia de HC030031. Como se puede apreciar en la Figura 34, el bloqueo de los canales TRPA1 en aorta sin endotelio provocó una disminución leve pero significativa del efecto vasodilatador de la afinina, sin afectar la respuesta máxima ($EC_{50} = 461.9 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$; $E_{MAX} = 100 \pm 3.1 \%$), lo cual sugiere que la participación de canales TRPA1 endoteliales juega un papel importante en el efecto vasodilatador de la afinina. De manera adicional, estos resultados sugieren que esta alcalamida también produce su efecto vasodilatador, activando canales TRPA1 localizados en células perivasculares, aunque en una proporción mucho menor.

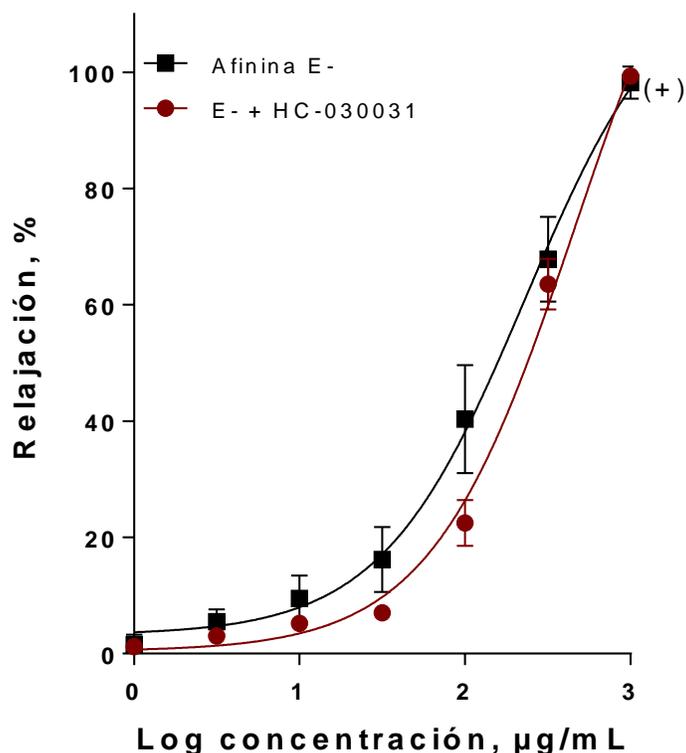


Figura 34. Participación de los canales TRPA1 endoteliales y perivasculares en la vasodilatación provocada por la afinina. Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador de la afinina sobre anillos de aorta de rata sin endotelio, en ausencia y en presencia del bloqueador de canales TRPA1, HC-30031 (100 µM). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); + $p < 0.01$.

7.8 Activación de los canales TRPV1 en el efecto vasodilatador de la afinina

Considerando que los canales TRPA1 se coexpresan en un 60-75% con los canales TRPV1 presentes en tejido nervioso (Story y col., 2003; Kobayashi y col., 2005), se determinó si el efecto vasodilatador de la afinina involucra también la activación de los canales TRPV1 en aorta aislada de rata. Por esta razón, se incubaron segmentos de aorta de rata con bloqueadores específicos (capsaicina, 10 µM y BCTC, 10 µM) (Figuras 35 y 36) e inespecíficos (rojo de rutenio, 10 µM y SKF365, 30 µM) (Figuras 37 y 38) de los canales TRPV1. Aunque el compuesto SKF-96365 es un inhibidor inespecífico de canales TRP, se ha utilizado para bloquear con mayor especificidad canales TRP del tipo C (García y col., 2016).

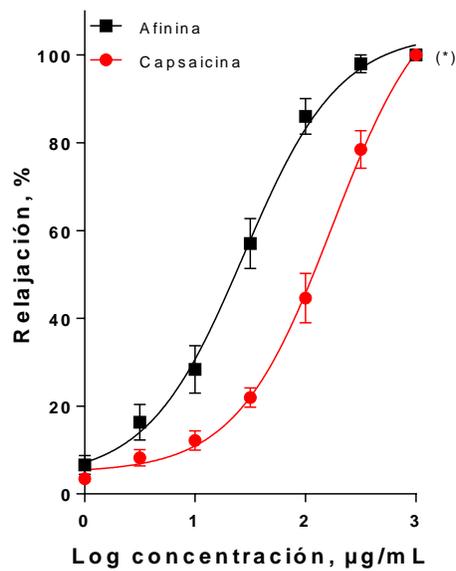


Figura 35. Activación de los canales TRPV1 en la vasodilatación causada por afinina. La curva concentración respuesta muestra el efecto vasodilatador de la afinina en ausencia (control) y en presencia de capsaicina (10 µM). Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.01$.

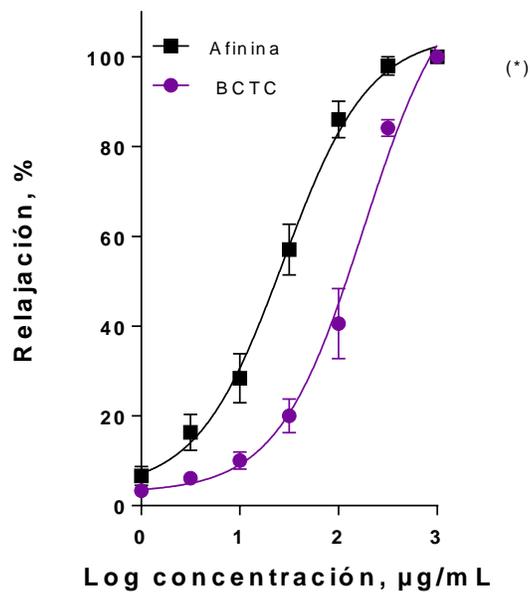


Figura 36. Efecto vasodilatador de la afinina en presencia del bloqueador específico de canales TRPV1, BCTC (10 µM). Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.01$.

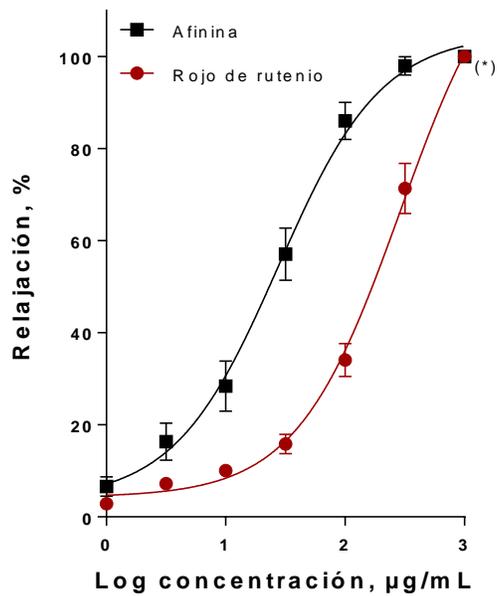


Figura 37. Vasodilatación producida por afinina en presencia del inhibidor inespecífico de canales TRPV1, rojo de rutenio (10 µM). Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.01$

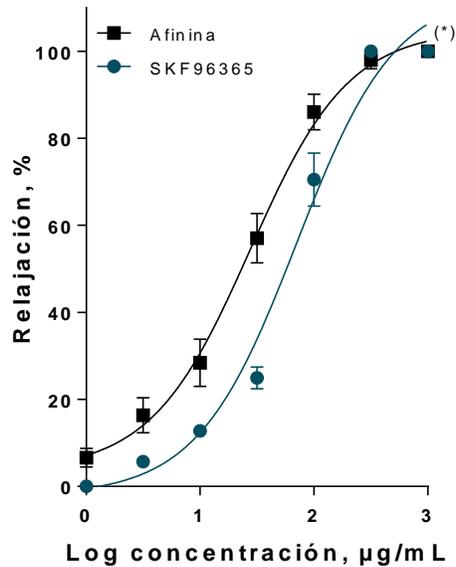


Figura 38. Influencia del bloqueador de canales TRP SKF96365 (30 µM) en la vasodilatación producida por la afinina. Los valores se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.01$.

Los cuatro bloqueadores de canales TRPV evaluados, disminuyeron significativamente la potencia de la afinina sin afectar su efecto vasodilatador máximo: capsaicina ($EC_{50} = 174.2 \pm 1.12 \mu\text{g/mL}$; $E_{MAX} = 100 \pm 2.1\%$), BCTC ($EC_{50} = 178.5 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$; $E_{MAX} = 100 \pm 2.2\%$), rojo de rutenio ($EC_{50} = 288.9 \pm 1.07 \mu\text{g/mL}$; $E_{MAX} = 100 \pm 1.5\%$) y SKF96365 ($EC_{50} = 70.27 \pm 1.06 \mu\text{g/mL}$; $E_{MAX} = 100 \pm 2.3\%$). Estos resultados indican que los canales TRPV1 participan en el efecto vasodilatador producido por la afinina y que es posible que los canales TRPC también contribuyan a este efecto.

7.9 Participación del receptor a cannabinoides de tipo endotelial en el efecto vasodilatador de la afinina.

Con el fin de determinar si el efecto vasodilatador de la afinina también es generado por la activación de receptores a cannabinoides de tipo endotelial (eCB), se construyó la curva concentración respuesta del efecto vasodilatador de este compuesto en presencia del inhibidor del receptor eCB, O-1918 (10 μM) (Figura 39).

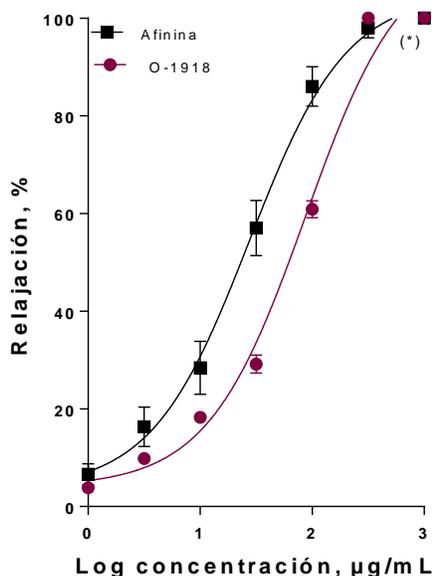


Figura 39. Respuesta vasodilatadora de la afinina en presencia del inhibidor del receptor a cannabinoides del tipo endotelial O-1918 (10 μM). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) ($n = 6$); * $p < 0.01$.

La inhibición de este receptor disminuyó significativamente ($EC_{50} = 86.59 \pm 2.72$ $\mu\text{g/mL}$) el efecto vasodilatador de la afinina, sin afectar la respuesta máxima ($E_{MAX} = 100\% \pm 2\%$). Estos resultados indicaron que la vasodilatación dependiente de endotelio producida por la afinina se debe, en parte, a la activación de receptores a cannabinoides del tipo endotelial.

8. DISCUSIÓN

En México, las raíces de *H. longipes* se han utilizado tradicionalmente con fines culinarios y medicinales. Numerosos estudios han evidenciado que extractos orgánicos, derivados de las raíces de esta especie, y la afinina, su metabolito mayoritario, poseen efectos biológicos y farmacológicos importantes (Ogura y col., 1982; Molina-Torres y col., 1999; Molina-Torres y col., 2004; Ríos y col., 2007; Acosta-Madrid y col., 2009; Hernández y col., 2009a; Hernández y col., 2009b; Cariño-Cortés y col., 2010; Cilia-López y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; Hernández-Morales y col., 2015; de la Rosa-Lugo y col., 2017). Sin embargo, actualmente, ninguna investigación se había centrado en el estudio de los efectos de los extractos de *H. longipes* y de la afinina sobre el tono del músculo liso vascular.

En la presente investigación, tanto el extracto etanólico, como el de diclorometano obtenidos de las raíces de *H. longipes*, produjeron una relajación significativa en aorta aislada de rata. Hasta ahora, esto no se había reportado previamente. En 2008, Wongsawaktul y col. (Wongsawatkul y col., 2008) describieron el efecto vasodilatador de cuatro extractos orgánicos (hexano, cloroformo, metanol y acetato de etilo), preparados a partir de las partes aéreas de la planta *Acmella oleracea*, sobre anillos de aorta de rata. En este estudio, el extracto de acetato de etilo, exhibió el efecto vasodilatador más potente y, de acuerdo a los autores, este efecto podría ser atribuido a la presencia de triterpenos y compuestos fenólicos polares. Adicionalmente, el extracto de cloroformo relajó segmentos de aorta de rata con mayor eficacia. Los autores atribuyeron este efecto a triterpenos y alcoholes grasos o ésteres presentes en el extracto clorofórmico. De manera adicional, la vasodilatación producida por *A. oleracea* fue completamente abatida en ausencia de endotelio y disminuyó significativamente en presencia de L-NAME (1 μ M) e INDO (1 μ M), lo cual sugirió la participación del NO y la PGI₂ (Wongsawatkul y col., 2008).

Otros estudios se llevaron a cabo para evaluar el efecto de la administración oral del extracto etanólico de las flores de *A. oleracea* a dosis de 50 a 150 mg/kg sobre

el desempeño sexual de ratas macho. El extracto fue administrado durante 28 días, sin que se observaran efectos tóxicos. Uno de los principales hallazgos fue el aumento, dependiente de la dosis, en la función eréctil, inducido por el extracto. Este efecto se mantuvo aún después de 15 días de haber terminado el esquema de administración. En este mismo estudio, se encontró una buena correlación entre estos resultados y un aumento en los niveles de NO, determinados en cultivos de células DS-1 (línea celular de cuerpo cavernoso humano), estimulados con extracto de *A. oleracea* (100 µg/mL). Los autores sugirieron una posible contribución de la afinina y otras alcaloides, presentes en el extracto, en el comportamiento sexual (Sharma y col., 2011). Estudios previos han mostrado que la función eréctil es mediada por un complejo mecanismo, en donde el NO, sintetizado por la NOS, es el factor más importante que contribuye a la dilatación de la vasculatura del pene (Nangle y col., 2003; Dalaklioglu y Ozbey, 2013; Yetik-Anacak y col., 2014).

En el presente trabajo, se seleccionó el extracto de diclorometano de *H. longipes*, el cual presentó la mayor potencia vasodilatadora para realizar el estudio fitoquímico, con la finalidad de aislar los compuestos responsables del efecto vasodilatador. El análisis cromatográfico permitió el aislamiento de la afinina, el compuesto mayoritario presente en este extracto. Este resultado es consistente con estudios previos que han demostrado que la afinina es la principal alcaloide presente en la raíces de *Heliopsis longipes* (Molina-Torres y col., 1996; Molina-Torres y col., 1999; Molina-Torres y col., 2004; Ríos y col., 2007; Déciga-Campos y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; Hernández-Morales y col., 2015). De manera inesperada, la afinina produjo un intenso efecto vasodilatador; la potencia de esta alcaloide fue aproximadamente tres veces más potente que la del extracto crudo. Este hallazgo mostró, por vez primera, que la afinina es capaz de relajar el músculo liso arterial. Considerando que la afinina es el constituyente más abundante en el extracto de diclorometano de *H. longipes*, es altamente probable que este compuesto constituya el principal responsable del efecto vasodilatador provocado por el extracto crudo.

La remoción de la capa endotelial disminuyó, de manera parcial, pero significativamente, la vasodilatación inducida por la afinina, indicando que existen dos vías involucradas en el mecanismo de acción: una dependiente y otra independiente de la presencia de endotelio. En estudios anteriores, se ha reportado, que diversos fitoquímicos relajan los vasos sanguíneos, mediante vías dependientes e independientes de endotelio (Yanaga y col., 2006; Huo y col., 2015; Qu y col., 2015), sin embargo, la actividad vasodilatadora de la afinina o de compuestos estructuralmente similares no se había reportado. En un estudio previo, se evaluó el efecto vasodilatador, en aorta de rata, de cuatro extractos orgánicos de la planta *Spilanthes acmella*, especie vegetal reconocida por sintetizar alcanidas, mayoritariamente afinina. Este estudio reveló que la remoción del endotelio produjo una disminución significativa del efecto vasodilatador de todos los extractos evaluados (Wongsawatkul y col., 2008). Existen varias diferencias importantes entre los resultados obtenidos por el grupo de Wongsawatkul y col. y los obtenidos en la presente tesis: 1) en este trabajo se determinó el mecanismo de acción de un compuesto puro, la afinina; mientras que en el estudio de Wongsawatkul y col. se evaluaron solamente extractos; 2) los autores atribuyen los efectos vasodilatadores a compuestos diferentes a las alcanidas, mientras que en la presente investigación se demostró que la afinina constituye el principal compuesto responsable del efecto vasodilatador; 3) en la presente investigación, la remoción endotelial disminuyó el efecto vasodilatador de la afinina, pero no lo abatió completamente, ni disminuyó su efecto máximo (100 %), mientras que en el estudio de Wongsawatkul y col. todos los extractos evaluados en anillos de aorta de rata sin endotelio disminuyeron su efecto vasodilatador por debajo del 10% (Wongsawatkul y col., 2008).

El efecto vasodilatador se redujo significativamente en presencia de inhibidores de las enzimas NOS, CSE y HO, lo cual evidenció que la activación de las vías del NO/cGMP, del H₂S/K_{ATP} y del CO/cGMP contribuyen al efecto vasodilatador de la afinina. De estas tres vías bioquímicas de transmisores gaseosos evaluadas, la mayor inhibición se observó, cuando la aorta se incubó con L-NAME ($p < 0.001$), lo cual sugirió que la activación de la vía NO/cGMP desempeña un papel más prominente en el efecto vasodilatador de esta alcanida, que el proporcionado por

las otras vías de señalización de gasotransmisores. Por otra parte, la inhibición de la sGC con ODQ ($p < 0.001$) también redujo significativamente el efecto vasodilatador de la afinina, sugiriendo que esta alcalamida tiene la capacidad de activar directamente a la sGC, el principal receptor del NO (Zhao y col., 2015). Es importante señalar que existen isoformas de la sGC sensibles al CO en el músculo liso vascular (Purohit y col., 2014), por lo tanto, este transmisor gaseoso se considera también como un activador importante de esta clase de enzimas (Derbyshire y Marletta, 2012). La activación de la sGC en células musculares lisas vasculares podría contribuir, al menos en parte, a la vasodilatación, independiente de endotelio, causada por la afinina.

Uno de los mecanismos clave, por medio del cual el NO, el CO y el H₂S, sintetizados en las células endoteliales, inducen vasodilatación, es la activación de canales de potasio, localizados en las células del músculo liso vascular. Con respecto a la vasodilatación inducida por la vía del NO/cGMP, se ha demostrado que la proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG) fosforila a canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) en la membrana de las células del músculo liso, resultando en una disminución en la concentración del calcio intracelular (Boerth y col., 1997; White y col., 2000). Este mecanismo también está involucrado en la vasodilatación producida por el CO. Además, este transmisor gaseoso es capaz de activar directamente canales de potasio, particularmente canales K_{Ca} (Wang y col., 1997; Decaluwé y col., 2012). Por otro lado, el H₂S regula la vasodilatación vía apertura de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Zhao y col., 2001; Zhang y col., 2007; Mustafa y col., 2009; Yoo y col., 2015). En el presente estudio, se determinó que el bloqueo de los canales K_{Ca} y K_{ATP} disminuyó significativamente la vasodilatación producida por la afinina, lo cual confirmó la participación de la activación de las vías de señalización de los transmisores gaseosos NO, CO y H₂S en el efecto relajante de la aorta producido por esta alcalamida.

La activación de canales TRPA1 puede inducir la liberación de neuropéptidos en tejido nervioso (Trevisani y col., 2007), tales como la sustancia P o el CGRP (Pozsgai y col., 2012). El CGRP es un neuropéptido con efecto vasodilatador

importante que se libera de neuronas sensitivas que, en condiciones fisiológicas, posee un efecto cardioprotector y profiláctico contra la hipertensión (Kee y col., 2018). Eberhardt y col. reportaron que el NO y el H₂S reaccionan entre sí para generar el HNO, el cual activa a los canales TRPA1, provocando la liberación del CGRP, en nervios sensoriales, produciendo una disminución del tono vascular (Eberhardt y col., 2014). Los resultados de nuestros experimentos indicaron que el efecto vasodilatador de la afinina pudiera involucrar la activación de la vía HNO-TRPA1-CGRP, ya que la inhibición de los canales TRPA1 por HC030031 o de los receptores al CGRP por el CGRP₈₋₃₇ redujeron, de manera significativa, el efecto vasodilatador producido por esta alamida. Entonces, la afinina pudiera estar actuando de manera individual o simultánea sobre las siguientes vías: 1) activando directamente canales TRPA1, los cuales, a la vez, inducirían la liberación de CGRP para producir vasodilatación o, 2) la afinina pudiera estimular la liberación de NO y H₂S, los cuales al reaccionar producen HNO, activando subsecuentemente la vía del HNO-TRPA1-CGRP para producir vasodilatación.

Algunas alamidas, con estructura química similar a la afinina, son capaces de activar canales TRP para ejercer efectos biológicos como la disminución de la adipogénesis en células indiferenciadas y en estado de diferenciación a adipocitos (Lieder y col., 2017) y la disminución de la inflamación (Walker y col., 2017). Los canales TRP son una superfamilia de canales que se encuentran de manera ubicua en los mamíferos. Estos canales se expresan de manera abundante en la vasculatura. Los canales TRPA1 participan en una amplia gama de procesos fisiológicos, dependientes de calcio, como la mecanotransducción, la termopercepción, la nocicepción, la inflamación y la respuesta a irritantes exógenos y compuestos pungentes (Earley, 2012). La activación del receptor TRPA1 produce vasodilatación en diferentes lechos vasculares. En arterias de resistencia pre-contraídas con fenilefrina, se observó que agonistas del canal TRPA1 produjeron un efecto vasodilatador importante, que disminuyó en presencia de rojo de rutenio, un bloqueador inespecífico de canales TRP, capsaicina y un antagonista de receptor del CGRP. Sin embargo, en presencia del inhibidor específico de canales TRPV1, el efecto vasodilatador no se vio afectado (Bautista y col., 2005). Estos hallazgos

mostraron, por primera vez, la presencia del canal TRPA1 en tejido vascular y posteriormente fueron confirmados por Pozgai y cols. (Pozgai y col., 2010). No obstante, en arterias de conducción, específicamente en aorta, existen escasos reportes que asocien la presencia de TRPA1 con la vasodilatación. Yanaga y cols. (Yanaga y col., 2006) estudiaron la vasodilatación inducida por cinamaldehído, un reconocido y potente agonista selectivo de los canales TRPA1. En tal estudio, los investigadores encontraron que el cinamaldehído produce vasodilatación en segmentos aórticos en presencia y ausencia del endotelio, y que tal efecto se disminuye parcialmente en presencia de inhibidores de la síntesis de óxido nítrico endotelial y de la sGC. En la presente investigación, se demostró que el efecto vasodilatador de la afinina disminuye de forma significativa en presencia del bloqueador específico de canales TRPA1 HC-030031. En experimentos adicionales donde se evaluó el efecto vasodilatador de la afinina en anillos aórticos sin endotelio y en presencia del inhibidor HC-030031, se observó una disminución importante en la potencia de la afinina, sin que la efectividad disminuyera (100%). Una posible explicación de estos resultados es que la afinina produce su efecto vasodilatador, activando no solo los canales TRPA1 que están localizados en el endotelio, sino también los que están en las células perivasculares, de manera que cuando se elimina el endotelio permanece el efecto vasodilatador producido por la activación de este tipo de canales en las terminaciones nerviosas de los anillos de aorta. Así pues, los resultados obtenidos en esta investigación, sugieren fuertemente que la afinina pudiera estar activando canales TRPA1 presentes en el endotelio y en las terminaciones nerviosas de la aorta de rata, para así, generar vasodilatación.

Los canales TRPV1 también fueron evaluados en la presente investigación, pues su participación en la regulación del tono vascular ha sido estudiada ampliamente (Zygmunt y col., 1999; Herradon y col., 2007; López-Miranda y col., 2008; Akerman y col., 2004; Baylie y Brayden, 2011; Ivic y col., 2016). En el sistema vascular, se ha reportado la presencia de estos canales en el endotelio, en las terminaciones nerviosas perivasculares y en las células de músculo liso vascular, por lo que se les ha asociado a la liberación de factores relajantes derivados de endotelio (Wang y col., 2017), a la liberación de neuropéptidos como el CGRP (Zygmunt y col., 1999)

y a la vasoconstricción derivada de una elevación de $[Ca^{2+}]_i$ en el músculo liso vascular (Kark y col., 2008; Cavanaugh y col., 2011), respectivamente. Así pues, tenemos efectos vasoconstrictores y efectos relajantes, dependiendo de la ubicación de canales TRPV1. En este trabajo, la vasodilatación inducida por afinina disminuyó, cuando se incubaron segmentos de aorta con los inhibidores rojo de rutenio 10 μ M, capsaicina 10 μ M y BCTC 10 μ M. El rojo de rutenio, disminuyó la potencia vasodilatadora de la afinina, aproximadamente diez veces, mientras que el BCTC y la capsaicina produjeron una disminución en la potencia del efecto vasodilatador de esta alcalamida de aproximadamente 6 veces. Una posible explicación a estos resultados es que el inhibidor rojo de rutenio es altamente inespecífico y puede actuar como bloqueador de distintos canales TRP, mientras que la capsaicina en concentraciones de 10 μ M, es capaz de desensibilizar canales TRPV1 y TRPV4. Asimismo, el BCTC es un inhibidor específico de canales TRPV1. Tomando en cuenta lo anterior, resulta evidente que la afinina es capaz de interactuar con diferentes canales TRP, en particular con los de tipo V1, para producir vasodilatación. Es posible que la activación de este tipo de canales producida por la afinina, dé como resultado la elevación de los niveles de calcio en la célula endotelial, activando la vía de los gasotransmisores (Akerman y col., 2004; Wang y col., 2017). Esta alcalamida podría también activar la liberación de neuropéptidos vasoactivos como el CGRP, induciendo la relajación arterial. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para elucidar completamente el mecanismo de acción vasodilatador de la afinina.

Por otra parte, es importante considerar que el canal TRPV1 ha sido propuesto como un receptor a cannabinoides atípico, debido a que algunos endocannabinoides son capaces de activarlo, generando vasodilatación, independientemente de la activación del receptor a cannabinoides CB1 en distintos lechos vasculares. Si se toma en cuenta que, la estructura química de las *N*-alquilamidas o alcalamidas (Boonen y col., 2012), como la afinina (Chicca y col., 2009; Ríos y Olivo, 2014; Martínez-Loredo y col., 2015), es similar a la de los ácidos grasos (Raduner y col., 2006; Sudhahar y col., 2009; Rios, 2013; Raboune y col., 2014) y a la del endocanabinoide *N*-araquidonil-etanolamina o anandamida (Gertsch y col.,

2010; Blancaflor y col., 2014; Di Marzo y Piscitelli, 2015; Lu y MacKie, 2016). La anandamida produce un efecto vasodilatador muy potente a través de varios mecanismos, incluyendo la activación de canales TRPV1 y receptores acoplados a proteína G, como los receptores CB1, CB2 y el no-CB1/ no-CB2 (eCB) (Zygmunt y col., 1999; O'Sullivan y col., 2005; Herradón y col., 2007). En estudios previos, se ha reportado que el efecto relajante de la anandamida en aorta de rata se debe principalmente a la activación del receptor endotelial (eCB), que a su vez activa la vía del NO/cGMP. Por lo tanto, considerando la similitud entre las estructuras químicas de la anandamida y la afinina, es posible que los receptores a cannabinoides pudieran ser también blancos moleculares de la afinina en células endoteliales. En el presente estudio, se determinó que la inhibición del receptor eCB con O1918 redujo significativamente el efecto vasodilatador de la afinina, lo cual indicó que estos receptores contribuyen, al menos en parte, a la vasodilatación, dependiente de endotelio, provocada por la afinina. Aunque algunos autores ponen en duda la existencia del receptor eCB (Bondarenko, 2014), otros grupos de investigación han mostrado evidencia de su participación en la vasodilatación provocada por endocannabinoides (Sudhahar y col., 2009; Hopps y col., 2012; Stanley y col., 2015; Stanley y col., 2016).

En estudios recientes se ha reportado que las alcanidas denominadas riparina I, II y III, obtenidas de la especie *Aniba riparia*, producen vasodilatación independiente de endotelio en arterias mesentéricas de ratón, a través de un mecanismo que incluye la inhibición del influjo de calcio en las células de músculo liso vascular a través del bloqueo de canales de calcio tipo L y canales no selectivos a cationes, ubicados en la membrana plasmática. Es posible que los canales no selectivos a cationes pertenezcan a la subfamilia de canales TRPC, ya que el efecto vasodilatador producido por estas alcanidas disminuyó en presencia de SKF-96365 (30 μ M), un inhibidor de canales TRP, principalmente de la subfamilia TRPC (García y col., 2016). En el presente estudio, se evaluó el efecto vasodilatador de la afinina sobre aorta de rata en presencia del inhibidor SKF-96365 (30 μ M), el cual se ha utilizado para bloquear canales TRPC en arterias de conducción y de resistencia en ratas (Bencze y col., 2015). En presencia de este inhibidor, la afinina disminuyó su

potencia vasodilatadora 2.5 veces, sin afectar el efecto máximo, lo que sugiere que esta alcanida es capaz de activar también los canales TRPC, contribuyendo a su efecto vasodilatador. Se ha propuesto que canales de la subfamilia TRPC ubicados en el endotelio, específicamente en las uniones mioendoteliales, pueden ser activados y subsecuentemente, incrementar la actividad de canales de potasio sensibles a calcio de pequeña e intermedia conductancia (I/SK_{Ca}) para inducir hiperpolarización endotelial. El potasio introducido a través de estos canales se conduce a las células de músculo liso vascular vía uniones gap, induciendo así, vasodilatación (Senadheera y col., 2012; Ellinsworth y col., 2014).

Por otra parte, los resultados indicaron que la vasodilatación producida por la afinina involucra también la activación de la vía de la PGI₂/cAMP, ya que la inhibición de la ciclooxigenasa con indometacina provocó una reducción significativa ($p < 0.001$) en el efecto vasodilatador inducido por esta alcanida. Junto con los transmisores gaseosos, la PGI₂ se libera de las células endoteliales y provoca la relajación de músculo liso arterial, a través de la estimulación de la adenilato ciclasa, la cual subsecuentemente incrementa los niveles de cAMP. Este segundo mensajero activa a la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), la cual fosforila y activa canales K_{Ca} (Giles y col., 2012; Stoner y col., 2012). Estudios previos sugieren que el cAMP es capaz de activar, de manera cruzada, a la PKG, incrementando la actividad de canales K_{Ca} (White y col., 2000; Ibarra-Alvarado y col., 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo y otros grupos de investigación, es evidente que la afinina produce sus efectos sobre el músculo liso arterial a través de la activación de varios blancos moleculares (efectos pleiotrópicos). Debido a que el efecto vasodilatador de este compuesto no se bloqueó completamente en ausencia de endotelio, se sugiere que la afinina es capaz de producir sus efectos sobre la aorta, mediante la activación de vías dependientes e independientes de endotelio. En la presente investigación se muestran resultados que indican que la afinina activa las vías del NO/cGMP, del CO/cGMP, del H₂S/K_{ATP} y de la PGI₂/cAMP. De manera adicional, el efecto vasodilatador de esta alcanida involucra la activación de canales TRP y receptores

a cannabinoides. La Figura 40 muestra las vías de señalización propuestas involucradas en el efecto vasodilatador de la afinina.

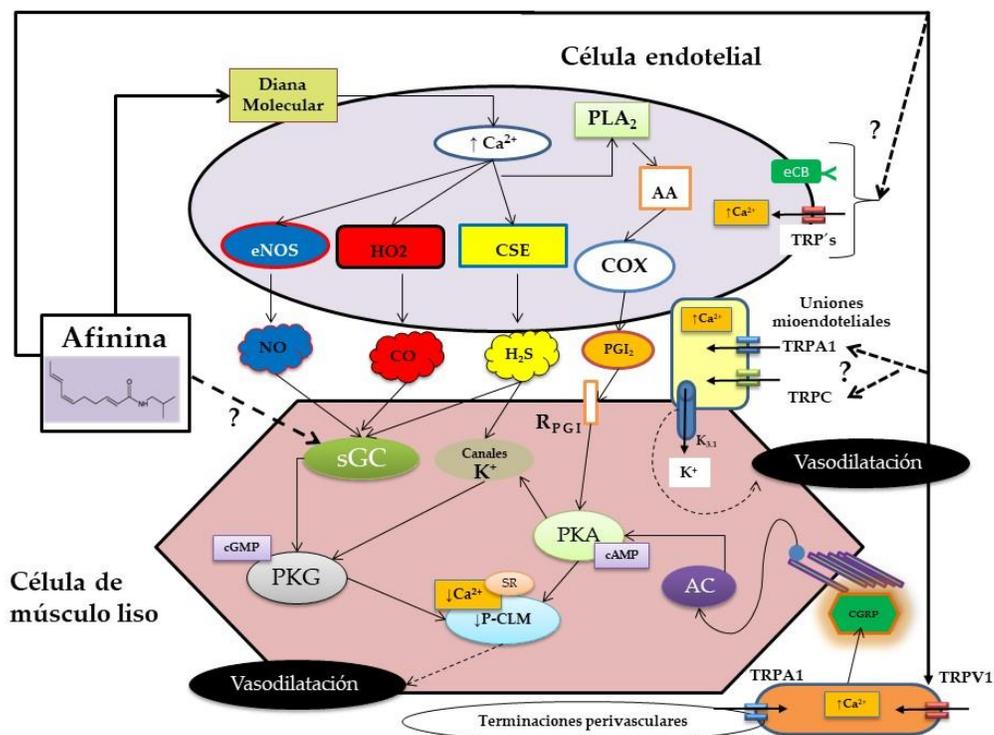


Figura 40. Mecanismo de acción propuesto para el efecto vasodilatador de la afinina.

Este es el primer reporte que describe el efecto vasodilatador de la afinina y las principales vías de señalización involucradas en su mecanismo de acción. La concentración efectiva media para producir vasodilatación ($\text{EC}_{50} = 27.38 \mu\text{g}/\text{mL}$) coincide con los rangos de concentración, dentro de los cuales este compuesto produce otras actividades biológicas y farmacológicas. Por lo tanto, la concentración a la que la afinina produce su efecto vasodilatador está dentro del rango de concentración inocua para células de mamífero, sin embargo, se requieren más estudios de citotoxicidad para establecer sus posibles efectos adversos.

El efecto vasodilatador producido por la afinina representa una nueva actividad biológica importante que debe continuar estudiándose con la finalidad de elucidar completamente su mecanismo de acción. Los resultados descritos en la presente

investigación proporcionan evidencias del gran potencial terapéutico de las raíces de *Heliopsis longipes* y de su principal constituyente, la afinina. Considerando además que esta alcaloide posee adecuadas propiedades farmacocinéticas y en estudios preclínicos se ha demostrado que no induce toxicidad en los rangos de dosis en los que ejerce sus efectos farmacológicos, es factible que esta molécula represente un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de fármacos útiles para prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares, tales como la hipertensión.

9. CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólico y de diclorometano de las raíces de *Heliopsis longipes* relajan la aorta de rata, de una manera dependiente de la concentración.
2. El extracto de diclorometano presentó la mayor potencia vasodilatadora.
3. La afinina constituye el compuesto mayoritario presente en las raíces de *Heliopsis longipes* y es la principal responsable del efecto vasodilatador producido por esta especie vegetal.
4. El efecto vasodilatador de la afinina involucra mecanismos de acción dependientes e independientes de la presencia de endotelio.
5. En el efecto vasodilatador de la afinina participan diversos sistemas y blancos moleculares: 1) las vías del NO/cGMP, del CO/cGMP, del H₂S/K_{ATP}, de la PGI₂/cAMP y del HNO-TRPA1-CGRP; 2) los canales TRP (A1, V1 y C) y 3) el receptor eCB.
6. La afinina constituye un prototipo estructural para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Madrid, I. I., G. Castañeda-Hernández, V. G. Cilia-López, R. Cariño-Cortés, N. Pérez-Hernández, E. Fernández-Martínez, and M. I. Ortiz. 2009. Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phytomedicine* 16:336–341.

Acree, F., M. J. Jacobson, and H. L. Haller. 1945. An amide possessing insecticidal properties from the roots of *Erigeron affinis* DC. *J. Org. Chem.*:236–242.

Aguilar, M., N. Castillo, C. Alvarado-López, G. Duarte-Lisci, R. Ríos-Gómez, and M. Rios. 2015. HPLC Determination of the Alkamide Affinin in Fresh and Dry Roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) and HS-SPME-GC-MS-TOF Analysis of Volatile Components. *Food Anal. Methods*: 1–7.

Ahmad, A., S. Munavvar A., R. Hassaan A., K. Safia Akhtar, L. M. I., A. Sheryar, H. F., A. Nor A., and J. Edward J. 2015. A critical review of pharmacological significance of Hydrogen Sulfide in hypertension. *Indian J. Pharmacol.* 47:243–247.

Akerman, S., H. Kaube, and P. J. Goadsby. 2003. Vanilloid type 1 receptors (VR1) on trigeminal sensory nerve fibres play a minor role in neurogenic dural vasodilatation, and are involved in capsaicin-induced dural dilation. *Br. J. Pharmacol.* 140:718–24.

Akerman, S., H. Kaube, and P. J. Goadsby. 2004. Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 142:1354–60.

Alonso-Carbajo, L., M. Kecskes, G. Jacobs, A. Pironet, N. Syam, K. Talavera, and R. Vennekens. 2017. Muscling in on TRP channels in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes. *Cell Calcium* 66:48–61.

Andresen, J. J., N. I. Shafi, W. Durante, and R. M. Bryan. 2006. Effects of carbon monoxide and heme oxygenase inhibitors in cerebral vessels of rats and mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*

Arriaga-Alba, M., M. Y. Rios, and M. Déciga-Campos. 2013. Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. *Pharm. Biol.* 51:1035–9.

Atoyan, R., D. Shander, and N. V Botchkareva. 2009. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J. Invest. Dermatol.*

129:2312–5.

Aubdool, A. A., X. Kodji, N. Abdul-Kader, R. Heads, E. S. Fernandes, S. Bevan, and S. D. Brain. 2016. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. *Br. J. Pharmacol.* 173:2419–33.

Bae, S. S., B. M. Ehrmann, K. Etefagh, and N. B. Cech. 2010. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochem. Anal.* 21:438–43.

Bae, S. S. 2007. A HPLC/ESI-MS method developed and validated to evaluate the quantity, identity and stability of the alkylamides in ethanolic extracts of *Spilanthes acmella*. :1–81.

Balunas, M. J., and A. D. Kinghorn. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78:431–441.

Bauer, R., I. A. Khan, and H. Wagner. 1988. TLC and HPLC analysis of *Echinacea pallida* and *E. angustifolia* roots. *Planta Med.* 54:426–430.

Bauer, R., P. Remiger, and H. Wagner. 1989. Alkamides from the roots of *Echinacea angustifolia*. *Phytochemistry* 28:505–508.

Bauer, R., and P. Remiger. 1989. TLC and HPLC Analysis of Alkamides in *Echinacea* Drugs^{1,2}. *Planta Med.* 55:367–371.

Bautista, D. M., P. Movahed, A. Hinman, H. E. Axelsson, O. Sterner, E. D. Högestätt, D. Julius, S.-E. Jordt, and P. M. Zygmunt. 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:12248–52.

Baylie, R. L., and J. E. Brayden. 2011. TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol.* 203(1), 99-116.

Bedolla-Cázares, F., P. E. Hernández-Marcelo, M. A. Gómez-Hurtado, G. Rodríguez-García, R. E. del Río, Y. López-Castro, J. P. García-Merinos, J. M. Torres-Valencia, and J. B. González-Campos. 2017. Silver nanoparticles from AgNO₃–affinin complex synthesized by an ecofriendly route: chitosan-based electrospun composite production. *Clean Technol. Environ. Policy.*

Beltowski, J., and A. Jamroz-Wiśniewska. 2014. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules* 19:21506–21528.

Bencze, M., M. Behuliak, A. Vavřínová, and J. Zicha. 2015. Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat. *Eur. J. Pharmacol.* 765:533–540.

Benemei, S., R. Patacchini, M. Trevisani, and P. Geppetti. 2015. TRP channels. *Curr. Opin. Pharmacol.*

Blancaflor, E. B., A. Kilaru, J. Keereetaweeep, B. R. Khan, L. Faure, and K. D. Chapman. 2014. *N*-Acylethanolamines: lipid metabolites with functions in plant growth and development. *Plant J.* 79:568–83.

Boerth, N. J., N. B. Dey, T. L. Cornwell, and T. M. Lincoln. 1997. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. *J Vasc Res* 34:245–59.

Bohlen, H. G. Ienn. 2015. Nitric oxide and the cardiovascular system. *Compr. Physiol.* 5:808–823.

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

Boonen, J., B. Baert, C. Burvenich, P. Blondeel, S. De Saeger, and B. De Spiegeleer. 2010a. LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53:243–249.

Boonen, J., B. Baert, N. Roche, C. Burvenich, and B. De Spiegeleer. 2010b. Transdermal behaviour of the *N*-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (*Compositae*) extracts. *J. Ethnopharmacol.* 127:77–84.

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

Bratz, I. N., G. M. Dick, J. D. Tune, J. M. Edwards, Z. P. Neeb, U. D. Dincer, and M. Sturek. 2008. Impaired capsaicin-induced relaxation of coronary arteries in a porcine model of the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294:H2489–96.

Campos-Cuevas, J. C., R. Pelagio-Flores, J. Raya-González, A. Méndez-Bravo, R. Ortiz-Castro, and J. López-Bucio. 2008. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkalimides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.* 174:165–173.

Cárdenas-Flores, A., D. A. Rodríguez-Chávez, A. Flores-Olivas, L. Ibarra-Jiménez, and J. H. Valenzuela-Soto. 2017. Alkamide-rich *Heliopsis longipes* extract promotes resistance to grey mould disease in ornamental lisianthus. *J. Plant Pathol.* 99:483–486.

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

Castro-Ruiz, J., A. Rojas-Molina, F. Luna-Vázquez, F. Rivero-Cruz, T. García-Gasca, and C. Ibarra-Alvarado. 2017. Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis longipes*, Induces Vasodilation via Activation of Gasotransmitters and Prostacyclin Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18:218.

Cavanaugh, D. J., A. T. Chesler, A. C. Jackson, Y. M. Sigal, H. Yamanaka, R. Grant, D. O'Donnell, R. A. Nicoll, N. M. Shah, D. Julius, and A. I. Basbaum. 2011. Trpv1 Reporter Mice Reveal Highly Restricted Brain Distribution and Functional Expression in Arteriolar Smooth Muscle Cells. *J. Neurosci.*

Chen, S., H. Yu, H. Luo, Q. Wu, C. Li, and A. Steinmetz. 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin. Med.* 11.

Chicca, A., S. Raduner, F. Pellati, T. Strompen, K.-H. Altmann, R. Schoop, and J. Gertsch. 2009. Synergistic immunopharmacological effects of *N*-alkylamides in *Echinacea purpurea* herbal extracts. *Int. Immunopharmacol.* 9:850–8.

Chitme, H. R., U. Pradesh, R. Chandra, and S. Kaushik. 2004. Studies on anti-diarrheal activity of. *Group 7*:70–75.

Cilia-López, V., J. Rogelio Aguirre-rivera, J. Antonio Reyes-agüero, Y. I. Bertha Juárez-flores, D. C. Llano, and S. Luis Potosí. 2008. Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Bol.Soc.Bot.Méx* 83:81–87.

Cilia-López, V. G., B. I. Juárez-Flores, J. R. Aguirre-Rivera, and J. a Reyes-Agüero. 2010. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system.

Pharm. Biol. 48:195–200.

Cilia-López, V. G., J. R. Aguirre-Rivera, G. Espinosa-Reyes, J. a. Flores-Cano, J. A. Reyes-Agüero, and B. I. Juárez-Flores. 2014. Distribution of *Heliopsis longipes* (Heliantheae: Asteraceae), an endemic resource from central Mexico. Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient. XX: 47–54.

Cirino, G., V. Vellecco, and M. Bucci. 2017. Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. Br. J. Pharmacol. 174:4021–4031.

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

Correa, J., S. Roquet, and E. Díaz. 1971. Multiple NMR analysis of the affinin. Org. Magn. Reson. 3:1–5.

Csonka, C., T. Páli, P. Bencsik, A. Görbe, P. Ferdinandy, and T. Csont. 2015. Measurement of NO in biological samples. Br. J. Pharmacol. 172:1620–1632.

Dalaklioglu, S., and G. Ozbey. 2013. The potent relaxant effect of resveratrol in rat corpus cavernosum and its underlying mechanisms. Int. J. Impot. Res. 25:188–193. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijir.2013.6>

De Spiegeleer, B., J. Boonen, S. V. Malysheva, J. D. Di Mavungu, S. De Saeger, N. Roche, P. Blondeel, L. Taevernier, and L. Veryser. 2013. Skin penetration enhancing properties of the plant *N*-alkylamide spilanthol. J. Ethnopharmacol. 148:117–125.

Decaluwé, K., B. Pauwels, S. Verpoest, and J. Van De Voorde. 2012. Divergent mechanisms involved in CO and CORM-2 induced vasorelaxation. Eur. J. Pharmacol. 674:370–377.

Déciga-Campos, M., M. Arriaga-Alba, R. Ventura-Martínez, B. Aguilar-Guadarrama, and M. Y. Rios. 2012. Pharmacological and Toxicological Profile of Extract from *Heliopsis longipes* and Affinin. Drug Dev. Res. 73:130–137.

Déciga-Campos, M., M. Y. Rios, and A. B. Aguilar-Guadarrama. 2010. Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. Planta Med. 76:665–670.

De la Rosa-Lugo, V., M. Acevedo-Quiroz, M. Déciga-Campos, and M. Y. Rios. 2017.

Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *J. Pharm. Pharmacol.*

Derbyshire, E. R., and M. a. Marletta. 2012. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* 81:533–559.

Diario Oficial de la Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Durante, W., F. K. Johnson, and R. A. Johnson. 2006. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J. Cell. Mol. Med.* 10:672–686.

Dux, M., C. Will, B. Vogler, M. R. Filipovic, and K. Messlinger. 2016. Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* 173:431–445.

Earley, S. 2012. TRPA1 channels in the vasculature. *Br. J. Pharmacol.* 167:13–22.

Earley, S., and J. E. Brayden. 2015. Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiol. Rev.* 95:645–690.

Earley, S., A. L. Gonzales, and R. Crnich. 2009. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by trpa1 and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ. Res.* 104:987–994.

Earley, S., A. L. Gonzales, and Z. I. Garcia. 2010. A Dietary Agonist of Transient Receptor Potential Cation Channel V3 Elicits Endothelium-Dependent Vasodilation. *Mol. Pharmacol.* 77:612–620.

Earley, S. 2011a. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57(2), 148-153.

Eberhardt, M., M. Dux, B. Namer, J. Miljkovic, N. Cordasic, C. Will, T. I. Kichko, J. de la Roche, M. Fischer, S. a Suárez, D. Bikiel, K. Dorsch, A. Leffler, A. Babes, A. Lampert, J. K. Lennerz, J. Jacobi, M. a Martí, F. Doctorovich, E. D. Högestätt, P. M. Zygmunt, I. Ivanovic-Burmazovic, K. Messlinger, P. Reeh, and M. R. Filipovic. 2014. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.* 5:4381.

Ellinsworth, D. C., S. Earley, T. V. Murphy, and S. L. Sandow. 2014. Endothelial control of vasodilation: integration of myoendothelial microdomain signalling and modulation by epoxyeicosatrienoic acids. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 466:389–405.

Fabricant, D. S., and N. R. Farnsworth. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Heal.* 109 Suppl : 69–75.

Farah, C., L. Y. M. Michel, and J.-L. Balligand. 2018. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 15:292–316.

Fonfria, E., P. R. Murdock, F. S. Cusdin, C. D. Benham, R. E. Kelsell, and S. McNulty. 2006. Tissue Distribution Profiles of the Human TRPM Cation Channel Family. *J. Recept. Signal Transduct.* 26:159–178.

Förstermann, U., and H. Li. 2012. Nitric Oxide: Biological Synthesis and Functions. In: *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 1–36.

Forstermann, U., and W. C. Sessa. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33:829–837.

Freichel, M., S. H. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weißgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi, and B. Nilius. 2001. Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat. Cell Biol.* 3:121–127.

Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376.

Garcia, D. C. G., A. C. Pereira, S. J. C. Gutierrez, J. M. Barbosa-Filho, V. S. Lemos, and S. F. Côrtes. 2016. Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkaloids in mice mesenteric artery. *Vascul. Pharmacol.* 82:60–65.

García-Chávez, A., E. Ramírez-Chávez, and J. Molina-Torres. 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcaloides presentes en sus raíces. *Acta Bot. Mex.* 69:115–131.

Gerbino, A., G. Schena, S. Milano, L. Milella, A. Franco Barbosa, F. Armentano, G. Procino, M. Svelto, and M. Carmosino. 2016. *Spilanthol* from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. *PLoS One* 11.

Gertsch, J., R. G. Pertwee, and V. Di Marzo. 2010. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? *Br. J. Pharmacol.* 160:523–529.

Giles, T. D., G. E. Sander, B. D. Nossaman, and P. J. Kadowitz. 2012. Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. *J. Clin. Hypertens.* 14:198–205.

Gonzalez, C., H. Rosas-Hernandez, B. Jurado-manzano, M. A. Ramirez-Lee, S. Salazar-Garcia, P. P. Martinez-Cuevas, A. J. Velarde-salcedo, H. Morales-Loredo, R. Espinosa-Tanguma, S. F. Ali, and R. Rubio. 2015. The prolactin family hormones regulate vascular tone through NO and prostacyclin production in isolated rat aortic rings. *Acta Pharmacol. Sin.* 36:572–586.

Greger, H. 1984. Alkamides: structural relationships, distribution and biological activity. *Planta Med.* 50:366–375.

Greger, H. 2016. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochem. Rev.* 15:729–770.

Guarini, G., V. A. Ohanyan, J. G. Kmetz, D. J. DelloStritto, R. J. Thoppil, C. K. Thodeti, J. G. Meszaros, D. S. Damron, and I. N. Bratz. 2012. Disruption of TRPV1-mediated coupling of coronary blood flow to cardiac metabolism in diabetic mice: role of nitric oxide and BK channels. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 303:H216–H223.

Hamilton, A. C. 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodivers. Conserv.* 13:1477–1517.

Hernández, I., Y. Lemus, S. Prieto, J. Molina-Torres, and G. Garrido. 2009a. Anti-inflammatory effect of an ethanolic root extract of *Heliopsis longipes* in vitro. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* 8:160–164.

Hernández, I., L. Márquez, I. Martínez, R. Dieguez, C. Delporte, S. Prieto, J. Molina-Torres, and G. Garrido. 2009b. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. *J. Ethnopharmacol.* 124:649–652.

Hernández-Morales, A., J. L. Arvizu-Gómez, C. Carranza-Álvarez, B. E. Gómez-Luna, B. Alvarado-Sánchez, E. Ramírez-Chávez, and J. Molina-Torres. 2015. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 18:227–231.

Hernández-Morales, A., J.-L. Arvizu-Gómez, B.-E. Gómez-Luna, E. Ramírez-Chávez, M. del R. Abraham-Juárez, G. Martínez-Soto, and J. Molina-Torres. 2012. Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del estado de Guanajuato. *Ra Ximhai* 8:111–118.

Herradón, E., M. I. Martín, and V. López-Miranda. 2007. Characterization of the vasorelaxant mechanisms of the endocannabinoid anandamide in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 152:699–708.

Hill-Eubanks, D. C., A. L. Gonzales, S. K. Sonkusare, and M. T. Nelson. 2014. Vascular TRP Channels: Performing Under Pressure and Going with the Flow. *Physiology* 29:343–360.

Ho, W.-S. V. 2013. Modulation by 17beta-estradiol of anandamide vasorelaxation in normotensive and hypertensive rats: a role for TRPV1 but not fatty acid amide hydrolase. *Eur. J. Pharmacol.* 701:49–56.

Holwerda, K. M., S. A. Karumanchi, and A. T. Lely. 2015. Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 24:170–176.

Hopps, J. J., W. R. Dunn, and M. D. Randall. 2012. Vasorelaxation to capsaicin and its effects on calcium influx in arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 681:88–93.

Horváth, Á., V. Tékus, M. Boros, G. Pozsgai, B. Botz, É. Borbély, J. Szolcsányi, E. Pintér, and Z. Helyes. 2016. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* 18:6.

Huang, S., and A. Szallasi. 2017. Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Drug Discovery: Old Concepts & New Thoughts. *Pharmaceuticals* 10:64.

Huo, L., J. Zhang, Z. Qu, H. Chen, Y. Li, and W. Gao. 2015. Vasorelaxant effects of Shunaoxin pill are mediated by NO/cGMP pathway, HO/CO pathway and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta. *J. Ethnopharmacol.* 173:352–360.

Ibarra-Alvarado, C., J. Galle, V. O. Melichar, A. Mameghani, and H. H. H. W. Schmidt. 2002. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol. Pharmacol.* 61:312–319.

Ibarra-Alvarado, C., A. Rojas, S. Mendoza, M. Bah, D. M. Gutiérrez, L. Hernández-Sandoval, and M. Martínez. 2010. Vasoactive and antioxidant activities of plants

used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm. Biol.* 48:732–739.

Ivic, I., M. Solymar, E. Pakai, Z. Rumbus, E. Pinter, A. Koller, and A. Garami. 2016. Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channels Contribute to the Regulation of Acid- and Base-Induced Vasomotor Responses. *J. Vasc. Res.* 53:279–290.

Jacobson, M., F. Agree, and H. L. Haller. 1947. Correction of the source of “affinin” (n-isobutyl-2,6,8-decatrienoamide). *J. Org. Chem.* 12:731–732.

Jacobson, M. 1954. Constituents of *Heliopsis* Species. III.1 cis-trans Isomerism in Affinin. *J. Am. Chem. Soc.* 76(18), 4606-4608.

Jaggar, J. H., C. W. Leffler, S. Y. Cheranov, D. Tcheranova, S. E, and X. Cheng. 2002. Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca²⁺ sparks to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ. Res.* 91:610–7.

Jandera, P. 2011. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal. Chim. Acta* 692:1–25.

Jiménez-Sierra, C.-L., J. Ramírez-Sosa, Solís-Cámara Aurora-Breceda, and A. Dávalos-Íñiguez, Luis-Ignacio; Ortega-Rubio. 2014. México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. *Investig. y Cienc. la Univ. Autónoma Aguascalientes*:16–22.

Johns, T., K. Graham, and G. H. N. Towers. 1982. Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the asteraceae. *Phytochemistry* 21:2737–2738.

Johnson, F. K., and R. A. Johnson. 2003. Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 285:R536–R541.

Joshi, D. D. 2012a. TLC: Herbal Drugs and Fingerprints. In: *Herbal Drugs and Fingerprints*. Springer India, India. p. 29–48.

Joshi, D. D. 2012b. HPLC: Herbal Drugs and Fingerprints. In: *Herbal Drugs and Fingerprints*. Springer India, India. p. 61–81.

Kanu, A., J. Whitfield, and C. W. Leffler. 2006. Carbon monoxide contributes to hypotension-induced cerebrovascular vasodilation in piglets. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291:H2409–14.

Kaneko, Y., and A. Szallasi. 2014. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171:2474–2507.

Kark, T., Z. Bagi, E. Lizanecz, E. T. Pasztor, N. Erdei, A. Czikora, Z. Papp, I. Edes, R. Porszasz, and A. Toth. 2008. Tissue-Specific Regulation of Microvascular Diameter: Opposite Functional Roles of Neuronal and Smooth Muscle Located Vanilloid Receptor-1. *Mol. Pharmacol.*

Katiyar, C., A. Gupta, S. Kanjilal, and S. Katiyar. 2012. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *Ayu* 33:10–9.

Kee, Z., X. Kodji, and S. D. Brain. 2018. The role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in neurogenic vasodilation and its cardioprotective effects. *Front. Physiol.*

Kim, H. S., P. A. Loughran, and T. R. Billiar. 2008. Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1 β -stimulated hepatocytes. *Nitric oxide Biol. Chem.* 18:256–65.

Kobayashi, K., T. Fukuoka, K. Obata, H. Yamanaka, Y. Dai, A. Tokunaga, and K. Noguchi. 2005. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with $\alpha\delta$ /c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* 493:596–606.

Kreck, T. C., E. D. Shade, W. J. E. Lamm, S. E. McKinney, and M. P. Hlastala. 2001. Isocapnic Hyperventilation Increases Carbon Monoxide Elimination and Oxygen Delivery. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:458–462.

Kunkler, P. E., C. J. Ballard, G. S. Oxford, and J. H. Hurley. 2011. TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain* 152:38–44.

Lieder, B., M. Zaunschirm, A.-K. Holik, J. P. Ley, J. Hans, G. E. Krammer, and V. Somoza. 2017. The Alkamide trans-Pellitorine Targets PPAR γ via TRPV1 and TRPA1 to Reduce Lipid Accumulation in Developing 3T3-L1 Adipocytes. *Front. Pharmacol.* 8:316.

Liu, D., S. Xiong, and Z. Zhu. 2014. Imbalance and dysfunction of transient receptor potential channels contribute to the pathogenesis of hypertension. *Sci. China Life Sci.* 57:818–825.

Little, E. J. 1948. *Heliopsis longipes*, a Mexican insecticidal plant species. *J Wash Acad Sci* 38:269–74.

López-Martínez, S., B. Aguilar-Guadarrama, and M. Y. Ríos. 2011. Minor alkamides from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochem. Lett.* 4:275–279.

Lu, H. C., and K. MacKie. 2016. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry* 79:516–525.

Majed, B. H., and R. A. Khalil. 2012. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol. Rev.* 64:540–82.

Martínez-Loredo, E., J. A. Izquierdo-Vega, R. Cariño-Cortés, V. G. Cilia-López, E. O. Madrigal-Santillán, C. Zuñiga-Pérez, C. Valadez-Vega, E. Moreno, and M. Sánchez-Gutiérrez. 2015. Effects of *Heliopsis longipes* ethanolic extract on mouse spermatozoa *in vitro*. *Pharm. Biol.*:1–6.

Di Marzo, V., and F. Piscitelli. 2015. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics* 12:692–698.

Matthias, A., K. G. Penman, N. J. Matovic, K. M. Bone, J. J. De Voss, and R. P. Lehmann. 2005. Bioavailability of *Echinacea* constituents: Caco-2 monolayers and pharmacokinetics of the alkylamides and caffeic acid conjugates. *Molecules* 10:1242–51.

Molina-Torres, J., A. García-Chávez, and E. Ramírez-Chávez. 1999. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.* 64:241–248.

Molina-Torres, J., C. Salazar-Cabrera, C. Armenta-Salinas, and E. Ramírez-Chávez. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amides. *J. Agric. Food Chem.* 52:4700–4704.

Molina-Torres, J., R. Salgado-Garciglia, E. Ramirez-Chavez, and R. E. del Rio. 1995. Presence of the Bornyl Ester of deca-2E,6Z,8E-Trienoic Acid in *Heliopsis longipes* Roots. *J. Nat. Prod.* 58:1590–1591.

Molina-Torres, J., R. Salgado-Garciglia, E. Ramírez-Chávez, and R. E. Del Río. 1996. Purely Olefinic Alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes oppositifolia)*. 24:43–47.

Moran, M. M. 2018. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58: annurev-pharmtox-010617-052832.

Mulier, M., J. Vriens, and T. Voets. 2017. TRP channel pores and local calcium signals. *Cell Calcium* 66:19–24.

Mustafa, A. K., M. M. Gadalla, and S. H. Snyder. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Sci. Signal.* 2:re2.

Nakatani, N., and M. Nagashima. 1992. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56:759–762.

Nangle, M. R., M. A. Cotter, and N. E. Cameron. 2003. An in vitro study of corpus cavernosum and aorta from mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *Nitric Oxide* 9:194–200.

Nagpure, B. V., and J.-S. Bian. 2016. Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016:1–16.

Newman, D. J., and G. M. Cragg. 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75:311–335.

Nilius, B., G. Owsianik, T. Voets, and J. A. Peters. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* 87(1), 165-217.

Nomura, E. C. O., M. R. A. Rodrigues, C. F. Da Silva, L. A. Hamm, A. M. Nascimento, L. M. De Souza, T. R. Cipriani, C. H. Baggio, and M. F. De Paula Werner. 2013. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *J. Ethnopharmacol.* 150:583–589.

O'Sullivan, S. E., D. A. Kendall, and M. D. Randall. 2005. Vascular effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), anandamide and *N*-arachidonoyldopamine (NADA) in the rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 507:211–221.

Ocegueda, S., E. Moreno, and P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*:12–15.

Ogura, M., G. A. Cordell, M. L. Quinn, C. Leon, P. S. Benoit, D. D. Soejarto, and N. R. Farnsworth. 1982. Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem — oral use of *Heliopsis longipes* — by means of a multidisciplinary approach. *J. Ethnopharmacol.* 5:215–219.

Ogut, O., and F. V. Brozovich. 2003. Regulation of force in vascular smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35:347–355.

Ortiz, M. I., R. Cariño-Cortés, N. Pérez-Hernández, H. Ponce-Monter, E. Fernández-Martínez, G. Castañeda-Hernández, I. I. Acosta-Madrid, and V. G. Cilia-López. 2009. Antihyperalgesia induced by *Heliopsis longipes* extract. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 52:75–7.

Pedersen, S. F., G. Owsianik, and B. Nilius. 2005. TRP channels: An overview. *Cell Calcium.* 38(3-4), 233-252.

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

Pozsgai, G., Z. Hajna, T. Bagoly, M. Boros, Á. Kemény, S. Materazzi, R. Nassini, Z. Helyes, J. Szolcsányi, and E. Pintér. 2012. The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur. J. Pharmacol.*

Premkumar, L. S. 2009. Transient Receptor Potential Channels as Targets for Phytochemicals. *ACS Chem. Neurosci.* 5:1117–1130.

Purohit, R., B. G. Fritz, J. The, A. Issaian, A. Weichsel, C. L. David, E. Campbell, A. C. Hausrath, L. Rassouli-Taylor, E. D. Garcin, M. J. Gage, and W. R. Montfort. 2014. YC-1 binding to the β subunit of soluble guanylyl cyclase overcomes allosteric inhibition by the α subunit. *Biochemistry* 53:101–114.

Qu, Z., J. Zhang, L. Huo, H. Chen, H. Li, Y. Fan, and W. Gao. 2015. Antihypertensive and vasorelaxant effects of *Rhizoma corydalis* and its active component tetrahydropalmatine via NO/cGMP pathway and calcium channel blockade in isolated rat thoracic aorta. *RSC Adv.* 5:94130–94143.

Raboune, S., J. M. Stuart, E. Leishman, S. M. Takacs, B. Rhodes, A. Basnet, E. Jameyfield, D. McHugh, T. Widlanski, and H. B. Bradshaw. 2014. Novel endogenous *N*-acyl amides activate TRPV1-4 receptors, BV-2 microglia, and are regulated in brain in an acute model of inflammation. *Front. Cell. Neurosci.* 8:195

Raduner, S., A. Majewska, J. Chen, X. Xie, B. Faller, K. Altmann, and J. Hamon. 2006. Alkylamides from *Echinacea* Are a New Class of Cannabinomimetics. *J. Biol. Chem.* 281:14192–14206.

Ramírez-Chávez, E., L. Lucas-Valdez, G. Virgen-Calleros, and J. Molina-Torres. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* 34:207–215.

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

Ríos, M. Y., A. B. Aguilar-Guadarrama, and M. D. C. Gutiérrez. 2007. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 110:364–367.

Ríos, M. Y., and H. F. Olivo. 2014. Chapter 3 – Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 43. p. 79–121.

Rios, M. 2013. Natural Alkamide: Pharmacology, Chemistry and Distribution. *Drug Discov. Res. Pharmacogn*:107–144.

Rohm, B., A.-K. Holik, N. Kretschy, M. M. Somoza, J. P. Ley, S. Widder, G. E. Krammer, D. Marko, and V. Somoza. 2015a. Nonivamide Enhances miRNA let-7d Expression and Decreases Adipogenesis PPAR γ Expression in 3T3-L1 Cells. *J. Cell. Biochem.* 116:1153–1163.

Rohm, B., A. Riedel, J. P. Ley, S. Widder, G. E. Krammer, and V. Somoza. 2015b. Capsaicin, nonivamide and trans-pellitorine decrease free fatty acid uptake without TRPV1 activation and increase acetyl-coenzyme A synthetase activity in Caco-2 cells. *Food Funct.* 6:172–184.

Ruparel, N. B., A. M. Patwardhan, A. N. Akopian, and K. M. Hargreaves. 2008. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain* 135:271–279. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17590514>

Ruparel, N. B., A. M. Patwardhan, A. N. Akopian, and K. M. Hargreaves. 2011. Desensitization of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) by the TRP vanilloid 1-selective cannabinoid arachidonoyl-2 chloroethanolamine. *Mol. Pharmacol.* 80:117–23.

Salgado-Garciglia, R., J. Molina-Torres, J. E. López-Meza, and P. D. Loeza-Lara. 2008. Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, micorrización y nodulación del frijol. *Agrociencia* 42:679–688.

Sánchez, G. A., V. A. Miozza, A. Delgado, and L. Busch. 2014. Total salivary nitrates

and nitrites in oral health and periodontal disease. *Nitric Oxide* 36:31–35.

Sandow, S. L., M. Tare, H. A. Coleman, C. E. Hill, and H. C. Parkington. 2002. Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ. Res.* 90:1108–13.

Senadheera, S., Y. Kim, T. H. Grayson, S. Toemoe, M. Y. Kochukov, J. Abramowitz, G. D. Housley, R. L. Bertrand, P. S. Chadha, P. P. Bertrand, T. V. Murphy, M. Tare, L. Birnbaumer, S. P. Marrelli, and S. L. Sandow. 2012. Transient receptor potential canonical type 3 channels facilitate endothelium-derived hyperpolarization-mediated resistance artery vasodilator activity. *Cardiovasc. Res.*

Sharma, V., J. Boonen, N. S. Chauhan, M. Thakur, B. De Spiegeleer, and V. K. Dixit. 2011. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC–MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. *Phytomedicine* 18:1161–1169.

Shen, M., L. Zhao, R. xin Wu, S. qiang Yue, and J. ming Pei. 2013. The vasorelaxing effect of resveratrol on abdominal aorta from rats and its underlying mechanisms. *Vascul. Pharmacol.* 58:64–70.

Siddiqui, M. R., Z. A. Alothman, and N. Rahman. 2017. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arab. J. Chem.* 10:S1409–S1421.

Spahn, V., C. Stein, and C. Zollner. 2014. Modulation of Transient Receptor Vanilloid 1 Activity by Transient Receptor Potential Ankyrin 1. *Mol. Pharmacol.* 85:335–344. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275229>

Stanley, C. P., W. H. Hind, C. Tufarelli, and S. E. O’Sullivan. 2015. Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB₁ activation. *Cardiovasc. Res.* 107:568–578

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

Stoner, L., M. L. Erickson, J. M. Young, S. Fryer, M. J. Sabatier, J. Faulkner, D. M. Lambrick, and K. K. McCully. 2012. There’s more to flow-mediated dilation than nitric oxide. *J. Atheroscler. Thromb.* 19:589–600.

Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, and A. Patapoutian. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in

nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819–29.

Stott, J. B., T. A. Jepps, and I. A. Greenwood. 2014. KV7 potassium channels: A new therapeutic target in smooth muscle disorders. *Drug Discov. Today* 19:413–424.

Sudhahar, V., S. Shaw, and J. D. Imig. 2009. Mechanisms involved in oleamide-induced vasorelaxation in rat mesenteric resistance arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 607:143–150.

Trevisani, M., J. Siemens, S. Materazzi, D. M. Bautista, R. Nassini, B. Campi, N. Imamachi, E. Andre, R. Patacchini, G. S. Cottrell, R. Gatti, A. I. Basbaum, N. W. Bunnett, D. Julius, and P. Geppetti. 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Vang, A., J. Mazer, B. Casserly, and G. Choudhary. 2010. Activation of endothelial BKCa channels causes pulmonary vasodilation. *Vascul. Pharmacol.* 53:122–129.

Veryser, L., N. Bracke, E. Wynendaele, T. Joshi, P. Tatke, L. Taevernier, and B. De Spiegeleer. 2016a. Quantitative In Vitro and In Vivo Evaluation of Intestinal and Blood-Brain Barrier Transport Kinetics of the Plant N-Alkylamide Pellitorine. *Biomed Res. Int.* 2016:5497402.

Veryser, L., L. Taevernier, T. Joshi, P. Tatke, E. Wynendaele, N. Bracke, S. Stalmans, K. Peremans, C. Burvenich, M. Risseeuw, and B. De Spiegeleer. 2016b. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using *in vitro* and *in vivo* models. *BMC Complement. Altern. Med.* 16:177.

Vane, J., and R. Corin. 2003. Prostacyclin: A Vascular Mediator. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 26: 571-578.

Veryser, L., E. Wynendaele, L. Taevernier, F. Verbeke, T. Joshi, P. Tatke, and B. De Spiegeleer. 2014. N-alkylamides: from plant to brain. *Funct. Foods Heal. Dis.* 4.

Walker, J., J. P. Ley, J. Schwerzler, B. Lieder, L. Beltran, P. M. Ziemba, H. Hatt, J. Hans, S. Widder, G. E. Krammer, and V. Somoza. 2017. Nonivamide, a capsaicin analogue, exhibits anti-inflammatory properties in peripheral blood mononuclear cells and U-937 macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 61:1600474.

Wang, L.-H., M. Luo, Y. Wang, J. J. Galligan, and D. H. Wang. 2006. Impaired vasodilation in response to perivascular nerve stimulation in mesenteric arteries of

TRPV1-null mutant mice. *J. Hypertens.* 24:2399–2408.

Wang, R., C. Szabo, F. Ichinose, A. Ahmed, M. Whiteman, and A. Papapetropoulos. 2015. The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 36:568–578.

Wang, R., L. Wu, and Z. Wang. 1997. The direct effect of carbon monoxide on K_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 434:285–91.

Wang, R. 2002. Two's company, three 's a crowd : can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter ? *Faseb J.* 16:1792–1798.

Wang, R. 2012. Shared signaling pathways among gasotransmitters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:8801–8802.

Wang, R. 2014. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem. Sci.* 39:227–32.

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

Wang, Y., N. E. Kaminski, and D. H. Wang. 2005. VR1-mediated depressor effects during high-salt intake: role of anandamide. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 46:986–91.

White, R. E., J. P. Kryman, a M. El-Mowafy, G. Han, and G. O. Carrier. 2000. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK (Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* 86:897–905.

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

Wu, L. C., N. C. Fan, M. H. Lin, I. R. Chu, S. J. Huang, C. Y. Hu, and S. Y. Han. 2008. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J Agric Food Chem* 56:2341–2349.

Wu, L., K. Cao, Y. Lu, and R. Wang. 2002. Different mechanisms underlying the stimulation of K (Ca) channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J. Clin. Invest.*

110:691–700.

Wu, L., and R. Wang. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.* 57:585–630. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382109>

Ximénez, F. 1888. Cuatro libros de la naturaleza y virtudes medicinales de las plantas y animales de la Nueva España. Secretaría de Fomento, México.

Yanaga, A., H. Goto, T. Nakagawa, H. Hikiami, N. Shibahara, and Y. Shimada. 2006. Cinnamaldehyde Induces Endothelium-Dependent and -Independent Vasorelaxant Action on Isolated Rat Aorta. *Biol. Pharm. Bull.* 29:2415–2418.

Yang, D., Z. Luo, S. Ma, W. T. Wong, L. Ma, J. Zhong, H. He, Z. Zhao, T. Cao, Z. Yan, D. Liu, W. J. Arendshorst, Y. Huang, M. Tepel, and Z. Zhu. 2010. Activation of TRPV1 by Dietary Capsaicin Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation and Prevents Hypertension. *Cell Metab.* 12:130–141.

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

Yao, X., and C. J. Garland. 2005. Recent Developments in Vascular Endothelial Cell Transient Receptor Potential Channels. *Circ. Res.* 97:853–863. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254217>

Yasuda, I., K. Takeya, and H. Itokawa. 1980. The geometric structure of spilanthol. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 28:2251–2253.

Yetik-Anacak, G., R. Sorrentino, a. E. Linder, and N. Murat. 2014. Gas what: NO is not the only answer to sexual function. *Br. J. Pharmacol.*

Yoo, D., R. C. Jupiter, E. A. Pankey, V. G. Reddy, J. A. Edward, K. W. Swan, T. C. Peak, R. Mostany, and P. J. Kadowitz. 2015. Analysis of Cardiovascular Responses to the H₂S donors Na₂S and NaHS in the Rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309:ajpheart.00171.2015.

Zardi, E. M., D. M. Zardi, F. Cacciapaglia, A. Dobrina, A. Amoroso, A. Picardi, and A. Afeltra. 2005. Endothelial dysfunction and activation as an expression of disease: role of prostacyclin analogs. *Int. Immunopharmacol.* 5:437–459.

Zhang, L., and D. Saffen. 2001. Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms: molecular structures and functional characterization. *JBC Pap. Press. Publ.* January 12.

Zhang, Z., H. Huang, P. Liu, C. Tang, and J. Wang. 2007. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K⁺ ATP channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85:1248–1253.

Zhao, W., J. Zhang, Y. Lu, and R. Wang. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K⁺ATP channel opener. *EMBO J.* 20:6008–6016.

Zhao, Y., P. M. Vanhoutte, and S. W. S. Leung. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129:83–94.

Zierler, S., S. Hampe, and W. Nadolni. 2017. TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases. *Cell Calcium* 67:105–115.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. a Andersson, H. Chuang, M. Sjørgård, V. Di Marzo, D. Julius, and E. D. Högestätt. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452–457.

