



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

**Determinación del efecto angiogénico del extracto etanólico  
y de la afinina, obtenidos de raíces de chilcuague  
(*Heliopsis longipes*) ex vivo e in vivo**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

Paola Estefanía García Badillo

Dirigido por:

Dr. Jesús Eduardo Castro Ruiz

Co-dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dr. Jesús Eduardo Castro Ruiz  
Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Secretario

M. en C. Josué López Martínez  
Vocal

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez  
Suplente

Dr. Anaguiven Ávalos Soriano  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Enero 2020  
México

## RESUMEN

Las raíces de *Heliopsis longipes* (Asteraceae) conocidas como chilcuague, sintetizan compuestos bioactivos, principalmente alcaloides, siendo la afinina la más abundante. La afinina tiene la capacidad de atravesar la mucosa oral y la piel, alcanzando fácilmente el torrente circulatorio para ejercer efectos farmacológicos y organolépticos. Sin embargo, la información existente acerca de los efectos de extractos *H. longipes* y de la afinina sobre el sistema vascular es escasa, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del extracto etanólico (EEHL) y de la afinina pura obtenidos de *H. longipes* sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Se utilizó el ensayo de anillos aórticos de rata ( $n = 9$ ) y el ensayo de angiogénesis *in vivo* con implantes de matrigel en ratones CD-1, utilizando diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de ambas sustancias a probar ( $n = 4$ ). Los resultados demostraron que tanto el EEHL como la afinina poseen un efecto angiogénico significativo ( $p < 0.5$ ) a las concentraciones bajas (1-10  $\mu\text{g/mL}$  y 10-50  $\mu\text{g/mL}$ , en los ensayos *ex vivo* e *in vivo*, respectivamente), mientras que el efecto fue inhibitorio sobre la angiogénesis a la concentración más alta (100  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Palabras clave:** chilcuague, *Heliopsis longipes*, planta medicinal, angiogénesis, sistema vascular.

## ABSTRACT

The roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) known as chilcuague, synthesize bioactive compounds, including alkaloids, of which affinin is predominant. The affinin easily permeates the oral mucosa and skin to access the bloodstream in order to exert pharmacological and organoleptic effects. However, little is known regarding the actions of extracts of *H. longipes* and affinin on the vascular system, therefore, the objective of this study was to evaluate possible effects on the formation of new blood vessels (angiogenesis) of the ethanolic extract (EEHL) and pure affinin obtained from *H. longipes*. Different concentrations (1, 10, 50 and 100 µg / mL) of both preparations were tested on the rat aortic *ex vivo* angiogenesis assay ( $n = 9$ ) and the *in vivo* Matrigel plug angiogenesis assay in CD-1 mice ( $n = 4$ ). The results demonstrated a significant angiogenic effect ( $p < 0.5$ ) at 1-10 µg / mL and 10-50 µg / mL for the *ex vivo* and *in vivo* assays respectively, while the antiangiogenic effect at the highest concentration (100 µg/mL) was inhibitory.

**Key words:** medicinal plant, chilcuague, *Heliopsis longipes*, angiogenesis, vascular system.

***A mis padres***

*“El mayor peligro para la mayoría de nosotros no es que nuestra meta sea demasiado alta y no la alcancemos, sino que sea demasiado baja y la consigamos.”*

*-Miguel Ángel Buonarroti*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres: María Eugenia Badillo Muñiz y José Carlos García García, por brindar luz en mi camino dándome su apoyo y amor para lograr mis metas. A mi hermano, José Carlos García Badillo por su apoyo y la enseñanza de aferrarme a algo que deseo hasta obtenerlo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales por abrirme sus puertas para realizar mis estudios de posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Dr. Eduardo Castro Ruíz por la dirección de mi tesis, su amistad, confianza, paciencia, enseñanzas y por la oportunidad de integrarme a su proyecto de investigación. Al igual que, a la Dra. Teresa García Gasca, por aceptarme con cariño en su grupo de investigación, por dirigir mi tesis, su apoyo, consejos, enseñanzas e inspirarme por la admiración que le tengo.

A la Dra. Carmen Clapp Jiménez, por su gran apoyo y enseñanzas, por su disposición para ayudar en el proyecto y enriquecerlo. Al Dr. Anaguiven Ávalos, M. en C. Josué López y MVZ. Verónica Andrade por su colaboración y apoyo en el proyecto, sus lecciones y compartir su experiencia en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

Al MVZ. Martín García, ISC. E. Nydia Hernández y L.N. Fernando López, por su apoyo, amistad y enseñanzas en las áreas del Bioterio, la Unidad de Microscopía y el laboratorio respectivamente del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), campus Juriquilla.

A mis amigos de la maestría, del laboratorio de biología celular y mis amigas de San Luis Potosí por su compañía y apoyo. A Jose Dena, Gloria Casique, Dulce Palmerin, Maru Maycotte, Ixchel Yunge, Ricardo Martínez, Guillermo Plaza y Jessica Flores por sus palabras de aliento, momentos de felicidad y aprendizaje. A Octavio Roldán por todo su apoyo brindado.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Usos de la medicina tradicional.....	3
2.2 Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ).....	4
2.2.1 Alcamidas.....	5
2.2.2 Afinina.....	6
2.3 Angiogénesis.....	12
2.3.1 Procesos celulares y moleculares de la angiogénesis.....	14
2.3.2 Modelos <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> para el estudio de angiogénesis.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Reactivos y solventes.....	23
6.2 Animales.....	23
6.3 Materia vegetal.....	24
6.4 Fase 1: Preparación del extracto etanólico de <i>Heliopsis longipes</i> .....	24
6.4.1 Análisis fitoquímico por métodos cromatográficos.....	24
6.4.2 Afinina purificada.....	25

6.5 Fase 2: Evaluación farmacológica .....	25
6.5.1 Determinación del efecto angiogénico del extracto etanólico y la afinina por el ensayo de anillos aórticos de rata .....	25
6.5.2 Ensayo directo de angiogénesis <i>in vivo</i> (EDAIV) .....	27
6.6 Análisis estadístico .....	29
VII. RESULTADOS .....	31
7.1 Fase 1: Preparación del extracto etanólico y análisis fitoquímico .....	31
7.2 Fase 2: Evaluación farmacológica .....	32
7.2.1 Efecto angiogénico del extracto etanólico de <i>H. longipes</i> y de la afinina en anillos aórticos de rata .....	32
7.2.2 Efecto angiogénico del extracto etanólico de <i>H. longipes</i> y de la afinina en el ensayo directo de angiogénesis <i>in vivo</i> (EDAIV) .....	35
VIII. DISCUSIÓN .....	37
IX. CONCLUSIONES .....	43
ANEXO 1 .....	44
X. LITERATURA CITADA .....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características físicas y químicas de la afinina. ....	7
<b>Cuadro 2.</b> Activación de las vías moleculares del efecto angiogénico. ....	17

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de <i>Heliopsis longipes</i> en los estados de Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí, México .....	4
<b>Figura 2.</b> Planta de <i>Heliopsis longipes</i> y sus raíces secas.....	5
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la afinina.....	7
<b>Figura 4.</b> Vías moleculares de señalización que involucran a los GTs, y su participación en la angiogénesis y la vasodilatación.....	11
<b>Figura 5.</b> Proceso de angiogénesis.....	12
<b>Figura 6.</b> Interacción de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con receptores de membrana celular.....	15
<b>Figura 7.</b> Diagrama del Ensayo Directo de Angiogénesis <i>In Vivo</i> .....	29
<b>Figura 8.</b> Análisis cromatográfico del extracto etanólico de <i>H. longipes</i> (EEHL) y de la afinina .....	31
<b>Figura 9.</b> Cuantificación del efecto angiogénico del EEHL y de la afinina en ensayo de aorta aislada de rata .....	33
<b>Figura 10.</b> Presencia de células endoteliales por efecto angiogénico del EEHL y la afinina en anillos aórticos de rata.....	34
<b>Figura 11.</b> Efecto angiogénico del EEHL y de la afinina .....	35
<b>Figura 12.</b> Cuantificación del efecto angiogénico del EEHL y de la afinina del EDAIV .....	36

## I. INTRODUCCIÓN

México posee alrededor de 4,000 especies de plantas con atributos medicinales, de las cuales únicamente el 5% han sido evaluadas científicamente (Ocegeda y col., 2005). *Heliopsis longipes* S. F. Blake (Asteraceae) es una planta originaria de la región central de México, cuyas raíces se conocen comúnmente como “chilcuague” (Cilia-López y col., 2014). Esta especie sintetiza en sus raíces compuestos bioactivos llamados alcanidas, siendo la afinina la más abundante, la cual posee numerosas actividades biológicas reportadas y patentadas (López-Martínez y col., 2011; Silveira y col., 2018) tales como: insecticida, larvicida (Hernández-Morales y col., 2015); antimicrobiano, fungistático (García-Chávez y col., 2004; Molina-Torres, y col., 1999); anti inflamatorio (Hernández y col., 2009), antinociceptivo (de la Rosa-Lugo y col., 2017; Déciga-Campos y col., 2010) y ansiolítico y diurético (Gerbino y col., 2016). Se ha demostrado que la afinina es un compuesto capaz de permear la mucosa bucal y la piel (Boonen y col., 2010a; Boonen y col., 2010b), penetrar rápidamente en el torrente sanguíneo e incluso atravesar la barrera hematoencefálica (Veryser y col., 2016; Veryser y col., 2014). Lo anterior indica la facilidad con la que esta molécula pudiera interactuar con el sistema vascular, sin embargo, la evidencia científica acerca de los posibles efectos de la afinina y otras alcanidas sobre el sistema cardiovascular es escasa.

Recientemente se reportó que extractos de *H. longipes* y la afinina interaccionan con el sistema vascular, produciendo un efecto vasodilatador dependiente de la concentración sobre anillos de aorta de rata. Así mismo, el estudio del mecanismo de acción de la afinina confirmó la participación de la vía de los gasotransmisores (GTs), que incluyen al óxido nítrico (NO), al sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y al monóxido de carbono (CO), así como de la vía de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Castro-Ruiz y col., 2017). Cabe destacar que las vías de señalización implicadas en la vasodilatación mediada por GTs también participan, de manera paralela, en el proceso de la angiogénesis que es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los

preexistentes (Coletta y col., 2012; Hasan y col., 2017; Seo y col., 2003; Wang y col., 2005); desempeñando un papel central en procesos fisiopatológicos como la cicatrización, desarrollo del endometrio uterino, hematopoyesis y crecimiento tumoral (Freedman e Isner, 2001).

La información existente acerca de los efectos de la afinina y otras isobutilamidas en el sistema vascular es escasa y se desconoce la posible influencia sobre la angiogénesis. Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis fue determinar el efecto angiogénico del extracto etanólico de *H. longipes* y de la afinina purificada en modelos *ex vivo* e *in vivo* de angiogénesis.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **II. ANTECEDENTES**

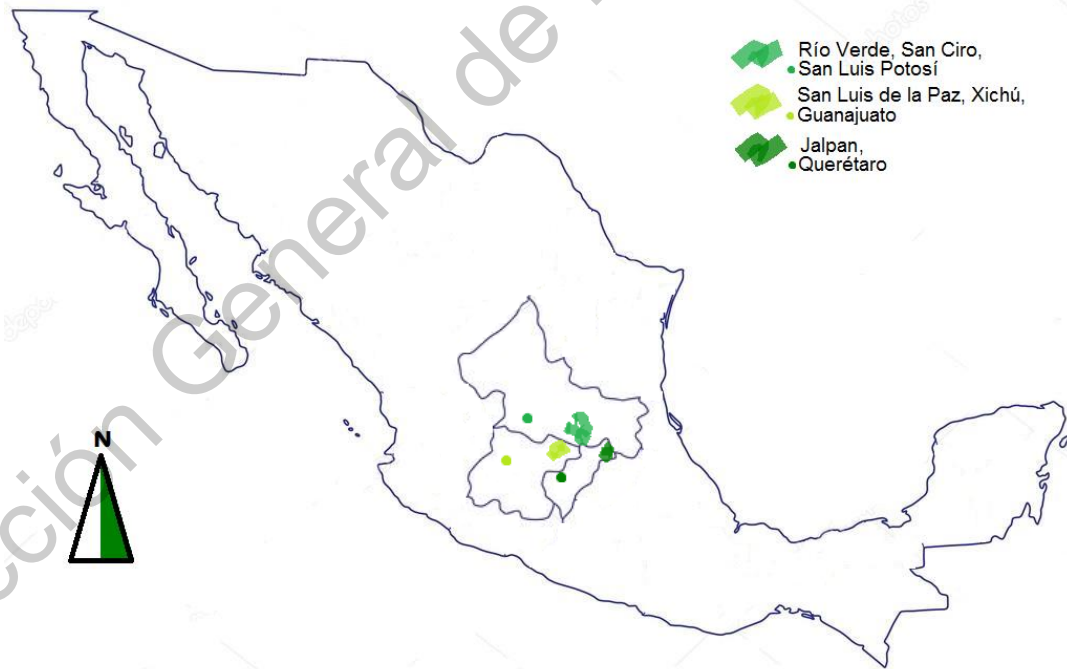
### **2.1 Usos de la medicina tradicional**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define en 2013 a una planta medicinal como “cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos”. Así mismo, la Organización reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, así como la relevancia a nivel económico en comparación a la síntesis de nuevos fármacos. El interés científico sobre las plantas medicinales, ha impulsado la valorización de su empleo en muchas partes del mundo representando una forma complementaria de curar, en que el empirismo y la etnología de la terapia quedan atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina tradicional con las terapias oficiales de cada país (OMS, 2013).

En Mesoamérica, existe una diversidad de plantas medicinales usadas a través del tiempo con el propósito de tratar malestares. Las plantas medicinales son un elemento importante en la tradición de la medicina especialmente en México, en donde crecen alrededor de 4,000 especies de plantas con flores y aproximadamente el 15% de la flora total tienen atributos medicinales, es decir que poseen alguna propiedad curativa. Sin embargo, en el lado científico, 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 (Ocegueda y col., 2005). Una sola planta medicinal puede contener de ocho a 10 compuestos bioactivos. Estos compuestos químicos se extraen por diferentes procedimientos y se presentan como infusiones, extractos o cápsulas siendo un potencial benéfico para la salud (Ibarra-Alvarado y col., 2010).

## 2.2 Chilcuague (*H. longipes*)

En México, en las sierras de Álvarez y Gorda, donde coinciden los estados de Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí (Figura 1), crece *Heliopsis longipes* S. F. Blake, una planta medicinal cuyas raíces (con longitud de 15 a 30 cm) son conocidas comúnmente como “chilcuague, raíz azteca o raíz de oro” perteneciente a la familia Asteraceae: *Heliantheae*, junto con otras 25,000 especies (Figura 2) (Cilia-López y col., 2014). Culinariamente se usa para condimentar salsas, frijoles, nopales y otros platillos de las regiones donde crece y comúnmente las personas que la prueban en una infusión de té, describen que posee un sabor picante que estimula la secreción salival (Arriaga-Alba y col., 2013). En la medicina popular se utiliza como analgésico, anestésico local y como antibiótico para infecciones de los aparatos respiratorio y digestivo (Molina-Torres y García-Chávez, 2001); debido a que contiene compuestos bioactivos llamados alcanidas (López-Martínez y col., 2011).



**Figura 1.** Distribución geográfica de *Heliopsis longipes* en los estados de Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí, México. Fuente: Modificado (Cilia-López y col., 2014).



**Figura 2.** Planta de *Heliopsis longipes* y sus raíces secas.

### **2.2.1 Alcamidas**

Las *N*-alcamidas o alcamidas son compuestos bioactivos presentes en al menos 33 familias de plantas, con 300 derivados. Su estructura química parte de la unión de una amida (condensación química de un ácido con una amina) y un ácido graso con longitud de cadena mediana a larga de ocho a dieciocho carbonos, generalmente alifática o lineal. Las amidas cuya cadena acídica es alifática, dependiendo del tipo de enlaces insaturados que presenten, se clasifica en dos grupos: las alcamidas olefínicas, con al menos una doble ligadura; y las alcamidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura. La importancia de las alcamidas, radica en que son compuestos bioactivos, lo que significa que producen una respuesta notable en células receptoras (García-Chávez y col., 2004; Greger, 2016; Molina-Torres y García-Chávez, 2001; Rios, 2013).

La familia Asteraceae es caracterizada por su contenido de alcamidas alifáticas, se destacan los géneros de *Achilea*, *Acmella*, *Echinaceae*, *Heliopsis* y *Spilanthes* con estudios fitoquímicos y farmacológicos (Boonen, y col., 2010; García-Chávez y col.,

2004; Molina-Torres y García-Chávez, 2001; Rios, 2013). Otro conjunto de alcanidas, lo constituyen las amidas que presentan anillos homo o heterocíclicos, estructuras observadas en la capsaicina presente en algunos chiles (*Capsicum spp.*) y la piperina presente en pimientas (*Piper spp.*), entre otras (Boonen y col., 2012; Greger, 2016; Johns y col., 1982; Rios y Olivo, 2014).

Las alcanidas representan una clase de compuestos lipídicos relacionados estructuralmente con compuestos endógenos en mamíferos, los endocannabinoides. La anandamida (*N*-araquidonoiletanolamina), un neurotransmisor cerebral cannabinoide endógeno con una similitud estructural notable a las alcanidas, tiene su mayor actividad en el sistema nervioso central, en donde evoca sus efectos biológicos (Rios, 2013).

### **2.2.2 Afinina**

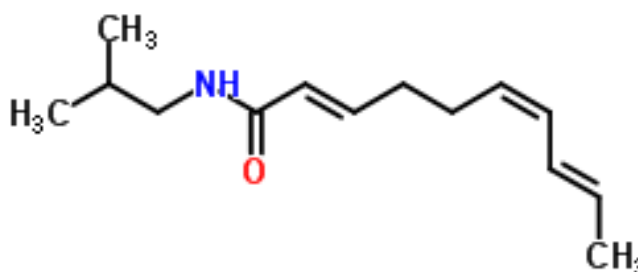
Isobutilamida alifática insaturada (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida), también conocida como espilantol, se encuentra en diversas plantas que se usan como remedio tradicional en numerosos países (Rios y Olivo, 2014). Esta alcanida se aisló por primera vez de las raíces de *H. longipes* en 1945 y se le atribuyó la propiedad de insecticida (Acree y col., 1945a,b; Jacobson y col., 1947). La estructura molecular de este compuesto se ha elucidado gracias a estudios espectroscópicos reportados por diferentes grupos de investigación (Boonen y col., 2010a,b; Correa y col., 1971; Crombie y col., 1963; Crombie y Krasimski, 1962; Nakatani y Nagashima, 1992) así como sus características físicas y químicas mostradas en el Cuadro 1 (Ikeda y col., 1984; Jacobson, 1957).

**Cuadro 1.** Características físicas y químicas de la afinina.

Características	Valores
Peso molecular	221.339 g/mol
Color	Amarillo claro
Punto de fusión	23 °C
Punto de ebullición	165 °C
Índice de refracción a 298 °C	1.5135
Absorción máxima UV	228.5 nm

*Heliopsis longipes* acumula en sus raíces 20 alcanoides, de las cuales, está reportado que la afinina es la más abundante en un 45% del peso total en extractos (Déciga-Campos y col., 2010; López-Martínez y col., 2011; Rios y col., 2007). Así mismo, la afinina está presente en otras plantas del género *Spilanthes*, como *Spilanthes acmella* (Boonen y col., 2010).

La estructura química de la afinina (Figura 3) posee, al igual que otras alcanoides, una parte relativamente polar que corresponde a la amida y a su vez se une con un ácido graso menos polar, lo que da a la molécula en general una característica antipática, aunque su afinidad prevalente es lipofílica (Yasuda y col., 1980).



**Figura 3.** Estructura química de la afinina.



En una variedad de estudios se ha comprobado que la afinina es responsable de efectos biológicos como anestesia local, saborizante, insecticida y larvicida (10-14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Hernández-Morales y col., 2015), antimicrobiano (25-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Molina-Torres y col., 1999), bactericida y fungistático en dos especies de *Sclerotium* (5-150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Molina-Torres y col., 2004). Así mismo, se han evidenciado efectos farmacológicos de la afinina como antiinflamatorio en línea celular de macrófagos (90-180  $\mu\text{M}$ ) (Wu y col., 2008) y en roedores ( $\text{DE}_{50} = 0.8 \text{ mg/kg per os (p.o.)}$ ) (Hernández y col., 2009), antinociceptivo ( $\text{DE}_{50} = 6.98 \text{ mg/kg p.o.}$ ;  $\text{DE}_{50} = 36 \pm 5 \text{ mg/kg intraperitoneal (i.p.)}$  en ratones) (Cariño-Cortés y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2010), ansiolítico (3-30  $\text{mg/kg i.p.}$  en ratones) y diurético (800  $\text{mg/kg p.o.}$  en ratones) (Gerbino y col., 2016) y recientemente se reportó un efecto vasodilatador en aorta de rata (27.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Castro-Ruiz y col., 2017). De manera similar, diferentes extractos orgánicos obtenidos de las raíces de *H. longipes* han mostrado efectos farmacológicos tales como antihiperalgésico con EEHL *p.o.* y diclofenaco *i.p.* ( $\text{ED}_{30} = 54.4 \pm 9.4 \text{ mg/kg}$  en ratones) (Acosta-Madrid y col., 2009); efecto antinociceptivo del EEHL (3-100  $\text{mg/kg p.o.}$  dosis dependencia en ratones CD1, (3  $\text{mg/pata i.v.}$  en ratones ICR) y efecto estimulante en el sistema nervioso central del extracto (1  $\text{mg/kg i.v.}$ ); ( $\text{DE}_{50} = 2.2 \pm 0.2 \text{ mg/kg i.p.}$  en ratones ICR) (Cariño-Cortés y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; Déciga-Campos y col., 2010); efecto analgésico del EEHL y efecto en el sistema neuronal antidepressivo (10  $\text{mg/kg i.p.}$  en ratones) (Cilia-López y col., 2010); efecto antiinflamatorio ( $\text{DE}_{50} = 0.8 \text{ mg/oreja de ratón tópico}$ ) (Hernández y col., 2009); efecto analgésico del extracto de diclorometano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en cortes de cerebro de ratones) (Rios y col., 2007).

Adicionalmente, se han llevado a cabo diferentes estudios toxicológicos, para establecer la seguridad de la afinina. Mediante un ensayo de toxicidad aguda en ratones ICR, se obtuvo una dosis letal media ( $\text{LD}_{50}$ ) de 113  $\text{mg/kg p.o.}$ , así mismo se obtuvo una  $\text{LD}_{50} = 62 \text{ mg/kg p.o.}$  del EEHL (Déciga-Campos y col., 2012). Cabe mencionar que la  $\text{LD}_{50}$  es mayor en comparación con la dosis requerida para obtener antinocicepción con la afinina ( $\text{DE}_{50} = 36 \pm 5 \text{ mg/kg i.p.}$ ;  $\text{DE}_{50} = 6.98 \text{ mg/kg}$

*p.o.*) (Déciga-Campos y col., 2010; Ogura y col., 1982). Además, un análisis mediante la prueba de Ames reveló que tanto la afinina como el EEHL no son mutagénicos (Déciga-Campos y col., 2012) y en una investigación posterior, se demostró que la afinina es un compuesto con propiedades antimutagénicas (Arriaga-Alba y col., 2013). En 2010, se reportó la toxicidad aguda del EEHL en ratones CD1 ( $LD_{50} = 288 \text{ mg/kg } p.o.$ ) y se estableció la ausencia de efectos genotóxicos y citotóxicos en dosis bioactivas *in vivo* (Cariño-Cortés y col., 2010). Con análisis histopatológicos se ha demostrado que una dosis de 1000 mg/kg de EEHL produce daño cerebral, sin embargo, esta dosis es más alta de la que normalmente se consume como condimento o tratamiento analgésico y antiinflamatorio dental y oral por los humanos (Cariño-Cortés y col., 2010; Molina-Torres y García, 2001). Se ha demostrado que la afinina es capaz de interactuar con la circulación sanguínea y cruzar la barrera hematoencefálica en concentración de 4 mg/mL *i.v.* en ratones ICR-CD1 sin mostrar toxicidad (Verlyser y col., 2016).

En estudios citotóxicos se ha reportado la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de la afinina (260  $\mu\text{g/mL}$ ) y del extracto metanólico de *A. oleracea* (234  $\mu\text{g/mL}$ ) en células embrionarias de riñón humano (HEK 293), sin embargo, los efectos biológicos se observaron en concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  o menores (Gerbino y col., 2016). Se ha demostrado que la afinina inhibe mediadores pro inflamatorios (180  $\mu\text{M}$ ) sin causar citotoxicidad en macrófagos murinos RAW 264.7 (Wu y col., 2008). Recientemente, ensayos de citotoxicidad de la afinina y del EEHL dieron como resultado efecto citotóxico para la inhibición selectiva de la proliferación de células cancerosas (HeLa, K-562, MCF-7) (Willig y col., 2019).

El efecto farmacológico más estudiado de extractos de *H. longipes* y la afinina es la antinocicepción (Acosta-Madrid y col., 2009; Cariño-Cortés y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2012; Ogura y col., 1982). Estudios realizados en animales, han demostrado que tanto los extractos como la afinina producen un efecto analgésico dependiente de la concentración con una potencia comparable a fármacos ampliamente utilizados como la morfina y anti-inflamatorios

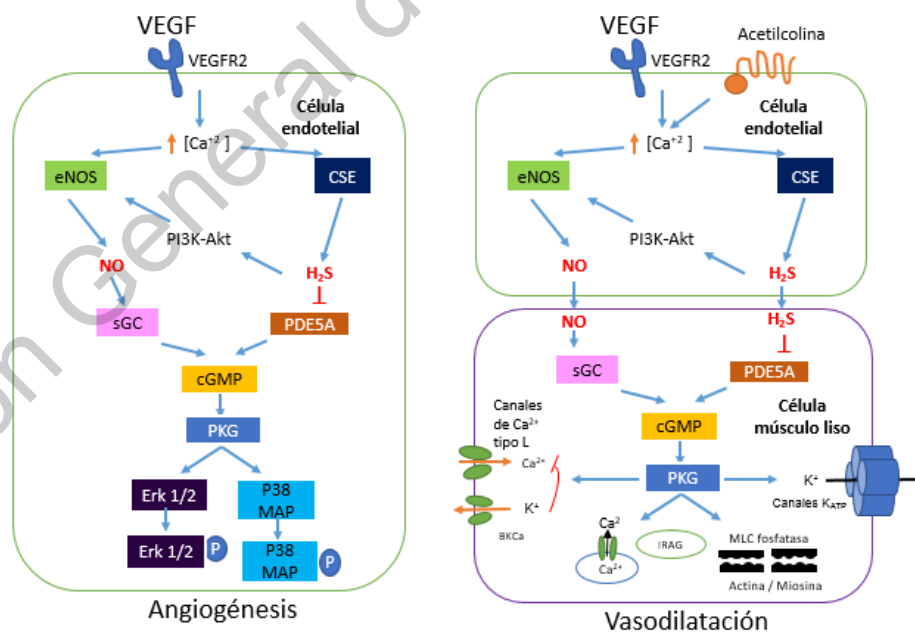
no esteroideos (AINEs) (Déciga-Campos y col., 2010; Rios y col., 2007). Estudios enfocados en elucidar el posible mecanismo de acción de la afinina, sugieren su interacción con varias vías de señalización como la vía del ácido gamma-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), serotonina, opioide, la vía del NO y la activación de canales potenciales de receptor transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) específicamente la activación de los TRPV1 como potencial tratamiento de analgesia para el dolor orofacial (de la Rosa-Lugo y col., 2017; Déciga-Campos y col., 2010).

La afinina, es un compuesto capaz de permear la mucosa bucal y la piel, (Boonen, y col., 2010a; Boonen y col., 2010b) una prueba de permeabilidad *in vitro* mostró que la afinina (10 µg/ mL) penetra monocapas de células CaCo-2 en cultivo por difusión pasiva y, consecuentemente, se mostró en modelos *in vivo* que alcanza la circulación sanguínea, cruzando la barrera hematoencefálica en grandes cantidades (~98%) (Veryser y col., 2016; Veryser y col., 2014). Lo anterior indica que la afinina accede e interactúa con la vasculatura. Sin embargo, la evidencia científica acerca de los posibles efectos de la afinina y otras alcamidas sobre el sistema cardiovascular es escasa.

Nuestro grupo de trabajo se ha centrado en el estudio de la respuesta vasomotora producida por extractos de diclorometano y etanólico de *H. longipes* enriquecidos en afinina y de la afinina pura sobre la vasculatura de rata. La afinina se purificó a partir del extracto de diclorometano mediante una columna abierta con una fase estática de silica gel (1 kg, Kiesegel 60 Merck 100–230 mesh, 8 × 110 cm) y una fase móvil conformada por una relación hexano: acetato de etilo (10:0 a 6:4). Se colectaron 21 fracciones, entre las cuales se recuperaron 21.8 g de afinina. Posteriormente se identificó la afinina por comparación con muestra auténtica mediante sus datos analizados por técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de C13 y protónica (<sup>13</sup>C-NMR y <sup>1</sup>H-NMR). Así mismo, se analizó la pureza del compuesto por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Waters 600 Associates, Milford, MA, USA), acoplada a un detector de

arreglo de diodos (Waters 2998) (HPLC-PDA). Se utilizó una columna C18 modelo XBridge (4.6 × 100 mm 3.5 μm) con una velocidad de flujo de la fase móvil (acetonitrilo/agua 44:56 v/v) 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 (Castro-Ruiz y col., 2017).

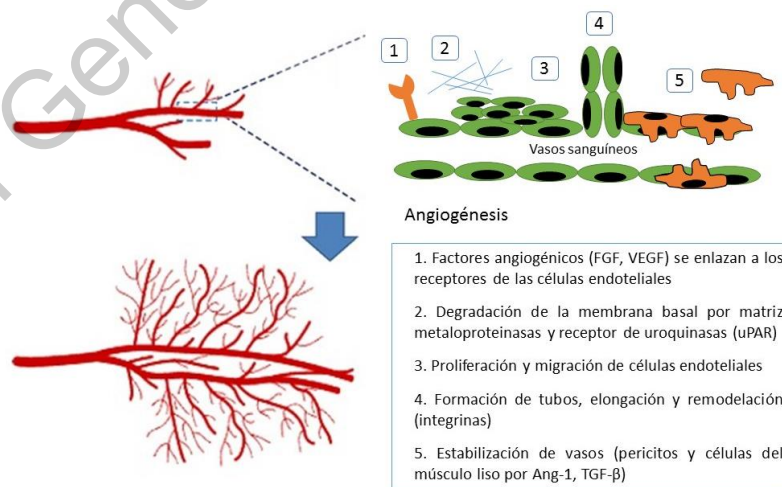
Los resultados del estudio para determinar el efecto vasodilatador mostraron que tanto la afinina como los extractos de diclorometano y etanólico, producen vasodilatación dependiente de la concentración en segmentos de aorta aislada de rata. Experimentos para determinar el mecanismo de acción vasodilatador de la afinina confirmaron la participación de la vía de los GTs [óxido nítrico (NO), sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y monóxido de carbono (CO)], así como de la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Castro-Ruiz y col., 2017). Además, la vía de señalización implicadas en la vasodilatación mediada por NO también participan de manera paralela en el proceso de angiogénesis (Figura 4) (Coletta y col., 2012; Seo y col., 2003; Wang y col., 2005).



**Figura 4.** Vías moleculares de señalización que involucran a los GTs, y su participación en la angiogénesis y la vasodilatación. Fuente: Modificado (Coletta y col., 2012)

## 2.3 Angiogénesis

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos ya existentes y este proceso implica la degradación de matriz extracelular, migración, proliferación y reorganización estructural de las células endoteliales diferenciadas (Figura 4) (Freedman e Isner, 2001; Kumar y col., 1998; Torres y col., 2017). La angiogénesis ocurre en estados fisiológicos como en el crecimiento de órganos y tejidos durante el desarrollo, eventos reproductivos en las hembras (crecimiento cíclico del endometrio, formación de la placenta y de la glándula mamaria durante el embarazo, etc) y la reparación de heridas. La angiogénesis también es determinante de estados patológicos, cuando se interfiere la homeostasis angiogénica, como durante la formación de tumores, retinopatías vasoproliferativas, o enfermedades inflamatorias crónicas, tales como, artritis reumatoide, psoriasis y periodontitis (Freedman e Isner, 2001; Johnson y Wilgus, 2014). La activación del factor pro-angiogénico más prominente, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), es consecuencia de estímulos como la hipoxia, la inflamación y la transformación tumoral (Zimna y Kurpisz, 2015).



**Figura 5.** Proceso de angiogénesis. **(1)** Interacción de factores angiogénicos con sus respectivos receptores de las células endoteliales y activación de las vías de transducción

de señales. **(2)** Se degrada la matriz extracelular por medio de la activación de matriz metaloproteinasas (MMP's). **(3)** Las células endoteliales migran a partir de la pared capilaridad preexistente e inicia la proliferación. **(4)** Células endoteliales expresan integrinas, facilitan su adhesión a la matriz extracelular y su migración para la formación de nuevos tubos capilares. **(5)** Angiopoyetina I (Ang-I) se embona a receptores de Tie-2 para la estimulación del reclutamiento de pericitos y la estabilización de los nuevos vasos sanguíneos. Modificado (Yoo y Kwon, 2013).

Los factores promotores de la angiogénesis incluyen al VEGF, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento placentario (PIGF, por sus siglas en inglés), factor-alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y angiopoyetinas (Ang). Entre los factores inhibidores de la angiogénesis sobresalen la angiostatina, la trombospondina, la endostatina y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Folkman, 1995; Liekens y col., 2001; Ucuizian y col., 2010; Wood, 2000; Yoo y Kwon, 2013).

El proceso angiogénico inicia con señales biológicas como la hipoxia, isquemia, y/o daño de vasos sanguíneos que regulan la expresión de factores de crecimiento pro-angiogénicos que activan sus receptores. La permeabilidad vascular incrementa en respuesta al VEGF, permitiendo así la extravasación de proteínas plasmáticas que forman una estructura de soporte para la migración de las células endoteliales. Angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2 (Ang-1 y Ang-2) ejercen una función de regulación homeostática durante el desarrollo vascular, Ang-1 como inhibidor de la permeabilidad vascular y Ang-2 que participa en la vía de desestabilización del desapego de las células del músculo liso y la promoción de la permeabilidad. Las metaloproteinasas de matriz (MMP's) promueven la angiogénesis por medio de la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Las células endoteliales que proliferan subsecuentemente se unen y conforman estructuras tubulares. Las integrinas  $\alpha$  y  $\beta$  promueven la adhesión y migración de las células endoteliales, mientras que las cadherinas vasculares endoteliales (VE) incrementan la supervivencia celular y promueven la adhesión celular. Una vez que los vasos

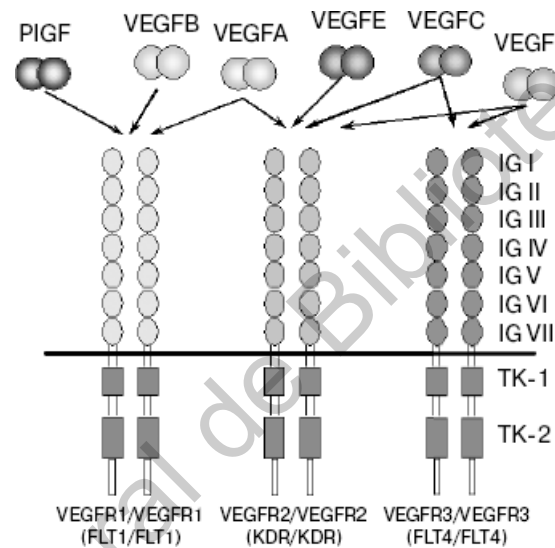
sanguíneos se han formado, pericitos y las células del músculo liso facilitan la diferenciación, estructura y estabilidad de los nuevos vasos (Ucuzian y col., 2010; Yoo y Kwon, 2013; Zimna y Kurpisz, 2015).

### **2.3.1 Procesos celulares y moleculares de la angiogénesis**

Dentro de las moléculas con señal extracelular que favorecen el crecimiento, se encuentran los mitógenos, los cuales estimulan la división celular; los factores de crecimiento, que estimulan el crecimiento celular por medio de la promoción de síntesis proteica y otras macromoléculas inhibiendo su degradación y los factores de supervivencia, con función de mantener una supervivencia celular por medio de la supresión de apoptosis (Ucuzian y col., 2010).

Los miembros de la familia del VEGF incluyen proteínas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D; que realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca. El receptor VEGFR-1, también llamado tirosina de fosforilación 1 (Flt-1, por sus siglas en inglés), expresado en varios tipos celulares incluyendo monocitos y macrófagos, músculo vascular liso y células neuronales, tiene la función, entre otras, de unir al VEGF-A y de esta manera regular su accesibilidad para interactuar con el receptor VEGFR-2, que es el principal mediador de los efectos angiogénicos y de vasopermeabilidad del VEGF. El receptor VEGFR-2 o KDR (contiene el dominio de inserción de quinasa), localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares, juega un papel clave tanto en angiogénesis embrionaria como en hematopoyesis y su activación estimula una serie de vías de transducción de señales para la mitogénesis, la migración y la supervivencia de las células endoteliales. La expresión del VEGFR-3 en las últimas etapas del desarrollo embrionario determina su exclusiva expresión en el endotelio del sistema linfático endotelial. La activación única de este receptor es suficiente para proteger a las células de apoptosis e inducir su proliferación y migración (Johnson y Wilgus, 2014; Karamysheva, 2008; Ucuzian y col., 2010).

El VEGF-A regula la angiogénesis y la permeabilidad vascular mediante la activación de dos receptores el VEGFR- 1 y VEGFR- 2. Ambos poseen siete dominios de inmunoglobulinas como dominios extracelulares, un dominio transmembrana y una secuencia tirosina quinasa que se interrumpe por una quinasa insertada en el dominio, que pertenece a la misma familia de receptores que contribuyen a la angiogénesis tumoral y la remodelación vascular PDGFR, c-Kit, c-Fms, Flt-3 y Flt-4 (Figura 6) (Torres y col., 2017; Wood, 2000).



**Figura 6.** Interacción de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con receptores de membrana celular. Fuente: (Karamysheva, 2008)

Flt-1 se une a VEGF-A y -B y al factor de crecimiento placentario (PIGF), mientras que KDR se une a VEGF- A, -C y -D; y Flt-4 (VEGF -R3) se activa por VEGF-C y -D. Aunque se demostró que la activación de Flt-1 media respuestas biológicas, tales como la migración de células endoteliales y monocitos y la inducción del factor tisular, la estimulación con VEGF induce solo fosforilación débil del receptor y sin respuesta mitogénica significativa. Por otro lado, KDR está fuertemente autofosforilado en respuesta a la estimulación de VEGF y regula una respuesta mitogénica (Karamysheva, 2008; Ucuizian y col., 2010).



Dentro de los otros factores de crecimiento se encuentra el FGF, del cual se han identificado 20 subtipos y 4 diferentes receptores tirosina-quinasa (FGFRs). Los principales factores estimulantes de angiogénesis, el FGF-1 (FGF ácido) y el FGF-2 (FGF básico), están unidos a los cuatro receptores, siendo mitogénicos para células endoteliales, fibroblastos y otros tipos celulares. Así mismo, FGF-2 incrementa la expresión angiogénica del factor VEGF y proteasas; por lo tanto, el FGF-2 es clave para cicatrización de heridas, ya que regula los brotes de nuevos vasos sanguíneos en los sitios de reparación de tejidos, en diferencia del FGF-1 (Tahergorabi y Khazaei, 2012).

La cascada de señalización de angiogénesis comienza por medio de la activación de los factores de crecimiento con sus respectivos receptores, como el VEGF-A con el VEGFR-2, lo cual genera un incremento de calcio dentro de la célula endotelial, lo que hace que se sintetice NO por medio de la isoforma de NO sintasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) lo que resulta en el aumento de la permeabilidad vascular. La principal vía de señalización del NO incluye la vinculación a la guanilil/guanilato ciclasa soluble (sGC, por sus siglas en inglés) y la producción del segundo mensajero, la guanosín 5' monofosfato cíclica (cGMP, por sus siglas en inglés), seguida por la activación de la proteína quinasa G (PKG, por sus siglas en inglés). Además, recientemente se ha estudiado la vía del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) vascular, generado de L-cisteína por dos enzimas piridoxales 5'-fosfato dependientes: la cistationina-β-sintasa (CBS) y la cistationina-γ-liasa (CSE, por sus siglas en inglés). H<sub>2</sub>S no activa directamente la sGC, ya que tiene un efecto inhibitorio por medio de la fosfodiesterasa 5A (PDE5A, por sus siglas en inglés), retrasando así la degradación de cGMP impidiendo la ciclación. H<sub>2</sub>S activa la fosfatidilinositol-3-OH-quinasa - proteína quinasa B (PI3K-Akt, por sus siglas en inglés) generando un incremento en la supervivencia celular; esta señalización aumenta la fosforilación de eNOS, influyendo en el aumento de la permeabilidad vascular. Una vez activada la PKG por la cascada de señalización, se fosforilarán quinasas reguladas por señal extracelular (Erk 1 y 2, por sus siglas en inglés),

expresando proliferación y migración a los nuevos vasos sanguíneos. Así mismo, al fosforilarse la proteína quinasa activada por mitógenos (p38 MAP, por sus siglas en inglés) incrementa la permeabilidad vascular y actúa como reguladora de la inflamación (Cuadro 2) (Coletta y col., 2012; Katsouda y col., 2016; Szabó y Papapetropoulos, 2011; Ucuzian y col., 2010; Wong, 2012).

Tanto el NO como el H<sub>2</sub>S son GTs requeridos para el control fisiológico de la función vascular, mostrado las vías de señalización de vasodilatación y angiogénesis para estimular el incremento de cGMP que activa PKG para seguir con la cascada de señalización y activar Erk 1/2 y p38 en el caso de angiogénesis; y en la vasodilatación se activa la cadena ligera de miosina (MLC) fosfatasa, canales de potasio activados por voltaje y calcio de gran conductancia (BK<sub>Ca</sub>), y IP<sub>3</sub>-R-asociado a sustrato de cG-quinasa (IRAG), mostrado en la Figura 7 (Coletta y col., 2012; Eberhardt y col. 2014; Katsouda y col., 2016; Szabó y Papapetropoulos, 2011; Wong, 2012)

**Cuadro 2.** Activación de las vías moleculares del efecto angiogénico.

<b>Molécula</b>	<b>Efecto por activación</b>
eNOS	Permeabilidad vascular
PI3K-Akt	Supervivencia celular
Erk 1/2 fosforilada	Proliferación y migración
P38 MAP fosforilada	Permeabilidad vascular y regulador de inflamación

Tomando en cuenta que el sistema cardiovascular se encarga de transportar oxígeno y nutrimentos a todas las células, tejidos y órganos. Cuando hay una exposición prolongada a niveles bajos de oxígeno, las células sobreviven a través de la activación de una serie de genes que participan en la angiogénesis. El

activador transcripcional sensible al oxígeno, el factor inducible a hipoxia-1 (HIF-1), es el mediador clave de la regulación de la angiogénesis, tanto fisiológica como patológica. HIF-1 participa en la formación de la vasculatura por correlación sinérgica con otros factores pro-angiogénicos como el VEGF, PlGF, o angiopoyetinas (Ucuzian y col., 2010; Zimna y Kurpisz, 2015).

### **2.3.2 Modelos *ex vivo* e *in vivo* para el estudio de angiogénesis**

La importancia de la angiogénesis en las patologías ha generado un interés general en elucidar los mecanismos celulares y moleculares con el fin de identificar nuevos tratamientos terapéuticos. Numerosos ensayos se han desarrollado para evaluar el proceso angiogénico en modelo animal, *ex vivo* e *in vivo* (Go y col., 2003; Nilesch y col., 2006; Zippel y col., 2016).

Como modelo intermedio entre los ensayos de angiogénesis *in vitro* que son más precisos y los *in vivo* más completos y relevantes fisiológicamente, los ensayos con explantes de órganos (*ex vivo*) han ganado un amplio uso por brindar una más completa información y visualización de los mecanismos angiogénicos (crecimiento, estabilidad y regresión de los nuevos vasos sanguíneos) y las sustancias de prueba que influyen en la angiogénesis; información a la que no se accede en otros ensayos de angiogénesis. Los tipos de órganos más utilizados para estudiar la angiogénesis son la aorta (rata, ratón, pollo, conejo y perro), arteria carótida (rata, cerdo y vaca), vena cava (rata) y vena placentaria (rata y ratón) (Irvin y col., 2014).

El ensayo de anillos aórticos de rata, consiste en embeber segmentos de aorta en una matriz extracelular, generalmente geles de fibrina o colágeno (Nicosia, 2009; Nicosia y col., 1997). El ensayo tiene como ventajas principales que es económico y que se obtiene información a lo largo de un periodo de tiempo relativamente corto, pues se requieren pocos animales para obtener una muestra significativa y se puede dar un seguimiento al desarrollo de nuevos brotes vasculares y capturar imágenes representativas durante la duración del experimento (6 a 12 días). Asimismo, recapitula las cuatro fases de la angiogénesis, por lo que es posible evaluar con

éxito inhibidores de la angiogénesis y analizar los posibles factores moleculares involucrados (Aplin y Nicosia, 2014; Go y col., 2003; Zippel y col., 2016).

Por otro lado, en los modelos *in vivo* se puede estudiar el proceso de angiogénesis completo y su interacción con todos los demás procesos que mantienen el estado del organismo. La mayoría de estos ensayos tiene la finalidad de investigar los efectos de fármacos o nuevos compuestos bioactivos, validar resultados y observaciones de los mecanismos moleculares de la angiogénesis de estudios *in vitro* y/o *ex vivo*. Los estudios *in vivo* son indispensables para el desarrollo de nuevas terapias, en este caso angiogénicas (Irvin y col., 2014).

Dentro de los ensayos *in vivo* más utilizados eficientemente para probar fármacos y agentes biológicos, se encuentran el ensayo de membrana corioalantoidea (CAM) de huevo de gallina; modelo de retinopatía prematura en mamíferos neonatales; ensayo de pez cebra con fluorescencia; modelo de ratón tumoral y ensayos de invasión *in vivo* con matriz de membrana basal (BME) solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (Tahergorabi, y Khazaei, 2012).

Los modelos *in vivo* de invasión poseen la ventaja de llevarse a cabo en un tiempo relativamente corto (~ 9 días), así como de poder realizar la estimación de la respuesta angiogénica de diversos compuestos por medio de técnicas bioquímicas de fluorescencia y conteo directo de los brotes. Usualmente, se implanta una porción de BME bajo la piel del animal a evaluar, la cual puede ir impregnada de la sustancia de interés (Malinda, 2009; Martin y Murray, 2009).

En la literatura científica figuran diversos reportes con algunas modificaciones para optimizar los ensayos *in vivo* con BME, mediante el uso de dispositivos cilíndricos de silicona semicerrados con longitud de 1 cm, conocidos como angio-reactores (Auerbach y col., 2000; Guedez y col., 2003). El ensayo con los angio-reactores tiene la ventaja de delimitar un volumen estable de la muestra, mantener su estructura (direcciona el crecimiento de los vasos sanguíneos) y uso de una menor cantidad de reactivos que en otros ensayos, lo que demuestra que es un modelo

reproducible y cuantitativo; además de que permite recuperar el material contenido en el ensayo para pruebas bioquímicas, celulares o genéticas adicionales. Por otro lado, como desventaja puede haber una inadecuada manipulación del material que cause gelificación prematura del BME o una inapropiada implantación de los dispositivos resultando en variabilidad de los resultados. (Guedez y col., 2003; Seo y col., 2003; Wang y col., 2005).

Los modelos anteriormente mencionados, se han utilizado con fármacos sintéticos y productos naturales. De éstos últimos, se han utilizado extractos de plantas y moléculas derivadas con el fin de elucidar tratamientos pro y anti angiogénicos (Min y col., 2004; Xie y col., 2015; Zihlif y col., 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales se han convertido tradicionalmente en una fuente de tratamiento para padecimientos, sin embargo, en México únicamente el 5% de las plantas medicinales tienen validación científica. *Heliopsis Longipes*, crece en la zona centro de México, conocida por las múltiples actividades biológicas que efectúan sus raíces. Los principales compuestos bioactivos de *H. longipes* son las alcanidas, siendo la afinina la de mayor proporción.

Se ha comprobado que la afinina es capaz de alcanzar la circulación sistémica con relativa facilidad y ejercer un efecto vasodilatador en arterias de rata a través de mecanismos que involucran las vías de señalización de los gasotransmisores. Por lo anterior, resulta de particular interés profundizar en el estudio de los efectos de ésta alcanida en otros procesos biológicos del sistema vascular, como lo es la angiogénesis, la cual comparte vías de señalización paralelas a las involucradas en la regulación del tono vascular. La evaluación farmacológica de fitoquímicos resulta de gran interés, principalmente en las áreas de investigación y desarrollo farmacéutico, debido a que se pueden diseñar formulaciones farmacológicas aplicables en procedimientos terapéuticos relacionados a la cicatrización y tratamiento de heridas.

En la vasculatura, los efectos de las alcanidas y extractos con alto contenido de éstas han sido escasamente estudiados. La investigación de tales efectos farmacológicos representa una línea de investigación novedosa a partir de un recurso natural presente en México.

Así mismo, el impacto de la presente investigación pudiera tener influencia en áreas de desarrollo empresarial y social; pues, se podría establecer un programa multidisciplinario para el aprovechamiento y producción de chilcuague en la zona serrana Queretana, que incluya la participación tanto de agricultores, como profesionistas de diferentes áreas como la farmacéutica, agronómica, botánica, biotecnológica, entre otros.

#### **IV. HIPÓTESIS**

El extracto etanólico enriquecido en afinina y la afinina purificada, obtenidos de raíces de *H. longipes* poseen un efecto angiogénico dependiente de la concentración en modelos *ex vivo* e *in vivo*.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar el efecto angiogénico del extracto etanólico y la afinina purificada, obtenidos de la raíz de *Heliopsis longipes*, en modelo animal *ex vivo* e *in vivo*.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Cuantificar el contenido de afinina, por HPLC, en el extracto etanólico obtenido a partir de raíces de *H. longipes*.
2. Determinar el efecto angiogénico del extracto etanólico y de la afinina purificada de *H. longipes* mediante el ensayo *ex vivo* de anillos aórticos de rata.
3. Evaluar el efecto angiogénico por medio del ensayo directo de angiogénesis *in vivo* del extracto etanólico y la afinina purificada de *H. longipes*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio dividido en dos fases: la obtención y análisis fitoquímico del extracto etanólico y la afinina (Fase 1) y la evaluación farmacológica del efecto angiogénico (Fase 2).

### 6.1 Reactivos y solventes

Los reactivos y solventes empleados en el estudio fitoquímico de las raíces de *H. longipes* fueron adquiridos de JT Baker (Phillisburg, NJ, USA). Para las pruebas farmacológicas, los estándares y reactivos se obtuvieron de Sigma-Adrich (St. Louis, MO, USA). El Directed In Vivo Angiogenesis Assay (DIVAA®) Starter Kit que se usó en la evaluación farmacológica *in vivo*, se compró de Trevigen (Gaithersburg, Md., USA).

### 6.2 Animales

La presente investigación se realizó bajo las directrices de los estándares de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la reproducción, cuidado y uso de los animales del laboratorio (Ochoa, 2001), y así mismo, se aprobó por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro con No. de Registro 10001.

En la evaluación farmacológica en modelo *ex vivo* se emplearon ratas Wistar macho (250-300 g), para el estudio *in vivo* se utilizaron ratones CD-1 hembras (25-30 g). Los animales fueron adquiridos en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, México. Los animales se alojaron en jaulas estándar con temperatura controlada, ciclo luz-oscuridad de 12:12 h y el agua junto con los alimentos se proporcionaron a libre demanda. Se realizó la limpieza de las camas sanitarias durante el alojamiento.

Los desechos de cadáveres (órganos o sus partes, tejidos y líquidos corporales); materiales punzocortantes, jeringas y agujas hipodérmicas, se manejaron y



eliminaron de acuerdo con la Norma NOM-087-ECOL-94, así como a la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, para tal fin se utilizaron bolsas de polietileno color amarillo para los cadáveres por ser residuos patológicos en estado sólido y para residuos con flujo sanguíneo se utilizaron bolsas de polietileno color rojo; todas fueron marcadas con sus respectivas características como lo dicta la Norma. Los desechos no contaminantes o biológicos infecciosos, se destinaron al depósito general de basura (Secretaría de Medio Ambiente, 2003).

### **6.3 Materia vegetal**

Las raíces de *H. longipes* (Asteraceae), fueron obtenidas de un proveedor local e identificadas por comparación con dos especímenes completos ubicados en el herbario Jerzy Rzedowski de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. (*H. longipes* vouchers J.E. Castro R.1. y R.2.).

### **6.4 Fase 1: Preparación del extracto etanólico de *Heliopsis longipes***

Se usaron 700 g de las raíces de *H. longipes*, las cuales se secaron en estufa de convección a una temperatura de 60°C por 12 h y posteriormente se trituraron en un molino (Thomas Wiley 4 Lab Mill, Thomas Scientific, USA), hasta obtener un polvo fino usando una criba de 0.5 mm. Para la preparación del extracto de la raíz, el material molido de la planta (~700 g) se sometió a maceración con etanol absoluto por una semana en ración 1:10 (p/v). Adicionalmente en el transcurso de la extracción las soluciones se sonicaron en un sonicador (Branson 5510, Danbury, CT) durante 15 min en el día cero y tres de la semana. Después de eso, se filtró y se usó roto evaporación a 60°C (BÜCHI R-200, Flawil, Switzerland), como se ha reportado con anterioridad (Castro-Ruiz y col., 2017).

#### **6.4.1 Análisis fitoquímico por métodos cromatográficos**

Se utilizó cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) con fase estática de sílica gel y fase móvil hexano:acetato de etilo (3:2) para comparar e identificar la afinina purificada y el extracto etanólico. La placa de TLC se humedeció con una

solución de anisaldehído/ácido sulfúrico (0.5 mL anisaldehído en 50 mL de ácido acético glacial y 1 mL de ácido sulfúrico al 97%) para revelar la afinina como una mancha color violeta brillante, ya reportada para otras isobutil-amidas olefínicas en un factor de retención (FR) de 0.3 (Bauer y Remiger, 1989).

Subsecuentemente se efectuó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) (Waters 600 Associates, Milford, MA, USA), acoplada a un detector de arreglo de diodos (Waters 2998) (HPLC-PDA); utilizando 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.

#### **6.4.2 Afinina purificada**

La afinina se obtuvo de un stock, que se purificó previamente por el grupo de trabajo. El proceso de purificación fue analizado y cuantificado por métodos cromatográficos de la TLC con el factor de retención y por HPLC (Castro-Ruiz y col., 2017).

### **6.5 Fase 2: Evaluación farmacológica**

#### **6.5.1 Determinación del efecto angiogénico del extracto etanólico y la afinina por el ensayo de anillos aórticos de rata**

Las ratas se sacrificaron por decapitación de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 (Diario Oficial de la Federación, 2001). Posteriormente se extrajo quirúrgicamente la aorta torácica y se lavó el espacio intraluminal aórtico en una caja de Petri con solución Krebs-Henseleit con la siguiente composición (nM): 126.8 NaCl; 5.9 KCl; 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 MgSO<sub>4</sub>; 5.0 D-glucosa; 30 NaHCO<sub>3</sub>; 2.5 CaCl<sub>2</sub> (pH de 7.4) con una temperatura de 4°C, oxigenado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) para evitar la formación de coágulos sin dañar la pared aortica. Se limpió retirando el tejido conectivo y adiposo circulante con tijeras y pinzas finas de disección. Finalmente, se cortaron en delgados anillos de 1 a 2 mm de longitud y se pusieron en hilo de

sutura para un mejor manejo. Los anillos aórticos pasaron por un tren de 6 lavados consecutivos en hielo (4°C) con solución salina balanceada de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés) con la composición (M) de: 0.005 KCl; 0.0004 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.0005 MgCl<sub>2</sub>; 0.0004 MgSO<sub>4</sub>; 0.14 NaCl; 0.0003 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.006 D-Glucosa; 0.001 CaCl<sub>2</sub>; 0.00002 Rojo Fenol. La solución se filtró con membrana de 0.22 micras y se le añadió antibiótico-antimicótico (Penicilina, Estreptomina y Amfotericina) 1X (Nicosia y col., 1997 y Baker y col., 2012).

Los anillos de aorta se colocaron dentro de una campana de flujo laminar para manejarlos en condiciones de esterilidad, en donde pasaron por otros 6 lavados con solución DBSS a 4°C. Mientras los anillos aórticos pasaban por el lavado, se preparó el colágeno tipo 1 de cola de rata de 4 mg/mL (Advanced BioMatrix) usado anteriormente en ensayos de angiogénesis con anillos de aorta de rata (Blacher y col., 2001; Go y col., 2003; Zippel y col., 2016). El colágeno se preparó mezclando 8 volúmenes de colágeno (4 mg/mL); 1 volumen de 10 x DMEM y 1 volumen de H<sub>2</sub>O, obteniendo una concentración final del colágeno de 2 mg/mL. La solución se ajustó a un pH de 7.2 con una décima parte de solución neutralizadora, que al mezclarlo cambió a un color rosado. En todo momento se trabajó con material y soluciones sobre hielo para mantener una temperatura de 4°C para evitar polimerización prematura del colágeno.

En una microplaca de 96 pozos estéril, se añadieron 100 µL de colágeno y un anillo aórtico por pozo, se cultivaron 6 anillos aórticos por grupo. Posteriormente, se incubó la microplaca en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos para que el colágeno se solidificara. Transcurrido el tiempo, los anillos aórticos se suplementaron con 150 µL de los tratamientos previamente preparados de la siguiente manera: se utilizó medio de cultivo Opti-MEM con suero fetal bovino (SFB) 2.5% y 1% de anti-anti con ausencia (control negativo) o presencia de FGF a una concentración final de 30 ng/mL para el grupo control positivo (Baker y col., 2012); o suplementados con concentraciones del EEHL o de la afinina de 1, 10 o 100

$\mu\text{g/mL}$ . Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) por cada 2  $\mu\text{g}$  de muestra para su dilución y preparación de los tratamientos.

Los anillos aórticos se incubaron a 37 °C en condiciones de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Así mismo, se les cambió el medio cada segundo día, extrayendo 130  $\mu\text{L}$  y suplementando con 140  $\mu\text{L}$  del respectivo tratamiento según el grupo experimental. Durante este periodo se obtuvieron imágenes digitales con objetivo 4x cada día por medio de una cámara digital acoplada a un microscopio digital VE-BC3 PLUS (Velab, Co; USA) con ayuda del software IS Capture 3.6.8 (ISCapture.ink). Las imágenes del día 10 se cuantificaron con el programa Image-Pro Plus versión 5.1.2.59 para Windows XP (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD), obteniendo la cantidad de nuevos vasos sanguíneos (número de objetos en la periferia del anillo aórtico) y el área de invasión por nuevos brotes sanguíneos ( $\mu\text{m}^2$ ) por imagen de muestra (6 muestras por grupo). Los procedimientos de este ensayo se encuentran representados en un diagrama en el Anexo 1.

En el día 10, los anillos aórticos se lavaron 2 veces con PBS 1X por 5 min, se fijaron con 100  $\mu\text{L}$ /pozo de formalina al 4% por 30 min a temperatura ambiente, se volvieron a lavar con PBS 1X, para posteriormente permeabilizarse con 0.5% de Tritón X-100 por 30 min (37°C) en agitación mecánica con un agitador de hibridación a 10 rev/min (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Transcurrido el tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS 1X; después se marcaron con el fluoróforo FITC-Lectin (50  $\mu\text{g/mL}$ ) y la placa se dejó incubando durante la noche a 4°C. El día posterior, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y los anillos aórticos se montaron sobre portaobjetos con cubreobjetos. Las imágenes de escaneo laser confocal se capturaron utilizando un microscopio invertido con sistema confocal de escaneo láser Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

### **6.5.2 Ensayo directo de angiogénesis *in vivo* (EDAIV)**

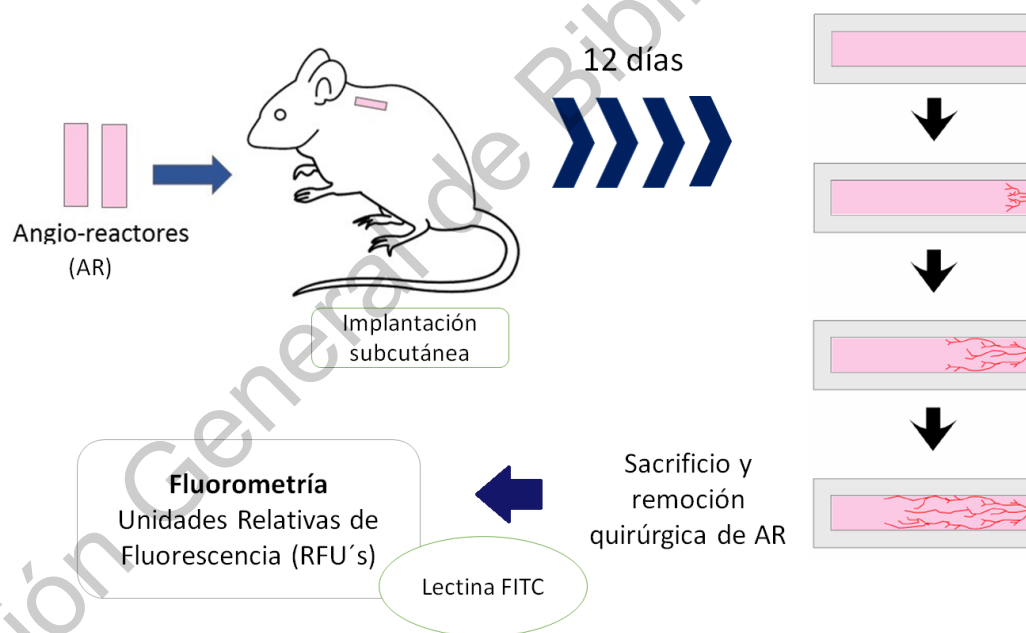
El EDAIV (en inglés DIVAA, por sus siglas, Direct *In Vivo* Angiogenesis Assay), se llevó a cabo como ha sido descrito anteriormente (Guedez y col., 2003). Se utilizó

el kit DIVAA, que incluía “angiorreactores” (AR), dispositivos cilíndricos estériles con medidas de 1 cm de longitud, 3 mm de ancho y 0.15 cm de diámetro interno. Dentro de condiciones de esterilidad dentro de una campana laminar y trabajando con los reactivos y material a 4°C, los AR se llenaron con 25  $\mu$ L que contenían el factor de crecimiento reducido de matriz de la membrana basal (BME); mezclado con PBS 1X (control negativo); o con el VEGF (3 ng/ $\mu$ L), el bFGF (9 ng/ $\mu$ L) y heparina (control positivo). En cambio, para los tratamientos, los AR contenían las especificaciones del grupo control positivo junto con el EEHL o la afinina, probados en diferentes concentraciones de 1, 10, 50 o 100  $\mu$ g/mL.

Para la polimerización del BME, los AR se incubaron a 37°C durante 1 h para pasar a ser implantados en los ratones CD-1, previamente anestesiados con fármacos vía intramuscular (Xilacina/Zoletil 50). Se mantuvo una zona inocua en el área cervical posterior donde se colocó el implante subcutáneamente, utilizando de uno a dos puntos de sutura. Después del procedimiento de implantación, los animales se mantuvieron en observación, prestando atención en signos de dolor (acialamiento, actividad, comezón, apetito) y monitoreo de sanación de la herida. Después de un periodo de mantenimiento de 12 días, los animales se sacrificaron, se anestesiaron con isoflurano 2% y se les realizó dislocación cervical. Los AR se extrajeron cortando cuidadosamente alrededor del dispositivo para cortar cualquier vaso sanguíneo que estuviera creciendo en él, como se muestra en la Figura 7. Se depositaron en microtubos de centrífuga para su traslado y, posteriormente en una caja de Petri estéril, se fotografiaron y se observaron en microscopio invertido (Zeiss, Axio Vert. A1, Germany) con un objetivo de 4x.

Posteriormente, se expulsó el BME fuera del AR a un microtubo de centrífuga y se agregaron 300  $\mu$ L de solución dispasa para el proceso de digestión y se incubó durante tres horas a 37°C. Después de la digestión, la mezcla de incubación se llevó a centrifugación por 5 min a 1700 RPM) a temperatura ambiente en una centrífuga (Allegra 21R - Beckman Coulter, Fullerton, California), se extrajo el sobrenadante y se suspendió el pellet en medio DMEM con 10% SFB durante una hora y se llevó a

centrifugación (5 min a 1800 RPM), para pasar por tres lavados de un Buffer de lavado (DIVAA Wash Buffer). El producto de la digestión se marcó con el fluoróforo de isolectina-B4 conjugada con isotiocinato de fluoresceína (FITC) y las muestras se colocaron en una placa de 96 pozos. El día posterior a la digestión y marcaje con el fluoróforo, se determinó la fluorescencia de cada muestra mediante lectura de multimodo por espectrofluorimetría (Varioskan™ Flash, Thermo Scientific™, USA) en un Software lector de microplacas (Thermo Scientific™, SkanIt™, USA) con parámetros de 485 nm de excitación y 510 nm de emisión; se estimó la cantidad en el número de células endoteliales formadas y se interpretaron como Unidades Relativas de Fluorescencia (URF's).



**Figura 7.** Diagrama del Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo* en ratones CD-1.

## 6.6 Análisis estadístico

En el ensayo de aorta aislada de rata se utilizaron tres ratas diferentes por cada grupo experimental y se realizó por triplicado (n= 9) y para el EDAIV las diferentes

concentraciones de las sustancias probadas se llevaron a cabo en 4 ratones diferentes (n= 4).

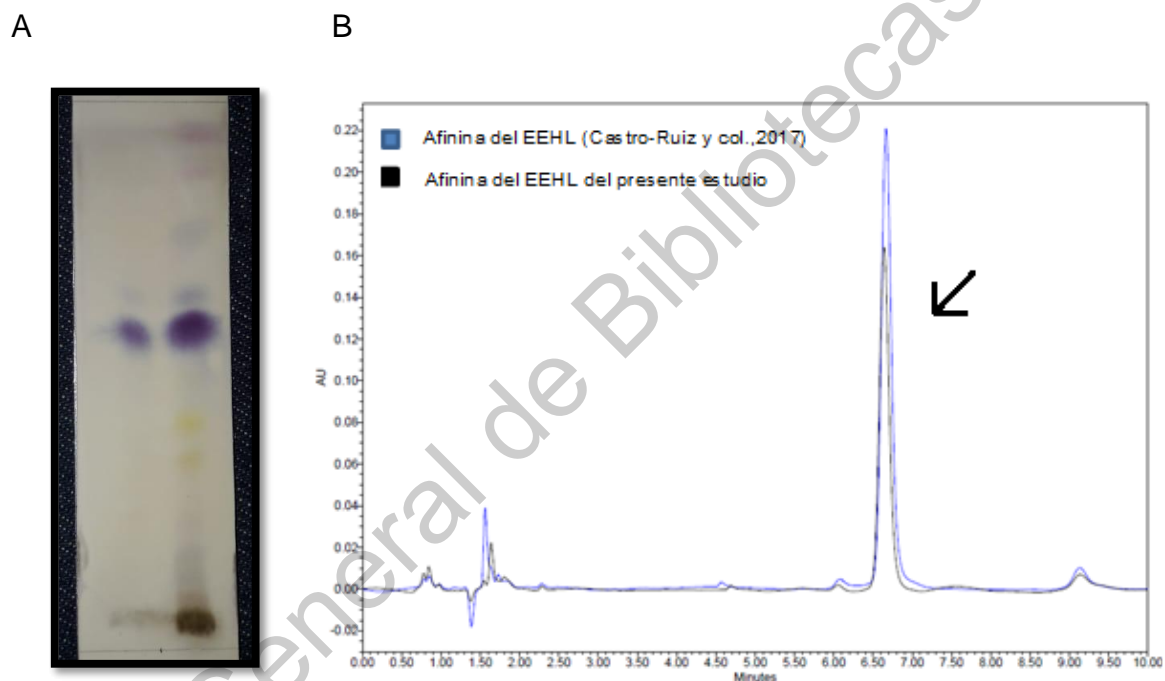
Todos los valores se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y se analizaron por el software estadístico GraphPad Prism versión 6.01 (San Diego, CA, USA) mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de *post hoc* de Tukey para evaluar diferencia significativa entre las medias del grupo control con los experimentales. Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y los valores de  $p < 0.05$  se consideraron como significativos.

Dirección General de Bibliotecas UNO

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Fase 1: Preparación del extracto etanólico y análisis fitoquímico

El rendimiento del extracto etanólico fue de 54.7 g/kg, resultando en una optimización del método de extracción. El análisis por cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) corroboró que el extracto etanólico contiene como metabolito principal la afinina (Figura 8).



**Figura 8.** Análisis cromatográfico del extracto etanólico de *H. longipes* (EEHL) y de la afinina. **(A)** Cromatografía de capa fina (TLC), se muestra la afinina (primer carril de izquierda a derecha), comparada con el extracto etanólico de EEHL (segundo carril de izquierda a derecha). **(B)** Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en presencia de la afinina (marcada con una flecha).

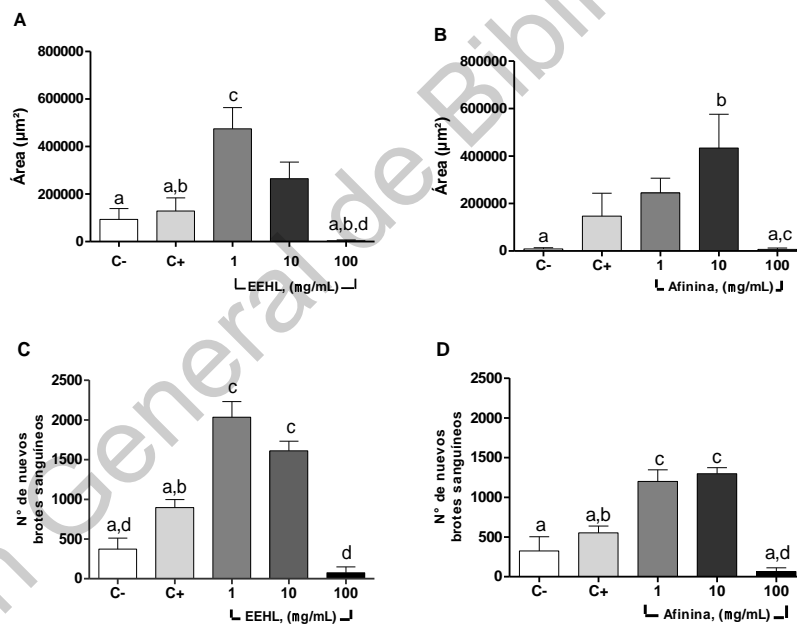
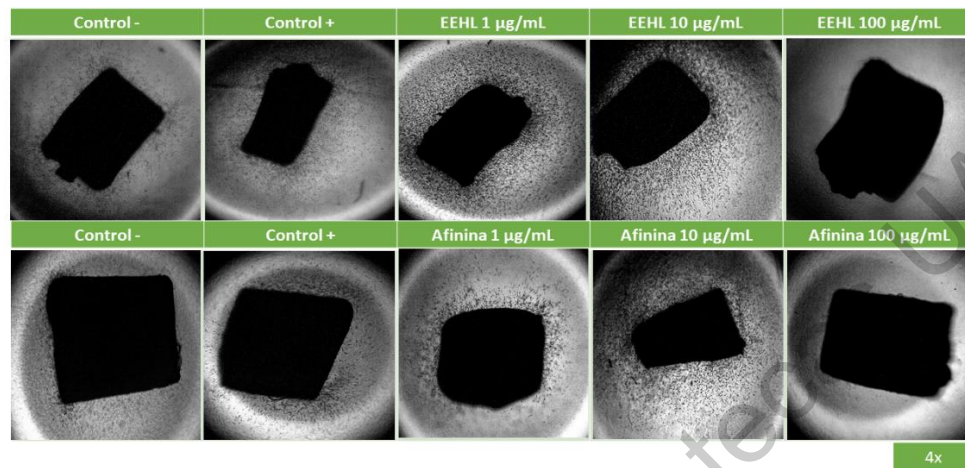


## 7.2 Fase 2: Evaluación farmacológica

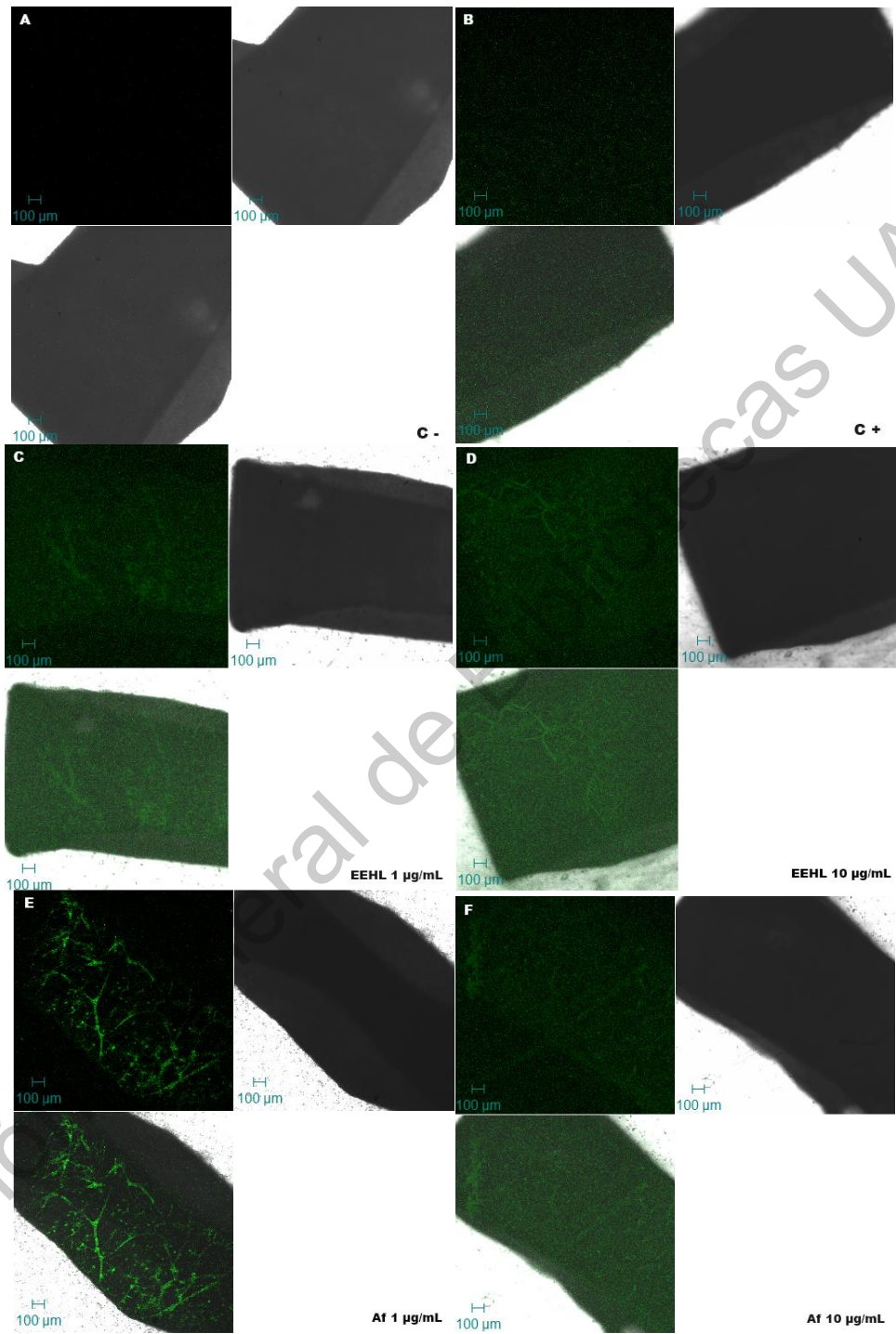
### 7.2.1 Efecto angiogénico del extracto etanólico de *H. longipes* y de la afinina en anillos aórticos de rata

El extracto etanólico de *H. longipes* (EEHL), al igual que la afinina, provocaron la formación de nuevos vasos sanguíneos en anillos aórticos de rata. En la Figura 9, se muestra el efecto angiogénico cuantificado por invasión en área ( $\mu\text{m}^2$ ) y número de los nuevos brotes, en donde el EEHL tuvo su mayor efecto con la concentración probada en 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en área y en número de nuevos brotes, en comparación con los controles. Por su parte, la concentración con mayor efecto angiogénico de la afinina fue de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en área y en número de nuevos brotes, en comparación con los controles. Se destaca que en concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se inhibió el efecto casi en su totalidad para ambas sustancias probadas.

La tinción con fluorescencia fue necesaria para obtener una mayor información de la formación de los nuevos vasos sanguíneos. Las células endoteliales de los anillos aórticos se marcaron con el FICT-Lectin (verde) como se muestra en la Figura 10, usando microscopía confocal. El EEHL y la afinina mostraron tener presencia de células endoteliales en concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en comparación con el control negativo; incluso se observó mayor fluorescencia de las sustancias probadas que en el control positivo con FGFb (30 ng/mL).



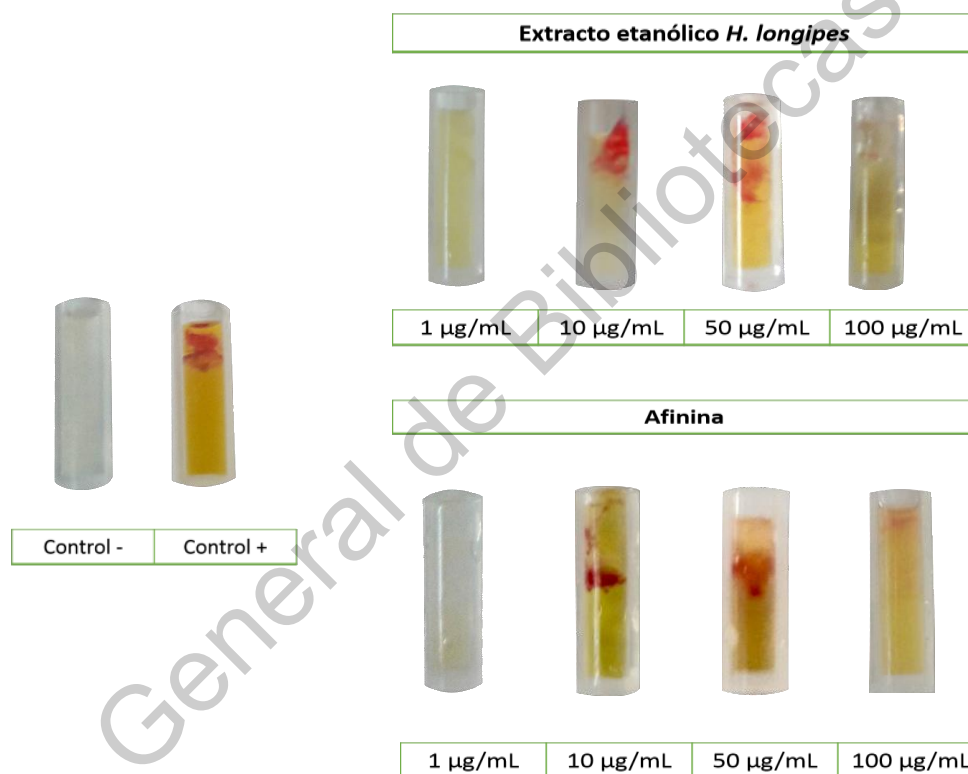
**Figura 9.** Cuantificación del efecto angiogénico del EEHL y de la afinina en ensayo de aorta aislada de rata. Arriba: Microfotografías representativas del efecto angiogénico de EEHL y afinina sobre aorta aislada de rata. Abajo: el efecto angiogénico se cuantificó por el área ( $\mu\text{m}^2$ ) invadida (A y B) y el número (C y D) de nuevos brotes sanguíneos para las sustancias probadas. Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) ( $n=9$ ). Las letras sobre las barras representan diferencia estadísticamente significativa,  $p < 0.05$ . C-, control negativo; C+, control positivo.



**Figura 10.** Presencia de células endoteliales por efecto angiogénico del EEHL y la afinina en anillos aórticos de rata.

### 7.2.2 Efecto angiogénico del extracto etanólico de *H. longipes* y de la afinina en el ensayo directo de angiogénesis *in vivo* (EDAIV)

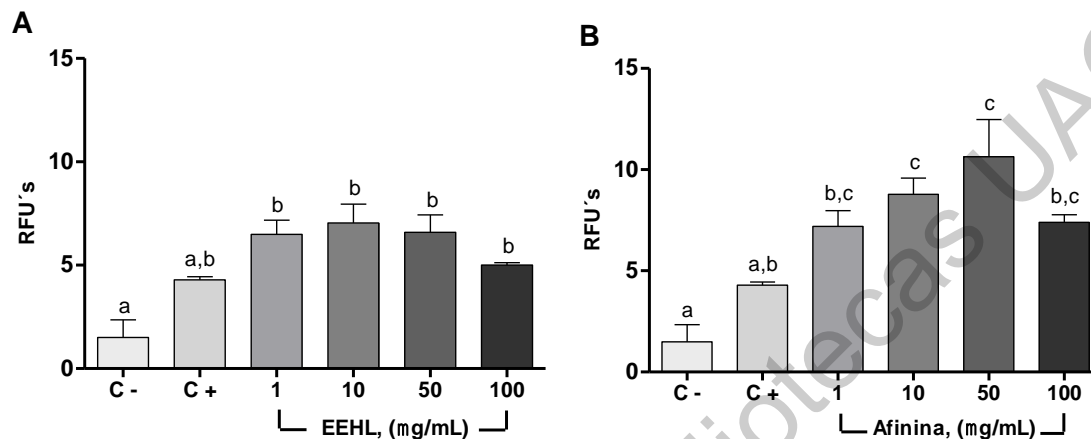
Durante el desarrollo del ensayo, ningún animal falleció ni mostró signos de toxicidad. Se observó una respuesta biológica en los AR, después de su extracción, de las sustancias probadas dependiendo de la concentración en comparación con los controles (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto angiogénico del EEHL y de la afinina. Angio-reactores obtenidos del ensayo directo de angiogénesis *in vivo* (EDAIV). Se muestra el control negativo (-), positivo con VEGF y bFGF (+) y las concentraciones examinadas del A. EEHL y B. de la afinina.

El EEHL y la afinina produjeron un efecto angiogénico dependiente de la concentración mostrado en la Figura 12. El EEHL mostró un mayor efecto significativo en la concentración de 10 µg/mL ( $7.048 \pm 0.9133$ ) en comparación al control negativo y la afinina en 50 µg/mL ( $10.63 \pm 1.839$ ) en contraste a los grupos

control. Sin embargo, el efecto disminuyó para las concentraciones probadas de 100 µg/mL en ambas sustancias probadas.



**Figura 12.** Cuantificación del efecto angiogénico del EEHL y de la afinina del EDAIV. El efecto angiogénico se estimó en homogenados de los angio-reactores mediante fluorimetría en presencia o ausencia del EEHL (A) y de la afinina (B). Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM)  $n = 4$ . Las letras sobre las barras representan diferencia estadísticamente significativa,  $p < 0.05$ . C-, control negativo; C+, control positivo; RFU's, unidades relativas de fluorescencia.

## VIII. DISCUSIÓN

*Heliopsis longipes* pertenece a la familia Asteraceae, con amplia distribución y considerada la familia de plantas con flores más grande del mundo, conocida por su importancia etnofarmacológica; siendo de relevante que algunas de las especies pertenecientes a esta familia se emplean de manera tradicional para el tratamiento de heridas, debido a sus efectos directos sobre la curación y en algunos casos debido a sus acciones antiinflamatorias por medio de diferentes productos derivados de las especies (compuestos aislados, aceites y extractos) son efectivos en los modelos de curación de heridas *in vitro* e *in vivo* (Carvalho y col., 2018). Se ha identificado que principales compuestos bioactivos purificados, la silibinina (*S. marianum*) y la jaceosidina (*A. princeps*), como compuestos prometedores para curar heridas. Así mismo, extractos de *Blumea balsamífera* y *Calendula officinalis* han demostrado la regeneración capilar, mejora en deposición de colágeno y angiogénesis en modelo *in vivo* e *in vitro* respectivamente (Carvalho y col., 2018). En 2016, Yamane y col., encontraron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Acmella oleracea*, mostró tener una actividad de cicatrización de herida en ratas asociado a un incremento en los niveles de deposición de colágeno y se detectó a la afinina en el extracto. Por otro lado, en extractos de *Echinacea Purpure* con alto contenido de alcaloides, se ha reportado una disminución de concentraciones de VEGF y bFGF a comparación *in vivo* con el control en ratonas preñadas, lo cual puede interferir con la angiogénesis embrional (Barcz y col., 2007), e *in vitro* en células tumorales de sarcoma L1 (Wasiutyński y col., 2009).

El presente trabajo tuvo la finalidad de optimizar la producción del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* (EEHL) y así mismo estudiar por primera vez su efecto angiogénico, junto con su compuesto bioactivo mayoritario (la afinina) en modelo animal. La fase de preparación del extracto fue realizada por método de maceración y sonicación. Recientemente, la aplicación de la sonicación ha ido en aumento para la extracción de materia vegetal, con base a su fundamento de uso de fuentes de ultrasonido de baja frecuencia (20-40 kHz), cuyas ondas ultrasónicas inducen

presión y cavitación con la interrupción de las paredes celulares y con esto facilita la liberación de los componentes de interés (Chemat y col., 2017; Giacometti y col., 2018).

En el presente trabajo se obtuvieron 36.8 g del EEHL (54.7 g/Kg), resultando en un rendimiento mayor de 3.2 veces que en un estudio anterior realizado por el mismo grupo de trabajo (17 g/Kg) (Castro-Ruiz y col., 2017). Así mismo, se logró una optimización de extracción en comparación a otros estudios que reportaron la obtención del EEHL por método de maceración (Arriaga-Alba y col., 2013; Cilia-López y col., 2010). Para un mayor rendimiento de extracción de compuestos bioactivos se han considerado que los factores que más influyen son la selección adecuada del solvente (afecta en la efectividad de la cavitación), el tiempo y la temperatura de sonicación para obtener una efectiva desintegración de la estructura de la pared celular vegetal que es difícil de degradar usando sólo el método de maceración (Giacometti y col., 2018; Hromádková y Ebringerová, 2003). Actualmente, existe evidencia de que el tratamiento con sonicación aumenta significativamente niveles de polifenoles y antioxidantes en extracto de brotes de *M. edule* (Falleh y col., 2012); aumento en las concentraciones de proteína y propiedades funcionales de un extracto sonicado de hojas de *Diplazium esculentum* (Saha y Deka, 2015); optimización de la extracción de compuestos fenólicos principales de extractos de las hojas de olivo con ultrasonificación (Giacometti y col., 2018); aumento en el potencial en extracción asistida por ultrasonido de polisacáridos industrialmente importantes de diferentes tejidos de materiales vegetales (Hromádková y Ebringerová, 2003); e incluso se ha utilizado en frutos, como alto potencial para aplicaciones industriales, ya que en un estudio incrementó significativamente la extracción de varios antioxidantes en el extracto metanólico del fruto de carambola en comparación al extracto acuoso con y sin sonicación (Annegowda y col., 2012).

Para evaluar la presencia y cantidad del compuesto bioactivo mayoritario de nuestro interés en el EEHL, se le realizó un análisis fitoquímico en donde se utilizó TLC para

identificar la presencia de afinina purificada utilizada en la fase farmacológica presente en el EEHL con sonicación por medio del parámetro de factor de retención (FR) de 0.3 (hexano; acetato de etilo 3:2) como ya se ha reportado previamente en otro estudio de la afinina obtenida de *H. longipes* (Castro-Ruiz y col., 2017) y otras isobutilamidas olefinicas (Bauer y col., 1989). Así mismo, el EEHL de la presente investigación, en el que se utilizó maceración y sonicación y el EEHL obtenido por el grupo de trabajo (Castro-Ruiz y col., 2017) se analizaron por HPLC. Se identificó la afinina con un tiempo de retención de 6.54 min para ambas muestras y se cuantificó por unidades de absorbancia (AU) resultando que el EEHL con sólo maceración mostró tener una cantidad mayoritaria de afinina (0.22 AU) que el EEHL con sonicación (0.165 AU); sin embargo, la absorbancia del EEHL del presente trabajo no fue despreciable, sobre todo si se obtiene un considerable rendimiento de 300% (Castro-Ruiz y col., 2017). En 2012, Singh y Chaturvedi realizaron un análisis cromatográfico de HPLC de cultivos *in vitro* de células y tejidos de *Spilanthes acmella* Murr., se identificó la afinina con un tiempo de retención de 7.5 minutos; valor muy cercano a la afinina utilizada para la presente investigación.

En los últimos años, la investigación acerca de las raíces de *Heliopsis longipes* ha ido en aumento desde su uso tradicional para fines culinarios y medicinales. Actualmente, diferentes grupos de investigación han demostrado por medio de estudios los diferentes efectos biológicos y farmacológicos que producen los extractos orgánicos de las raíces de *H. longipes* y la afinina, como su compuesto bioactivo mayoritario (Acosta-Madrid y col, 2009; Cariño-Cortes y col., 2010; Cilia-López y col., 2010; de la Rosa-Lugo y col., 2017; Déciga-Campos y col., 2012; Déciga-Campos y col., 2010; Hernández y col., 2009a; Hernández y col., 2009b; Hernández-Morales y col., 2015; Ogura y col., 1982; Molina-Torres y col., 1999; Molina-Torres y col., 2004; Rios y col., 2007).

En 2017, Castro-Ruiz y col. brindaron nueva evidencia de que tanto la afinina como extractos de las raíces de *H. longipes*, son capaces de inducir vasodilatación por mecanismos moleculares que involucran la activación de GTs como el óxido nítrico



(ON), sulfuro de hidrogeno ( $H_2S$ ) y el monóxido de carbono (CO). Este descubrimiento abrió la brecha a la investigación de la influencia de estas sustancias bioactivas en el sistema vascular, sin embargo, no hay estudios enfocados en el efecto angiogénico de estos compuestos bioactivos.

Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez que el extracto etanólico de *H. longipes* (EEHL) y la afinina producen un efecto angiogénico significativo en modelo *ex vivo* de aorta aislada de rata (1  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente) y en el ensayo directo de angiogénesis *in vivo* (10  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ ), en base a esta evidencia, se sugiere a la afinina como la alcalamida responsable del efecto angiogénico. Previamente, un estudio en base a observación de un ensayo *ex vivo* en aorta aislada de rata reveló un comportamiento similar de una invasión vascular del EEHL y de la afinina dependiente de la concentración (1-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) el cual se inhibió en 1000  $\mu\text{g/mL}$  para ambas sustancias probadas (Castro-Ruiz, 2016). Así mismo, este fenómeno se ha evidenciado en el efecto angiogénico de N-araquidiletanolamina o anandamida, compuesto químico endógeno que forma parte de una misma clase de los endocannabinoides, a su vez relacionado estructuralmente a las alcalamidas (Hofmann y col., 2014, Picardi y col., 2014; Pisanti y col., 2007). Relacionado a lo anterior, se ha evidenciado que la anandamida produce un potente efecto vasodilatador a través de mecanismos que incluyen la activación de canales de receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) y receptores cannabinoides que activan la ruta NO / cGMP (Herradón y col., 2007), la cual también está involucrada en el efecto angiogénico. Se sugiere que, por la similitud estructural, la afinina pueda interactuar con los canales TRP y receptores cannabinoides, el estudio sigue en vías de exploración para confirmarlo.

Ningún animal murió ni se observó toxicidad en ninguno de los dos modelos con las concentraciones utilizadas del EEHL y de la afinina, demostrando la seguridad para obtener un efecto angiogénico. Previamente se tomó en consideración la  $DL_{50}$  reportada de la afinina (113 mg/kg *p.o.*), y del EEHL (62 mg/kg *p.o.*) (Déciga-Campos y col., 2012). La  $LD_{50}$  es mayor en comparación con la dosis y

concentraciones usadas en estudios previos para obtener efectos biológicos (Cariño-Cortés y col., 2010; Déciga-Campos y col., 2010; Molina-Torres y García, 2001; Ogura y col., 1982). La afinina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en concentración de 4 mg/mL *i.v.* en ratones sin mostrar toxicidad (Verlyser y col., 2016). Estudios han demostrado que la afinina no es citotóxica ni genotóxica (Gerbino y col., 2016; Wu y col., 2008). Por otro lado, recientemente se demostró que la afinina tienen efecto citotóxico ante células cancerígenas K-562 (IC<sub>50</sub>= 39 µg/mL), MCF-7 (IC<sub>50</sub>= 42 µg/mL) y HeLa (IC<sub>50</sub>= 64 µg/mL) (Willig y col., 2019).

Resultados de modelos experimentales (celular y en ensayo de anillos aórticos aislados de rata) han demostrado una interacción entre el H<sub>2</sub>S y NO en el sistema vascular (vasodilatación dependiente de endotelio y angiogénesis); existiendo un requerimiento mutuo de estos mediadores que convergen a nivel de cGMP intracelular y la activación de PKG (Coletta y col., 2012). Así mismo, hay ensayos *in vitro* y *ex vivo* en los cuales el efecto angiogénico inducido por VEGF y FGFb se disminuyó con inhibidores farmacológicos de la enzima eNOS (Bir y col., 2012) y en modelo *in vivo* (Coletta y col., 2012).

Actualmente está reportado el efecto vasodilatador de extractos orgánicos (acetato de etilo, cloroformo, hexano y metanol) de partes aéreas de *Acmella oleracea*, en modelo de anillos de aorta de rata, atribuyendo el efecto a triterpenos, compuestos fenólicos, alcoholes grasos o ésteres presentes en los extractos. Aunado a lo anterior, usando inhibidores moleculares de ON (L-NAME, 1µM) y de la PG<sub>I2</sub> (INDO, 1µM) en el ensayo, sugirió la participación de estas vías moleculares (Wongsawatkul y col., 2008). En 2017, se publicó la actividad vasodilatadora del extracto de diclorometano (extracto más potente, EC<sub>50</sub>= 76.99 ± 1.14 µg/mL) y del extracto etanólico (EC<sub>50</sub>= 140.5 ± 1.16 µg/mL) de *H. longipes*, y de la afinina (EC<sub>50</sub>= 27.38 ± 1.20 µg/mL) como molécula bioactiva más potente que ambos extractos por lo que se le atribuyó ser la posible responsable del efecto en anillos de aorta aislada de rata. Así mismo, se demostró que la afinina tiene la capacidad de activar las vías

de señalización de los GTs y de la prostaciclina; se destaca su interacción en las vías de ON/GMP<sub>c</sub> y PGI<sub>2</sub>/AMP<sub>c</sub>; además de que también se reportaron las vías de H<sub>2</sub>S/KATP y CO/GMP<sub>c</sub>. Dentro del mecanismo molecular del efecto angiogénico, se sugiere la activación de la vía de señalización del ON, por su participación y de otros GTs en el efecto vasodilatador de la afinina (Castro-Ruiz y col., 2017). Además, de la evidencia de la participación central de los GTs en la angiogénesis (Eberhardt y col., 2014, Coletta y col., 2012), sin embargo, hace falta evidencia experimental para confirmarlo. En el presente trabajo, no se estudiaron los mecanismos de acción de la afinina para el efecto angiogénico por limitaciones de tiempo, sin embargo, el estudio está en vías de exploración de la participación de los transmisores gaseosos, canales iónicos y receptores cannabinoides

Sería de interés dilucidar si el efecto angiogénico está presente en otras alcanidas similares a la afinina, como la pellitorina (*A. pyrethrum*) por su similitud estructural con la afinina (Cilia-López y col., 2010), así como el grupo de trabajo pretende evaluar el efecto angiogénico de otras alcanidas presentes en extractos de *H. longipes*.

El presente trabajo de tesis contribuye al estudio de *H. longipes* y la afinina en el sistema vascular, siendo el primer reporte que evalúa el EEHL y la afinina con efecto angiogénico, con una evidencia experimental *ex vivo* e *in vivo* la cual sugiere que el efecto es producido por la afinina que representa un prototipo estructural muy prometedor para la síntesis de moléculas con actividad angiogénica para el tratamiento de cicatrización o enfermedades cardiovasculares.

## IX. CONCLUSIONES

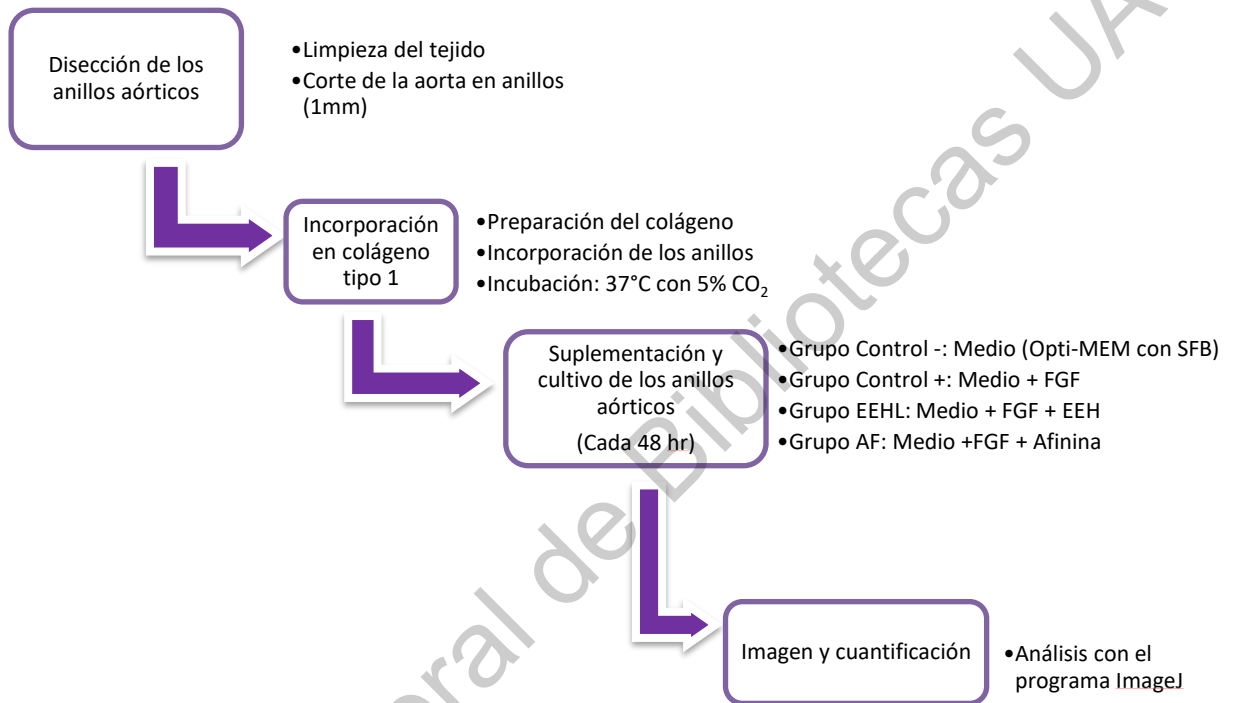
El rendimiento del extracto etanólico de *H. longipes* se optimizó con el proceso de sonicación, y se obtuvo un extracto con alto contenido de afinina.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo demuestran que el extracto etanólico y la afinina de las raíces de *H. longipes* poseen un efecto angiogénico dependiente de la concentración en modelos *ex vivo* e *in vivo*, con una mayor proliferación de nuevos brotes sanguíneos en concentraciones de 10 y 50 µg/mL. Por el contrario, en concentraciones mayores a 100 µg/mL se obtiene una inhibición de la angiogénesis.

La afinina, por ser un compuesto bioactivo capaz de atravesar mucosa y piel con relativa facilidad, llegar al torrente sanguíneo y cruzar la barrera hematoencefálica para interactuar con el sistema nervioso central y producir los efectos farmacológicos; se le ha destacado su potencial farmacológico. Los resultados obtenidos confirman el uso de las raíces de *H. longipes* en la medicina tradicional como anti ulcerativo y cicatrización de heridas, al igual que da pauta para continuar la línea de investigación de estos compuestos bioactivos sobre el sistema vascular, siendo parte de indicios de resultados prometedores para el aprovechamiento y producción de esta planta Queretana con una participación multidisciplinaria.

## ANEXO 1

Diagrama de la metodología del ensayo de anillos aórticos de rata.



## X. LITERATURA CITADA

Acosta-Madrid, I. I., Castañeda-Hernández, G., Cilia-López, V. G., Cariño-Cortés, R., Pérez-Hernández, N., Fernández-Martínez, E., & Ortiz, M. I. (2009). Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 16(4), 336–341. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.014

Acree, F., Jacobson, M., Haller y H.L. (1945a). An amide possessing insecticidal properties from the roots of *Erigeron affinis* D. C. *Journal of Organic Chemistry*, 10(3), 236–242. doi:10.1021/jo01179a014

Acree, F., Jacobson, M., Haller y H.L. (1945b). The structure of affinin, the insecticidal amide from *Erigeron affinis* D. C. *Journal of Organic Chemistry*, 10(5), 449–451. doi:10.1021/jo01181a010

Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A., y Mansor, S. M. (2012). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *Journal of food science and technology*, 49(4), 510–514. doi:10.1007/s13197-011-0435-8

Aplin, A. C., y Nicosia, R. F. (2014). The rat aortic ring model of angiogenesis. In *Vascular Morphogenesis: Methods and Protocols* (pp. 255–264). doi: 10.1007/978-1-4939-1462-3\_16

Arriaga-Alba, M., Rios, M. Y. y Déciga-Campos, M. (2013). Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. *Pharmaceutical Biology*, 51(8), 1035–1039. doi: 10.3109/13880209.2013.775161

Auerbach, R., Akhtar, N., Lewis, R. L., & Shinnars, B. L. (2000). Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer and Metastasis Reviews*, 19(1-2), 167-172. doi: 10.1023/a:1026574416001

Baker, M., Robinson, S., Lechertier, T., Barber, P., Tavora, B., D' Amico, G., Jones, D., Vojnovic, B. y Hodival, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature Protocols*, 7(1), 89-97. doi: 10.1038/nprot.2011.435

Bauer R. y Remiger P. (1989). TLC and HPLC Analysis of Alkamides in *Echinacea* Drugs<sup>1,2</sup>. *Planta Medica*, 55, 367–371. doi: 10.1055/s-2006-962030.

Barcz, E., Sommer, E., Nartowska, J. y col. (2007). Influence of *Echinacea purpurea* intake during pregnancy on fetal growth and tissue angiogenic activity. *Folia Histochem Cytobiol.* 45(Suppl 1):35–39.

Bir, S. C., Xiong, Y., Kevil, C. G., y Luo, J. (2012). Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovascular Research*, 95(1), 7–18. doi: 10.1093/cvr/cvs143

Blacher, S., Devy, L., Burbridge, M. F., Roland, G., Tucker, G., Noël, A., y Foidart, J. M. (2001). Improved quantification of angiogenesis in the rat aortic ring assay. *Angiogenesis*, 4(2), 133–142. doi: 10.1023/A:1012251229631

Boonen, J., Baert, B., Burvenich, C., Blondeel, P., De Saeger, S., y De Spiegeleer, B. (2010a). LC–MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 243–249. doi: doi: 10.1016/j.jpba.2010.02.010

Boonen, J., Baert, B., Roche, N., Burvenich, C., y De Spiegeleer, B. (2010b). Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 77–84. doi:10.1016/j.jep.2009.09.046

Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J., Veryser, L., De Tré, G., y De Spiegeleer, B. (2012). Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 563–590. doi: 10.1016/j.jep.2012.05.038

Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J. A., Ortiz, M. I., Sánchez-Gutiérrez, M., García-Reyna, P. B., Cilia-López, V. G., ... Ponce-Monter, H. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 216–221. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.037

Carvalho, A. R., Jr, Diniz, R. M., Suarez, M., Figueiredo, C., Zigmignan, A., Grisotto, M., ... da Silva, L. (2018). Use of Some Asteraceae Plants for the Treatment of Wounds: From Ethnopharmacological Studies to Scientific Evidences. *Frontiers in pharmacology*, 9, 784. doi:10.3389/fphar.2018.00784

Castro-Ruiz, J.E. (2016). El chilcuague (*Heliopsis longipes*), una planta Queretana y el efecto angiogénico de sus extractos y de la afinina sobre aorta de rata. Proyecto FOPER-2016.

Castro-Ruiz, J. E., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F. J., Rivero-Cruz, F., García-Gasca, T., & Ibarra-Alvarado, C. (2017). Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis longipes*, Induces Vasodilation via Activation of Gasotransmitters and Prostacyclin Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 218-233. doi:10.3390/ijms18010218

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A-S. y AbertVian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* ;34:540–60. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

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

Cilia-López, V. G., Aguirre-Rivera, J. R., Espinosa-Reyes, G., Flores-Cano, J. A., Reyes-Agüero, J. A., & Juárez-Flores, B. I. (2014). Distribution of *Heliopsis longipes*



(Heliantheae: Asteraceae), an endemic resource from central-mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XX(1), 47–54. doi: 10.5154/r.rchscfa.2013.05.015

Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Modis, K., Panopoulos, P., ... Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 9161–9166. doi: 10.1073/pnas.1202916109

Correa, J., Roquet, S. y Díaz, E. (1971). Multiple NMR analysis of the affinin. *Organic Magnetic Resonance*, 3(1), 1-5. doi:10.1002/mrc.1270030102

Crombie, L. y Krasinski, A.H.A. (1962). Synthesis of *N*-isoButyldeca-*trans*-2,*cis*-6,*trans*-8 and - *trans*-2,*cis*-6,*cis*-8-trienamide. *Chemistry and Industry*. 983-984.

Crombie, L., Krasinski, A. H. A., y Manzoor-i-Khuda, M. (1963). Amides of vegetable origin. Part X. The stereochemistry and synthesis of affinin. *Journal of the Chemical Society*, 4970-4976. doi:10.1039/jr9630004970

de la Rosa-Lugo, V., Acevedo-Quiroz, M., Déciga-Campos, M., & Rios, M. Y (2017). Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(7), 884–895. doi: 10.1111/jphp.12721

Déciga-Campos, M., Arriaga-Alba, M., Ventura-Martínez, R., Aguilar-Guadarrama, B., & Rios, M. Y. (2012). Pharmacological and Toxicological Profile of Extract from *Heliopsis longipes* and Affinin. *Drug Development Research*, 73(3), 130-137. doi: 10.1002/ddr.21002

Déciga-Campos, M., Rios, M. Y., & Aguilar-Guadarrama, A. B. (2010). Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Medica*, 76(7), 665–670. doi: 10.1055/s-0029-1240658

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. Obtenido de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>

Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., y col (2014). H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun*, 5, 4281.

Falleh, H., Ksouri, E., Lucchesi, M. -E., Adbelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243-249. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v11i2.10>

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1(1), 27–30. doi: 10.1038/nm0195-27

Freedman, S. B., y Isner, J. M. (2001). Therapeutic Angiogenesis for Ischemic Cardiovascular Disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(3), 379–393. doi: 10.1006/jmcc.2000.1329

García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2004). El género *Heliopsis* (*Helianthea*; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botanica Mexicana*, (69), 115-131.

Gerbino, A., Schena, G., Milano, S., Milella, L., Barbosa, A. F., Armentano, F., ... Carmosino, M. (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(5), e0156021. doi: 10.1371/journal.pone.0156021

Giacometti, J., Žauhar, G., & Žuvić, M. (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted

Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (*Olea europaea* L.) Using Response Surface Methodology. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(9), 149. doi:10.3390/foods7090149

Go, R. S., Ritman, E. L., y Owen, W. G. (2003). Angiogenesis in rat aortic rings stimulated by very low concentrations of serum and plasma. *Angiogenesis*, 6(1), 25–29. doi: 10.1023/A:1025876030744

Greger, H. (2016). Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochemistry Reviews*, 15(5), 729–770. doi: 10.1007/s11101-015-9418-0

Guedez, L., Rivera, A. M., Salloum, R., Miller, M. L., Diegmüller, J. J., Bungay, P. M., y Stetler-Stevenson, W. G. (2003). Quantitative assessment of angiogenic responses by the directed in vivo angiogenesis assay. *The American Journal of Pathology*, 162(5), 1431–1439. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64276-9

Hasan, S. S., Tsaryk, R., Lange, M., Wisniewski, L., Moore, J. C., Lawson, N. D., ... Siekmann, A. F. (2017). Endothelial Notch signalling limits angiogenesis via control of artery formation. *Nature Cell Biology*, 19(8), 928–940. doi: 10.1038/ncb3574

Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Carranza-Álvarez, C., Gómez-Luna, B. E., Alvarado-Sánchez, B., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2015). Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2), 227–231. doi: 10.1016/J.ASPEN.2014.09.004

Hernández, C. M. (2009). Tesis de grado: Evaluación del efecto de la afinina presente en extractos de *Heliopsis longipes* en la recuperación de ápices de vainilla sometidos a tratamientos con crioprotectores”. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz.

Hernández, I., Márquez, L., Martínez, I., Dieguez, R., Delporte, C., Prieto, S., ...

Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids derived from *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 649–652. doi: 10.1016/j.jep.2009.04.060

Herradón, E., Martín, M. I., & López-Miranda, V. (2007). Characterization of the vasorelaxant mechanisms of the endocannabinoid anandamide in rat aorta. *British journal of pharmacology*, 152(5), 699-708. doi: 10.1038/sj.bjp.0707404

Hofmann, N., Barth, S., Waldeck-Weiermair, M., Klec, C., Strunk, D., Malli, R., y Graier, W. (2014). TRPV1 mediates cellular uptake of anandamide and thus promotes endothelial cell proliferation and network-formation. *Biology open*, 3(12), 1164-72. doi:10.1242/bio.20149571

Hromádková, Z. y Ebringerová, A., (2003). Ultrasonic extraction of plant materials- investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrason. Sonochem.* 10, 127–133. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00094-4](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00094-4)

Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D. M., Hernández-Sandoval, L., y Martínez, M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 732–739. doi: 10.3109/13880200903271280

Irvin, M. W., Zijlstra, A., Wikswo, J. P., & Pozzi, A. (2014). Techniques and assays for the study of angiogenesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 239(11), 1476–1488. doi:10.1177/1535370214529386

Ikeda, Y., Ukai, J., Ikeda, N., y Yamamoto, H. (1984). Facile routes to natural acyclic polyenes syntheses the spilanthal and trail pheromone for termite. *Tetrahedron Letters*, 25, 5177-5180

Jacobson, M., Acree, F. y Haller, H.L. (1947). Correction of the source of “affinin” (Nisobutyl-2,6,8-decatrienoamide). *Journal of Organic Chemistry*, 12, 731–732

- Jabcoson, M. (1957). The structure of spilanthol. *Chemical and Industry*, 2, 50-55
- Johns, T., Graham, K., y Towers, G. H. N. (1982). Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the asteraceae. *Phytochemistry*, 21(11), 2737–2738. doi: 10.1016/0031-9422(82)83110-5
- Johnson, K. E., y Wilgus, T. A. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care*, 3(10), 647–661. doi: 10.1089/wound.2013.0517
- Karamysheva, A. F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 73(7), 751–762. doi: 10.1134/S0006297908070031
- Katsouda, A., Bibli, S.-I., Pyriochou, A., Szabo, C., y Papapetropoulos, A. (2016). Regulation and role of endogenously produced hydrogen sulfide in angiogenesis. *Pharmacological Research*, 113(Pt A), 175–185. doi: 10.1016/J.PHRS.2016.08.026
- Kumar, R., Yoneda, J., Bucana, C. D., y Fidler, I. J. (1998). Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *International Journal of Oncology*, 12(4), 749–757. doi: 10.3892/ijo.12.4.749
- Liekens, S., De Clercq, E., y Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 61(3), 253–270. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00529-3
- López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, a. B., y Rios, M. Y. (2011). Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochemistry Letters*, 4(3), 275–279. doi: 10.1016/j.phytol.2011.04.014
- Malinda, K. M. (2009). In vivo BME migration and angiogenesis assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 467, 287–294. doi: 10.1007/978-1-59745-241-0\_17
- Martin, Stewart Ph. D & Murray, J. Clifford (2009). Angiogenesis protocols (2nd ed). Humana ; [London : Springer, distributor], New York, N.Y, 159-294

Min, J.-K., Han, K.-Y., Kim, E.-C., Kim, Y.-M., Lee, S.-W., Kim, O.-H., ... Kwon, Y.-G. (2004). Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer Research*, 64(2), 644–651. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3250

Molina-Torres, J., García-Chávez, A., & Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 241–248. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00134-2

Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., & Ramírez-Chávez, E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkaloids from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4700–4704. doi: 10.1021/jf034374y

Molina-Torres, J. y García-Chavez, A. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, 20, 377–387.

Nakatani N. y Nagashima M. (1992). Pungent Alkaloids from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(5), 759–762. doi: 10.1271/bbb.56.759

Nicosia, R. F. (2009). The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(10), 4113–4136. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00891.x

Nicosia, R. F., Lin, Y. J., Hazelton, D., y Qian, X. (1997). Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Pathology*, 151(5), 1379-1386.

Nilesh M. P., Naranjan S. D. y Dev D. S. (2006). Angiogenesis a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*, 44(5), 265-74. doi: 10.1016/j.vph.2006.01.005

Ocegueda, S., Moreno, E., y Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina

tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, 62, 12–15. Retrieved Sept 8, 2018, from <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>

Ochoa, L. (2001). Norma Oficial Mexicana [NOM-062-ZOO-1999], Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *DOF* 1999, 1–58.

Ogura, M., Cordell, G. A., Quinn, M. L., Leon, C., Benoit, P. S., Soejarto, D. D., y Farnsworth, N. R. (1982). Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem--oral use of *Heliopsis longipes*--by means of a multidisciplinary approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 5(2), 215–219. doi: 10.1016/0378-8741(82)90045-9

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Retrieved Sept 8, 2018, from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>

Picardi, P., Ciaglia, E., Proto, M., y Pisanti, S. (2014). Anandamide inhibits breast tumor-induced angiogenesis. *Translational Medicine*, 10, 8-12. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.024

Pisanti S, Borselli C, Oliviero O, Laezza C, Gazzero P, & Bifulco M (2007). Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation to its tumor-suppressor efficacy. *J Cell Physiol* 211: 495-503. doi: 10.1002/jcp.20954

Rios, M. (2013). Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*. InTech; Vienna, Austria. pp. 107–144.

Rios, M. Y., y Olivo, H. F. (2014). Chapter 3 – Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 43, 79–121. doi: 10.1016/B978-0-444-63430-6.00003-5

Rios, M. Y., Aguilar, A. B. y Gutiérrez, M. D. C. (2007). Analgesic activity of affinin,

an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J. Ethnopharmacol*, 110, 364–367. doi: 10.1016/j.jep.2006.09.041

Saha, J., y Deka, S. C. (2017). Functional properties of sonicated and non-sonicated extracted leaf protein concentrate from *Diplazium esculentum*. *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1051-1061. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1199034>

Secretaría de Medio Ambiente y, R. N. (2003). *Norma Oficial Mexicana, Protección Ambiental - Salud Ambiental - Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos - Clasificación y Especificaciones de Manejo. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación* (Vol. 10). Retrieved Sept 8, 2018, from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

Seo, D.-W., Li, H., Guedez, L., Wingfield, P. T., Diaz, T., Salloum, R., ... Stetler-Stevenson, W. G. (2003). TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*, 114(2), 171–180. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00551-8

Silveira, N., Sandjo, L. P., y Biavatti, M. W. (2018). Spilanthal-containing products: A patent review (1996–2016). *Trends in Food Science y Technology*, 74, 107–111. doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.012

Singh M y Chaturvedi R: Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthal from in-vitro cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella*. *Industrial Crops and Products*; 36(1): 321-328.

Szabó, C., y Papapetropoulos, A. (2011). Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. *British Journal of Pharmacology*, 164(3), 853–865. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01191.x

Tahergorabi, Z. y Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(6), 1110–1126.



Torres, J. S. S., Cerón, L. F. Z., Bernal, S. I. F., Ordoñez, G. W. M., y Salguero, C. (2017). El rol de VEGF en la angiogénesis fisiológica y tumoral. *Medicina* 39(3), 190-209 ISSN: 0120-5498. Retrieved Sept 8, 2018 from <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/118-3/1480>

Ucuzian, A. A., Gassman, A. A., East, A. T., y Greisler, H. P. (2010). Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of Burn Care y Research : Official Publication of the American Burn Association*, 31(1), 158–175. doi: 10.1097/BCR.0b013e3181c7ed82

Veryser, L., Taevernier, L., Joshi, T., Tatke, P., Wynendaele, E., Bracke, N., ... De Spiegeleer, B. (2016). Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 177. doi: 10.1186/s12906-016-1159-0

Veryser, L., Wynendaele, E., Taevernier, L., Verbeke, F., Joshi, T., Tatke, P., y De Spiegeleer, B. (2014). N-alkylamides: from plant to brain. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(6), 264-275.

Wang, T., Ward, Y., Tian, L., Lake, R., Guedez, L., Stetler-Stevenson, W. G., y Kelly, K. (2005). CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. *Blood*, 105(7), 2836–2844. doi: 10.1182/blood-2004-07-2878

Wasiutyński, A., Bałan, B., Skopińska-Różewska, E., y col. (2009) The effect of *Echinacea purpurea* on the morphology, angiogenic activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration of murine L-1 sarcoma tumors. *Centr Eur J Immunol*. 34:38–41.

Willig, J. B., Salomón, J., Vianna, D. R. B., Moura, S., Pilger, D. A., Buffon, A., & Konrath, E. L. (2019). *Heliopsis longipes* SF Blake (Asteraceae) extract causes cell cycle arrest and induces caspase dependent apoptosis against cancer cell

lines. *South African Journal of Botany*, 125, 251-260. doi: 10.1016/j.sajb.2019.07.035

Wong, W. (2012). Two Gases Required for Vasodilation and Angiogenesis. *Science Signaling*, 5(228), ec163-ec163. doi: 10.1126/scisignal.2003302

Wongsawatkul O., Prachayasittikul S., Isarankura-Na-Ayudhya C., Satayavivad J., Ruchirawat S. y Prachayasittikul V. (2008). Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int. J. Mol. Sci.*;9:2724–2744. doi: 10.3390/ijms9122724

Wood, J. M. (2000). Inhibition of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) as a novel approach for cancer therapy. *Journal of MEDICINA (Buenos Aires)*, 60(Supl II), 41–47.

Wu, L. C., Fan, N. C., Lin, M. H., Chu, I. R., Huang, S. J., Hu, C. Y., y Han, S. Y. (2008). Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2341–2349. doi: 10.1021/jf073057e

Xie, F., Feng, L., Cai, W., Qiu, Y., Liu, Y., Li, Y., ... Qiu, L. (2015). Vaccarin promotes endothelial cell proliferation in association with neovascularization in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1131–1136. doi: 10.3892/mmr.2015.3503

Yamane, L. T., De Paula, E., Jorge, M. P., De Freitas-Blanco, V. S., Junior, I. M., Figueira, G. M., y col. (2016). *Acmella oleracea* and *Achyrocline satureioides* as sources of natural products in topical wound care. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016:3606820. doi: 10.1155/2016/ 3606820

Yasuda, I.; Takeya, K. y Itokawa, H. (1980). The Geometric Structure of Spilanthol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2251–2253. doi: 10.1248/cpb.28.2251

Yoo, S. Y., y Kwon, S. M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation*, 2013, 127170. doi: 10.1155/2013/127170

Zihlif, M., Afifi, F., Muhtaseb, R., Al-Khatib, S., Abaza, I., y Naffa, R. (2012). Screening the Antiangiogenic Activity of Medicinal Plants Grown and Sold in Jordan. *Planta Medica*, 78(3), 297–301. doi: 10.1055/s-0031-1280449

Zimna, A., y Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed Research International*, 2015, 549412. doi: 10.1155/2015/549412

Zippel, N., Ding, Y., y Fleming, I. (2016). A modified aortic ring assay to assess angiogenic potential in vitro. In *Methods in Molecular Biology*, 1430, 205–219. doi: 10.1007/978-1-4939-3628-1\_14