

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos
de alcamidas; agentes terapéuticos asociados al
tratamiento del dolor”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA

M.F. VIANEY DE LA ROSA LUGO

CO-DIRECTORES DE TESIS

DRA. MA. YOLANDA RIOS GÓMEZ

DRA. MYRNA DÉCIGA CAMPOS

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA
Secretaría de Docencia

“1919-2019 en memoria del General Emiliano Zapata Salazar”

Cuernavaca, Mor., a 27 de noviembre de 2019

Folio:FF/D/SDoc/CIP/DF/058/2019



M.F. VIANEY DE LA ROSA LUGO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
PRESENTE

Por este conducto le informo que la Comisión Académica de Doctorado en sesión ordinaria del 25 de noviembre del 2019 le asignó jurado para revisar y presentar la defensa oral de su tesis titulada:

“Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcamidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor”

Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez	PRESIDENTE
Dr. Jesús Rivera Islas	SECRETARIO
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	VOCAL 1
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama	VOCAL 2
Dr. Víctor Gómez Calvario	VOCAL 3
Dr. Germán Bernal Fernández	VOCAL 4
Dra. Ángeles Ramírez Cisneros	VOCAL 5

De acuerdo con el Artículo 101° (Reglamento General de Posgrado).- *Será requisito previo al examen de grado, que los integrantes de la Comisión Revisora, emitan su voto y opinión favorables en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente. Lo cual no compromete el dictamen de la evaluación de examen.*

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarla por estar próxima a obtener el título de Doctora en Farmacia.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
JEFE DE POSGRADO



C.c.p Dra. Sara García, Dr. Jesús Rivera, Dr. Gabriel Navarrete, Dra. Berenice Aguilar, Dr. Víctor Gómez, Dr. Germán Bernal y Dra. Ángeles Ramírez.

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 61
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3365



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



El presente trabajo se realizó en el laboratorio 323 del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra. Ma. Yolanda Rios Gómez y la Dra. Myrna Déciga Campos de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 412028 y de los proyectos CONACyT de Infraestructura Científica 254145 y de ciencia básica CB-2015-241044 (CONACyT), 20190293 (SIP-IPN), PIDE PII02 y PICA18.

• AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT y a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos a través de la Facultad de Farmacia y del Centro de Investigaciones Químicas.

A la Dra. Ma. Yolanda Rios Gómez y a la Dra. Myrna Déciga Campos por su dirección para la realización de este proyecto y especialmente por su confianza.

A la Dra. María de los Ángeles Ramírez Cisneros (CIQ, UAEM), al Dr. Francisco Javier López Muñoz (CINVESTAV, IPN) y a la Dra. Sara Concepción García Jiménez (Facultad de Farmacia, UAEM) por las facilidades brindadas y su asesoría invaluable.

Al comité tutorial y al jurado revisor por sus observaciones.

• DEDICATORIA

A mi madre Claudia Lugo y a Hernán

Por ser mi soporte, mi inspiración y mi mejor ejemplo.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>vii</i>
ÍNDICE DE ECUACIONES	<i>viii</i>
ÍNDICE DE ESPECTROS	<i>ix</i>
RESUMEN	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. ALCAMIDAS	3
2.1.1. Generalidades	3
2.1.2. Actividad biológica de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos	5
2.2. FARMACODINAMIA	8
2.2.1. Generalidades	8
2.2.2. Mecanismos de acción de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos	10
2.3. TOXICIDAD	12
2.3.1. Generalidades	12
2.3.2. Estudios de toxicidad de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos	14
2.4. FARMACOCINÉTICA	16
2.4.1. Generalidades	16
2.4.2. Estudios de farmacocinética de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos	20
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
6. MATERIAL Y EQUIPOS	29
6.1. SÍNTESIS Y PROCESOS CROMATOGRÁFICOS	29
6.2. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE ALCAMIDAS	30

6.2.1. Animales	30
6.2.2. Equipos e instrumentación	31
6.2.3. Reactivos y disolventes.....	32
7. MÉTODOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
7.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ALCAMIDAS.....	34
7.2. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.....	35
7.2.1. Toxicidad aguda.....	35
7.2.2. Toxicidad a dosis repetida.....	36
7.2.3. Evaluación del efecto neurofarmacológico	37
7.2.4. Análisis sanguíneo.....	38
7.2.5. Daños macroscópicos en órganos principales	39
7.2.6. Estudio de genotoxicidad	39
7.2.7. Farmacodinamia. Exploración del mecanismo de señalización de alcamidias	40
7.2.8. Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos de afinina	43
7.2.8.1. Establecimiento de las dosis	43
7.2.8.2. Canulación y obtención de muestras sanguíneas	44
7.2.8.3. Tratamiento de muestras sanguíneas y análisis cromatográfico ...	45
7.2.8.4. Análisis estadístico	48
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
8.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ALCAMIDAS.....	51
8.1.1. Obtención de capsaicina y afinina.....	51
8.1.2. Síntesis de hexahidroafinina	53
8.1.3. Mecanismo de reacción	54
8.2. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.....	55
8.2.1. Toxicidad aguda.....	55
8.2.2. Toxicidad a dosis repetida.....	56
8.2.3. Evaluación del efecto neurofarmacológico	58
8.2.4. Análisis sanguíneo.....	60
8.2.5. Daños macroscópicos en órganos principales	61
8.2.6. Estudio de genotoxicidad	62
8.2.7. Farmacodinamia. Exploración del mecanismo de señalización de alcamidias	64
8.2.7.1. Modelo de formalina	64

8.2.7.2. Participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides ..	65
8.2.8. Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos de afinina	77
9. CONCLUSIONES	84
10. PERSPECTIVAS	85
11. REFERENCIAS	86
12. ANEXOS.....	96

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y eliminación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFN	Afinina
AINE	Analgésico no esteroideo
ALB	Albúmina
ALT	Alanina aminotransferasa
AMES	Ensayo de <i>Salmonella typhimurium</i>
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AST	Aspartato aminotransferasa
BCC	Bicuculina
BSF	Basófilos
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
°C	Grados Celsius
C ₀	Concentración al tiempo cero
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
Cl	Depuración
Cm	Centímetros
C _{máx}	Concentración máxima
C _{mín}	Concentración mínima
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPS	Capsaicina
CPSZ	Capsazepina
CRE	Creatinina
DAG	Diacilglicerol
DE ₅₀	Dosis efectiva media

DI	Decilitros
DL ₅₀	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESN	Eosinófilos
<i>E. angustifolia</i>	<i>Echinacea angustifolia</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. purpurea</i>	<i>Echinacea purpurea</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Eq	Equivalentes
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
Fm	Femtolitro
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GC/MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>
GGT	Gamma glutamil transferasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
h	Horas
HAFN	Hexahidroafinina
<i>H. longipes</i>	<i>Heliopsis longipes</i>
HCT	Hematocrito
HGB	Hemoglobina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
i.p	Intraperitoneal
IE	Impacto electrónico
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
K _a	Constante de absorción

K_e	Constante de eliminación
Kg	Kilogramos
K_p	Coeficiente de permeación
L	Litros
LNF	Linfocitos
LC-MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
MNC	Monocitos
MCH	Hemoglobina celular media
MCHC	Concentración media de hemoglobina corpuscular
MCV	Volumen celular medio
Min	Minutos
mL	Mililitros
MN-NE	Eritrocitos normocromáticos micronucleados
MNPCE	Eritrocitos policromáticos micronucleados
NADA	<i>N</i> -araquidonoil-dopamina
NB	Neutrófilos en banda
NE	Eritrocitos normocromáticos
NK	<i>Natural killers</i>
NK-1	Receptor neurocinina 1
Nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NS	Neutrófilos segmentados
OBt	Oxibenzotriazol
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. solanacearum</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
p.o	Vía oral
P_{app}	Permeabilidad aparente
PCE	Eritrocitos policromáticos

PCPA	<i>p</i> -Clorofenilalanina
PEA	Palmitoiletanolamida
Pg	Picogramos
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLT	Plaquetas
pM	Picomolar
Ppm	Partes por millón
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio
RBC	Recuento de eritrocitos
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SCL	Saclofen
SEM	<i>Standar error of the mean</i>
SFB	Suero fetal bovino
SGA	Sistema globalmente armonizado
SNC	Sistema nervioso central
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
$t_{1/2a}$	Semivida de absorción
TGO	Transaminasa glutámica oxaloacética
$t_{máx}$	Tiempo máximo
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TNF-R	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
μ L	Microlitros
μ m	Micrómetros
UPLC/MS	<i>Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer</i>

UV	Ultravioleta
V _D	Volumen de distribución
VH	Vehículo
WBC	<i>White blood cells</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de las alcanmidas -----	3
Figura 2. Alcanmidas aisladas en <i>H. longipes</i> -----	4
Figura 3. Estructura química de <i>N</i> -isobutildecanamida (hexahidroafinina) -----	4
Figura 4. Estructura química de capsaicina -----	5
Figura 5. Factores que provocan la activación y sensibilización del receptor TRPV1 ----	11
Figura 6. Principales parámetros farmacocinéticos tras la administración oral de un fármaco-----	19
Figura 7. Principales metabolitos del estudio <i>in silico</i> de afinina (MetaTox)-----	24
Figura 8. Síntesis de hexahidroafinina -----	34
Figura 9. Diseño experimental de la evaluación de toxicidad a dosis repetida en ratón --	37
Figura 10. Diseño experimental de la evaluación del perfil neurofarmacológico en ratón	38
Figura 11. Evaluación de la actividad genotóxica; obtención y tratamiento de la médula ósea de ratón-----	40
Figura 12. Curso temporal del efecto nociceptivo en ratón producido por formalina-----	41
Figura 13. Evaluación del mecanismo transduccional de las alcanmidas en la prueba de la formalina en ratón -----	42
Figura 14. Obtención de muestras sanguíneas para determinar el perfil farmacocinético	44
Figura 15. Proceso de canulación. Obtención de muestras sanguíneas-----	45
Figura 16. Preparación de las muestras sanguíneas para el análisis en UPLC/MS -----	46
Figura 17. Preparación de las muestras para elaboración de la curva de calibración ----	47
Figura 18. Modelo mono-compartimental para la obtención de los principales parámetros farmacocinéticos -----	48
Figura 19. Método de los trapezoides para el cálculo del área bajo la curva -----	49
Figura 20. Asignación por RMN de capsaicina-----	52
Figura 21. Asignación por RMN de afinina -----	52
Figura 22. Asignación por RMN de hexahidroafinina -----	53
Figura 23. Mecanismo de reacción. Síntesis de hexahidroafinina-----	54
Figura 24. Control de peso e ingesta de alimento -----	57
Figura 25. Evaluación del perfil neurofarmacológico-----	59
Figura 26. Curso temporal del efecto nociceptivo expresado como tallado facial de la administración local de formalina 2% en ratón-----	64

Figura 27. Diseño experimental. Participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides-----	66
Figura 28. Efecto de la administración orofacial de los antagonistas en el modelo de formalina -----	67
Figura 29. Exploración de la participación de los receptores TRPV1 en el mecanismo de señalización-----	68
Figura 30. Rutas de señalización activadas por los agentes proinflamatorios que convergen en el receptor TRPV1 -----	69
Figura 31. Modelo estructural del receptor TRPV1-----	71
Figura 32. Interacción de las alcanidas con el sitio de reconocimiento del receptor TRPV1-----	72
Figura 33. Señalización clásica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 -----	73
Figura 34. Exploración de la participación de los receptores cannabinoides en el mecanismo de señalización -----	74
Figura 35. Características estructurales de las amidas importantes para la interacción con los receptores CB -----	75
Figura 36. Amidas agonistas de los receptores GABA _A -----	76
Figura 37. Exploración de la participación de los receptores GABA en el mecanismo de señalización -----	76
Figura 38. Curso temporal de la relación afinina/SI (2.5 mg/Kg, p.o) -----	78
Figura 39. Curso temporal de la relación afinina/SI (2.5 mg/Kg, i.v) -----	79
Figura 40. Curva de calibración y ecuación de la recta de afinina-----	79
Figura 41. Concentración plasmática de afinina (2.5 mg/Kg, p.o) -----	81
Figura 42. Concentración plasmática de afinina (2.5 mg/Kg, i.v) -----	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conceptos básicos de los parámetros farmacocinéticos más comunes -----	18
Tabla 2. Reacciones químicas y metabolitos más probables de afinina-----	22
Tabla 3. Predicción de valores farmacocinéticos de afinina y sus metabolitos principales-----	23
Tabla 4. Reactivos usados para la determinación del perfil fármaco-toxicológico -----	32
Tabla 5. Selección de dosis. Ensayo de toxicidad aguda de acuerdo a Lorke-----	35

Tabla 6. Categorización de sustancias peligrosas según el SGA-----	36
Tabla 7. Soluciones de trabajo. Elaboración de curvas de calibración -----	48
Tabla 8. Toxicidad aguda de alcanidas-----	56
Tabla 9. Principales signos de intoxicación-----	58
Tabla 10. Parámetros hematológicos. Fórmula roja-----	60
Tabla 11. Parámetros hematológicos. Fórmula blanca-----	61
Tabla 12. Parámetros enzimáticos -----	61
Tabla 13. Índice de variación de peso de órganos de ratones administrados durante 28 días con alcanidas-----	62
Tabla 14. Apariencia de órganos principales de ratones administrados durante 28 días con alcanidas. Daño macroscópico-----	62
Tabla 15. Efecto genotóxico de alcanidas -----	63
Tabla 16. Efecto antinociceptivo de la inyección de alcanidas en la zona orofacial de ratón en la prueba de formalina -----	65
Tabla 17. Compuestos con actividad sobre el receptor TRPV1 -----	70
Tabla 18. Relación de las alturas de afinina/SI en muestras sanguíneas (2.5 mg/Kg, p.o)-----	78
Tabla 19. Cuantificación de afinina en las muestras sanguíneas (2.5 mg/Kg, p.o e i.v)---	80
Tabla 20. Principales parámetros farmacocinéticos de afinina- -----	82
Tabla 21. Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos de afinina con una alcanida similar- -----	83

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Variación de peso de órganos internos-----	39
Ecuación 2. Porcentaje de antinocicepción-----	42
Ecuación 3. Preparación de soluciones. Curva de calibración-----	47
Ecuación 4. Cálculo de la constante de eliminación (K_e)-----	49
Ecuación 5. Cálculo de la concentración plasmática el tiempo cero (C_0)-----	49
Ecuación 6. Cálculo del tiempo de vida media ($t_{1/2}$)-----	49
Ecuación 7. Cálculo de la constante de depuración (C) -----	49
Ecuación 8. Cálculo del área bajo la curva (ABC)-----	50
Ecuación 9. Cálculo del volumen de distribución (V_D)-----	50

Ecuación 10. Cálculo de la biodisponibilidad (F) -----	50
Ecuación 11. Ecuación de la recta. Curva de calibración de afinina-----	80

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) Capsaicina -----	98
Espectro 2. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) Capsaicina -----	99
Espectro 3. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) Afinina -----	100
Espectro 4. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) Afinina-----	101
Espectro 5. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) Hexahidroafinina-----	102
Espectro 6. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) Hexahidroafinina-----	103

RESUMEN

El creciente interés científico por la búsqueda y desarrollo de compuestos bioactivos con propiedades analgésicas ha llevado a la obtención, caracterización y evaluación farmacológica de metabolitos de fuentes naturales y sintéticas como potenciales agentes analgésicos. Sin embargo, para el desarrollo de fármacos a partir de nuevos compuestos bioactivos no sólo es necesario el estudio de la actividad farmacológica; se requiere el establecimiento del perfil toxicológico, farmacocinético y farmacodinámico de los nuevos compuestos con el fin de determinar la viabilidad de su uso en la terapéutica. En este estudio, afinina y hexahidroafinina demostraron ser alcanidas con alto potencial analgésico y baja toxicidad oral ($DL_{50} = 1442.2$ y > 5000 mg/kg, respectivamente). Tras la administración repetida de 50 mg/Kg durante 28 días de las alcanidas no se observaron daños macroscópicos en órganos principales ni alteraciones en los parámetros hematológicos y enzimáticos asociados a lesiones renales y hepáticas. Ambas alcanidas no mostraron efectos genotóxicos en la prueba de micronúcleos. En menor o mayor grado, la actividad antinociceptiva de afinina y hexahidroafinina se asoció a la activación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides. La alta lipofilicidad de afinina se vio reflejada en su rápida absorción tras la administración oral de 2.5 mg/Kg con una $C_{máx}$ y $t_{máx}$ de 8.3 ng/mL y 8 minutos, respectivamente. La concentración máxima detectada a la misma dosis, pero a través de la administración intravenosa fue de 841.1 ng/mL. De igual manera, se observó su rápida eliminación del sistema, dado que su presencia ya no fue detectada 120 minutos posteriores a su administración oral y 25 minutos posteriores a su administración intravenosa. Otros parámetros farmacocinéticos reforzaron el hecho de que afinina es un metabolito con rápido efecto farmacológico pero de corta duración antinociceptiva. En general, la presente investigación estableció el perfil fármaco-toxicológico de dos compuestos que pueden ser considerados viables para su desarrollo farmacéutico con el fin de incrementar la duración de su efecto farmacológico mediante tecnología farmacéutica adecuada de compuestos con estas características químicas.

ABSTRACT

The scientific interest to develop bioactive compounds with analgesic properties has led to obtaining and evaluating natural and synthetic metabolites as potential analgesic agents. However, to the new drugs development, it is necessary to establish the toxicological, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile in order to determine the feasibility of their use in therapeutics. In this study, affinin and hexahydroaffinin shown to be alcanamides with high analgesic potential and low oral toxicity ($LD_{50} = 1442.2$ and > 5000 mg/Kg, respectively). After subacute study (50 mg/Kg, p.o, 28 days) no macroscopic damage to the main organs or alterations in the hematological and enzymatic parameters associated with renal and hepatic lesions were observed. Both alcanamides had no genotoxic effects on the micronucleus test. The antinociceptive activity of affinin and hexahydroaffinin was associated with the activation of the TRPV1, GABA and cannabinoid receptors. The high lipophilicity from this kind of compound was evident due rapid absorption after oral administration (2.5 mg/Kg) with a C_{max} and t_{max} of 8.3 ng/mL and 8 minutes respectively. The maximum concentration detected at the same dose, but through intravenous administration was 841.1 ng/mL; 120 minutes after oral administration and 25 minutes after intravenous administration no affinin was detected in plasma samples. The main limitation of this compounds is the short antinociceptive duration however the pharmacological-toxicological profile showed that affinin and hexahydroaffinin are viable with the pharmaceutical technology development in order to increase duration of their pharmacological effect.



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La aparición de nuevas enfermedades, la resistencia de los organismos a la terapia farmacéutica ya existente, así como la presencia de efectos secundarios no deseados, ha incentivado al continuo estudio científico de nuevas moléculas con potencial farmacológico. Así, el proceso de desarrollo de un fármaco es un largo camino que nace, en ciertas ocasiones, de la inquietud de demostrar científicamente hipótesis basadas en el uso etnomédico de plantas medicinales, esto es, encontrar los principios bioactivos de las plantas utilizadas en la medicina tradicional con el fin de atribuir la actividad farmacológica a metabolitos perfectamente caracterizados.

En este sentido, los estudios preclínicos tienen como finalidad primaria el establecimiento de las interacciones de los metabolitos con el organismo, los procesos cinéticos, los mecanismos de acción, así como los efectos bioquímicos y toxicológicos en animales de laboratorio y modelos fisiológicos *in vivo* e *in vitro*. Esto es, el establecimiento del perfil fármaco-toxicológico de los candidatos a nuevos fármacos útiles en la terapéutica.

No es de extrañar que México, por su riqueza herbolaria y su amplio conocimiento etnomédico, sea referente en el estudio de metabolitos farmacológicamente activos provenientes de fuentes naturales. En este sentido, en los últimos tiempos se ha incrementado el estudio farmacológico de derivados tipo amida en plantas, llamados alcanmidas, *N*-alquilamidas, alquenamidas o alquenilamidas. Químicamente, éstos son compuestos constituidos por un grupo amida, una cadena de ácido graso alifático poliinsaturado de cadena variada (R_1CO-) y un sustituyente corto aromático o alifático (R_2NH-). Las alcanmidas han demostrado tener actividad insecticida (Molina-Torres et al. 2004), antiinflamatoria (Hernández et al. 2009), antihiperalgésica (Acosta-Madrid et al. 2009) y analgésica (Rios-Gómez et al. 2007, de la Rosa-Lugo et al. 2017). Referente de estos compuestos es la capsaicina, molécula con gran potencial analgésico, pero con alta pungencia como efecto secundario, característica que limita su uso en la terapéutica. Por tal motivo, el estudio de moléculas estructuralmente similares resulta de interés. Ejemplo de ello es la afinina (alcamida mayoritaria de *Heliopsis longipes*) y la hexahidroafinina (alcamida análoga de afinina), moléculas con alto interés farmacológico y nulos estudios preclínicos. El objetivo del presente trabajo tuvo como enfoque el establecimiento del perfil

fármaco-toxicológico de afinina y hexahidroafinina con la finalidad de contribuir al desarrollo de fármacos seguros para el tratamiento del dolor, en particular, del dolor dental.



2. ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 ALCAMIDAS

2.1.1 Generalidades

Las alcanidas son compuestos de interés biológico, farmacológico y alimentario ampliamente distribuidos en la naturaleza. Pertenecen a un grupo de lípidos bioactivos útiles para el crecimiento, desarrollo y protección de las plantas que los sintetizan. Químicamente están constituidos por una cadena de ácido graso [R₁CO-] vinculado a un residuo de amina [R₂-]; ambos con naturaleza aromática o alifática (**Figura 1**).

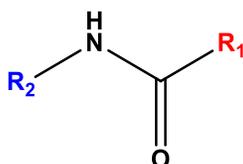


Figura 1. Estructura general de las alcanidas

Las fuentes más comunes de estos metabolitos son las plantas pertenecientes a las familias Asteraceae (anteriormente Compuestas), Solanaceae y Piperaceae (familia de la pimienta) aunque su presencia se ha demostrado también en otras familias de plantas.

Heliopsis longipes (*H. longipes*) conocida comúnmente como chilmecatl (de *chili*, chile y *mecatl*, mecate), chilcuán (chile de víbora), chilcuague, raíz de oro o raíz azteca (Molina-Torres et al. 2001), pertenece a la familia Asteraceae, es una de las principales plantas productoras de alcanidas. Se encuentra ampliamente distribuida en la Sierra Gorda, ubicada en la colindancia de los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro (García et al. 2004) y se distingue físicamente por ser una raíz filiforme de sabor picante. Químicamente, *H. longipes* se caracteriza por contener afinina (*N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida) como alcanida mayoritaria y longipenamida A (*N*-isobutil-*sin*-8,9-dihidroxi-2(*E*),6(*Z*)-decadienamida), longipenamida B (*N*-isobutil-*sin*-6,9-dihidroxi-2(*E*),7(*E*)-decadienamida) y longipinamida A (*N*-isobutil-8,10-diino-3(*Z*)-undecenamida) como alcanidas minoritarias de interés farmacológico (**Figura 2**) (López-Martínez et al. 2011).

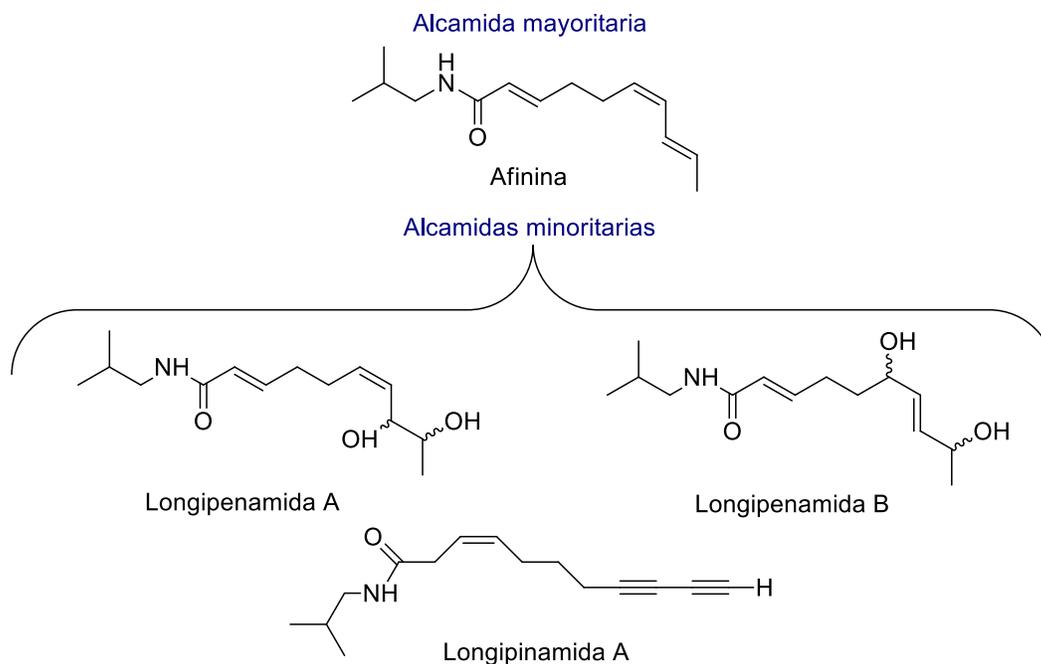


Figura 2. Alcanidas aisladas en *H. longipes*

Las alcanidas de la familia Asteraceae se caracterizan por poseer una cadena lineal de ácido graso de C8 a C18 átomos de carbono con insaturaciones múltiples (dobles y triples enlaces) en [R₁CO-] y *N*-isobutilo, *N*-2-metilbutilo, *N*-fenetilo o aminas cíclicas como piperidinilo, 2,3-dihidropiperidinilo, pirrolidinilo y pirrolidinona como residuo amina [R₂-] (Ríos-Gómez et al. 2012). Sin embargo, existen otras alcanidas estructuralmente más simples, pero con igual importancia farmacológica. Tal es el caso de la *N*-isobutildecanamida (hexahidroafinina), compuesto idéntico en el esqueleto a afinina, pero con la cadena de ácido graso totalmente saturada. La sencillez estructural de este compuesto resulta atractiva por la viabilidad de su obtención mediante síntesis y/o semisíntesis química a partir de reactivos y técnicas convencionales y no solo por su obtención de fuentes naturales (Figura 3).

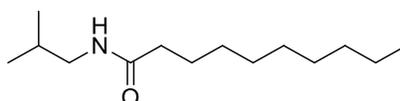


Figura 3. Estructura química de *N*-isobutildecanamida (hexahidroafinina)

Otros de los compuestos tipo amida con importancia social y económica son los llamados capsaicinoides. Proviene de la familia Solanaceae y son aislados únicamente de plantas del género *Capsicum*. Se considera a los capsaicinoides como las moléculas responsables del sabor picante de los frutos de Chile. En particular, la capsaicina (*E*-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnon-6-enamida) (**Figura 4**), es sintetizada por las plantas como un medio de defensa ante el ataque de animales. En los humanos, es detectada por un receptor general del dolor que, al entrar en contacto con la capsaicina, facilita la entrada de iones calcio a las células. Este proceso, el cerebro, lo traduce como una sensación de quemazón o ardor.

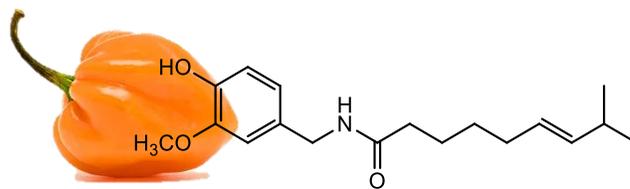


Figura 4. Estructura química de capsaicina

2.1.2 Actividad biológica de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos

Capsaicina, es la alcaloide más popular descrita en la literatura. Además de sus usos gastronómicos, es excelente coadyuvante en la pérdida de peso. Este fenómeno se da a través de la activación de los receptores TRPV1 y la estimulación de la termogénesis en el tejido adiposo produciendo así, la reducción de la grasa corporal ([Saito et al. 2015](#)). Sin embargo, capsaicina es más conocida por su importante actividad analgésica en dolor crónico y neuropático. Chrubasik y colaboradores demostraron que la aplicación tópica de capsaicina en crema (0.05%) resultó en una disminución del dolor en un 49% en pacientes con dolor crónico en partes blandas ([Chrubasik et al. 2010](#)). De igual manera, se ha demostrado que los productos tópicos de capsaicina alivian una variedad de condiciones de dolor incluyendo el originado por la osteoartritis y la artritis reumatoide ([Cameron et al. 2009](#)), neuralgia postherpética, neuropatía diabética ([Derry et al. 2009](#)) así como el dolor de espalda baja ([Keitel et al. 2001](#)). Sin embargo, la frecuencia de la aplicación de capsaicina en crema (dos a tres veces por día durante un periodo de 2 a 6 semanas) genera incomodidad en los pacientes tratados debido a que la alcaloide se impregna en el entorno causando irritación en la piel, mucosas, ojos y garganta, sensación de quemazón, formación

de eritemas y sequedad en el sitio de aplicación lo que provoca, en su mayoría, el abandono del tratamiento farmacológico (Anand et al. 2011).

En este sentido, otra de las alcanmidas más importantes por su uso etnomédico en la medicina tradicional es afinina (espilantol) nombrada así debido a que, se creyó en un principio, que fue aislada de la planta *Erigeon affinis*, sin embargo, después de corroborar los datos taxonómicos de la planta se consideró que se clasificó con error y que la afinina fue extraída en realidad de *H. longipes*. Sin embargo, el nombre de afinina ya había sido aceptado, por lo que decidieron no modificarlo (Molina-Torres et al. 2001). Químicamente, la afinina es una amida con un grupo isobutilo y una cadena de ácido graso de 10 átomos de carbono provista con tres insaturaciones en su cadena (**Figura 2**). Una de las alcanmidas estructuralmente similar a la afinina, es la *N*-isobutildecanamida la cual tiene el mismo esqueleto químico, pero sin insaturaciones en su cadena de ácido graso, razón por la cual se le puede nombrar como hexahidroafinina (**Figura 3**). Este compuesto se encuentra en la naturaleza, sin embargo, debido a que es una alcanmida minoritaria, ha resultado más factible su obtención mediante semisíntesis a partir de la hidrogenación catalítica de afinina o a través de síntesis total mediante la condensación química de isobutilamina y ácido decanoico. Para estas amidas lineales, diferentes actividades farmacológicas han sido reportadas.

La actividad antimicrobiana de la afinina fue demostrada, en cultivos bacterianos de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas solanacearum* (*P. solanacearum*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), por Molina Torres y colaboradores. Los resultados sugirieron que afinina inhibió el crecimiento microbiano a concentraciones menores de 25 µg/mL en bacterias tipo *E. coli* y *S. cerevisiae*, mientras que para las bacterias *P. solanacearum* and *B. subtilis* fueron necesarias concentraciones mayores (25 µg/mL). Se consideró que las insaturaciones en la cadena de ácido graso tienen un papel importante en esta actividad. Se ha sugerido que el mecanismo de toxicidad de estos compuestos en otros organismos inferiores como insectos es debido a un efecto estimulante a nivel neuronal (Molina-Torres et al. 1999). Este mismo grupo de investigación determinó la actividad bacteriostática (impedimento del crecimiento y reproducción bacteriana) de varias alcanmidas. Los resultados evidenciaron el efecto bacteriostático de afinina sobre *E. coli* (Gram-) y *B. subtilis* (Gram+) en un 100% mientras que la bacteria

Erwinia carotovora (Gram-) no fue sensible a la prueba. Por otro lado, hexahidroafinina solo mostró actividad contra *B. subtilis* (Molina-Torres et al. 2004). Las alcanidas, por su efecto antimicrobiano, bactericida y fungicida, deben constituir un elemento de defensa para las especies de plantas que las continen. Así, la actividad larvicida/insecticida del extracto etanólico de *H. longipes*, afinina, hexahidroafinina y otras alcanidas fue demostrada por Hernández y colaboradores usando larvas de mosquitos *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* como modelo. El extracto total mostró el mejor efecto para ambas larvas, seguido de afinina y las alcanidas parcialmente reducidas. Se evidenció la importancia de la presencia de las insaturaciones en la cadena de ácido graso para esta actividad farmacológica, dado que hexahidroafinina solo tuvo un 23% de efecto larvicida comparado con afinina (100 %) (Hernández-Morales et al. 2015).

Por otro lado, en el año 2009, Hernández y colaboradores determinaron el efecto antiinflamatorio del extracto de *H. longipes*, así como de algunas alcanidas del mismo. Para hacerlo, utilizaron un modelo de edema en oreja de ratón inducido por ácido araquidónico. Los ensayos evidenciaron el efecto antiinflamatorio del extracto de *H. longipes*, afinina y hexahidroafinina con una $DE_{50} = 0.8, 1.2$ y 0.9 mg/oreja respectivamente. En este estudio, la presencia o ausencia de dobles enlaces en las moléculas de las alcanidas mostró un rol fundamental en su actividad ya que, hexahidroafinina tuvo una DE_{50} menor comparada con afinina (Hernández et al. 2009). Sumando esfuerzos para demostrar el efecto antiinflamatorio de afinina, Wu y colaboradores estudiaron los posibles mediadores inflamatorios implicados en este proceso. Afinina disminuyó de forma dosis dependiente la producción de óxido nítrico (NO) debido a la inhibición de la expresión de la proteína iNOS. Cuando la proteína iNOS se sobreexpresa, se presenta un proceso inflamatorio con participación directa de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α . Se determinó que afinina redujo notablemente la producción de estas citocinas en macrófagos RAW 264, además de inhibir también la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), reduciendo la progresión de la respuesta (Wu et al. 2008).

Sin embargo, *H. longipes* es más utilizada empíricamente para el tratamiento de patologías dentales, en especial, el dolor de muelas. En algunas regiones del centro del país, las personas mastican un trozo de raíz, generando una sensación de hormigueo en la boca, estimulación salival y entumecimiento intenso (Fabricant et al. 2001). Por tal motivo,

diversas investigaciones se han enfocado en el establecimiento de la actividad analgésica de *H. longipes*, afinina y alcanidas relacionadas. Déciga-Campos y colaboradores reportaron la actividad antinociceptiva del extracto de *H. longipes* y de afinina basada en la prueba de formalina en rata. Los resultados mostraron actividad dependiente de la dosis en ambos casos. En este ensayo, el número de elevaciones de la pata de la rata fue contabilizado como respuesta nociceptiva. Las concentraciones con mejor actividad antinociceptiva fueron 3.0 mg/pata y 1.7 mg/pata para el extracto de *H. longipes* y afinina respectivamente (Déciga-Campos et al. 2012). Estos compuestos también mostraron actividad antinociceptiva en un modelo de nocicepción con ácido acético. La administración sistémica a dosis logarítmicas de *H. longipes* (0.01-1 mg/Kg, i.p) y afinina (1-1.875 mg/Kg, i.p) redujeron sistemáticamente las contracciones abdominales producidas por la administración de ácido acético 0.6% en ratones. En este estudio, el extracto de *H. longipes* resultó ser más potente que afinina con una $DE_{50} = 2.2 \pm 0.2$ mg/Kg contra $DE_{50} = 36 \pm 5$ mg/Kg del compuesto puro (Déciga-Campos et al. 2010). En un estudio afín, Rios Gómez y colaboradores demostraron que la actividad antinociceptiva de *H. longipes* y afinina está determinada por su capacidad de liberar al neurotransmisor GABA a nivel cerebral (Rios-Gómez et al. 2007). Se ha demostrado que la actividad analgésica de compuestos de esta naturaleza está vinculada al efecto que tienen a nivel del sistema nervioso central (SNC), pues son capaces de producir alteraciones en el comportamiento de los animales de experimentación; por mencionar, algunas alteran la actividad ansiolítica, la actividad motora y la capacidad de explorar nuevos espacios (Cilia-López et al. 2010, Déciga-Campos et al. 2012). La molécula de afinina se caracteriza por ser altamente lipofílica. Esta característica permite penetrar la piel y la mucosa oral mediante difusión pasiva, para llegar a la circulación sanguínea y posteriormente atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) con facilidad (Boonen et al. 2010, Veryser et al. 2016). Debido a esta y otras características, afinina se considera una molécula bioactiva valiosa como candidato a fármaco (Wu et al. 2008, Veryser et al. 2016).

2.2 FARMACODINAMIA

2.2.1 Generalidades

La farmacodinamia es el estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos que se producen tras la interacción de los fármacos con sus dianas terapéuticas. En otras palabras, explica el mecanismo de acción mediante el cual se produce el efecto farmacológico de los

principios bioactivos. Esta interacción se lleva a cabo en componentes macromoleculares situados en la membrana o en el citoplasma celular, generando en ello, cambios conformacionales de los receptores blanco y cambios bioquímicos en el interior de la célula. Por mencionar, los cambios ocurridos durante este proceso pueden ser alteraciones en la conductancia iónica, fosforilaciones proteicas, actividad enzimática, transcripción del DNA, entre otras. Cabe mencionar que la naturaleza de los ligandos (y de los principios activos en general) no siempre es específica hacia un solo tipo de receptor, ni lo hacen con la misma eficacia o actividad intrínseca. Por tal razón, y debido a la diversidad de vías de señalización y receptores asociados en el proceso de nocicepción, la terapia farmacéutica para el tratamiento del dolor se vuelve compleja. La neuroanatomía del dolor es un proceso coordinado en el que participan los nociceptores periféricos (receptores sensoriales) en presencia de estímulos externos, los centros de regulación de la transmisión de estos impulsos nerviosos son la médula espinal, el tálamo, la corteza y el cerebro. El proceso se desencadena cuando un estímulo físico, mecánico o químico supera el umbral de activación de los nociceptores, generando con ello el fenómeno de despolarización y polarización de la membrana celular (entrada y salida de iones a través de canales iónicos) originando entonces, la producción de impulsos eléctricos o potenciales de acción que viajan de neurona en neurona hasta llegar a los centros superiores (tálamo y corteza). En su camino, estos impulsos eléctricos pasan a través de la médula espinal, la cual funciona como un filtro de señales, eliminando aquellos mensajes innecesarios y amplificando aquellos que considera más importantes mediante la liberación de neurotransmisores excitatorios (promueven el proceso nociceptivo) y neurotransmisores inhibitorios (disminuyen la sensación dolorosa). Finalmente, la información desde la médula espinal es transmitida hasta los centros superiores mediante neuronas de proyección (Eblen-Zajjur 2005).

Los principales neurotransmisores excitatorios son glutamato, sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Los neurotransmisores inhibitorios más comunes son GABA, somatostatina, encefalinas y los opiáceos, y cada uno de ellos tiene un rol importante en la vía de señalización del dolor. Considerando la comunicación entre dos neuronas; una jugará el rol de neurona presináptica y otra de neurona postsináptica, con su respectivo espacio sináptico entre ellas. Ejemplificando el proceso de transmisión de la señal dolorosa, el neurotransmisor excitatorio glutamato es liberado al espacio sináptico tras la despolarización de la neurona presináptica. Una vez libre, viaja a la neurona

postsináptica para agonizar a los receptores AMPA (receptores ionotrópicos). Cuando el glutamato llega a la neurona postsináptica se acopla al receptor originando un cambio conformacional, lo que produce, la entrada y salida de iones sodio y potasio del interior de la célula, es decir, una despolarización y un potencial de acción, transmitiendo la información de neurona en neurona hasta centros superiores. Estas despolarizaciones inciden en otros canales ionotrópicos como los receptores NMDA, que hasta el momento se encontraban inactivos debido al bloqueo del poro por un ion de magnesio. Sin embargo, la generación de potenciales de acción en la neurona permite la migración del ion magnesio y la entrada de iones calcio al interior de la célula, originando la activación de segundos mensajeros como proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC), así como calmodulina. Como consecuencia de estos procesos, se incrementa la expresión de receptores AMPA y NMDA, favoreciendo así la velocidad de respuesta hacia el glutamato en procesos subsecuentes. Con el neurotransmisor GABA pasa lo contrario, cuando es liberado al espacio sináptico es captado por los receptores de la neurona postsináptica (Paoletti et al. 2007). En general, existen dos tipos de receptores y mecanismos de acción para el neurotransmisor GABA. GABA_A actúa hiperpolarizando la membrana celular mediante la entrada de iones cloruro al interior de la célula evitando la generación de potenciales de acción (Chebib et al. 2000). El mecanismo de GABA_B es mediante el acoplamiento a proteínas G, encargadas mediante segundos mensajeros, de expulsar los iones de potasio de la neurona y de bloquear la entrada de iones positivos como sodio y calcio, evitando también la generación de potenciales de acción (Chebib et al. 1999). De esta manera, se da la modulación de la señal nociceptiva a través de las neuronas, desde la periferia hasta los centros superiores.

2.2.2 Mecanismos de acción de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos

La actividad analgésica de la capsaicina está directamente relacionada con la sustancia P. En este sentido, las fibras nerviosas sensoriales C, la capsaicina, los receptores TRPV1 y NK-1 así como la sustancia P, orquestan las respuestas del sistema nervioso ante situaciones de estrés y dolor térmico e inflamatorio persistente. La sustancia P es un neurotransmisor que se libera por estímulos físicos y químicos, e interacciona con los receptores NK-1 provocando una respuesta inflamatoria y sensibilización nociceptiva, incrementando la transmisión de estímulos dolorosos desde la periferia hasta el SNC (Lynn 1990). La biosíntesis, el almacenamiento y transporte de este péptido se ve afectado por la exposición a capsaicina que, tras la interacción con el receptor TRPV1 y la subsecuente

despolarización de la membrana celular, libera la sustancia P presente en el reservorio celular (Figura 5) (Kort et al. 2012). Después de la exposición repetida a capsaicina, se inhibe la biosíntesis y el transporte axonal de la sustancia P, lo que conlleva a una depleción de la misma en el SNC y periférico, favoreciendo que los impulsos nociceptivos no se transmitan al cerebro, evitando de esta manera, sentir dolor (Baumann et al. 1991).

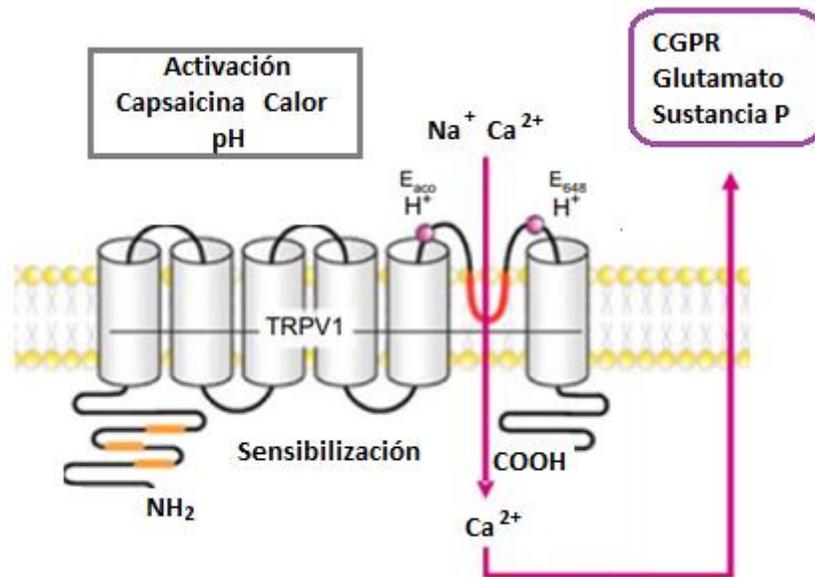


Figura 5. Factores que provocan la activación y sensibilización del receptor TRPV1. La afluencia de Ca²⁺ provoca la liberación de agentes pro-algésicos (glutamato, sustancia P, CGPR). Adaptado de Kort et al. 2012

Respecto del mecanismo de acción subyacente al efecto antinociceptivo de la afinina, Déciga-Campos y colaboradores estudiaron la vía de señalización en un modelo de ácido acético en ratón. Previo a la administración de los tratamientos y de ácido acético, los ratones se pretrataron con los antagonistas naltrexona, PCPA y flumazenilo, correspondientes a la vía de señalización de los receptores opioides, serotoninérgicos y gabaérgicos, respectivamente. El conjunto de datos sugiere que afinina puede activar estas tres principales vías de antinocicepción, sin embargo, la forma en que actúa sobre estas vías sigue sin ser determinado. En este mismo estudio se analizó la participación de afinina en la vía del óxido nítrico- GMPc siendo los resultados positivos a su participación, similares a los de otros analgésicos no esteroideos (AINEs) (Déciga-Campos et al. 2010). En un estudio a fin, de la Rosa-Lugo y colaboradores determinaron la participación del receptor TRPV1 en el mecanismo de señalización de afinina y otras alcaloides similares en un modelo de dolor orofacial en ratón. Primeramente, los ratones fueron pretratados con

capsazepina, antagonista del receptor TRPV1, y posteriormente se administraron las alcanmidas y formalina. En el modelo experimental se midió el tiempo de tallado facial, considerando a este, como una conducta nociceptiva. Los ratones pretratados con el antagonista previenen el efecto antinociceptivo de las alcanmidas. Por lo que, se asume que el receptor TRPV1 participa en el mecanismo de señalización de afinina (de la Rosa-Lugo et al. 2017). Respecto a hexahidroafinina, hasta el momento no se tienen evidencias de su vía de señalización. Otras vías de señalización asociadas con las alquilamidias son las del sistema endocannabinoide. Los receptores cannabinoides suelen distinguirse por su distribución en el cuerpo. Esto es, los receptores CB1 predominan en el SNC y los receptores CB2 son expresados primordialmente en células inmunitarias. Sin embargo, el hecho de que CB1 tenga mayor presencia en sistemas centrales no quiere decir que no se encuentre en monocitos, macrófagos, osteoclastos y células dendríticas. De la misma manera, a pesar de que los receptores CB2 se expresan mayormente en la periferia, también se encuentran presentes en neuronas cerebrales (Onaivi et al. 2006). Se ha descrito que, en patologías como esquizofrenia, náuseas, vómitos, cirrosis y ansiedad, están involucrados los receptores CB1 mientras que, en la osteoporosis, inflamación gastrointestinal, aterosclerosis y lesiones hepáticas están involucrados los receptores CB2. El dolor, junto con otros padecimientos, involucra la participación de ambos receptores (Gertsch 2008). Algunas alcanmidias presentes en la familia Asteraceae, con longitudes de cadena de ácido graso e insaturaciones variables, están estrechamente relacionadas con el sistema cannabinoide. Actúan como activadores de los receptores CB1 y CB2, como inhibidores de los mediadores inflamatorios, además de tener actividad inhibitoria sobre la enzima COX-2 y sobre la enzima encargada de la hidrólisis de los ácidos grasos (FAAH) (Gertsch 2008, Boonen et al. 2010).

2.3 TOXICIDAD

2.3.1 Generalidades

Se entiende por toxicidad el “estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes químicos y/o físicos sobre la estructura o función de los sistemas vivos, así como la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles” (Hayes 1975). Según sea el tiempo de exposición al principio activo, existen diferentes modelos y metodologías de

evaluación, regulados por normas y lineamientos emitidos por instituciones como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Por mencionar un caso, los estudios de toxicidad aguda están diseñados para proporcionar información que permita clasificar a las sustancias por el grado de daño observado tras una única administración. El objetivo primordial de estos ensayos es el establecimiento de la dosis letal media (DL_{50}) así como el registro de los signos de toxicidad durante 14 días. Generalmente estos estudios son realizados en animales de laboratorio como roedores, y clasificados por categorías según su vía de administración y el valor de DL_{50} obtenida. Una de las principales categorías de clasificación la propone el Sistema Globalmente Armonizado (GHS, por sus siglas en inglés), en donde se proponen 5 niveles de toxicidad. La categoría 1 se refiere a sustancias altamente tóxicas ($DL_{50} \leq 5 \text{ mg/Kg}$) y la categoría 5 a compuestos relativamente inocuos ($DL_{50} = 2000\text{-}5000 \text{ mg/Kg}$) (Allen 2010). Algunos de los lineamientos experimentales más conocidos y aceptados en la literatura son los descritos en las guías de la OCDE. Existen metodologías referentes a ensayos de toxicidad oral aguda (OCDE 423); enfocados al ajuste de la dosis a evaluar (OCDE 420) y la relacionada al “*up-and-down procedure*” (UDP), método alternativo en donde no se utiliza la DL_{50} convencional para estimar el riesgo de toxicidad aguda (OCDE 425).

Sin embargo, las anteriores no son las únicas metodologías aceptadas. El método del Lorke para la estimación de la DL_{50} ha sido ampliamente utilizado. Este método no tiene limitaciones y se aplica a principios activos, productos químicos, agrícolas e industriales, y es utilizado para todas las vías de administración. Lorke sugiere que con 13 animales experimentales es posible obtener la DL_{50} e información importante sobre signos de intoxicación inmediatos (Lorke 1983). Otro de los estudios relevantes que se realizan para establecer el perfil toxicológico de nuevos principios bioactivos son las pruebas de toxicidad a dosis repetida, cuyo objetivo es proporcionar información de la seguridad en el uso de los principios activos, suponiendo la necesidad de administraciones sucesivas en los pacientes. Estos experimentos consisten en la administración repetida durante un mínimo de 14 días; periodo que se puede extender hasta 9 meses o más, dependiendo de los objetivos de la investigación y del uso de los principios activos. Los elementos más importantes para considerar en los ensayos son los animales (especie, sexo y tamaño de grupo), la dosis, el periodo de experimentación y la vía de administración. Cabe mencionar que los estudios de toxicidad a dosis repetida permiten identificar cambios cuantales como la muerte o

cambios graduales como comportamiento anormal, aletargamiento, agitación, agresividad, dificultad motora, inflamación, cambios en el pelaje/piel, alteración en membranas mucosas, cambios en el consumo de agua y alimento, entre otros. Además, brinda información de los posibles órganos diana; su estado y sus alteraciones morfológicas (tamaño y daños aparentes en los tejidos) ([OCDE 407](#)).

En la toxicología genética se consideran dos tipos de estudios importantes, aquellos que miden el daño directo e irreversible al ADN que es transmisible a la siguiente generación celular (mutagenicidad) y aquellos que miden los efectos potencialmente reversibles sobre el ADN o sobre mecanismos involucrados en la preservación de la integridad del genoma (genotoxicidad). Al finalizar las pruebas, estos estudios permiten el análisis sanguíneo para la identificación de alteraciones de los parámetros bioquímicos y niveles enzimáticos más importantes; estudios histopatológicos, de genotoxicidad y mutagenicidad esto es; alteraciones cromosómicas debido a la exposición prolongada al fármaco. Existen protocolos experimentales como el enfocado en el estudio de toxicidad oral a dosis repetida en roedores durante 28 y 90 días ([OCDE 407](#), [OCDE 408](#)), ensayos asociados a la toxicidad crónica ([OCDE 452](#)), lineamientos referentes a la determinación de la mutagenicidad, comúnmente conocido como prueba de AMES ([OCDE 471](#)), los lineamientos relativos a las pruebas de genotoxicidad (aberraciones cromosómicas) ([OCDE 473](#), [OCDE 474](#), [OCDE 487](#)), que son base para el establecimiento del perfil toxicológico de una sustancia.

2.3.2 Estudios de toxicidad de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos

La capsaicina es un saborizante natural usado principalmente como condimento en la gastronomía y como coadyuvante en el tratamiento del dolor crónico. Su fórmula mínima es $C_{18}H_{27}NO_3$ y número CAS 404-86-4. En la naturaleza y en las formulaciones farmacéuticas disponibles, la capsaicina se encuentra acompañada de otros capsaicinoides estructuralmente similares, por ejemplo, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homodihidrocapsaicina. En general, la relación de capsaicina-dihidrocapsaicina respeta las proporciones 1:1 y 2:1 ([Govindarajan et al. 1991](#)). Capsaicina exhibe diferentes valores de DL_{50} dependiendo de la especie y sexo de los animales experimentales, el vehículo utilizado y vía de administración. Por ejemplo, Saito reportó el valor de DL_{50} tras la administración oral de capsaicina disuelta en propilenglicol en ratones y ratas. Para ratones, los valores de

DL₅₀ fueron de 118.8 mg/Kg y 97.4 mg/Kg para macho y hembra, respectivamente. Para ratas, el valor de DL₅₀ correspondió a 161.2 mg/Kg para macho y 148.1 mg/Kg para hembra (Saito et al. 1996). En otro estudio con ratones, Glinsukon determinó que la DL₅₀ de capsaicina disuelta en etanol y dimetilsulfóxido variaba entre 60-75 mg/Kg y 122-294 mg/Kg, respectivamente, usando la vía de administración intragástrica (Glinsukon et al. 1980). En ambos estudios se identificaron signos de toxicidad como salivación, eritemas en la piel, cianosis, temblores y convulsiones clónicas. Todos los animales sobrevivientes se recuperaron en un periodo de 6-24 h. Se consideró, como posible causa de muerte, la hipotensión y parálisis respiratoria, sin embargo, este fenómeno aún no se encuentra totalmente claro. La toxicidad subcrónica de algunos extractos de chile y/o capsaicina en general consisten en afectaciones a nivel gastrointestinal, específicamente sobre la mucosa gástrica. Los efectos adversos son notorios tras periodos prolongados de exposición; en periodos de 60 días o menos no se observan afectaciones sobre órganos principales o parámetros bioquímicos sanguíneos (Monserenusorn 1983). No obstante, Agrawal y colaboradores realizaron estudios en ratones, administrando el extracto etanólico de chile en su alimento durante un periodo de 14 meses. Al final de la prueba se observaron altos índices de mortalidad y cambios histopatológicos en hígado, estómago y riñones. En particular, se encontró necrosis hepática, células inflamatorias en las lesiones, y fibrosis (Agrawal et al. 1987).

Los estudios de mutagenicidad para capsaicina y sus extractos han sido controversiales. Utilizando las bacterias de *Salmonella typhimurium*, Toth y colaboradores demostraron el efecto mutagénico de capsaicinoides en la prueba de AMES. El estudio reveló que capsaicina indujo mutaciones genéticas en la cepa TA98 sin embargo, no tuvo afectaciones en las cepas TA97, TA100 y TA102 (Toth et al. 1984). En este sentido, según lo reportado por Nagabhushan, la mezcla capsaicina:dihidrocapsaicina (80:20) exhibió mutagenicidad en varias cepas de *S. typhimurium* (Nagabhushan et al. 1985); actividad que no coincide con los estudios publicados por Gannett y colaboradores, en los que concluyen que capsaicina y dihidrocapsaicina no tuvieron actividad mutagénica para la cepa TA98 y TA1535 (Gannett et al. 1988). En el mismo contexto, se le ha atribuido actividad genotóxica (inducción de formación de micronúcleos) a capsaicina y extractos de chile en médula ósea de ratón (Villaseñor et al. 1994). Díaz estudió la capacidad genotóxica de capsaicina a 1.46 y 1.94 mg/Kg (i.p) en ratones durante un periodo de 32 días. La actividad genotóxica fue

determinada por la generación de eritrocitos normocromáticos micronucleados (MN-NE). Los resultados concluyeron que la dosis más alta de capsaicina provocó la aparición de células micronucleadas a partir del día 16. Mientras que la dosis de 1.46 mg/Kg provocó respuesta genotóxica leve hasta el día 32. Estos resultados indican que la capsaicina es un compuesto genotóxico capaz de producir aberraciones cromosómicas en células animales (Díaz et al. 1995).

Si bien capsaicina y los extractos de las diferentes variedades de Chile son los más estudiados por su alto interés gastronómico y farmacológico, no son las únicas alcanidas de importancia biológica. Los extractos de *H. longipes* (A. Gray) S. F. Blake, afinina y alcanidas afines, son ampliamente usadas para el tratamiento del dolor, en especial, del dolor dental. En un estudio publicado por Déciga-Campos y colaboradores determinaron la toxicidad aguda de afinina en ratones ICR utilizando el método de Lorke. La DL₅₀ estimada fue significativamente mayor (113 mg/Kg) a la requerida para producir antinocicepción (Déciga-Campos et al. 2010, 2012). En uno de estos mismos estudios, se determinó el efecto mutagénico mediante la prueba de AMES de afinina y el extracto de *H. longipes* en las cepas bacterianas TA98, TA100 y TA102 de *S. typhimurium* (His) con y sin la fracción microsomal S9. Como resultado de los estudios, no se observaron efectos mutagénicos en ninguna de las sustancias evaluadas (Déciga-Campos et al. 2012). En contraste, el efecto antimutagénico de afinina (25 y 50 µg/mL) fue demostrado utilizando la prueba de AMES en las mismas cepas bacterianas (Arriaga-Alba et al. 2013). El efecto citotóxico del extracto metanólico de *Acmella oleracea* (especie reportada con efecto diurético) y afinina fue determinado por Gerbino y colaboradores utilizando células de riñón HEK293 humanas. Ambos provocaron muerte celular de manera dosis dependiente; con concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 234 y 260 µg/mL, respectivamente. Estos estudios son importantes porque demuestra que las concentraciones utilizadas para observar los efectos antinociceptivos fueron menores a 100 µg/mL (Gerbino et al. 2016), muy lejanas a las de los efectos tóxicos.

2.4 FARMACOCINÉTICA

2.4.1 Generalidades

En la frase “La dosificación adecuada de los fármacos constituye el arte de la práctica anestésica” se enfatiza la importancia del conocimiento del correcto uso de los fármacos en

la terapéutica, esto es, las dosis óptimas producen el efecto deseado, y administradas de una manera precisa, dan lugar a una rápida recuperación de los pacientes (Aguilera 2008). En este sentido, el conocimiento de los procesos a los cuales es sometido el fármaco en el cuerpo, así como el correcto manejo de los elementos fisiológicos que alteran estos procesos, son la directriz de una correcta posología en la terapéutica médica para convertir la “dosificación” en un “arte”. La farmacocinética es la rama de la farmacología que se ocupa especialmente de los procesos a los cuales un fármaco es sometido en su paso por el cuerpo, es decir, estudia la concentración de un fármaco o sus metabolitos en los distintos compartimentos corporales, desde su administración hasta su excreción, así como su relación con la respuesta farmacológica. En particular, se estudian los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME). Para poder entender la cinética del fármaco, es fundamental conocer las propiedades fisicoquímicas del principio activo y de los excipientes, así como las características de las membranas biológicas, las rutas de administración, las interacciones con proteínas y la susceptibilidad que tienen a los efectos enzimáticos. El objetivo de toda terapéutica es alcanzar el efecto deseado evitando los efectos adversos mediante una dosificación adecuada, para ello es necesario conocer la evolución temporal de la concentración del fármaco en el organismo. Esto es, conocer las concentraciones plasmáticas del principio activo a su paso por el organismo, así como las modificaciones que sufre en el trayecto, a través del establecimiento de parámetros cuantificables derivados de cálculos matemáticos que brindan información puntual de las características del principio activo y su interacción con el organismo, con el fin de establecer la posología y vía de administración que permitan asegurar su acción farmacológica en las dianas terapéuticas (Tabla 1).

Las constantes biológicas de los fármacos que definen su comportamiento farmacocinético están basadas en las relaciones de proporcionalidad que existen entre las cantidades de fármaco presentes en diferentes compartimentos. El modelo monocompartimental considera que todo el organismo constituye un único compartimento acuoso, en el que se distribuye el fármaco de forma instantánea y homogénea. Cuando este modelo es asumido, los cálculos que permiten determinar los parámetros que describen el perfil cinético del fármaco son relativamente simples. Otro de los elementos a considerar al estudiar la farmacocinética de un fármaco es la vía de administración, cuando el fármaco es administrado de manera intravenosa, se introduce de manera instantánea al compartimento

(sangre y tejidos altamente irrigados), en donde el volumen de distribución será el que éste ocupe en el compartimiento central. Simultáneo al proceso de distribución, se presenta el proceso de eliminación, orquestado por una serie de reacciones químicas llevadas a cabo en el hígado, que permiten la transformación del principio activo en metabolitos fácilmente excretables.

Tabla 1. Conceptos básicos de los parámetros farmacocinéticos más comunes

Concepto	Definición
Absorción	Proceso de liberación del fármaco de su forma farmacéutica, su disolución y entrada al organismo desde el lugar de la administración
Depuración (Cl)	Volumen de plasma que queda libre de fármaco por unidad de tiempo (mL/min)
Área bajo la curva (ABC)	Relaciona las variables de la concentración plasmática del fármaco en función del tiempo
Biodisponibilidad	Fracción de la dosis administrada del fármaco que llega inalterada al torrente circulatorio
Concentración máxima (C_{máx})	Concentración máxima del fármaco en sangre
Concentración mínima (C_{mín})	Concentración mínima del fármaco en sangre
Constante de eliminación (K_e)	Parámetro de velocidad que está en función de cómo se elimina el analito de la sangre por parte de los órganos
Constante de absorción (K_a)	Parámetro de velocidad que está en función de la ganancia de concentración del analito en sangre
Distribución	Una vez que se ha producido el fenómeno de absorción, o bien el fármaco ha pasado directamente al torrente sanguíneo se distribuye hacia los tejidos y otros fluidos. La velocidad y la extensión de este proceso depende fundamentalmente de las características fisicoquímicas del fármaco, las barreras biológicas que debe atravesar, así como de su unión a proteínas plasmáticas
Excreción	Capacidad del organismo de eliminar las sustancias extrañas directamente (excreción) o bien después de convertirlas en sustancias fácilmente eliminables (metabolismo)
Semivida de absorción (t_{1/2a})	Tiempo que tarda en reducirse a la mitad el número de moléculas que quedan por absorberse
Tiempo de vida media (t_{1/2})	Es el tiempo transcurrido hasta que la concentración plasmática del fármaco se reduce a la mitad. Permite conocer el periodo de permanencia del fármaco en el organismo, la frecuencia con que hay que administrarlo, el tiempo en que tardará en eliminarse del organismo, etc
Tiempo máximo (t_{máx})	Es el tiempo expresado en min que indica el momento en el que el fármaco alcanza la concentración máxima en sangre
Volumen de distribución (V_D)	Después de la administración de un fármaco en el organismo éste puede distribuirse en el agua de los líquidos corporales (plasma y líquido extracelular) o puede unirse fuertemente a los tejidos. El volumen de distribución en el organismo es un volumen aparente, no se trata de un valor real sino de un parámetro farmacocinético que proporciona un valor matemático indicativo del grado de distribución tisular del fármaco

El proceso de eliminación se considera de primer orden, dado que la tasa de eliminación del fármaco es proporcional a la concentración de éste en sangre. Este proceso se

caracteriza por la llamada constante de eliminación (K_e), en donde su valor matemático se expresa de forma negativa debido a que la concentración del fármaco decrece con el tiempo. En general, los parámetros farmacocinéticos se obtienen graficando los datos experimentales de las concentraciones plasmáticas (en forma logarítmica) *versus* el tiempo. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se define como el tiempo requerido por el organismo para eliminar la mitad del fármaco presente en él. La depuración está asociada al volumen teórico de plasma desde el cual es removido el fármaco por el metabolismo y la excreción por unidad de tiempo, y está en función del V_D y la K_e . En una administración oral, el ingreso del fármaco a la circulación sanguínea no es instantáneo, inicia de forma creciente en un curso temporal, hasta llegar a su concentración máxima, caracterizada por una constante de absorción (K_a) seguido de la fase de eliminación (Figura 6).

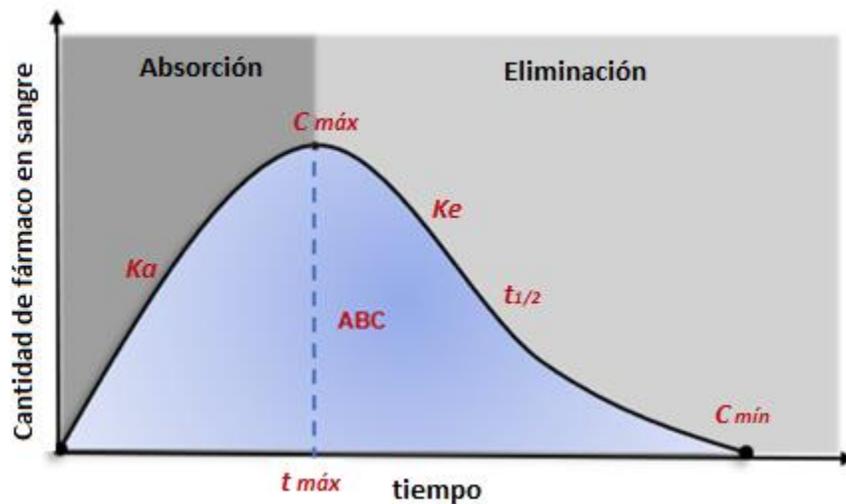


Figura 6. Principales parámetros farmacocinéticos tras la administración oral de un fármaco

El tiempo de concentración máxima depende de la relación entre la velocidad de absorción y la velocidad de eliminación. El área bajo la curva (ABC) es la relación entre la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica y la depuración del fármaco.

La correcta posología de los fármacos no depende únicamente de las propiedades fisicoquímicas del principio activo, sino que en gran medida influyen factores relacionados con el paciente; algunos de estos últimos pueden utilizarse para predecir los parámetros farmacocinéticos de poblaciones con características particulares. Para un fármaco cualquiera, es diferente la farmacocinética observada en pacientes niños que, en pacientes geriátricos, pues factores como sexo, edad, genética y padecimientos de salud afectan todo

el proceso ADME. Por lo que el conocimiento de los principios de la farmacocinética permite a los expertos de la salud ajustar las dosis del fármaco de manera precisa, según corresponda al paciente, para garantizar el correcto manejo de las enfermedades.

2.4.2 Estudios de farmacocinética de capsaicina, afinina y hexahidroafinina. Ejemplos selectos

Capsaicina es un metabolito bioactivo que se absorbe rápidamente en piel, de ahí que sus formulaciones farmacéuticas disponibles son de uso tópico en presentación de gel, crema, ungüento y parche. Pershing y colaboradores determinaron el efecto de diferentes vehículos sobre la cinética de capsaicinoides en la piel humana. Para ello, aplicaron sobre piel una preparación de capsaicinoides (55% capsaicina, 35% dihidrocapsaicina y 10% otros capsaicinoides) en tres diferentes vehículos (alcohol isopropílico, aceite mineral y propilenglicol). En primera instancia se corroboró que capsaicina fue altamente permeable a esta barrera; las concentraciones máximas de capsaicinoides se alcanzaron rápidamente en el estrato córneo humano de forma dosis dependiente, sin embargo, mostró mejor liberación en alcohol isopropílico. Las concentraciones máximas ($C_{máx}$) en alcohol isopropílico, propilenglicol y aceite mineral fueron de 16.1, 6.2 y 6.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue similar para todos los vehículos siendo un estimado de 24 h (Pershing et al. 2004).

En el mismo contexto, un amplio estudio de distribución y eliminación de curcumina, capsaicina y piperina fue realizado por Suresh y Srinivasan. Capsaicina (30 mg/Kg) fue administrada oralmente en ratas albinas, las cuales fueron sacrificadas a diferentes tiempos para la cuantificación este metabolito en muestras sanguíneas y órganos principales. Cerca del 94% de capsaicina administrada oralmente fue absorbida; solo una pequeña porción fue eliminada de forma intacta a través de la orina. Las concentraciones máximas en suero, sangre e intestino fueron detectadas posterior a 1 hora de administración (1.9, 11.1 y 1057.0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Mientras que en el hígado (44.7 $\mu\text{g/tejido}$) y riñones (6.73 $\mu\text{g/tejido}$) se detectaron concentraciones máximas transcurrido un periodo de 3 y 6 h, respectivamente. Posterior a 24 h, la concentración de capsaicina fue baja y a las 48 h prácticamente indetectable. Los valores de los parámetros $t_{1/2}$ y área bajo la curva (ABC) fueron de 7.88 h y 15.6 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ (Suresh et al. 2010). Por otra parte, el estudio de Chanda y colaboradores demostró que el metabolismo de capsaicina fue similar en microsomas

procedente de humanos, ratas y perros; realizándose principalmente por la acción de los microsomas hepáticos (Chanda et al. 2008). De forma tópica o intragástrica, capsaicina es rápidamente absorbida, transportada al torrente sanguíneo y metabolizada en el hígado. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los capsaicinoides se metabolizan por diferentes vías: (1) hidrólisis del enlace amida y desaminación oxidativa de la vanililamina formada, (2) hidroxilación del anillo de vanillilo, posiblemente a través de la epoxidación, (3) oxidación de un electrón del anillo fenol formando radicales fenoxi y dímeros capsaicinoides, y (4) por oxidación en el carbono terminal de la cadena de ácido graso (Surh et al. 1995). Metabolitos como 16-hidroxicapsaicina, 17-hidroxicapsaicina y 16,17-deshidrocapsaicina además de vainillina, vanililamina, ácido vanílico, alcohol vanílico (en forma libre o como glucurónidos) han sido identificados tras la administración oral de capsaicina y dihidrocapsaicina (Chanda et al. 2008, Kawada et al. 1985). Estudios de Miller y colaboradores, demostraron la unión covalente de dihidrocapsaicina a proteínas microsómicas hepáticas, así como la formación de intermedios electrofílicos (epóxidos, radicales fenoxi o derivados de tipo quinona) y la subsiguiente unión covalente a macromoléculas celulares (Miller et al. 1983). Estos metabolitos formados pueden relacionarse con la etiología de la toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad inducida por la capsaicina (Surh et al 1995).

La farmacocinética de alquilamidas presentes en *Spilanthes acmella* y diferentes ejemplares de género *Echinacea* se han investigado después de su uso vía oral y tópica. Woelkart y colaboradores estudiaron los parámetros farmacocinéticos de algunas alcanmidas presentes en *Echinacea angustifolia* tras la administración oral de 2.5 mL del extracto etanólico o placebo en humanos. La cuantificación de las alcanmidas la realizaron analizando el plasma sanguíneo mediante HPLC. Dado que no se administraron compuestos puros, en primera instancia establecieron la composición del extracto. Siendo el compuesto mayoritario una alcanmida con residuo isobutilamina y una cadena de ácido graso de C12 y 4 insaturaciones en su cadena con $C_{m\acute{a}x} = 10.88 \pm 6.50$ ng/mL y $t_{m\acute{a}x} = 30$ min. Las alcanmidas restantes se encontraron, en general, en proporción 1:4 respecto del compuesto mayoritario y sus valores farmacocinéticos no mostraron diferencias significativas ($C_{m\acute{a}x} = 0.96-2.10$ ng/mL y $t_{m\acute{a}x} = 20-30$ min) (Woelkart et al. 2005). Matthias et al. estudiaron la biodisponibilidad de alquilamidas presentes en *Echinacea purpurea* y *Echinacea angustifolia* en diferentes presentaciones. Los voluntarios ingirieron oralmente 9

mL de una formulación preparada con 300 mg/mL de *E. purpurea* y 200 mg/mL de *E. angustifolia* o tres tabletas constituidas por 675 mg/tableta de *E. purpurea* y 600 mg/tableta *E. angustifolia*. Los resultados sugirieron que, independientemente de la forma farmacéutica, las alquilamidias se absorbieron rápidamente; fueron detectadas en plasma 10 min después de su administración. En general, existió mayor variación de las concentraciones plasmáticas de la formulación en tabletas debido al proceso no uniforme de disgregación. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros farmacocinéticos, la $C_{m\acute{a}x}$ se encontró entre el rango de 114-136 ng/mL en plasma con $t_{m\acute{a}x} = 20-30$ min (Matthias et al. 2007). Custódio de Souza y colaboradores estudiaron el efecto del extracto de *Acmella oleracea* (especie rica en afinina) sobre el desarrollo embrionario del pez cebra. Sus resultados concluyeron que, a pesar de haber una mayor disposición de huevos en los grupos tratados con el extracto, se observaron efectos teratogénicos y deformaciones en cola, edema cardiaco y yema, además de escoliosis y retraso del crecimiento. Sus resultados motivaron a realizar un estudio *in silico* del metabolismo, farmacocinética y toxicidad de afinina con diferentes programas comerciales. En la **Figura 7** y **Tabla 2** se muestran las estructuras químicas de los metabolitos principales de afinina, las reacciones químicas de procedencia, así como la predicción de algunos efectos secundarios. La predicción de parámetros farmacocinéticos, como solubilidad en agua, absorción en piel y en las células Caco-2, fueron obtenidos con el programa PreaADMET para afinina y sus metabolitos como se muestra en la **Tabla 3** (Custódio de Souza et al 2019).

Tabla 2. Reacciones químicas y metabolitos más probables de afinina

Metabolito	Fase del metabolismo	Reacción	DL ₅₀ (mg/Kg)	Predicción de efectos secundarios (MetaTox)
M8	I Oxidación	Epoxidación	46.49	Enfermedades cardiacas, insuficiencia renal y potencial carcinogénico
M18	II Biotransformación	N-acetilación	26.28	No mostró efectos secundarios
M26	I Oxidación	Hidroxilación alifática	33.14	No mostró efectos secundarios
M28	II Biotransformación	Glutacionación	327.74	Carcinógeno para el riñón
M33	I Oxidación	C-oxidación	28.69	Potencial carcinogénico
M35	II Biotransformación	N-glucuronidación	81.34	Toxicidad en nefronas y carcinógeno para el riñón

Tabla 3. Predicción de valores farmacocinéticos de afinina y sus metabolitos principales

Metabolito	S _{agua} (cm/h)	P _{piel}	Unión a proteínas (%)	Permeabilidad a BHE (C _{cerebro} /C _{sangre})	Permeabilidad a Caco-2
Afinina	384.73	-0.86	100	6.71	53.01
M8	845.44	-1.16	83.73	1.57	56.29
M18	1366.64	-1.11	93.16	2.24	23.66
M26	5553.90	-1.29	68.86	0.40	26.30
M28	2344.76	-1.25	90.15	0.72	34.14
M33	2358.30	-1.16	90.42	1.13	27.52
M35	257.65	-2.84	33.00	0.03	0.62

Datos toxicológicos adicionales para afinina y sus 6 metabolitos principales fueron obtenidos usando el software Derek. En menor o mayor grado, los datos indican que todos los compuestos causan sensibilidad en la piel; esta propiedad se asoció a la formación de grupos alfa o beta insaturados, y los grupos epóxidos, aldehídos y cetonas. El metabolito M8 resultó ser el causante de mayores daños a la salud, debido a su alta probabilidad de causar daños cromosómicos, irritación en los ojos, en la piel y en las vías respiratorias en humanos, debido quizá, a la presencia del grupo epóxido en su estructura. Los metabolitos restantes no resultaron con alertas toxicológicas importantes (Custódio de Souza et al. 2019).

En la estructura química de la afinina resalta una insaturación *cis* en su cadena de ácido graso, sin embargo, en la predicción *in silico* realizada por Custódio de Souza, se representan como insaturaciones de tipo *trans* en las moléculas resultantes del metabolismo. Del mismo modo, se sugiere la reacción de glutacionación en un extremo del residuo isobutilo, no obstante, estas reacciones son más comunes en los enlaces alfa,beta-insaturados.

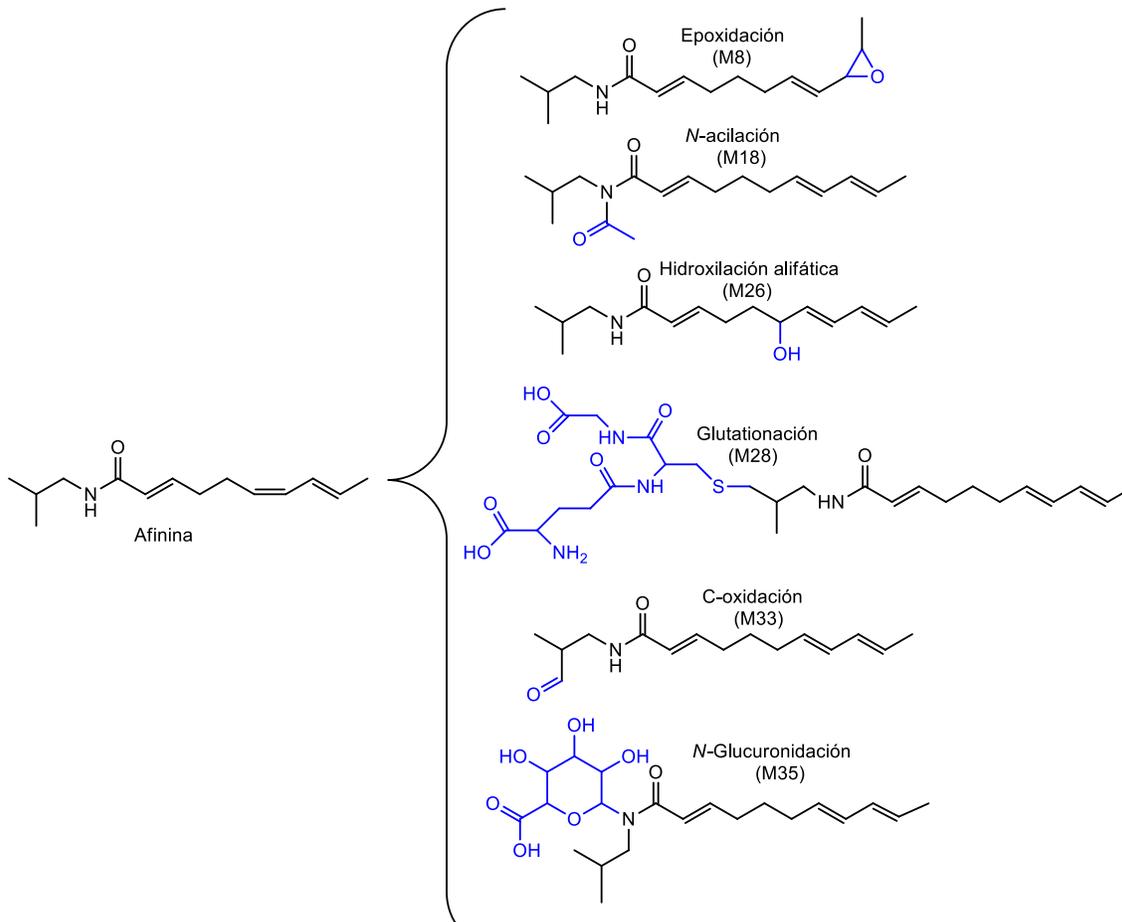


Figura 7. Principales metabolitos del estudio *in silico* de afinina (MetaTox). Adaptado de Custódio de Souza et al. 2019

A decorative graphic on the left side of the page, consisting of a thick dark blue vertical bar and a medium blue arrow pointing to the right, which is positioned behind the section header.

3. JUSTIFICACIÓN

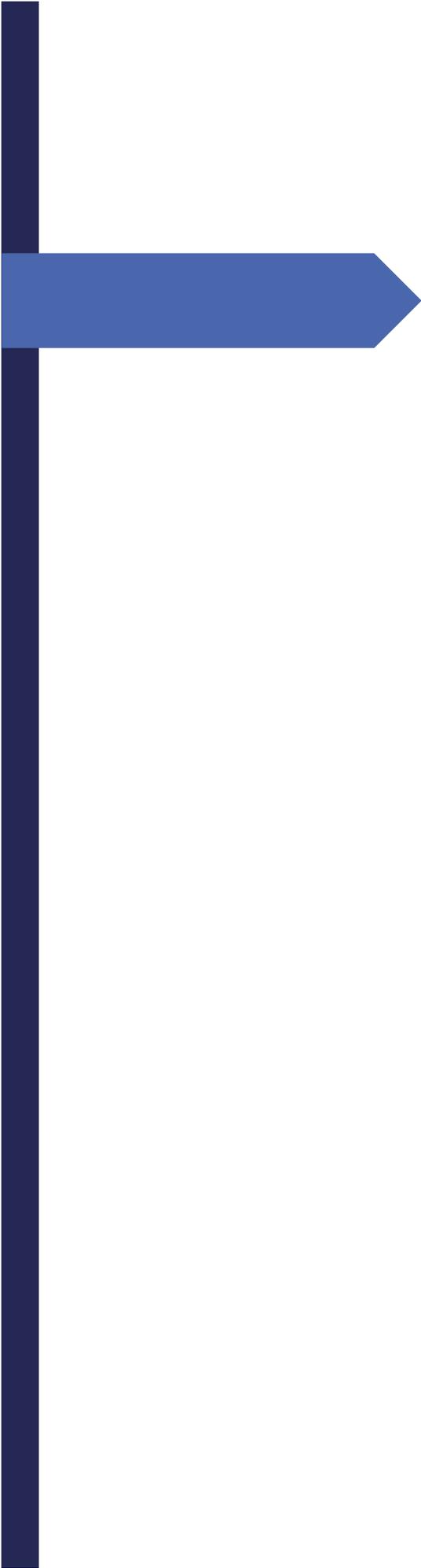
3. JUSTIFICACIÓN

La salud es conceptualizada como el completo estado de bienestar físico, mental y social que tienen los individuos y concebida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un derecho humano fundamental. Este concepto ha sido directriz de innumerables investigaciones científicas enfocadas, entre otras, a estudios relacionados con el tratamiento del dolor; dado que no se puede conceptualizar como “completo estado de salud” a aquellos casos que presentan dolor en sus diferentes niveles. En México, como en otras partes del mundo, el tratamiento del dolor es insuficiente; dado que son innumerables sus fuentes de origen. Es importante señalar que, lamentablemente el 80% de las personas que lo padecen, hacen referencia a que su intensidad limita su calidad de vida. Más aún, se ha documentado que el 64% de estos sujetos no recibe un esquema analgésico suficiente y el 15% de los enfermos se considera “muy insatisfecho” con la analgesia proporcionada por los grupos de salud (Sinais, 2019).

El creciente interés científico por la búsqueda y desarrollo de compuestos bioactivos con propiedades analgésicas ha llevado a la obtención, caracterización y evaluación farmacológica de metabolitos de fuentes naturales y sintéticas como potenciales agentes analgésicos útiles para el tratamiento del dolor. En los últimos tiempos se ha incrementado el estudio farmacológico de derivados tipo amida de plantas llamados alcanmidas, *N*-alquilamidas, alquenamidas o alquenilamidas. Algunos metabolitos pertenecientes a este selecto grupo son capsaicina (alcamida mayoritaria de *Capsicum chinense*), afinina (alcamida mayoritaria de *H. longipes*) y hexahidroafinina (alcamida similar a afinina). Todas ellas con interés farmacológico notable debido a su importante actividad analgésica (Déciga-Campos et al. 2010, de la Rosa-Lugo et al. 2017).

En las investigaciones científicas, además de estudiar la actividad biológica de los metabolitos, es de particular importancia el establecimiento del perfil fármaco-toxicológico de los compuestos bioactivos, es decir, explorar y establecer parámetros que permitan el desarrollo de fármacos seguros útiles en la terapéutica. Para la utilización de cualquier principio activo, es requisito indispensable el conocimiento de su seguridad, eficacia y calidad, esto es, pasar de la utilización empírica de las sustancias, al establecimiento de las bases científicas para su uso racional.

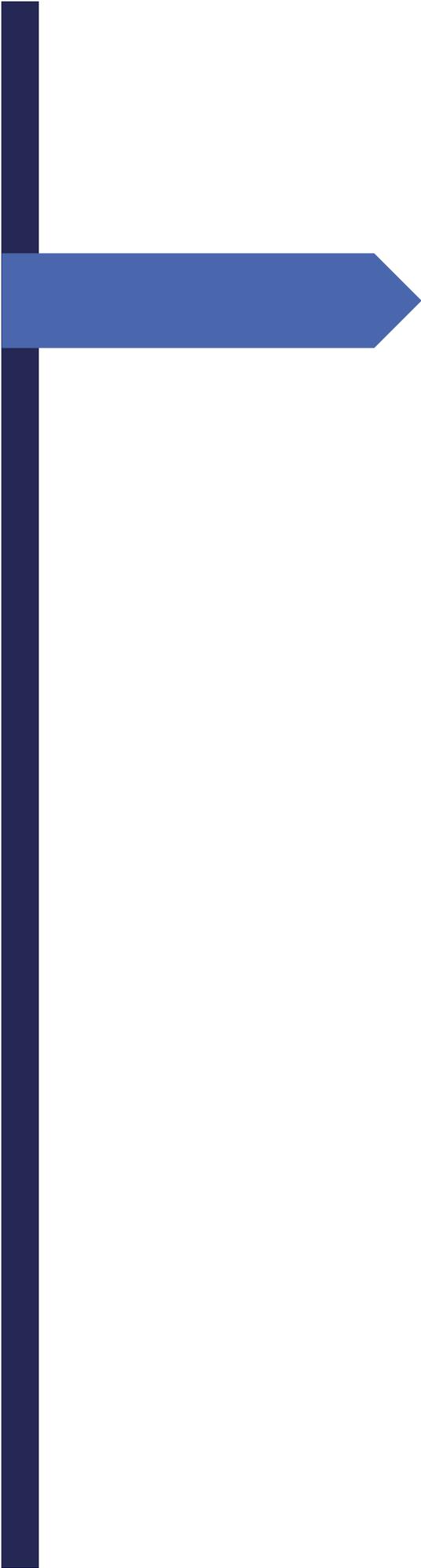
El conocimiento incompleto del origen y mecanismos del dolor, aunado a la falta de comprensión de las estrategias preventivas para su control, las inconsistencias en las prácticas de su evaluación, el mal uso de analgésicos existentes, y la falta de tratamientos analgésicos, han conllevado a una deficiente estrategia en el manejo de este problema de salud pública. Por tal motivo, con la intención de contribuir a los esfuerzos de encontrar alternativas viables para el tratamiento del dolor, el presente trabajo tiene como eje de investigación el establecimiento del perfil toxicológico, farmacocinético y farmacodinámico de afinina y hexahidroafinina, compuestos bioactivos con potencial uso en el tratamiento del dolor.



4. HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

Dada la extensa utilización empírica de fuentes naturales con altos contenidos en alcanidas en el tratamiento del dolor, y tomando en consideración la similitud química y funcional de estos metabolitos secundarios con capsaicina, molécula ampliamente utilizada en la terapéutica de este padecimiento, se podrá establecer el perfil fármaco-toxicológico de las alcanidas afinina y hexahidroafinina con resultados alentadores para su uso en el tratamiento del dolor.



5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1 General

Establecer el perfil fármaco-toxicológico de afinina y hexahidroafinina.

5.2 Específicos

Parte química

- Obtener alcanidas perfectamente caracterizadas químicamente para su evaluación en modelos farmacológicos.

Parte farmacológica

- Establecer los principales parámetros toxicológicos derivados de la exposición aguda y a dosis repetida de afinina y hexahidroafinina en modelos *in vivo*.
- Categorizar a las alcanidas en estudio, dependiendo de su DL_{50} , como compuestos tóxicos, medianamente tóxicos o inocuos, así como identificar los principales signos de intoxicación y sus efectos genotóxicos tras la exposición a dosis repetida.
- Explorar la participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides en el mecanismo de señalización de afinina y hexahidroafinina.
- Determinar los principales parámetros farmacocinéticos de afinina en dos vías de administración en modelos *in vivo*.



6. MATERIAL Y EQUIPOS

6. MATERIAL Y EQUIPOS

6.1 SÍNTESIS Y PROCESOS CROMATOGRÁFICOS

El material de vidrio, espátulas, agitadores magnéticos y otros instrumentos utilizados en las reacciones químicas y procesos cromatográficos fueron lavados con detergente dextran pH 7, enjuagados y secados en un horno a 80 °C durante 12 h previas a su utilización. Los equipos utilizados en la síntesis de las alcanidas fueron: estufa marca Quincy modelo 30 GC para el secado de material, balanza analítica marca Ohaus Voyager Pro modelo VP213CN, parrilla eléctrica marca Corning modelo PC-420 con agitación magnética, y rotavapor marca Büchi modelo R-II para eliminar disolventes a presión reducida. La preparación de las alcanidas para su análisis químico o farmacológico, ya sea en disolvente o en solución salina, se llevó a cabo utilizando un agitador Vortex Genie 2 y un sonicador Brasonic 3510R-DTH en los casos en que resultó necesario.

La caracterización química de los metabolitos se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** Es la herramienta analítica que proporciona información de la estructura (conectividad y estereoquímica) de un compuesto. El fundamento de la RMN consiste en la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético y que, por efecto de esa energía, cambia su orientación. Los espectros de RMN fueron determinados en equipos marca Varían: Inova 400 y Mercury 200. Los desplazamientos químicos (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportaron en partes por millón (ppm) y Hertz (Hz), respectivamente. En todos los casos se utilizó cloroformo deuterado ($CDCl_3$) como disolvente con TMS como referencia interna.
- **Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés):** Es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas

entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar. La identificación definitiva, así como la cuantificación de cada sustancia debe hacerse mediante el empleo de sustancia de referencia. Los criterios de pureza de los compuestos para su evaluación farmacológica fueron determinados en un Cromatógrafo de Gases Agilent Technology 6890 acoplado a un detector de masas 5973N, con modo de ionización por Impacto Electrónico (IE).

- **Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas** (UPLC-MS-QTOF) es una técnica analítica que combina el poder de separación del UPLC con la gran selectividad, sensibilidad y exactitud en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de las muestras. La identificación y cuantificación de afinina se realizó en un equipo de UPLC 1290 acoplado a un detector de masas QTOF 6545 Agilent Technology.

6.2 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE ALCAMIDAS

6.2.1 Animales

En la evaluación toxicológica y la determinación de la participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides fueron utilizados ratones hembra Swiss Webster (25-30 g de peso, 3-4 semanas de edad) del Cinvestav-Sede Sur, Departamento de Farmacología, Ciudad de México. Para el establecimiento de los parámetros farmacocinéticos se utilizaron ratas Wistar (200-250 g de peso, 3-4 semanas de edad) procedentes de la Facultad de Medicina de la UAEM. Ambas especies animales se mantuvieron en cajas plexiglás en ciclos de luz/oscuridad de 12 h con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Los animales permanecieron en aclimatación durante 48 h antes de su utilización. El día de las pruebas experimentales los animales se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada de 22 ± 2 °C. Los experimentos fueron manejados de acuerdo con las leyes y regulaciones de México; en particular, con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Además, se consideraron los Procedimientos Científicos establecidos en la Directiva 2010/63 / UE para experimentos con animales. El protocolo fue

aprobado por el Comité Institucional Local de Cuidado y Uso de Animales del Cinvestav-Sede Sur (ID: 003-12). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar su sufrimiento y reducir la cantidad de animales utilizados. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical o en cámara de CO₂ según fuera el caso.

6.2.2 Equipos e instrumentación

Para las evaluaciones de toxicidad y farmacocinética se requirió de la administración oral de los compuestos en solución mediante cánulas intragástricas de diferentes medidas dependientes de la especie animal. Otros materiales como cronómetros, contadores y cámaras de filmación fueron utilizadas para el registro de los principales signos de intoxicación y para el establecimiento del perfil neurofarmacológico (pruebas conductuales) pertenecientes a las pruebas de toxicidad. Para el estudio farmacocinético fue necesaria la utilización de equipo quirúrgico especializado como bisturí, pinzas, tijeras, equipo de iluminación, así como sondas, material de sutura y de curación. Se utilizaron sondas de polietileno marca INTRAMEDIC de diferentes diámetros, así como hilos de sutura Atramat SR2633 USP 3-0/EP2. El material quirúrgico, las sondas y las cánulas de administración fueron lavadas y desinfectadas previo a su uso. Además, para la preparación de soluciones y tratamiento de las muestras, se utilizaron micropipetas marca Transferpette de diferentes capacidades (10 -1000 µL). El material de plástico de uso único, como jeringas, tubos vacutainer y viales eppendorf utilizados para la toma, colecta y tratamiento de muestras sanguíneas fueron dispuestos en los residuos biológicos infecciosos posterior a su utilización.

Las muestras sanguíneas para el estudio farmacocinético fueron analizadas en un equipo de UPLC acoplado a un detector de masas QTOF. El análisis hematológico y enzimático de las muestras sanguíneas finalizada la prueba de toxicidad a dosis repetida, se realizó utilizando una centrifuga Thermo scientific Sorval Legend micro 17, un dispositivo de análisis Mindray Auto Hematology Analyzer BC 2800 y el kit colorimétrico Roche-COBAS C111 para las evaluaciones enzimáticas, con un coeficiente de variación intra e interensayo de 2.5% y 2.8%, respectivamente. La cuantificación de micronúcleos en el ensayo de genotoxicidad fue realizada en un microscopio Vanguard 1331 con un lente de 100X.

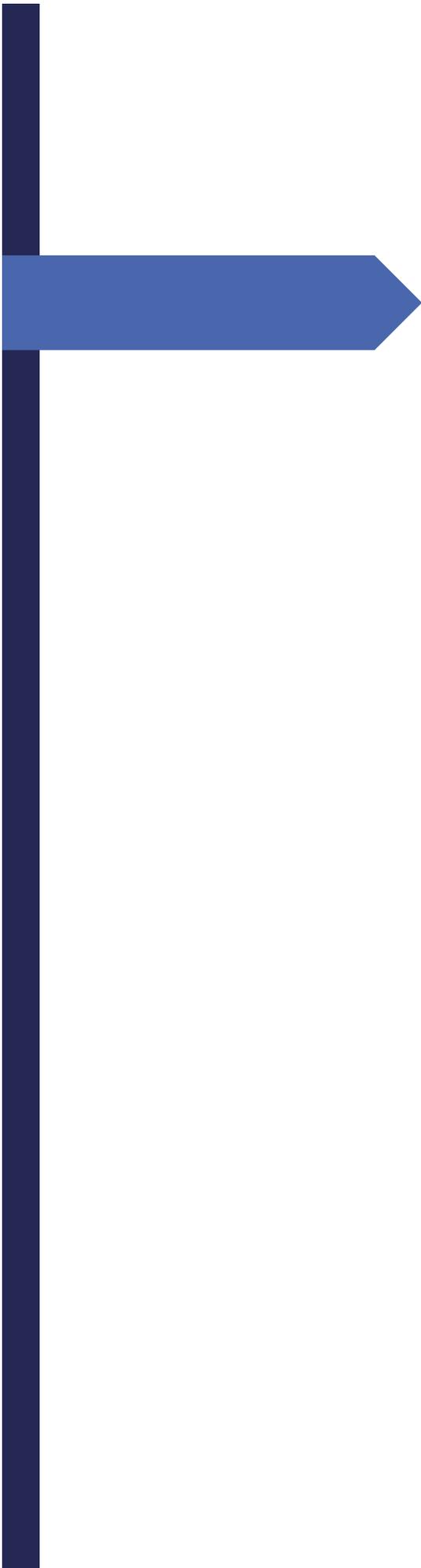
6.3 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los insumos utilizados para la obtención de las alcamidas y su evaluación farmacológica se enlistan en la **Tabla 4**. Los disolventes utilizados en la cromatografía de columna abierta fueron destilados previamente en un matraz bola de 12 L acoplado a una torre de destilación de 3.5 cm de diámetro y 60 cm de altura. Los disolventes utilizados e GC-MS, UPLC-QTOF y UV fueron grado analítico.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la determinación del perfil fármaco-toxicológico

Reactivos (síntesis)	Marca	Grado	CAS
Ácido decanoico	Sigma Aldrich	Reactivo	334-48-5
Gel de sílice (0.040-0.063 mm)	Merck	Flash	7631-86-9
Isobutilamina	Sigma Aldrich	Reactivo plus	78-81-9
PyBOP	Sigma Aldrich	Reactivo	128625-52-5
Reactivos (evaluación farmacológica)	Marca	Grado	CAS
Capsazepina	Sigma Aldrich	HPLC	138977-28-3
Formalina	Mallinckrodt	Comercial	50-00-0
Lidocaína	Xilonibsa	Farmacéutico	137-58-6
Solución salina	CS PISA	Comercial	7647-14-5
Tween 80	Sigma Aldrich	Comercial	9005-65-6
DMSO	Sigma Aldrich	Bioreagent	67-68-5
Éter etílico	Sigma Aldrich	Reactivo	60-29-7
AM630	Sigma Aldrich	HPLC	164178-33-0
AM251	Sigma Aldrich	HPLC	183232-66-8
Giemsa	Sigma Aldrich	Histológico	51811-82-6
Saclofen	Sigma Aldrich	Reactivo	125464-42-8
Bicuculina	Sigma Aldrich	Reactivo	485-49-4
Suero fetal bovino	Merck	Biológico	32160409
Ciclofosfamida	Sigma Aldrich	Farmacéutico	6055-19-2
Heparina	Pisa	Farmacéutico	9005-49-6
Disolventes	Marca	Grado	CAS
Acetona	Mardupol	Industrial	67-64-1

Acetonitrilo	JT Baker	HPLC/Masas	75-05-8
Agua	JT Baker	HPLC/Masas	7732-18-5
Diclorometano	Mardupol	Industrial	75-09-2
Hexano	Mardupol	Industrial	110-54-3
Metanol	Mardupol	Industrial	67-56-1
Cloroformo deuterado	Sigma Aldrich	RMN	865-49-6



7. MÉTODOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

7. MÉTODOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ALCAMIDAS

Afinina y capsaicina (control positivo) fueron obtenidas de sus fuentes naturales de trabajos previos realizados en el Centro de Investigaciones Químicas, Laboratorio 323 de Productos Naturales a cargo de la Dra. Ma. Yolanda Rios Gómez. Para este proyecto se facilitaron fracciones primarias del extracto acetónico de *H. longipes* para la obtención de afinina (López-Martínez et al. 2011) y del extracto diclorometánico del chile habanero para la obtención de capsaicina (de la Rosa-Lugo et al. 2017). La metodología empleada para la síntesis de hexahidroafinina (Figura 8) fue basada en la propuesta de síntesis de amidas de Preobrazhenskaya y colaboradores (Preobrazhenskaya et al. 2009).

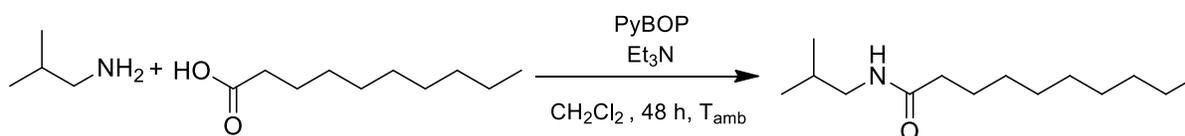


Figura 8. Síntesis de hexahidroafinina

Brevemente, en un matraz bola con agitación magnética se adicionaron 1700 mg de ácido decanoico (1 eq) disueltos en diclorometano bajo atmósfera inerte de nitrógeno. Posteriormente, se adicionaron, gota a gota y bajo agitación, 1.27 mL de isobutilamina (1.3 eq) y 2.06 mL de trietilamina (1.5 eq) hasta su incorporación total. Finalmente, se incorporaron 7.7 g (1.5 eq) del agente acoplante PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinfosfonio). La reacción se dejó en agitación durante 48 h. La purificación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía en columna abierta, utilizando columnas de vidrio de diferentes diámetros, empacadas con gel de sílice de malla 400-230 marca Merck como fase estacionaria. Estas columnas fueron eluidas con mezclas de disolventes convencionales de polaridad variable como fase móvil. Para el monitoreo de las reacciones, así como la identificación de los metabolitos esperados, se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) con base de aluminio. El revelado e identificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando sulfato cérico amoniacal [(NH₄)₄Ce(SO₄)] al 1% en ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N, yodo y una lámpara de UV-Vis modelo UVGL-25 (254-366 nm).

7.2 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Para el establecimiento del perfil fármaco-toxicológico se prepararon soluciones frescas de las alcanidas. Para ello, se disolvieron en solución salina, DMSO (10%), Tween 80 (2%) y etanol (2%), y se administraron por vía oral (0.2 mL/10 g peso) o local en la zona orofacial (40 µL/sitio), dependiendo del modelo farmacológico a utilizar.

7.2.1 Toxicidad aguda

Los compuestos con actividad farmacológica requieren estudios de toxicidad para continuar su inclusión en el diseño de fármacos. Por lo tanto, es importante identificar la dosis letal media y los posibles efectos neurotóxicos que se producen en los animales. El estudio de toxicidad aguda permite cuantificar el efecto todo o nada que un compuesto tiene sobre un organismo (ej. la letalidad) mediante la estimación de la DL₅₀. La estimación de la DL₅₀ de las alcanidas se realizó siguiendo la metodología descrita por Lorke. Para ello se administraron dosis iniciales de 10, 100 y 1000 mg/Kg vía oral de los compuestos de interés (fase I) y se cuantificó el número de muertes causadas por la exposición. Con base en los resultados, se seleccionaron nuevas dosis (fase II) registrando el número de muertes en esta segunda etapa (Tabla 5) (Lorke 1983). Finalmente, los animales se mantuvieron en observación durante 14 días y al final del periodo fueron sacrificados para la observación macroscópica de órganos internos principales en busca de daños aparentes.

Tabla 5. Selección de dosis. Ensayo de toxicidad aguda de acuerdo a Lorke

FASE I Dosis en mg/Kg			FASE II Dosis en mg/Kg			
10	100	1000				
0/3*	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

*Letalidad/n

A manera de comparación, se estimó de forma *in silico*, la DL₅₀ y otros parámetros de interés con el programa computacional **ACD/Tox Suite versión 2.95**. Finalmente, se categorizaron las alcanmidas, de acuerdo a su DL₅₀, conforme al Sistema Globalmente Armonizado (SGA) (Tabla 6).

Tabla 6. Categorización de sustancias peligrosas según el SGA

SGA	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5
Indicación de peligro (en caso de ingestión)	Mortal	Mortal	Tóxico	Nocivo	Puede ser nocivo
DL ₅₀ mg/Kg	5	50	300	2000	5000

7.2.2 Toxicidad a dosis repetida

El estudio de toxicidad a dosis repetida de afinina, capsaicina y hexahidroafinina se llevó a cabo siguiendo la directriz [OCDE 407](#): Estudio de toxicidad oral a dosis repetida a 28 días en roedores, con modificaciones menores. Para ello se formaron grupos aleatorios de 10 ratones a los cuales se les administraron diariamente 50 mg/Kg (p.o) de cada alcanmida o vehículo durante 28 días. Después de cada administración, se sometieron a un periodo de observación en busca de signos de toxicidad general, como convulsiones, temblores, salivación, diarrea, letargo, sueño y mortalidad. En los días 1, 7, 14 y 21 del tratamiento, se evaluaron, con modelos conductuales, el efecto neurofarmacológico que los tratamientos causen a nivel de SNC.

Al finalizar el periodo de evaluación (28 días), los animales fueron sacrificados por decapitación y muestras sanguíneas fueron colectadas en viales eppendorf impregnados con EDTA como anticoagulante para su análisis biométrico y enzimático. De igual manera, los órganos principales fueron pesados y analizados macroscópicamente en busca de daños físicos aparentes. Finalmente, muestras de médula ósea fueron colectadas para el establecimiento de la actividad genotóxica de los tratamientos. El peso corporal y la ingesta de alimentos fue medido a intervalos de 7 días hasta el último día del ensayo. El diseño general de protocolo de toxicidad a dosis repetida se muestra en la **Figura 9** cuyos componentes se describirán a continuación.

7.2.3 Evaluación de efecto neurofarmacológico

Para identificar los efectos neurológicos que ocurren durante el periodo de tratamiento con las alcamidas o con el vehículo se midió la actividad locomotora espontánea y la respuesta contra la ansiedad, conforme a lo establecido previamente por Déciga-Campos y colaboradores (Déciga-Campos et al. 2016). Para este proyecto, cada 7 días, desde el inicio hasta el fin del experimento, los animales se sometieron a la evaluación de pruebas conductuales como la exploración de cuadrantes, la exploración de perforaciones (*hold board test*) y el laberinto elevado (*plus maze*), 10 min posteriores a la administración de los tratamientos. Para la evaluación de la actividad locomotora, los ratones se colocaron en el centro de una caja de acrílico dividida en 9 secciones.

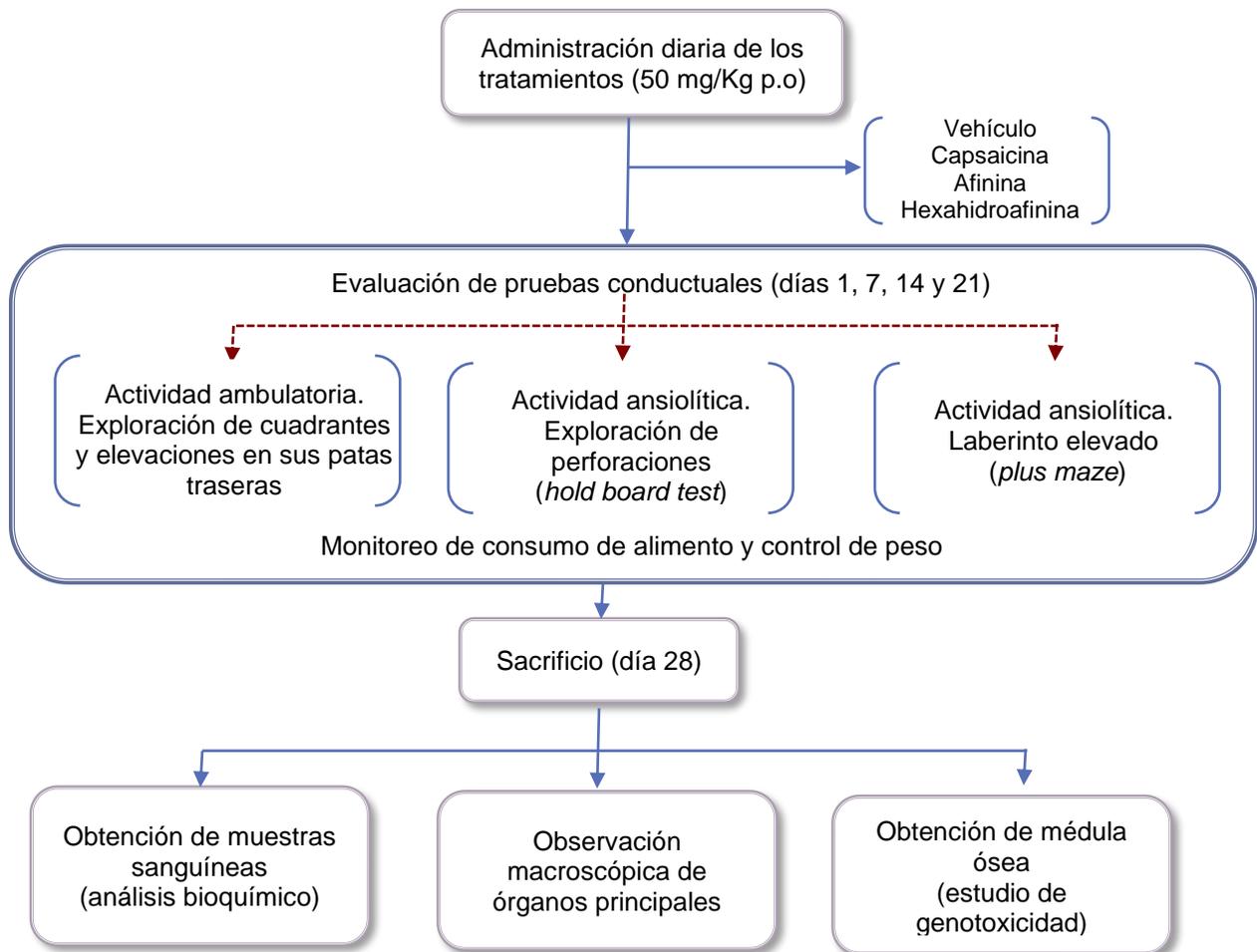


Figura 9. Diseño experimental de la evaluación de toxicidad a dosis repetida en ratón. Cada grupo experimental estuvo formado por 10 animales

Se contabilizó, durante 2 min, el número de cuadrantes explorados y el número de levantamientos que el ratón tenía sobre sus patas traseras. Posteriormente, cada ratón pasó a la prueba de exploración de perforaciones. Para ello, los ratones fueron colocados individualmente en el centro de un tablero perforado con 9 agujeros de 3 cm igualmente espaciados en una base de 20 x 20 cm colocado a una altura de 20 cm. En esta prueba se contabilizó, durante 2 min, el número de exploraciones que los ratones hicieron con sus cabezas en los agujeros del tablero. Finalmente, los ratones pasaron a la prueba del laberinto elevado. El equipo está constituido por dos brazos de madera, uno abierto y uno cerrado, colocados en cruz a una altura de aproximadamente 30 cm. La prueba inició cuando el ratón fue colocado en la intersección de los brazos, inmediatamente se contabilizó durante 5 min el tiempo que el ratón pasó en el área abierta. El proceso general de la evaluación neurofarmacológica se muestra en la **Figura 10**.

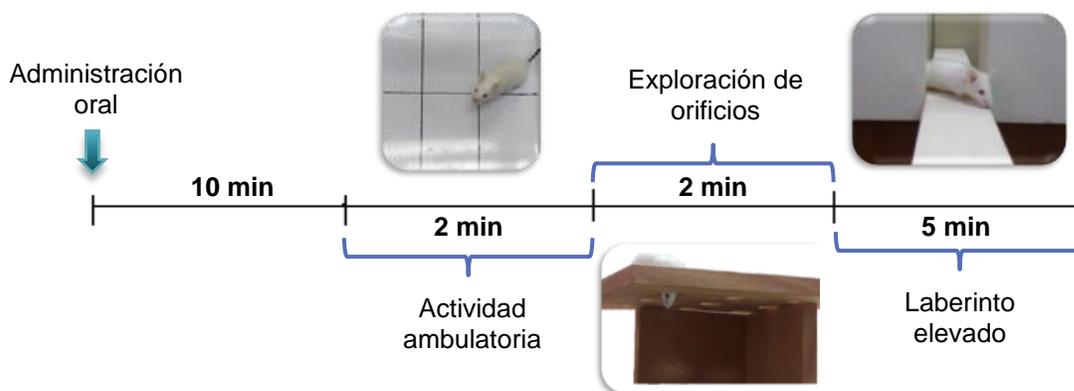


Figura 10. Diseño experimental de la evaluación del perfil neurofarmacológico en ratón

7.2.4 Análisis sanguíneo

Los parámetros hematológicos y bioquímicos son importantes para poder determinar los posibles daños que el organismo sufre tras la exposición continua a los medicamentos o principios activos. Por ejemplo, un aumento de proteínas, como la albúmina y la globulina, se asocian a procesos de deshidratación, inflamación, mioma múltiple y cólico. En el presente proyecto, una vez finalizado el periodo de evaluación de 28 días, los ratones fueron sacrificados mediante decapitación y la sangre fue colectada inmediatamente en tubos *vacutainer*. Las muestras de plasma fueron obtenidas tras la centrifugación a 3,000 rpm durante 5 min, y analizadas para el conteo de los principales parámetros hematológicos

de la fórmula roja y blanca como hemoglobina, eritrocitos, hematocrito, volumen celular medio, plaquetas, además de neutrófilos, segmentados, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. Finalmente, se realizó el recuento de las principales enzimas como la gamma-glutamyl-transferasa, aspartato aminotransferasa, creatinina, albúmina y alanina aminotransferasa por métodos de ensayo colorimétricos.

7.2.5 Daños macroscópicos en órganos principales

Una vez sacrificado el ratón se procedió a analizar macroscópicamente los órganos principales como bazo, hígado, pulmón, corazón, riñones y estómago. Para ello, cada órgano fue disectado y analizado macroscópicamente para identificar daños aparentes como hematomas, inflamación o anormalidades en los tejidos. El aumento del peso de los órganos puede ser signo de enfermedades o anormalidades patológicas. Para determinar el índice de la variación de peso, cada órgano se lavó con agua destilada inmediatamente después de su disección, se secó con un paño y se pesó en una balanza analítica. Una vez limpios los órganos, se registró su peso para determinar el índice de variación de peso mediante la **Ecuación 1**.

$$\text{Índice de variación de peso del órgano} = \frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso corporal del ratón}} \times 100$$

...Ecuación 1

7.2.6 Estudio de genotoxicidad

Las evaluaciones de genotoxicidad incluyen aquellas pruebas que evalúan el daño inducido al ADN a través de efectos, como la síntesis de ADN no programada, roturas de cadena de ADN (ensayo de cometas) y formación de aductos de ADN, entre otras. Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, que corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos (Zalacain et al. 2005). El estudio de genotoxicidad en médula ósea de ratón se realizó a través del conteo micronúcleos según lo establecido en la guía OCDE 474. La prueba de micronúcleos *in vivo* en mamíferos se utiliza para detectar daño citogenético inducido por

sustancias químicas en los cromosomas o el aparato mitótico de los eritroblastos. Para ello, en esta prueba, se contabiliza la formación de micronúcleos, es decir, fragmentos de cromosomas (o cromosomas completos) extranucleares, rodeados de su propia membrana en eritrocitos procedentes de la médula ósea. En este protocolo se analizó la médula ósea de los ratones tratados con las alcanidas, el vehículo y un grupo control positivo. El grupo control fue tratado con ciclofosfamida (50 mg/Kg, i.v) y sacrificado 48 h posteriores a su administración. Para la obtención de la médula ósea, se extrajo por completo el fémur del ratón y se cortaron los extremos cuidadosamente. La médula ósea fue colectada en tubos eppendorf haciendo pasar suero fetal bovino (SFB) con ayuda de una jeringa de insulina. Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 min y se fijaron en portaobjetos de vidrio con ayuda de metanol absoluto. Se dejaron secar al aire libre durante 30 min antes de su tinción con el reactivo Giemsa al 10%. Por cada ratón se prepararon dos portaobjetos, y se analizaron 1000 eritrocitos policromáticos por microscopía, para determinar la frecuencia de los eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) (Ledebur et al. 1973) (Figura 11). El incremento de frecuencia de MNPCE se consideró indicativo de actividad genotóxica.



Figura 11. Evaluación de actividad genotóxica; obtención y tratamiento de la médula ósea de ratón

7.2.7 Farmacodinamia. Exploración del mecanismo de señalización de alcanidas

El efecto bioquímico-fisiológico que desarrollan los compuestos bioactivos en el organismo es consecuencia de su interacción con los componentes de la estructura macromolecular, esto es, su mecanismo de acción. El mecanismo de acción se inicia con la interacción del compuesto bioactivo y su receptor, originando así una serie de sucesos bioquímicos que finalizan en la acción farmacológica. El análisis de la participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides de afinina, hexahidroafinina y capsaicina, se llevó a cabo utilizando el modelo de formalina como se ha reportado previamente (de la Rosa-Lugo et al. 2017).

Detallando brevemente, la formalina es utilizada como un estímulo químico irritante que desencadena un dolor prolongado de intensidad moderado semejante al dolor crónico observado en humanos. Los parámetros más utilizados para cuantificar el grado de dolor en el modelo de formalina son dependientes de la zona de administración; entre las principales acciones se encuentra el morder (*biting*), lamer (*licking*), tallar y sacudir (*flinching/shakes*) la zona afectada. La prueba de formalina en roedores es bifásica. La primera fase (aguda o neurogénica) inicia después de la administración de formalina y dura entre 3 y 5 min, y se debe a la estimulación directa de nociceptores, principalmente fibras C. La segunda fase (tónica o inflamatoria) inicia 15-20 min después de la inyección y dura entre 20 y 40 min. El comportamiento nociceptivo se grafica en función del tiempo, por lo que se obtienen gráficas denominadas cursos temporales como la que se muestra en la **Figura 12**. Debido a razones éticas, los animales son inmediatamente sacrificados.

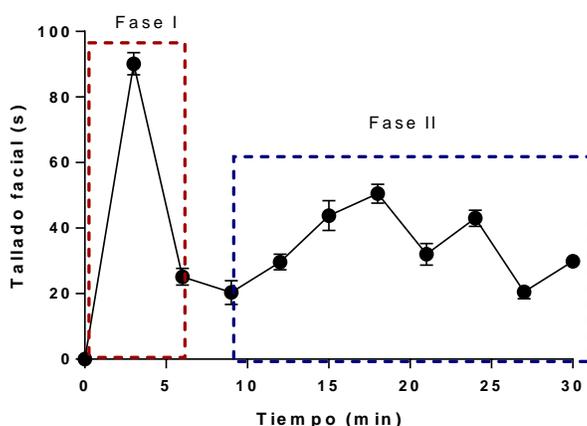


Figura 12. Curso temporal del efecto nociceptivo en ratón producido por formalina

El diseño experimental para la evaluación de la participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides se describe en la **Figura 13**. La ambientación consistió en la colocación de los ratones en cilindros de acrílico (Plexiglás) transparentes de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura, 30 min antes de iniciar la prueba, con la finalidad de que el ratón reconozca y se adapte al nuevo espacio. Para la determinación del efecto antinociceptivo de las alcanidas, se administraron de manera subcutánea los tratamientos en la zona orofacial (a la altura de las vibrisas), con una jeringa de insulina calibre 30 de media pulgada de largo. Transcurridos cinco min se administró la solución de formalina al 2% en el mismo sitio que el tratamiento. Inmediatamente se inició el periodo de observación, en donde se contabilizó el tallado facial cada 3 min durante los siguientes 30 min (**Figura 13**, sección A).

Esta estimulación facial puede ser con sus patas delanteras, traseras o en su defecto, el tallado contra alguna superficie en donde se evidencie el contacto con la zona tratada.

Para determinar la participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides, posterior al periodo de ambientación, se administraron a nuevos grupos experimentales los correspondientes antagonistas de los receptores TRPV1 (Capsazepina), GABA_A (Bicuculina), GABA_B (Saclofen), CB1 (AM251) y CB2 (AM630) (Figura 13, sección B). Posteriormente, se tuvo un periodo de espera antes de administrar los tratamientos (alcanidas). Para capsazepina se esperaron 120 min y para los antagonistas restantes 45 min (de la Rosa-Lugo et al. 2017). Los compuestos y la formalina se administraron en un volumen de 40 µL/sitio.

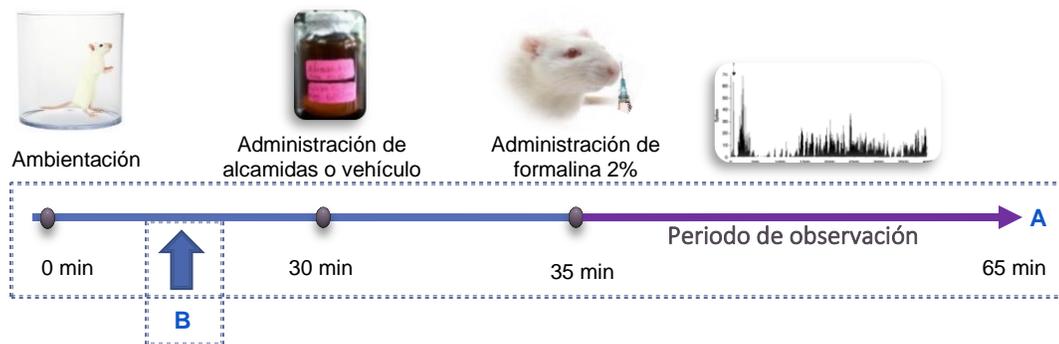


Figura 13. Evaluación del mecanismo transducional de las alcanidas en la prueba de la formalina en ratón

Los resultados fueron esquematizados en cursos temporales, donde la duración de la prueba (30 min) se representó en el eje x (abscisas) y el efecto nociceptivo (tiempo acumulado de tallado facial) se representó en el eje y (ordenadas). Los resultados fueron mostrados como el promedio ± error estándar (e.e) de la media para cada grupo experimental. Se calculó el área bajo la curva (ABC) y el porcentaje de antinocicepción de la primera y segunda fase (0-9 y 12-30 min, respectivamente) por el método de los trapecoides. El porcentaje de antinocicepción fue calculado con la Ecuación 2.

$$\% \text{ Antinocicepción} = \left(\frac{ABC_{vehículo} - ABC_{compuesto}}{ABC_{vehículo}} \right) \times 100$$

...Ecuación 2

La disminución del área bajo la curva de cada tratamiento en comparación con el control representó el efecto antinociceptivo de los compuestos evaluados. La pérdida del efecto debido a la presencia de los antagonistas fue indicativo de su participación en este mecanismo de señalización. Los datos dosis-respuesta se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba post-hoc de Dunnett para comparaciones múltiples contra el vehículo. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$) y aquellos valores de p superiores a 0.05 se consideraron estadísticamente no significativos.

7.2.8 Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos de afinina

La farmacocinética puede definirse como la descripción de los cambios de concentración de los fármacos dentro del organismo, debido a su distribución, metabolismo y excreción. Todos estos fenómenos se pueden expresar de forma matemática a partir de la curva de niveles plasmáticos con relación al tiempo. Cabe mencionar que la duración del efecto está en función del número de moléculas que lleguen al sitio diana, así como de la afinidad y tiempo que permanezcan en este sitio. Por lo que la farmacocinética dependerá de las características fisicoquímicas del principio activo, la dosis empleada, el sitio diana y la vía de administración. El análisis de las muestras sanguíneas y el desarrollo de las curvas de calibración se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del Centro de Investigaciones Químicas, bajo la supervisión de la Dra. María de los Ángeles Ramírez Cisneros.

7.2.8.1 Establecimiento de las dosis

La farmacocinética de capsaicina es ampliamente conocida, por tal motivo, en el presente proyecto se decidió determinar el perfil farmacocinético de afinina, molécula con alto potencial farmacológico y con poco estudio en este ámbito. La selección de la dosis a administrar se fundamentó en lo reportado en la literatura de metabolitos estructuralmente similares (Woelkart et al. 2009). Para ello, se administró 2.5 mg/Kg de afinina disuelta en solución salina, Tween 80 (2%) y etanol (2%). Para este experimento se seleccionaron las vías de administración oral e intravenosa. Todas las soluciones se agitaron y sonicaron previamente, hasta obtener una mezcla fresca homogénea para cada experimento.

7.2.8.2 Canulación y obtención de muestras sanguíneas

Para el desarrollo experimental farmacocinético se utilizaron ratas Wistar (200-250 g de peso, 4-5 semanas de edad) procedentes de la Facultad de Medicina de la UAEM. El proceso de manipulación de los animales para la obtención de muestras sanguíneas se esquematiza en la **Figura 14**.



Figura 14. Obtención de muestras sanguíneas para determinar el perfil farmacocinético

Primeramente, los animales se ambientaron en el laboratorio de trabajo con tres días de anticipación antes del inicio de la prueba. El día del ensayo, se separaron individualmente en cajas plexiglás 1 hora antes de la canulación dado que la sangre es mucho más difícil de recolectar de animales que sufrieron estrés agudo en los minutos previos a la recolección de la muestra, porque las hormonas del estrés contraen los vasos sanguíneos. Antes de iniciar la intervención, los animales fueron anestesiados introduciendo la nariz de la rata en una cámara de éter etílico, esta fue formada impregnando un trozo de algodón con éter etílico y se colocó en el fondo de un tubo falcon de 50 mL. Transcurridos 2 min, se verificaron los reflejos del animal, y en caso de ser necesario se volvió a utilizar la cámara de éter para llegar a la anestesia total. Inmediatamente se procedió a colocar la rata boca arriba y a limpiar con agua tibia y algodón la zona del nacimiento de la cola, con la finalidad de dilatar los vasos sanguíneos y facilitar su localización. Si la vasculatura está constreñida, la colocación adecuada de la sonda será difícil y el flujo sanguíneo se reducirá enormemente. Se sostuvo firmemente la cola y, con ayuda de un bisturí, se hizo un corte de aproximadamente 0.5-1.0 cm de la base de la cola, con el material quirúrgico se expuso la vena lateral y se colocaron hilos de seda en los extremos superior e inferior, pasándolos justo por debajo de la vena expuesta (**Figura 15**). Una vez colocados los hilos, se realizó un pequeño corte a la vena con ayuda de tijeras de punta, en posición horizontal, evitando

el corte total del conducto. Cuidadosamente se insertó la sonda de polietileno (P-10) de aproximadamente 8 cm de largo en el corte de la vena, intentando su inserción al menos 1 cm. Antes de amarrar la sonda con ayuda de los hilos de seda, se verificó el libre paso de sangre, haciendo pasar por ella una mezcla de heparina:solución salina 50:50 con ayuda de una jeringa y puntas de aguja especialmente cortadas para este fin. Esta solución se empleó para lavar la cánula y evitar la coagulación de la sangre y para restablecer la volemia del animal tras cada toma de muestra. De la misma manera, se verificó que se pudieran obtener muestras sanguíneas por este medio. Concluido este proceso, se sujetó cuidadosamente la sonda con los hilos de seda, evitando el estrangulamiento del conducto y se suturó la incisión. Posteriormente, se cubrió la herida con cinta adhesiva de curación, junto con la sonda, con el fin de evitar que el animal la jalara y se descanulara. Finalmente, los animales se colocaron en cámaras de plexiglás semicirculares para el inicio de las pruebas. Se realizó la administración oral o intravenosa de 2.5 mg/Kg de afinina o vehículo. Se tomaron 300 μ L de muestras sanguíneas a diferentes tiempos ($t = 0, 8, 15, 30, 60, 90, 120$ y 180 min). Cada muestra biológica se colectó en tubos vacutainer heparinizados de 1.3 mL.

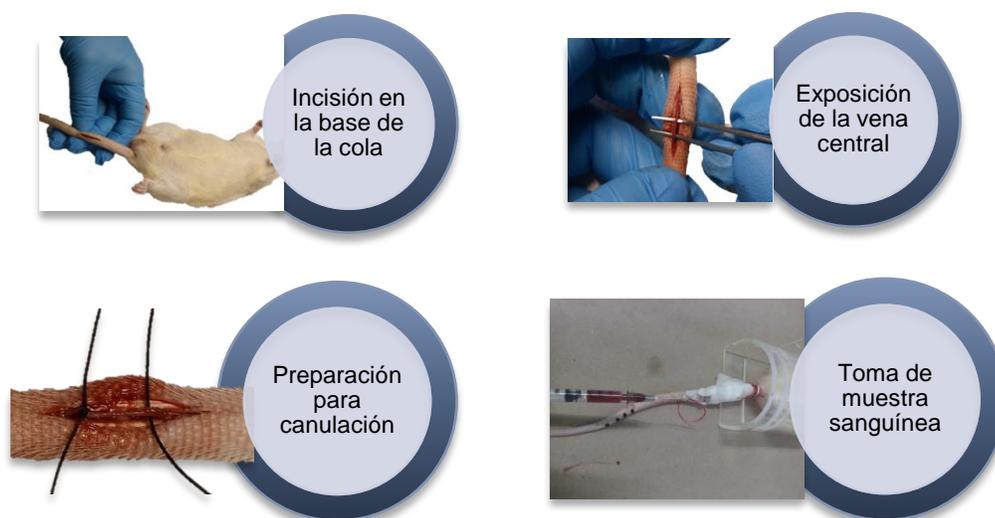


Figura 15. Proceso de canulación. Obtención de muestras sanguíneas

7.2.8.3 Tratamiento de muestras sanguíneas y análisis cromatográfico

La sangre colectada por cada punto experimental (300 μ L) fue centrifugada a 3,000 rpm durante 15 min. El proceso de desproteinización de la muestra consistió en la transferencia

de 120 μL de sobrenadante (plasma) a viales eppendorf, con la subsecuente adición del doble volumen de acetonitrilo grado masas (240 μL), y agitación durante un minuto, para una posterior centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min. Finalmente, se transfirieron 350 μL de sobrenadante y se adicionó un volumen similar de agua grado masas (350 μL) (Figura 16). La cuantificación de afinina en las muestras biológicas se realizó en un UPLC-MS-QTOF con un rango de detección de 100-3000 m/z en modo positivo, utilizando un voltaje de capilar de 3000 y un volumen de inyección de 3 μL .

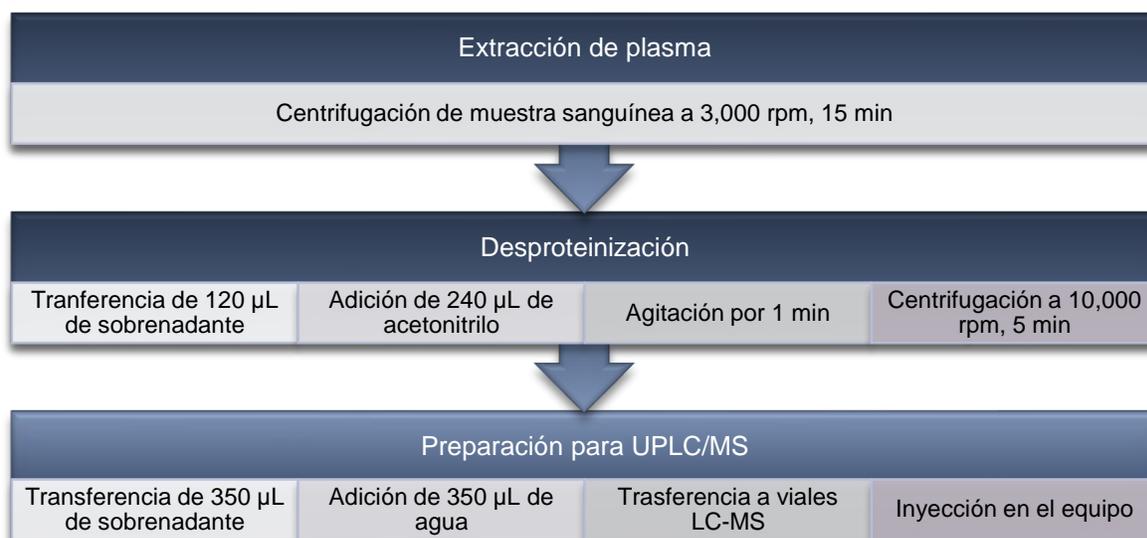


Figura 16. Preparación de las muestras sanguíneas para el análisis en UPLC/MS

La fase móvil consistió en una mezcla de agua y acetonitrilo, con un gradiente de elución 50:50 durante los primeros 5 min, y un incremento de acetonitrilo a 95% al minuto 6, manteniendo esta mezcla durante 7 min más. Finalmente, se realizó un periodo de reequilibrio a condiciones iniciales (50:50, agua:acetonitrilo) antes de la siguiente inyección. El tiempo total de procesado por muestra fue de 15 min. Las muestras se hicieron pasar por una columna ZORBAX C18 de 2.5 x 100 mm y 1.7 μm , con una velocidad de flujo de 0.25 mL/min y una temperatura de 25°C. Para la cuantificación de afinina se utilizó una curva de calibración de plasma blanco, enriquecido con cantidades conocidas de afinina y estándar interno, correspondiente a una amida aromática de fórmula y peso molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ y 251.5 g/mol, respectivamente. La curva de calibración se preparó en un rango de 1.0-56.3 ng/mL, con incrementos logarítmicos. Para ello, se obtuvo sangre de rata mediante punción cardíaca, y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min para la separación

del plasma. Por otro lado, se prepararon soluciones de trabajo de afinina de forma seriada a partir de una preparación madre. Cabe mencionar que se tomaron en cuenta los cambios de volumen de la desproteización para llegar a concentraciones finales de 1, 3.16, 10, 17.8, 31.6 y 56.3 ng/mL. El proceso de preparación de las soluciones para la elaboración de la curva de calibración se esquematiza en la **Figura 17**.



47

Figura 17. Preparación de las muestras para elaboración de la curva de calibración

En este sentido, para llegar a una concentración final de 1 ng/mL se partió de la adición de 50 µL de una solución a concentración de 12 ng/mL. El volumen final de trabajo fue de 600 µL (100 µL de plasma + 50 µL de la solución de alcanidas + 150 µL de acetonitrilo + 300 µL de agua) por tal motivo:

$$C_1 = \frac{C_2 V_2}{V_1}$$

...Ecuación 3

En donde:

$$V_2 = 600 \mu L$$

$$V_1 = 50 \mu L$$

$$C_2 = 1 \text{ ng/mL}$$

Sustituyendo:

$$C_1 = \frac{1 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \times 600 \mu L}{50 \mu L} = 12 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

De esta solución se tomaron 50 µL y se adicionaron al plasma para llevar a cabo el proceso antes mencionado. Las concentraciones de partida se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Soluciones de trabajo. Elaboración de curvas de calibración

Concentración final (ng/mL)	Concentración de partida (ng/mL)
1	12.0
3.16	37.9
10	120.0
17.8	213.4
31.6	379.2
56.3	674.8

7.2.8.4 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó la gráfica de abundancia de afinina en las muestras experimentales, expresada como la relación de la altura del analito respecto a la altura del estándar interno. Con base en la curva de calibración, se estimó la cantidad de afinina en cada muestra. Los parámetros farmacocinéticos de afinina fueron calculados siguiendo un modelo monocompartimental. La concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), así como el tiempo máximo ($t_{m\acute{a}x}$), fueron tomados directamente de los valores observados de la gráfica. La concentración al tiempo cero (C_0), el volumen de distribución (V_D), la constante de eliminación (K_e), así como el tiempo de eliminación ($t_{1/2}$) fueron estimados con fórmulas matemáticas conocidas a partir de la ecuación de la recta de la gráfica de concentración-tiempo (**Ecuaciones 4-8**). El área bajo la curva (ABC_(0-t)) fue calculada mediante la regla trapezoidal hasta la última concentración medible (Biber 2003). Los datos se reportan como la media \pm SD. Considerando un modelo mono-compartmental (**Figura 18**):

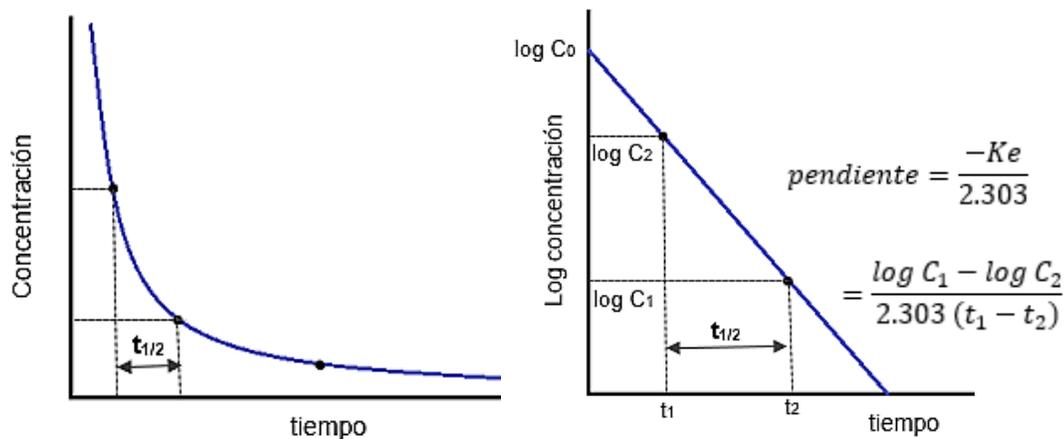


Figura 18. Modelo mono-compartmental para la obtención de los principales parámetros farmacocinéticos

Constante de eliminación (K_e):

$$K_e = \text{pendiente} * (-2.303)$$

...Ecuación 4

Concentración plasmática al tiempo cero (C_0):

$$C = C_0 e^{-tk_1}$$

$$\log C = \log C_0 - \frac{k_1}{2.303} t$$

...Ecuación 5

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$):

$$\log C_t = \log C_0 - \frac{K}{2.303} t$$

$$\log \frac{C_0}{2} = \log C_0 - \frac{K}{2.303} t$$

$$-\log 2 = -\frac{K}{2.303} t$$

$$t_{1/2} = \frac{2.303 \log 2}{K} = \frac{0.693}{K}$$

...Ecuación 6

Depuración (Cl):

$$Cl = K V_D$$

...Ecuación 7

Área bajo la curva (ABC) usando el método de los trapezoides (Figura 19):

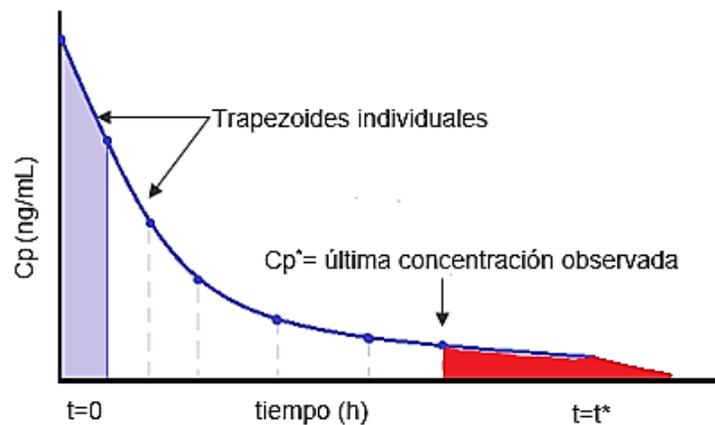


Figura 19. Método de los trapezoides para el cálculo del área bajo la curva

$$\int_{t_0}^{t_1} C_p dt = (ABC)_{t_0}^{t_1} = \frac{(Cp)_0 + (Cp)_1}{2} \times (t_1 - t_0)$$

$$= \text{promedio } C_p \times dt$$

El área del último punto:

$$(ABC)_{t^*}^{\infty} = \int_{t^*}^{\infty} C_p dt = \frac{C_p^*}{K_e}$$

...Ecuación 8

50

Volumen de distribución aparente:

$$V_D = \frac{D_0}{K[ABC]_0^{\infty}}$$

...Ecuación 9

Biodisponibilidad (F):

$$F = \frac{ABC_{oral}}{ABC_{i.v}} \times 100$$

...Ecuación 10



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ALCAMIDAS

8.1.1 Obtención de capsaicina y afinina

La capsaicina se obtuvo de fracciones primarias del extracto diclorometánico de chile habanero (*Capsicum chinense*). Para ello, 500 mg de extracto se colocaron en una columna de vidrio de 2 cm de diámetro empacada previamente con 120 g de gel de sílice y suspendida en una mezcla *n*-hexano-acetona 90:10. Todas las fracciones obtenidas fueron de 30 mL. A lo largo del proceso cromatográfico se aplicaron incrementos de polaridad impartidos por la adición de acetona. La columna se resolvió en 105 fracciones. En total se obtuvieron alrededor de 420 mg de un sólido ceroso color naranja con $R_f = 0.41$ (hexano-acetona 7:3) soluble en diclorometano. Éste compuesto fue identificado como capsaicina ($C_{18}H_{27}NO_3$), metabolito responsable de la propiedad pungente de los chiles.

La unidad aromática de la molécula tiene 2 grupos sustituyentes importantes (**Figura 20**): el grupo metoxilo ubicado sobre C-3' con hidrógenos desplazados de 3.8 a 3.9 ppm debido a la desprotección inducida por el sistema aromático. Una de las características de los hidrógenos de alcohol es su desplazamiento variable e incluso inexistente en los espectros de protón, debido a la concentración de la muestra y a sus interacciones químicas. Esta característica también se hace evidente en la señal producida por el protón ubicado sobre el nitrógeno, el cual resuena como una señal simple variante en su desplazamiento químico. En este caso en particular, se encontró ubicado en el rango de 5.9-7.5 ppm. Los protones aromáticos se localizaron en la zona de resonancia comprendida de 6.6-7.1 ppm con multiplicidad doble. Por otro lado, los protones vinílicos situados sobre C-6 y C-7 de la capsaicina se encontraron en 5.1-5.5 ppm, con multiplicidad doble de doble para C-7 y doble de triple para C-6. Los datos espectroscópicos fueron concordantes con lo reportado en la literatura ([Gannett et al. 1988](#), [Gómez-Calvario et al. 2016](#)).

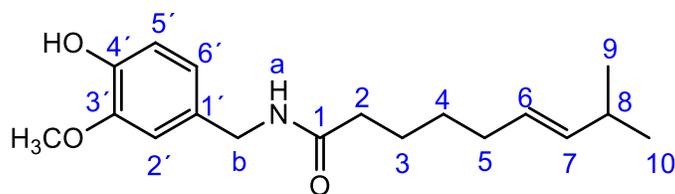


Figura 20. Asignación por RMN de capsaicina

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, espectro 1); δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6'), 5.90 (1H, s, NHa), 5.34 (1H, dd, $J = 15.4, 5.6$ Hz, H-7), 5.33 (1H, dt, $J = 15.4, 5.8$, H-6), 4.33 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, Hb), 3.85 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.20 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.98 (2H, dt, $J = 7.8, 2.0$ Hz, H-5), 1.64 (2H, q, $J = 7.7$ Hz, H-3), 1.50 (1H, o, $J = 6.7$ Hz, H-8), 1.37 (2H, q, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H-4), 0.94 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-9 y H-10).
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, espectro 2); δ (asignación): 173.0 (C, C-1), 146.9 (C, C-4'), 145.3 (C, C-3'), 138.2 (CH, C-7), 130.4 (C, C-1'), 126.6 (CH, C-6), 120.8 (CH, C-6'), 114.6 (CH, C-5'), 111.0 (CH, C-2'), 56.1 ($-\text{OCH}_3$), 43.7 (CH_2 , Cb), 36.8 (CH_2 , C-2), 32.3 (CH_2 , C-5), 31.1 (CH, C-8), 29.4 (CH_2 , C-4), 25.42 (CH_2 , C-3), 22.8 (CH_3 , C-9 y C-10).

Por otro lado, la purificación de 200 mg de afinina ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}$) (Figura 21) se realizó en una columna de vidrio de 1.5 cm de diámetro, empacada previamente con 90 g de gel de sílice suspendida en una mezcla *n*-hexano-acetona 80:20. Se colectaron 39 fracciones de 20 mL. Se obtuvieron 185 mg de aceite amarillo con $R_f = 0.36$ (hexano-acetona 8:2) soluble en diclorometano. Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

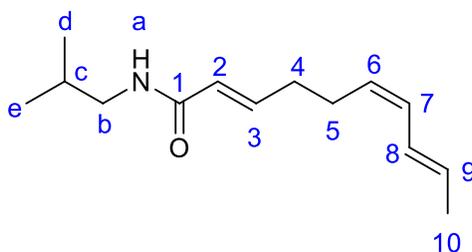


Figura 21. Asignación por RMN de afinina

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, espectro 3); δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 6.82 (1H, dt, $J = 15.4, 6.4$ Hz, H-3), 6.29 (1H, ddc, $J = 15.2, 10.2, 1.0$, H-8), 5.98 (1H, sa, NHa), 5.97 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-7), 5.85 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-

2), 5.69 (1H, dc, $J = 14.8$, 6.7 Hz, H-9), 5.26 (1H, ddd, $J = 10.6$, 7.4 Hz, H-6), 3.14 (2H, dd, $J = 6.5$ Hz, Hb), 2.28 (4H, m, H-4), 1.78 (1H, n, $J = 6.8$ Hz, Hc), 1.77 (3H, dd, $J = 6.7$, 1.2 Hz, H-10), 0.92 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, Hd y He). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 100 MHz, espectro 4); δ (asignación): 166.1 (C, C-1), 143.4 (CH, C-3), 129.9 (CH, C-9), 129.5 (CH, C-7), 127.8 (CH, C-6), 126.8 (CH, C-8), 124.3 (CH, C-2), 47.0 (CH_2 , Cb), 32.2 (CH_2 , C-4), 28.7 (CH, Cc), 26.5 (CH_2 , C-5), 20.3 (CH_3 , Cd y Ce), 18.4 (CH_3 , C-10).

8.1.2 Síntesis de hexahidroafinina

53

El crudo de reacción de la condensación química de ácido decanoico con isobutilamina se purificó en una columna de vidrio de 3 cm de diámetro empacada previamente con 100 g de gel de sílice suspendida en una mezcla *n*-hexano-acetona 90:10. Se colectaron 52 fracciones de 20 mL. Se obtuvieron 1.7 g (92%) de un compuesto sólido blanco ceroso identificado como hexahidroafinina (*N*-isobutildecanamida) ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}$) (**Figura 22**) con $R_f = 0.39$ (hexano-acetona 8:2) soluble en diclorometano. Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

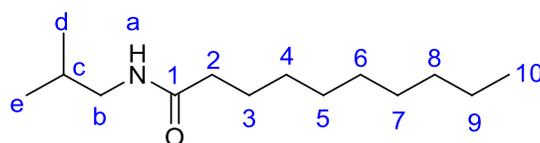


Figura 22. Asignación por RMN de hexahidroafinina

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, espectro 5); δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 5.50 (1H, sa, NHa), 3.08 (2H, dd, $J = 6.5$, 4.0 Hz, Hb), 2.17 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2), 1.76 (1H, n, $J = 6.7$ Hz, Hc), 1.63 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, H-3), 1.26 (12H, m, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.91 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, Hd y He), 0.88 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, H-10). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 100 MHz, espectro 6); δ (asignación): 173.6 (C, C-1), 46.7 (CH_2 , Cb), 37.3 (CH_2 , C-2), 32.16 (CH_2 , C-8), 29.6 (CH_2 , C-6), 29.5 (CH_2 , C-7), 29.5 (CH_2 , C-5), 29.4 (CH_2 , C-4), 28.7 (CH, Cc), 26.1 (CH_2 , C-3), 22.8 (CH_2 , C-9), 20.3 (CH_3 , Cd y Ce), 14.3 (CH_3 , C-10).

La presencia del residuo *N*-isobutilo en afinina y hexahidroafinina se comprobó debido a las señales doble de doble con integral para dos protones en la región 3.0-3.21 ppm, correspondiente al metileno unido al nitrógeno, una señal múltiple en 1.70-1.84, asignable

al metino y un doble que integra para seis hidrógenos en 0.83-0.94 ppm. La diferencia estructural entre ellos radica en la presencia de 3 insaturaciones sobre los carbonos C-2–C-3, C-6–C-7 y C-8–C-9 en afinina. Para afinina, todas las señales observadas entre 5.1 y 6.9 ppm corresponden, de acuerdo con su desplazamiento químico, a hidrógenos vinílicos, con integración total para 6 protones, lo que corrobora la presencia de las tres insaturaciones, mismas que no se observan en el espectro de hexahidroafinina. En su lugar, aparecen dos señales desplazadas a campo alto en 2.17 y 1.63, correspondientes a H-2 y H-3. Este desplazamiento de los metilenos se debe a su cercanía con el carbonilo. Este efecto no alcanza a afectar a los metilenos de la cadena de ácido graso, mismos que se encuentran como un multiplete desplazado a 1.26 ppm con integral para 12 protones. Los datos espectroscópicos de afinina y hexahidroafinina son concordantes con los reportados en la literatura (Correa et al. Díaz 1971, Rios-Gómez et al. 2007, Molina-Torres et al. 2004)

8.1.3 Mecanismo de reacción

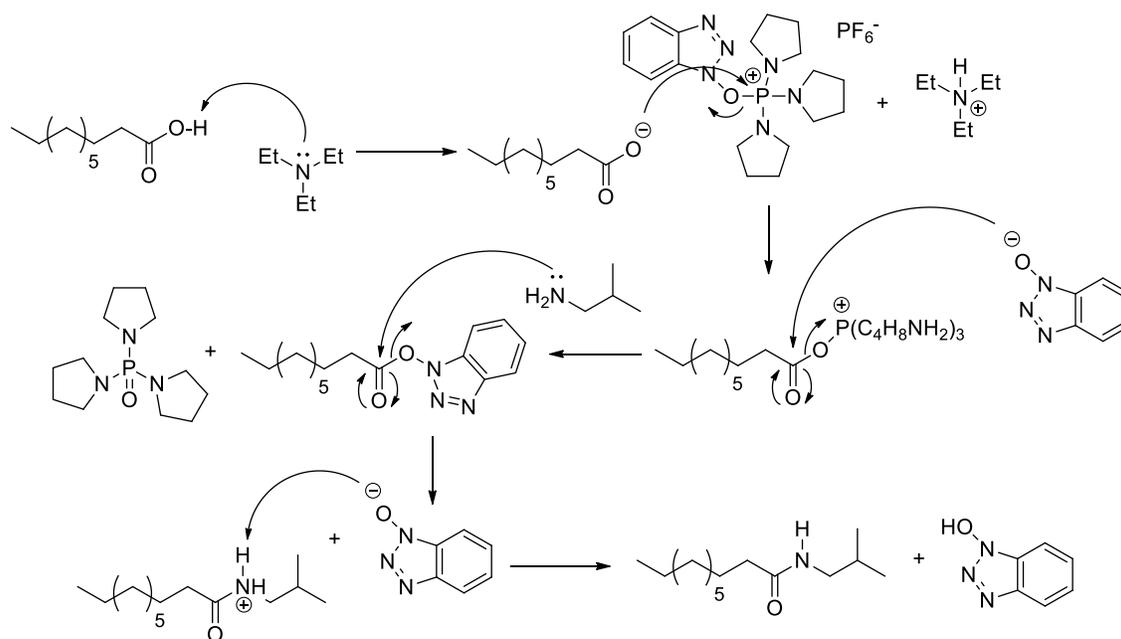


Figura 23. Mecanismo de reacción. Síntesis de hexahidroafinina

El mecanismo de reacción de la condensación entre el ácido carboxílico y la amina para la generación de la amida en presencia de un agente acoplante se describe en la Figura 23. En esta reacción, la trietilamina (Et₃N) se utilizó para la generación del carboxilato, así como para neutralizar especies ácidas producidas en el curso de la reacción. El agente acoplante

PyBOP favoreció la activación del grupo -OH del carboxilato, provocando la adición nucleofílica de la amina para generar así la amida. El mecanismo propone que la trietilamina extrae el protón ácido del ácido decanoico, formando así un carboxilato, que posteriormente realiza el ataque nucleofílico sobre PyBOP. Posteriormente, el oxibenzotriazol (OBt) formado ataca al carbonilo desplazando la especie fosfato. La amina vuelve a atacar al grupo carbonilo regenerando y expulsando al grupo saliente OBt. Finalmente, el benzotriazol extrae el protón de la amida para neutralizarla.

8.2 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

8.2.1 Toxicidad aguda

En la fase I de experimentación, todas las alcanidas fueron administradas a 10, 100 y 1000 mg/Kg (p.o). Únicamente capsaicina causó el 100% de letalidad a 1000 mg/kg por lo que, para la fase II, se eligieron dosis más bajas (50, 200, 400 y 600 mg/Kg). Por el contrario, para afinina y hexahidroafinina se seleccionaron dosis superiores en la segunda fase; específicamente 1300, 2600 y 2900 mg/Kg para afinina y 1600, 2900 y 5000 mg/Kg para hexahidroafinina. El compuesto con mayor potencial toxicológico (en orden de la DL_{50}) fue capsaicina (489.9 mg/Kg), seguido de afinina (1,442.2 mg/Kg) y finalmente hexahidroafinina (>5,000 mg/Kg). Estos resultados se compararon con los valores teóricos obtenidos *in silico* por el programa ACD/Tox Suite versión 2.95. Los valores teóricos de la DL_{50} corresponden a 450 mg/Kg para capsaicina, 1,700 mg/Kg para afinina y 12,200 mg/Kg para hexahidroafinina. Por lo tanto, utilizando el método de Lorke, los datos *in vivo* son similares a los obtenidos en el estudio *in silico*. La **Tabla 8** muestra los resultados y la categorización del Sistema Globalmente Armonizado (SGA). En general, los ratones experimentaron períodos cortos de salivación y agitación después de la administración oral aguda. Las muertes en los grupos de afinina y capsaicina se caracterizaron por convulsiones vigorosas en los primeros 5 min después de la administración, incluyendo convulsiones mioclónicas, clónicas y tónicas; solo la hexahidroafinina no causó salivación. Los ratones sobrevivientes en los grupos de afinina y capsaicina no volvieron a presentar convulsiones durante los siguientes 14 días. Al final de este periodo, los ratones supervivientes no presentaron cambios morfológicos, ni ningún efecto tóxico visible en los órganos internos como riñones, pulmones, hígado y corazón.

Tabla 8. Toxicidad aguda de alcanidas

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Muertes	Mortalidad (%)	DL ₅₀ (mg/Kg) <i>in vivo</i>	DL ₅₀ (mg/Kg) <i>in silico</i>	SGA	Comentarios
Capsaicina	10 ^a	0/3	0	489.9	450	3	Mediana toxicidad
	50 ^b	0/3	0				
	100 ^a	1/3	33				
	200 ^b	0/3	0				
	400 ^b	0/3	0				
	600 ^b	3/3	100				
	1000 ^a	3/3	100				
Afinina	10 ^a	0/3	0	1,442.2	1,700	4	Baja toxicidad
	100 ^a	0/3	0				
	1000 ^a	0/3	0				
	1300 ^b	0/3	0				
	1600 ^b	3/3	100				
	2900 ^b	3/3	100				
Hexahidroafinina	10 ^a	0/3	0	>5000	12,200	5	Baja toxicidad, relativamente inocuo
	100 ^a	0/3	0				
	1000 ^a	0/3	0				
	1600 ^b	0/3	0				
	2900 ^b	1/3	33				
	5000 ^b	1/3	33				
Vehículo	---	0/3	0	---			

^a fase I, ^b fase II

Aunque la fisiopatología de la muerte por exposición a capsaicina no está del todo clara, Glinsukon y colaboradores sugirieron que la posible causa de muerte por convulsiones con capsaicina es la parálisis respiratoria y el proceso de hipotensión (Glinsukon et al. 1980). Nuestros resultados concuerdan con hallazgos de informes anteriores, en los cuales la capsaicina se consideró como un compuesto tóxico con severos efectos neurológicos, como convulsiones, salivación, eritema de la piel, marcha tambaleante, bradipnea y cianosis (Lee et al. 1991, Saito et al. 1996). En este sentido, las muertes producidas por afinina fueron idénticas a la capsaicina: los animales murieron con una convulsión tónica, que probablemente también podría estar asociada con parálisis respiratoria.

8.2.2 Toxicidad a dosis repetida

Se realizaron ensayos de toxicidad a dosis repetidas con la administración de 50 mg/Kg (p.o) durante 28 días (n = 10 ratones/grupo). La administración repetida de estos

compuestos mostró diferentes grados de letalidad durante el estudio. Capsaicina fue el compuesto más letal (60%), seguido de afinina (30%) y hexahidroafinina (10%). La ingesta de alimentos y el peso corporal no mostraron ningún cambio significativo durante la evaluación (**Figura 24**).

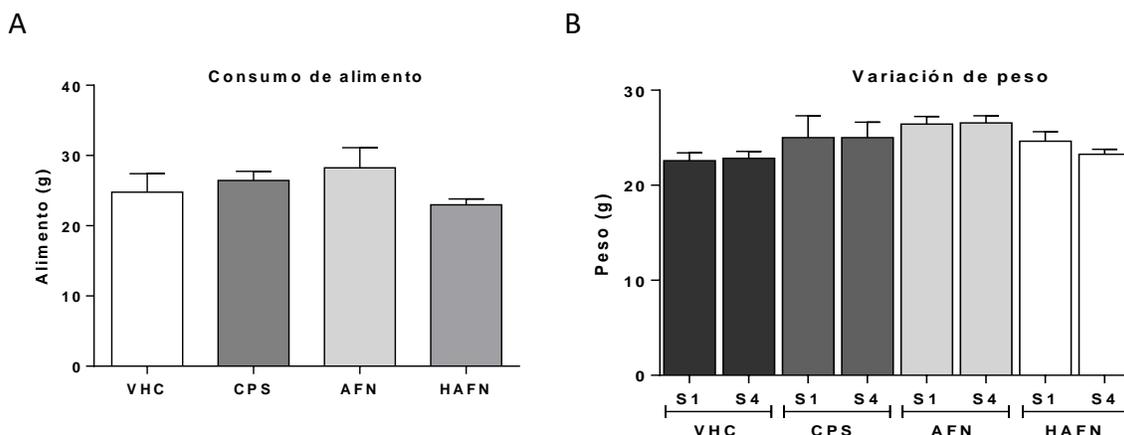


Figura 24. Control de peso e ingesta de alimento. Ingesta de alimento en gramos (g) consumidos por semana/ratón (A) y comparación del peso inicial (S1: semana 1) y final (S4: semana 4) (B). Se compararon capsaicina (CPS), afinina (AFN) y hexahidroafinina (HAFN) con respecto al vehículo (VHC). Los datos se expresan como media \pm SEM. El establecimiento de una diferencia significativa ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.0001$) se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett

Varias investigaciones relacionan el consumo de capsaicina con la pérdida de peso en estudios de alimentación crónica (Johnson 2007). Sin embargo, al menos en un estudio de 28 días, no se encontró que la capsaicina, ni otras alcanidas, afecten el consumo diario de alimentos estándar (Choi et al. 2013). Después de la administración de capsaicina, el comportamiento de los ratones se caracterizó por salivación, comportamiento agresivo, temblores, estiramientos, disnea seguidos de posturas verticales (de pie sobre las patas traseras), saltos intensos seguidos de agitación y dificultades respiratorias que, en algunos casos, terminaron en crisis convulsivas. Para todos los grupos experimentales, los signos de intoxicación disminuyeron 15 min después de la administración oral. Estos comportamientos se presentaron todos los días de administración. Los tratamientos con afinina y hexahidroafinina provocaron menores síntomas tóxicos comparados con capsaicina (Tabla 9). Después de este período de tiempo, los ratones no experimentaron ningún otro problema.

Tabla 9. Principales signos de intoxicación

Tratamiento	Agitación	Salivación	Temblores	Estiramiento corporal	Dificultades respiratorias	Agresividad
Capsaicina	+++	+++	+++	++	++	+++
Afinina	++	++	++	---	+	+
Hexahidroafinina	+	+	+	---	++	+

+++; alto; ++: moderado; +: bajo; ---: ausente

8.2.3 Evaluación de efecto neurofarmacológico

Para identificar los efectos sobre el sistema nervioso central, se evaluó la actividad ambulatoria y de ansiedad durante el ensayo de toxicidad oral de dosis repetidas de 28 días. En primera instancia se evaluó el número de cuadrantes explorados en 2 min, así como el número de levantamientos sobre sus patas traseras en este mismo experimento. Posteriormente, se evaluó la actividad ansiolítica con el modelo de tablero perforado y laberinto elevado. En general, se observó una tendencia de ambientación en las pruebas conductuales con el paso de las semanas, ya que la respuesta final está disminuida en todas las pruebas y en todos los grupos experimentales (**Figura 25**). La administración de afinina y hexahidroafinina no modificaron la actividad locomotora caracterizada por el número de cuadrantes explorados, ni el número de elevaciones corporales con respecto al vehículo. Sin embargo, la administración de capsaicina disminuyó la cantidad de cuadrantes explorados y levantamiento en la primera semana. Después de esto, el grupo no fue diferente con respecto al control; sin embargo, la tendencia a disminuir el comportamiento continuó. El grupo de capsaicina mostró una tendencia a disminuir su actividad ambulatoria, probablemente debido al largo tiempo de recuperación relacionado con la gravedad de los síntomas adversos mencionados para este compuesto (**Figura 25**, A y B). Estos resultados concuerdan con datos previos ([Di Marzo et al. 2000](#)). Esta tendencia de inhibir la actividad motora podría estar relacionada con la participación de receptores vanilloides TRPV1 asociados al control del comportamiento ([Mezey et al. 2000](#)). La activación de estos receptores desencadena indirectamente la biosíntesis de anandamida, que, a su vez, puede ejercer una acción hipocinética al activar la vía de acción cannabinoide (CB) ([Di Marzo et al. 2001](#)). Sin embargo, en un estudio contrario, Dawbarn y colaboradores demostraron que la capsaicina mejora la actividad motora tras una administración bilateral en la sustancia negra; sitio relacionado con el movimiento, la consciencia, la alerta, la visión y la audición ([Dawbarn et al.1981](#)). Se sugiere que los efectos locomotores mejorados observados después de la inyección de este agente están relacionados con el metabolismo de la

dopamina. Por lo que, es posible que la capsaicina provoque los efectos opuestos en el comportamiento motor dependiendo de la ruta y/o la duración del tratamiento.

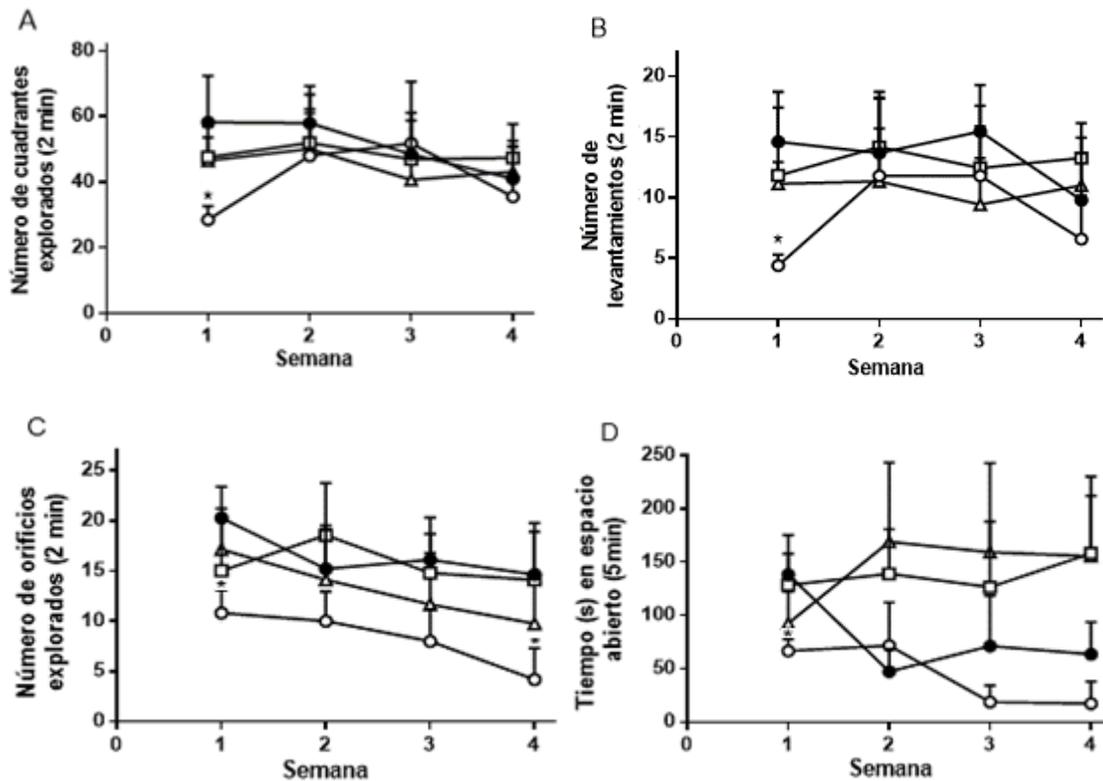


Figura 25. Evaluación del perfil neurofarmacológico. Actividad motora (A), levantamientos (B), respuesta de ansiedad: Tablero con agujeros (C) y laberinto elevado (D). Se compararon el grupo de capsaicina (○), afinina (Δ) y hexahidroafinina (□) con respecto al vehículo (●). Los datos se representan como los cuadrantes explorados en 2 min (A), el número de elevaciones soportadas en las patas traseras de los ratones en 2 min (B), el número de agujeros escaneados en 2 min (C) y tiempo pasado en brazos abiertos en 5 min (D). Los datos se expresan como media ± SEM. El establecimiento de una diferencia significativa (*p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.0001) se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett

La actividad de ansiedad se evaluó con la prueba de exploración de agujeros en el tablero, utilizando los parámetros cuantitativos de inclinación de la cabeza y con el modelo de laberinto elevado. En el modelo de exploración de agujeros en tablero se considera que los valores bajos reflejan una condición de ansiedad alta, mientras que los valores altos indican un nivel de ansiedad bajo (Crawley 1985). Solo los animales tratados con capsaicina mostraron valores bajos para el parámetro de inclinación de la cabeza en comparación con el vehículo. Estos valores bajos fueron 44% en la primera semana y 64% en la última

semana. Esta propiedad ansiogénica fue concordante con la prueba del laberinto plus, ya que la capsaicina favoreció permanecer en los brazos cerrados durante más tiempo. Mascarenhas y colegas sugirieron que el efecto de ansiedad producido por la capsaicina se debe principalmente a la activación de TRPV1 dentro de la materia gris periacueductal dorsal en ratones (Mascarenhas et al. 2013). Los resultados del presente proyecto concuerdan con los de Choi et al. quienes relacionan este efecto con comportamientos similares a la depresión (Choi et al. 2013). En contraste, los animales que recibieron hexahidroafinina y afinina mostraron una tendencia a aumentar el tiempo que pasaron en los espacios abiertos. Este comportamiento está asociado con efectos ansiolíticos; sin embargo, se requiere repeticiones dexperimentales para confirmar estas tendencias (Figura 25, C y D).

8.2.4 Análisis sanguíneo

Una disminución en el nivel de proteína es similar a trastornos digestivos, insuficiencia renal o hepática, parasitismo, infecciones crónicas, paperas y tumores. De igual forma, el aumento de creatinina está relacionado con patologías renales, mientras que un aumento en la alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y la gamma-glutamyl transferasa son indicativas de lesiones hepáticas, musculares, cardíacas y pancreáticas (Latimer et al. 2003). Los parámetros hematológicos y bioquímicos no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo de vehículo. Por lo tanto, los datos sugieren que el tratamiento con alcanidas no afectó los riñones y el hígado después de la administración repetida durante 28 días (Tabla 10-12).

Tabla 10. Parámetros hematológicos. Fórmula roja

Tratamiento	Fórmula roja						
	HGB (g/dL)	RBC (10 ⁶ /mm ³)	HCT (%)	MCV (fm ³)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /mm ³)
Capsaicina	12.4 ± 0.8	8.0 ± 0.6	40.8 ± 2.3	51.0 ± 0.9	15.4 ± 0.1	30.3 ± 0.3	281 ± 45.2
Afinina	13.5 ± 1.6	8.8 ± 0.9	43.7 ± 5.0	50.2 ± 1.8	15.4 ± 0.6	30.8 ± 0.1	293.7 ± 42.7
Hexahidroafinina	13.1 ± 1.5	8.9 ± 1.0	42.1 ± 5.2	47.4 ± 0.3	14.8 ± 0.1	31.3 ± 0.3	317.5 ± 3.5
Vehículo	12.8 ± 1.3	8.2 ± 0.6	42.2 ± 3.9	51.2 ± 1.9	15.5 ± 0.7	30.4 ± 1.1	213 ± 51.0

Hemoglobina (HGB); recuento de eritrocitos (RBC); hematocrito (HCT); volumen celular medio (MCV); hemoglobina celular media (MCH); concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC); plaquetas (PLT). Los datos se expresan como media ± SEM

Tabla 11. Parámetros hematológicos. Fórmula blanca

Tratamiento	Fórmula blanca						
	WBC (10 ³ /mm ³)	NS (%)	NB (%)	ESN (%)	BSF (%)	MNC (%)	LNF (%)
Capsaicina	6.8 ± 1.2	58.0 ± 7.1	0	2.0 ± 1.0	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.0	37.5 ± 7.8
Afinina	7.2 ± 1.2	59.3 ± 5.5	0	2.0 ± 1.0	0.3 ± 0.3	1.0 ± 1.0	37.33 ± 4.0
Hexahidroafinina	8.1 ± 1.1	65.5 ± 7.8	0	2.5 ± 1.5	0	0.5 ± 0.5	31.5 ± 6.4
Vehículo	6.9 ± 2.2	61.2 ± 5.1	0	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.7	1.1 ± 0.8	34.6 ± 4.5

Glóbulos blancos (WBC); neutrófilos segmentados (NS); neutrófilos en banda (NB); eosinófilos (ESN); basófilos (BSF); Monocitos (MNC); Linfocitos (LNF). Los datos se expresan como media ± SEM

Tabla 12. Parámetros enzimáticos

Tratamiento	CRE (mg/dL)	ALB (g/L)	ALT/TGP (U/L)	AST/TGO (U/L)	GGT (U/L)
	Capsaicina	0.4	34.2 ± 2.1	44.8 ± 8.4	142.8 ± 5.6
Afinina	0.8 ± 0.6	39.0 ± 1.7	53.2 ± 10.0	183.3 ± 34.0	1.9 ± 0.5
Hexahidroafinina	0.5	41.6 ± 3.3	68.3 ± 7.0	218.6 ± 24.2	1.9 ± 0.3
Vehículo	0.6 ± 0.5	37.7 ± 3.8	56.1 ± 7.9	208.39 ± 47.0	2.9 ± 1.7

Creatinina (CRE); albúmina (ALB); alanina aminotransferasa (ALT); aspartato aminotransferasa (AST); transaminasa glutámica oxaloacética (TGO); gamma glutamil transferasa (GGT). Los datos se expresan como media ± SEM

8.2.5 Daños macroscópicos en órganos principales

Después de la necropsia, los órganos pulmón, bazo, hígado, riñón, corazón y estómago fueron extraídos, enjuagados con agua destilada, pesados y observados en busca de alteraciones o cambios morfológicos como úlceras, necrosis, hematomas, entre otros. En todos los grupos, los pulmones no mostraron inflamación; sin embargo, se encontraron marcas marrones en su apariencia, incluido el grupo de vehículo. Esta presencia de marcas se determinó en un 80% en el grupo de capsaicina, 60% en el de hexahidroafinina, 33% en afinina y 25% en el grupo vehículo. Es posible que la presencia de marcas marrones se debiese al uso de etanol, DMSO o Tween 80 y no a un efecto *per se* de las alcanidas. Finalmente, se encontró inflamación intestinal en 20% y 33% de los ratones en los grupos de hexahidroafinina y capsaicina, respectivamente. En todos los grupos, la apariencia de la piel, pelaje y ojos fue normal (Tabla 13-14).

Tabla 13. Índice de variación de peso de órganos de ratones administrados durante 28 días con alcanmidas

Órgano	Índice de variación de peso del órgano			
	Vehículo	Capsaicina	Afinina	Hexahidroafinina
Bazo	0.68 ± 0.17	0.75 ± 0.16	0.64 ± 0.10	0.73 ± 0.17
Pulmones	1.58 ± 0.36	1.46 ± 0.23	1.24 ± 0.21	1.46 ± 0.23
Corazón	0.64 ± 0.15	0.58 ± 0.08	0.59 ± 0.12	0.59 ± 0.11
Hígado	6.22 ± 0.92	6.49 ± 0.87	5.42 ± 0.55	5.63 ± 0.83
Riñones	1.42 ± 0.16	1.52 ± 0.15	1.37 ± 0.19	1.38 ± 0.08
Estómago	1.0 ± 0.21	1.19 ± 0.21	0.97 ± 0.35	0.88 ± 0.24

Índice de variación de peso del órgano = (peso del órgano x 100) / peso corporal. Las alcanmidas se administraron a ratones a una dosis de 50 mg/Kg durante 28 días. Los datos se expresan como media ± SEM. El establecimiento de una diferencia significativa (p < 0.05) se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett

Tabla 14. Apariencia de órganos principales de ratones administrados durante 28 días con alcanmidas. Daño macroscópico

Órgano	Vehículo	Capsaicina	Afinina	Hexahidroafinina
Bazo	Normal	Normal	Normal	Normal
Hígado	Normal	Normal	Normal	Normal
Riñones	Normal	Normal	Normal	Normal
Corazón	Normal	Normal	Normal	Normal
Estómago	Normal	Normal	Normal	Normal
Pulmones	Marcas marrones +	Marcas marrones +++	Marcas marrones +	Marcas marrones ++
Intestino	Normal	Inflamación++	Normal	Inflamación+

Las alcanmidas se administraron a una dosis de 50 mg/Kg durante 28 días. Los órganos se analizaron macroscópicamente y se compararon con respecto al vehículo. +++: alto; ++: moderado; +: bajo

8.2.6 Estudio de genotoxicidad

La prueba de micronúcleos identifica sustancias que inducen roturas cromosómicas y aneuploidía. Los micronúcleos son formados cuando un fragmento cromosómico o un cromosoma intacto no puede migrar a un polo mitótico durante la etapa anafase de la división celular y no se incorpora al núcleo. En este estudio se analizó la presencia de micronúcleos en médula ósea tras el tratamiento con las alcanmidas antes mencionadas

durante 28 días. Los datos del ensayo genotóxico sugieren la formación de micronúcleos en 28%, 5% y 3% en los grupos de capsaicina, afinina y hexahidroafinina, respectivamente, en comparación con el grupo administrado con ciclofosfamida (Tabla 15). Por lo que afinina y hexahidroafinina no parecen ser compuestos con actividad genotóxica.

Tabla 15. Efecto genotóxico de alcanmidas

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Vía de administración	PCE:NE	MNPCE/ 1000 PCE
Capsaicina	50	p.o	23.7±5.9 [#]	34.2±8.3 ^{#, +}
Afinina	50	p.o	19.9±7.2	6.3±3.9 [#]
Hexahidroafinina	50	p.o	22.3±6.8 [#]	4.0±3.3 [#]
Vehículo	---	p.o	25.1±7.2 [#]	0
Ciclofosfamida	40	i.p	12.0±3.6 ⁺	121.0±22.0 [#]

Eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE); eritrocitos policromáticos (PCE); eritrocitos normocromáticos (NE).

Diferencia significativa con respecto a ciclofosfamida ($p < 0.05$)

+ Diferencia significativa con respecto al vehículo ($p < 0.05$)

Los datos son expresados como media \pm SEM

Los resultados de genotoxicidad son concordantes con el trabajo de Cariño-Cortés y colaboradores, quienes evaluaron el efecto genotóxico del extracto etanólico de *H. longipes* (3-10 mg/Kg). Su estudio demostró que la proporción de eritrocitos policromáticos con respecto al número de eritrocitos normocromáticos inducidos por *H. longipes* fue pequeña y no significativa (Cariño-Cortés et al. 2010). En contraste, la capsaicina causó la formación de micronúcleos en un 30% de los ratones en comparación con ciclofosfamida. Los estudios de genotoxicidad para capsaicina han sido contraversiales y poco claros. Un estudio *in vivo* realizado por Nagabhushan y Bhide mostró un aumento en la incidencia de formación de micronúcleos después de la administración (i.p) de 7.5 mg/Kg de capsaicina en ratones (Nagabhushan et al.1985). Esta tendencia fue confirmada por Marques en un estudio *in vitro* en linfocitos humano (Marques et al. 2002). Sin embargo, De y colaboradores demostraron un efecto protector de capsaicina contra el efecto clastogénico y el daño al ADN causado por la exposición de ciclofosfamida en la médula ósea del ratón (De et al. 1995). Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se sugiere que las alcanmidas, específicamente afinina y hexahidroafinina, podrían ser compuestos candidatos útiles y seguros en el tratamiento del dolor.

8.2.7 Farmacodinamia. Exploración del mecanismo de señalización de alcanidas

8.2.7.1 Modelo de formalina

La formalina es un irritante químico que provoca daño tisular, inflamación y dolor en las zonas administradas. La inyección subcutánea de formalina constituye un modelo experimental utilizado para evaluar acciones antinociceptivas. La inyección subcutánea de formalina al 2% en la zona del nervio trigémino (orofacial) produce una conducta nociceptiva caracterizada por tallado facial perfectamente diferenciada en dos fases. La fase I se presenta inmediatamente tras su administración (a los pocos segundos) con una duración de 3-5 min, seguida de una fase de relativa inactividad (5-10 min), para finalizar con una respuesta más tardía (10-15 min) y prolongada (20-40 min) asociada a la fase II (**Figura 26**).

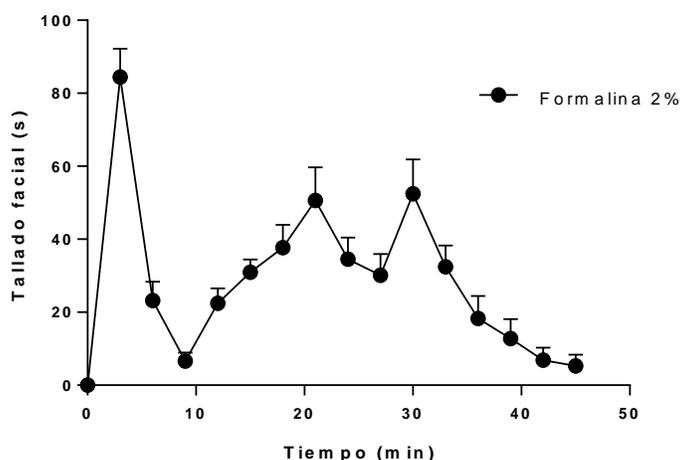


Figura 26. Curso temporal del efecto nociceptivo expresado como tallado facial de la administración local de formalina 2% (40 µL) en ratón evaluado durante 45 min. Los datos se expresan como el promedio de 6 animales \pm SEM

El efecto antinociceptivo de capsaicina, afinina y hexahidroafinina a diferentes concentraciones se expresa en la **Tabla 16** como porcentaje de antinocicepción en comparación con el vehículo.

El patrón de respuesta dolorosa a la inyección de formalina en la región orofacial observado en los experimentos fue similar al reportado en la literatura ([Clavelou et al. 1989](#)). Los animales administrados con formalina al 2% presentaron una típica respuesta bifásica de tallado facial, caracterizada en primera instancia por la activación directa de los

nociceptores periféricos, originando la liberación de la sustancia P y aminoácidos excitadores, como bradicinina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, seguido de la activación de las fibras C (no mielinizadas), originando la liberación de mediadores químicos inflamatorios como prostaglandinas, histamina y serotonina (Shibata et al. 1989). El efecto analgésico de diclofenaco se debe a la inhibición de la producción de prostaglandinas (mediador asociado al proceso inflamatorio) (Morita 2002).

Tabla 16. Efecto antinociceptivo de alcanidas en la zona orofacial de ratón en la prueba de formalina

% de efecto antinociceptivo				
Administración µg/sitio	Diclofenaco	Capsaicina	Afinina	Hexahidroafinina
1	10.7±4.8	30.9±6.2	5.5±3.5	18.3±7.2
3	10.3±5.2	36.8±8.6	22.2±1.8	29.4±5.7
10	13.6±2.4	40.1±2.5	47.6±2.0	40.5±3.4
30	24.3±5.7	-----	64.1±3.9	39.8±2.8

8.2.7.2 Participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides

La participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides está altamente vinculada en la transmisión de los procesos nociceptivos a nivel del sistema nervioso central y periférico. Por tal motivo, se exploró el papel de estos receptores en el mecanismo de señalización de las alcanidas capsaicina, afinina y hexahidroafinina, usando antagonistas en el modelo de dolor orofacial. Un fármaco con acción antagonista es aquel que provoca la pérdida del efecto de otra molécula sobre un sitio de acción, es decir, una molécula antagonista impide la unión y/o acción de una molécula agonista. La capsaicina es uno de los agonistas de los receptores TRPV1 que, al ser agonizados, liberan neurotransmisores excitatorios del SNC como la sustancia P y somatostatina. Ante un proceso de estimulación continua, se lleva a cabo la inhibición de la biosíntesis y el transporte axonal de la sustancia P, lo que conlleva una depleción del mismo en el sistema nervioso central y periférico, produciendo un efecto analgésico. La capsazepina (C₁₉H₂₁ClN₂O₂S) es un antagonista sintético competitivo de la capsaicina, por tal motivo es utilizado para evaluar la participación de capsaicina y otros compuestos en esta vía de señalización. En este contexto, el rol del sistema gabaérgico es inhibir o reducir la actividad neuronal, así, bicuculina (C₂₀H₁₇NO₆) y saclofen (C₉H₁₂ClNO₃S) reducen el efecto de los

neurotransmisores inhibitorios mediante el antagonismo de los receptores GABA_A y GABA_B. Por último, los compuestos AM251 (C₂₂H₂₁Cl₂N₄O) y AM630 (C₂₃H₂₅IN₂O₃) funcionan como antagonistas de la vía de señalización cannabinoide CB1 y CB2 respectivamente, en donde neurotransmisores inhibitorios como la anandamida, actúan como agonistas en este mecanismo de acción.

La primera fase del estudio de exploración de los mecanismos de señalización de las alcanmidas contempló el cálculo de la concentración, y el tiempo de administración del pretratamiento con las alcanmidas (**Figura 27**). Cabe mencionar que se utilizó la concentración de alcanmidas que provocó el mejor efecto antinociceptivo, es decir 3, 10, 30 µg/sitio para capsaicina, afinina y hexahidroafinina, respectivamente. La segunda fase de la prueba se enfocó en determinar el efecto antinociceptivo obtenido bajo estas condiciones, siendo, la prevención del efecto antinociceptivo, referente de la participación de las vías de señalización.

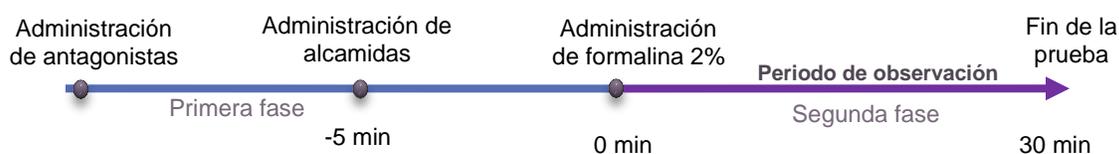


Figura 27. Diseño experimental. Participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides. En donde X es el tiempo de

Con base en el estudio de Yuan Cui y colaboradores se contemplaron 2 h como el periodo de administración de capsazepina, previo a la administración de las alcanmidas a evaluar (Cui et al. 2014). Posteriormente, con un estudio piloto en el que se administraron las concentraciones de 10, 50, 100 y 500 µg/sitio de capsazepina, se determinó la concentración adecuada para cada grupo experimental. Los resultados sugieren la utilización de capsazepina de 10 µg/sitio para capsaicina y 100 µg/sitio para afinina y hexahidroafinina. De la misma manera, se determinó la concentración de 6 µg/sitio para los antagonistas gabaérgicos y 10 µg/sitio para los compuestos que actúan por la vía cannabinoide. Todos ellos con un tiempo de espera de 15 min previos a la intervención con las alcanmidas en estudio. Una vez establecidas las condiciones experimentales, se realizó la administración solo de los antagonistas, con la finalidad de descartar algún efecto *per se* de las moléculas sobre la actividad antinociceptiva de los compuestos. Como se puede

observar en la **Figura 28** ningún tratamiento con los antagonistas mostró efecto sobre el tallado facial producido por la administración de formalina, lo que quiere decir que la ganancia o pérdida de efecto antinociceptivo se debe al antagonismo de los receptores, originando que las alcanmidas disminuyan o pierdan totalmente su acción antinociceptiva.

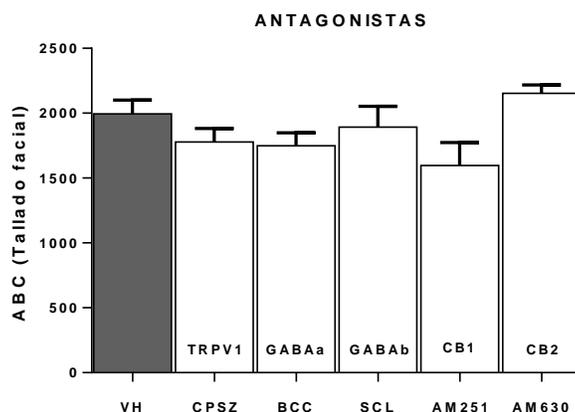


Figura 28. Efecto de la administración orofacial de los antagonistas en el modelo de formalina. VH: vehículo, CPSZ: capsazepina (10 µg/sitio, antagonistas de los receptores TRPV1), BCC: bicuculina (6 µg/sitio, antagonistas de los receptores GABA_A), SCL: saclofen (6 µg/sitio, antagonistas de los receptores GABA_B), AM251 (10 µg/sitio, antagonista de los receptores CB1) y AM630 (10 µg/sitio, antagonista de los receptores CB2). Cada valor representa el promedio de 6 animales ± SEM *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.0001, ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Dunnett

El efecto analgésico de capsaicina se ha relacionado con su capacidad de agotar la sustancia P de las neuronas de fibras C aferentes primarias, provocando en un principio sensaciones de dolor, edema y vasodilatación, originados por la liberación de histamina contenida en los mastocitos locales (Helme et al. 1985). Los efectos persistentes de capsaicina sobre las neuronas sensoriales se deben a que el compuesto altera en forma prolongada la capacidad de la membrana plasmática para excitarse y propagar potenciales de acción (Buck et al. 1986). Los efectos de capsaicina sobre neuronas sensitivas con fibras aferentes C, involucradas en la recepción y transmisión de estímulos dolorosos, se manifiestan como pérdida de la sensibilidad nociceptiva. Por las analogías estructurales entre capsaicina, afinina y hexahidroafinina, se propuso la posible participación del receptor TRPV1 como vía de señalización. En la **Figura 29** se observa la pérdida de actividad antinociceptiva de las tres alcanmidas de ensayo cuando se utiliza el antagonista de TRPV1. En el caso de capsaicina era de esperarse este comportamiento, sin embargo, la pérdida

parcial de la actividad con afinina y hexahidroafinina fue novedosa. Esto indica la participación de los receptores TRPV1 en el mecanismo de acción.

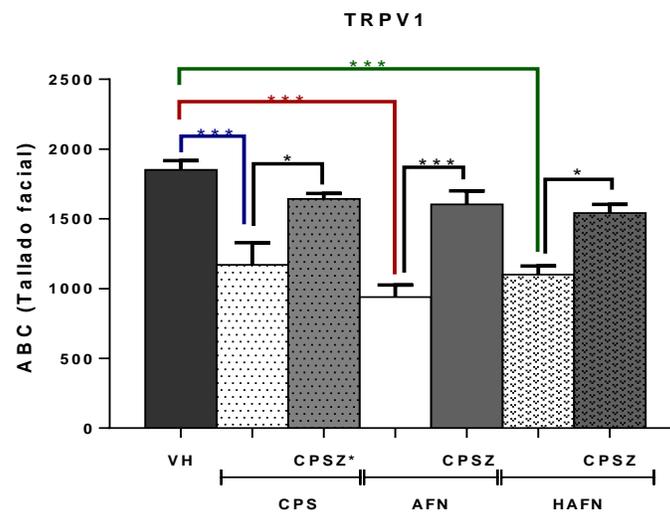


Figura 29. Exploración de la participación de los receptores TRPV1 en el mecanismo de señalización de la actividad antinociceptiva de las alcanmidas en el modelo de formalina orofacial. VH: vehículo, CPS: capsaicina (3 µg/sitio), AFN: afinina (30 µg/sitio) y HAFN: hexahidroafinina (30 µg/sitio). CPSZ* (10 µg/sitio), CPSZ (100 µg/sitio). Cada valor representa el promedio de 6 animales ± SEM *p < 0.05 y ***p < 0.001 ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Tukey

La extensa distribución tisular y celular de los receptores TRPV1, junto a la potenciación de su actividad por mediadores proinflamatorios liberados durante un daño tisular, han situado a este receptor como un mediador crítico de la sensibilización inflamatoria de los nociceptores, que resulta en la manifestación de hipersensibilidad en la zona dañada (Belmonte et al. 2008, Planells-Cases et al. 2005). A nivel celular, el receptor TRPV1 es un medidor común en distintas rutas de señalización, que son activadas por factores proalgésicos, produciendo la potenciación de su funcionalidad que, en último término, resulta en un incremento de la excitabilidad de los nociceptores (Figura 30). Varias son las causas de la sensibilización de los receptores TRPV1. Por ejemplo, la activación directa por agonistas (ej. endovanilloides, capsaicina, anandamida, *N*-araquidonoil-dopamina (NADA), *N*-oleoildopamina, entre otras) o productos del metabolismo lipídico (diacilgliceroles, fosfoinositoles), nucleótidos de purina y sus metabolitos, así como iones inorgánicos (calcio y magnesio) (Ramsey et al. 2006). Otro de los factores de activación de los receptores TRPV1 es la acción del pH ácido del medio, producto de procesos inflamatorios (Messeguer et al 2006), además de cambios de temperatura, así como estímulos mecánicos, acoplamiento a receptores inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), y por fosforilación del canal (Vriens

et al. 2004); activación por receptores como los acoplados a proteínas G, y los receptores de tirosina cinasa, que activan la enzima fosfolipasa C, modulando los canales TRP mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), a través de la producción de diacilglicerol (DAG), o mediante la producción del IP₃ y la consecuente liberación del calcio intracelular (Berridge et al. 2003).

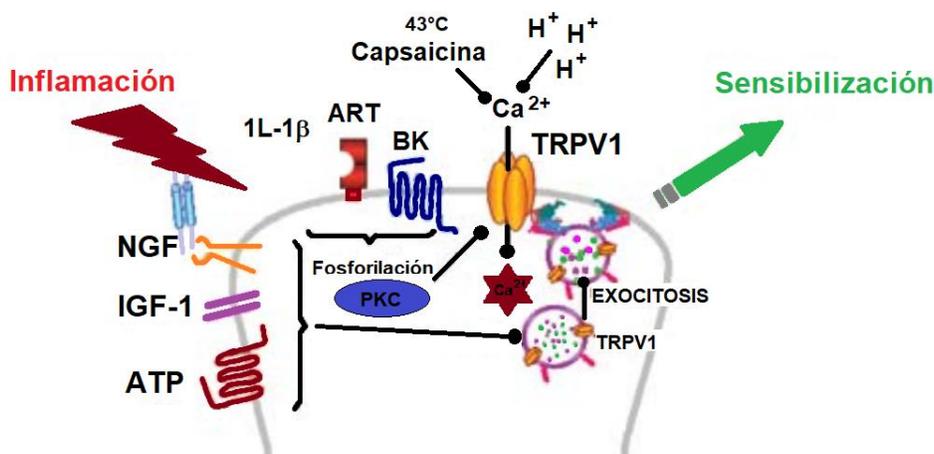


Figura 30. Rutas de señalización activadas por los agentes proinflamatorios que convergen en el receptor TRPV1, afectando la sensibilización de los nociceptores. Adaptado de Ferrer-Montiel 2009

La estimulación del receptor produce un incremento en la entrada de calcio al citosol, provocando la despolarización de la membrana y la subsecuente desensibilización del complejo protéico, sin embargo, el incremento de calcio al interior de la célula también tiene la capacidad de actuar como segundo mensajero, activando rutas de señalización como la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa dependiente de calmodulina (CAMKII), que fosforilan al receptor alterando su funcionalidad, como la reducción del umbral de activación térmica de 42 °C a 35 °C, provocando hiperalgesia (Planells-Cases et al 2007, Caterina et al. 2001, Huang et al. 2006). Uno de los agonistas más populares de los receptores TRPV1 es la capsaicina (IC₅₀ = 10 nM), sin embargo, por sus efectos pungentes su uso farmacéutico es limitado. Por esta razón, en los últimos años se ha incrementado el interés por desarrollar fármacos dirigidos a obtener agonistas más potentes, que induzcan desensibilización del receptor con menores o nulos efectos no deseados. La resiniferatoxina es un compuesto mucho más potente que capsaicina (IC₅₀ = 10 pM) que inhibe la actividad del receptor TRPV1, sin embargo, su biodisponibilidad oral es limitada y tiene posible actividad tumorigénica (Messegueur et al. 2006). Otra estrategia para el tratamiento del dolor es el desarrollo de antagonistas que induzcan la inhibición del receptor. La capsazepina es el

antagonista competitivo de la capsaicina más conocido, no obstante, su aplicación en modelos animales ha mostrado resultados contradictorios, por un lado, no ha evidenciado tener efectos analgésicos ni antiinflamatorios, pero si efectos atenuantes en la hiperalgesia (S zallasi et al. 2007). Otros inhibidores de TRPV1 desarrollados en los últimos tiempos son las moléculas DD161515 y DD191515, que actúan como potentes antagonistas no competitivos con importante actividad antinociceptiva y antiinflamatoria *in vivo*, sin embargo, su elevada toxicidad ha frenado su desarrollo farmacéutico (Messeguer et al. 2006, Planells-Cases et al. 2003). En general, el receptor TRPV1 es un blanco terapéutico de interés farmacológico por su participación directa e indirecta en los diferentes mecanismos de señalización, en especial, en aquellos asociados al dolor, no obstante, aun después del enorme esfuerzo científico y económico realizado en los últimos años en la búsqueda y desarrollo de antagonistas de TRPV1, el número de estos compuestos que han progresado a ensayos clínicos en humanos es marcadamente pobre (Tabla 17).

Tabla 17. Compuestos con actividad sobre el receptor TRPV1

Nombre	Compuesto	Compañía	Acción	Ruta	Indicaciones	Fase clínica
Transacin	Capsaicina	NeurogenX	Agonista	Parche transdérmico	Neuropatía asociada a VIH	III
WL-1001 WL-1002	Civamida	Winston	Agonista	Intranasal	Migraña, osteoartritis	III
ALGRX4975	Capsaicina	Anesiva	Agonista	Inyección	Dolor	II
SB-705498	SB-705498	GlaxoSmith-Kline	Antagonista	Oral	Migraña, dolor dental	II
NGD 8243	NGD 8243	NeurogenX	Antagonista	Oral	Dolor	II
AMG 517	AMG 517	Amgen	Antagonista	Oral	Dolor	I
GRC 6211	GRC 6211	Glenmark	Antagonista	Oral	Osteoartritis, dolor dental, dolor neuropático	I

El receptor TRPV1 tiene seis dominios transmembrana que forman un poro conductor de iones en el centro del canal (zona verde, **Figura 31**), así como dos dominios citosólicos en ambos extremos de la proteína. Diversos estudios sugieren que la capsaicina se une a un sitio extracelular del receptor, sin embargo, debido a que la capsaicina o sus análogos como capsazepina o resiniferatoxina, son solubles en lípidos, es posible que pasen a través de la membrana celular y actúen sobre los sitios de unión presentes en la superficie intracelular del receptor. Por lo tanto, la ubicación de la unión de capsaicina aún no está plenamente determinado (Liu et al. 1994, Oh et al. 1996). Jordt y colaboradores demostraron que la

zona polar de capsaicina es estabilizada por enlaces de hidrógeno y su cola lipofílica interactúa con varios residuos hidrófobos dentro de la membrana. El residuo aromático de la capsaicina interactúa con un residuo aromático 511 ubicado en la región citosólica, enlazando los dominios TM2 y TM3 (Jordt et al. 2002). Los resultados de la presente investigación relacionan al efecto antinociceptivo de las alcanmidas con la interacción con el receptor TRPV1, dado que el efecto analgésico de estos compuestos fue bloqueado, en mayor o menor grado, por la presencia de capsazepina. La interacción de las alcanmidas con el receptor TRPV1 pudiera asociarse a las características químicas de las moléculas, es decir, (1) todas incluyen un grupo amida, (2) todas incluyen una cadena de ácido graso semejante, lo que les confiere alta lipofilicidad. En el análisis de acoplamiento molecular realizado por nuestro grupo de investigación, se sugiere que el grupo amida juega un papel importante en la actividad antinociceptiva, debido a una importante interacción con el residuo THR550 del receptor TRPV1. Adicionalmente, se identificó que la interacción con el residuo GLU570 podría estar involucrado en la propiedad pungente de moléculas como capsaicina (de la Rosa-Lugo et al. 2017) (Figura 32).

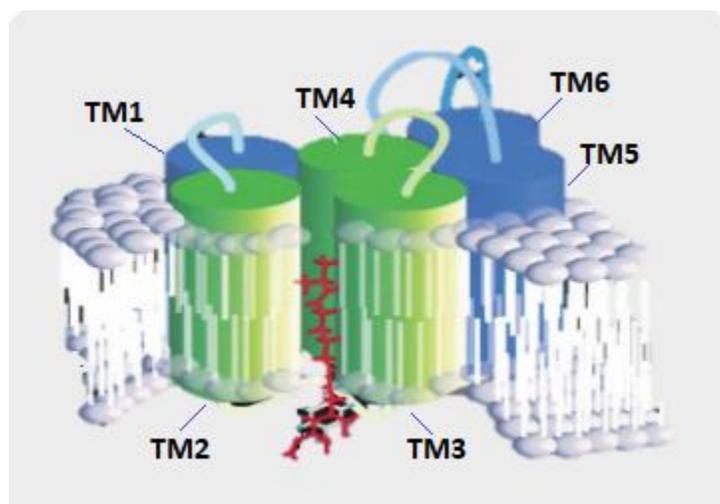


Figura 31. Modelo estructural del receptor TRPV1. Acoplamiento de capsaicina. Adaptado de Jordt 2002.

Es importante resaltar que la transmisión de los impulsos nociceptivos no es exclusiva de una sola vía de señalización, de ahí la complejidad de su tratamiento farmacológico. En los últimos años se han investigado y caracterizado diversos mecanismos asociados con el dolor como el sistema cannabinoide.

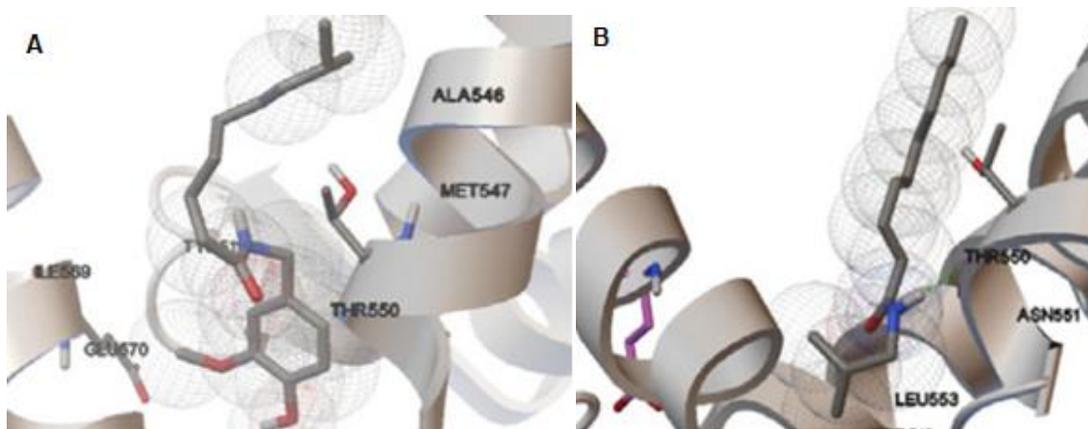


Figura 32. Interacción de las alcaloides con el sitio de reconocimiento del receptor TRPV1 considerando la configuración de "cola arriba, cabeza abajo". A) capsaicina y B) afinin (de la Rosa-Lugo et al. 2017)

Este sistema debe su nombre a compuestos aislados de la planta *Cannabis sativa*, metabolitos conocidos por sus propiedades psicoactivas. Su elevada liposolubilidad hizo pensar que el mecanismo de acción estaba relacionado con la modificación de los fosfolípidos de la membrana plasmática, sin embargo, no tardaron mucho en aislarse y caracterizarse receptores de membrana específicos de los cannabinoides, lo que puso de manifiesto la existencia de ligandos endógenos (Szulakowska et al. 2007, Izzo et al. 2010). Los receptores CB1 son abundantes en el cerebro y ganglios basales. La presencia del receptor en el hipocampo y el córtex están relacionados con los efectos sobre el aprendizaje y la memoria y con propiedades psicotrópicas y antiepilépticas; en menor grado, los receptores CB1 también tienen presencia en linfocitos B, linfocitos T, monocitos y células cebadas. El receptor CB2 se expresa abundantemente en linfocitos B, células asesinas naturales o «*natural killers*» (NK), monocitos, neutrófilos, linfocitos T y células cebadas y en menor proporción en el SNC (Galiègue et al. 1995). La localización y distribución de receptores CB-1 y CB-2 en el sistema inmune, en las células de la médula ósea y en los glóbulos blancos coincide perfectamente con los conocidos efectos inmunomoduladores de los cannabinoides. La anandamida es uno de los principales ligandos endógenos con efecto analgésico local, debido a su interacción con los receptores CB1 localizados fuera del SNC (Devane et al. 1988). Mientras que la palmitoiletanolamida (PEA) debe su efecto a su interacción con los receptores CB2, también periféricos, consiguiendo un efecto 100 veces más potente que la anandamida. En general, la unión del ligando al receptor cannabinoide produce la activación de proteínas G inhibitoras, que entonces se disocian en la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$. La subunidad α inhibe a la enzima adenilato ciclasa

(AC). Esto se traduce en menor producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y, por lo tanto, en menor actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), lo cual produce, en última instancia, una disminución de la síntesis de algunas proteínas. Por su parte, el complejo formado por las subunidades $\beta\gamma$ activa la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y de la cinasa de fosfatidilinositol (PI3K). Otros efectos mediados por el receptor CB1 son una disminución de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje, y un aumento de la conductancia de los canales rectificadores de potasio, lo cual produce hiperpolarización de la célula (**Figura 33**) (Bosier et al. 2010). Este mecanismo involucra la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC) y por lo tanto la disminución de los niveles de AMPc (McAllister et al. 2002, Fine et al. 2013), así como la modulación de algunos canales iónicos como los de potasio y calcio (aumentando la conductancia del potasio y disminuyendo la entrada de calcio), originando así una disminución en la despolarización de la membrana y bloqueando la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina y glutamato (Herkenham et al. 1991). La señalización de los cannabinoides también involucra la fosforilación y activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (ej. MAPKs, ERK, JNK), alterándose por diversos procesos la proliferación y diferenciación celular (McAllister et al. 2002; Velasco et al. 2004). La activación de los receptores CB2 sigue las mismas rutas que las de los CB1, pero sin alterar los canales iónicos y por lo tanto la liberación de neurotransmisores (McAllister et al. 2002). Cabe resaltar que los cannabinoides no sólo tienen interacción con los receptores CB1 y CB2. Se ha demostrado que su mecanismo de acción involucra de manera directa o indirecta la participación de otras vías de señalización como la de los receptores TRPV, PPAR y de los opiáceos (Meng et al. 1998, Pertwee et al. 2010).

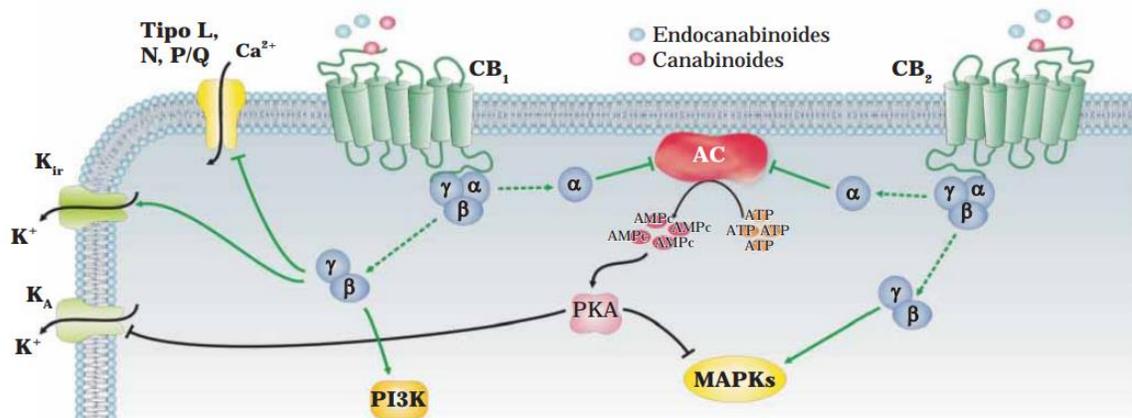


Figura 33. Señalización clásica de los receptores cannabinoides CB1 y CB2. Adaptado de Bosier et al. 2010

La pérdida del efecto antinociceptivo de capsaicina, afinina y hexahidroafinina debido al pretratamiento con los antagonistas AM251 (CB1) y AM630 (CB2) se ve esquematizado en la **Figura 34**. Los resultados sugieren una pérdida del efecto antinociceptivo de capsaicina y afinina en presencia del antagonista AM251, lo que implica la participación de los receptores CB1 y en menor grado de los receptores CB2. En el caso de hexahidroafinina sólo se puede observar una tendencia de la participación de los receptores, sin embargo, no se aprecia una diferencia estadísticamente significativa, por lo que son necesarios más estudios para corroborar esta información. Es importante resaltar que los receptores CB1 son más abundantes en el cerebro y en neuronas periféricas. Considerando que la región orofacial es una zona altamente inervada de fibras sensoriales con terminaciones libres, y que todas las fibras nociceptivas de esta región viajan del núcleo espinal del nervio trigémino a centros nerviosos superiores, no es de extrañar la participación en mayor grado de los receptores CB1.

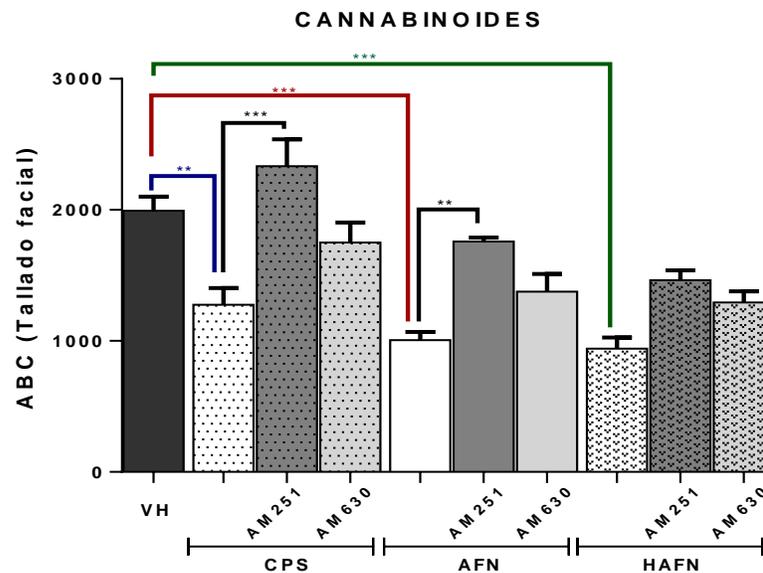


Figura 34. Exploración de la participación de los receptores cannabinoides en el mecanismo de señalización de la actividad antinociceptiva de las alcanmidas en el modelo de formalina orofacial. VH: vehículo, CPS: capsaicina (3 µg/sitio), AFN: afinina (30 µg/sitio) y HAFN: hexahidroafinina (30 µg/sitio). AM251 (10 µg/sitio, antagonista de los receptores CB1), AM630 (10 µg/sitio, antagonista de los receptores CB2). Cada valor representa el promedio de 6 animales ± SEM *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.0001, ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Tukey

Raduner y colaboradores identificaron, mediante un estudio SAR, diferentes características estructurales importantes de amidas vegetales necesarias para su unión con los receptores CB (Figura 35).

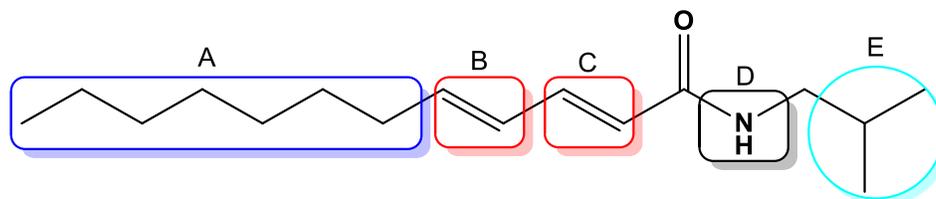


Figura 35. Características estructurales importantes de amidas para su interacción con los receptores CB

Para una buena interacción con el receptor CB2 la cadena alquílica (A) necesita ser más larga que diez átomos de carbono. El doble enlace (B) no es necesario para su unión con el receptor CB1, pero aumenta su afinidad para CB2 dependiendo de la cadena de alquilo. Por otro lado, el doble enlace (C) es necesario para la interacción con los receptores CB. El protón del grupo amida (D) parece estar involucrado en la unión al receptor CB2. De igual forma, el residuo isobutilo (E) favorece la interacción con los receptores CB2. (Raduner et al. 2007).

Finalmente, otra de las vías de señalización implicadas en la nocicepción es la gabaérgica. Esta vía de señalización está ligada a los procesos involucrados en el dolor neuropático, causado por la disfunción del sistema nervioso central o periférico. Las principales afecciones que demeritan la calidad de vida de los pacientes son la presencia de hiperestesia e hiperalgesia, alodinia y descargas espontáneas lancinantes. Estas afecciones son causadas principalmente por la neuralgia del trigémino, la neuralgia postherpética y la neuropatía diabética (Correa-Illanes 2014). El dolor neuropático, a diferencia del nociceptivo, se produce cuando la señal algésica se origina en neuronas centrales o periféricas, que funcionan de un modo aberrante por haber sido dañadas o alteradas de algún modo. Si bien aún no se ha comprendido en su totalidad la fisiología del dolor neuropático, si se han asociado diversos fenómenos que potencian su expresión, por ejemplo, alteraciones en la despolarización de las membranas debido a daños en su estructura, alteración en la liberación de neurotransmisores excitatorios, lo que da lugar a despolarizaciones mantenidas y aumento de excitabilidad (Mannion et al. 2000), reorganización central de las vías aferentes, provocando que estímulos no dolorosos se perciban como dolorosos (Woolf et al. 1992), así como la pérdida o alteración de los

mecanismos inhibitorios, como la inhibición de la expresión de GABA en las interneuronas y una sobreexpresión de los receptores AMPA, que amplifican el estímulo excitatorio en modelos de dolor neuropático (Gwak et al. 2006). En general, la unión de GABA a su receptor produce un flujo de iones cloruro al interior celular y de iones potasio al exterior, lo que da lugar a un estado de hiperpolarización e inhibición en la neurona postsináptica. La elevada proporción de neuronas gabaérgicas, tanto en el asta posterior de la médula como en el núcleo del trigémino, hace pensar en un papel de estas neuronas como mecanismos inhibitorios del dolor neuropático (Avendano et al. 2005). Raster y colaboradores sintetizaron una serie de compuestos tipo amida con la finalidad de demostrar su actividad sobre los receptores GABA_A. En su estudio detectaron que los compuestos 7a-e (Figura 36) demostraron agonizar de forma total y parcial a los receptores GABA_A, provocando la captación de los iones Cl⁻ al interior de la célula, provocando su hiperpolarización y con ello la sensación de analgesia (Raster et al. 2013).

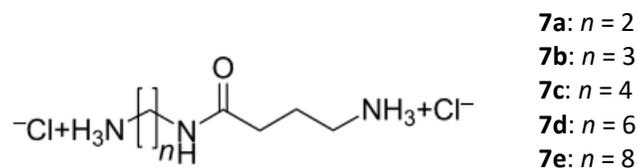


Figura 36. Amidas agonistas de los receptores GABA_A. Adaptado de Raster et al. 2013

Los resultados experimentales de nuestros estudios muestran una pérdida del efecto antinociceptivo de afinina y hexahidroafinina ante la presencia de bicuculina, antagonista de los receptores GABA_A. En los receptores GABA_B no se observó la pérdida de este efecto al utilizar un antagonista (Figura 37).

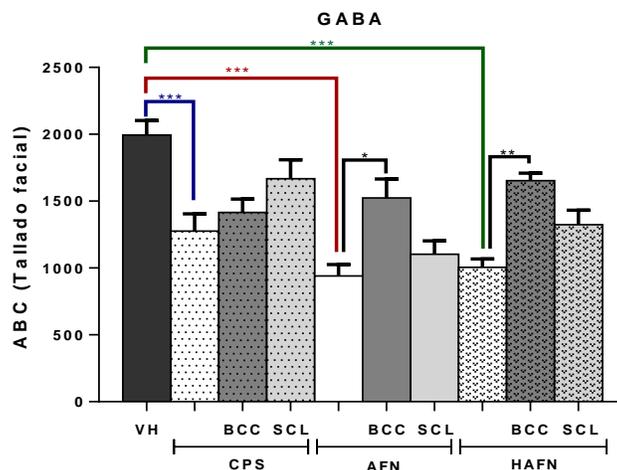


Figura 37. Exploración de la participación de los receptores GABA en el mecanismo de señalización de la actividad antinociceptiva de las alcanidas en el modelo de formalina orofacial. VH: vehículo, CPS: capsaicina (3 µg/sitio), AFN: afinina (30 µg/sitio) y HAFN: hexahidroafinina (30 µg/sitio). BCC: bicuculina (6 µg/sitio, antagonista de los receptores GABA_A), SCL: saclofen (6 µg/sitio, antagonista de los receptores GABA_B). Cada valor representa el promedio de 6 animales ± SEM *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.0001, ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Tukey

Estos resultados enriquecen los experimentos realizados por Rios-Gómez y colaboradores, quienes determinan que el efecto analgésico de afinina está asociado a la liberación del neurotransmisor GABA (Rios-Gómez et al. 2007).

Es importante considerar la complejidad de la fisiología de la nocicepción debido a la interrelación de las diferentes vías de señalización. Conceptualizar que las respuestas agonistas/antagonistas-receptor no son lineales y exclusivas; que dependen del modelo experimental a utilizar y el sitio de administración. Es decir, capsaicina es una molécula con actividad analgésica, sin embargo, existen modelos animales de dolor en donde utilizan esta molécula como detonadora de conductas nociceptivas (ej. alodinia e hiperalgesia). Por otro lado, como lo hemos mencionado, el efecto analgésico de capsaicina no se debe únicamente al agotamiento de la sustancia P, se sabe que en el área gris periacueductal del cerebro es capaz de producir analgesia vía activación del sistema endocannabinoide, esto es, implica la participación de los receptores CB1 (Liao et al. 2011). Las múltiples cascadas de señalización asociadas a la fisiología del dolor (ej. la vía opioidérgica, serotoninérgica, del óxido nítrico, los canales TRPV1, la vía de los cannabinoides, la vía gabaérgica), así como los segundos mensajeros derivados de la activación de estas vías, forman una compleja red que dificulta el completo entendimiento y tratamiento farmacológico del dolor.

8.2.8 Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos de afinina

Las muestras sanguíneas usadas en la elaboración de la curva de calibración, y las obtenidas en los experimentos tras la administración oral o intravenosa de afinina, fueron procesadas conforme a lo descrito en la metodología. Cada grupo se trabajó con una n = 6 y todos ellos fueron tratados bajo las mismas condiciones experimentales. El parámetro de referencia utilizado para la cuantificación y obtención de los parámetros farmacocinéticos fue la relación de altura del pico del analito con respecto a la altura del pico del estándar interno (afinina/SI). Con esta razón, una vez obtenida la curva de calibración, se convirtió

la relación afinina/SI a unidades de ng/mL. La curva de calibración de afinina se estableció en un rango de 1-56.23 ng/mL, utilizando saltos logarítmicos, cada punto se analizó por triplicado. Los resultados experimentales se muestran en la **Tabla 18, Figuras 38-40**. Los parámetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$ y $t_{m\acute{a}x}$ fueron obtenidos directamente de las gráficas. Los parámetros farmacocinéticos restantes fueron calculados como previamente de describió.

Tabla 18. Relación de las alturas de afinina/SI en muestras sanguíneas tras la administración oral de 2.5 mg/Kg de afinina

Nombre	Relación afinina/SI							
Tiempo (min)	R1A	R2A	R3A	R4A	R5A	R6A	\bar{x}	SD
0	0.14	0.06	0.08	0.06	0.04	0.02	0.08	0.04
8	0.55	0.14	0.37	0.34	0.32	0.15	0.34	0.15
15	0.32	0.15	0.30	0.26	0.23	0.10	0.25	0.07
30	0.16	0.29	0.22	0.04	0.23	0.28	0.19	0.10
60	0.16	0.12	0.12	0.03	0.10	0.04	0.11	0.05
120	0.11	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.03
180	0.04	0.05	0.04	0.05	0.03	0.02	0.04	0.01

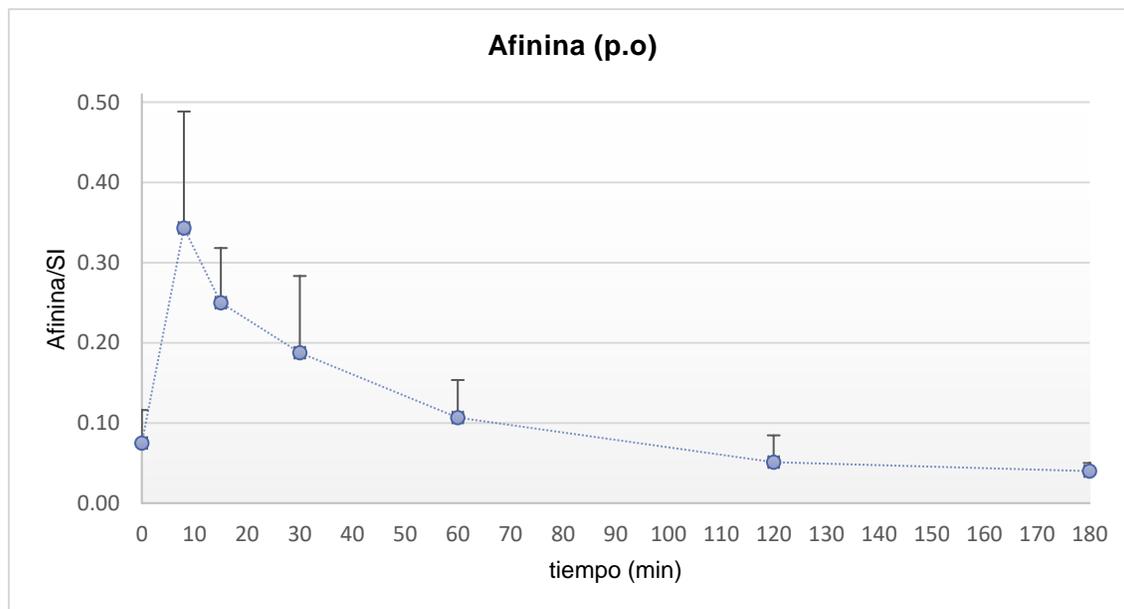


Figura 38. Curso temporal de la relación afinina/SI (2.5 mg/Kg, p.o). Cada punto representa el promedio de 6 animales \pm S.D

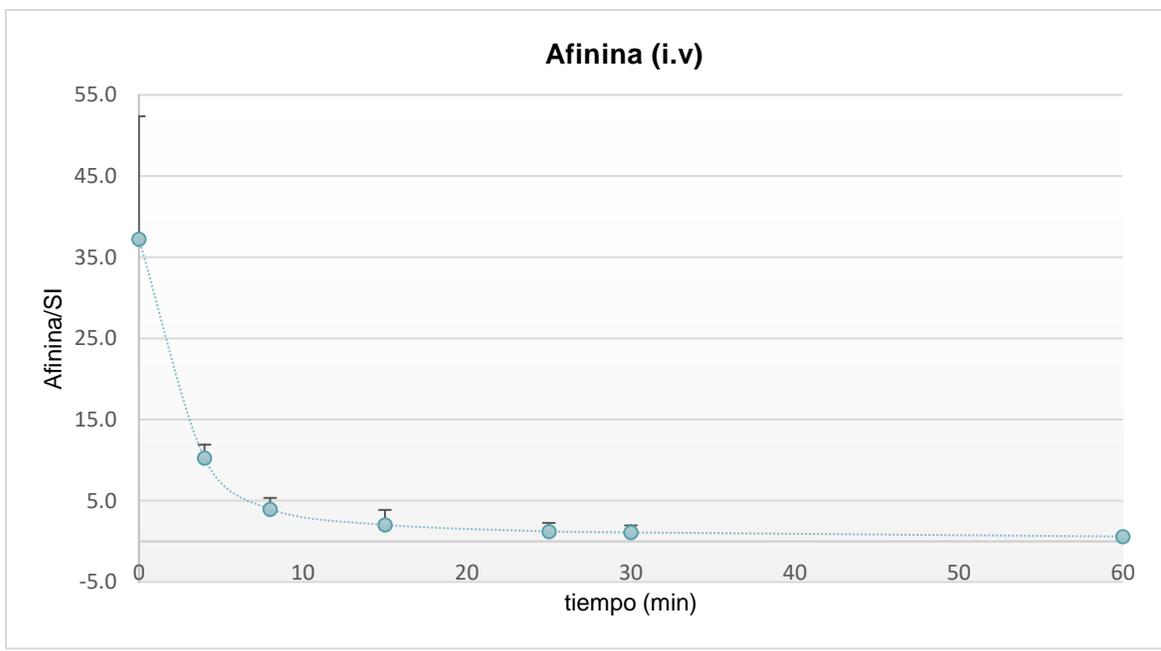


Figura 39. Curso temporal de la relación afinina/SI (2.5 mg/Kg, i.v). Cada punto representa el promedio de 6 animales \pm S.D

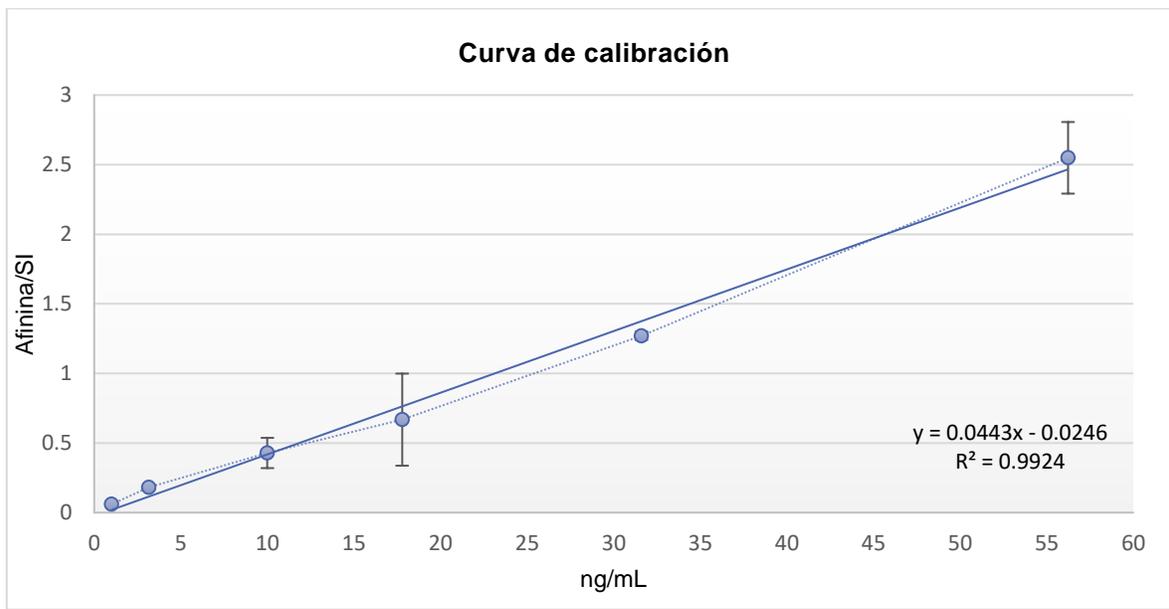


Figura 40. Curva de calibración y ecuación de la recta de afinina

Con la ecuación de la recta generada de la curva de calibración de afinina (**Ecuación 11**) se determinó la proporción en ng/mL para cada una de las relaciones afinina/SI tras la administración oral e intravenosa (**Tabla 19**).

$$y = 0.0443x - 0.0246$$

$$x = \frac{y + 0.0246}{0.0443}$$

... Ecuación 11

Tabla 19. Cuantificación de afinina en las muestras sanguíneas tras la administración oral de 2.5 mg/Kg vía oral e intravenosa

Tiempo		Oral		
min	h	Afinina/SI	ng/mL	Log concentración
0	0.00	0.08	2.25	0.35
8	0.13	0.34	8.30	0.92
15	0.25	0.25	6.20	0.79
30	0.50	0.19	4.78	0.68
60	1.00	0.11	2.96	0.47
120	2.00	0.05	1.71	0.23
180	3.00	0.04	1.45	0.16
Tiempo		Intravenosa		
min	h	Afinina/SI	ng/mL	Log concentración
0	0.00	37.24	841.10	2.92
4	0.07	10.26	232.09	2.37
8	0.13	3.97	90.26	1.96
15	0.25	2.04	46.59	1.67
25	0.42	1.23	28.31	1.45
30	0.50	1.11	25.53	1.41
60	1.00	0.60	14.04	1.15

Para calcular las constantes de eliminación (K_e) y otros parámetros farmacocinéticos, se obtuvieron las ecuaciones de la recta, tras graficar el t_{max} (h) para cada vía de administración contra el logaritmo de la concentración plasmática. El área bajo la curva para ambos casos fue calculada con todos los puntos experimentales, de acuerdo a las Figuras 41-42. El ABC de los últimos puntos fueron estimados usando las K_e . Los valores farmacocinéticos más importantes se resumen en la **Tabla 20**.

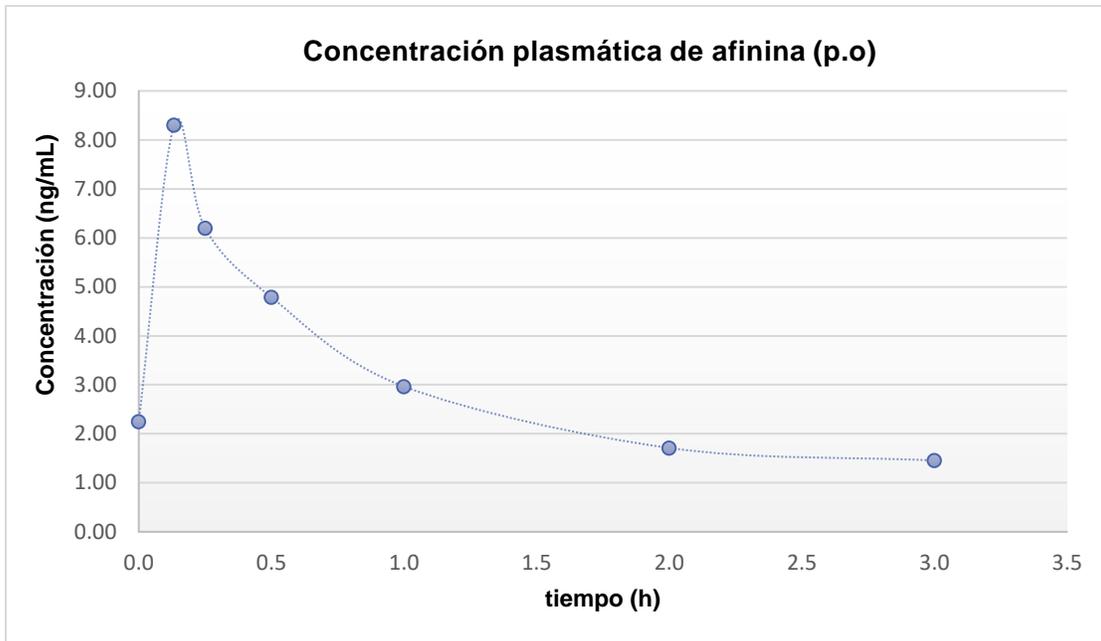


Figura 41. Concentración plasmática de afinina (2.5 mg/Kg, p.o)

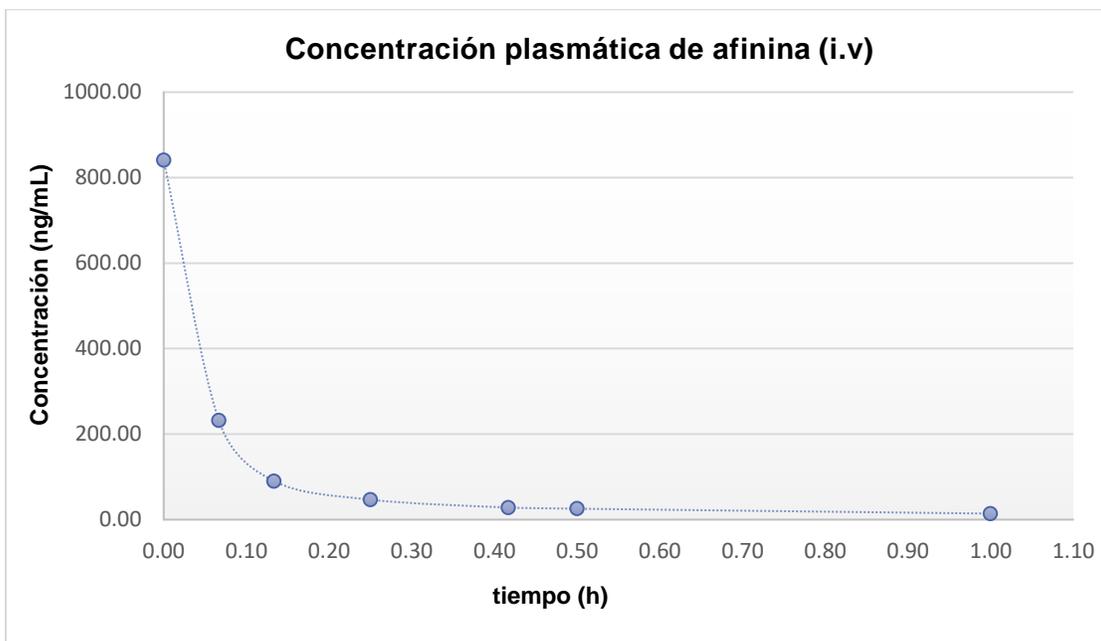


Figura 42. Concentración plasmática de afinina (2.5 mg/Kg, i.v)

Tabla 20. Principales parámetros farmacocinéticos de afinina

Afinina	Oral	Intravenosa
Dosis	2.5 mg/Kg	2.5 mg/Kg
Ecuación de la recta	$y = -0.2567x + 0.8379$	$y = -1.521x + 2.36$
Intercepto	0.8379	2.36
Pendiente	-0.2567	-1.521
$C_{máx}$	8.3 ng/mL	841.1 ng/mL
$t_{máx}$	0.1 h (8 min)	0 h (0 min)
K_e	0.59 h^{-1}	3.5 h^{-1}
C_0	6.88 ng/mL	229.09 ng/mL
$t_{1/2}$	1.17 h	0.20 h
ABC	11.25 ng h/mL	76.88 ng h/mL
Vd	375.99 L	9.28 L
Cl	222.28 L/h	32.51 L/h
Biodisponibilidad	0.14 ng/mL	

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Woelkart y colaboradores, quienes determinaron el perfil farmacocinético y de distribución de una alcanida con cadena de ácido graso de doce átomos de carbono con insaturaciones múltiples en su estructura (*N*-isobutil-2*E*,4*E*,8*E*,10*E/Z*-dodecatrienoamida), se puede observar que este tipo de metabolitos altamente lipofílicos tienen la capacidad de alcanzar su $t_{máx}$ en plasma en tiempos breves (8-20 min), así como de expresar la $C_{máx}$ en razón de los nanogramos (10^{-9}) cuando se parte de dosis iniciales en orden de los nanogramos (10^{-9}) (Tabla 21) (Woelkart et al. 2009). Otras investigaciones han estudiado la biodisponibilidad de algunas alcanidas partiendo de formulaciones farmacéuticas líquidas y en tabletas, evidenciando que, independientemente de la presentación, las alcanidas se absorben rápidamente en torrente sanguíneo, sin mostrar variación en los parámetros farmacocinéticos entre ambas presentaciones (Matthias et al. 2007). Sin embargo, su rápida absorción no sólo se ve manifiesta en su cuantificación en plasma, también se ha demostrado su alta capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a diferentes zonas cerebrales como el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo en tiempos relativamente breves (Woelkart et al. 2009).

Tabla 21. Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos de afinina con una alcanida similar

Metabolito	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	$t_{m\acute{a}x}$ (min)	ABC (ng h/mL)	$t_{1/2}$ (h)
Afinina	8.3	8	11.25	1.17
N-isobutil-2E,4E,8E,10E/Z-dodecatrienoamida	26.35	15	13.22	1.19

Otras de las vías de administración útiles para compuestos lipofílicos es la tópica. Boonen y colaboradores determinaron algunos parámetros farmacocinéticos asociados a la permeabilidad de afinina, empleando diferentes vehículos tras su aplicación dérmica y utilizando la celda de difusión de Franz. Sus datos demostraron que, afinina se impregnó rápidamente en la piel, teniendo un coeficiente de permeación (K_p) aumentado cuando la formulación contenía propilenglicol en su composición. Caso contrario se observó cuando la formulación tenía niveles altos de etanol; esto se debió a la capacidad del alcohol de deshidratar las membranas biológicas, reduciendo la permeabilidad a través del tejido (Boonen et al. 2010). En este mismo contexto, se investigó la capacidad de permeación de afinina en barreras celulares y barrera hematoencefálica (BHE), así como su capacidad de absorción intestinal. Los resultados sugirieron que afinina tuvo la capacidad de atravesar la monocapa de células Caco-2 *in vitro*, con un coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) en un rango de $5.2-10.2 \times 10^{-5}$ cm/h. Esta permeabilidad fue confirmada por la absorción intestinal *in vivo* tras una administración oral en rata, con una constante de eliminación (K_e) de 0.6 h^{-1} . Finalmente se observó una afluencia altamente significativa a través de BHE (Veryser et al. 2016).



9. CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

El estudio fármaco-toxicológico de afinina y hexahidroafinina demostró su importante actividad antinociceptiva por lo que pueden ser considerados como metabolitos útiles en la terapéutica del dolor. En especial, hexahidroafinina mostró ser un compuesto con muy baja toxicidad aguda y subcrónica, y con actividad a nivel de sistema nervioso central. Ambas moléculas involucraron la participación de los receptores TRPV1, GABA y cannabinoides en su mecanismo de señalización. Sin embargo, su alta lipofilicidad, rápida absorción y su corto tiempo de vida media limitan su uso y se requiere de tecnología farmacéutica que favorezca a la molécula en su control de liberación. En general, la presente investigación permitió sentar las bases fármaco-toxicológicas de afinina y hexahidroafinina, identificando las fortalezas y debilidades de estas entidades química.



10. PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

El desarrollo de nuevos medicamentos útiles en la terapéutica necesita investigaciones científicas multidisciplinarias. Por tal motivo, como perspectiva del presente trabajo es necesario:

- ❖ Establecer el perfil farmacocinético de hexahidroafinina tras su administración oral e intravenosa.
- ❖ Validar los resultados obtenidos de los estudios farmacocinéticos mediante programas especializados.
- ❖ Desarrollar formulaciones farmacéuticas que permita prolongar su efecto antinociceptivo en el organismo (quizá mediante un sistema de liberación prolongada).
- ❖ Realizar una amplia investigación de los parámetros fármaco-toxicológicos y de estabilidad de las formulaciones propuestas.



11. REFERENCIAS

11. REFERENCIAS

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." *Int. J. Phytother. Phytopharm.* 16: 336-341.

Agrawal, R. C., Bhide, S. V. **1987**. "Biological studies on carcinogenicity of chillies in Balb/c mice." *Indian J. Med. Res*, 86: 391-396.

Aguilera, L. **2008**. "Conceptos básicos de Farmacocinética-Farmacodinamia en TIVA." Grupo de Anestesia Total Intravenosa. Consultado en: <http://www.tivabcn.org/ponencias.html>.

Allen, S. L. **2010**. "Regulatory aspects of acute neurotoxicity assessment." In Hayes Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition) 587–602. Consultado en: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00020-3>.

Anand, P., Bley, K. **2011**. "Topical capsaicin for pain management: Therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch." *Br. J. Anaesth.* 107: 490–502.

Arriaga-Alba, M., Rios, M. Y., Déciga-Campos, M. **2013**. "Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract." *Pharm. Biol.* 51: 1035-1039.

Avendano, C., Machín, R., Bermejo, P., Lagares, A. **2005**. "Neuron numbers in the sensory trigeminal nuclei of the rat: A GABA- and Glycine-Immunocytochemical and stereological analysis." *J. Comp. Neurol.* 493: 538-553.

Baumann, T. K., Simone, D. A., Shain, C. N., LaMotte, R. H. **1991**. "Neurogenic hyperalgesia: The search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia." *J. Neurophysiol.* 66: 212–227.

Belmonte, C., Viana, F. **2008**. "Molecular and cellular limits to somatosensory specificity." *Mol. Pain* 4: 1-14.

Berridge, M. J., Bootman, M, D., Roderick, H. L. **2003**. "Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 517-529.

Biber, A. **2003**. "Pharmacokinetics of ginkgo biloba extracts." *Pharmacopsychiatry* 36: 32-37.

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

Boonen, J., Baert, B., Roche, N., Burvenich, C., De Spiegeleer, B. **2010**. "Transdermal behaviour of the N-Alkylamide spilanthol (Affinin) from *Spilanthus acmella* (Compositae) extracts." *J. Ethnopharmacol.* 127: 77-84.

Bosier, B., Muccioli, G. G., Hermans, E., Lambert, D. M. **2010**. "Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic Implications and Opportunities." *Biochem. Pharmacol.* 80: 1-12.

Buck, S. H., Burks, T. F. **1986**. "The neuropharmacology of capsaicin: Review of some recent observations." *Pharmacol. Rev.* 38: 179-226.

Cameron, M., Gagnier, J. J., Little, C. V., Parsons, T. J., Blümle, A., Chrubasik, S. **2009**. "Evidence of effectiveness of herbal medicinal products in the treatment of arthritis." *Phytother. Res.* 23: 1647-1662.

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

Caterina, M. J., Julius, D. **2001**. "The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway." *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 487-517.

Chanda, S., Bashir, M., Babbar, S., Koganti, A., Bley, K. **2008**. "In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin." *Drug Metab. Dispos.* 36: 670-675.

Chebib, M., Johnston, G. A. **1999**. The 'ABC' of GABA receptors: A brief review." *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 937-940.

Chebib, M., Johnston, G. A. **2000**. "GABA-activated ligand gated ion channels: Medicinal chemistry and molecular biology." *J. Med. Chem.* 43: 1427-1447.

Choi, Y.J., Kim, J. Y., Yoo, S. B., Lee, J. H., Jahng, J. W. **2013**. "Repeated oral administration of capsaicin increases anxiety-like behaviours with prolonged stress-response in rats." *J. Biosci.* 38: 561-571.

Chrubasik, S., Weiser, T., Beime, B. **2010**. "Effectiveness and safety of topical capsaicin cream in the treatment of chronic soft tissue pain." *Phytother. Res.* 24: 1877-1885.

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.

Clavelou, P., Pajot, J., Dallel, R., Raboisson, P. **1989**. "Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat." *Neurosci. Lett.* 103: 349-353.

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

Correa-Illanes, G. **2014**. "Dolor neuropático, clasificación y estrategias de manejo para médicos generales." *Revista Médica Clínica Las Condes* 25: 189-199.

Crawley, J. N. **1985**. "Exploratory behavior models of anxiety in mice." *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 37-44.

Cui, Y. Y., Xu, H., Wu, H. H., Qi, J., Shi, J., Li. Y. Q. **2014**. "Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats." *Plos One* 9: 1-10.

Custódio de Souza, G., Arlindo, C., Pereira, M., Muller-Duarte V., Ferreira, A. M., Dias, I., Da Silva, R. **2019**. "Acmella oleracea (L) R. K. Jansen reproductive toxicity in zebrafish: An in vivo and in silico assessment." *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1: 1-19

Dawbarn, D., Harmar, A. J., Pycoc. C. J. **1981**. "Intranigral injection of capsaicin enhances motor activity and depletes nigral 5-Hydroxytryptamine but not substance P." *Neuropharmacology* 20: 341-346.

De, A. K., Agarwal, K., Mukherjee, A., Sengupta, D. **1995**. "Inhibition by capsaicin against cyclophosphamide-induced clastogenicity and DNA damage in mice." *Mutat. Res./Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 335: 253-258.

Déciga-Campos, M., Arriaga-Alba, M., Ventura-Martínez, R. Aguilar-Guadarrama, B., Rios- Gómez, M. Y. **2012**. "Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin." *Drug Dev. Res.* 73: 130-137.

Déciga-Campos, M., Navarrete-Vázquez, G., López-Muñoz, F. J., Librowski, T., Sánchez-Recillas, A., Yañez-Pérez, V., Ortiz-Andrade, R. **2016**. "Pharmacological profile of N-(2,6-Dichlorophenyl)-2-(4-Methyl-1-Piperidiny) acetamide, a novel analogue of lidocaine." *Life Sci.* 155: 48-55.

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

Derry, S., Lloyd, R., Moore, R. A., McQuay, H. J. **2009**. "Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults." *Cochrane Database Syst. Rev.* 4: 1-39.

De la Rosa-Lugo, V., Acevedo-Quiroz, M., Déciga-Campos, M., Rios-Gómez, M.Y. **2017**. "Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors." *J. Pharm. Pharmacol.* 69: 884-895.

Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., Howlett, A. C. **1988**. "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." *Molecular Pharmacology* 34: 605-613.

Di Marzo, V., Breivogel, C., Bisogno, T., Melck, D., Patrick, G., Tao, Q., Szallasi, A., Razdan, R. K., Martin, B. R. **2000**. "Neurobehavioral activity in mice of n-vanillyl-arachidonylamide." *Eur. J. Pharmacol.* 406: 363-374.

Di Marzo, V., Lastres-Becker, I., Bisogno, T., De Petrocellis, L. Milone, A., Davis, J. B. Fernandez-Ruiz, J. J. **2001**. "Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues." *Eur. J. Pharmacol.* 420: 123-131.

Díaz-Barriga, A., Madrigal-Bujaidar, S. E., Calderón-Montellano, E., Ramírez-Herrera, L., Díaz-García B. D. **1995**. "Genotoxic effects produced by capsaicin in mouse during subchronic treatment." *Mutat. Res./Genetic Toxicology* 345: 105-109.

Eblen-Zajjur, A. 2005. "Neurofisiología de la nocicepción." *Gaceta Médica de Caracas*, 113: 466-473.

Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. **2001**. "The value of plants used in traditional medicine for drug discovery." *Environ. Health Perspect.* 109: 69-75.

Fine, P.G., Rosenfeld, M. J. **2013**. "The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain." *Rambam Maimonides Med. J.* 4: 1-15.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Fur, G. L., Casellas, P. **1995**. "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." *Eur. J. Biochem.* 232: 54-61.

Gannett, P. M., Nagel, D. L., Reilly, P. J., Lawson, T., Sharpe, J., Toth, B. **1988**. "Capsaicinoids: Their separation, synthesis, and mutagenicity." *J. Org. Chem.* 53: 1064-1071.

García, A., Ramírez, E., Molina, T. **2004**. "El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces." *Acta Botánica Mexicana* 69: 115-131.

Gerbino, A., Schena, G., Milano, S., Milella, L., Barbosa, F., Armentano, F., Procino, G., Svelto, M., 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* 11:1-22.

Gertsch, J. **2008**. "Immunomodulatory lipids in plants: Plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system." *Planta Med.* 74: 638-650.

Glinsukon, T., Stitmunnaithum, V., Toskulkao, C., Buranawuti, T., Tangkrisanavinont, V. **1980**. "Acute toxicity of capsaicin in several animal species." *Toxicon* 18: 215-220.

Gómez-Calvario, V., Garduño-Ramírez, M. L., León-Rivera, I., Rios-Gómez, M. Y. **2016** "¹H and ¹³C NMR data on natural and synthetic capsaicinoids." *Magn. Reson. Chem.*, 54: 268– 290.

Govindarajan, V. S., Sathyanarayana, M. N. **1991**. "Capsicum, production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; Structure, pungency, pain, and desensitization sequences." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 435-74.

Gwak, Y. S., Tan, H. Y., Nam, T. S., Paik, K. S., Hulsebosch, C. S., Leem, J. W. **2006**. "Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury." *J. Neurotrauma* 23: 1111-1124.

Hayes, W. **1975**. Toxicology of Pesticides. Williams and Wilkins Publishers. Baltimore, M.D.

Helme, R. D., McKernan, S. **1985**. "Neurogenic flare responses following topical application of capsaicin in humans." *Ann. Neurol.* 18: 505-509.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., Rice, K. C. **1991**. "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study." *J. Neurosci.* 11: 563-83.

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." *J. Asia-Pac. Entomol* 18: 227-231.

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

Huang, J., Zhang, X., McNaughton, P. A. **2006**. "Inflammatory pain: The cellular basis of heat hyperalgesia." *Curr. Neuropharmacol.* 4: 197-206.

Izzo, A. A., Sharkey, K. A. **2010**. "Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts." *Pharmacol. Therapeut* 126: 21-38.

Johnson, W. **2007**. "Final report on the safety assessment of *Capsicum annum* extract, *Capsicum annum* fruit extract, *Capsicum annum* resin, *Capsicum annum* fruit powder, *Capsicum frutescens* fruit, *Capsicum frutescens* fruit extract, *Capsicum frutescens* resin, and capsaicin." *Int. J. Toxicol.* 26: 3-106.

Jordt, S. E., Julius, D. **2002**. "Molecular basis for species-specific sensitivity to chili peppers." *Cell* 108: 421-430.

Kawada, T., Iwai, K. **1985**. "In vivo and in vitro metabolism of dihydrocapsaicin, a pungent principle of hot pepper, in rats." *Agric. Biol. Chem.* 49: 441-448.

Keitel, W., Frerick, H. Kuhn, U., Schmidt, U., Kuhlmann, M., Bredehorst, A. **2001**. "Capsicum pain plaster in chronic non-specific low back pain." *Arzneimittelforschung-Drug Res.* 51: 896-903.

Kort, M., E, Kym, P. R. **2012**. "TRPV1 Antagonists: Clinical setbacks and prospects for future development." *Prog. Med. Chem.* 51:57-70.

Latimer, K. S. **2003**. "Veterinary laboratory medicine: Clinical pathology." Wiley-Blackwell, 5ta Edition.

Ledebur, V., Schmid, W. **1973**. "The micronucleus test methodological aspects." *Mutat. Res./Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 19: 109-117.

Lee, S. S., Sohn, Y. W., Yoo, E. S., Kim, K. H. **1991**. "Neurotoxicity and long-lasting analgesia induced by capsaicinoids." *J. Toxicol. Sci.* 16: 3-20.

Liao, H. T., Lee, H. J., Ho, Y. C., Chiou, L. C. **2011**. "Capsaicin in the periaqueductal gray induces analgesia via metabotropic glutamate receptor-mediated endocannabinoid retrograde disinhibition." *British J. Pharmacol.* 163: 330-345.

Liu, L., Simon, S. A. **1994**. "A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91: 738-741.

López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, B., Rios-Gómez, M. Y. **2011**. "Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots." *Phytochem. Lett.* 4: 275-279.

Lorke, D. **1983**. "A new approach to practical acute toxicity testing." *Arch. Toxicol.* 54: 275-287.

Lynn, B. **1990**. "Capsaicin: Actions on nociceptive C-Fibres and therapeutic potential." *Pain* 41: 61-69.

Mannion, R., Woolf, C. **2000**. "Pain mechanisms and management: A central perspective." *Clin. J. Pain* 16: 144-156.

Marques, S., Oliveira, N. G., Chaveca, T., Rueff, J. **2002**. "Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes." *Genetic Toxicol. Environ. Mutagen.* 517: 39-46.

Mascarenhas-Cardozo, D., Santos-Gomes, K., Nunes-de-Souza, R. L. **2013**. "Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice." *Behav. Brain Res.* 250: 308-315.

Matthias, A., Addison, R. S., Agnew, L. L., Bone, K. M., Watson, k., Lehmann, R. P. **2007**. "Comparison of Echinacea alkylamide pharmacokinetics between liquid and tablet preparations." *Phytomedicine* 14: 587-590.

McAllister, S. D., Glass, M. **2002**. "CB1 and CB2 receptor-mediated signalling: A focus on endocannabinoids." *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66: 161-171.

Meng, I. D., Manning, B. H., Martin, W. J., Fields. H. L. **1998**. "An analgesia circuit activated by cannabinoids." *Nature* 395: 381-383.

Messeguer, A., Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A. **2006**. "Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor." *Curr. Neuropharmacol.* 4: 1-15.

Mezey, E., Tóth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P. M., Szallasi, A. **2000**. "Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 3655-6360.

Miller, M. S., Brendel, K., Burks, T. F., Sipes, I. G. **1983**. "Interaction of capsaicinoids with drug-metabolizing systems. relationship to toxicity." *Biochem. Pharmacol.* 32: 547-551.

Molina-Torres, J., García-Chávez. A. **2001**. "Alcanmidas en plantas: Distribución e importancia." *Avance y Perspectiva* 20: 377-387.

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

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

Monserenusorn, Y. **1983**. "Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats." *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 41: 95-110.

Morita, I. **2002**. "Distinct functions of COX-1 and COX-2." *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 69: 165-175.

Nagabhushan, M., Bhide, S. V. **1985**. "Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term tests." *Environ. Mutagen.* 7: 881-888.

OCDE 407. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents." Consultado en: https://www.OCDE-ilibrary.org/environment/OCDE-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788?page=3.

OCDE 408. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/20745788>.

OCDE 420. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/20745788>.

OCDE 423. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/20745788>.

OCDE 425. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/20745788>.

OCDE 452. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 452: Chronic Toxicity Studies." Consultado en: <https://doi.org/doi.org/10.1787/20745788>.

OCDE 471. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 471: Bacterial Reverse Mutation Test." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/20745788>.

OCDE 473. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 473: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/9789264071261-en>.

OCDE 474. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/9789264224292-en>.

OCDE 487. "OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals No 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test." Consultado en: <https://doi.org/10.1787/9789264091016-en>.

Oh, U., Hwang, S. W., Kim, D. **1996**. "Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons." *J. Neurosci.* 16: 1659-1667.

Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B. E., Liu, Q. R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasenfiz, L., Uhl, G. R. **2006**. "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." *Ann. New York Acad. Sci.* 1074: 514-536.

Paoletti, P., Neyton, J. **2007**. "NMDA receptor subunits: Function and pharmacology." *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 39-47.

Pershing, L. K., Reilly, C. A., Corlett, J. L., Crouch, D. J. **2004**. "Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200: 73-81.

Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J. **2010**. "International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2." *Pharmacol. Rev.* 62: 588-631.

Planells-Cases, R., García-Martínez, C., Royo, M., Pérez-Pay, E., Carreño, C., Albericio, F., Messeguer, A., Ferre-Montiel, A. **2003**. "Small molecules targeting the vanilloid receptor complex as drugs for inflammatory pain." *Drug Future* 28: 787-815.

Planells-Cases, R., García-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., Ferrer-Montiel, A. **2005**. "Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia." *Pflügers Archiv* 451: 151-159.

Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A. **2007**. "Drug design and development through the vanilloid receptor." *Expert Opin. Drug Dis.* 2: 1053-1063.

Preobrazhenskaya, M. N., Olsufyeva, E. N., Solovieva, S. E., Tevyashova, A. N., Reznikova, M. I., Luzikov, Y. N., Terekhova, L. P. **2009**. "Chemical modification and biological evaluation of new semisynthetic derivatives of 28,29-Didehydronystatin A1 (S44HP), a genetically engineered antifungal polyene macrolide antibiotic." *J. Med. Chem.* 52: 189-196.

Raduner, S., Chicca, A., Feyen, F., Khan, I., Altmann, K. H., Gertsch, J. **2007**. "Exploration of natural and synthetic N-alkylamides as source for new lead structures to target the endocannabinoid system." In ICRS Meeting. Saint Sauveur, Canada. Consultado en: <http://icrs.co/SYMPOSIUM.2007/2007.ICRS.Program.and.Abstracts.pdf>.

Ramsey, I. S., Delling, M., Clapham, D. E. **2006**. "An introduction to TRP channels." *Annu. Rev. Physiol.* 68: 619-647.

Raster, P., Späth, A., Bultakova, S., Gorostiza, P., König, B., Bregestovski, P. **2013**. "New GABA amides activating GABA_A-receptors." *Beilstein J. Org. Chem.* 9: 406-410.

Rios-Gómez, M. Y. **2012**. "Natural Alkamides: Pharmacology, chemistry and distribution." In Tech: Drug Discovery Research in Pharmacognosy, Edition 1: 107-144.

Rios-Gómez, M. Y., Aguilar-Guadarrama, B., Gutiérrez, M. del C. **2007**. "Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae)." *J. Ethnopharm.* 110: 364-367.

Saito, A., Yamamoto, M. **1996**. "Acute oral toxicity of capsaicin in mice and rats." *The J. Toxicol. Sci.* 21: 195-200.

Saito, M. **2015**. "Capsaicin and related food ingredients reducing body fat through the activation of TRP and brown fat thermogenesis." *Adv. Food Nutr. Res.* 76: 1-28.

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. **1989**. "Modified formalin test: characteristic biphasic pain response." *Pain* 3: 347-352.

SINAIS: "Sistema Nacional de Información En Salud. Consultado en: <http://sinais.salud.gob.mx>.

Suresh, D., Srinivasan, K. **2010**. "Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats." *Indian J. Med. Res.* 131: 682-691.

Surh, Y.J., Lee. S. S. **1995**. "Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential." *Life Sci.* 56: 1845-1855.

Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., Eid, S. R. **2007**. "The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept." *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 357-372.

Szulakowska, A., Milnerowicz, H. **2007**. "*Cannabis sativa* in the light of scientific research." *Adv. Clin. Exp. Med.* 16: 807-815.

Toth, B. E., Walker, B. **1984**. "Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers." *Anticancer Res.* 4: 117-119.

Velasco, G., Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Blázquez, C., Guzmán, M. **2004**. "Hypothesis: Cannabinoid therapy for the treatment of gliomas?" *Neuropharmacology* 47: 315-323.

Veryser, L., Taevernier, L., Joshi, J., Tatke, P., Wynendaele, E., Bracke, N., Stalmans, S. **2016**. "Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant n-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models." *BMC Complem. Altern. Med.* 16:177-189.

Villaseñor, I. M., de Ocampo, E. J. **1994**. "Clastogenicity of red pepper (*Capsicum frutescens* L.) Extracts." *Mutat. Res./Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 312: 151-155.

Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. **2004**. "Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 396-401.

Woelkart, K., Frye, R. F., Derendorf, H., Bauer, R., Butterweck, V. **2009**. "Pharmacokinetics and tissue distribution of dodeca-2E,4E,8E,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamides after oral administration in rats." *Planta Med.* 75: 1306-1313.

Woelkart, K., Xu, W., Pei, Y., Makriyannis, A., Picone, R. P., Bauer, R. **2005**. "The endocannabinoid system as a target for alkaloids from *Echinacea angustifolia* roots." *Planta Med.* 71: 701-705.

Wolf, C., Shortland, P., Coggeshall, R. **1992**. "Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents." *Nature* 355: 75-78.

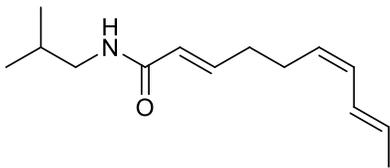
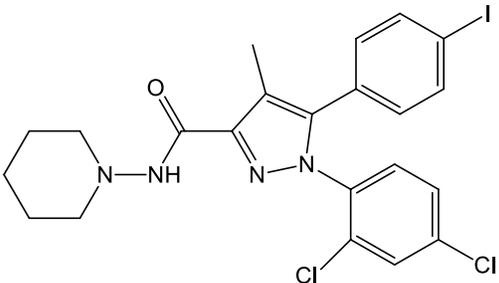
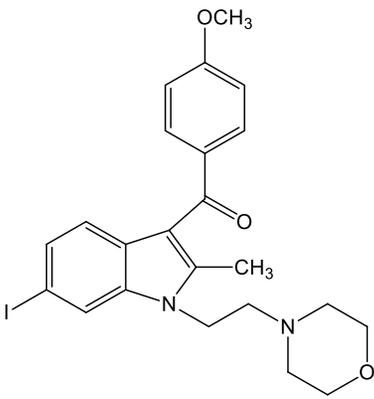
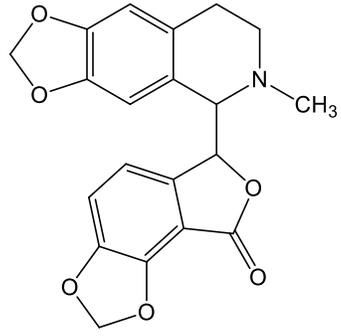
Wu, L. C., Fan, N. C., Lin, M. H., Chu, I. R., Huang, S. J., Hu, C. Y., Han, S. Y. **2008**. "Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators." *J. Agric. Food Chem.* 56: 2341-2349.

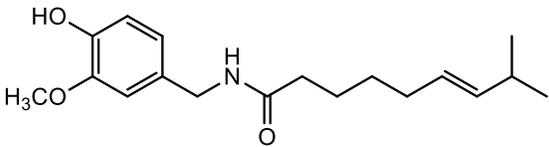
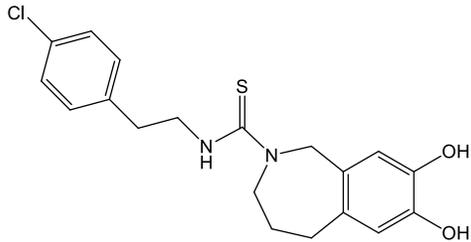
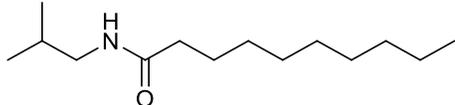
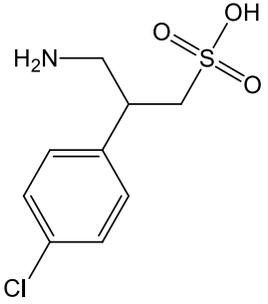
Zalacain, M., Sierrasesumaga, L., Patiño-García, A. **2005**. "The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents." *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra* 28: 227-236.

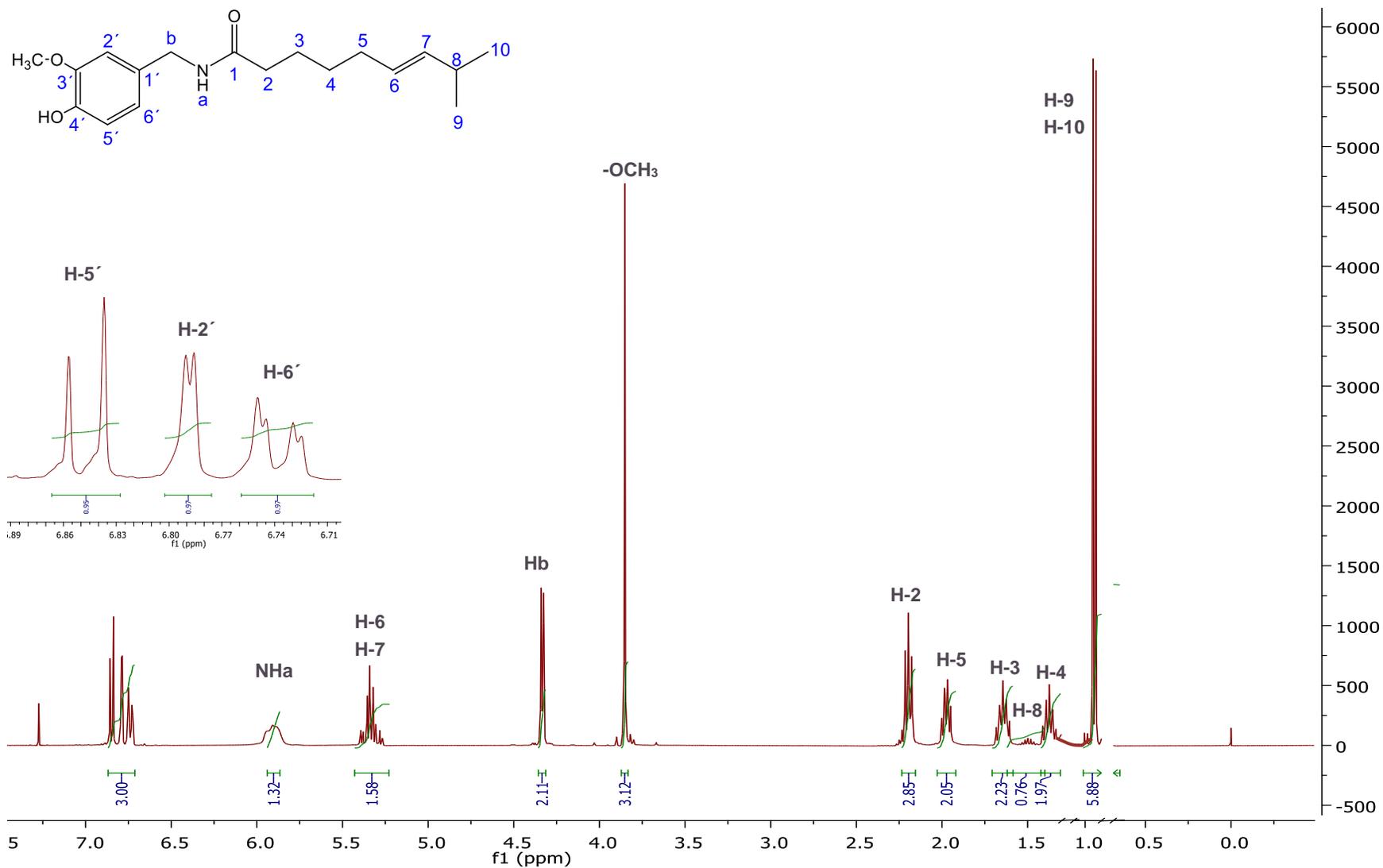


12. ANEXOS

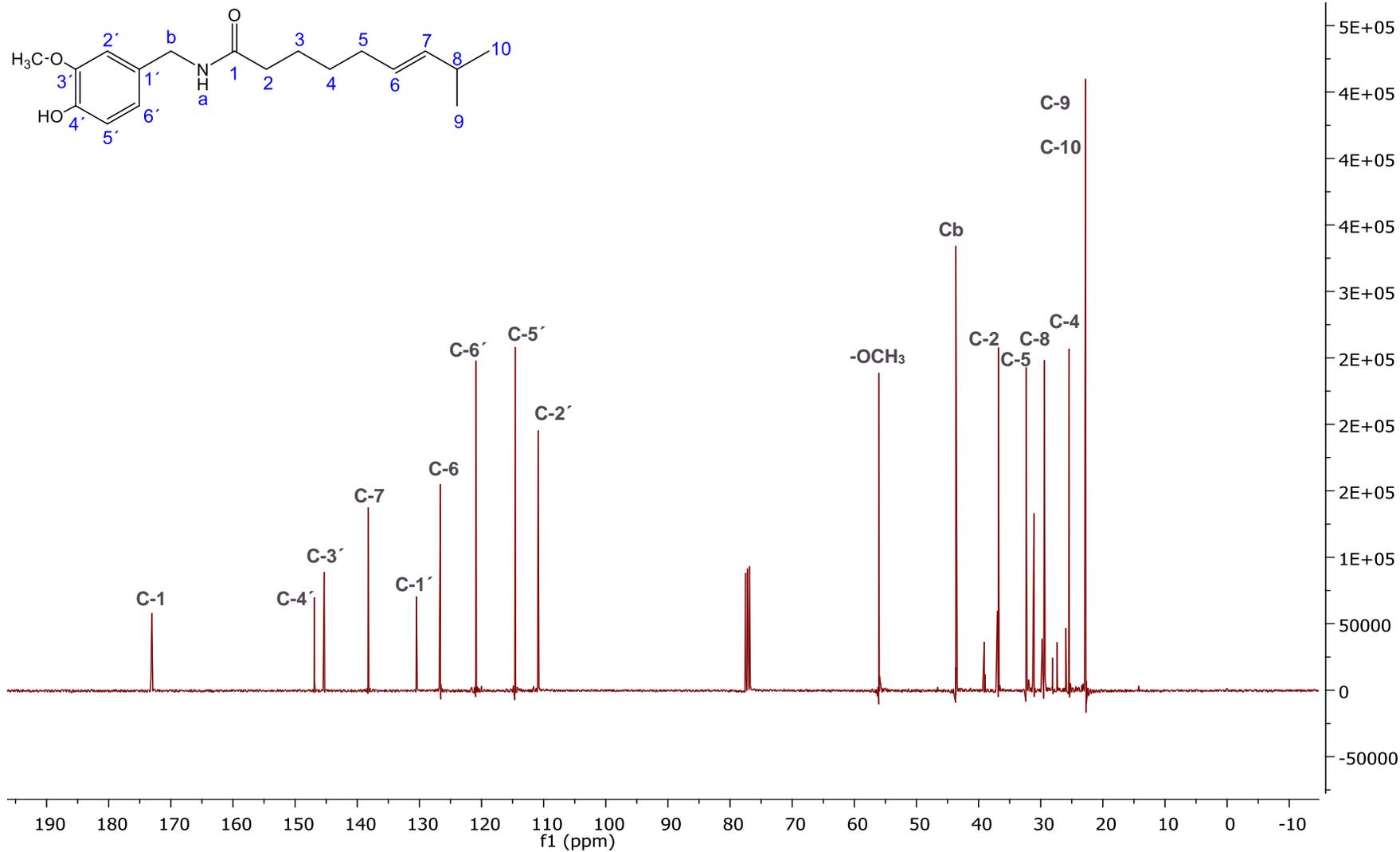
GLASARIO DE ESTRUCTURAS

Nombre	Fórmula mínima	Peso molecular	Estructura
Afinina	C ₁₄ H ₂₃ NO	221.34	
AM251	C ₂₂ H ₂₁ N ₄ OCl ₂ I	555.24	
AM630	C ₂₃ H ₂₅ IN ₂ O ₃	504.36	
Bicuculina	C ₂₀ H ₁₇ NO ₆	367.35	

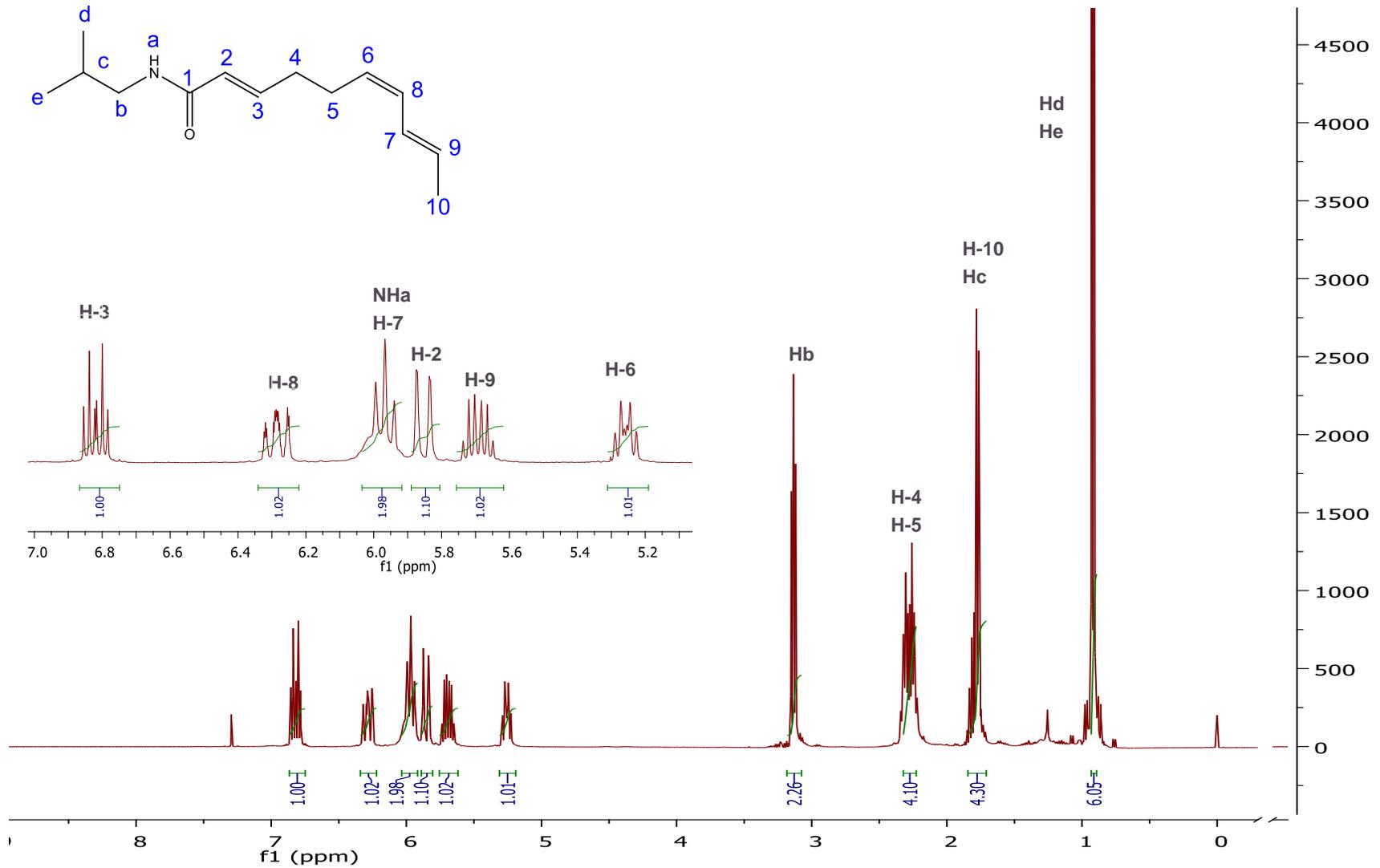
Capsaicina	$C_{18}H_{27}NO_3$	305.41	
Capsazepina	$C_{19}H_{21}ClN_2O_2S$	376.90	
Hexahidroafinina	$C_{14}H_{29}NO$	227.39	
Saclofen	$C_9H_{12}ClNO_3S$	249.71	



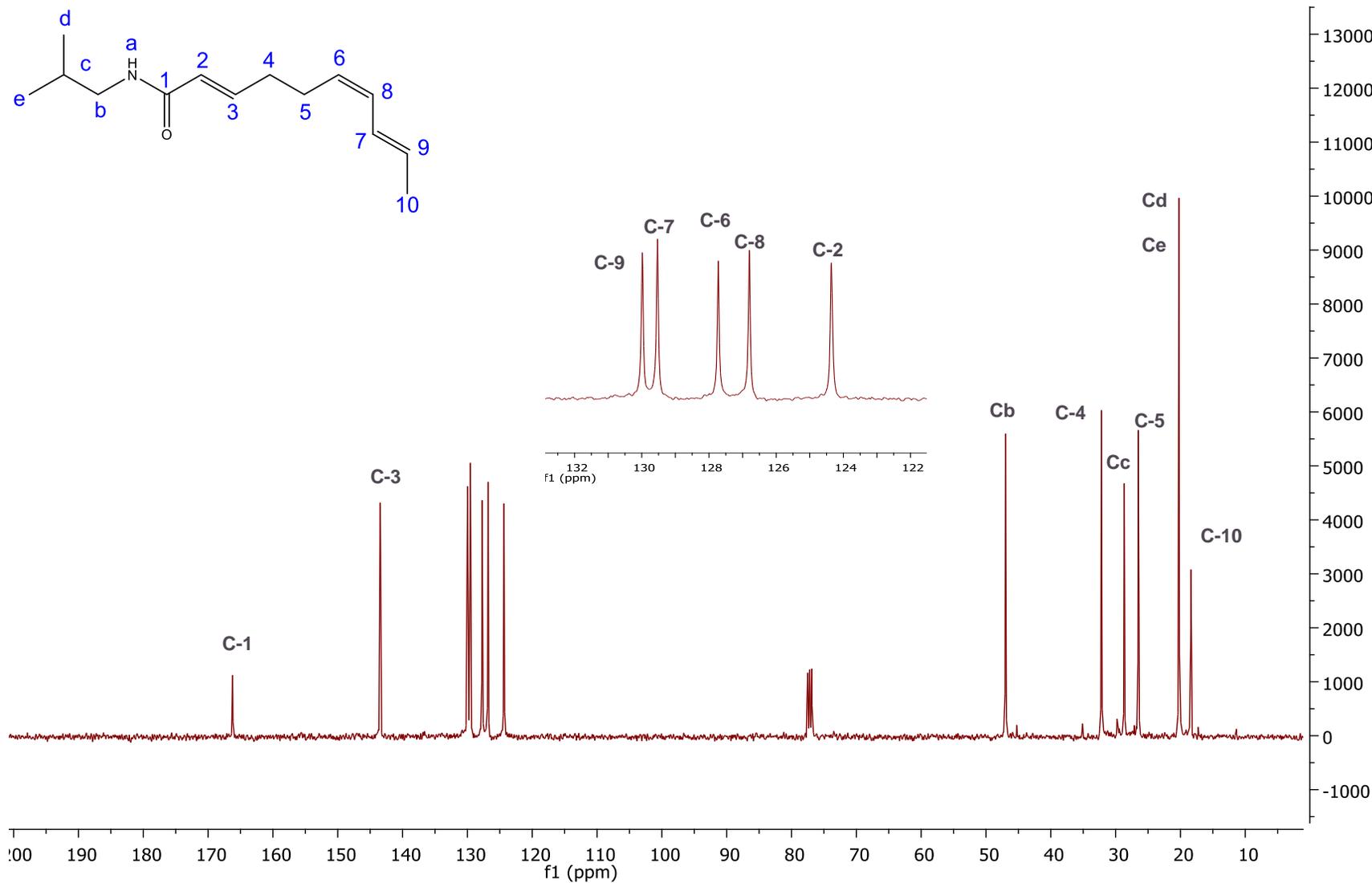
Espectro 1. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) Capsaicina



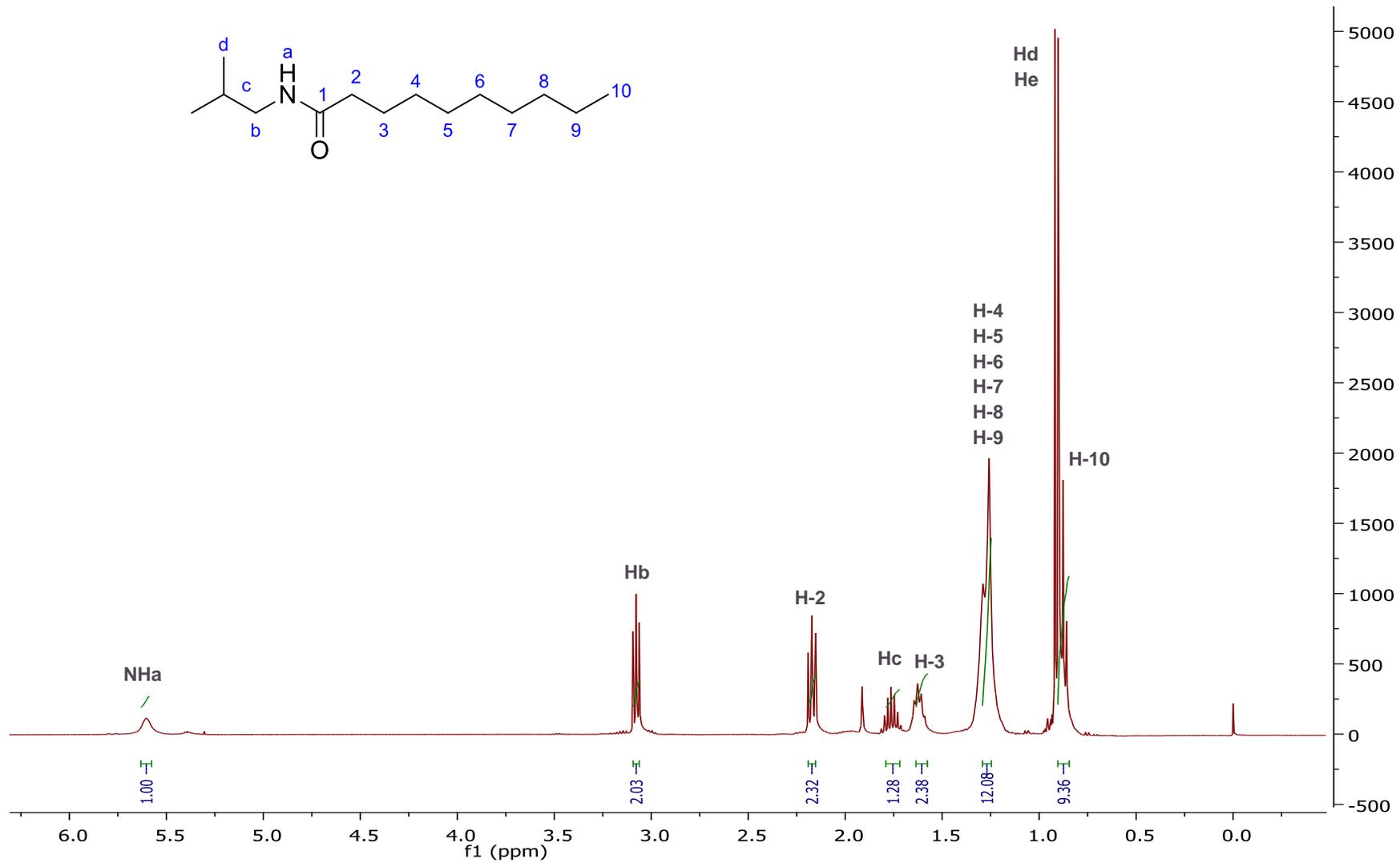
Espectro 2. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) Capsaicina



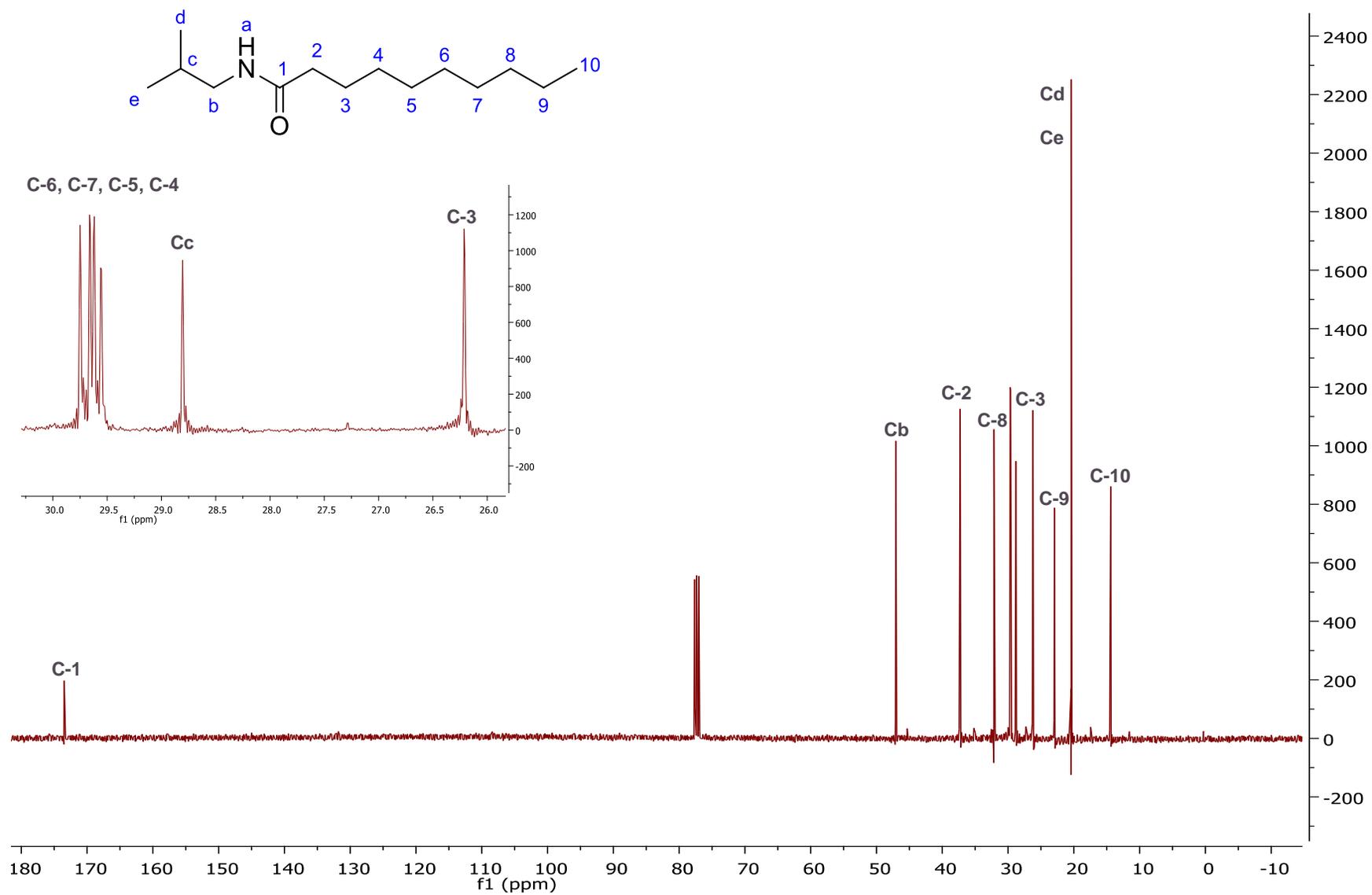
Espectro 3. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) Afina



Espectro 4. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) Afina



Espectro 5. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) Hexahydroafinina



Espectro 6. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) Hexahidroafinina

Antinociceptive effect of natural and synthetic alcanamides involves TRPV1 receptors

Vianey de la Rosa-Lugo^a, Macdiel Acevedo-Quiroz^a, Myrna Déciga-Campos^b  and María Yolanda Ríos^a

^aCentro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, and ^bSección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

Keywords

affinin; alcanamides; antinociception; capsaicin; *Heliopsis longipes*

Correspondence

Myrna Déciga-Campos, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Santo Tomás, 11340 Ciudad de México, México.

E-mails: myrnadeciga@hotmail.com; mdeciga@ipn.mx

and

María Yolanda Ríos, Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, México.

E-mail: myolanda@uaem.mx

Received November 10, 2016

Accepted March 4, 2017

doi: 10.1111/jphp.12721

Abstract

Objective To establish the role of TRPV1 receptor in the antinociceptive effect of natural alcanamides (i.e. affinin, longipinamide A, longipenamide A and longipenamide B) isolated from *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake and some related synthetic alcanamides (i.e. *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide).

Methods The orofacial formalin test was used to assess the antinociceptive activity of natural (1–30 µg, orofacial region) and synthetic alcanamides (0.1–100 µg, orofacial region). The alcanamide capsaicin was used as positive control, while capsaizepine was used to evaluate the possible participation of TRPV1 receptor in alcanamide-induced antinociception.

Key findings Natural (1–30 µg) and synthetic (0.1–100 µg) alcanamides administered to the orofacial region produced antinociception in mice. The antinociceptive effect induced by affinin, *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide was antagonized by capsazepine but not by vehicle.

Conclusions These results suggest that alcanamide affinin, longipinamide A, longipenamide A and longipenamide B isolated from *Heliopsis longipes* as well as the synthesized analogue compounds *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide produce their effects by activating TRPV1 receptor and they may have potential for the development of new analgesic drugs for the treatment of orofacial pain.

Introduction

Alcanamides (*N*-alkylamides, alkenamides or alkenylamides) are bioactive compounds with potential pharmacological activity for the treatment of pain. More than 300 alcanamides have been isolated as natural products. They represent a class of lipid compounds that are highly active in the central nervous system as they produce analgesic and immunomodulatory effects. These types of compounds are considered chemotaxonomic markers because special families of plants biosynthesize alcanamides with unique structural characteristics.^[1] Capsaicinoids are alcanamides that are exclusively isolated from the fruits of the *Capsicum* genus (e.g. hot pepper, chile, chili). Capsaicin (trans-8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide, Figure 1), the

most important capsaicinoid in nature, also participates in the nociceptive process. First, it activates the transient receptor potential cation channel vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) receptor in sensory nerves, thereby inducing a sensation of hotness and burning due to depletion of substance P and other neurotransmitters such as somatostatin, neuronin A and kassinin, which leads to nociception.^[2] A desensitization period then occurs in small sensory neurons due to the de-phosphorylation of TRPV1, which occurs in a Ca²⁺-dependent manner via calmodulin–calcineurin.^[3]

TRPV channels are a large family of nonselective cation channels that are involved in pain transmission. They function to detect external stimuli such as heat (<42 °C), protons, voltage and pressure.^[4] TRPV1 is expressed in

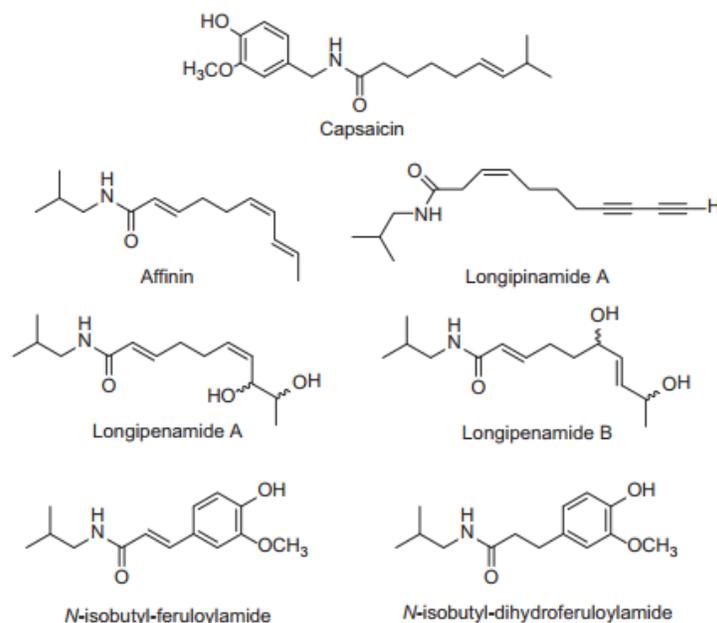


Figure 1 Chemical structures of natural capsaicin, affinin, longipinamide A, longipinamide A and longipinamide B alkamides and related synthetic, *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide alkamides.

the peripheral and central nervous system, especially in the trigeminal ganglion (TG) and dorsal root ganglion (DRG) neurons, hippocampus and dentate gyrus.^[5] Activation of TRPV1 results in an increase of permeability towards Na^+ and Ca^{2+} , thereby increasing neuronal excitability.^[6]

The roots of *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake are used in Mexico as a spice and for flavouring, just like the fruit of *Capsicum* species. These roots are also used as a buccal analgesic and anaesthetic in Mexican traditional medicine.^[7] Affinin (i.e. spilanthol, *N*-isobutyl-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamide, Figure 1) is responsible for these effects.^[7] The antimutagenic, pharmacological and toxicological profile of affinin has been determined by our working group.^[8,9] Its antinociceptive properties are related to the release of GABA^[7] as well as to the activation of the opioid, serotonergic and the nitric oxide pathways.^[9,10] The intense, nonpungent numbness and tingling sensation that is caused by affinin when orally consumed suggests that this compound and the related alkamides could be useful for the treatment of pain. Capsaicin and affinin are related compounds that have structural similarities (Figure 1), such as the amide region and the fatty acid chain. These similarities may account for their shared analgesic and anaesthetic capacities.

The orofacial (i.e. the oral mucous, gums and face) perception of painful stimuli is performed by the primary

afferent neurons of the TG system.^[11] Their cell bodies are located in the TG in the face.^[12] Orofacial pain is a condition that affects a large portion of the population, and it occurs as a result of health complications, such as neuralgia, headache and masticatory muscle disorders.^[13] It is easily recognized when its origin is dental, such as with cavities and periodontal diseases. However, it may be produced by several causes (i.e. nerve injury).

Due to the high incidence of orofacial pain and the low efficacy of pharmacological treatments, we sought to obtain natural^[14] and synthetic alkamides^[15] and to evaluate their antinociceptive activity in mice. The purpose of the present work was to evaluate the antinociceptive effect of isolated natural alkamides of *Heliopsis longipes* and some related synthetic alkamides in the orofacial formalin test in mice and to establish the TRPV1 receptor participation on this activity.

Materials and Methods

General

The progress of reactions and the purity of products were monitored using thin layer chromatography (TLC) and

visualized using UV light with subsequent application of $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ in 2N H_2SO_4 and heat. All analytical samples were homogenized before application on TLC, which was performed in at least two different solvent systems. Products were purified by flash column chromatography (FCC, silica gel, 100–230 mesh), and melting points were determined using a Fisher-Johns apparatus. Infrared (IR) spectra were recorded in a NICOLET 6700 laser with a source of He/Ne and a spectral range of 525–4000 cm^{-1} . ^1H , ^{13}C and 2D NMR experiments were performed by dissolving the samples in 0.5 ml of CDCl_3 or acetone, as is indicated, and then measuring using an Inova Varian and Mercury Spectrometer, at 400 MHz for ^1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR. Chemical shifts are in parts per million, and tetramethylsilane (TMS) was used as an internal standard. A JMS-700 high-resolution mass spectrometer was used to obtain mass spectrometry data by (+)-FABMS. Catalytic hydrogenation reactions were conducted in a Parr Instrument Hydro Ap auto 500 ml to measure temperature and solvents for each reaction, as indicated.

Chemicals: name (abbreviation, PubChem compound)

4-dimethylaminopyridine (DMAP, 14284), isobutylamine (6558), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC, 15908), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 81531), palladium/carbon (Pd/C, 23938), *trans*-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid, 445858), capsazepine (2733484), pentylenetetrazole (PTZ, 5917) and Tween 80 were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Formalin (712), which was purchased from J.T. Baker, and diazepam (Valium, 3016) were used in this study. Acetone, dichloromethane (CH_2Cl_2), hexane and methanol (MeOH) were distilled before use. All natural or synthetic alkamides and capsazepine were dissolved in 2% Tween 80 in 0.9% saline solution. Formalin was dissolved to 2% in 0.9% saline solution. In addition, all drugs were freshly prepared for each experiment and administered to the orofacial region (20 μl) or intraperitoneally (i.p., 0.1 ml/10 g). Control animals received the same volume of vehicle (2% Tween 80 in 0.9% saline solution).

Animals

Swiss Webster female mice (20–25 g) from Cinvestav, Sede Sur, Mexico City, were used in this study for behavioural experiments. All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigations of Experimental Pain in Animals,^[16] and their care was conducted in accordance with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). The protocol was approved by the institutional ethics committee (Protocol SIP-20170861).

All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Hence, mice were used once only. Animals were given free access to standard chow and tap water while being housed in a climate-controlled room with a 12-h light/dark cycle. At the end of the experiment, animals were sacrificed in a CO_2 chamber.

Capsaicin extract preparation

Dried pericarp of *Capsicum chinense* (commonly named 'chile habanero', 5 kg) were extracted at room temperature with dichloromethane (3.5 l \times 4). The extract was concentrated to dryness in a vacuum to produce 24.7 g of extract (oleoresin). Oleoresin fractionation was performed through an open FCC (silica gel, 100–230 mesh; 8 \times 24 cm) with a step gradient of *n*-hexane-acetone 100 : 0 to 70 : 30 (yielding 140 fractions of 50 ml each). Capsaicin was isolated as an 8 : 2 unresolvable mixture of capsaicin : dihydrocapsaicin from fractions 105–13t. In our hands, the IR, ^1H , ^{13}C NMR and (+)-FABMS data for capsaicin are as follows: IR (film) ν_{max} 3306, 2954, 1650, 1625 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6'), 5.90 (1H, s, NH), 5.34 (1H, dd, $J = 15.4, 5.6$ Hz, H-7), 5.33 (1H, dt, $J = 15.4, 5.8$, H-6), 4.33 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7'), 3.85 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.20 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 1.98 (2H, dt, $J = 7.8, 2.0$ Hz, H-5'), 1.64 (2H, q, $J = 7.7$ Hz, H-3'), 1.50 (1H, o, $J = 6.7$ Hz, H-8), 1.37 (2H, q, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H-4), 0.94 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-9,H-10); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 173.07 (s, C-1), 146.94 (s, C-4'), 145.28 (s, C-3'), 138.19 (d, C-7), 130.45 (s, C-1'), 126.57 (d, C-6), 120.84 (d, C-6'), 114.58 (d, C-5'), 110.9 (d, C-2'), 56.12 (c, $-\text{OCH}_3$), 43.72 (t, C-7'), 36.82 (t, C-2), 32.33 (t, C-5), 31.06 (d, C-8), 29.38 (t, C-4), 25.42 (t, C-3), 22.80 (c, C-9, C-10); (+)-FABMS m/z 305 ($\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$). For IR and NMR spectra, see Appendix S1. These data agreed with previous reports.^[14]

Natural alkamides isolated from *Heliopsis longipes*

Fresh roots from *Heliopsis longipes* (Compositae) were collected at 'Real de Xichu' in Guanajuato and were identified by M.Sc. Ramiro Rios-Gómez. A voucher specimen (number 5904) was deposited at the FEZA Herbarium at the Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza (UNAM) in Mexico City. Affinin (90% purity), longipinamide A (95% purity), longipenamide A (95% purity) and longipenamide B, (98% purity) were purified from the acetone extract of the fresh roots from *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake following the methodology previously reported.^[15] Approximately 30 mg of each natural alkamide was obtained. The ^1H and ^{13}C NMR profiles for each alkamide agreed with our previous reports.^[4,15]

Affinin, IR (film): ν_{\max} 3288, 2957, 1668, 1625 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 6.82 (1H, dt, $J = 15.4, 6.4$ Hz, H-3), 6.29 (1H, ddc, $J = 15.2, 10.2, 1.0$, H-8), 5.98 (1H, sa, NH), 5.97 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-7), 5.85 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-2), 5.69 (1H, dc, $J = 14.8, 6.7$ Hz, H-9), 5.26 (1H, dt, $J = 10.6, 7.4$ Hz, H-6), 3.14 (2H, dd, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.28 (4H, m, H-4, H-5), 1.78 (1H, n, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 1.77 (3H, dd, $J = 6.7, 1.2$ Hz, H-10), 0.92 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 166.15 (s, C-1), 143.43 (d, C-3), 129.94 (d, C-9), 129.49 (d, C-7), 127.77 (d, C-6), 126.77 (d, C-8), 124.34 (d, C-2), 47.02 (t, C-1'), 32.18 (t, C-4), 28.69 (d, C-2'), 26.46 (t, C-5), 20.29 (c, C-3', C-5'), 18.38 (c, C-10); (+)-FABMS m/z 221 ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}$) (See Appendix S1).

Longipinamide A, IR (CHCl_3): $\nu_{\max} = 3433, 3305, 2959, 2932, 2871, 2224, 1646, 1552, 1266, 971, 739$ cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 5.93 (1H, bs, NH), 5.60 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-3), 5.59 (1H, ddd, $J = 5.6, 2.0, 0.8$ Hz, H-4), 3.07 (2H, dd, $J = 6.8, 6.0$ Hz, H-1'), 2.96 (1H, dd, $J = 4.8, 2.0$ Hz, H-2a), 2.95 (1H, dd, $J = 4.8, 0.8$ Hz, H-2b), 2.28 (2H, td, $J = 6.8, 1.2$ Hz, H-7), 2.18 (2H, m, H-5), 2.01 (1H, t, $J = 1.2$ Hz, H-11), 1.77 (1H, h, 6.8 Hz, H-2'), 1.64 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, H-6), 0.90 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3', H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 171.1 (s, C-1), 134.3 (d, C-4), 124.3 (d, C-3), 77.9 (s, C-8), 68.5 (s, C-9), 65.3 (s, C-10), 65.0 (d, C-11), 47.0 (t, C-1'), 40.7 (t, C-2), 31.6 (t, C-5), 28.6 (d, C-2'), 27.5 (t, C-7), 20.2 (q, C-3', C-4'), 18.6 (t, C-6); EIMS m/z 231 ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}$).

Longipenamamide A, IR (CHCl_3): $\nu_{\max} = 3315, 2961, 2926, 2871, 1669, 1627, 1514, 1370, 1255, 979$ cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 6.79 (1H, ddd, $J = 15.6, 6.4, 6.4$ Hz, H-3), 6.04 (1H, bs, NH), 5.85 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 5.55 (1H, dd, $J = 11.2, 5.2$ Hz, H-6), 5.54 (1H, dd, $J = 11.2, 8.4$ Hz, H-7), 4.34 (1H, dd, $J = 8.4, 4.0$ Hz, H-8), 3.82 (1H, dq, $J = 6.4, 4.0$ Hz, H-9), 3.13 (2H, dd, $J = 6.4, 6.4$ Hz, H-1'), 2.25 (2H, m, H-4), 1.79 (1H, h, 6.8 Hz, H-2'), 1.30 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 0.92 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3', H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 166.5 (s, C-1), 143.8 (d, C-3), 132.2 (d, C-7), 129.4 (d, C-6), 124.4 (d, C-2), 71.3 (d, C-8), 70.5 (d, C-9), 47.2 (t, C-1'), 31.7 (t, C-4), 28.8 (d, C-2'), 26.9 (t, C-5), 20.4 (q, C-3', C-4'), 17.7 (q, C-10). EIMS m/z 255 ($\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3$).

Longipenamamide B, IR (CHCl_3): $\nu_{\max} = 3309, 2960, 2925, 2869, 1669, 1628, 1555, 1370, 1255, 979$ cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 6.94 (1H, bs, NH), 6.77 (1H, ddd, $J = 15.6, 6.8, 6.8$ Hz, H-3), 5.90 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 5.68 (1H, ddd, $J = 15.6, 12.4, 5.6$ Hz, H-8), 5.61 (1H, ddd, $J = 15.6, 12.4, 5.6$ Hz, H-8), 4.26 (1H, dq, $J = 12.4, 6.4$ Hz, H-9), 4.06 (1H, ddd, $J = 13.2, 6.8, 5.6$ Hz, H-6), 3.08 (2H, dd, $J = 6.4, 6.4$ Hz, H-1'), 2.22 (2H, m, H-4), 1.78 (1H, h, 6.8 Hz, H-2'), 1.64 (2H, m, H-5), 1.23 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 0.90 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3', H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 166.8 (s, C-1), 144.0 (d, C-3), 135.0 (d,

C-8), 131.8 (d, C-7), 124.1 (d, C-2), 71.1 (d, C-6), 67.7 (d, C-9), 47.1 (t, C-1'), 35.6 (t, C-5), 28.7 (d, C-2'), 28.1 (t, C-4), 23.3 (q, C-10), 20.4 (q, C-3', C-4'); (+)-FABMS m/z 255 ($\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3$).

HPLC analysis

The acetone extract of *H. longipes* was injected in a Dionex LC System Model Ultimate 3000, a WPS-3000SL Ultimate 3000 analytical Split loop autosampler, an LPG3400SD pump system, a DAD 3000 UV/VIS detector, a computerized data station equipped with Chromeleon 6.80 SR10 version software serial number 17056 (US patent 7747402) Munich, Germering. Separation was achieved on an Eclipse Plus C18 column (150 \times 2.1 mm I.D.; 3.5 mm particle size) operating at 30°C. The mobile phase consisted of acetonitrile (55%) and water (45%). It was applied in an isocratic form. The flow rate was adjusted to 0.6 mL/min, during 10 min, monitoring at 213 nm.

Synthetic alkamides

N-isobutyl-feruloylamide [(*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-isobutylacrylamide]: To a well-stirred solution of ferulic acid (1498 mg, 7.74 mmol) in CH_2Cl_2 (45.0 ml), DIPEA (2.0 ml, 11.61 mmol) was added dropwise, followed by EDAC (1480 mg, 7.74 mmol) and DMAP (1418 mg, 11.61 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 5 min. Then, isobutylamine (0.9 ml, 7.74 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for another 12 h. Brine solution (120.0 ml) was added to the reaction mixture, and the organic phase was separated. Next, the aqueous phase was extracted using CH_2Cl_2 (90 ml \times 3). The organic solvent was concentrated in vacuum. The residue was purified by FCC (silica gel, 100–230 mesh; 24 \times 3 cm id), using *n*-hexane-acetone 90 : 10, to collect 32 fractions of 20 ml each, to produce 1.68 g of C7 (82.5% yield, 94% purity).

Compound *N*-isobutyl-feruloylamide was obtained as a waxy yellow powder from fractions 13–18: Rf 0.47 (*n*-hexane-acetone 1 : 1); IR (film) ν_{\max} 3275, 3100, 2958, 1652, 1625 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 7.52 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-3), 7.02 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6"), 6.96 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2"), 6.88 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5"), 6.32 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-2), 6.03 (1H, s, NH), 3.85 (3H, s, -OCH₃), 3.21 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.84 (1H, n, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 0.94 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3', H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 166.48 (s, C-1), 147.45 (s, C-4"), 146.83 (s, C-3"), 140.88 (s, C-1"), 127.30 (d, C-6"), 121.91 (d, C-5"), 118.35 (d, C-2"), 114.83 (d, -OCH₃), 109.81 (t, C-1'), 55.84 (d, C-2), 47.10 (d, C-3'), 28.61 (d, C-3), 20.13 (q, C-4' and C-5'); (+)-FABMS m/z : 249 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$) (See Appendix S1).

N-isobutyl-dihydroferuloylamide [(*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-isobutylpropanamide]: To a solution of *N*-isobutyl-feruloylamide (535 mg, 2.15 mmol) in CH₂Cl₂ (10.0 ml), 5 mg of 5% Pd/C was added. A flux of hydrogen was bubbled through the solution at 50 °C and 55 KPa for 8 h. The mixture reaction was filtered through celite, thereby adding CH₂Cl₂ (15.0 ml × 2). The organic solvent was concentrated in vacuum. The residue was purified by FCC (silica gel, 100–230 mesh; 24 × 3 cm id), using *n*-hexane-acetone 70 : 30, to collect 21 fractions of 20 ml each, to produce 480 mg of C8 (89.0% yield, 99% purity). Compound *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide was obtained as a white powder from fractions 15–21: Rf 0.53 (*n*-hexane-acetone 1 : 1); m.p. 101–103 °C; IR (film) ν_{\max} 3515, 3300, 2957, 1639 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) 7.40 (1H, s, NH), 6.81 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2''), 6.71 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5''), 6.64 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6''), 3.80 (3H, s, -OCH₃), 2.98 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-1'), 2.81 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-3), 2.41 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-2), 1.70 (1H, n, *J* = 6.7 Hz, H-2'), 0.83 (6H, d, *J* = 6.7 Hz, H-3',H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) 171.52 (s, C-1), 147.22 (s, C-4''), 144.78 (s, C-3''), 132.91 (s, C-1''), 120.56 (d, C-6''), 114.72 (d, C-5''), 111.90 (d, C-2''), 55.19 (d, -OCH₃), 46.40 (t, C-1'), 38.13 (t, C-2), 31.25 (d, C-2'), 28.42 (t, C-3), 19.53 (q, C-3',C-4'); (+)-FABMS *m/z*: 251 (C₁₄H₂₁NO₃) (See Appendix S1).

Pharmacological assay

Antinociceptive evaluation

The orofacial formalin test procedure was performed as described by Raboison,^[12] with slight modifications. Mice were placed in an open plexiglass observation chamber for 30 min to become familiarized with the testing equipment. Then, 20 µl of 2% formalin solution was subcutaneously injected into the upper lip lateral to the nose surface (orofacial region) using a 30-gauge needle. The animals were then returned to the chamber for observation, and nociceptive behaviour was observed immediately after injection. A mirror was placed behind the chamber to enable unhindered observation. Nociceptive behaviour was quantified as the time that mice spent rubbing the orofacial region during a 30-min period with 1-min measurements every 3 min after the irritant injection. Rubbing was readily identified and was characterized as face-rubbing episodes with vigorous face-wash strokes directed to the orofacial area. The time (in seconds) that animals spent rubbing the injected orofacial area is defined as the nociceptive response. Formalin-induced rubbing behaviour is biphasic: an initial, acute phase (0–5 min), followed by a relatively short quiescent period, before the terminal prolonged tonic response phase (9–30 min).

Participation of TRPV1 on alkamide-induced antinociception

Mice received increasing doses of natural (1–30 µg) and synthetic (0.1–100 µg) alkamides or vehicle (20 µl) 20 min before formalin injection into the orofacial region. Then, rubbing behaviour was assessed for 30 min. The concentration at which each alkamide showed its maximal effect in the orofacial region was selected to assess the mechanism of action. Capsaicin was tested at 3 µg, affinin at 30 µg and *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide at 10 µg. Two hours before the administration of the different alkamides (–2 h), animals were treated with capsazepine (a TRPV1 receptor antagonist). For the capsaicin group, 10 µg of capsazepine was administered, and for affinin and *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide, 100 µg of capsazepine was administered. The time and concentration schedule for capsazepine injection was determined in a pilot experiment in our laboratory (data not shown). Two hours following capsazepine injection, capsaicin, affinin and *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide or the vehicle were administered. After 15 min, each animal received an orofacial injection of 20 µl of 2% formalin to induce nociceptive behaviour, as previously performed in the experiment.

Molecular docking study

To investigate the binding interaction between alkamides and pain receptor TRPV1, we performed a molecular docking study with SPARTAN 08 program (Wavefunction, Inc., Irvin, California USA) to determine the minimum energy conformers through semiempirical calculations using the parametric method number 3 (PM3). TRPV1 channel model was taken from PDB entry 5IRX. Only the transmembrane domains (residues: 394–719) were used in the computational model as binding of capsaicin occurs in a pocket located between the voltage-sensor-like domain and the pore, above the S4-S5 linker.

The molecular docking calculation was focused on the binding pocket where the capsaicin molecule was previously bonded^[17] using AutoDock4.0 software (The Scripps Research Institute, Molecular Graphics Laboratory, La Jolla, California USA). To obtain initial models of the structure of alkamides in the binding pocket, a grid maps representing the protein during the docking process were calculated with AutoGrid 4.0, with grid dimensions of 20 × 20 × 40 grid points, a spacing of 0.375 Å, and the centre of the box placed at the reported essential residues for capsaicin (T550 and E570). A Lamarckian genetic algorithm search and an empirical free energy function were used. Docking parameters included an initial population of 200 randomly placed individuals, a maximum number of 3

million energy evaluations, a maximum of 27 000 generations, mutation and crossover rates of 0.02 and 0.80, respectively, and an elitism value of 1. Thirteen independent runs were carried out, and the docking solutions were clustered by root-mean-square deviation, using a threshold of 2 Å. The resulting clusters were ranked according to the values of the free energy of binding. The best docked conformations were those found to have the lowest binding energy and the largest number of members in the cluster, indicating good convergence.

Seizures as adverse effect of alkamides

High doses of affinin (90 mg/kg, i.p.), capsaicin (90 mg/kg, i.p.), *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide (90 and 180 mg/kg, i.p.) were intraperitoneally administered in mice, and latency of mortality by seizures was quantified. Evaluation of pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures was used as a positive control to demonstrate the seizure activity in the mice used in this study. Diazepam (90 mg/kg, -10 min, i.p.) was used to reduce seizures induced by PTZ. If no convulsions or mortality occurred during the 30 min time period, animals were considered to be protected from seizures in the diazepam group. In the case of alkamides, we used the same time period. Natural alkamides were not evaluated, as the quantity isolated was low. The alkamides were administered without PTZ.

Data and statistical analysis

All experimental results are given as the mean \pm SEM of the data obtained in six animals per group. Curves were constructed by plotting the time that mice spent rubbing the orofacial area (rubbing time). The area under the rubbing time against time curve (AUC), an expression of the duration and intensity of the effect, was calculated by the trapezoidal rule. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test was used to compare differences between treatments. Differences were considered to reach statistical significance when $P < 0.05$.

Results and Discussion

Formalin injection produced immediate withdrawal of their head, which was often accompanied with vocalization. When returned to the test box and after a short delay of 15–30 s, the animals displayed sustained face-rubbing episodes with vigorous face-wash strokes that were directed to the orofacial area (i.e. whisker pad, upper lip and nostril) with their forepaw and hindpaw (Figure 2). The first phase commenced immediately following formalin injection and declined gradually over approximately 5 min. The second

phase initiated 8 min after formalin injection, became maximal at approximately 18 min, and gradually declined over approximately 30 min (Figure 2a). Capsaicin (3 μ g) injection, a positive control for alkamide compounds, significantly reduced formalin-induced nociception (Figure 2a). In addition, capsaicin (0.1–3 μ g) produced a concentration-dependent antinociceptive effect during the second phase of the formalin test (Figure 2b). At the tested doses, capsaicin (0.1–3 μ g) did not show nocifensive responses before formalin injection.

Local peripheral injection of affinin (1–30 μ g), longipinamide A, longipinamide A and longipinamide B (1–30 μ g) produced a concentration-dependent antinociceptive effect (Figure 3). The maximum antinociceptive effect for natural alkamides at the 30 μ g concentration was

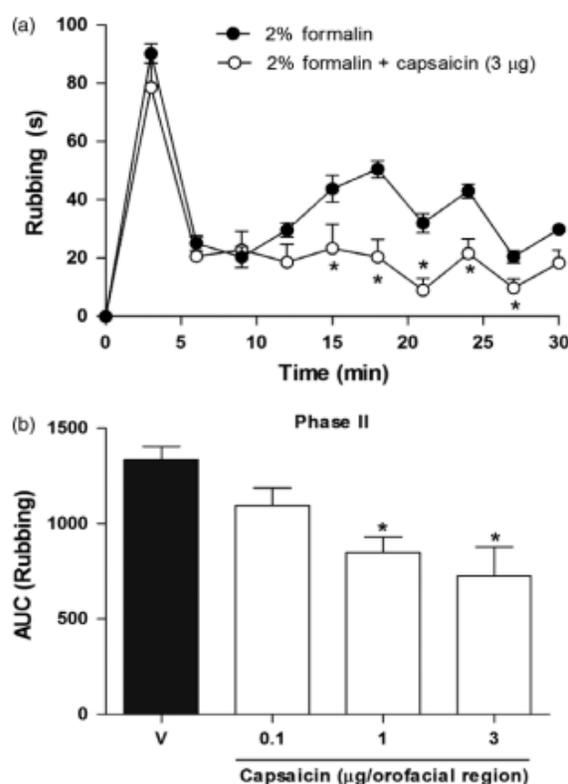


Figure 2 Time course of the rubbing behaviour observed after local orofacial administration of vehicle and capsaicin (3 μ g/20 μ l) in mice submitted to the 2% formalin test (a). The antinociceptive effect of local orofacial administration of capsaicin (0.1–3 μ g/20 μ l) during the second phase of the formalin test (b). Each bar indicates the area under the rubbing time against time curve (AUC) in mice submitted to the formalin test. Each value represents the mean of at least six animals \pm SEM. *Significantly different with respect to the vehicle ($P < 0.05$), determined by the Student's *t*-test (a) and one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test (b).

similar: affinin (65.8%), longipinamide A (56.3%), longipenamide A (60.5%) and longipenamide B (52.8%).

Local peripheral injection of synthetic compounds *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide (0.1–100 µg) in the orofacial region significantly ($P < 0.05$) reduced in a concentration-dependent fashion the time spent in rubbing during the first and second phase of the formalin test (Figure 4).

Local peripheral administration of capsaepine (10 µg) in the capsaicin-treated group or capsaepine (100 µg) in the affinin-, *N*-isobutyl-feruloylamide- and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide-treated groups prevented alkamide-induced antinociception during both phases of the formalin test (Figure 5).

Structurally, the TRPV1 channel is a homotetramer, symmetrically organized around a solvent exposed central pore, each subunit is formed by six transmembrane helices (S1-

S6).^[18] The hybrid approach that combines computational docking and functional studies has been employed to identify the capsaicin-binding pocket.^[19] However, although the study revealed a 'tail-up, head-down' configuration according to previously reported,^[20] and explained that the lack of clear electron density showed in cryo-electron microscopy (cryo-EM) technic was due to a very flexible tail that adopted more than one fixed conformations. Nevertheless, the atomic interaction was related on one side to the van der Waal's interactions and two hydrogen bonds between its Neck and Head with THR550 and GLU 570, respectively, and in another study argues that the two hydrogen bonds interactions were mediated by water molecules.^[17] Although the specific interactions were not detailed, this supports the position of capsaicin in a 'tail-up, head-down' configuration and the assistance of THR550 and GLU570 residues as confidence position in TRPV1 activation.

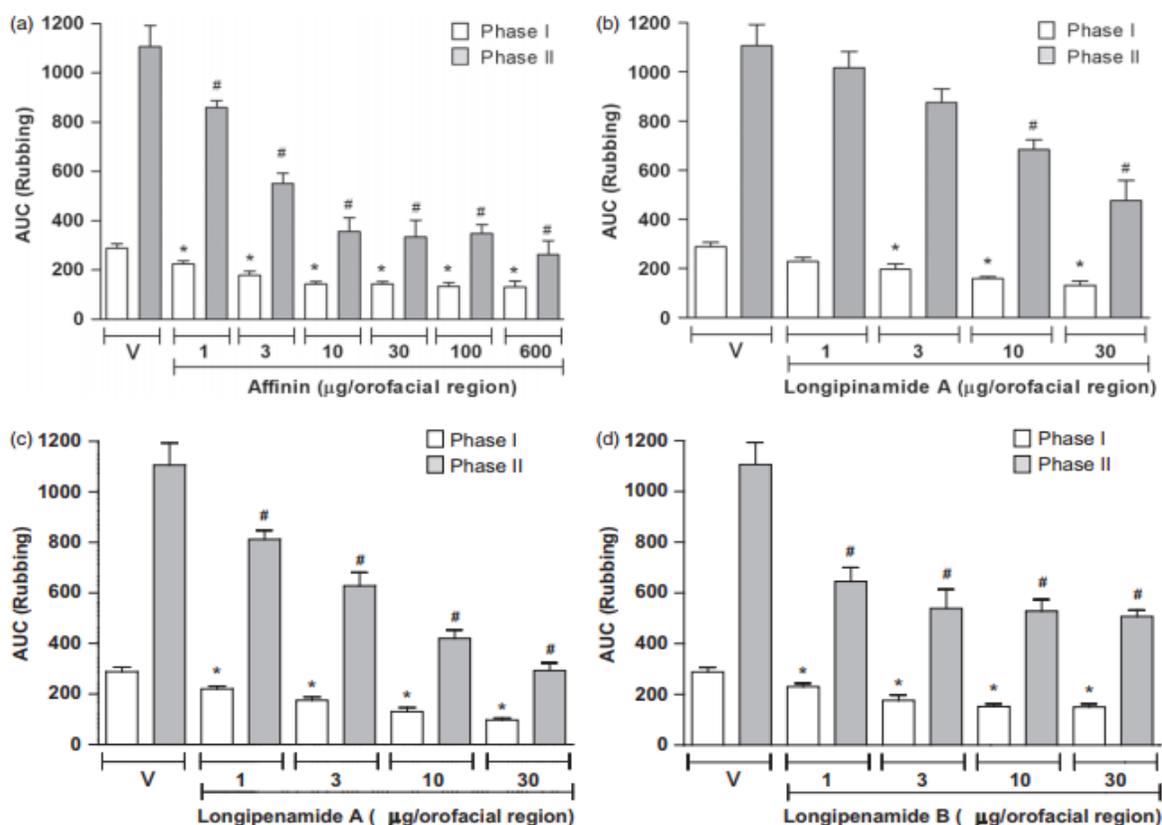


Figure 3 Antinociceptive effect of orofacial administration of natural alkamides isolated from *Heliopsis longipes*: affinin, longipinamide A, longipenamide A and longipenamide B during the first and second phase of the 2% formalin test in mice. Data are expressed as the area under the rubbing time against time curve (AUC). Bars represent the means \pm SEM for at least six animals. *Significantly different ($P < 0.05$) from the vehicle group (V) in phase I, and #significantly different ($P < 0.05$) from the vehicle group in phase II, as determined by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test.

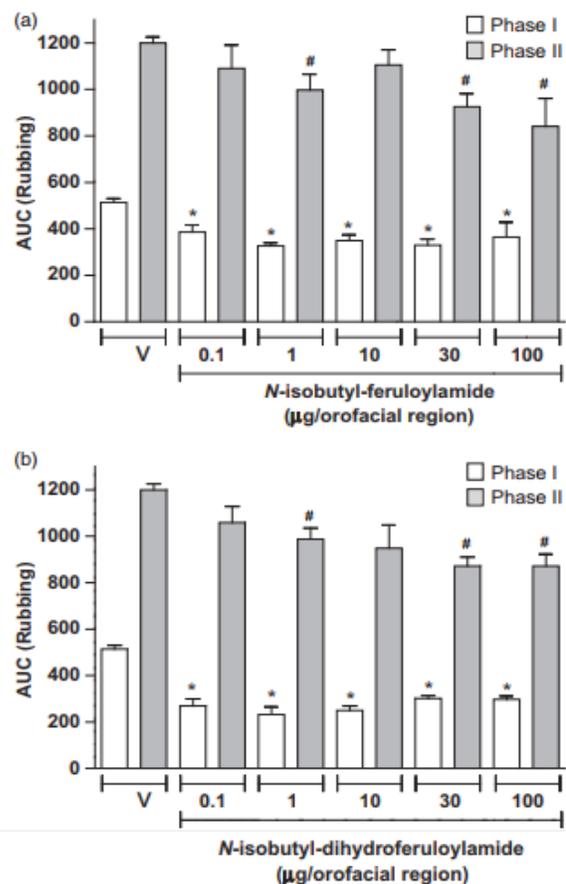


Figure 4 Antinociceptive effect of orofacial administration of synthetic alkamides: *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide during the first and second phase of the 2% formalin test in mice. Data are expressed as the area under the rubbing latency against time curve (AUC). Bars represent the means \pm SEM for at least six animals. *Significantly different ($P < 0.05$) from the vehicle group (V) in phase I, and #significantly different ($P < 0.05$) from the vehicle group in phase II, as determined by one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test.

Based on the above, the binding pocket was determined considering the 'tail-up, head-down' configuration and the THR550 and GLU570 residues to validate the docking studies with capsaicin and hence studies on derivatives after. According to docking results, (1) the Figure 6a showed the docking with capsaicin well-situated in binding-site, in a 'tail-up, head-down' configuration and near to THR550 and GLU570 residues.^[17] This related with de antinociceptive activity results (36% at 3 µg) where capsaicin showed outstanding activity. (2) For natural and synthetic alkamide docking analysis, (Figure 6b–6g) displayed a 'tail-up, head-down' configuration similar to capsaicin at the same

binding-site and neither of them showed GLU570 residue interactions. The antinociceptive activity below to capsaicin (60% at 30 µg for natural alkamides and 35% at 10 µg, for synthetic alkamides) could be explained by the unique THR550 residue interaction; however, the pungency absence shown in the biological assay could be explained by the lack of interaction at GLU570 residue too. This would place to GLU570 as key residue in the process pungency. (3) The synthetic alkamide docking analysis (Figure 6f and 6g) displayed the amide group is plainly close to THR550 residue and the p-OH interacts with LEU553 residue for both, even *N*-isobutyl-feruloylamide showed a hydrogen bond interaction. The antinociceptive activity results showed a ceiling effect, which is characterized by partial agonists. The synthetic alkamides occupied receptors but only partially activating it, while at the same time displacing or blocking full agonist's binding-site from receptors. The LEU553 residue interaction could be responsibly of this effect. Finally, (4) In the natural alkamide docking analysis, the ligand flexibility let to adopted a conformation that let them interacting with TYR511 residue considered by some reports as important residue for capsaicin activation,^[19] and thus, the nociceptive activity is comparable between them.

Intraperitoneal administration of PTZ (90 mg/kg, i.p.) produced seizures and 100% mortality in mice (Table 1), which were prevented by diazepam. The administration of capsaicin and affinin (90 mg/kg, i.p.) produced a mortality rate of 100 and 83%, respectively. In both cases, the animals

died at a faster rate (latency, Table 1) when compared to PTZ administration. None of the synthetic compounds (i.e. *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide) generated seizures and mortality at 90 mg/kg, i.p. However, when the dose was increased to 180 mg/kg, i.p., *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide produced a mortality rate of 66% in mice (Table 1).

Results indicate that affinin, the principal alkamide from *Heliopsis longipes*, showed the best antinociceptive activity, followed by longipenamide B, with 65.8 and 60.5%, respectively. These results suggest that the *N*-isobutyl-feruloylamide double bond contributed to the antinociceptive activity. Our data extend previous observations showing that the systemic administration of affinin inhibits acetic acid- and capsaicin-induced nociception in mice.^[10] In addition, this antinociceptive effect was demonstrated in the rat formalin test. Thus, data suggest that affinin inhibits nociception in inflammatory pain models following its local and systemic administration in rats and mice.^[9]

The natural alkamide longipinamide A and longipenamide B showed an % of antinociception of 56.3 and 52.8, respectively. Their range of activity is close to that of affinin and longipenamide A, thereby confirming the hypothesis that a long chain (8–11 carbons) is ideal for exerting the

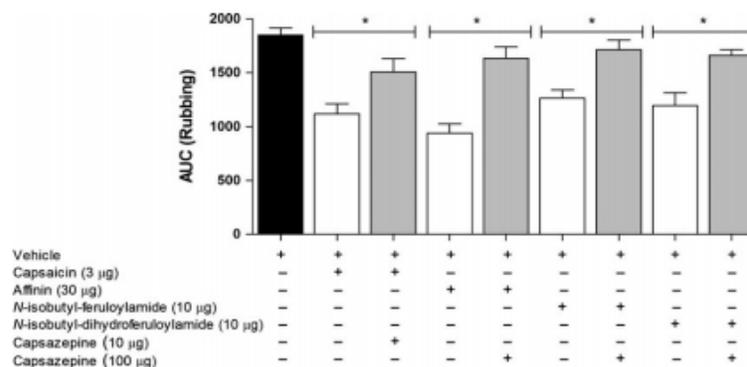


Figure 5 Effect of capsazepine (10 µg/20 µl) and (100 µg/20 µl) on the antinociceptive effect of capsaicin (3 µg/20 µl), affinin (30 µg/20 µl), *N*-isobutyl-feruloylamide (10 µg/20 µl) and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide (10 µg/20 µl) in the orofacial formalin test. Data are expressed as the area under the rubbing time against time curve (AUC). Bars represent the means ± SEM for at least six animals. *Significantly different ($P < 0.05$) from the individual administration, respectively, on each group, determined by one-way ANOVA and Tukey's test.

most effective antinociceptive effect.^[21] Despite the effective antinociceptive properties of alkamide longipinamide A, longipinamide A and longipinamide B, their low quantities in nature could be a limitation for their use as alternative analgesic compounds. Obtaining these compounds with synthetic or bioengineering methods could be a solution to this problem. The finding that longipinamide B has antinociceptive activity further demonstrates that *Heliopsis longipes* (A. Gray) extracts present anti-inflammatory and antinociceptive properties that are even greater than those of affinin.^[7,10] In contrast, related alkamides *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide displayed a % of antinociception between 25 and 35%, which is smaller than that of the natural alkamides. Furthermore, its evaluation demonstrated that the removal of the double bonds in the fatty acid chain allowed the creation of a stable derivative. This was most likely due to the presence of reducing epoxidation sites during metabolism, hence its toxicity.

While the mechanism of TRPV receptor activity remains to be elucidated, there is evidence suggesting that the satellite cell activation that follows dental pulp inflammation may be involved in the enhancement of the activity of TG neurons. This activation causes the innervation of the adjacent noninflamed teeth, the enhancement of TRPV1 expression and neural excitation, which manifests as ectopic persistent tooth-pulp pain.^[22] In addition, the up-regulation or sensitization of TRPV1 channel receptors may also have an important role in mechanical allodynia and heat hyperalgesia on TG C-fibre neurons.^[23]

It has been previously reported that the antinociceptive effect of capsaicin is related to its interaction with the TRPV1 receptor.^[24] Confirming this finding, our experiments have shown that the capsaicin-induced

antinociception was blocked by capsazepine, a TRPV1 receptor antagonist. Capsazepine also blocked the antinociceptive effect of affinin and that of the related synthetic alkamides in the formalin test, thereby implicating an activation of the vanilloid system. This blockade can be attributed to the structural similarity between these alkamides (Figure 1): (1) all include an amide group, (2) all include a short lateral chain as the fatty acid residue, and (3) alkamide compounds include an isobutylamine as the amine residue. This mechanism is also partly responsible for the antinociceptive activity that is observed in the alkamides *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide. Thus, the structural similarities between affinin and capsaicin and more generally between the natural and related alkamides that were assayed in this study might account for the significant interaction with the vanilloid system, particularly with the TRPV1 receptor. In the present study, we provide the first evidence that shows the antinociceptive properties of both natural and synthetic alkamides, with the participation of the TRPV1 channel. Previous studies have shown that affinin interacts with GABA, opioid and serotonergic receptors^[7,10] and it activates the cGMP-K⁺ channel pathway to modulate the nociceptive process.^[10] These observations suggest a need for future studies to determine the interaction of longipinamide A, longipinamide A, longipinamide, *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide with these signalling pathways. Among alkamides, capsaicin is the only pungent compound. Its initial burning pain is considered a potential limitation for use and development as active principle in formulations for the treatment of pain and itch.^[25] This pungent property can therefore be attributed to the vanillylamine residue. Alkamide compounds lack this residue as well as the pungent property. Therefore,

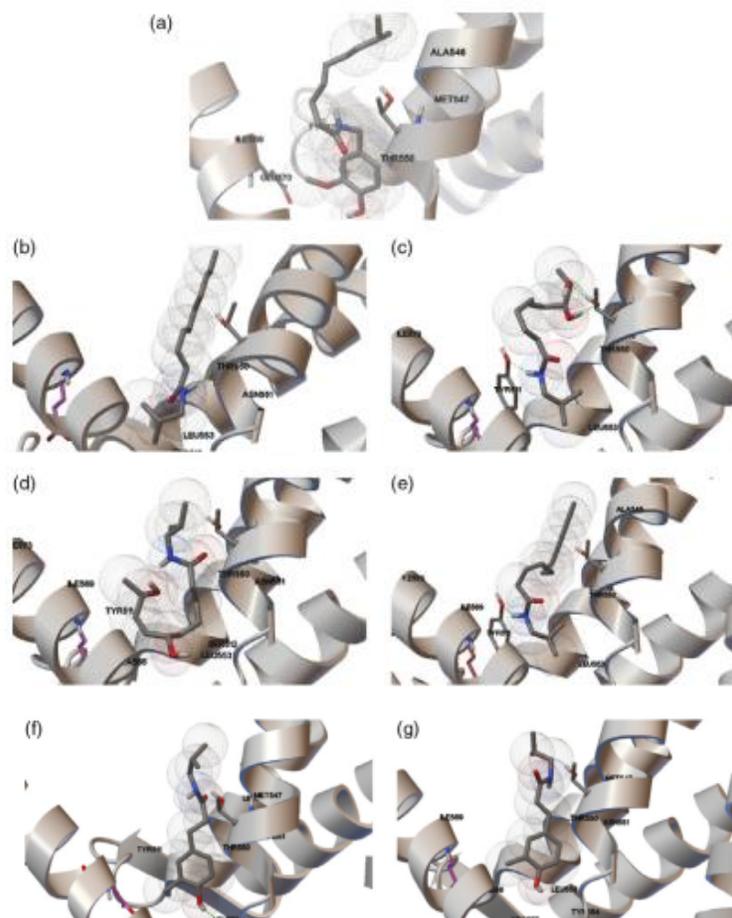


Figure 6 Interaction between alkamides and the binding-pocket recognition site TRPV1 considering the 'tail-up, head-down' configuration (THR550 and GLU570 residues). (a) Capsaicin; (b) affinin; (c) longipenamide A; (d) longipenamide A; (e) longipenamide A; (f) *N*-isobutyl-feruloylamide and (g) *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide alkamides. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Table 1 Effect of alkamides on seizure activity in mice

Group	Doses mg/kg (i.p.)	Mortality	
		Frequency	Latency (s)
Vehicle + PTZ ^a		6/6	266 ± 46.5
Diazepam + PTZ ^a	1	0/6	0
Capsaicin	90	6/6	132 ± 19.8
Affinin	90	5/6	88 ± 25
<i>N</i> -isobutyl-feruloylamide	90	0/6	0
	180	0/6	0
<i>N</i> -isobutyl-dihydroferuloylamide	90	0/6	0
	180	4/6	224 ± 21.3

^aPTZ, Pentylentetrazole (80 mg/kg, i.p.).

these alkamides are excellent candidates for the development of compounds which could be useful for the treatment of pain.

Seizures are produced by neuronal activity that is unbalanced between inhibitory (GABA-mediated) and excitatory (glutamate-mediated) neurotransmission.^[26] Evidence indicates that glutamate has a crucial role in seizures initiation and propagation. An abnormal glutamate release causes synchronous firing of large populations of neurons, leading to seizures.^[27] Importantly, glutamate and NMDA receptors are involved in seizures aetiology and dopamine (D₂) and serotonin (5-HT_{1A}) monoamines are involved in the anticonvulsant effects.^[28] On the other hand, the TRPV1 channels are expressed in the DRG and hippocampus, the main epileptogenic region in the brain. Ca²⁺ accumulation in the cytosol of the hippocampus and DRG is important in the aetiology of epilepsy. Furthermore, antagonist capsazepine suppresses epileptiform activity by decreasing the amplitude of nonsynaptic antidromic potentials, thereby interacting with residues from all four

monomers of the tetrameric channel.^[29] Capsazepine interferes with the propagation of seizure activity along the hippocampal pathway. Blockade of TRPV1 channels by capsazepine administration remarkably suppressed in vivo ongoing ictal activity.^[30] Recently, Nazıroğlu presents a revision that support a role for Ca²⁺ accumulation through TRPV1 channels in the aetiology of epileptic seizures, indicating that inhibition of TRPV1 in the hippocampus may possibly be a novel target for prevention of epileptic seizures.^[31]

TRPV1 channels could be involved in the aetiology of seizures that are generated by capsaicin and affinin (90 mg/kg) as well as by *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide at high doses (180 mg/kg). Affinin does not produce seizures at doses of 80 mg/kg, and alkamides *N*-isobutyl-feruloylamide and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide do not produce seizures at doses of 90 mg/kg. Furthermore, their antinociceptive effect was decreased by capsazepine treatment. Thus, affinin and *N*-isobutyl-feruloylamide (at doses lower than 90 mg/kg) and *N*-isobutyl-dihydroferuloylamide (at doses lower than 180 mg/kg) have antinociceptive activity, which acts on TRPV1 without seizure activity, perhaps due to different intrinsic activity and affinity towards the TRPV1 receptor or by activation of other mechanisms. More studies are necessary to determine the molecular mechanism mediating this behaviour.

Conclusions

Our results indicate that all natural and related alkamides produce peripheral antinociception in the orofacial formalin test. Docking analysis suggest that amide group play an important role on antinociceptive activity, due to a relevant interaction with THR550; additionally, the GLU570 residue could be involved in the pungent property. Data show that

these compounds produce their antinociceptive effect also by activation of the TRPV1 receptor. At high doses (180 mg/kg), these alkamides induce seizures and death in mice, perhaps also due to their action on the TRPV1 receptor. Thus, blockade of TRPV1 activation in the DRG may be a target for the prevention of epileptic seizures and peripheral pain. It is important to consider that high doses of the natural extract of *Heliopsis longipes* could lead to intoxication. Notwithstanding, alkamides could be good candidates for future pharmaceutical development.

Declarations

Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

Funding

This research was financially supported by Conacyt, México (Grant number 241044), UAEM-México (PIDE Projects PII02 and PICA18) and ESM-IPN (Grant number SIP: 20170861).

Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. dissertation of Vianey de la Rosa-Lugo, who was a Conacyt fellow (fellowship 290761). We are in debt to Dr. Francisco Javier López-Muñoz for revising the experimental design (Departamento de Farmacobiología, Cinvestav). We are grateful with B. Domínguez, M.A. Ramírez, M. Medina and V. Labastida for technical assistance. All spectrometric analyses were obtained from LANEM (Grant number 232693).

References

- Rios MY, Olivo HF. Chapter 3 – Natural and synthetic alkamides: applications in pain therapy. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Ed. Attatur-Rahman. 2014; 43: 79.
- Nagy I et al. Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Prog Drug Res* 2014; 68: 39–76.
- Por ED et al. β -Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *J Biol Chem* 2012; 287: 37552–37563.
- Rios MY et al. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 364–367.
- Arriaga-Alba M et al. Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis Longipes* extract. *Pharm Biol* 2013; 51: 1035–1039.
- Déciga-Campos M et al. Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin. *Drug Dev Res* 2012; 137: 130–137.
- Déciga-Campos M et al. Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Med* 2010; 76: 665–670.
- Ueda H. In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 263–268.
- Raboisson P. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28: 219–226.
- Schiffman E et al. Diagnostic criteria for temporomandibular disorders (DC/TMD) for clinical and research applications: recommendations of the international RDC/TMD consortium network and orofacial pain special

Vianey de la Rosa-Lugo *et al.*

Natural and synthetic alkamides in nociception

- interest group. *J Oral Facial Pain Headache* 2014; 28: 6–27.
11. Van der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1827–1834.
 12. Gerhold KA, Bautista DM. Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1170: 184–189.
 13. Cavanaugh DJ *et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* 2011; 31: 5067–5077.
 14. Gannett PM *et al.* Capsaicinoids: their separation, synthesis, and mutagenicity. *J Org Chem* 1988; 53: 1064–1071.
 15. López-Martínez S *et al.* Minor alkamides from *Heliopsis longipes* S.F Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochem Lett* 2011; 4: 275–279.
 16. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109–110.
 17. Gao Y *et al.* TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature* 2016; 534: 347–351.
 18. Zheng J, Ma L. Structure and function of the thermoTRP channel pore. *Curr Top Membr* 2014; 74: 233–257.
 19. Yang F *et al.* Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 518–524.
 20. Cao E *et al.* TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 2013; 504: 113–118.
 21. Walpole CS *et al.* Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain “C-region”. *J Med Chem* 1993; 36: 2381–2389.
 22. Matsuura S *et al.* Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. *PLoS One* 2013; 8: e52840.
 23. Cruz LS *et al.* Intraganglionic resiniferatoxin prevents orofacial inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Behav Pharmacol* 2014; 25: 112–118.
 24. Caterina MJ. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816–824.
 25. Papoiu ADP, Yosipovitch G. Topical capsaicin. The fire of a “hot” medicine is reignited. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 1359–1371.
 26. Dalby NO, Mody I. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 187–192.
 27. Kong W-L *et al.* Role of TRPV1 in susceptibility to PTZ-induced seizure following repeated hyperthermia challenges in neonatal mice. *Epilepsy Behav* 2014; 31: 276–280.
 28. Clinckers R *et al.* Hippocampal dopamine and serotonin elevations as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant efficacy of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine. *Neurosci Lett* 2005; 390: 48–53.
 29. Gonzalez-Reyes LE *et al.* TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exp Neurol* 2013; 250: 321–332.
 30. Messegue A *et al.* Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr Neuropharmacol* 2006; 4: 1–15.
 31. Nazıroğlu M. TRPV1 channel: a potential drug target for treating epilepsy. *Curr Neuropharmacol* 2015; 13: 239–247.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1. Alkamides chemical synthesis schemes and spectra data.



HU-4655



<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial	Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI RECIBIDO 26 MAY 2017 DELEGACIÓN FEDERAL EN EL ESTADO DE MORELOS	Uso exclusivo del IMPI No. de expediente No. de folio de entrada Fecha y hora de presentación
	Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso	
	Fecha y hora de recepción	

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): Universidad Autónoma del Estado de Morelos	
2) Nacionalidad (es): Mexicana	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209. 5° piso, Torre de Rectoría (Secretaría Académica)	
Población, Estado y País: Cuernavaca, Morelos, México	
4) Teléfono (clave): 01777 329 7004	5) Fax (clave): 01777 329 7004 Ext. 3212



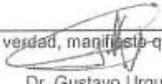
II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): Ma. Yolanda Ríos Gómez; Vianey de la Rosa Lugo; Myrna Déciga Campos	
7) Nacionalidad (es) Mexicana, Mexicana, Mexicana	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209. 5° piso, Torre de Rectoría (Secretaría Académica)	
Población, Estado y País: Cuernavaca, Morelos, México	
9) Teléfono (clave): 01777 3297004	10) Fax (clave): 01777 329 7004 Ext. 3212

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)	
11) Nombre (s): Dr. Gustavo Urquiza Beltrán	12) R G P: DDAJ-22134
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209. 5° piso, Torre de Rectoría (Secretaría Académica)	
Población, Estado y País: Cuernavaca, Morelos, México	
14) Teléfono (clave): 01777 329 7004	15) Fax (clave): 01777 329 7004 Ext. 3212
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: Lic. Emma Rivera Arroyo, Alondra Ortiz Juárez y Biol. Milton René Fragozo Ramírez	

17) Denominación o Título de la Invención:
"ALCAMIDAS COMO PRINCIPIOS ACTIVOS UTILES EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR"

18) Fecha de divulgación previa Día Mes Año	19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI
20) Divisional de la solicitud	21) Fecha de presentación Día Mes Año

Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año
22) Prioridad Reclamada: País	Fecha de presentación Día Mes Año	No. de serie		

Lista de verificación (uso interno)			
No. Hojas		No. Hojas	
[]	Comprobante de pago de la tarifa	[]	Documento de cesión de derechos
[]	Descripción y reivindicación (es) de la invención	[]	Constancia de depósito de material biológico
[]	Dibujo (s) en su caso	[]	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
[]	Resumen de la descripción de la invención	[]	Documento (s) de prioridad
[]	Documento que acredita la personalidad del apoderado	[]	Traducción
		[]	TOTAL DE HOJAS
Observaciones:			
Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.			
	 Dr. Gustavo Urquiza Beltrán Nombre y firma del solicitante o su apoderado	Cuernavaca, Morelos a 17 de mayo de 2017 Lugar y fecha	

"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"



Certificado de acuse
de recibo registro(s):
MX/2017/043639

DIRECCION DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTES
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
Expediente de Patente **MX/a/2017/007947**

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 18 de julio de 2017.

Gustavo URQUIZA BELTRÁN
Apoderado de
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
Av. Universidad No. 1001. 5° Piso, Torre Rectoría (Secretaría
Académica)
Chamilpa
62209, CUERNAVACA, Morelos, México

No. Folio: **55849**

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud presentada el 26/05/2017

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6° fracciones III y XI y 7° bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012, 09/04/2012 y 01/06/2016); artículos 1°, 2°, 3° fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4°, 5° y 12° fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 07/09/2007); artículos 1°, 2°, 3°, 4°, 5° fracción V inciso a) sub inciso i), segundo guión, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F.



MX/2017/55849

"2017. Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"



27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); artículos 1º, 3º y 5º inciso e) e i) y penúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Asimismo, el presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7º BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3º de su Reglamento, y 1º fracción III, 2º fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

ATENTAMENTE
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO.
OSGC/RMRV/2017



Cadena Original
OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO|00001000000401472906|Servicio de Administración
Tributaria|1796|FOR|MX/2017/55849|MX/a/2017/007947|Favorable|1854|RMRV|Pág(s)
2|HR89RGrZoKqdASYP7kkVY+3GIXs=

Sello Digital
LPh9c0KM/mNqTBf3ez58qREMoYeNe7eFMva/qp33Z80r30YpQ+N3F88lat6pLvsGukqhiOAb9IL+E3CG
pc2UPoNvSMNPMICQMPvLXVwDwE68Z5zpZOMFzQWeDhHHEJ4dyZILgbzu3FfpPaZyIbGD0d+h+ WQg18W
/rLED9DxXG8KdAydzn+NQrheulp/yzWj3Ut31PX9SOSeBQy54aqz2BmTZd9zh2fBXXpbTL8GdV6v
UibMfAjcLgxfppgX4l//+vJ6SYvWCJxD85QjedxeA5P2kW2abao3Lin200LmFcEojF83orohnWJmPnD
rv2LmnZ4JfPTp01echYDSA=

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcámidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Fecha 10/02/2020

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcámidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dr. Germán Bernal Fernández

Fecha 18/02/2020

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcamidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dr. Jesús Rivera Islas

Fecha 17/02/2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcanidas;
agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Víctor Gómez Calvario

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Víctor Gómez Calvario

Fecha 10 Febrero 2020

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcámidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Ángeles Ramírez Cisneros

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. Ángeles Ramírez Cisneros

Fecha 12-dic-2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcámidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama

Fecha 14. Febrero. 2020

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: de la Rosa Lugo Vianey

Título de la tesis: "Determinación de parámetros fármaco-toxicológicos de alcámidas; agentes terapéuticos asociados al tratamiento del dolor"

Grado a obtener: Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

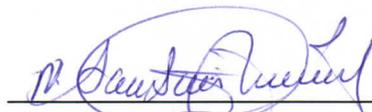
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

Fecha 14/02/2020