



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTI-
ALODÍNICO DE PIPERINA EN UN MODELO DE
DOLOR NEUROPÁTICO EN ROEDORES”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JORGE LUIS MENDOZA MONROY

DIRECTOR:

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.
2017**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Andrés Navarrete Castro
Vocal:	Dra. Ruth Ivonne Téllez Ballesteros
Secretario:	Dra. Guadalupe Esther Ángeles López
Suplente 2:	Dr. Fernando Rodríguez Ramos
Suplente 1:	M en C. Ariana Elizabeth Vargas Castillo

Sitio de elaboración de tesis:

Laboratorio 126. Departamento de Farmacia, Facultad de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Asesor de tesis: Dr. Andrés Navarrete Castro

Supervisor técnico de tesis: Dr. Héctor Isaac Rocha González

Sustentante: Jorge Luis Mendoza Monroy

Agradecimientos.

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico a través del proyecto PAPIIT IN 216516, Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrados a través del proyecto PAIP 5'000-9143, A la Facultad de Química por otorgarme la beca del Subprograma 127 Formación Básica en Investigación. .

Tabla de Contenido

1.) Resumen.....	1
2.) Introducción.....	2
3.) Fundamento Teórico.....	3
3.1) Sistema somato-sensorial.....	3
3.2) Dolor.....	3
3.3) Clasificación del dolor.....	4
3.3.1) Dolor adaptativo.....	4
3.3.2) Dolor no adaptativo.....	4
3.4) Mecanismo de percepción del dolor (fibras sensoriales aferentes nociceptivas y nociceptores).....	7
3.5) Dolor neuropático.....	10
3.6) Clasificación del dolor neuropático.....	10
3.7) Causas.....	12
3.8) Mecanismos en la modulación del dolor neuropático.....	12
3.8.1) Mecanismos en la modulación a nivel periférico.....	13
3.8.2) Alteraciones del canal iónico o alteraciones neuronales nociceptivas de primer orden.....	14
3.8.3) Mecanismos en la modulación a nivel central.....	15_Toc489392336
3.9) Tratamiento del dolor neuropático.....	16
3.10) TRPV1.....	17
3.10.1) Distribución en tejidos, propiedades generales.....	17
3.10.2) Activadores TRPV1.....	18
3.10.3) Desensibilización o taquifilaxis de TRPV1.....	19
3.10.4) Moduladores TRPV1.....	20
3.11) Alcamidas.....	23
3.12) Piper nigrum.....	23
3.12.1) Farmacología de <i>P.nigrum</i>	24
3.12.2) Composición química.....	25
3.13) Piperina.....	25
4.) Planteamiento del problema.....	27
5.) Hipótesis.....	28

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor
neuropático en roedores

6.) Objetivos.....	28
6.1) Objetivo general.....	28
6.2) Objetivos particulares.....	28
7.) Material y métodos.....	29
7.1) Fármacos.....	29
7.2) Material vegetal.....	29
7.3) Preparación de extracto.....	29
7.4) Cristalización de la piperina.....	29
7.5) Purificación de piperina por cromatografía en columna abierta.....	29
7.6) Análisis Resonancia Magnética Nuclear RMN (H^1 , C^{13}) y Difracción de Rayos X de Monocristal.....	30
7.7) Animales.....	31
7.8) Inducción del dolor neuropático.....	31
7.9) Determinación de la alodinia táctil.....	32
7.10) Análisis estadístico.....	34
8.) Resultados.....	35
8.1) Aislamiento de la piperina.....	35
8.2) Caracterización de piperina.....	36
8.3) Características generales de las ratas en el estudio.....	39
8.4) Postura y modo de andar.....	39
8.5) Cotejo de la sensibilidad mecánica.....	39
8.6) Prueba de alodinia táctil.....	41
8.7) Determinación de la dosis efectiva.....	41
9.) Discusión de resultados.....	44
10.) Conclusiones.....	47
11.) Perspectivas.....	48
12.) Referencias.....	49
13.) Anexo 1.....	57
14.) Anexo 2.....	61

Índice de Figuras

<i>Figura 1 Clasificación del dolor basada en el mecanismo neurofisiológico que lo origina.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2 Anatomía de las fibras sensoriales aferentes nociceptivas.</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3 Modulación de algunas vías del dolor neuropático.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4 Alteraciones de canal iónico.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5 Topología del canal TRPV1.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 6 Moduladores de la actividad del canal TRPV1.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7 Hoja y frutos de P.nigrum.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8 Molécula de piperina</i>	<i>26</i>
<i>Figura 9 Ligación de nervios L5 y L6.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10 Condiciones para estudio de up-down.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 11 Área de aplicación de fibra de von Frey.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 12 Piperina: (2E, 4E)-5-(1, 3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-ona.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13 Diagrama ORTEP de piperina que muestra su conformación molecular. Los átomos son identificados como N: óvalos azules, O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 14 Perspectiva del empaquetamiento de moléculas de piperina en la celda unitaria. Los átomos son identificados como N: óvalos azules, O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 15 Espectro de resonancia magnética nuclear ¹H de piperina (400 MHz, CDCl₃).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 16 Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³C de piperina (400 MHz, CDCl₃).</i>	<i>38</i>

Índice de Cuadros

<i>Cuadro 1 Principales fibras sensoriales nociceptivas: características principales.</i>	<i>9</i>
<i>Cuadro 2 Cambios en los mecanismos fisiopatológicos a nivel del sistema nervioso.....</i>	<i>11</i>
<i>Cuadro 3 Pesos y porcentajes obtenidos de las semillas de Piper nigrum.</i>	<i>35</i>
<i>Cuadro 4 Tratamiento del dolor neuropático</i>	<i>57</i>

Abreviaturas y Notaciones Utilizadas

TRP Receptores de potencial *transitorio*

TRPV1 Receptores de potencial transitorio vanilloide subfamilia 1

GRD Ganglio de la raíz dorsal

ATP Adenosina-5'-trifosfato

BK Bradiquinina;

His Histamina

IL Interleucina

Na_v Canales de sodio dependientes de voltaje

NMDA N -metil-D-aspartato

PG Prostaglandina

SNP Sistema Nervioso Periférico

SNC Sistema Nervioso Central

TNF- α factor de necrosis tumoral alfa

GABA Acido γ -aminobutírico

P₂X₃ Receptor purinérgico que se activa por adenosina-5'-trifosfato.

ASIC Canales iónicos sensibles a ácidos

NGF Factor de crecimiento nervioso

TrkA Receptor tirosina cinasa A

5-HT₂ Receptor subtipo dos de serotonina

5-HT₃ Receptor subtipo tres de serotonina

PKC Proteincinasa C

PKA Proteincinasa A

CaMKII Calmodulina dependiente cinasa

PLC Fosfolipasa C

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor
neuropático en roedores

PIP₂ Fosfatidilinositol-4,5- difosfato

TK Tirosina cinasas

PG Prostaglandinas

AMPc Adenosín monofosfato cíclico

Thr Treonina

Ser Serina

GPCR Receptor de prostaglandinas acoplados a proteínas G

AC Adenilato ciclasa

DAG 1,2-diacilglicerol

IP₃ (1,4,5)-inositoltrifosfato

RE Retículo endoplásmico

CSAV Canales de sodio dependientes de voltaje

CCAV Canales de calcio activados por voltaje

CGRP Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

i.p vía intraperitoneal

ABC área bajo la curva

E.E.M Error estándar de la media

MEP Máximo efecto posible

DE50 Dosis efectiva necesaria para producir el 50% del efecto máximo posible

ANOVA análisis de varianza de una vía

RMN¹H Resonancia magnética de proton

RMN¹³C Resonancia magnética de carbono

CDCl₃ Cloroforma deuterado

TMS Terametilsilano

1.) Resumen

El dolor neuropático es un padecimiento de difícil tratamiento, el cual suele originarse a consecuencia de lesiones o enfermedades que afectan al sistema somatosensorial, en la actualidad este es un síndrome de muy difícil manejo en la clínica debido a que aún existe una falta de entendimiento y de un tratamiento efectivo y específico, las estrategias terapéuticas existentes presentan limitaciones importantes, por lo que la búsqueda de nuevos agentes con utilidad en el dolor neuropático es altamente necesaria. Los productos naturales son una alternativa muy importante para el tratamiento del dolor ya que siguen siendo fuentes importantes para la obtención de compuestos con utilidad terapéutica, recientemente se ha investigado sobre moléculas llamadas alcanidas, que actúan sobre los receptores de potencial transitorio (TRP) las cuales han presentado efectos benéficos en el tratamiento del dolor inflamatorio y visceral. Una de estas alcanidas es la piperina, que se encuentra en las semillas de pimienta negra.

Esta tesis se desarrolló con el propósito de valorar el potencial anti-alodínico de la piperina en el modelo de ligación de los nervios L5 y L6, como un modelo de dolor neuropático en rata. El efecto anti-alodínico de la piperina se evaluó con el modelo de “up and down” por el estímulo con fibras de von Frey. Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 160 a 200g a las cuales se les ligaron los nervios espinales L5 y L6. Se dejaron recuperar por 20 días previos a la experimentación. Se verificó la presencia de alodinia táctil en cada rata. La piperina se administró intraperitonealmente a las dosis de 3.1, 10, 31, 56 y 100 mg/kg, dispersa en solución salina con Tween 80. La piperina presentó efecto anti-alodínico dosis-dependiente hasta la dosis de 56 mg/kg. La dosis efectiva 50 anti-alodínica de la piperina fue de 17.47 ± 0.059 mg/kg. El efecto anti-alodínico provocado por la piperina es posible que ocurra por la desensibilización de las fibras nerviosas nociceptivas por medio de la activación de los receptores de potencial transitorio vanilloide subfamilia 1 (TRPV1). Los resultados de este estudio demostraron que la piperina tiene efecto anti-alodínico y puede sugerirse como una futura alternativa terapéutica para el dolor neuropático.

2.) Introducción

Las alcanidas son productos naturales frecuentemente presentes en plantas que se utilizan en la herbolaria tradicional de diferentes culturas en todo el mundo. Estos compuestos han demostrado actividad analgésica en algunos modelos de dolor.

Entre las alcanidas más importantes utilizadas para el alivio del dolor, la capsaicina es la más estudiada en la actualidad en relación con su actividad analgésica (Epstein, 1994). A pesar de sus efectos secundarios, la capsaicina actualmente se usa como principio activo en diversas formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de diferentes tipos de dolor, estableciendo las bases para el eventual uso de otras alcanidas relacionadas al mismo fin (Simpson, 2008). Entre estas se encuentra la piperina. La piperina es la alcanida principal de la familia *Piperaceae*, la cual ha demostrado actividad analgésica en algunos modelos de dolor visceral e inflamatorio (Ying, 2013).

El potencial terapéutico de las alcanidas parece estar siendo desaprovechado debido a que estudios previos sugieren que pueden intervenir en la modulación de algunos mecanismos comunes en el dolor de diversas etiologías (Szallasi, 2005), lo que las hace buenas candidatas para el tratamiento de algunos tipos de dolor crónico como el dolor neuropático.

El dolor neuropático suele originarse a consecuencia de lesiones o enfermedades que afectan al sistema somato-sensorial (Magrinelli et al. 2013). Las lesiones de nervios periféricos, la diabetes (Wilson, 1999), el virus herpes zoster (Sabatowski et al. 2004), entre otras, son ejemplos de padecimientos que causan dolor neuropático. El dolor neuropático es un síndrome de muy difícil manejo en la clínica debido a que aún existe una falta de entendimiento y de un tratamiento efectivo y específico.

En este contexto, el uso de productos de origen natural representa una buena opción en la búsqueda de tratamientos novedosos para este tipo de padecimiento.

En el presente trabajo se estudió el efecto anti-alodínico de la alcanida piperina en un modelo de dolor neuropático, con el propósito de en un futuro poder contar con una alternativa terapéutica para el dolor neuropático.

3.) Fundamento Teórico

3.1) Sistema somato-sensorial

El sistema somato-sensorial permite la percepción del tacto, presión, dolor, temperatura, posición, movimiento y vibración. Este sistema se extiende desde la periferia a través de la medula espinal, cerebro, tallo cerebral, tálamo y la corteza cerebral, donde la sensación es percibida (Zeilhofer, 2008). Los nervios somato-sensoriales inervan a la piel, los músculos, las articulaciones e incluye a los mecano-receptores, termo-receptores, quimio-receptores, baro-receptores y a los nociceptores, que envían señales a la medula espinal y eventualmente al cerebro, para posteriormente procesarlo (Bridges et al. 2001). La mayoría de los procesos sensoriales involucran al núcleo talámico que recibe una señal sensorial que luego se dirige a la corteza cerebral. Lesiones o enfermedades del sistema nervioso somato-sensorial pueden alterar y desordenar la transmisión señales sensoriales (Campbell, 1988).

3.2) Dolor

El sistema nervioso juega un papel vital en la protección de los organismos. Se encarga de detectar, responder y recordar cualquier estímulo nocivo mediante su traducción en una experiencia desagradable conocida como dolor. El dolor tiene una función sumamente importante en el organismo intacto, ya que obliga al cuerpo a retirarse de estímulos físicos, químicos o mecánicos que ponen en peligro su integridad (Zeilhofer, 2008). Sin embargo, cuando existe un funcionamiento anormal en las estructuras que regulan este mecanismo, el dolor sobrepasa su función y se vuelve patológico (Bowman, 1984). La sensación del dolor implica componentes fisio-patológicos y psicológicos que con frecuencia son difíciles de interpretar (Marazziti et al. 2006), por lo que definirlo se vuelve muy complicado.

La Organización Internacional para el Estudio del Dolor, (IASP, por sus siglas en ingles) , tiene la definición más aceptada para este término y lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño” (Merskey, 1979).

3.3) Clasificación del dolor

Aunque actualmente la clasificación del dolor resulta difícil debido a la gran cantidad de factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos que se integran para originar esta sensación (Turk, 1999). La clasificación más aceptada es la publicada por Woolf en el 2004 (Woolf, 2004) (**Figura 1**), quien se basa en el mecanismo neuro-fisiológico que lo origina para clasificar al dolor en 2 grandes familias subdivididas en 4 tipos:

3.3.1) Dolor adaptativo

El dolor adaptativo contribuye a la supervivencia debido a que da protección al organismo, de lesiones o promoviendo la curación cuando una lesión ha ocurrido.

1) Dolor nociceptivo: es un dolor transitorio que responde a estímulos nocivos mediante un sistema especializado de alto umbral. Se considera como un sistema de alerta ante estímulos potencialmente dañinos.

2) Dolor inflamatorio: es un dolor espontáneo que responde a un daño en el tejido y se acompaña de hipersensibilidad. Este dolor tiene como objetivo la reducción del contacto y movimiento de la zona afectada. Se considera como un sistema de protección para evitar un daño mayor al ya originado.

3.3.2) Dolor no adaptativo

El dolor no adaptativo en contraste, es una expresión de una operación patológica del sistema nervioso que está desacoplado de un estímulo nocivo que usualmente es persistente o no recurrente. Esta es un área enorme de estudios clínicos ya que no hay resultados satisfactorios para su tratamiento ni control, además sus opciones de tratamiento son muy limitadas debido al poco entendimiento

3) Dolor neuropático: es un tipo de dolor espontáneo acompañado de hipersensibilidad que se genera por lesiones en el sistema nervioso, tanto a nivel periférico, como a nivel central. Este tipo de dolor, no es un proceso auto-limitado por lo que puede persistir por meses o incluso años.

4) Dolor disfuncional: es un tipo de dolor no adaptativo, pues carece de un motivo de respuesta específico y se origina como consecuencia de sensibilidad anormal o procesamiento central alterado.

A pesar de que el dolor inflamatorio, neuropático y disfuncional tienen diferentes causas, comparten una característica que los diferencia del dolor nociceptivo. Esto es que el dolor puede presentarse de manera espontánea en ausencia aparente de un estímulo periférico o puede ser evocado por un estímulo capaz de producir dos respuestas distintas conocidas como alodinia e hiperalgesia. En la hiperalgesia se presenta una reacción exagerada ante un estímulo nocivo y en la alodinia se obtiene una respuesta nociceptiva ante un estímulo inocuo (Woolf, 2004).

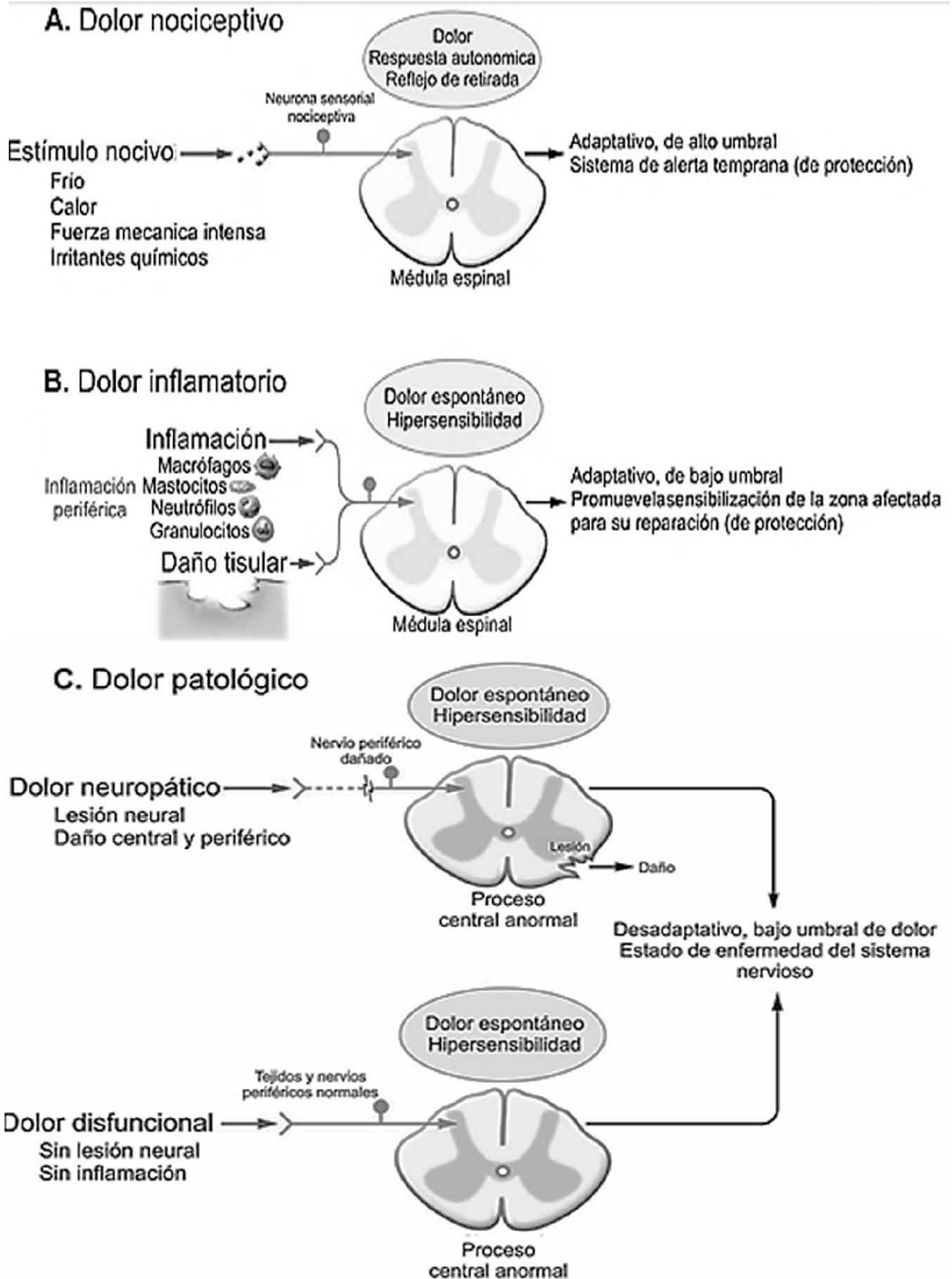


Figura 1 Clasificación del dolor basada en el mecanismo neurofisiológico que lo origina

Tomado de Woolf, 2004.

3.4) Mecanismo de percepción del dolor (fibras sensoriales aferentes nociceptivas y nociceptores)

La percepción de un estímulo nocivo, es iniciada por la detección de un estímulo potencialmente dañino, donde los nociceptores (receptores localizados en las terminaciones nerviosas) de las fibras sensoriales aferentes nociceptivas que son un subconjunto de neuronas sensoriales primarias altamente especializadas, actúan convirtiendo este estímulo en una señal eléctrica (traducción), para posteriormente transmitirla y que el Sistema Nervioso Central pueda responder ante este estímulo nocivo (Dubin, 2010).

Las fibras sensoriales aferentes nociceptivas están divididas en axones desmielinizados (Fibras-C), axones ligeramente mielinizados (Fibras-A δ) y axones mielinizados (Fibras A β) (Woolf, 1999). Estas fibras se encuentran localizadas en todas las partes del cuerpo que puedan detectar el dolor (piel, músculos, articulaciones, vísceras). Con base en lo anterior, las fibras nociceptivas se han clasificado también de acuerdo a su velocidad de conducción, la sensibilidad a estímulos que las activan, diámetro y grado de mielinización (Julius, 2001). Para transmitir la información nociceptiva, la fibra sensorial aferente nociceptiva debe ser selectiva, es decir, debe ser capaz de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos (Hyman, 1995). En este sentido los nociceptores poseen características importantes que ayudan a realizar esta distinción y a clasificarlos: por su presencia, especificidad, capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo y el umbral del nociceptor, este último es el primer y más importante filtro en la activación de este y define las diferentes clases de fibras sensoriales aferentes: unimodal, la cual reacciona solo a un tipo de estímulo y la polimodal, la cual reacciona a diferentes tipos de estímulos. Las fibras polimodales sensoriales primarias son más comunes que las unimodales. En la **Figura 2** se describe de manera detallada cada una de las partes que componen a las fibras sensoriales aferentes nociceptivas. En el **Cuadro 1** se presentan de manera general las características de cada una de las fibras sensoriales aferentes nociceptivas.

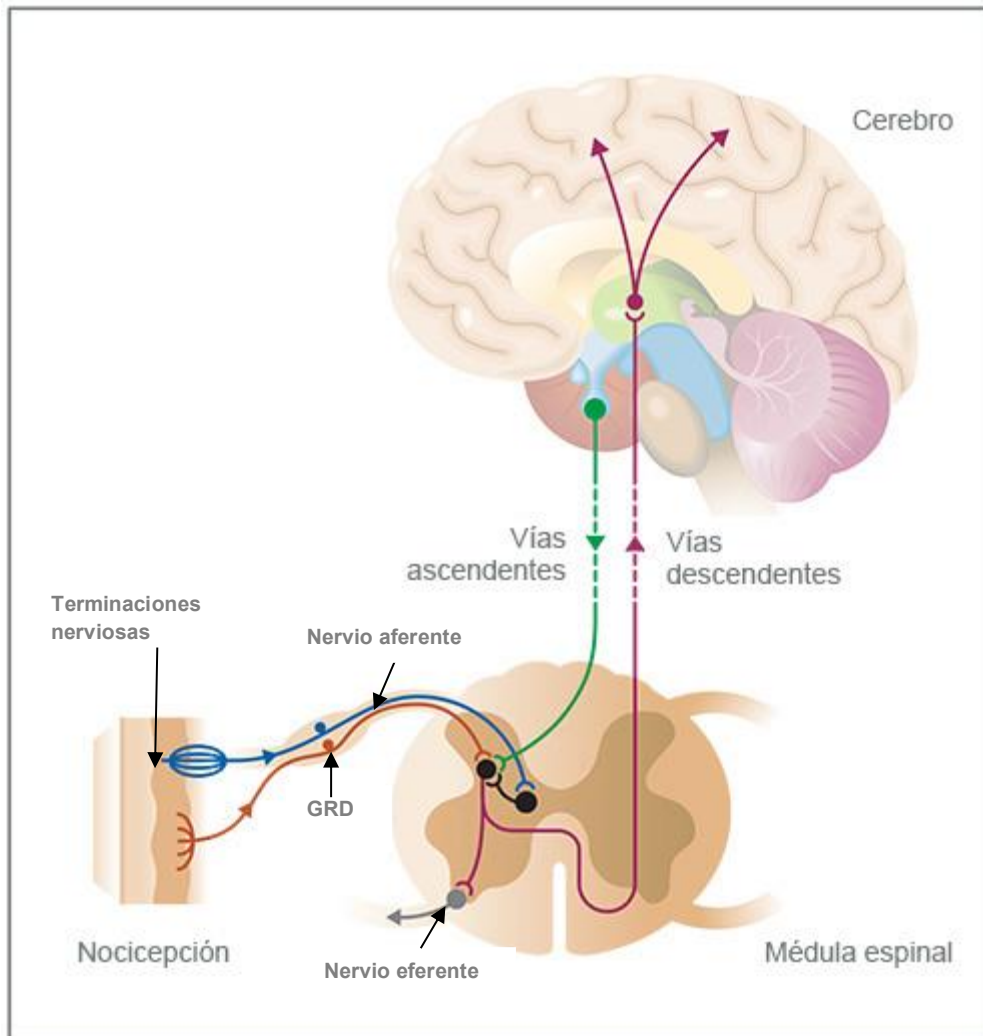


Figura 2 Anatomía de las fibras sensoriales aferentes nociceptivas.

Tomado de Purves et al. 2008

El axón periférico de las fibras sensoriales aferentes nociceptivas pertenece a una neurona mono-polar o unimodal (las más comunes son las polimodales), que tiene la peculiaridad de emitir una proyección periférica y otra central. Su rama central penetra en las astas posteriores medulares estableciendo la primera sinapsis y la rama periférica inerva la piel, músculos, articulaciones y vísceras la cual lleva la señal a un conjunto de cuerpos celulares. El conjunto de cuerpos celulares de estas neuronas mono-polares conforman el ganglio de la raíz dorsal (GRD), dentro hay cuerpos celulares que regulan la intensidad y frecuencia de transducción. Abreviaturas: GRD (Ganglio de raíz dorsal).

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor neuropático en roedores

Cuadro 1 Principales fibras sensoriales nociceptivas: características principales.

Tipo de fibra aferente	Velocidad de conducción	Diámetro	Grado de mielinización	Tipo de estímulo	Características de los nociceptores
Aβ	30-120 m/s	5-15 μ m	+++	Mecánico	En condiciones normales participan como mecanoreceptores de bajo umbral en la percepción táctil, pero ante un proceso inflamatorio modifica su fenotipo convirtiéndose en fibras A δ de alto umbral
Aδ	6-30 m/s	1-5 μ m	++	Mecánico Térmico	Trasmiten la sensación de primer dolor rápido (tarda 300 mili segundos) mediado por la primera respuesta adaptativa al dolor (retirada). Se activa por estímulos mecánicos aversivos, solo se localiza en la piel 40-10%
C	0.5-2 m/s	0.5-2 μ m	+	Mecánico Térmico Químico	Representan el 60-90% de las terminaciones aferentes periféricas, transmiten de manera más lenta, son los responsables del segundo dolor (tarda unos 0.7-1.2 segundos) desencadena acciones de protección. Se activan por estímulos mecánicos, térmicos y químicos aversivos

+ (Poco mielinizado), ++ (ligeramente mielinizado), +++ (mielinizado)

Tomado y modificado de Delgado, 1998

3.5) Dolor neuropático

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor estipula que de acuerdo con el Grupo de Interés Especial en Dolor Neuropático (NeuPSIG por sus siglas en inglés), este está definido como: El surgimiento de dolor como consecuencia directa de una lesión o discapacidad que afecta el sistema somato-sensorial del sistema nervioso a nivel periférico o central.

En este caso el dolor deja de ser una señal fisiológica asociada a la búsqueda de protección, perdiendo su condición adaptativa, para convertirse en un estado patológico, que involucra una serie de elementos que facilitan su generación y persistencia en el tiempo.

El dolor neuropático presenta una variedad de síntomas y puede percibirse como una sensación quemante, persistente y/o lancinante (Chong, 2003), que frecuentemente está asociado a signos sensoriales como la alodinia (respuesta nociceptiva ante un estímulo inocuo) o la hiperalgesia (reacción exagerada ante un estímulo nocivo) (Baron, 2006; Cruciani, 2006). También pueden observarse la presencia de signos sensoriales anormales de tipo espontáneo o evocado, tales como disestesias (sensaciones anormales y displacenteras) y parestesias (sensaciones anómalas no desagradables) (Attal, 1999; Baron, 2006). Dichas características se originan por la presencia de sensibilización a nivel de las fibras aferentes primarias (sensibilización periférica) o a nivel del asta dorsal de la médula espinal (sensibilización central). Estos fenómenos son consecuencia de una estimulación nociva repetida que genera un aumento en la actividad espontánea, una disminución del umbral de activación y un incremento en la respuesta a estímulos subsecuentes (Latremoliere, 2009). Por lo que supone modificaciones de la fisiología normal de las neuronas que integran la vía de transmisión nociceptiva y que operan tanto a nivel periférico, como central.

3.6) Clasificación del dolor neuropático

Con base en la localización anatómica de la lesión o enfermedad, las neuropatías pueden dividirse en aquellas que son periféricas o centrales. El término periférico indica cambios en la excitabilidad de nervios periféricos y en ganglios de raíz dorsal, mientras que el término central se refiere a cambios en la excitabilidad que afecta las vías somato-sensoriales centrales a nivel del asta dorsal de la médula espinal, en el tallo cerebral y en el cerebro. Los mecanismos fisiopatológicos presentes a nivel del sistema nervioso se presentan en el **Cuadro 2.**(Magrinelli et al. 2013).

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor neuropático en roedores

Cuadro 2 Cambios en los mecanismos fisiopatológicos a nivel del sistema nervioso.

Nivel del sistema nervioso	Mecanismos fisiopatológicos
SNP	
Nervio periférico	<ul style="list-style-type: none"> ▶ La liberación de mediadores relacionados con el dolor (BK, PG, His, TNF-α, IL, ATP, algunos iones). ▶ La regulación al alza de los TRP en las fibras C no lesionadas. ▶ La desregulación de la síntesis o el funcionamiento de los canales Na_v. ▶ La desregulación de la síntesis o el funcionamiento de los canales de K⁺ y Ca²⁺.
Ganglio de la raíz dorsal	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Aumento de la actividad en los ganglios de la raíz dorsal. ▶ Infiltración de macrófagos activados en los ganglios de la raíz dorsal. ▶ Aumento de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en los ganglios de la raíz dorsal.
SNC	
Neuronas de la médula espinal	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Reorganización funcional (neuroplasticidad) del asta dorsal en neuronas nociceptivas. ▶ Aumento de la liberación de glutamato y la sustancia P ▶ Aumento de la expresión de Na_v en el asta dorsal neuronas de segundo orden. ▶ Aumento de la actividad en los canales de calcio dependientes de voltaje. ▶ Sensibilización de la actividad de los TRP. ▶ Cambios intracelulares inducidas por la activación de los receptores NMDA o de otros receptores (receptores metabotrópicos de glutamato) por los aminoácidos excitatorios liberados.
Tallo cerebral (sistema descendente de control del dolor)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ La pérdida de función en vías opioidérgica, serotoninérgica y noradrenérgica descendente inhibitoria. ▶ Los cambios en el control de modulador de las vías nociceptivas
Cerebro	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Reorganización funcional de neuronas nociceptivas (neuroplasticidad) del tálamo y la corteza (prefrontal y somatosensorial)

Abreviaturas: ATP, adenosina-5'-trifosfato; BK, bradiquinina; CNS, sistema nervioso central; His, histamina; IL, interleucina; Na_v, canales de sodio dependientes de voltaje; NMDA, N -metil-D-aspartato; PG, prostaglandina; SNP, sistema nervioso periférico; SNC, sistema nervioso central; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; TRP, receptor de potencial transitorio.

3.7) Causas

Condiciones comunes asociadas al dolor neuropático incluyen, el dolor de espalda, la neuralgia del trigémino (Zakrzewska, 2002), la neuropatía diabética (Wilson, 1999), la neuralgia post-herpética (Sabatowski et al. 2004, Mielke et al. 2005), el dolor neuropático inducido por radiación y quimioterapia (Caraceni et al. 2004; Rajagopal et al. 2004; Staats et al. 2004), radiculopatía dorsal, lesión nerviosa periférica.

El dolor neuropático central se debe a una lesión o enfermedad de la médula espinal, el tallo cerebral o el cerebro, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversa y neuromielitis óptico (Watson, 2016). Por el contrario, la patología de la periferia está referida a aquellos trastornos que causan dolor neuropático que predominantemente envuelve las fibras C no mielinizadas y las fibras mielinizadas $\alpha\beta$ y $\alpha\delta$ (Dworkin et al. 2007). El dolor neuropático periférico es probablemente más común debido al envejecimiento de la población mundial, el aumento de la incidencia de la diabetes mellitus, las tasas crecientes de cáncer y las consecuencias de la quimioterapia, que afectan a todas las fibras sensoriales (fibras $\alpha\beta$, $\alpha\delta$ y C).

3.8) Mecanismos en la modulación del dolor neuropático

Los mecanismos que contribuyen a la generación y mantenimiento de dolor neuropático son múltiples, tienen diferente duración y ocurren a diferentes niveles del sistema nervioso periférico y del sistema nervioso central (Woolf, 1999). En la **Figura 3** se muestran de manera general los cambios a nivel de mecanismos neurales por los cuales se detectan los estímulos nocivos.

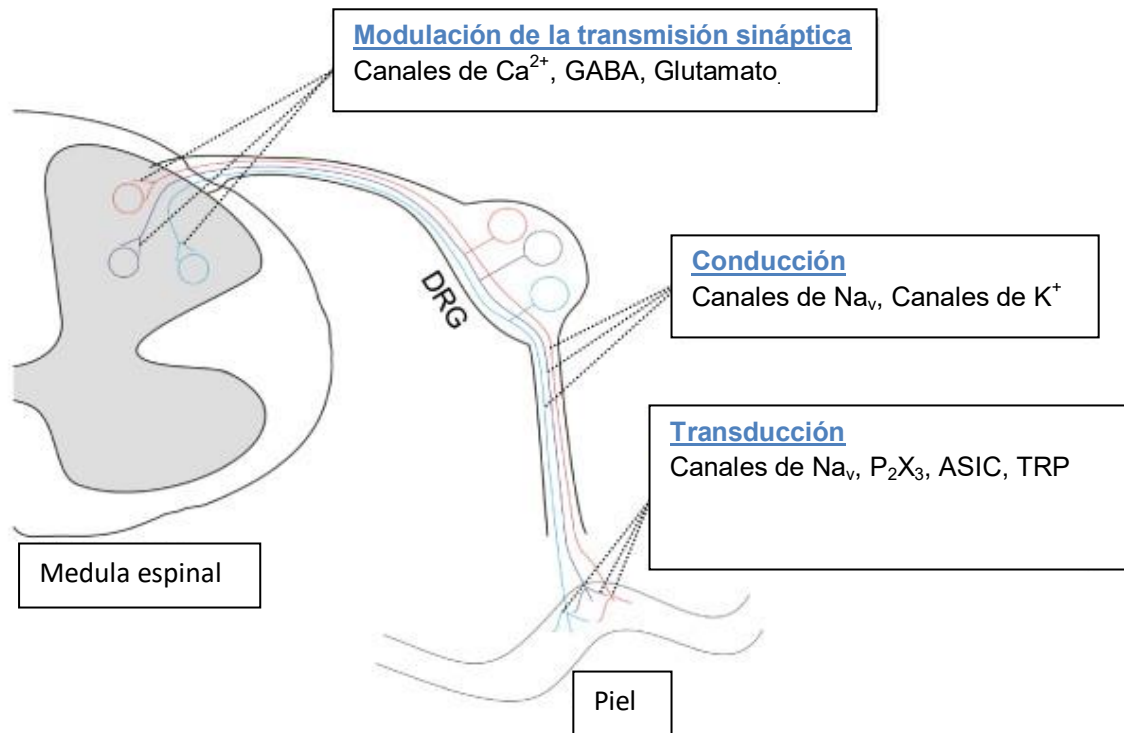


Figura 3 Modulación de algunas vías del dolor neuropático.

Tomado y Modificado de Woolf, 2009.

La neuropatía periférica altera las propiedades eléctricas de nervios sensoriales, lo que conduce a desequilibrios entre la señalización central excitatoria e inhibitoria, de manera que las inter-neuronas inhibitorias y el sistema de control descendente están deteriorados. A su vez, la transmisión de señales sensoriales y los mecanismos de excitación están alterados a nivel de las neuronas del cuerno dorsal de la médula espinal. Estos cambios desplazan las vías sensoriales a un estado de hiper-excitabilidad y a una secuencia de cambios en el tiempo señalización de la periferia al cerebro.

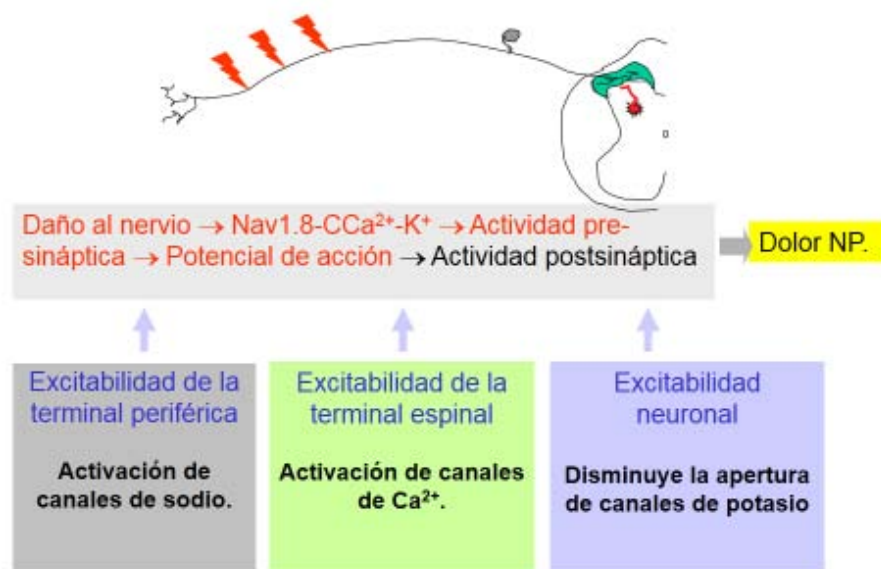
Abreviaturas: Na_v , canales de sodio dependientes de voltaje, ASIC canales iónicos sensibles a ácidos, P_2X_3 receptor purinérgico que se activa por adenosina-5'-trifosfato, TRP canales de potencias transitorio, GABA ácido γ -aminobutírico.

3.8.1) Mecanismos en la modulación a nivel periférico

Los mecanismos periféricos que contribuyen a la generación y mantenimiento de dolor neuropático que han sido mejor descritos hasta el momento incluyen la alteración de canales iónicos o de primer orden y las alteraciones neuronales o de segundo orden.

3.8.2) Alteraciones del canal iónico o alteraciones neuronales nociceptivas de primer orden

Las alteraciones en este nivel incluyen la generación de descargas ectópicas resultando en dolor del área afectada. (Ochoa et al. 1982; Seltze et al. 1991), como resultado secundario se presentara un incremento y redistribución de canales de sodio (Nav 1.7, Nav_v 1.8, Nav 1.9) (O'Banion, 1999), así como también un aumento en la expresión en la neurona aferente primaria de: adrenoreceptores, receptor purinérgico P₂X₃ que se activa por ATP, receptor de prostaglandina E acoplado a proteína G (PE), receptor de factor de crecimiento nervioso (NFG), sobreexpresión de canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC), receptor tirosina cinasa A (TrkA), sustancia P (Woolf, 1999). También se ha sugerido la participación otros canales iónicos como son los receptores de potencial transitorio (TRP) que favorecen la entrada de Ca²⁺ al interior de la célula. Se sabe que el aumento de la función de los receptores TRPA1, TRPV1 y TRPV4 presentes en la membrana plasmática de los nociceptores aumenta la percepción de estímulos nocivos (Alessandri-Haber et al. 2008; Shields et al. 2010; Lee-Kubli et al. 2014). En la **Figura 4** se muestran las alteraciones en canales iónicos dentro de un nervio afectado, lo que altera también la señalización sensorial, todos estos cambios son debido a una reorganización de la plasticidad de la fibra (Bridges et al. 2001).



NP: Neuropático

Figura 4 Alteraciones de canal iónico

3.8.3) Mecanismos en la modulación a nivel central o Alteraciones neuronales nociceptivas de segundo orden

A nivel central, la sensibilización que ocurre en el asta dorsal de la médula espinal es un evento que se considera indispensable para la generación del dolor neuropático (Wu, 2009). Durante la sensibilización central se da la fosforilación del receptor (NMDA) N-metil-D-aspartato y del receptor (AMPA) ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico. Al ser fosforilados incrementan su distribución y se trasladan de depósitos intracelulares hacia el espacio sináptico. Una vez en la membrana, el aumento en los potenciales de acción incrementa la sensibilidad al glutamato y el flujo de Ca^{2+} en dichos receptores. Esto origina un aumento en la excitabilidad de las células, una reducción del umbral de activación y cambios en la respuesta normal de las diferentes fibras nociceptoras ($A\beta$, $A\delta$ y C) pues ahora responden ante estímulos normalmente inocuos (alodinia), mientras que responde exageradamente ante estímulos nocivos (hiperalgesia) (Woolf, 2004). Estas fibras sensibles son las encargadas de activar a las neuronas nociceptivas de segundo orden que transmiten la información sensorial al cerebro y modulan las respuestas descendentes, las cuales expande sus campos receptivos para que un determinado estímulo las excite, generando así la denominada sensibilización central.

La sensibilización es debida, al menos en parte, a la exposición a mediadores pro-nociceptivos en la zona de daño (Baron, 2000). Por ejemplo, en estudios experimentales en ratas, se ha determinado un incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONs), y es de suponer que también del óxido nítrico (ON), en modelos de dolor neuropático (McHugh, 2000), alcanzándose un efecto anti-nociceptivo con inhibidores de esta enzima (Mayer et al. 1999; Tassorelli et al. 2006). En apoyo a esto, el uso de precursores del ON (L-arginina y nitroprusiato de sodio), demostraron que potenciaban la hiperalgesia y la alodinia en ratas con neuropatía (Naik et al. 2006). La acción propuesta para el ON a nivel espinal es que funciona como un transmisor retrogrado que incrementa la liberación de neurotransmisores (Woolf, 1999) y que ejerce control post-sináptico de canales iónicos (Callsen et al. 1999).

Aunado a esto, hay una reducción en el mecanismo de inhibición espinal a través de la disminución de la liberación de GABA y opioides endógenos desde la inter-neuronas inhibitoras que inervan la terminal central de las fibras aferentes primarias, lo que facilita el incremento de la transmisión del dolor (Tesfaye et al. 2013; Lee-Kubli et al. 2014). Asimismo, la modulación descendente del dolor resulta afectada (Morgado et al. 2011). Las vías descendentes inhibitoras que involucran la liberación de, noradrenalina y péptidos opioides endógenos se ven severamente disminuidas (Ossipov et al.

2010), mientras que las vías descendentes facilitadoras que promueven el dolor a través de la liberación de serotonina aumentan a través de los receptores de serotonina 5-HT₂ y 5-HT₃ (Amaya-Castellanos et al. 2011; Godínez-Chaparro et al. 2011; Bravo-Hernández et al. 2012). En resumen, los receptores TRP y las vías serotoninérgicas, opioidérgicas, GABAérgicas y del óxido nítrico juegan un papel importante en la modulación del dolor neuropático. Lo que explica por qué muchos de los fármacos actualmente empleados para el tratamiento de este tipo de dolor tienen estas vías como dianas terapéuticas.

3.9) Tratamiento del dolor neuropático

Se han propuesto numerosas recomendaciones terapéuticas para el dolor neuropático con diferentes clases de fármacos, algunos análisis y guías recientes indican el medicamento que debe ser el utilizado en el tratamiento de primera, segunda y tercera línea para tratar el dolor neuropático (Collins et al., 2000; Edwards et al. 2008; Max et al. 1992). A pesar de esto, el tratamiento de la neuropatía sigue siendo un reto en el entorno real, ya que los pacientes con neuropatía por lo general requieren más medicamentos y reportan menos alivio del dolor que aquellos con dolor nociceptivo.

Las razones para obtener estos resultados no satisfactorios en el tratamiento de la neuropatía, incluyen la prescripción de fármacos sin eficacia probada en dolor neuropático o el uso de fármacos eficaces en neuropatía, pero a dosis insuficientes, así como los efectos secundarios, que son causa frecuente para detener el tratamiento (Ziegler, 2006). A pesar de la disponibilidad de varios fármacos, no más de 30% a 50% de los pacientes lograr una respuesta satisfactoria.

Entre las numerosas recomendaciones existentes estas incluyen antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptura de serotonina-norepinefrina, fármacos antiepilépticos activos en los canales de sodio y los canales de calcio (ligandos $\alpha_2\text{-}\delta$), opiáceos, pomadas a base de capsaicina y lidocaína, así como fármacos donadores de óxido nítrico. Estos tres últimos han mostrado en estudios preliminares ser efectivos en aliviar la neuropatía (Yuen et al. 2002; Barbano et al. 2004; Edwards et al. 2008). La actualidad exige el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del dolor neuropático y es necesario considerar el gran potencial que existe en el uso de productos de origen natural para este fin.

En el **Cuadro 4** ubicado en el **Anexo I** se resumen los tratamientos existentes para el tratamiento del dolor neuropático.

3.10) TRPV1

3.10.1) Distribución en tejidos, propiedades generales

Los canales iónicos son proteínas transmembranales encargadas de controlar el paso de iones a través de la membrana de toda célula viva, actuando como compuertas que se cierran o se abren en respuesta a determinados estímulos. Los canales iónicos TRP fueron descritos por primera vez en 1989 en *Drosophila melanogaster* (Montell, 1989) Actualmente, la familia de canales TRP contiene siete divisiones: TRPC (canónica), TRPM (melastatina), TRPV (vanilloide), TRPA (anquirina), TRPN (mecanorreceptor), TRPP (policistina) y TRPML (mucolipina). La subfamilia TRPV comprende actualmente seis miembros (TRPV1-TRPV6). El miembro más estudiado de esta subfamilia es TRPV1, y no fue hasta 1997 cuando TRPV1, uno de los miembros de la familia de canales de TRP, fue clonado y se demuestra que responde a una variedad de estímulos (Ramsey IS, 2006; Nilius, 2005). Tales como capsaicina, el ingrediente picante principal de los chiles, pH bajo (Caterina, 1997), altas temperaturas, reguladores proinflamatorios e inflamatorios y otros compuestos pungentes como la piperina (McNamara, 2005).

El receptor vanilloide TRPV1 es un canal catiónico que contienen seis dominios transmembrana que se reúne como homotetramérico y regiones amino y carboxilo terminales intracelulares. (Jordt, 2000), donde cada uno contribuye al poro conductor de iones y al filtro de selectividad. Los segmentos transmembranales cinco (S5) y seis (S6) de cada subunidad (**Figura 5**), junto con el asa que los conecta, dan lugar al poro o vía de conducción iónica, Al igual que los otros canales TRP, el TRPV1 es un canal catiónico no selectivo expresado predominantemente en todos los ganglios sensoriales (ganglio de razi dorsal DRG, ganglios trigeminales TG, Torácico Vagal) y en fibras sensorial primarias nociceptivas C y A δ , (Szallasi, 2005). TRPV1 también se encuentra en la Sistema Nervioso (SNC) y en tejidos no neuronales tales como queratinocitos, mastocitos, cabello Folículos, músculo liso, vejiga, hígado, riñón, bazo y pulmones (Inoue, 2002; Biro, 2006)

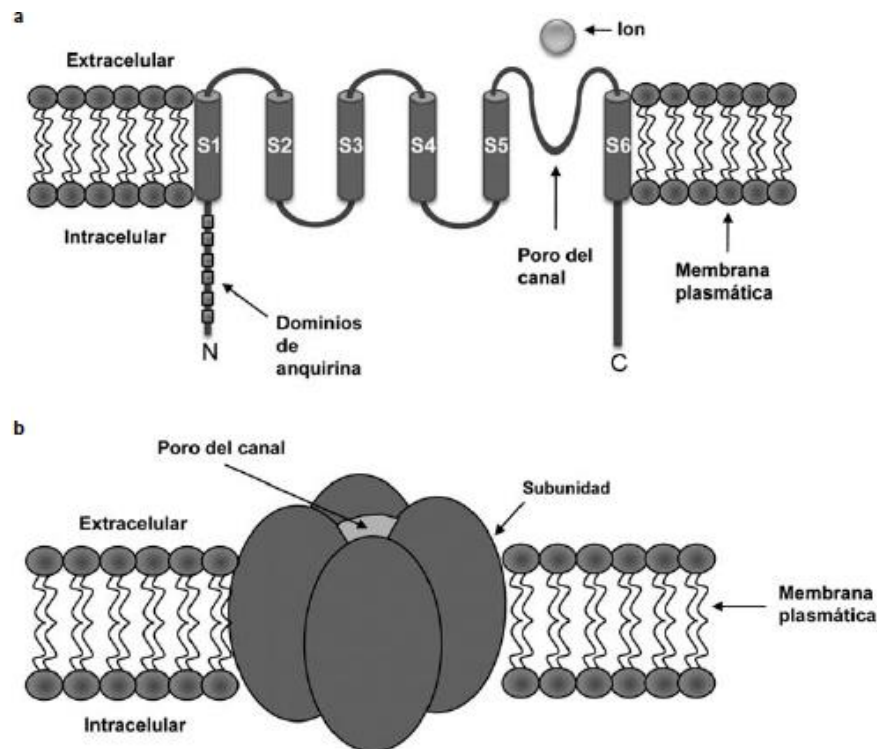


Figura 5 Topología del canal TRPV1.

Tomado de Salazar H, 2009.

a: Esquema de una subunidad del canal TRPV1; cada subunidad se compone de seis segmentos transmembranales (S1-S6) y regiones amino-terminal (N) y carboxilo-terminal (C) intracelulares. Los segmentos S5 y S6 y el asa que los conecta dan lugar al filtro de selectividad y al poro del canal. La región N-terminal contiene seis dominios de unión a anquirina (mostrados como cuadros).

b: El canal funcional forma un tetrámero compuesto de cuatro subunidades como las que se muestran en la figura anterior.

3.10.2) Activadores TRPV1

a) Capsaicina

TRPV1 se considera como un objetivo del estudio del dolor, durante los últimos años, se han observado potentes agonistas de TRPV1, lo que ha autenticado a TRPV1 como un objetivo para el tratamiento del dolor, el ejemplo más claro es la capsaicina que ha demostrado causar la desensibilización de los canales TRPV1 aliviando los síntomas dolorosos en ciertas condiciones (dolor posquirúrgico, neuralgia postherpética, dolor en la neuropatía diabética, osteoartritis) lo que lo convierte en un objetivo prometedor para los fármacos que alivian el dolor (Jung, 1999).

b) Protones y óxido nítrico

El pH ácido extracelular aumenta la sensación de dolor durante la inflamación en fibras A δ y C, la activación de los ASIC y TRPV1 se asocian con una variedad de condiciones relacionadas con el dolor (Nagae et al. 2007). TRPV1 está activado por la reducción del pH extracelular. Lo que sensibiliza al canal provocando que el canal pueda abrirse a temperatura ambiente.

TRPV1 es activado por ON a través de la modificación de cisteínas en la secuencia primaria de la proteína. Estos datos sugieren un papel de TRPV1 como un sensor de integración de señales de ON (Yoshida et al. 2006). La enzima responsable de la síntesis de ON (ONs), es activada por el calcio intracelular por lo que la activación de TRPV1 por ON podría entonces resultar en un mecanismo de regulación de retroalimentación entre la activación del canal, la entrada de calcio y la producción de ON (Moncada, 1997). Esto podría resultar en una mayor producción de ON bajo condiciones en las que se estimula inicialmente la síntesis de ON.

c) Calor

TRPV1 funciona como un termómetro molecular, la presencia de TRPV1 en las terminales nerviosas libres en la piel nos permite detectar temperaturas nociceptivas (>43°C) y por lo tanto una sensación de dolor. Las altas temperaturas no sólo producen una sensación de dolor mediante la activación del canal TRPV1, sino que aumentan la sensibilidad del canal a otros estímulos y, por tanto, su actividad, lo que facilita la activación de las terminaciones nerviosas donde se expresa y promueve la liberación de neuropéptidos proinflamatorios (Biro et al. 2006).

3.10.3) Desensibilización o taquifilaxis de TRPV1

El fenómeno de la desensibilización por vanilloides en las neuronas sensoriales se describió por primera vez en 1949 por Nicholas Jancso (Jancson, 1957).

Existen dos tipos de desensibilización descrita para los canales TRPV1. El primer tipo es la aguda, la cual se caracteriza por una rápida pérdida de la función del receptor en la presencia del agonista. El segundo tipo es la taquifilaxis, que se evidencia por la disminución progresiva en la corriente debido a una administración repetida del agonista (Porszasz, 1959).

La desensibilización aguda de TRPV1 refleja un cambio conformacional inducido por agonistas, que da como resultado el cierre del poro del canal. La desensibilización aguda es un proceso dependiente de la presencia de calcio intracelular y puede inhibirse mediante la aplicación de secuestradores de este

ion (Schwarz, 2000). Cuando la capsaicina se une al canal, éste se abre y permite la entrada de calcio al interior de la célula. El calcio que ingresa interactúa con la calmodulina, activándola. Esta calmodulina, que funciona como una subunidad accesoria del TRPV1, se asocia con el canal y promueve un cambio conformacional que produce el cierre del receptor (Rosenbaum, et al. 2004). La taquifilaxis, por otra parte, involucra el paso del canal entre estados en reposo o activos a estados intermedios no conductores (Liu, 1996). Por ello, la taquifilaxis se considera como la recuperación del TRPV1 desde estados intermedios no conductores al estado en reposo desde el cual el canal es capaz de activarse de nuevo.

3.10.4) Moduladores TRPV1

La acción de diversos moduladores sobre la actividad del canal TRPV1, promueven respuestas a la inflamación y al dolor. Algunas de las vías utilizadas por los moduladores TRPV1 para regular sus regiones donde interactúan se presentan en la **Figura 6**.

Entre las vías más importantes de modulación se encuentran los procesos de:

1.- Fosforilación y desfosforilación los cuales son cruciales para la función TRPV1. Estos se ejemplifican por el papel de la Proteincinasa C (PKC), Proteincinasa A (PKA) (Bhave, 2003), y por las acciones de calmodulina dependiente cinasa CaMKII, que regula la actividad de TRPV1 a través de la fosforilación de dos residuos (Bhave, 2002).

En las neuronas nociceptivas, la activación de fosfolipasa C (PLC) acoplada a receptores de agentes proinflamatorios tales como ATP, NGF, His o quimiocinas, sensibiliza a TRPV1 (Stein, 2006). Este fenómeno subyace en un aumento de la sensibilidad al estímulo doloroso después de una lesión o inflamación.

2.- La actividad de TRPV1 también es modulada por el lípido regulador, fosfatidilinositol-4,5- difosfato (PIP₂) que resulta de la activación de fosfolipasas como PLC (Liu, 2005).

3.- Los efectos de los mediadores inflamatorios en TRPV1 surgen de una variedad de señales intracelulares. Las tirosina cinasas (TK) y receptores acoplados a proteínas Gs y Gq son capaces de modular TRPV1, permitiendo que esté sensibilizado a cualquier estímulo (Bhave, 2002; Rathee, 2002). Algunos de los efectos de agentes inflamatorios en TRPV1 dependen de la fosforilación de canal a través de la PKC o PKA (Bhave, 2002; Mohapatra, 2005). Las prostaglandinas (PG), como PGE₂, aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y por lo tanto activa a la PKA, que fosforila directamente el canal (Bhave, 2002). Residuos localizados en el

extremo N-terminal de TRPV1 (Ser 116 y Thr 370) son fosforilados por PKA y han sido implicados en la desensibilización (Bhave, 2002; Mohapatra, 2005). Mientras que los residuos Thr 370 y Ser 502 han sido implicados en la sensibilización de TRPV1, en respuestas evocadas por calor cuando son fosforilados por PKA (Rathee PK et al. 2002). Este último efecto sugiere un papel importante de la PKA en el desarrollo de la hiperalgesia térmica.

4.- El canal TRPV1 es regulado por diversas cascadas de señalización. Muchos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son activados por agentes proinflamatorios, como las PG y la His. La activación de receptores acoplados a proteínas G_s activa la adenilato ciclasa (AC) y por tanto, la PKA fosforila directamente al TRPV1 modulando su actividad. Por otro lado, tanto la activación de receptores acoplados a proteínas G_q , como del receptor del NGF promueve la estimulación de la PLC, la cual libera de la membrana celular al 1,2-diacilglicerol (DAG) y al (1,4,5)-inositoltrifosfato (IP_3). El IP_3 desencadena la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). El Ca^{2+} y el DAG activan la PKC, la cual fosforila al canal TRPV1 y regula su función. El aumento en el Ca^{2+} intracelular también regula la actividad del canal mediante la unión de Ca^{2+} a la CaMKII, que se asocia con el TRPV1 y promueve la desensibilización del canal. Al activarse el TRPV1, entra Ca^{2+} al espacio intracelular, lo cual puede llegar a despolarizar a la célula lo suficiente como para activar los canales de sodio dependientes de voltaje (CSAV), iniciándose la descarga de potenciales de acción y la transmisión de las señales de dolor al SNC. Otra consecuencia de la despolarización de la membrana es la activación de canales de calcio activados por voltaje (CCAV), que pueden aumentar la concentración de calcio intracelular a niveles suficientes como para promover la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos (Salazar, 2009).

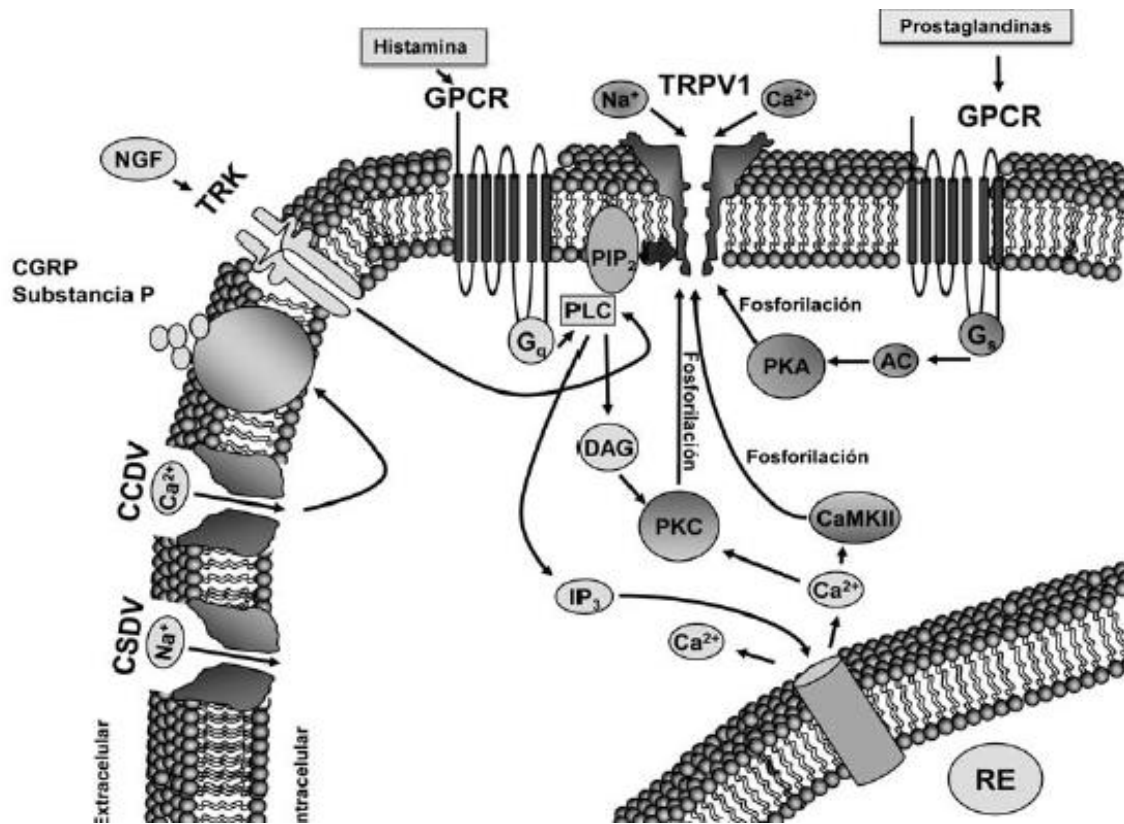


Figura 6 Moduladores de la actividad del canal TRPV1.

Tomado de Salazar H, 2009

Abreviaturas: TRPV1 receptores de potencial transitorio vanilloide subfamilia 1, NGF factor de crecimiento nervioso, TRK receptor tirosina cinasa, PKC Proteincinasa C, PKA Proteincinasa A, CaMKII Calmodulina dependiente cinasa, GPCR Receptor de prostaglandina, PLC Fosfolipasa C, PIP2 Fosfatidilinositol-4,5-difosfato, AC Adenilato ciclasa, DAG 1,2-diacilglicerol, IP_3 (1,4,5)-inositoltrifosfato, RE Retículo endoplásmico, CSAV Canales de sodio dependientes de voltaje, CCAV Canales de calcio activados por voltaje, CGRP Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

3.11) Alcamidas

Las alcamidas están distribuidas a lo largo del reino vegetal y están constituidas por la unión de un ácido graso de cadena mediana a larga que puede ser de ocho a dieciocho carbonos generalmente alifática o lineal, unida a una amina proveniente de algún aminoácido. Dependiendo del número de enlaces o dobles ligaduras que presenten, las alcamidas se han dividido en dos grupos principales: alcamidas olefínicas, que tienen sólo dobles ligaduras, y alcamidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura (Molina et al. 1999), y las que presentan anillos homo o heterocíclicos que se observan principalmente en la familia *Piperaceae* (Parmar et al. 1997).

Actualmente se han logrado aislar más de 300 alcamidas como productos naturales. Las fuentes más comunes de estas, son las plantas pertenecientes a las familias *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Rutaceae* y *Piperaceae* (Boonen et al. 2012). Cada una de estas familias tiene características individuales pero es interesante que sus moléculas bio-activas presenten estructuras químicas relacionadas. Las alcamidas aisladas de la familia *Piperaceae* se caracterizan por la presencia de un anillo aromático unido a una cadena de ácido graso insaturada la cadena del ácido graso que puede ir desde C₃ hasta C₁₆ (Rao et al. 2011).

Las alcamidas son consideradas compuestos bioactivos que presentan un amplio espectro de actividades biológicas tanto en plantas como en animales. Sus propiedades más destacadas son como insecticidas (Ramsewak et al. 1999; Saadali et al. 2001), antimaláricos (Ross et al. 2005; Sailaja, 2006, Bae et al. 2010), antibacterianos (Michalet et al. 2007; Zacares et al. 2007), analgésicos, antiinflamatorios y antioxidantes (Dalby-Brown et al. 2005). A pesar de las diversas actividades biológicas que presentan las alcamidas, se considera que sus propiedades inmuno-moduladoras y analgésicas son las que les aportan las aplicaciones terapéuticas más importantes (Rios, 2014).

3.12) *Piper nigrum*

Piper nigrum o Pimienta Negra, es un miembro de la familia *Piperaceae*. El género *piper* tiene más de 1000 especies, pero las especies más conocidas son *P. nigrum*, *P. longum* y *P. betle*. La Pimienta negra puede usarse para diferentes propósitos tales como dietas humanas, medicina, conservador, agentes de control biológico y su fruto como especia o condimento (Dalby-Brown et al. 2005; Michalet et al. 2007; Zacares et al. 2007).

La planta de pimienta negra es una planta que crece hasta 4 metros de altura en los árboles con un tallo ovalado liso, leñoso, con articulaciones, hinchazón cerca de las articulaciones y ramas, es una enredadera, las hojas son enteras, ampliamente ovadas, acuminadas, coriáceas, lisas, con siete nervios, de color verde oscuro y unidas por la envoltura fuerte como el pie de los tallos a las articulaciones de las ramas, de 5 a 10 centímetros de largo y de 3 a 6 centímetros de ancho. Las flores son pequeñas blancas, sésiles, producidas en forma de espigas pendulares 4 a 8 centímetros de largo, frutos carnosos que regularmente no se abren, pequeños, redondos de color negro cuando secos y aromáticos. Cultivares de *P. nigrum* crecen en regiones tropicales y subtropicales (Jaramillo, 2001).



Figura 7 Hoja y frutos de *P.nigrum*.

3.12.1) Farmacología de *P.nigrum*

Los granos de pimienta negra así como su aceite esencial, se caracterizan como remedios en la medicina para tratar los problemas asociados con el sistema digestivo, en particular para erradicar los gusanos parásitos. Se ha utilizado para ayudar a la digestión, mejorar el apetito, tratar la tos, los resfriados, la respiración y problemas cardíacos, cólicos, diabetes, anemia. Las dolencias estomacales como dispepsia, flatulencia, estreñimiento y diarrea. (Stöhr et al. 2001) Para el dolor de muelas, y una infusión de pimienta negra se ha sugerido como un remedio para la garganta dolorida y la ronquera. La pimienta negra puede ser masticada para reducir la inflamación de la garganta. Se ha reportado también su uso en Inflammaciones osteo-articulares, contracturas musculares (Correa et al. 2010; Rao et al. 2011; Tang et al. 2011).

3.12.2) Composición química

Se han extraído Piperamidas de *P. nigrum*, las cuales han mostrado diferentes actividades. Dos importantes sesquiterpenos han sido identificados, β -cariofileno y nerolidol como metabolitos, siendo el primero reportado con actividad anestésica y el segundo reportado con actividad pesticida contra varios ácaros. Otro Agente activo aislado del aceite volátil del grano de pimienta conocido como pipeno que es un importante odorante. Entre otras sustancias extraídas se encuentran Piperaminas, Piperetina, Pipericida, Piperina, Piperoleina B, Tricostaquina, Sarmentina, Sarmentosina.

Otros compuestos aislados de esta especie incluyen fenoles, diversos derivados de lignanos, terpenos, flavonoides, alcaloides y esteroides.

3.13) Piperina

Las especies del género *Piper* pertenecientes a la familia *Piperaceae* se han usado en China, India y América Latina dentro de la medicina tradicional como sedantes, analgésicos, para el tratamiento del reumatismo, artritis y mordidas de serpiente (Correa et al. 2010; Rao et al. 2011; Tang et al. 2011). Estudios *in vitro* con extractos de diferentes partes de las plantas del género *Piper* sugieren una actividad antiinflamatoria por la inhibición de dos enzimas proinflamatorias, la ciclooxigenasa-1 y la 5-lipooxigenasa (Stöhr et al. 2001). *Piper nigrum* y *Piper longum* son consideradas las especies más importantes dentro de éste género y la piperina es el principal compuesto en los frutos de ambas especies.

La piperina es el principal componente bio-activo de la pimienta negra, que imparte sabor picante y sabor penetrante a ella. La molécula de piperina es un alcaloide de origen natural constituida, principalmente de un anillo de piperidina, con dos grupos éter y un grupo amida N,N di-sustituido, además la piperina es una alcanida con estructura parecida a capsaicina que le confiere comportamiento similar a ésta y es capaz de activar al receptor TRPV1 por un mecanismo muy parecido (Rahman, 2010) basado en la activación del receptor TRPV1 localizado en las fibras nociceptivas C y A δ (Kissin, 2008).

Se cree que la unión de piperina con el receptor TRPV1 promueve la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ provocando esto que se module la fosforilación del receptor TRPV1 por medio de las PKC, PKA y CaMKII, lo cual genera la sensibilización del canal y favorece su estado activado, induciendo así que las neuronas sensoriales permanezcan en un estado de despolarización y por consecuencia tengan un umbral de respuesta disminuido y esto a su vez genere la liberación de neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) que conlleva a un estado inicial de hipersensibilidad y

dolor (Chung et al. 2008). El efecto analgésico que procede a éste paso inicial se explica debido a que el influjo agudo de cationes derivado de la activación del receptor TRPV1 es suficiente para activar la vía de la calcineurina (Patwardhan et al. 2006; White, 2008). La calcineurina produce el efecto contrario a las proteincinasas, desfosforilando el receptor TRPV1 y por lo tanto desensibilizándolo y reduciendo su actividad (Por et al. 2012). Un posible mecanismo adicional es que la activación súbita del receptor TRPV1 conlleva a una depleción de los neurotransmisores en las terminales de las fibras aferentes primarias (Sanatombi, 2008). En conjunto, ambos mecanismos llevarían en consecuencia a la desensibilización de las fibras nociceptivas impidiendo su función adecuada e interrumpiendo el procesamiento nociceptivo hacia centros superiores.

En estudios recientes se ha comparado el efecto anti-alodínico de la capsaicina con la piperina, demostrando una mayor potencia de la capsaicina, sin embargo, la piperina posee mayor eficacia para activar al receptor TRPV1 que la capsaicina, hecho que favorece una desensibilización más rápida del receptor TRPV1 en respuesta a piperina en comparación con capsaicina (Szallasi, 2005). Estos datos sugieren que la piperina es posiblemente una herramienta útil en el tratamiento del dolor de diferente etiología. En relación a esto, estudios previos demostraron que la piperina produce efectos antirreumáticos y antiinflamatorios en modelos animales de artritis (Bang et al. 2009) y también produce efecto anti-nociceptivo en un modelo dolor visceral inflamatorio en ratones (Salam et al. 2007).

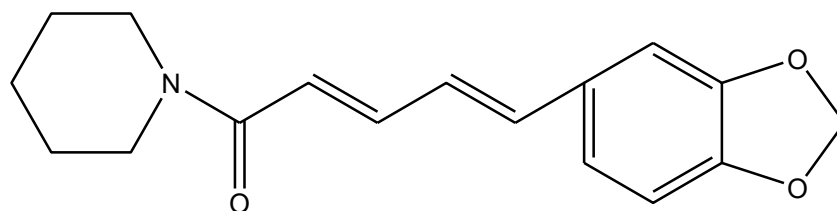


Figura 8 Molécula de piperina

4.) Planteamiento del problema

La Academia Americana de Manejo del Dolor (2011) reporta que aproximadamente 50 millones de personas viven con dolor neuropático crónico, mientras que aproximadamente 25 millones padecen de dolor neuropático agudo. Entre las causas de dolor más comunes se encuentran la Artritis, dolor de espalda baja, Diabetes, Cáncer.

Existen guías para la medicación que debe ser utilizada en el tratamiento del dolor neuropático, pero a pesar de todos los tratamientos existentes estos siguen siendo ineficaces, no específicos y con efectos secundarios severos. A pesar de la disponibilidad de varios fármacos, no más de 30%-50% de los pacientes logran una respuesta satisfactoria (Collins et al. 2000; Ziegler, 2006; Hamidi et al. 2006; Edwards et al. 2008).

La falta de un tratamiento eficiente y único para el dolor neuropático, exige la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para su tratamiento. En este sentido, el uso de la medicina tradicional, sugiere un gran potencial terapéutico. Sin embargo, en la actualidad, la capsaicina es la única alcaloide con un uso terapéutico para el tratamiento del dolor. Desafortunadamente, el efecto analgésico de la capsaicina es precedido por una serie de efectos indeseables no placenteros como lo es la sensación de ardor, picazón e irritación, limitando su uso terapéutico.

En México existen más de 4000 plantas registradas como medicinales cuyo potencial terapéutico podría estar siendo desaprovechado en la terapia del dolor, como es el caso de *Piper nigrum*, para la cual se ha demostrado su uso efectivo como sedante, analgésico, antiepiléptico, antiartrítico y para tratar las mordeduras de serpiente (Correa et al. 2010, Rao et al. 2011, Tang et al. 2011).

Actualmente no existen estudios que evalúen el efecto anti-alodínico de la piperina en el dolor neuropático. Por lo que el propósito del presente proyecto pretende determinar la eficacia de la alcaloide piperina para el alivio de la alodinia generada por el dolor neuropático.

5.) Hipótesis

La alcalamida piperina reducirá la alodinia táctil en el modelo de dolor neuropático por ligación de nervios espinales L5 y L6 en ratas, con lo que se espera establecer las bases científicas para considerarla en un futuro como una alternativa terapéutica viable en el tratamiento de la alodinia generada por el dolor neuropático.

6.) Objetivos

6.1) Objetivo general

- Valorar el efecto anti-alodínico de la piperina mediante un modelo experimental de neuropatía periférica producida por la ligación de los nervios espinales (L5 y L6) en rata.

6.2) Objetivos particulares

- Aislar, purificar y caracterizar por métodos espectroscópicos a la piperina a partir de los frutos de *Piper nigrum* en una cantidad suficiente para realizar los ensayos farmacológicos.
- Valorar el efecto anti-alodínico de la alcalamida piperina, administrada intraperitonealmente en el modelo de ligadura de nervios espinales L5 y L6 en rata.

7.) Material y métodos

7.1) Fármacos

Para la administración de la piperina (3.1, 10, 31, 56 y 100 mg/kg) y pregabalina (10 mg/kg) (Sigma-Aldrich) se utilizó como vehículo Tween 80 al 1% en solución salina.

7.2) Material vegetal

La alcaloide piperina fue aislada de semillas comerciales de *Piper nigrum*, en el laboratorio 126 del edificio E de la Facultad de Química, UNAM. Las semillas comerciales de *Piper nigrum* fueron compradas en la central de abastos en Septiembre del 2016.

7.3) Preparación de extracto

Las semillas de *Piper nigrum* (1700g) fueron extraídas cuatro veces consecutivas con seis litros de diclorometano por la técnica de extracción continua en Soxhlet. El disolvente fue evaporado al vacío obteniéndose así el extracto crudo diclorometánico (56g- 3.3%).

7.4) Cristalización de la piperina

Al extracto diclorometánico se adicionaron 15 gotas de éter isopropílico frío para la inducción de la cristalización, se enfrió a -4°C por refrigeración durante 24 h, se filtró al vacío y los cristales se lavaron con éter frío para eliminar coloraciones.

Los cristales fueron recristalizados por par de disolventes con etanol en caliente hasta disolución y poco a poco se adicionó diclorometano hasta turbidez, se adicionaron diez gotas más de éter isopropílico y se enfrió hasta observar abundantes cristales. Se filtró al vacío y los cristales se dejaron secar.

7.5) Purificación de piperina por cromatografía en columna abierta

Todos los cristales colectados fueron pesados, se pusieron en una proporción 1:2 con gel de sílice dentro de un refractario y se adsorbieron con diclorometano hasta la obtención de una pasta.

Posterior a ello, se montó una columna donde se puso gel de sílice en una relación 5:1, inicialmente se obtuvieron cuatro fracciones de 200 mL cada una con hexano, cinco fracciones más con hexano-acetato de etilo (90:10), cuarenta fracciones más con hexano-acetato de etilo (80:20) y tres fracciones más con hexano-acetato de etilo (75:25). El volumen de recambio fue de 500mL.

Cada fracción se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. Se reunieron las fracciones con perfiles cromatógrafos similares. La presencia de piperina fue monitoreada con una muestra auténtica por cromatografía en placa fina. Los cristales de piperina se encontraron en las fracciones 21-42 (hexano:acetato de etilo 80:20), los cuales se analizaron por punto de fusión (P.f.) y comparación física con una referencia.

Se montó una segunda columna sobre el mismo empaque de la primera columna, lavándola primero con acetato de etilo:metanol 7:2, se continuo siguiendo la misma metodología de la primera columna, los cristales de piperina fueron encontrados desde la fracción 40 hasta la fracción 85 (hexano:acetato de etilo 80:20).

7.6) Análisis Resonancia Magnética Nuclear RMN (H^1 , C^{13}) y Difracción de Rayos X de Monocristal

Una muestra (50mg) de la fracción de piperina identificada con cromatografía en capa delgada, se diluyó en cloroformo deuterado y se determinaron sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear de 1H (400 MHz) y ^{13}C (100MHz), en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), en un Espectrómetro de RMN de 9.4 T Marca Varian Modelo VNMRS. Sonda Broad Band Switchable de dos canales de radiofrecuencia ($^1H/^{19}F$) ($^{31}P/^{15}N$). Sonda de Detección Indirecta de dos canales de radiofrecuencia (1H) ($^{31}P/^{15}N$). Sonda Broad Band para RMN de sólidos (4mm) de dos canales de radiofrecuencia ($^1H/^{19}F$) ($^{31}P/^{15}N$).

Para la cristalografía de rayos X se mandaron diez cristales de la muestra de tamaño homogéneo, de forma regular y libre de disolventes. Se utilizó un Difractómetro de rayos X de monocristal Oxford Gemini ($\lambda_{MoK\alpha} = 0.71073$ o $\lambda_{CuK\alpha} = 1.5418\text{\AA}$) con detector de área de 135 mm Atlas, equipado con un sistema criogénico Cryojet.

La estructura química de la piperina se confirmó por los métodos antes mencionados (RMN¹H, RMN¹³C y Difracción Rayos X) y por comparación con los datos descritos en la literatura (Berger, 2009).

7.7) Animales

Para todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho con un peso corporal entre 160 y 200 g. Los animales fueron obtenidos del Centro de Producción Envigo México, S.A. de C.V. y del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento en todos los experimentos. Cada grupo de estudio estuvo formado por al menos seis animales y después de cada experimento los animales fueron sacrificados dentro de una cámara de CO₂. Todos los experimentos siguieron los estándares éticos que delimitan las guías internacionales para la investigación experimental del dolor en animales (Kim & Chung, 1992). Asimismo, se aplicaron los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999), el número de ratas utilizadas por experimento fue el mínimo necesario para tener un análisis estadístico confiable. También se obtuvo la autorización del protocolo experimental por el CICUAL de la Facultad de Química (OFICIO/FQ/CICUAL/199/17) Ver **Anexo II**.

7.8) Inducción del dolor neuropático

La inducción del dolor neuropático se llevó a cabo mediante el procedimiento quirúrgico descrito por Kim y Chung (Kim & Chung, 1992). Bajo condiciones de anestesia general (pentobarbital sódico 50mg/Kg i.p.) los animales se colocaron en una zona adaptada para operación y se expuso la columna vertebral en su zona lumbar, para así seccionar la apófisis lateral correspondiente a L6 y dejar expuestos los nervios espinales izquierdos L5 y L6 que fueron ligados con una sutura de seda 6-0 en la parte distal del ganglio de la raíz dorsal. Sólo se ligaron los nervios del lado izquierdo (**Figura 9**). Para las ratas falsamente ligadas (Sham) no se ligaron los nervios sólo se realizó el procedimiento quirúrgico incluyendo la manipulación de dichos nervios sin dañarlos, se limpió la herida con una solución aséptica de antibenzil para evitar infecciones en la herida. Finalmente se suturo la incisión y los animales se mantuvieron en recuperación durante 20 días. El tamaño de muestra se tomó de acuerdo con Kim, S.H. & Chung, J.M. 1992 (Kim & Chung, 1992).

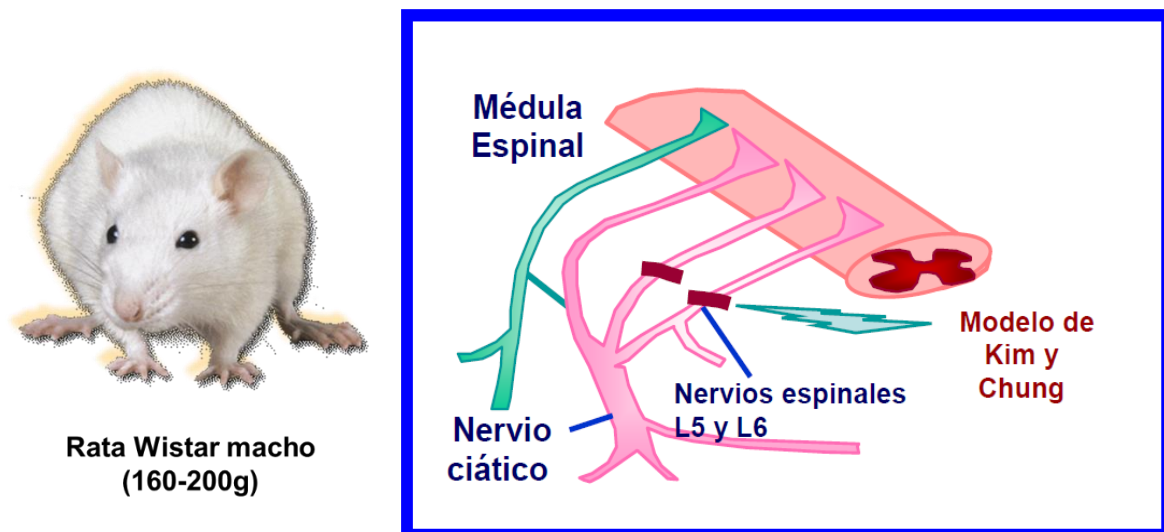


Figura 9 Ligación de nervios L5 y L6.

El nervio ciático de la rata está formado por los nervios espinales (NE) lumbares L4, L5 y L6. Los nervios L5 y L6 suministran los nervios a los músculos que elevan el pie y el dedo gordo del pie, y, en consecuencia, atrapamiento de estos nervios puede conducir a debilidad en estos músculos.

7.9) Determinación de la alodinia táctil

La evaluación de la alodinia se realizó antes y durante 8 h después de la administración de la piperina, administrada por vía intraperitoneal a las dosis de 3.1, 10, 31, 56 y 100 mg/kg, dispersa con Tween 80 al 1 % en solución salina. Se incluyó un grupo control al que sólo se le administró el vehículo y un grupo Sham, ratas falsamente ligadas. Los animales se colocaron de forma individual en cajas de plástico con un fondo de malla metálica durante 30 min para su ambientación (**Figura 10**). La prueba de umbral táctil induce el retiro de la pata izquierda al ser estimulada con los filamentos de von Frey. El área estimulada fue la parte media de la superficie plantar, evitando la almohadilla de la pata (**Figura 11**).

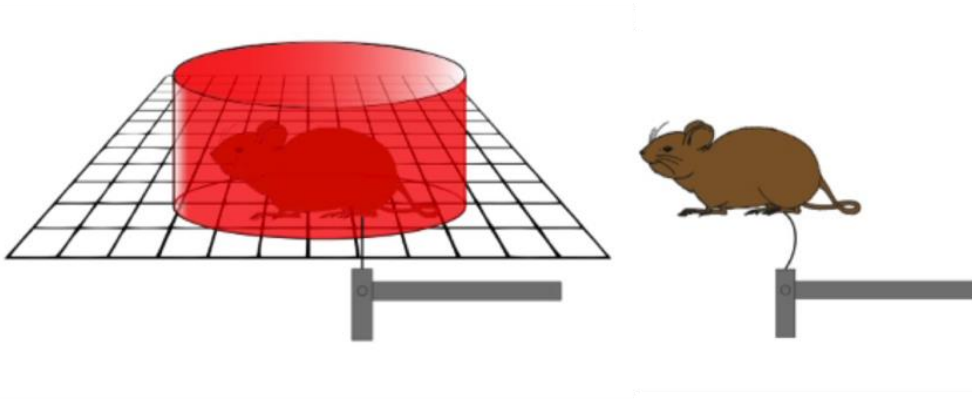


Figura 10 Condiciones para estudio de up-down.

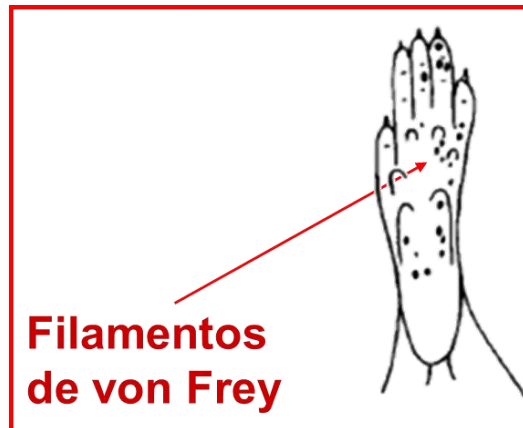


Figura 11 Área de aplicación de fibra de von Frey.

Tomado y modificado de Ferrier Jeremy, (2016)

Se determinó el 50% de umbral de retiro utilizando el método Up—Down (arriba abajo) de Dixon (Dixon, 1980; Chaplan et al. 1994), el 50 % de umbral de retiro se extrapola a la fuerza necesaria para que la rata tenga un 50% de probabilidad de responder ante un estímulo y que este le cause un dolor. En este paradigma la prueba se inició con el filamento de 4.31 g, a la mitad de la serie de 20 filamentos de von Frey, (Marca: Stoelting) con incrementos logarítmicos de rigidez o dureza y se ascendió o descendió en función de la respuesta del animal, se midió el umbral de retiro tomando como respuesta positiva el retiro de la pata estimulada en un lapso de 10 segundos. La respuesta negativa es aquella en la que al estimular la pata ésta no sea retirada. Después de la primera respuesta positiva, se llevó a cabo la estimulación otras 4 veces, según Dixon el cálculo del umbral de retiro óptimo por este método requiere de una serie de 6 patrones de respuestas positivas y negativas los cuales pueden ir variando secuencialmente y el último filamento utilizado. Donde el máximo estímulo permitido es con la fibra de von frey de valor 5.46g y el mínimo estímulo es permitido con la fibra de von Frey de 3.61g. El 50% de umbral de respuesta se calculó usando la fórmula:

$$50\% \text{ Umbral (g)} = (10^{[X_f + k\delta]})/1000$$

Dónde: X_f es el valor del último filamento de von Frey usado (en unidades logarítmicas); k es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado con base al patrón de respuestas positivas y negativas y δ que se refiere a las diferencias de promedio entre estímulos (unidades logarítmicas).

7.10) Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados conductuales se graficó la media \pm error estándar de la media (E.E.M.) de cada una de las dosis administradas de seis animales por grupo. Para el cotejo de la alodinia generada por el dolor neuropático se realizó una prueba de t no pareada entre las ratas Sham y las ratas tratadas únicamente con el vehículo y para la evaluación de las dosis se construyeron los cursos temporales. Las curvas se construyeron graficando el 50% del umbral de retiro en gramos representados en la escala de las fibras de von Frey en función del tiempo. Para determinar la dosis efectiva necesaria para producir el 50% del efecto máximo posible (DE_{50}), se calculó el porcentaje del máximo efecto posible (%MEP) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% MEP = \frac{ABC_{\text{compuesto}} - ABC_{\text{vehículo}}}{ABC_{\text{sham}} - ABC_{\text{vehículo}}} \times 100$$

Donde ABC es el área bajo la curva del curso temporal del 50% del umbral de retiro por rata de cada grupo. Las curvas dosis-respuesta se construyeron graficando el %MEP contra las dosis. La DE_{50} se calculó de acuerdo al método descrito por Tallarida (Tallarida, 2000), mediante el ajuste no lineal utilizando la ecuación de Hill. Se realizaron los cálculos por los modelos de efecto fijo, lineal, lineal logarítmico, de efecto máximo y del efecto máximo sigmoide, siendo el ajuste no lineal utilizando la ecuación de Hill la que mejor se ajustó.

Para determinar la diferencia entre tratamientos y el vehículo se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) de las áreas bajo la curva (ABC) de cada tratamiento seguido por la prueba de Dunnett para poder comparar contra un grupo de referencia. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$.

8.) Resultados

8.1) Aislamiento de la piperina

Se pesaron exactamente 1700 gramos de las semillas comerciales de *Piper nigrum* y se sometieron a un proceso de extracción continua en Soxhlet. En el **Cuadro 3** se presenta el rendimiento obtenido de piperina en porcentaje con respecto al extracto obtenido, se muestra también la cantidad en peso de piperina obtenida en las diferentes fracciones de la separación por cromatografía en columna, así como la determinación de identidad por sus propiedades físicas de cada fracción, donde se describe como un polvo de coloración amarilla, con un punto de fusión teórico de 129°C a 131°C.

Cuadro 3 Pesos y porcentajes obtenidos de las semillas de *Piper nigrum*.

	Referencia (P-31)	Fracción 21-30 Columna #1	Fracción 31-42 Columna #1	Fracción 40-50 Columna #2	Fracción 51-60 Columna #2	Fracción 61-70 Columna #2	Fracción 71-73 Columna #2	Fracción 74-85 Columna #2	Segunda cosecha de columna
Punto de fusión experimental (no corregido)	129°-130°C	130°-131°C	129°-130°C	129°-130°C	128°-130°C	128°-130°C	128°-130°C	130°-131°C	128°-129°C
Punto de fusión teórico	129°-131°C								
Peso de Piperina	N/A	1.4 g	0.8 g	0.7 g	2.7 g	2.4 g	0.1 g	0.5 g	0.8 g
Peso total de Piperina	12.2g								
Peso de extracto	56g								
Rendimiento (%) piperina con respecto al extracto	21.8%								

8.2) Caracterización de piperina

La piperina (**Figura 12**) aislada se identificó inequívocamente mediante sus espectros de RMN¹H (**Figura 16**) y RMN¹³C (**Figura 15**). En donde se pudieron constatar las señales características de para los protones y los carbonos de esta molécula. También se determinó su estructura por difracción de rayos X, así como por la comparación con los datos reportados en la literatura (Berger, 2009).

El espectro de RMN¹H en CDCl₃ mostrado en el **Figura 16**, se registró a 400 MHz y se utilizó como patrón interno al Tetrametilsilano (TMS). En su espectro de RMN¹H se observa que los hidrógenos de metileno (-CH₂-) del anillo piperidina que contiene el átomo de nitrógeno muestran un desplazamiento químico a δ 1.59 a 1.77, por otra parte los protones vinílicos muestran un desplazamiento químico experimental a δ 6.45 a δ 7.40, que se desplazan un poco debido al efecto del grupo carbonilo (C = O) unido al carbono vinílico principal. Por su parte los anillos de fenilo tienen resonancia, cerca de 7,3 ppm pero las posiciones se ven afectadas más fuertemente que otras en sistemas con patrones de sustitución diferentes de este. En este caso, el sustituyente dador de electrones, el grupo metoxi (-OR) desplazan la resonancia del anillo se observa un desplazamiento de 6.73 a 6.98. Además se observó el desplazamiento químico a 5.97 para los protones del grupo metilen-dioxi (-O-CH₂-O-).

La asignación de los protones en el espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) es la siguiente: 7.40 (**H-3'**) (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.98 (**H-5''**) (d, J = 1.6 Hz, 4H), 6.88 (**H-5'**) (d, J = 1.7 Hz, 2H), 6.79 (**H-4'**) (s, 2H), 6.77 (**H-6''**) (s, 2H), 6.73 (**H-3''**) (s, 2H), 6.45 (**H-2'**) (s, 2H), 5.97 (**H-7''**) (s, 9H), 3.58 (**H-2 y 6**) (d, J = 41.5 Hz, 20H), 1.77 (**H-3**) (s, 8H), 1.66 (**H-5**) (m, J = 5.1 Hz, 10H), 1.59(**H-4**) (d, J = 5.1 Hz, 18H).

En su espectro de RMN¹³C mostrado en el **Figura 15**, se observa un total de 17 carbonos, de los cuales son característicos el carbono metilen-dioxi (-O-CH₂-O-) (**C-7''**) y los del anillo piperidina (**C-2, 3, 4, 5 y 6**), así como también el carbono del grupo carbonilo (**C-1'**), la correlación entre las señales de H y C junto con lo reportado en la literatura da un indicio de que se trata de la piperina (Berger, 2009).

La asignación de los carbonos en el espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) es la siguiente : δ 165.58 (**C-1'**), 148.31 (**C-1''**), 148.24 (**C-2''**), 142.61 (**C-3'**), 138.36 (**C-5'**), 131.15 (**C-4''**), 125.48 (**C-5''**), 122.62 (**C-4'**), 120.18 (**C-2'**), 108.61 (**C-3''**), 105.80 (**C-6''**), 101.39 (**C-7''**), 43.12 (**C-6**), 46.81 (**C-2**) 26.84 (**C-3**), 25.72 (**C-5**), 24.80(**C-4**).

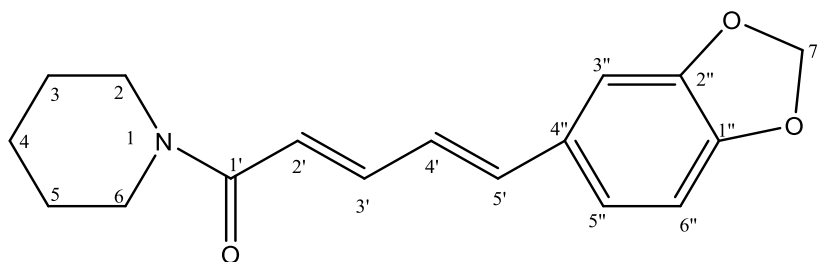


Figura 12 Piperina: (2E, 4E)-5-(1, 3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-ona.

Adicionalmente se determinó la estructura de piperina por difracción de rayos x con el programa ORTEP, el cual representa la estructura del cristal, representando los elipsoides térmicos representado en **Figura 13**, así como también se propuso el empaquetamiento molecular del cristal de piperina en una celda unitaria representado en el **Figura 14**.

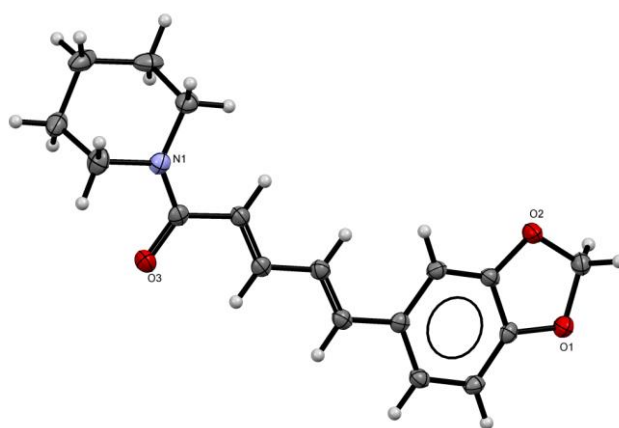


Figura 13 Diagrama ORTEP de piperina que muestra su conformación molecular. Los átomos son identificados como N: óvalos azules, O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

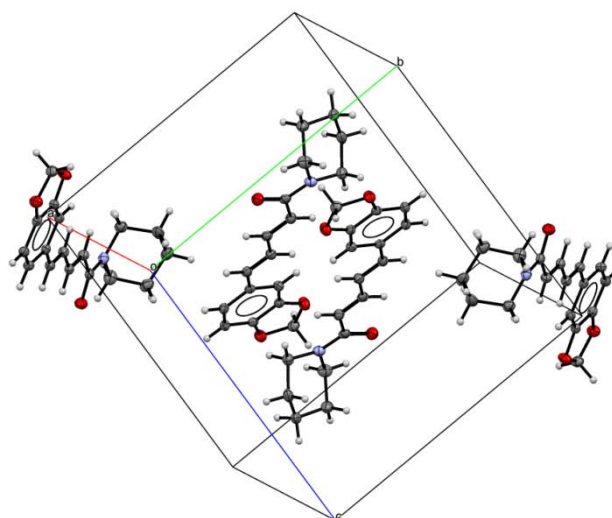


Figura 14 Perspectiva del empaquetado de moléculas de piperina en la celda unitaria. Los átomos son identificados como N: óvalos azules, O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos.

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor neuropático en roedores

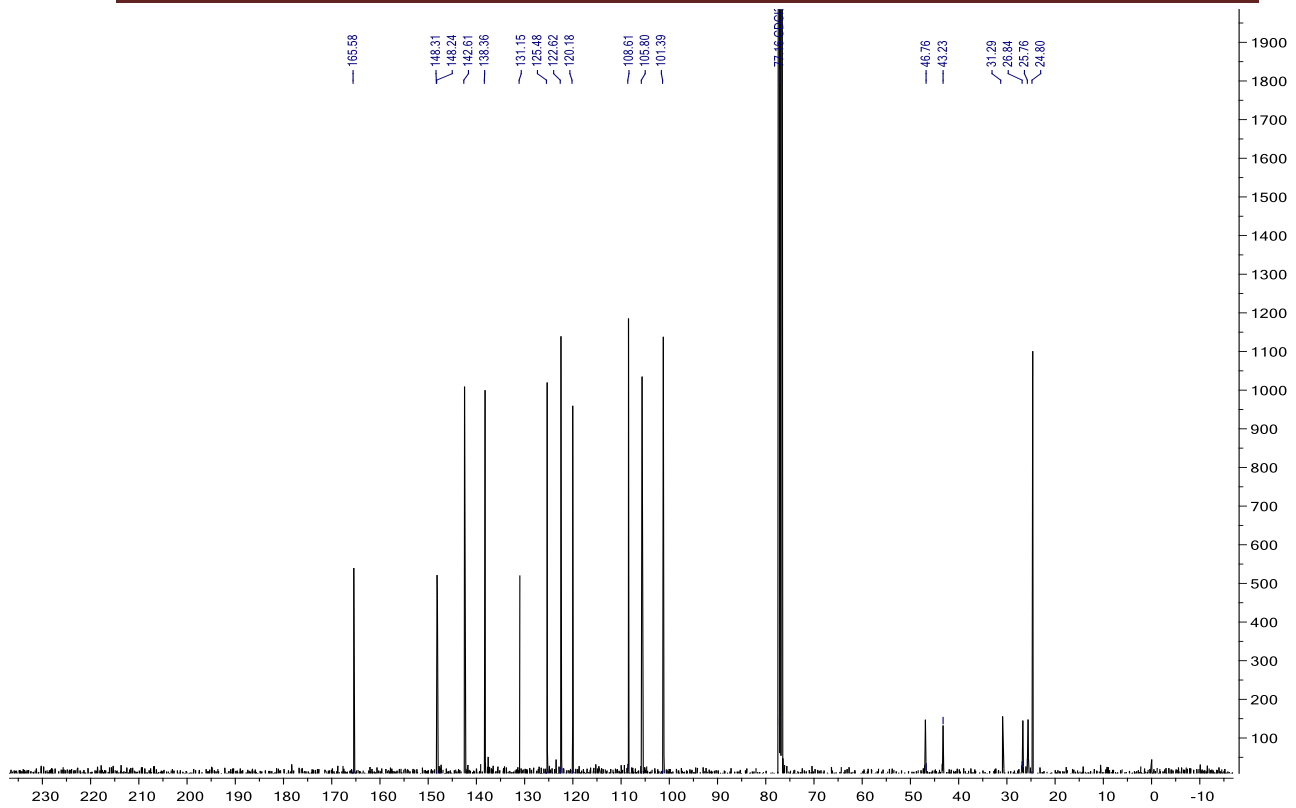


Figura 15 Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³C de piperina (100 MHz, CDCl₃).

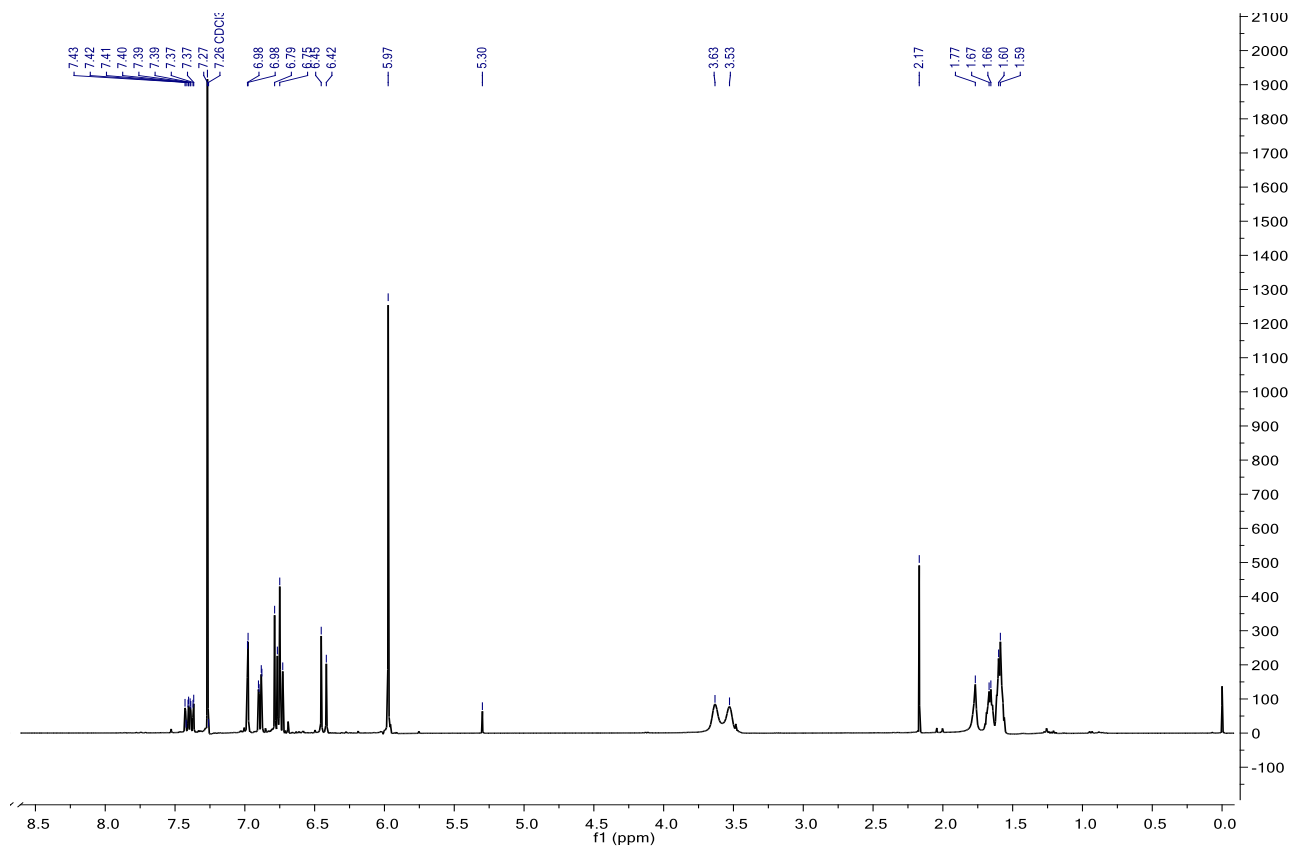


Figura 16 Espectro de resonancia magnética nuclear ¹H de piperina (400 MHz, CDCl₃).

8.3) Características generales de las ratas en el estudio

No se observaron cambios en el comportamiento o deformidad de la pata en los animales del grupo de las ratas Sham (falsamente ligadas). En tanto que la deformidad de la pata de todos los animales ligados de los nervios espinales L5 y L6 que se produjo después de la cirugía no presentó mejora alguna en el transcurso del periodo de estudio de 21 días. Las ratas de los grupos de estudio presentaron diferentes grados de deformidad del pie y en el modo de andar después de la cirugía.

8.4) Postura y modo de andar

En posición de descanso las ratas en todos los grupos experimentales frecuentemente mostraron un lamido repetitivo en la pata izquierda (excepto Sham). Además la pata del lado operado por lo regular siempre se mantenía levitando en una posición de protección, si alguna rata rosaba o tocaba la pata del lado ligado, la rata respondía violentamente. El modo de andar era pisando ligeramente con su pata ligada dejando la mayoría del peso en el otro lado, al levantarse en sus dos patas la rata no permanecía mucho tiempo en esta posición.

8.5) Cotejo de la sensibilidad mecánica

Para asegurar que nuestro modelo cumplía con la condición de dolor neuropático (alodinia táctil), se compararon las respuestas de las ratas Sham contra las que recibieron la lesión en los nervios espinales (L5 y L6) en el lado izquierdo, ante un estímulo mecánico. Para verificar la sensibilidad mecánica en la pata, se cuantificó la aparición de la elevación de la pata tras aplicaciones repetidas de seis fibras de von Frey de diferentes calibres (de 3.9 mN; 0.4 g a 19.6 mN; 2g y de 19.6 mN; 2g a 147.1 mN; 15g).

Los resultados obtenidos en el grupo Sham y en las ratas que recibieron la lesión en los nervios espinales tratadas únicamente con el vehículo muestran que las ratas Sham, presentaron un umbral de respuesta con la fibra de von Frey de mayor calibre (147.1 mN; 15g) (**Figura 17**), por otra parte las ratas que recibieron la lesión en los nervios espinales, muestran un umbral de respuesta ante la fibra de von Frey de menor calibre (3.9 mN; 0.4 g) (**Figura 17**).

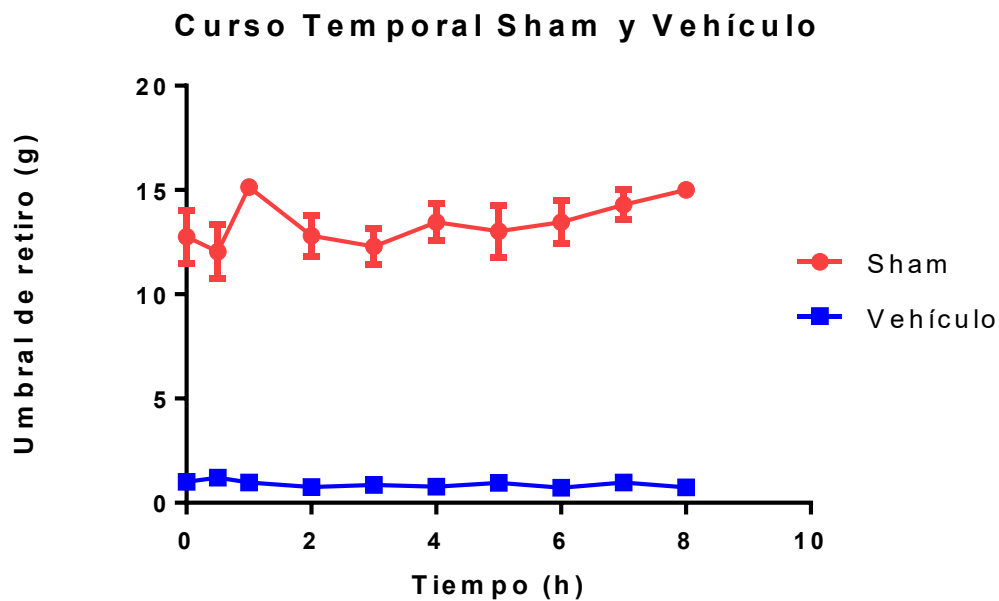


Figura 17.- Curso temporal de respuesta a estímulos táctiles con la fibra de von Frey de mayor calibre (147.1 mN; 15g), a la cual respondieron las ratas Sham (falsamente ligadas) y con la fibra de von Frey de menor calibre (3.9 mN; 0.4 g), a la cual respondieron las ratas con lesión en los nervios espinales L5 y L6. Los valores son presentados como la media \pm error estándar de la media (E.E.M), de por lo menos 6 repeticiones.

Respuesta a estímulo mecánico

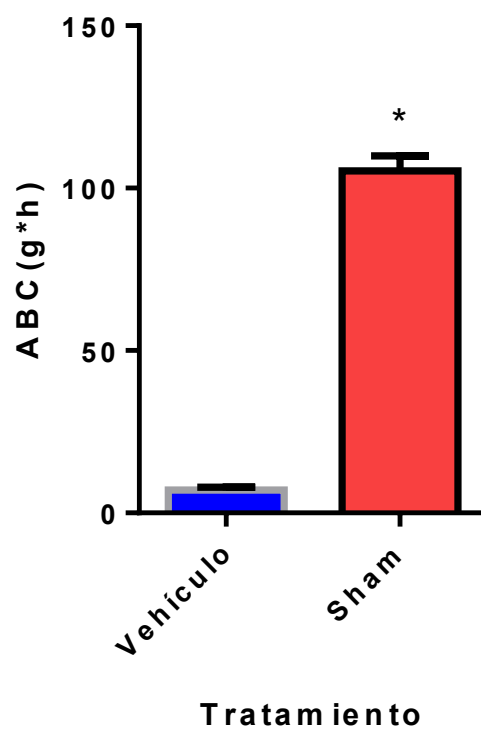


Figura 18. Área bajo la curva del curso temporal de respuesta a estímulos táctiles con la fibra de von Frey. Los valores se presentan como la media \pm error estándar de la media (E.E.M), de por lo menos n=6. (*) Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) por una t no pareada.

Los resultados de la respuesta a estímulo mecánico (**Figura 18**) sugieren que la ligación de los nervios espinales periféricos L5 y L6 induce una sensibilidad mecánica ante un estímulo inocuo. La rata retiraba el pie y regularmente lo lamia, manteniéndolo en el aire por algunos segundos, estos datos se interpretan como signos de alodinia táctil después de una lesión en los nervios espinales periféricos L5 y L6. Además, con los datos obtenidos en el grupo Sham se aseguró también que el procedimiento quirúrgico tiene una interferencia mínima en la presencia de la alodinia táctil asociada al dolor neuropático.

8.6) Prueba de alodinia táctil

Una vez que se determinó la estructura de la piperina y se cotejó la sensibilidad mecánica en las ratas, se evaluó la alodinia táctil, en ratas con dolor neuropático. Se encontró que todas las dosis administradas intraperitonealmente (i.p) de piperina (3.1, 10, 31, 56, 100 mg/kg) presentaron un aumento en el umbral de retiro (g), con respecto a las ratas que recibieron solo el vehículo. En todas las dosis administradas se observa que en una fase inicial desde las cero hasta las dos horas el umbral de retiro es bajo, para después mantenerse con un aumento en umbral de retiro a las cuatro y cinco horas y finalmente regresar a un umbral de retiro bajo, después de las seis horas (**Figura 19**).

Los resultados se caracterizan por tener una tendencia dosis-dependiente, hasta las dosis de 56mg/Kg y 100mg/Kg. Con la dosis de 100 mg/kg se observó que no existe un mayor efecto anti-alodínico de la piperina (**Figura 20**), en la gráfica del ABC del curso temporal del efecto anti-alodínico de los diferentes tratamientos.

8.7) Determinación de la dosis efectiva

La DE_{50} del efecto anti-alodínico de la piperina fue de 17.47 ± 0.059 mg/kg, se realizaron los cálculos por los modelos de efecto fijo, lineal, lineal logarítmico, de efecto máximo y del efecto máximo sigmoide, siendo el ajuste no lineal utilizando la ecuación de Hill la que mejor se ajustó.

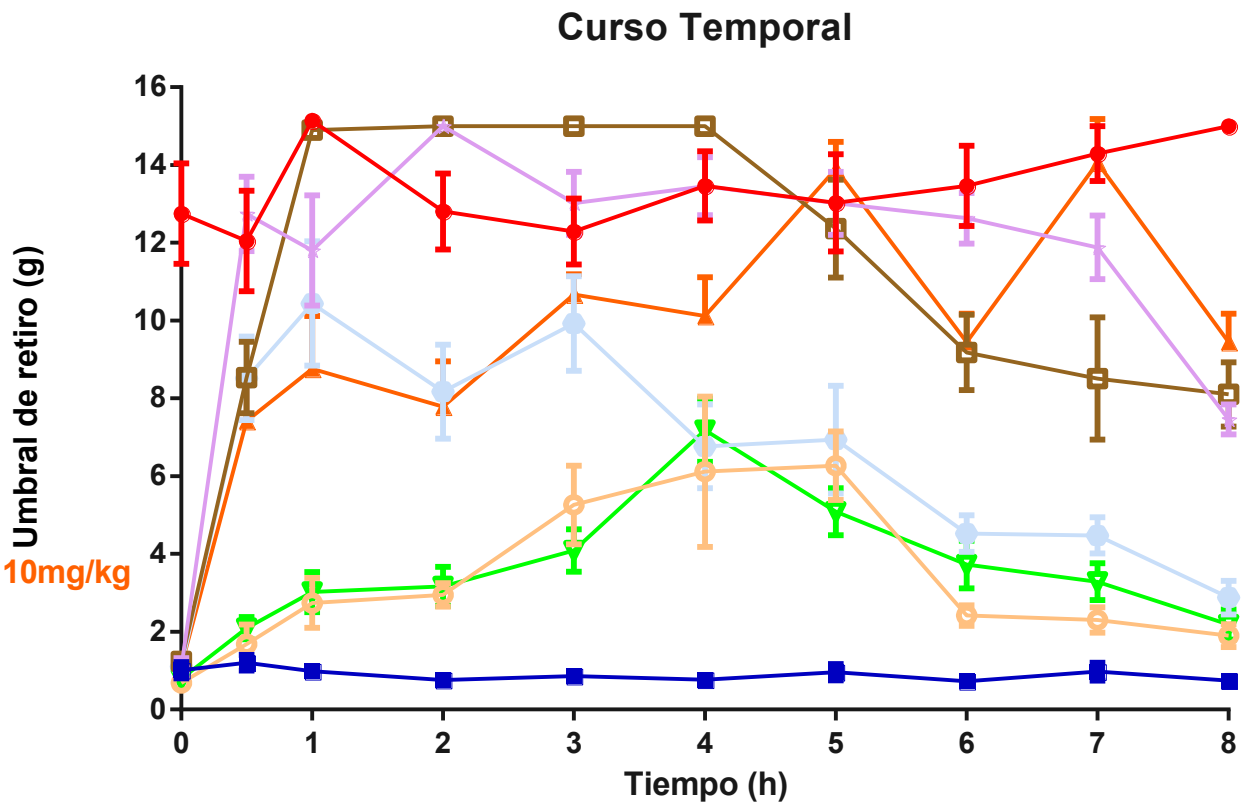


Figura 19.- Curso temporal de ratas Sham (falsamente ligada), vehículo, y las diferentes dosis de piperina (3.1, 10, 31, 56, 100 mg/kg, i.p.). Se presenta la diferencia de umbral del 50% de retiro inducido por un estímulo táctil. Los valores se presentan como la media \pm error estándar (E.E.M) de por lo menos 6 repeticiones.

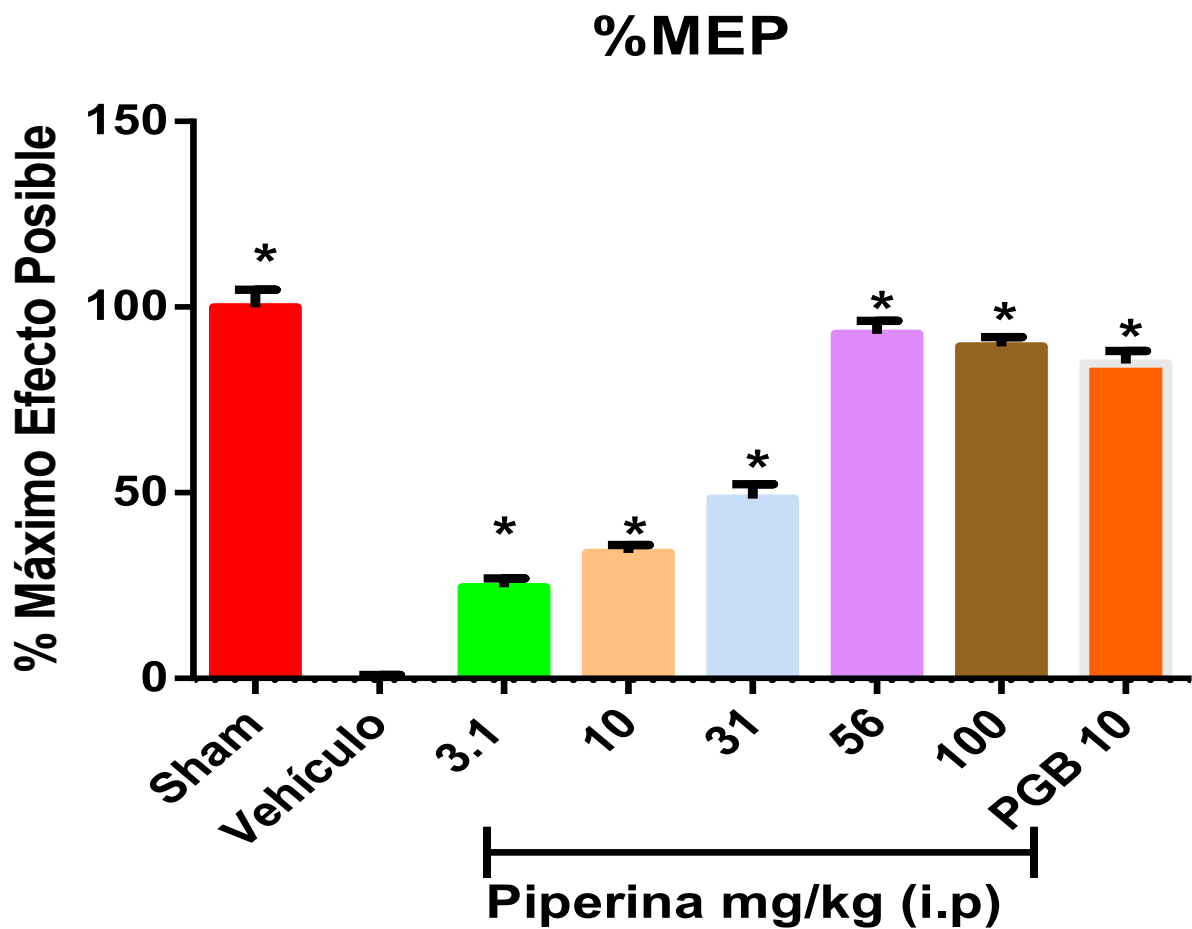


Figura 20.- Estudio del % de efecto antialodínico representado como % del máximo efecto posible (%MEP), (*) Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo de ratas con lesión en los nervios espinales L5 y L6 (vehículo) determinada por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de Dunnett. Los valores son presentados como la media \pm E.E.M. de al menos 6 repeticiones. Abreviaturas: pregabalina 10mg/kg (i.p.) (PGB10).

9.) Discusión de resultados

Los resultados encontrados en este estudio muestran claramente que la piperina administrada por vía intraperitoneal, tiene efecto antialodínico en el modelo de ligadura de los nervios L5 y L6 en rata (**Figura 19 y 20**). El valor de la dosis efectiva 50 en este modelo fue de 17.47 ± 0.059 mg/kg. La diferencia en el umbral de retiro entre las ratas Sham (falsamente ligadas) y las ratas tratadas únicamente con el vehículo (**Figura 17 y Figura 18**), indican que el modelo de dolor neuropático se estableció adecuadamente, ya que la lesión provocada en estos nervios a causa de la ligadura no pueden regenerarse. Se puede observar también que durante el curso temporal del efecto a las dosis altas (56, 100 mg/kg) presentaron una tendencia creciente durante la primera hora y sostenida durante las siguientes cuatro horas, para posteriormente decrecer (**Figura 20**). En tanto que para las dosis bajas (10, 3.1 mg/kg) se presentó una tendencia creciente hasta las seis horas, para después disminuir (**Figura 20**). Esta tendencia se ha observado en la administración intra-plantar de otra alcaloide; la capsaicina, por lo que sería un indicativo de que la piperina actúa de manera similar. Es importante resaltar que a dosis bajas se mantiene un umbral de retiro bajo y nunca llega a un umbral de retiro similar al de las ratas sham. En cambio, a dosis altas, se incrementa el umbral de retiro a niveles parecidos al umbral de las ratas sham, saturándose el efecto (**Figura 20**). Este comportamiento puede explicarse por la farmacología ligando-receptor, donde el ligando excede por cantidad al número de receptores disponibles para su unión y por lo tanto el efecto anti-alodínico de la piperina ya no puede aumentar.

La piperina es capaz de activar al receptor TRPV1 por un mecanismo muy parecido al de la capsaicina. Por lo que, un posible mecanismo de acción anti-alodínico de la piperina puede ser explicado por la desensibilización de TRPV1. McNamara y colaboradores, caracterizaron el efecto de piperina en el receptor TRPV1 utilizando un modelo electrofisiológico *in vitro*, demostrando un efecto agonista y desensibilizador en el receptor. Además en 1961 Jancsó y colaboradores demostraron que la capsaicina administrada en ratas adultas, durante un período de 1 a 3 días fue suficiente para desensibilizar a los animales al dolor nociceptivo inducido por sustancias químicas, desensibilización que perdura por hasta 3 meses. En el efecto antialodínico de piperina puede estar ocurriendo igualmente la desensibilización de los receptores TRPV1. Aunque TRPV1 es reconocido clásicamente como un transductor de estímulos térmicos y químicos nocivos, Yamamoto y colaboradores reportaron que la alodinia mecánica podría ser mediada por TRPV1 en neuronas sensoriales primarias en ratas con dolor neuropático, ya que con una inyección de resina de capsaicina en los ganglios de la raíz dorsal

destruyeron las células con receptores vanilloides, lo cual se reflejó en la reducción de la alodinia táctil.

Si bien los receptores TRPV1 están involucrados en la alodinia táctil, no significa que sea la única vía implicada en el dolor neuropático, ya que, por ejemplo la pregabalina, utilizada como control positivo en este trabajo (Figura 17), es un fármaco estándar de primera línea para el tratamiento del dolor neuropático y como se conoce es un análogo de GABA, que actúa como ligando antagonista de la subunidad $\alpha 2\delta$ del canal de calcio dependiente de voltaje. Lo anterior provoca la reducción de la entrada de calcio y por tanto, modula la función del sistema nervioso central ya que disminuye la liberación de neurotransmisores excitadores.

La pregabalina en contraste con la piperina, produce un efecto anti-alodínico a niveles de transmisión diferentes ya que modula la liberación de neurotransmisores excitadores, que ocurre en el asta de raíz dorsal, e involucra un mecanismo a nivel de transmisión central, en tanto que el mecanismo propuesto de la piperina conduciría a la desensibilización y desfuncionalización de TRPV1 (al igual que la capsaicina), en las terminales nerviosas. Este es un mecanismo a nivel de transmisión periférica primaria, por lo que su inhibición previene no solo la transducción, sino que también inhibe una respuesta a nivel central, lo que resultaría en mejores resultados anti-alodínicos y menos efectos secundarios ya que no se involucrarían de manera directa a los neurotransmisores.

Pese a que la terapéutica actual se enfoca en el uso de fármacos que inhiben vías de neurotransmisores (serotonina, noradrenalina, GABA, Glutamato), el presente trabajo, se centra en la inhibición de canales que producen la activación del potencial de acción en las fibras sensoriales aferentes nociceptivas primarias, evitando que éstos neurotransmisores se liberen, o que algunas otras moléculas como Sustancia P, IL-2, ATP, protones, generen un conjunto de señales que provoquen el dolor.

Está claro que TRPV1 juega un papel clave en la fisiología de dolor, no sólo en la integración de varias señales moleculares y físicas relacionadas con el dolor, sino también en la mediación de una respuesta a varios niveles de acción. La posición privilegiada de éste receptor vainilloide hace que sea un blanco terapéutico muy conveniente para la búsqueda de nuevos medicamentos analgésicos en el tratamiento del dolor neuropático.

Siendo la piperina un agonista de los receptores TRPV1 y conforme a los resultados obtenidos, donde se demuestra que la administración aguda de

piperina disminuyó la alodinia se puede considerar como un fármaco prometedor en el tratamiento del dolor neuropático.

10.) Conclusiones

La administración sistémica aguda de piperina aislada de *Piper nigrum*, presentó un efecto anti-alodínico en el modelo de dolor neuropático por ligadura de nervios espinales segmentales (L5 y L6) en rata con una dosis efectiva 50 de 17.47 ± 0.059 mg/kg.

El efecto anti-alodínico de la piperina se describe posiblemente por su efecto como agonista del receptor TRPV1.

11.) Perspectivas

Elucidar el mecanismo de acción de la piperina en el dolor neuropático, utilizando agonistas y antagonistas de receptores TRP y modulando sistemas de neurotransmisión que involucren a óxido nítrico, serotonina y GABA

Determinar por técnicas de biología molecular, si existe sobre-expresión de los receptores TRP, en las ratas con dolor neuropático, así como la disminución de su expresión al administrar la piperina.

Determinar el efecto en el dolor neuropático de otras alcanidas existentes en familias como la *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Rutaceae*.

Estudiar la administración sincrónica y crónica de piperina en la alodinia táctil en ratas.

Desarrollar formulaciones de piperina para su posible aplicación y comercialización a nivel clínico.

12.) Referencias

- Alessandri-Haber, N., et al. (2008). "Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia." *J Neurosci* 28(5): 1046-1057.
- Bae, S. S., et al. (2010). "A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr." *Phytochem Anal* 21(5): 438-443.
- Bang, J. S., et al. (2009). "Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models." *Arthritis Res Ther* 11(2): R49.
- Baron, R. (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nature clinical practice. Neurology*, 2, 95-106.
- Boonen, J., et al. (2012). "Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides." *J Ethnopharmacol* 142(3): 563-590.
- Bridges, D., et al. (2001). "Mechanisms of neuropathic pain." *Br J Anaesth* 87(1): 12-26.
- Callsen, D., et al. (1999). "Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases." *Free Radic Biol Med* 26(11-12): 1544-1553.
- Caraceni, A., et al. (2004). "Gabapentin for neuropathic cancer pain: a randomized controlled trial from the Gabapentin Cancer Pain Study Group." *J Clin Oncol* 22(14): 2909-2917.
- Correa, E. A., et al. (2010). "In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(9): 3299-3306.
- Chaplan, S. R., et al. (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." *J Neurosci Methods* 53(1): 55-63.
- Chung, M.-K., et al. (2008). "TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation." *Nat Neurosci* 11(5): 555-564.
- Dalby-Brown, L., et al. (2005). "Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins." *J Agric Food Chem* 53(24): 9413-9423.
- Dixon, W. J. (1980). "Efficient analysis of experimental observations." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 441-462.
- Epstein, J. B., & Marcoe, J. H. (1994). Topical application of capsaicin for treatment of oral neuropathic pain and trigeminal neuralgia. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 77(2), 135-140.
- Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." *Pain* 50(3): 355-363.
- Kissin, I. (2008). "Vanilloid-induced conduction analgesia: selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity." *Anesth Analg* 107(1): 271-281.
- Lee-Kubli, C. A., et al. (2014). "Animal models of diabetes-induced neuropathic pain." *Curr Top Behav Neurosci* 20: 147-170.

- Magrinelli, F., et al. (2013). "Neuropathic pain: diagnosis and treatment." *Pract Neurol* 13(5): 292-307.
- Marazziti, D., et al. (2006). "Pain and psychiatry: a critical analysis and pharmacological review." *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2: 31.
- Mayer, D. J., et al. (1999). "Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 7731-7736.
- McHugh, J. M. and W. B. McHugh (2000). "Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications." *AACN Clin Issues* 11(2): 168-178.
- Merskey, H. (1979). "Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy." *Pain* 6(3): 249.
- Michalet, S., et al. (2007). "N-caffeoilphenalkylamide derivatives as bacterial efflux pump inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett* 17(6): 1755-1758.
- Mielke, S., et al. (2005). "Association of Paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer." *Clin Cancer Res* 11(13): 4843-4850.
- Molina-Torres, J., et al. (1999). "Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin." *J Ethnopharmacol* 64(3): 241-248.
- Morgado, C., et al. (2011). "Changes in serotonergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1." *Neurobiol Dis* 43(1): 275-284.
- O'Banion, M. K. (1999). "Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology." *Crit Rev Neurobiol* 13(1): 45-82.
- Ochoa, E. L., et al. (1982). "Postnatal changes in the activity ratio of specific and nonspecific cholinesterases from neuronal perikarya." *J Neurochem* 38(5): 1236-1240.
- Parmar, V. S., et al. (1997). "Phytochemistry of the genus Piper." *Phytochemistry* 46(4): 597-673.
- Patwardhan, A. M., et al. (2006). "The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30): 11393-11398.
- Rahman, T. and M. Rahmatullah (2010). "Proposed structural basis of interaction of piperine and related compounds with monoamine oxidases." *Bioorg Med Chem Lett* 20(2): 537-540.
- Rajagopal, A., et al. (2004). "Symptomatic hypogonadism in male survivors of cancer with chronic exposure to opioids." *Cancer* 100(4): 851-858.
- Ramsewak, R. S., et al. (1999). "Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*." *Phytochemistry* 51(6): 729-732.
- Rao, V. R. S., et al. (2011). "Novel dimeric amide alkaloids from Piper chaba Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis." *Tetrahedron* 67(10): 1885-1892.
- Rios, M. Y. and H. F. Olivo (2014). Chapter 3 - Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy. *Studies in Natural Products Chemistry*. R. Atta ur, Elsevier. Volume 43: 79-121.
- Ross, S. A., et al. (2005). "Alkamides from the leaves of *Zanthoxylum syncarpum*." *J Nat Prod* 68(8): 1297-1299.

- Saadali, B., et al. (2001). "Alkamides from *Artemisia dracunculus*." *Phytochemistry* 58(7): 1083-1086.
- Sabatowski, R., et al. (2004). "Pregabalin reduces pain and improves sleep and mood disturbances in patients with post-herpetic neuralgia: results of a randomised, placebo-controlled clinical trial." *Pain* 109(1-2): 26-35.
- Sailaja, R. and O. H. Setty (2006). "Protective effect of *Phyllanthus fraternus* against allyl alcohol-induced oxidative stress in liver mitochondria." *J Ethnopharmacol* 105(1-2): 201-209.
- Salam, O. M. E. A., et al. (2007). "Piperine Inhibits Visceral Pain Caused by Acetic Acid in Mice." *J. Pharmacol. Toxicol* 2: 456-464.
- Sanatombi, K. and G. J. Sharma (2008). Capsaicin Content and Pungency of Different *Capsicum* spp. Cultivars.
- Seltzer, Z., et al. (1991). "The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats." *Pain* 46(3): 327-336.
- Shields, S. D., et al. (2010). "Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors." *Pain* 151(2): 422-429.
- Simpson, D. M., Brown, S., Tobias, J., & NGX-4010 C107 Study Group. (2008). Controlled trial of high-concentration capsaicin patch for treatment of painful HIV neuropathy. *Neurology*, 70(24), 2305-2313.
- Staats, P. S., et al. (2004). "Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial." *JAMA* 291(1): 63-70.
- Stöhr, J. R., et al. (2001). "Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro." *J Ethnopharmacol* 75(2-3): 133-139.
- Szallasi, A. (2005). "Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice." *Trends in Pharmacological Sciences* 26(9): 437-439.
- Tallarida, R. J. (2000). Drug synergism and dose-effect data analysis. Boca Raton, Chapman Hall/CRC Press.
- Tang, G.-H., et al. (2011). "Cytotoxic Amide Alkaloids from Piper boehmeriaefolium." *J Nat Prod* 74(1): 45-49.
- Tassorelli, C., et al. (2006). "Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test." *Eur J Pharmacol* 534(1-3): 103-107.
- Tesfaye, S., et al. (2013). "Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy." *Diabetes Care* 36(9): 2456-2465.
- Turk, D. C. and A. Okifuji (1999). "Assessment of patients' reporting of pain: an integrated perspective." *Lancet* 353(9166): 1784-1788.
- White, P. F. (2008). "Red-hot chili peppers: a spicy new approach to preventing postoperative pain." *Anesth Analg* 107(1): 6-8.
- Wilson, R. C. (1999). "The use of low-dose trazodone in the treatment of painful diabetic neuropathy." *J Am Podiatr Med Assoc* 89(9): 468-471.
- Woolf, C. J. and M. Costigan (1999). "Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 7723-7730.
- Zacares, L., et al. (2007). "Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial

- pathogen *Pseudomonas syringae*." *Mol Plant Microbe Interact* 20(11): 1439-1448.
- Zakrzewska, J. M. and P. N. Patsalos (2002). "Long-term cohort study comparing medical (oxcarbazepine) and surgical management of intractable trigeminal neuralgia." *Pain* 95(3): 259-266.
- Zeilhofer, H. U. (2008). "Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain--contributions of inflammation and microglia." *Int Immunopharmacol* 8(2): 182-187.
- Ying, X., Chen, X., Cheng, S., Shen, Y., Peng, L., & Xu, H. (2013). Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. *International immunopharmacology*, 17(2), 293-299.
- Campbell, J. N., Raja, S. N., Meyer, R. A., & Mackinnon, S. E. (1988). Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*, 32(1), 89-94.
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.
- Hyman SE, Cassem NH. (1995). *Dolor En: Neurología*. Ed. Científica Medica Latinoamericana 1-20.
- Delgado, J. M. (1998). *Manual de neurociencia* 18: 457-481.
- Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Joseph, E.K., Reichling, D.B. & Levine, J.D. (2008) Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28, 1046-1057.
- Shields, S.D., Cavanaugh, D.J., Lee, H., Anderson, D.J. & Basbaum, A.I. (2010) Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain*, 151, 422-429.
- Lee-Kubli, C.A., Mixcoatl-Zecuatl, T., Jolival, C.G. & Calcutt, N.A. (2014) Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. *Current topics in behavioral neurosciences*, 20, 147-170.
- Jaramillo, M. Alejandra; Manos (2001). "Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae)". *American Journal of Botany*. 88 (4): 706–16.
- Berger S, D. Sicker, *Classics in Spectroscopy. Isolation and Structure*, 2009, Cap. 53
- Rahman, T. and M. Rahmatullah (2010). "Proposed structural basis of interaction of piperine and related compounds with monoamine oxidases." *Bioorg Med Chem Lett* 20(2): 537-540.
- McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *British Journal of Pharmacology*. 2005;144(6):781-790.
- Jancsó, N. (1961), Inflammation and the inflammatory mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 13: 577–594.
- Bowman WC, R.M. (1984) *Farmacología Bases bioquímicas y patologías. Aplicaciones clínicas*. Editorial Interamericana.

- Woolf, C.J. (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of internal medicine*, 140, 441-451.
- Chong, M.S. & Bajwa, Z.H. (2003) Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *Journal of pain and symptom management*, 25, S4-S11.
- Cruciani, R. & Nieto, M. (2006) Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 13, 312-327.
- Attal, N. & Bouhassira, D. (1999) Mechanisms of pain in peripheral neuropathy. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 173, 12-24; discussion 48-52.
- Latremoliere, A. & Woolf, C.J. (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 10, 895-926.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., Portenoy, R.K., Rice, A.S., Stacey, B.R., Treede, R.D., Turk, D.C. & Wallace, M.S. (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*, 132, 237-251.
- Wu, L.J. & Zhuo, M. (2009) Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6, 693-702.
- Naik, A.K., Tandan, S.K., Kumar, D. & Dudhgaonkar, S.P. (2006) Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *European journal of pharmacology*, 530, 59-69.
- Ossipov, M.H., Dussor, G.O. & Porreca, F. (2010) Central modulation of pain. *The Journal of clinical investigation*, 120, 3779-3787.
- Amaya-Castellanos, E., Pineda-Farias, J.B., Castaneda-Corral, G., Vidal-Cantu, G.C., Murbartian, J., Rocha-Gonzalez, H.I. & Granados-Soto, V. (2011) Blockade of 5-HT₇ receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 99, 591-597.
- Godinez-Chaparro, B., Barragan-Iglesias, P., Castaneda-Corral, G., Rocha-Gonzalez, H.I. & Granados-Soto, V. (2011) Role of peripheral 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain*, 152, 687-697.
- Bravo-Hernandez, M., Cervantes-Duran, C., Pineda-Farias, J.B., Barragan-Iglesias, P., Lopez-Sanchez, P. & Granados-Soto, V. (2012) Role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors in development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 101, 246-257.
- Collins, S.L., Moore, R.A., McQuayHj & Wiffen, P. (2000) Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *Journal of pain and symptom management*, 20, 449-458.
- Edwards, J.L., Vincent, A.M., Cheng, H.T. & Feldman, E.L. (2008) Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & therapeutics*, 120, 1-34.
- Max, M.B., Lynch, S.A., Muir, J., Shoaf, S.E., Smoller, B. & Dubner, R. (1992) Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *The New England journal of medicine*, 326, 1250-1256.

- Ziegler, D. (2006) Treatment of diabetic polyneuropathy: Update 2006. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1084, 250-266.
- Yuen, K.C., Baker, N.R. & Rayman, G. (2002) Treatment of chronic painful diabetic neuropathy with isosorbide dinitrate spray: a double-blind placebo-controlled cross-over study. *Diabetes care*, 25, 1699-1703.
- Barbano, R.L., Herrmann, D.N., Hart-Gouleau, S., Pennella-Vaughan, J., Lodewick, P.A. & Dworkin, R.H. (2004) Effectiveness, tolerability, and impact on quality of life of the 5% lidocaine patch in diabetic polyneuropathy. *Archives of neurology*, 61, 914-918.
- Chung, M.-K., Guler, A.D. & Caterina, M.J. (2008) TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci*, 11, 555-564.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 619-47.
- Nilius B, Voets T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* 2005; 451: 1-10.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-24.
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8134-9.
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 124-9.
- Biro T, Bodo E, Telek A, Geczy T, Tychsen B, Kovacs L, et al. Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1909-12.
- Salazar, H., Jara-Oseguera, A., & Rosenbaum, T. (2009). El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Revista de neurología*, 48(7), 357-364.
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, et al. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* 1999; 19: 529-38.
- Nagae M, Hiraga T, Yoneda T. Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. *J Bone Miner Metab* 2007; 25: 99-104.
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., ... & Mori, Y. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature chemical biology*, 2(11), 596.
- Moncada, S. (1997). Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 811(1), 60-69.
- Porszasz J, Jancsó N. Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1959; 16: 299-306.
- Schwarz S, Greffrath W, Busselberg D, Treede RD. Inactivation and tachyphylaxis of heat-evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *J Physiol* 2000; 528: 539-49.

- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 2004; 123: 53-62.
- Liu L, Simon SA. Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol* 1996; 75: 1503-14.
- Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 2000; 408: 985-90.
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12480-5.
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12480-5.
- Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 2006; 128: 509-22.
- Liu B, Zhang C, Qin F. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 2005; 25: 4835-43.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, et al. PKA/AKAP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 2002; 22: 4740-5.
- Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005; 280: 13424-32.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. & Boll, P.M. (1997) Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*, 46, 597-673.
- Molina-Torres, J., Garcia-Chavez, A. & Ramirez-Chavez, E. (1999) Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *Journal of ethnopharmacology*, 64, 241-248.
- Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J., Veryser, L., De Tre, G. & De Spiegeleer, B. (2012) Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *Journal of ethnopharmacology*, 142, 563-590.
- Rao, V.R.S., Suresh, G., Babu, K.S., Raju, S.S., Vishnu vardhan, M.V.P.S., Ramakrishna, S. & Rao, J.M. (2011) Novel dimeric amide alkaloids from Piper chaba Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. *Tetrahedron*, 67, 1885-1892.
- Ramsewak, R.S., Erickson, A.J. & Nair, M.G. (1999) Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry*, 51, 729-732.
- Saadali, B., Boriky, D., Blaghen, M., Vanhaelen, M. & Talbi, M. (2001) Alkamides from *Artemisia dracunculoides*. *Phytochemistry*, 58, 1083-1086.
- Dalby-Brown, L., Barsett, H., Landbo, A.K., Meyer, A.S. & Molgaard, P. (2005) Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives,

and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 9413-9423.

Por, E.D., Bierbower, S.M., Berg, K.A., Gomez, R., Akopian, A.N., Wetsel, W.C. & Jeske, N.A. (2012) beta-Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *The Journal of biological chemistry*, 287, 37552-37563.

Hamidi, G.A., Manaheji, H., Janahmadi, M., Noorbakhsh, S.M. & Salami, M. (2006) Co-administration of MK-801 and morphine attenuates neuropathic pain in rat. *Physiology & behavior*, 88, 628-635.

Edwards, J.L., Vincent, A.M., Cheng, H.T. & Feldman, E.L. (2008) Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & therapeutics*, 120, 1-34.

13.) Anexo 1

Cuadro 4 Tratamiento del dolor neuropático

Clase de drogas	Mecanismo de acción	Dosificación y la titulación (I: dosis inicial, T: tratamiento prolongado, M: dosis máxima)	Número necesario de pacientes para obtener una respuesta (NNT)	Efectos secundarios y adversos	Ventajas	Desventajas y precauciones
Antidepresivos Tricíclicos						
Amitriptilina	Inhibidores de la recaptura de monoaminas, bloqueadores de canales de sodio y efectos anticolinérgicos.	I: 6-10 mg al acostarse, T: aumento de 2-5 mg cada 2-3 días, M: 75 mg.	3-4-4	Sedación, somnolencia, sequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento, retención urinaria, aumento de peso, hipomanía (efectos secundarios se reducen con una baja dosis de partida y la titulación lenta).	Puede mejorar la depresión perturbaciones (dosis necesaria más altos) y trastornos del sueño.	Enfermedades cardíacas, hipertrofia prostática, glaucoma, convulsiones, riesgo de suicidio.
Nortriptilina Desipramina		I: 10-25 mg al acostarse, T: aumento de 10-25 mg cada 5-7 días, M: 100 mg.				

Ligando a la subunidad $\alpha 2\text{-}\delta$ canales de calcio (antiepilépticos)						
Gabapentina	Actúan en la subunidad $\alpha 2\text{-}\delta$ de los canales de pendientes de voltaje de calcio, que disminuyen la sensibilización central.	I: 300 mg al acostarse, T: un aumento de 300 mg cada 2-3 días, M: 1200 mg tres veces al día.	5-9.4	Mareos o somnolencia, sedación, edema periférico, aumento de peso.	Puede mejorar la ansiedad y los trastornos del sueño, no hay interacciones farmacocinéticas significativas.	Insuficiencia renal.
Pregabalina		I: 75 mg al acostarse; T: aumento de 75 mg cada 2-3 días, M: 300 mg dos veces.				
Inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina						
Duloxetina	Inhiben la recaptura de serotonina y noradrenalina.	I: 30 mg (después de una comida), T: aumento a 60 mg después de 1 semana, M: 120 mg.	5.2-8.2	Náuseas, mareos, sedación, agitación, síndrome de abstinencia cuando se suspende bruscamente.	Puede mejorar la depresión y la ansiedad. Se les indican como primera opción para NP diabética.	La disfunción hepática, insuficiencia renal, riesgo de suicidio, pueden aumentar el riesgo de síndrome serotoninérgico.
Venlafaxina		I: 37,5 mg, T: aumento a 75 mg después de 1 semana, a				

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor neuropático en roedores

		continuación, por 37.5-75 mg cada semana, M: 225 mg.				
Administración tópica						
Parche Lidocaina 5%	Bloqueador de los canales de sodio	I: 1-3 parches para un máximo de 12 h / día, M: 3 parches para un máximo de 12 h / día	No reportado	Efectos secundarios locales (eritema, erupción cutánea).	Puede ser eficaz en la alodinia.	Hipersensibilidad a los anestésicos locales. No utilizar sobre piel inflamada o lesionada o las membranas mucosas.
Parche Capsaicina al 8%	Agonista de los receptores de potencial transitorio miembro 1 subfamilia V (TRPV1).		7.4-19	Eritema, dolor, aumento de la presión de la sangre, comezón.	Eficaz en la alodinia e hiperalgesia.	Ningún efecto general de la sensibilización después de varias aplicaciones.
Opioides						
Tramadol	Agonista de los receptores μ e inhibidor de la recaptura de monoaminas.	I: 50 mg una vez al día, T: aumento de 50-100 mg (en dosis divididas) cada 3-7 días, M: 400 mg (100 mg cuatro veces al día), consideran 300 mg para pacientes de		Náuseas, vómitos, sedación, estreñimiento, somnolencia, mareos.	Reducción rápida del dolor neuropático, eficaz en el dolor nociceptivo.	Riesgo de suicidio, convulsiones, depresión respiratoria, puede aumentar el riesgo de síndrome serotoninérgico. Adicción.

Caracterización del efecto anti-alodínico de piperina en un modelo de dolor neuropático en roedores

		mayor edad.				
Morfina Oxicodona Hidromorfona Oximorfona Metadona Buprenorfina Fentanilo Tapentadol	Agonista del receptor μ de opioides.	I: 10-15 mg de morfina cada 4 h o según sea necesario, T: después de 1-2 semanas puede continuarse según sea necesario , M: dosis máxima hasta 300 mg de morfina.	3.4-6.7	Náuseas, vómitos, enrojecimiento y picazón (generalmente de corta duración), sedación, confusión, estreñimiento, somnolencia, mareos.	Reducción rápida del dolor neuropático, eficaz en el dolor nociceptivo.	Depresión respiratoria, riesgo de suicidio, pueden aumentar el riesgo de síndrome serotoninérgico. adicción
Carbamazepina	Su principal mecanismo de acción puede ser la prevención de descargas repetitivas de potenciales de acción dependientes de sodio en neuronas despolarizadas vía uso y el bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes.	I: 100 mg tres veces al día, T: aumento de 100 mg cada 3-5 días, M: 1600 mg.		Somnolencia, anemia aplásica.	Son la primera línea de en la neuralgia del trigémino.	Adicción
Oxocarbazepina	Estabiliza las membranas neuronales hiperexcitadas bloqueando canales de sodio dependientes de voltaje	I: 300 mg, T: aumento de 600 mg cada semana, H: 2.400 mg.		Somnolencia, mareos, dolor de cabeza.	Son la primera línea de en la neuralgia del trigémino.	Adicción

(Número necesario para tratar (NNT), es decir, el número de pacientes necesarios para obtener una respuesta, más que el tratamiento de comparación, por lo general el placebo y así obtener el 50% del alivio del dolor).

14.) Anexo II



FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/199/17
ASUNTO: DICTAMEN

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Presente

Por éste medio le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el protocolo:

“Caracterización del efecto antinociceptivo de la piperina y la afinina en el dolor neuropático en roedores hiperglicémicos inducidos con estreptozotocina”.

No. de animales empleados en el estudio: 504 ratas Wistar macho

Constatando que realizó las correcciones solicitadas, se emite el dictamen de:

APROBADO

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 7 de marzo del 2017

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente

Dra. Ma. Elena Bravo Gómez
Secretaria

c.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaria Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.