



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INHIBICIÓN DE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR CAPSAICINA Y
PIPERINA EN EL MÚSCULO ESOFÁGICO DE ROEDORES CON AFÍNINA
*AISLADA DE *H. longipes*.*

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. GLORIA MELISA GONZÁLEZ ANDUAGA

Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INHIBICIÓN DE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR CAPSAICINA Y
PIPERINA EN EL MÚSCULO ESOFÁGICO DE ROEDORES CON AFININA
AISLADA DE *H. longipes*.

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. GLORIA MELISA GONZÁLEZ ANDUAGA



Ciudad de México, mayo 2018.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Rachel Mata Essayag	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Enrique Hong Chong	CINVESTAV, IPN
Vocal	Dr. Mariano Martínez Vázquez	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña	ENMH, IPN
Secretario	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha	Facultad de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría con número de registro: 596695.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al Posgrado en Ciencias Químicas.

Al financiamiento por el proyecto PAIP 5000-9143.

A mi tutor el Dr. Andrés Navarrete Castro por su apoyo, comentarios, mejoras, tiempo y valiosas pláticas, así como los conocimientos brindados para realizar este proyecto.

A la Dra. Aracely E. Chávez Piña, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Enrique Hong Chong, por el préstamo del equipo estimulador para la realización de esta tesis.

A mis sinodales por el tiempo brindado en la revisión de la tesis.

Índice temático

Abreviaturas	9
1. Introducción	10
2. Marco Teórico	13
2.1 Modelo farmacológico de esófago	13
2.2 Dolor esofágico.....	15
2.3 <i>Heliopsis longipes</i>	16
2.4 <i>N</i> -alquilamidas	17
2.4.1 Capsaicina.....	19
2.4.1.1 Receptores TRP en el tratamiento del dolor.....	20
2.4.2 Piperina	21
3. Planteamiento del problema	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. Metodología	26
6.1 Material vegetal	26
6.1.1 Preparación del extracto orgánico de <i>Heliopsis longipes</i>	26
6.1.2 Perfiles cromatográficos de <i>H. longipes</i>	26
6.1.3 Constantes espectroscópicas de <i>H. longipes</i>	27
6.2 Fármacos	27
6.3 Animales de experimentación	28
6.4 Bioensayos	28
6.4.1 Disección del esófago y preparación del tejido	28
6.4.2 Administración de los tratamientos	29
6.4.2.1 Efecto de fármacos sobre la respuesta contráctil inducida eléctricamente.....	29
6.4.2.2 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas de <i>H. longipes</i> sobre la respuesta de fármacos moduladores de canal TRP.....	30
6.4.2.3 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamida de <i>H. longipes</i> sobre la respuesta de fármacos moduladores de canales KCNK.....	30
6.4.2.4 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas de <i>H. longipes</i> sobre la respuesta de GABA.....	31
6.4.2.5 Cuantificación de la respuesta contráctil.....	31
6.5 Análisis de datos experimentales.....	31

7. Resultados	32
7.1 Perfiles cromatográficos de <i>H. longipes</i>	32
7.2 Bioensayos	42
7.2.1 Administración de los tratamientos	42
7.2.2 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas sobre la respuesta contráctil inducida eléctricamente	45
7.2.3 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas en presencia de GABA	47
7.2.4 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas en presencia de capsaicina	48
7.2.5 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas en presencia de capsazepina	49
7.2.6 Efecto de capsaicina en presencia de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas	50
7.2.7 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas en presencia de mentol	51
7.2.8 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas en presencia de piperina	52
7.2.9 Efecto de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas en presencia de bupivacaina	53
8. Discusión de resultados	56
9. Conclusión	64
10. Referencias	65

Índice de Imágenes

Imagen 1. Estructuras químicas de las <i>N</i> -alquilamidas objeto de estudio.....	12
Imagen 2 Anatomía del esófago (obtenido y modificado de Kou W. et al., 2015).	13
Imagen 3. <i>Heliopsis longipes</i> . (a) Partes aéreas y (b) raíces (Imagen tomada y modificada de López-Bucio et al., 2006)	16
Imagen 4. Estructura química general de las alquilamidas (Obtenido y modificado de: Boonen et al., 2010).....	188
Imagen 5. Perfil cromatográfico por CCF de <i>H. longipes</i>	332
Imagen 6. Cromatograma de los componentes de <i>H. longipes</i>	33
Imagen 7. Espectro de masas del pico en tR= 5.070 min.....	34
Imagen 8. Espectro de masas del pico en tR= 5.749 min.....	35
Imagen 9. Espectro de masas del pico en tR=4.221 min....	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 10. Cromatograma de gases de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas provenientes de <i>H. longipes</i> . Se identifican dos picos principales.	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 11. Espectro de masas del pico 1.....	¡Error! Marcador no definido.7
Imagen 12 Patrón de fragmentación propuesto para la afinina (1).	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 13. Espectro del pico 2 obtenido a partir de la cromatografía de gases de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas provenientes de <i>H. longipes</i>	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 14 Patrón de fragmentación propuesto para el homoespilantol (2).	¡Error! Marcador no definido.8
Imagen 15 Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz/CDCl ₃) de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas (1)..	40
Imagen 16. Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz/CDCl ₃) de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas (1)	41
Imagen 17. Trazo obtenido del polígrafo para el control.....	42
Imagen 18. Trazo obtenido del polígrafo tras la administración de la mezcla de <i>N</i> -alquilamidas.....	43
Imagen 19. Ejemplo de las sustancias a evaluar	44
Imagen 20. Estructura química del antagonista TRPV1 capsazepina.....	61

Resumen

Las raíces de *Heliopsis longipes* (A. Gray Blake) comúnmente conocidas como chilcuague, son empleadas en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio y como analgésico y anestésico en el tratamiento de dolor muscular y dental. También se utiliza para el tratamiento de lesiones bucales y como antiparasitario e insecticida. Estos efectos se han atribuido a la *N*-alquilamida afinina, uno de sus componentes mayoritarios. Los diferentes estudios reportan que la afinina se aísla en forma pura y se le han atribuido propiedades como antimicrobiana, anestésica y analgésica, principalmente. Sin embargo, basados en las propiedades espectroscópicas y espectrométricas, obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas, en el presente trabajo se encontró que es una mezcla rica en *N*-alquilamidas, formada por lo menos de dos componentes principales (afinina y homoespilantol) y no sólo afinina como se ha reportado en numerosos artículos.

Partiendo de este conocimiento, se realizó la evaluación de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* sobre las contracciones inducidas eléctricamente en el nervio vago de esófago de rata, preincubando dicho nervio con diferentes moduladores de receptores de potencial transitorio (TRP), el canal GABA_A y canales de potasio de doble poro (KCNK) [capsaicina (100 µM), capsazepina (10 µM), piperina (200 mM), GABA (1 mM), mentol (64 mM) y bupivacaína (0.58, 1.7 y 5.8 mM)] y midiéndose la respuesta que se producía respecto al observado por la mezcla de *N*-alquilamidas administradas individualmente (22.1 µg/mL o 221 µg/mL), observándose que el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* disminuye al administrar a capsaicina (agonista TRPV1), piperina y bupivacaina (bloqueador de los canales de potasio de doble poro, KCNK). Sugiriendo que la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* podría estar actuando sobre canales KCNK además de los canales TRPV1.

Abstract

The roots of *Heliopsis longipes* (A. Gray Blake) commonly known as “chilcuague” are used in Mexican Traditional Medicine as treatment in respiratory tract diseases and as a treatment to relieve muscular and dental pain. They are also used for treatment buccal injuries, antiparasitic agent and insecticide. These pharmacological effects have been associated to the *N*-alkylamide affinine or spilanthol, one of the majoritarian secondary metabolites from *H. longipes*. Different pharmacological activities have been reported for affinina like antinociceptive activity, anesthetic and analgesic activity. Nevertheless, even though every article reports affinine as a pure molecule, based on the spectroscopic and spectrometric properties (specially in gas chromatography), the recent research in our laboratory showed that the *N*-alkylamide affinina reported as a pure molecule it is actually a complex mix of *N*-alkylamides compounds with at least two main components: affinine and homospilanthol.

In view of the above-mentioned reason, we evaluated the activity of the mix of *N*-alkylamides of *H. longipes* during electrically induced contractions on the vagus nerve of rat esophagus to be able to provide an insight into the possible mechanism of action. Firstly, we did the pre-incubation of the tissue with different agonist and antagonist for different ion channels such as, two members of the transient receptor potential (TRP) family of ion channels (TRPV1 and TRPM8), GABA receptor and two pore potassium channel (KCNK) [capsaicin (100 μ M), capsazepine (10 μ M), piperine (200 μ M), GABA (1 mM), menthol (64 μ M) and bupivacaine (0.58, 1.7 and 5.8 mM)] measuring the contractile response of the mix of *N*-alkylamides of *H. longipes* individually (22.1 μ g/mL or 221 μ g/mL) in comparison with the contractile response of the mix of *N*-alkylamides of *H. longipes* in the present of the agonist or antagonist afore mentioned. According to the obtained results, the effect of the mix of *N*-alkylamides of *H. longipes* decreases in presence of capsaicine (TRPV1 agonist), piperine, bupivacaine (two-pore potassium channel blocker KNCK), suggesting that the possible mechanism of action of the mix of *N*-alkylamides of *H. longipes* involves the action on KNCK and TRPV1 channels.

Abreviaturas

(±) EEM Error estándar de la media

°C Grado Celsius

ACN Acetonitrilo

ANOVA Análisis de varianza

Ca²⁺ Ión calcio

CDCl₃ Cloroformo deuterado

cm Centímetro

δ Desplazamiento químico

eV Electrón Volt

g Gramo

GABA Ácido gama aminobutírico

HPLC Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (High Pressure Liquid Chromatographic)

K⁺ Ión potasio

KCNK Canales de potasio de doble poro (Two-pore Domain Potassium Channels subfamily K)

μM Micrometro

MS Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry)

Na⁺ Ión sodio

SNC Sistema Nervioso Central

SSP Solución salina fisiológica

TRP Receptores de Potencial Transitorio (Transient Receptor Potential)

1. Introducción

El dolor en el pecho de tipo no cardíaco (DPNC) es común en la población mundial teniendo una prevalencia del 14 al 33% de acuerdo a distintas fuentes (Schey et al., 2007). Debido a que los síntomas son indistinguibles del dolor isquémico en miocardio, es necesario realizar una evaluación cardíaca para descartar ese padecimiento. Las manifestaciones de DPNC también son debidas a alteraciones gastrointestinales (GI), siendo la principal causa, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). Sin embargo, existen otros padecimientos que presentan manifestaciones de DPNC como son los desórdenes en la motilidad esofágica (ej. espasmo esofágico difuso), esófago cascanueces, contracciones de larga duración, ondas peristálticas múltiples, acalasia e hipersensibilidad esofágica (Fass and Achem, 2011).

El mecanismo del dolor en estos pacientes aún no está elucidado, pero se han propuesto varias causas como la hipersensibilidad central y periférica, anormalidades mecano-físicas en el esófago, y una contracción sostenida del músculo esofágico longitudinal. Para disminuir los síntomas ocasionados por estos padecimientos se emplean diferentes tratamientos farmacológicos, los cuales se dividen en dos grupos: los relacionados a ERGE y los no relacionados a ERGE (Melzer et al., 1995; Schey et al., 2007). Los padecimientos relacionados a ERGE son ocasionados principalmente por una sobreexposición a los contenidos gástricos, y se tratan con moduladores del contenido gástrico, los cuales regulan el pH gástrico y/o la secreción de ácido estomacal. La terapia alopática incluye a los fármacos antsecretorios antagonistas de los receptores de histamina de tipo 2 (H₂, ej. ranitidina), y a los inhibidores de la bomba de protones (ej. omeprazol) (Takeuchi and Nagahama, 2014).

Los padecimientos no relacionados a ERGE se caracterizan por presentar un desorden motor esofágico, por lo que su tratamiento se basa en la administración de relajantes musculares como nitratos, bloqueadores de los canales de calcio,

inhibidores de fosfodiesterasa tipo 5 (PDE 5), bromuro de cimetropio e hidralazina (Melzer et al., 1995; Schey et al., 2007).

La amplia gama de medicamentos disponibles para tratar el DPNC comparten como característica común la relajación de la musculatura esofágica. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas farmacológicas para tratar el DPNC con blancos de acción novedosos se ha extendido al estudio de la estimulación eléctrica del nervio vago, aunque ésta resulta una terapia invasiva y poco viable para su uso a largo plazo (Howland, 2014). Por otra parte, la estimulación química del nervio vago es prácticamente inexplorada, y las plantas medicinales son candidatos idóneos para el descubrimiento de productos naturales que posean esta actividad, y que a la larga pudieran ser de utilidad para el tratamiento de las alteraciones de la motilidad esofágica.

Una de las especies que se emplea en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de afecciones gastrointestinales es *Heliopsis longipes*, conocida comúnmente como chilcuague. Se ha reportado que esta planta posee diferentes actividades farmacológicas como antifúngica, antimicrobiana, analgésica y antiinflamatoria, entre otras (Escobedo-Martínez et al., 2017). La actividad biológica de extractos de esta planta ha sido atribuida a las *N*-alquilamidas (**Imagen 1**) afinina [espilantol, *N*-isobutil deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienamida (**1**)] y a su derivado metilado homoespilantol [*N*-(2-metilbutil) deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienamida (**2**)] (López-Bucio et al., 2006). Resulta de interés farmacológico que *N*-alquilamidas obtenidas de otras especies de plantas, tales como la capsaicina [8-metil-*N*-vainilil-trans-6-nonenamida (**3**)] y la piperina [1-[5-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2,4-pentadienil]piperidina) (**4**)] posean propiedades antiinflamatorias, analgésicas y anestésicas en modelos animales (Cariño-Cortés et al., 2010; Hernández et al., 2009; Tasleem et al., 2014), por lo que las *N*-alquilamidas de *Heliopsis longipes* pudieran tener las mismas propiedades, y por tanto emplearse como alternativa terapéutica para el dolor esofágico.

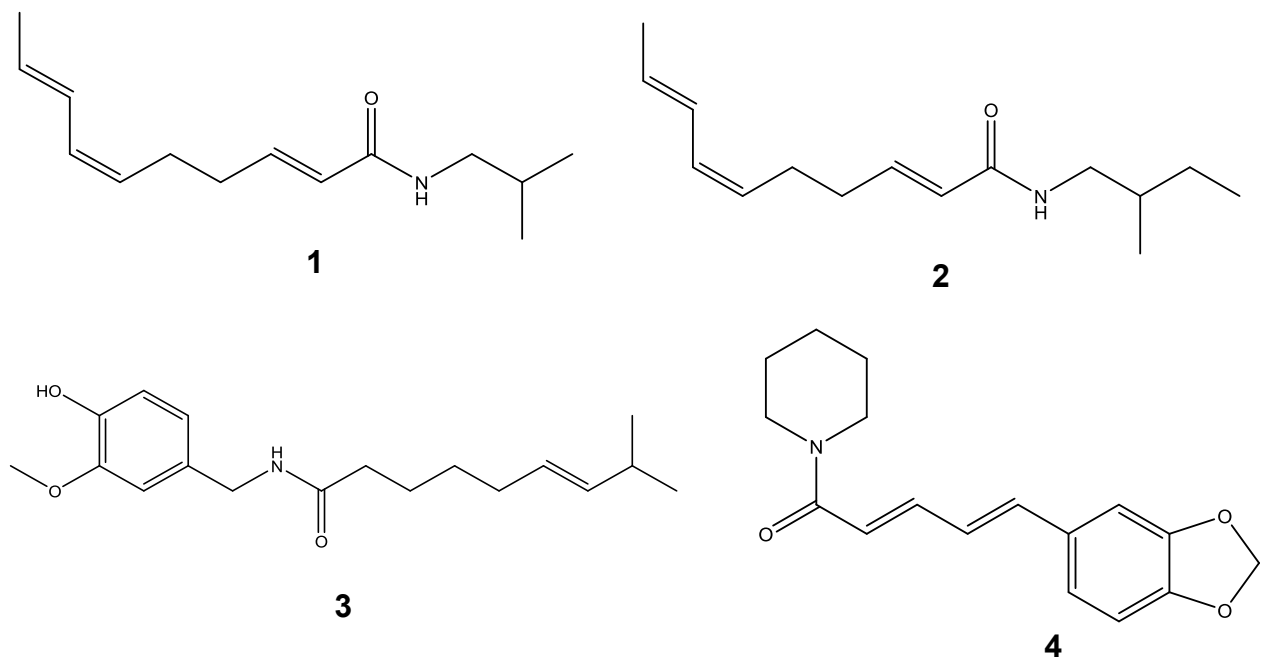


Imagen 1. Estructuras químicas de las *N*-alquilamidas objeto de estudio. 1= afinina; 2= homoespilantol; 3= capsaicina y 4= piperina.

2. Marco Teórico

2.1 Modelo farmacológico de esófago

El esófago es un tejido encargado del transporte de la comida desde la faringe hacia el estómago por medio de movimientos en forma de ondas peristálticas desde el inicio al término del esófago. En la parte inferior del esófago se encuentra el esfínter esofágico inferior (EEI), el cual permite el paso de los alimentos al estómago por la relajación transitoria del músculo liso en el esfínter. La deglución inicia un circuito que activa las neuronas en el centro de la deglución del tronco encefálico, el cual envía proyecciones a través del nervio vago hacia el EEI. En respuesta a la estimulación vagal, las neuronas mientéricas inhibitoras presentes en el músculo liso del EEI producen óxido nítrico (NO), provocando la relajación esofágica y permitiendo finalmente el paso de los alimentos al estómago (Romer et al., 2013). La parte externa del músculo esofágico consiste de tres partes: una capa externa longitudinal (estriada), una capa circular interna (lisa), y una capa mucosa que protege a los músculos del medio externo (Kerr et al., 1995; Page and Blackshaw, 1998; Shima et al., 2016) (**Imagen 2**).

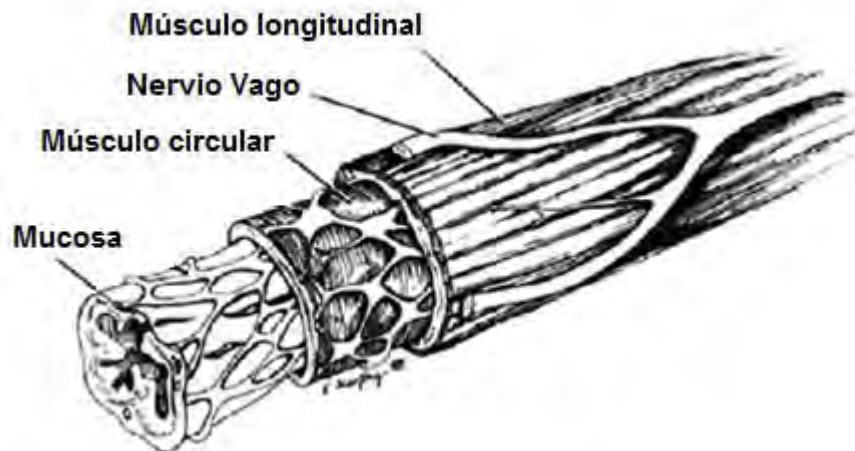


Imagen 2 Anatomía del esófago (obtenido y modificado de Kou et al., 2015).

La capa externa longitudinal del esófago difiere del músculo esquelético sistémico en la doble inervación vagal de sus uniones neuromusculares (Boudaka et al., 2007). Mientras que las capas musculares lisa y estriada del esófago están inervadas por fibras vagales y espinales, el epitelio del esófago está inervado preferentemente por el nervio vago (Page and Blackshaw, 1998). Los nervios sensoriales esofágicos detectan los estímulos resultantes de la actividad fisiológica del tejido, así como los estímulos asociados con daño tisular real o potencial (estímulos nocivos). Los nervios sensitivos capaces de discriminar estímulos nocivos se denominan nociceptores. La activación de los nociceptores puede iniciar reflejos defensivos y/o percepciones de incomodidad y dolor (Yu et al., 2005).

Las fibras espinales (nervios nociceptivos) detectan estímulos esofágicos nocivos que conducen a percepciones conscientes de pirosis y dolor; las fibras vagales participan en la regulación de las actividades fisiológicas del esófago. Sin embargo, se ha descrito que las fibras vagales también pueden mediar respuestas autónomas a estímulos nocivos, y modular la percepción de dolor y malestar originados en el esófago (Yu et al., 2005).

La estimulación eléctrica y química del nervio vago esofágico produce respuestas contráctiles tanto en la capa externa estriada como en la circular interna lisa, por lo que en un modelo *in vitro* es posible evaluar la actividad motora de ambas capas, incluso en segmentos aislados de esófago provenientes de diferentes modelos murinos (Kerr et al., 1995; Shima et al., 2016). El reflejo de la estimulación eléctrica sobre el nervio vago da como resultado la liberación del neurotransmisor endógeno acetilcolina, con la consecuente contracción de las capas musculares esofágicas. Este efecto puede inhibirse con la administración de capsaicina (Shima et al., 2016).

Los distintos modelos de órgano aislado reportados en la literatura permiten evaluar de forma directa sustancias exógenas moduladoras del nervio vago en esófago y examinar la quimiosensibilidad de los receptores vagales, evitando los procesos de distribución y biotransformación inherentes a los experimentos *in vivo* (Page and

Blackshaw, 1998). Estos modelos se han enfocado al estudio de los "mecanorreceptores de tensión", responsables de la detección del paso de los alimentos a través del esófago, y han omitido las respuestas vagales aferentes que se encargan de percibir estímulos nocivos en el esófago (Yu et al., 2005). Este punto es de vital importancia para la búsqueda de sustancias que actúen directamente en el nervio vago y que pretendan usarse para el tratamiento del dolor esofágico (Page and Blackshaw, 1998).

2.2 Dolor esofágico

El dolor esofágico se define como un dolor recurrente que no se puede distinguir del dolor isquémico cardiaco hasta después de un estudio que haya excluido una causa cardiaca (infarto al miocardio, angina inestable, disección aórtica, tromboembolismo pulmonar y taponamiento en el pericardio). Los pacientes con esta condición reportan dolor opresivo y quemante en el pecho que puede irradiarse a la espalda, cuello, brazos y mandíbula, por lo que no distinguen el origen del dolor, afectando la calidad de vida de quien lo padece sin impacto aparente en la mortalidad (Fass and Achem, 2011). A pesar del incremento del dolor esofágico entre la población, poco se conoce sobre este padecimiento. Los mecanismos precisos por los cuales se produce el dolor esofágico no están descritos en la literatura. Se conoce que el esófago contiene terminaciones nerviosas principalmente del nervio vago (izquierdo y derecho). Estas terminaciones detectan primordialmente los cambios en el pH y la presión que originan el dolor esofágico (Page and Blackshaw, 1998). Por tanto, la terapéutica existente está enfocada en neutralizar la acidez estomacal (reduciendo daño al esófago por el reflujo gastroesofágico), y en la disminución de la motilidad del tracto gastrointestinal (Schey et al., 2007).

Debido a la estrecha relación de los humanos con la naturaleza y al uso etnomédico de las plantas para aliviar el dolor de distintas causas, el estudio farmacológico y fitoquímico de las plantas usadas en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar el dolor permite el aislamiento y caracterización de los principios activos de estas

especies (*Piper nigrum*, *Capsicum annum*, *Panax ginseng*, *Cistus salviifolius*, *Heliopsis longipes*, *Agastache mexicana*, etc.). La Medicina Tradicional se basa en el conocimiento adquirido a través de los años y la práctica, y es fuente innegable de metabolitos secundarios útiles en el tratamiento del dolor, como la morfina y la salicina, de la que se deriva el ácido salicílico, extraídos de *Papaver somniferum* y *Salix alba*, respectivamente (Colvard et al., 2006). Por lo anteriormente descrito, el presente trabajo se enfocó al estudio farmacológico de la planta chilcuague, por sus propiedades analgésicas, anestésicas y antiinflamatorias relacionadas con la presencia de *N*-alquilamidas como metabolitos mayoritarios y activos.

2.3 *Heliopsis longipes*

Heliopsis longipes (A. Gray Blake) es una planta perteneciente de la familia Asteraceae comúnmente llamada chilcuague, pelitre, raíz de oro, raíz azteca, entre otros. Es una planta herbácea perene nativa de México principalmente de la región que comprende la Sierra Gorda, cerca del borde de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro (Escobedo-Martínez et al., 2017; Little, 1948). Crece entre 20 y 50 cm, sus tallos son ligeramente leñosos y en forma de arbusto, posee hojas opuestas, cortas, pecioladas y ovaladas (2 a 4 cm de largo) con borde dentado. Presenta inflorescencias amarillas. Las raíces, empleadas en la Medicina Tradicional Mexicana son distintivas de la planta, ya que son fasciculadas, delgadas (3 a 4 mm de diámetro), de color café claro y con una longitud que varía entre los 15 y los 30 cm (**Imagen 3**).

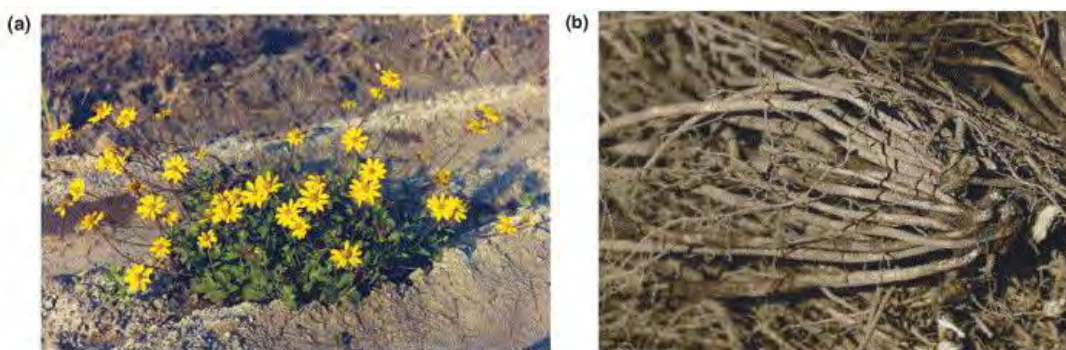


Imagen 3. *Heliopsis longipes*. (a) Partes aéreas y (b) raíces (Imagen tomada y modificada de López-Bucio et al., 2006)

Se ha reportado que si se mastica un pequeño segmento de la raíz (1-2 mm de largo), ya sea fresco o seco, se presenta entumecimiento, sensación pungente, anestesia, analgesia o parálisis en la boca o lengua, las cuales son perdurables por algunos minutos; además se estimula la secreción salival tras su consumo. En la región de la Sierra Gorda se emplea como condimento y en bebidas alcohólicas para incrementar el sabor. En las prácticas populares las raíces son utilizadas en enfermedades del tracto respiratorio (resfriados y neumonía), y como anestésico en el tratamiento de dolor muscular y dental (los dentistas han empleado el extracto etanólico para extraer piezas dentales, pero comúnmente se mastica la raíz seca), en lesiones bucales y como antiparasitario e insecticida. Las raíces se emplean como sustituto de la sensación pungente del chile. En preparados comerciales, los extractos de las raíces se incluyen en dentífricos, analgésicos orales en gel (Buccaldol® e Indolphar®), en cremas antiarrugas como sustituto del Botox®, y en preparados antienvjecimiento (Gatuline®, SYN®-COLL, ChroNOline™) (Barbosa et al., 2016).

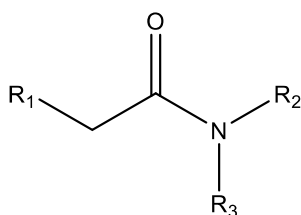
La composición química de las raíces de *H. longipes* ha sido reportada con anterioridad; se han identificado varias *N*-alquilamidas en la especie, siendo la afinina (**1**) la mayoritaria. Para la afinina se ha descrito que su actividad analgésica está dada por la liberación de GABA (Rios et al., 2007) por activación de receptores endocannabinoides (Barbosa et al., 2016). Por otra parte, la actividad antihiperálgica de la afinina en el modelo de edema plantar inducido por carragenina se atribuyó a la activación de la vía NO-GMPc-K⁺ (Acosta-Madrid et al., 2009).

2.4 *N*-alquilamidas

El interés biomédico sobre las *N*-alquilamidas se ha incrementado notoriamente desde hace veinte años. Este grupo de moléculas bioactivas derivadas de aminas contienen principalmente una cadena alifática de ácido graso poli-insaturado y un sustituyente corto unido al grupo amino (**Imagen 4**). En la naturaleza estos

compuestos son sintetizados por una gran cantidad de especies vegetales, y por hongos provenientes de los géneros *Calviceps*, *Penicillium* y *Aspergillus*. En mamíferos, las *N*-alquilamidas se encuentran en forma de ceramidas que actúan como agentes para el aislamiento y protección de la piel ante la pérdida de líquidos. Las moléculas representativas de las *N*-alquilamidas incluyen a los alcaloides ergotamina (de origen fúngico), capsaicina y piperina (ambos de origen vegetal).

R₁= Cadena alifática, que generalmente contiene unidades de carbono insaturadas con o sin sustituyentes directos (N, O, S, Ph) incorporado o no en un sistema cíclico con R₂



R₂= Cadena alifática, comúnmente isobutilamida, metilbutilamida, feniletilamida, tiramina, derivado de piperidina o pirrolidina, con o sin sustituyentes directos (N, O, S, Ph). Puede incluir sustituyentes directos incorporados en algún ciclo con R₁

R₃= Comúnmente constituida por un hidrógeno o un grupo funcional metil, metoxi o hidroxilo.

Imagen 4. Estructura química general de las alquilamidas (Obtenido y modificado de: Boonen et al., 2010).

Se ha reportado la existencia de este tipo de compuestos en al menos 26 familias vegetales que comprenden a más de 100 especies. Los principales géneros empleados como fuente de *N*-alquilamidas son *Echinaceae*, *Zanthoxylum*, *Capsicum*, *Piperaceae*, *Spilanthes* y *Heliopsis* (Boonen et al., 2010). Las funciones metabólicas de las *N*-alquilamidas se relacionan al desarrollo de raíces (Ramírez-Chávez et al., 2004), la formación de flores (Facchini et al., 2002), y, además en algunos, casos suponen la base para las capacidades defensivas o de protección de las plantas, tal es el caso de la pungencia de los capsacinoideos (Molina-Torres et al., 2004; Tewksbury et al., 2008).

Se ha reportado que las *N*-alquilamidas se usan como agentes saborizantes, como suplemento alimenticio para estimular el sistema inmune, como antimicóticas,

antiparasitarias, insecticidas, y también se han empleado para el tratamiento de úlceras bucales (Correa et al., 1971; De Spiegeleer et al., 2013)

2.4.1 Capsaicina

La capsaicina es el componente pungente de los chiles, es un alcaloide (capsaicinoide) encontrado en las plantas del género *Capsicum*. Es un sólido blanquecino liposoluble, inoloro, y con sabor pungente con un punto de fusión de 62–65 °C y un peso molecular de 305.4 g/mol. La capsaicina es soluble en etanol y otros disolventes orgánicos (Kasting, 2001). Está presente en los tejidos de la placenta que contienen las semillas y probablemente actúa como un elemento persuasivo contra los herbívoros. Cuando la capsaicina entra en contacto con tejidos de mamíferos causa sensación de ardor.

La capsaicina se une al receptor de potencial transitorio variante 1 (TRPV1) o mejor conocido como receptor vainilloide (Hayman and Kam, 2008). Este receptor es un canal iónico con alta permeabilidad a cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y a los monovalentes como Na^+ . Es activado por calor, protones, endovainilloides, endocannabinoides y mediadores inflamatorios, así como por venenos. La capsaicina se une al sitio alostérico del canal modulando la apertura del mismo y permitiendo el flujo de cationes a través de la membrana. (Díaz-Franulic et al., 2016). En el sistema nervioso periférico se ha observado que TRPV1 contribuye a la transmisión de la sensación térmica, química, de dolor e inflamatoria (Anwar and Derbenev, 2013).

Recientemente, la capsaicina ha despertado el interés en las terapias de procesos dolorosos ya que puede desensibilizar al nervio evitando la sobreestimulación debido a la disminución de la sustancia P en las terminaciones nociceptivas. De forma breve, el mecanismo antinociceptivo de la capsaicina inicia con la activación de los receptores TRPV1 (sensación de ardor), y posteriormente la depleción de la sustancia P que inicia la desensibilización en un grupo pequeño de neuronas. Los

nervios sensoriales se vuelven insensibles a la percepción de estímulos químicos, nocivos y calor. Además se pierde la capacidad de liberar mediadores involucrados en la neurotransmisión e inflamación. La suma de estos fenómenos conduce a la analgesia (Hayman and Kam, 2008).

2.4.1.1 Receptores TRP en el tratamiento de dolor

Los receptores TRP están distribuidos a lo largo de todo el organismo y median el flujo a través de la membrana de cationes, elevando las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y Na^+ lo que provoca una despolarización de la célula. Los cambios en el potencial de membrana propagan el potencial de acción e influyen en la contracción muscular al activar proteínas efectoras sensibles a Ca^{2+} . Los receptores TRP son canales compuestos por seis dominios transmembranales (TM) con un poro en los dominios S5 y S6 y muestran poca selectividad para cationes como Na^+ y Ca^{2+} . Existen por lo menos 7 subfamilias de receptores TRP de las cuales se destacan la subfamilia TRPA, TRPM, y TRPV (Flockerzi, 2007).

El receptor de potencial transitorio de melastina (TRPM) se subdivide a su vez en 8 miembros. Estos canales son permeables a Ca^{2+} y Mg^{2+} . El canal TRPM8 es comúnmente activado por el mentol, eucaliptol y las temperaturas bajas (<25 °C). Del mentol se ha reportado que se emplea como bálsamo en el tratamiento del dolor ocasionando un efecto refrescante seguido de un efecto analgésico. El canal TRPM8 está localizado en neuronas sensoriales y funge como sensor de temperaturas bajas.

El canal TRPV debe su nombre a que los agonistas de este canal contenían en su estructura un residuo vanilloide se expresa principalmente en neuronas del sistema nervioso periférico, como en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, de los ganglios trigeminal y torácico vagal y en fibras sensoriales C y A δ , pero también se encuentra en el sistema nervioso central. Este receptor se ha relacionado con procesos fisiológicos como la detección de estímulos dolorosos y la generación de

procesos de inflamación. Se ha comprobado la actividad antinociceptiva del receptor TRPV1 en el modelo de hiperalgesia térmica. Además se ha reportado que la actividad analgésica ejercida por diversos agonistas sobre TRPV1 se debe a la desensibilización del canal, tal es el caso del alcanfor, el cual es un analgésico tópico utilizado tradicionalmente para el tratamiento del dolor. El alcanfor es un agonista TRPV1 actuando en sistemas de expresión heterólogos y en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, provocando una rápida desensibilización del receptor de manera irreversible a diferencia de la capsaicina que es reversible (Salazar et al., 2009).

2.4.2 Piperina

La pimienta negra (*Piper nigrum*) es la especia más consumida alrededor del mundo por sus características pungentes y de estremecimiento en la percepción orosensorial (Beltrán et al., 2017; López et al., 2016). La piperina es el alcaloide mayoritario del fruto de la pimienta, y al igual que la capsaicina, es también una *N*-alquilamida. El uso tradicional de esta especie es para tratar padecimientos como fiebre, dolor, e inflamación (Tasleem et al., 2014). La piperina se ha investigado por diferentes propiedades, entre las que se destacan el incremento de la biodisponibilidad de varios fármacos (por inhibición de la glicoproteína P humana y el citocromo P450 3A4), y la estimulación de la liberación de adrenalina (Mujumdar et al., 1990; Vijayakumar et al., 2004).

Uno de los mecanismos de acción descritos para la piperina es la activación de los canales TRPV1 y TRPA1 (Beltrán et al., 2017). Algunos autores describen su acción en la lengua, en donde primero causa la activación de los receptores TRPV1 provocando una irritación, y posteriormente una desensibilización o taquifilaxia; sin embargo este efecto es 'superable' mediante la aplicación de estímulos recurrentes, tanto para capsaicina como para piperina (Dessirier et al., 1999).

Recientemente se ha demostrado que la piperina también inhibe la actividad basal de algunos canales de potasio de doble poro (KCNK). Los KCNK se abren selectivamente permitiendo el flujo de iones K^+ al interior de las células, manteniendo el potencial de membrana en reposo. La piperina bloquea la actividad de los canales tipo 3 (KCNK3), tipo 9 (KCNK9) y tipo 18 (KCNK18), produciendo una disminución de la actividad basal de éstos, incrementando como consecuencia la sensibilidad hacia los estímulos nocivos (Beltrán et al., 2017).

Este fenómeno de disminución de la actividad basal de KCNK es similar al producido por el anestésico local bupivacaína, que bloquea a estos canales de forma reversible, impidiendo la generación y propagación de los potenciales de acción. Al exponer el nervio a un anestésico local se genera una sensación casi inmediata de alivio del dolor, la cual es reversible y de corta duración. Otro anestésico local utilizado comúnmente en la clínica, es la lidocaína que actúa bloqueando los canales de Na^+ impidiendo la generación del potencial de acción e induciendo anestesia (Shin et al., 2014). Por otra parte, se ha reportado que el efecto anestésico de la lidocaína es más duradero si se administra con un extracto de las raíces de *Ottonia anisum*, una planta de la familia Piperaceae. Este extracto contiene piperina, y se propuso que esta *N*-alquilamida actúa sobre KCNK potenciando la acción de lidocaína (López et al., 2016).

3. Planteamiento del problema

En la Medicina Tradicional Mexicana se emplean diversas plantas en el tratamiento del dolor. Este es el caso de *Heliopsis longipes*, de la cual se utilizan las raíces para aliviar el dolor muscular y dental, y como anestésicas. El principio activo reportado de *H. longipes* es la *N*-alquilamida afinina (Escobedo-Martínez et al., 2017).

La actividad biológica de las *N*-alquilamidas ha sido estudiada en diferentes modelos experimentales *in vivo* y se ha descrito que actúan sobre numerosos blancos moleculares. Se ha propuesto que los metabolitos de *H. longipes* actúan sobre los receptores de potencial transitorio (TRP) al igual que la capsaicina y la piperina. Los receptores TRP se encuentran ampliamente distribuidos en órganos y en las inervaciones del SNC y tienen un papel fundamental en la transmisión de los estímulos nociceptivos.

Como parte de los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo para establecer los principios activos, y elucidar los mecanismos de acción antinociceptivos de especies medicinales de amplio uso entre la población mexicana, el presente trabajo propuso establecer la actividad de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* y su mecanismo de acción en el modelo de estimulación eléctrica del nervio vago en esófago de rata.

4. Hipótesis

De acuerdo con el efecto anestésico reportado para *Heliopsis longipes*, la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes*, antagonizará las respuestas contráctiles esofágicas inducidas por los moduladores TRP capsaicina, piperina y mentol. Así mismo, reducirá su efecto por capsazepina y, aumentará el efecto del modulador de los canales de potasio de doble poro bupivacaína, e incrementará el efecto de GABA en un modelo de estimulación eléctrica sobre el nervio vago de esófago de rata.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* sobre las contracciones inducidas eléctricamente, en presencia de moduladores TRP (capsaicina, piperina, capsazepina y mentol), canales de potasio de doble poro (bupivacaína) y GABA en el modelo de esófago de rata.

5.2 Objetivos particulares

- a. Identificar los componentes mayoritarios de un extracto orgánico diclorometano/acetona 9:1 de *H. longipes* empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).
- b. Aislar mediante técnicas cromatográficas convencionales a las *N*-alquilamidas mayoritarias del extracto orgánico de *H. longipes*.
- c. Caracterizar espectroscópicamente y espectrométricamente a las *N*-alquilamidas mayoritarias del extracto de *H. longipes*.
- d. Determinar el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas aisladas de *H. longipes* sobre las contracciones inducidas eléctricamente, en presencia de los agonistas TRP capsaicina, piperina y mentol y el antagonista TRP capsazepina en el modelo de esófago de rata.
- e. Determinar el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas aisladas de *H. longipes* sobre las contracciones inducidas eléctricamente en esófago de rata en presencia del bloqueador del canal de potasio de doble poro bupivacaína, y de GABA.

6. Metodología

6.1 Material vegetal

Las raíces secas de *Heliopsis longipes* fueron una donación de Laboratorios MIXIM S.A. de C.V., con lote 6702. El material vegetal fue posteriormente pulverizado utilizando un molino manual.

6.1.1 Preparación del extracto orgánico de *Heliopsis longipes*

El extracto orgánico se preparó utilizando 1012 g de raíces pulverizadas de *H. longipes* a través de extracción continua utilizando Soxhlet con una mezcla de diclorometano/acetona 9:1. El extracto de color ámbar fue llevado a sequedad con ayuda de un rotaevaporador, dando un peso total de 19.3 g. El rendimiento del extracto fue 1.91%, se mantuvo en refrigeración a 5 °C.

6.1.2 Perfiles cromatográficos de *H. longipes*

La obtención de la fracción rica en *N*-alquilamidas de *H. longipes* inició con 2 g del extracto orgánico que se fraccionaron en una columna abierta de fase normal utilizando gel de sílice 60-200 Mesh. Los gradientes de polaridad utilizados fueron: hexano/acetato de etilo 9:1, 8:2, 7:3 y 4:6. Se obtuvieron 60 fracciones primarias, colectándose las fracciones 12-17 (polaridad 9:1 y 8:2) las cuales se compararon con una referencia de afinina en cromatoplasmas de sílice sobre aluminio (60 F254, Merck), y utilizando como revelador *p*-anisaldehído.

Se realizaron análisis de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masa (MS), empleando como fase estacionaria la columna C18 de 15 cm de longitud, tamaño de partícula 5 µm y una elución de tipo

gradiente usando una fase binaria de acetonitrilo:agua ácida (ácido fórmico 0.1% v/v), velocidad de flujo 0.4 mL/min, de acuerdo a la tabla siguiente:

Tabla 1. Elución por gradiente empleado en HPLC

Tiempo (min)	% ACN	% H ₂ O acidulada
0	80	20
1	80	20
4	100	0
8	100	0
10	80	20
12	80	20

Por otra parte, se obtuvieron perfiles cromatográficos usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas usando un espectrómetro de masas Leco Tiempo de Vuelo, modelo Pegasus 4D acoplado a un cromatógrafo de Gases Agilent modelo 6890N. Se empleó una columna capilar DB5 20 m × 0.18 mm × 18 micras. Se utilizó el programa cromatográfico: 100 °C (3 min), 20 °C/min hasta 300 °C durante 10 min. La temperatura del inyector fue de 300 °C y la temperatura de la cámara de ionización 200 °C. Se utilizó una relación split 1:200 y un volumen inyectado de 1 µL. El voltaje de ionización de los espectros de masas fue de 70 eV.

6.1.3 Constantes espectroscópicas de *H. longipes*

La fracción 12-17 fue analizada en resonancia magnética nuclear monodimensional (CDCl₃, RMN-¹H 400 MHz y RMN-¹³C, 100 MHz), empleando un espectrómetro Varian Modelo VNMRS de 9.4 T.

6.2 Fármacos

La capsaicina y capsazepina fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis Mo. USA), estos fármacos fueron solubilizados en una solución de Tween 80 al 0.5% y solución modificada de Krebs-Henseleit (KHS, mM: NaCl 136.9, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 2.1, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 1.9 y glucosa 5.5) respectivamente. La bupivacaína se obtuvo de la marca comercial Buvacaína® (ampolleta, inyectable)

de los laboratorios Pisa S.A. de C.V., las diluciones se realizaron en agua purificada calidad cromatográfica obtenida del purificador de agua Mili-Q system (Millipore S.A. de C.V., México) manteniéndose las condiciones de estabilidad. El ácido gama amino butírico (GABA) se obtuvo de Sigma®, y se solubilizó en solución salina. Los cristales de mentol utilizados fueron de grado farmacéutico, y la piperina fue extraída previamente de *Piper nigrum* en el laboratorio 126 de la Facultad de Química por el método de reflujo con diclorometano. El mentol y la piperina fueron solubilizados en una solución de Tween al 0.5%. El pentobarbital sódico fue adquirido como solución inyectable para uso veterinario de los laboratorios PISA agropecuaria (Pisabental®).

6.3 Animales de experimentación

Para realizar los experimentos se utilizaron ratas macho Wistar obtenidas comercialmente del Centro UNAM-Envigo con un peso corporal entre 250–300 g. Los animales fueron mantenidos a temperatura ambiente con libre acceso a agua y alimento chow, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Los procedimientos involucrados en el cuidado y manejo de los animales se realizaron conforme lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y poseen la aprobación institucional de la Facultad de Química (CICUAL/241/17).

6.4 Bioensayos

6.4.1 Disección del esófago y preparación del tejido

Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/Kg i.p.). Se colocó el cuerpo boca arriba y se retiró la piel desde el tórax hasta la mandíbula del lado derecho. Las capas musculares se retiraron para exponer el músculo esternohioideo. Posteriormente, se removió el músculo para exponer la bifurcación de la carótida. Con ayuda de aparatos retractores se realizó la disección del nervio vago. Éste se encuentra junto a la arteria carótida y sigue el camino por el cuello. Se diseccionó alrededor de la carótida y por encima del corazón. En todo

momento, se mantuvo humectado el tejido con KHS modificada. Posteriormente en una caja de Petri con KHS modificada se colocó el esófago con el nervio vago, el cual mide 2-3 cm de longitud. Con ayuda de un estereoscopio (x6) se eliminaron los nervios troncales que no tenían la apariencia característica del nervio vago (anillada y ligeramente plateada). Cada preparación contenía dos segmentos de nervio vago. El esófago se mantuvo a 35 ± 1 °C con burbujeo constante de gas carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂). Este procedimiento no duró más de 20 minutos.

El esófago se colocó entre dos anillos de nicromel, uno conectado a la cámara y el otro a un transductor de fuerza (Grass FT 03E). La tensión inicial fue de 1 g y la preparación de órgano aislado se equilibró por 30 minutos. Se realizó una estimulación eléctrica a uno de los segmentos de nervio vago a 0.5 cm de distancia del tejido usando un electrodo ubicado sobre la cámara de órgano aislado, usando pulsos cuadrados de 1.5 volts con una duración de 0.5 ms en intervalos de 1 segundo. Se registró la respuesta contráctil inducida eléctricamente durante 10-15 min; esta respuesta se consideró como control. Transcurrido este tiempo se procedió a la administración de los tratamientos. Cada experimento *in vitro* duró menos de 4 horas y cada porción de nervio vago de esófago se utilizó para un solo experimento (Shiina et al., 2013, 2012; Shima et al., 2016).

6.4.2 Administración de los tratamientos

6.4.2.1 Efecto de fármacos sobre la respuesta contráctil inducida eléctricamente

Para cuantificar el efecto de los fármacos capsaicina, capsazepina, piperina, GABA, mentol, y bupivacaína, sobre la contractilidad inducida eléctricamente, se inició con una estimulación eléctrica de 1 minuto a un segmento del nervio vago. Tras el minuto de estimulación, se adicionaron 10 µL de las soluciones del fármaco a evaluar. Las concentraciones utilizadas fueron: capsaicina (100 µM), capsazepina (10 µM), piperina (200 mM), GABA (1 mM), mentol (64 mM) y bupivacaína (0.58, 1.7 y 5.8 mM). La mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* se evaluó en las

siguientes concentraciones: 0.22, 2.21, 22.1, 221 µg/mL. Se registró la respuesta de cada sustancia de prueba durante 150 segundos. El tejido se lavó con KHS modificada por 3 minutos y se dejó en reposo por 30 minutos.

6.4.2.2 *Efecto de la mezcla de N-alquilamidas de H. longipes sobre la respuesta de fármacos moduladores de canales TRP*

Se inició con una estimulación eléctrica de 1 minuto a un segmento del nervio vago. Tras el minuto de estimulación, se adicionaron sobre el nervio vago 10 µL del modulador TRP capsaicina (100 µM) y se registró durante 150 segundos la respuesta. Luego de este tiempo, se adicionaron 10 µL de la mezcla de N-alquilamidas de *H. longipes* (22.1 µg/mL y/o 221 µg/mL) y se continuó el registro durante 150 segundos más. El tejido se lavó con KHS modificada por 3 minutos y se dejó descansar durante media hora. Este procedimiento se repitió variando el modulador TRP, es decir, empleando capsazepina (10 µM), piperina (200 mM), y mentol (64 mM) en lugar de capsaicina. Estos experimentos se realizaron en preparaciones individuales y por triplicado (Shiina et al., 2012).

6.4.2.3 *Efecto de la mezcla de N-alquilamidas de H. longipes sobre la respuesta de fármacos moduladores de canales KCNK*

Como en el experimento anterior, se comenzó con una estimulación eléctrica de 1 minuto a un segmento del nervio vago. Tras el minuto de estimulación, se adicionaron 10 µL del bupivacaína (0.58, o 1.7, o 5.8 mM) y se registró durante 150 segundos la respuesta. Luego de este tiempo, se adicionaron 10 µL de la mezcla de N-alquilamidas de *H. longipes* (22.1 µg/mL y/o 221 µg/mL) y se continuó el registro durante 150 segundos más. El tejido se lavó con KHS modificada por 3 minutos y se dejó descansar durante media hora. Estos experimentos se realizaron en preparaciones individuales y por triplicado.

6.4.2.4 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* sobre la respuesta de GABA

Se realizó el mismo procedimiento de estimulación descrito en los incisos anteriores, pero empleando 10 μ L de GABA (1 mM) y 10 μ L de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* (22.1 μ g/mL). Luego de la obtención de los registros, el tejido se lavó con KHS modificada por 3 minutos y se dejó en reposo durante media hora. Estos experimentos se realizaron en preparaciones individuales y por triplicado.

6.4.2.5 Cuantificación de la respuesta contráctil

A partir de cada experimento se obtuvieron los gramos fuerza de contracción en intervalos de 10 segundos. De esta manera, cada experimento consta de 15 puntos que representan cada uno el promedio de al menos 30 valores. Con los datos del registro control se obtuvieron los porcentajes de contracción de cada tratamiento. Posteriormente, se graficaron los cursos temporales (% de contracción vs. tiempo) de cada tratamiento, y se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) de cada fármaco.

6.5 Análisis de datos experimentales

Los datos de los bioensayos se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM) del ABC de los cursos temporales. Se establecieron diferencias significativas empleando análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una significancia de $p < 0.05$ y una prueba *post hoc* de Tukey, usando el software GraphPad Prism® versión 6.0.

7. Resultados

7.1 Perfiles cromatográficos de *H. longipes*

A partir de las raíces secas y molidas de *H. longipes* se preparó un extracto de naturaleza orgánica con diclorometano/acetona 9:1 empleando extracción con Soxhlet. El fraccionamiento primario del extracto orgánico empleando cromatografía en columna abierta, y la comparación cromatográfica en capa delgada de las fracciones primarias con un estándar de afinina permitió seleccionar la fracción 15-17 que poseía como constituyente a esta *N*-alquilamida (**Imagen 5**).

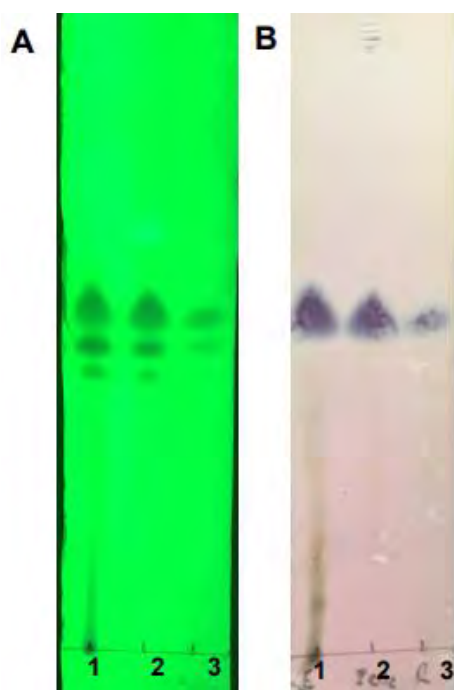


Imagen 5. Perfil cromatográfico por CCF de *H. longipes*. **A.** Perfil UV (254 nm). **B.** Solución reveladora de *p*-anisaldehído. En ambas placas: carril 1, extracto orgánico; carril 2, fracción 15-17 rica en *N*-alquilamidas; carril 3: afinina. Fase móvil: ciclohexano:acetona 6:4. Fase estacionaria: sílica gel sobre aluminio (Merck, tamaño de partícula: 5-20 μm).

La fracción 15-17 fue analizada empleando CLAE-ESI-EM. El cromatograma (base-peak chromatogram, BPC) de pico base obtenido se muestra en la **Imagen 6**.

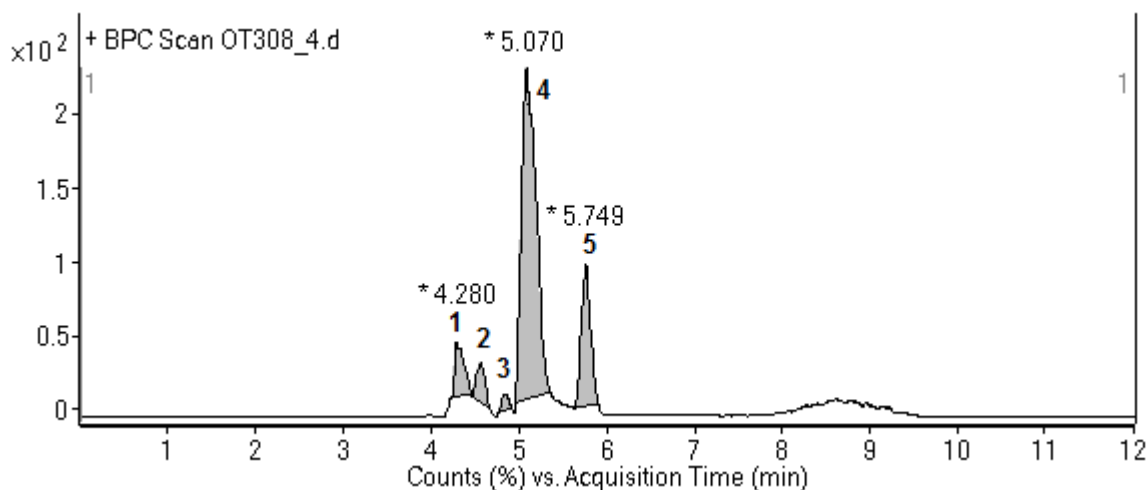


Imagen 6. Cromatograma de los componentes de *H. longipes*.

En el cromatograma se pueden observar cinco picos, a los cuales se calculó el porcentaje del área (**Tabla 2**). Los tres picos mayoritarios se encuentran en los tiempos de retención de 5.070 min (67.6% del área total), 5.749 min (18.4% del área total), y 4.280 min (7.4% del área total).

Tabla 2. Integración de los picos del cromatograma obtenido por HPLC.

Pico	Inicio (min)	Tiempo de retención (min)	Final (min)	Altura	Área	Área %
1	4.221	4.280	4.450	913330	6989307	7.4
2	4.460	4.550	4.665	666615	4598446	4.8
3	4.740	4.830	4.905	287736	1676970	1.8
4	4.945	5.070	5.349	5577988	64143861	67.6
5	5.634	5.749	5.894	2405127	17491906	18.4
Total					94900490	100

Se obtuvieron los espectros de masas de los tres picos mayoritarios por el método de electrospray (ESI). La comparación de estos espectros con lo reportado en la literatura (Boonen et al., 2010) permitió identificar a estos picos como las *N*-alquilamidas afinina (**1**), homoespilantol (**2**) y *N*-(2-metilbutil) undeca-2*E*-en-8,10-diinamida (**5**) (Imágenes 7 – 9).

Espectro 1. Afinina (*N*-isobutil deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienamida)

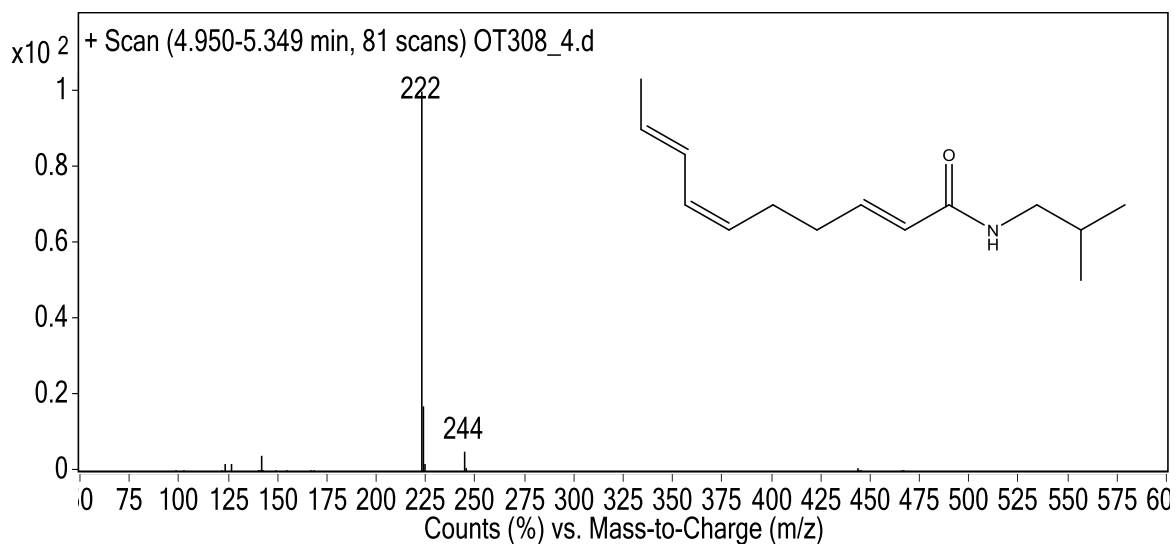


Imagen 7. Espectro de masas del pico 4 en tR= 5.070 min.

La afinina presenta el ion cuasi-molecular $[M+H]^+$ con m/z de 222, mientras que el pico 244 corresponde al aducto con sodio.

Espectro 2. Homoespilantol (*N*-(2-metilbutil) deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienamida) + afinina

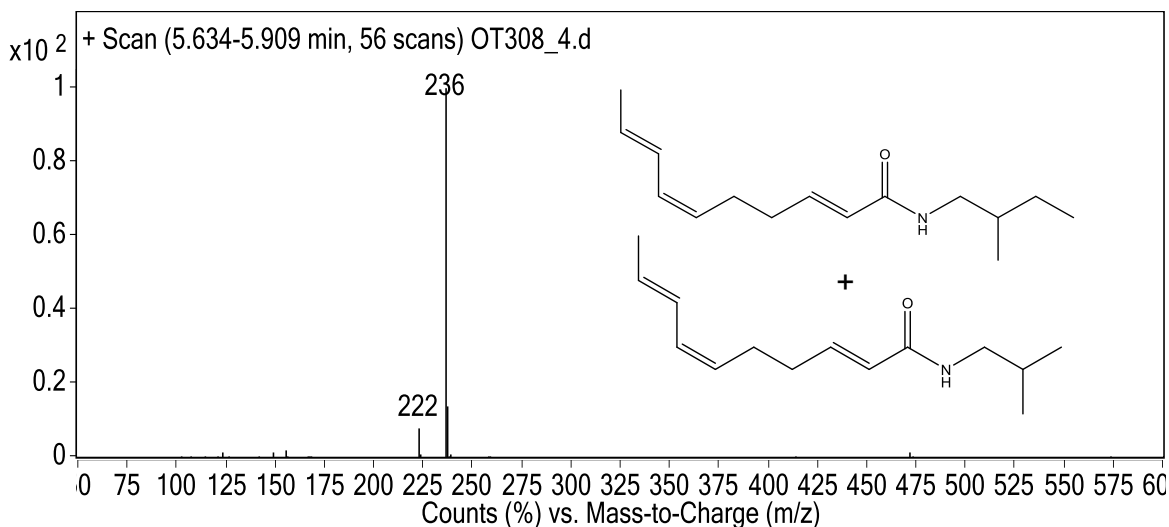


Imagen 8. Espectro de masas del pico 5 en $t_R = 5.749$ min

El homoespilantol (**2**) presenta el ion molecular $[M+H]^+$ con m/z de 236; también se observa a la afinina en la relación m/z de 222. El compuesto 2 posee un 27% de abundancia respecto a la afinina (**1**).

Espectro 3. *N*-(2-metilbutil) undeca-2*E*-en-8,10-diinamida

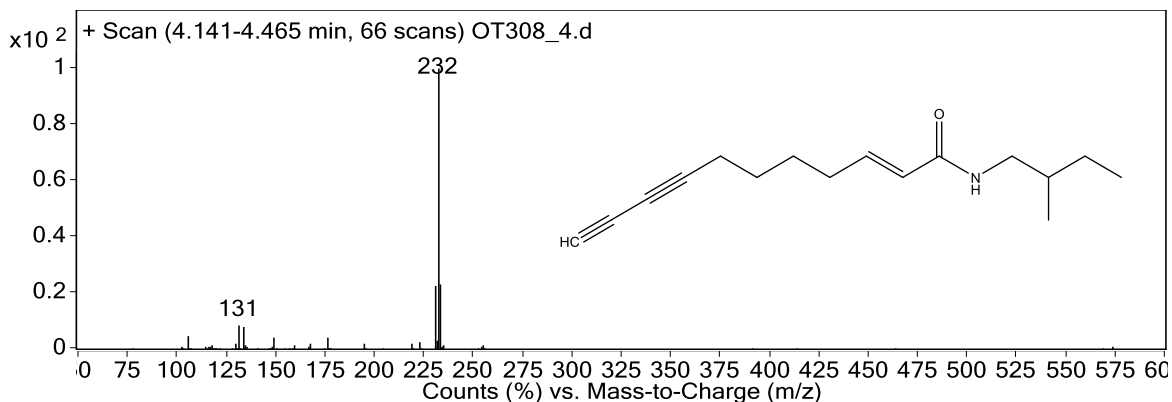


Imagen 9. Espectro de masas del pico 1 en $t_R = 4.221$ min.

El ion cuasi-molecular $[M+H]^+$ se observa con una relación m/z de 232. Esta *N*-alquilamida posee un 10.9% de abundancia respecto a la afinina (**1**).

La mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* fue analizado usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se obtuvo el siguiente cromatograma:

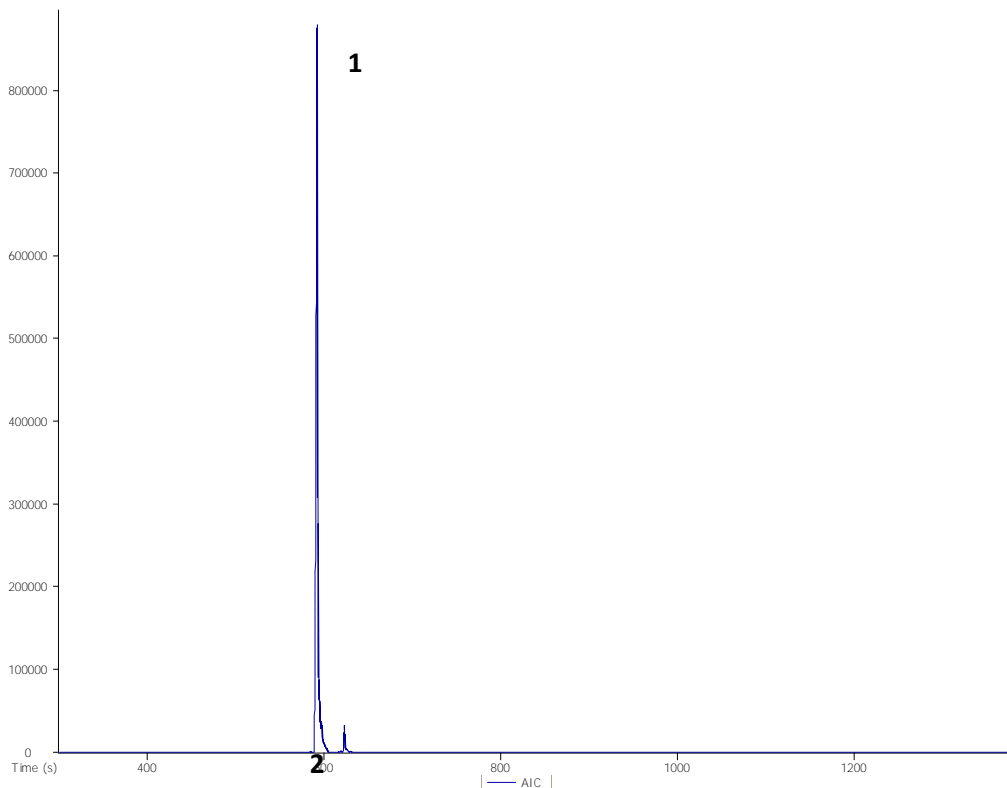


Imagen 10. Cromatograma de gases de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes*. Se identifican dos picos principales.

El análisis del espectro de masas del pico 1, permitió identificarlo como afinina (1), obteniéndose el siguiente patrón de fragmentación:

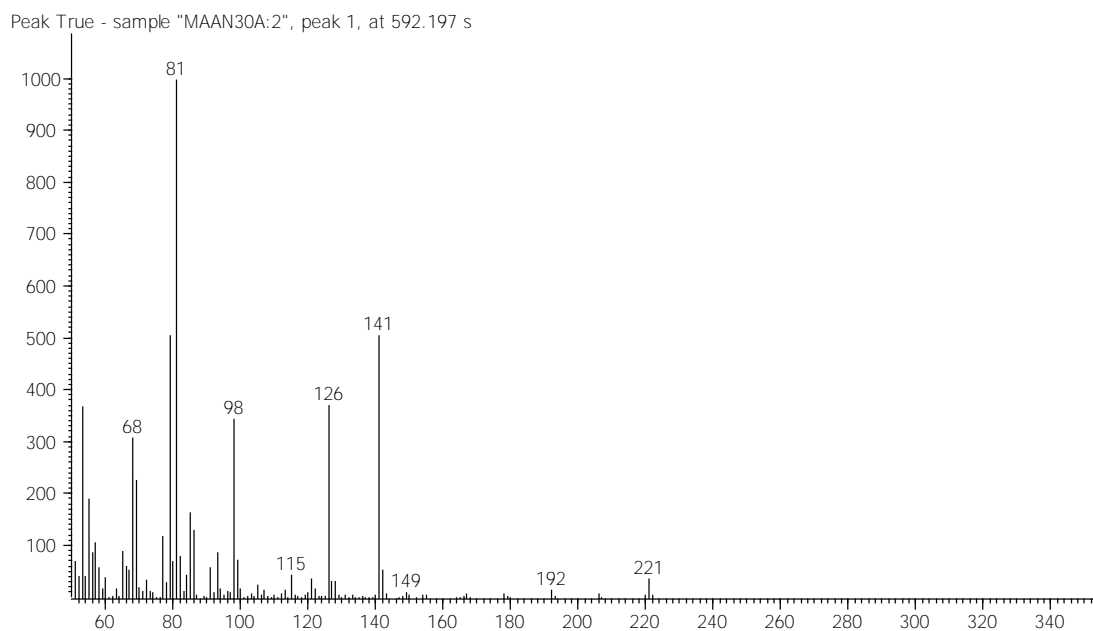


Imagen 11. Espectro de masas del pico 1.

El ion molecular en la relación m/z 221 corresponde al peso molecular de la afinina; los picos (m/z 81, pico base) y m/z 141 resulta de la ruptura de la cadena alifática en el carbono y al grupo amida (**Imagen 12**).

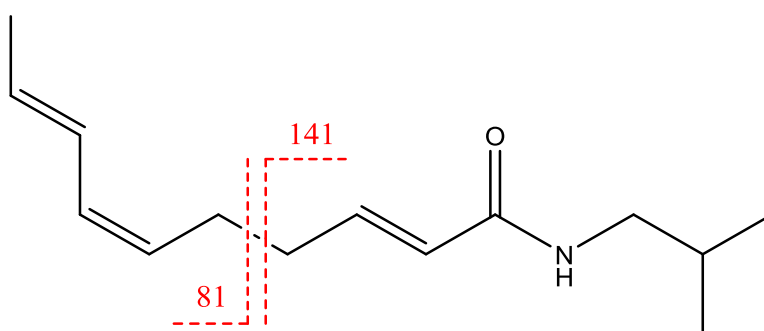


Imagen 12 Patrón de fragmentación propuesto para la afinina (1).

Por otra parte, el espectro de masas del pico 2 identificarlo como homoespilantol (**2**), obteniéndose el siguiente patrón de fragmentación:

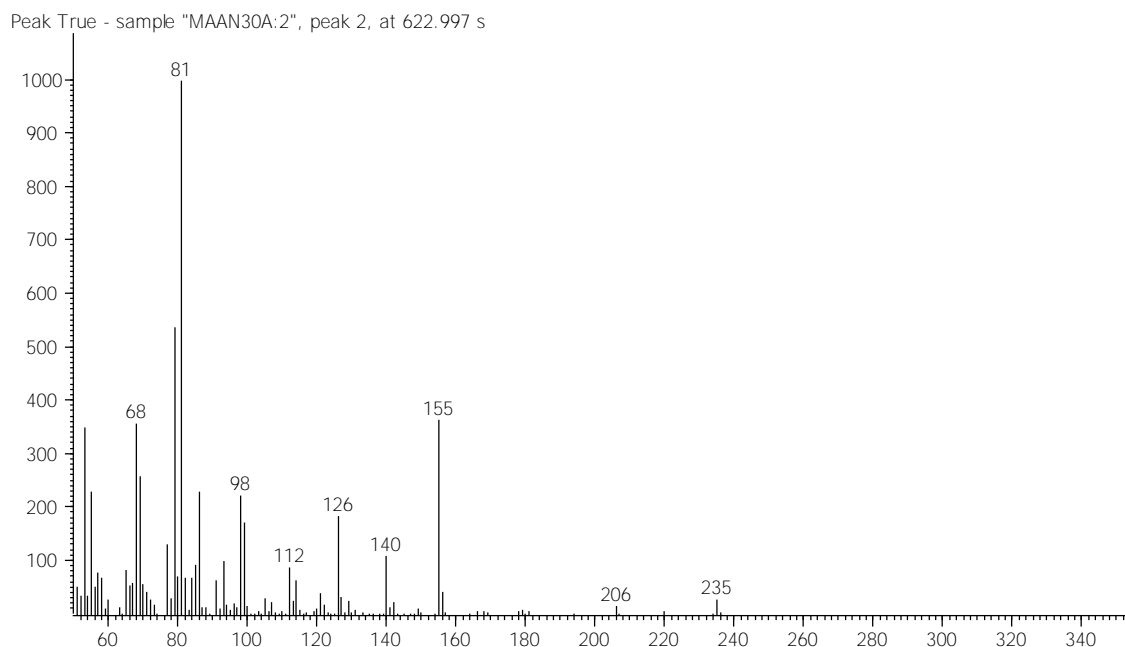


Imagen 13. Espectro del pico 2 obtenido a partir de la cromatografía de gases de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes*.

El ion molecular en la relación m/z 235 corresponde al peso molecular del homoespilantol (**2**); los picos (m/z 81, pico base) y m/z 155 resultan de la ruptura de la cadena alifática en el carbono γ y al grupo amida, el pico m/z 206 corresponde a la ruptura del grupo etilo en la cadena metiletilamida (**Imagen 14**).

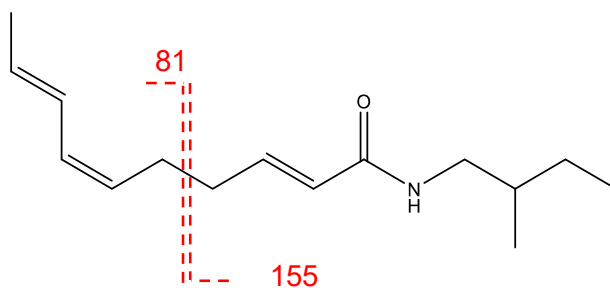


Imagen 14 Patrón de fragmentación propuesto para el homoespilantol (**2**).

El compuesto mayoritario de la fracción 12-17 se separó empleando cromatografía semi-preparativa, usando una mezcla de ciclohexano/acetona 85:15 como fase móvil. Los resultados de los experimentos monodimensionales de RMN obtenidos para este metabolito (**Tabla 3, Imágenes 15 y 16**) se compararon con los reportados en la literatura (Barbosa et al., 2016; Nakatani and Nagashima, 1992). Si bien se aprecia la presencia de un compuesto minoritario en los espectros monodimensionales, el compuesto mayoritario identificado resultó ser la afinina (**1**).

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN para la afinina (**1**) de *H. longipes* en CDCl_3 [^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz); ppm].

Posición	Afinina (1)		
	δ_c	tipo	δ_H (m)
1	166.1	C	-
2	124.3	CH	5.79 (dd)
3	143.7	CH	6.82 (dt)
4	32.3	CH ₂	2.27 (m)
5	26.5	CH ₂	2.27 (m)
6	127.8	CH	5.26 (m)
7	129.6	CH	5.97 (t)
8	126.9	CH	6.29 (m)
9	130.1	CH	5.68 (m)
10	18.5	CH ₃	1.76 (d)
1'	47.0	CH ₂	3.13 (dd)
2'	28.8	CH	1.76 (m)
3'	20.3	CH ₃	0.93 (d)
4'	20.3	CH ₃	0.93 (d)
H-N	-	-	5.51 (s)

Imagen 15 Espectro de RMN-¹H (400 MHz/CDCl₃) de la mezcla de *N*-alquilamidas (1)

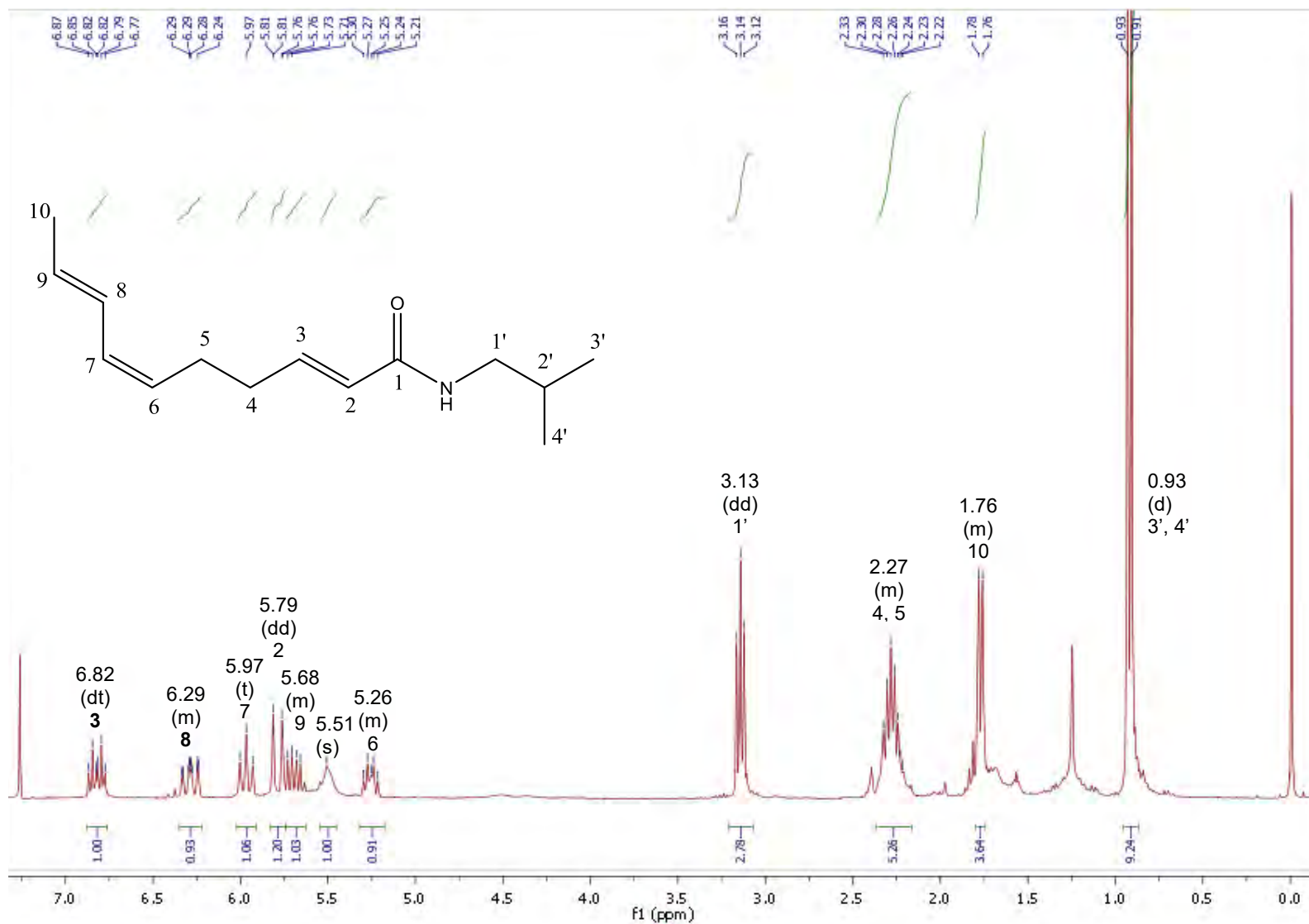
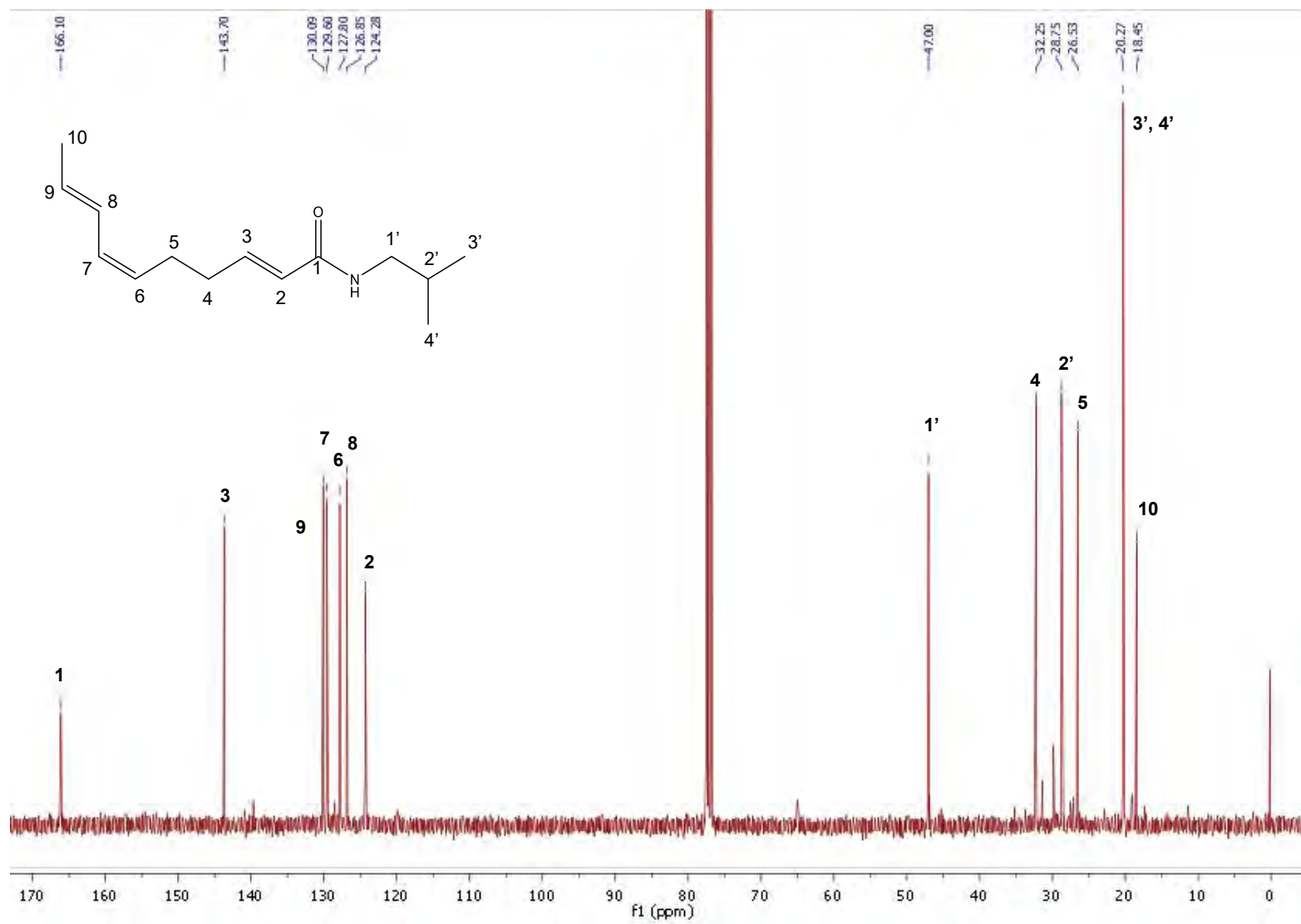


Imagen 16. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz/CDCl₃) de la mezcla de *N*-alquilamidas (1)



7.2 Bioensayos

7.2.1 Administración de los tratamientos

En la **Imagen 17** se muestra un ejemplo del trazo del polígrafo para los grupos control; cada 150 segundos se adicionó una solución de Tween al 0.5%. Esto con la finalidad de evaluar la contractilidad del esófago de rata mediante la estimulación eléctrica del nervio vago. Se observa que durante al menos 15 minutos el tejido mantiene estable la contractilidad inducida eléctricamente.

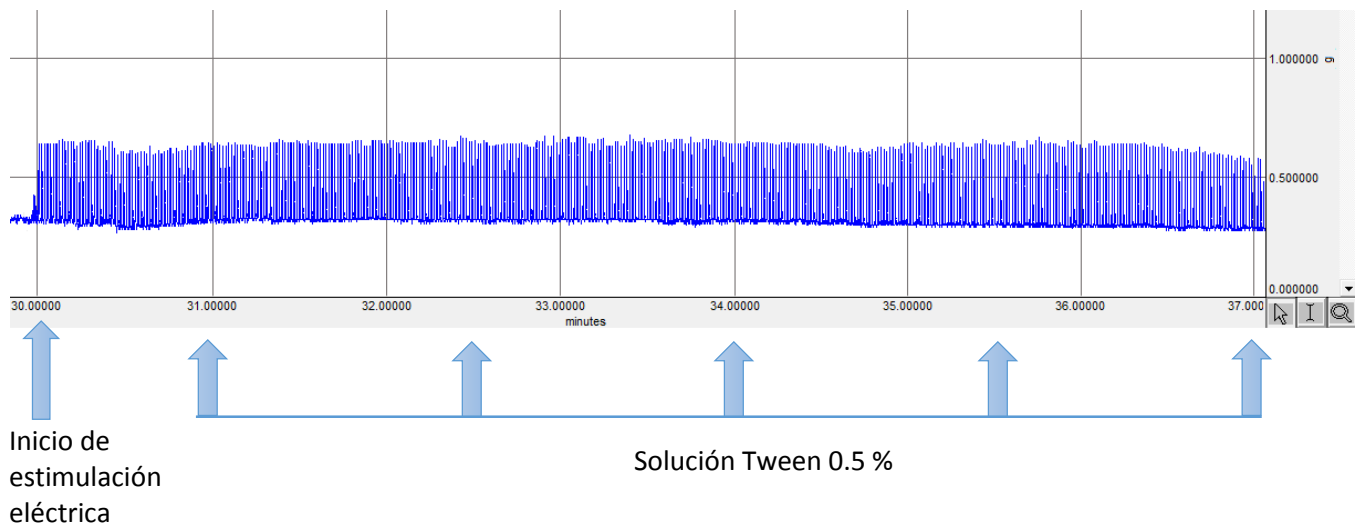


Imagen 17. Trazo obtenido del polígrafo para el grupo control, se muestra el tiempo contra los gramos-fuerza obtenidos del esófago de rata al estimularlo eléctricamente.

Para evaluar el efecto de la fracción de *N*-alquilamidas, se permitió que las contracciones inducidas eléctricamente se estabilizaran durante un minuto y posteriormente se procedió a administrar diferentes concentraciones de la fracción de *N*-alquilamidas en diferentes concentraciones, inmediatamente se observó un efecto de hiperestimulación seguido de un efecto de disminución de las contracciones inducidas eléctricamente (**Imagen 18**).

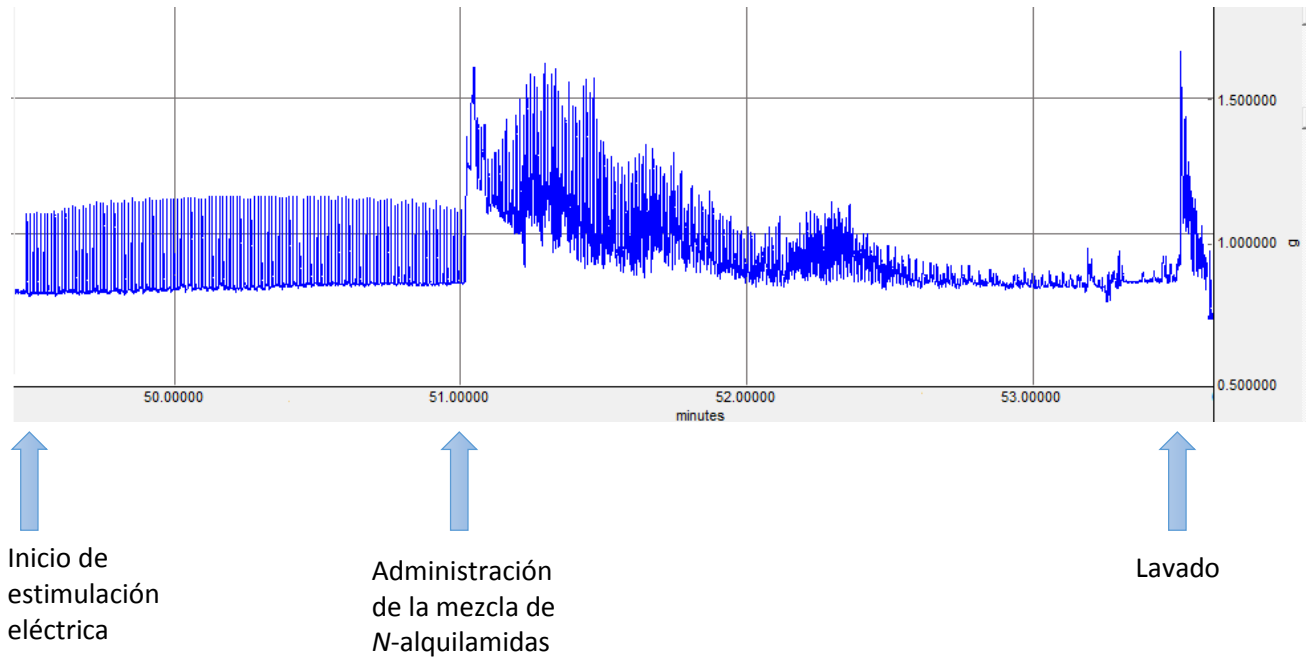


Imagen 18. Trazo obtenido del polígrafo tras la administración de la mezcla de *N*-alquilamidas, se muestra el tiempo contra los gramos-fuerza obtenidos del esófago de rata al estimular eléctricamente.

Posteriormente, se realizó la administración de las sustancias de prueba por separado y se observó la respuesta que éstas desencadenan. Al igual que para las *N*-alquilamidas, se inició la estimulación eléctrica sobre el nervio vago durante aproximadamente un minuto una vez que las variaciones de las contracciones sobre el esófago eran constantes se administraron los tratamientos (GABA, mentol, capsaicina, capsazepina, piperina o bupivacaína) que se evaluaron durante 150 segundos antes de lavar el tejido (**Imagen 19**).

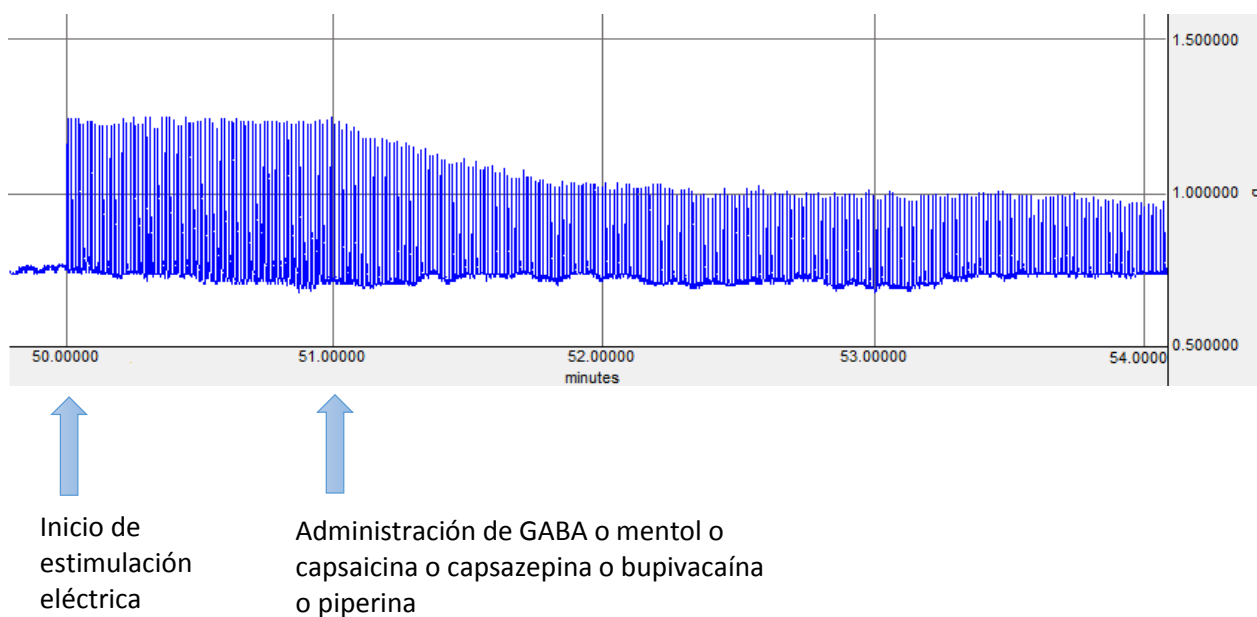
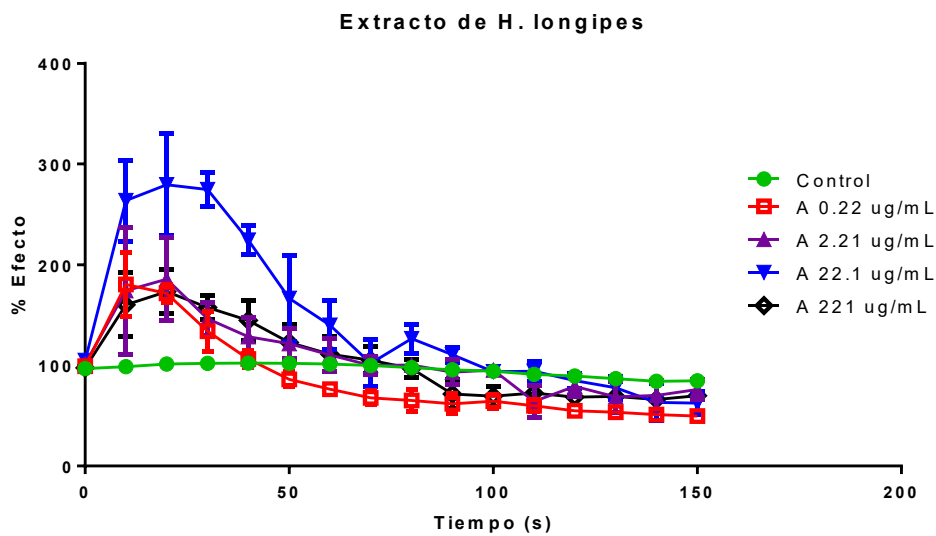


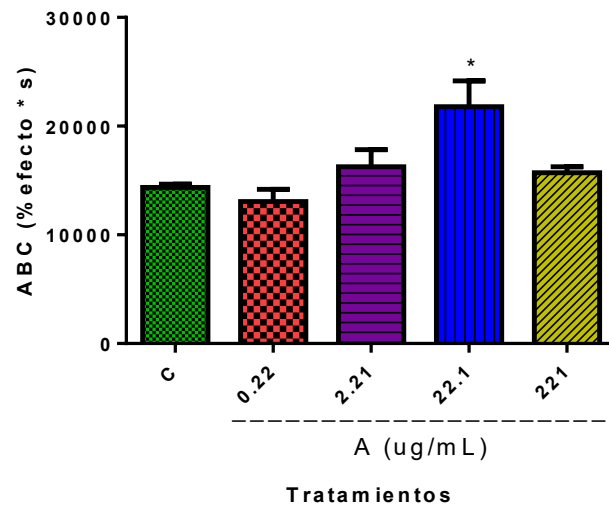
Imagen 19. Se ejemplifica como se observaba la acción de las sustancias en las contracciones del esófago inducidas eléctricamente. **Nota:** capsazepina no modifica las contracciones inducidas eléctricamente.

7.2.2 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas sobre la respuesta contráctil inducida eléctricamente

Al administrar las *N*-alquilamidas de *H. longipes* sobre el nervio vago incrementa las contracciones inducidas eléctricamente y en el transcurso del tiempo las disminuye, tal como se observa en la **Gráfica 1**. Este efecto no fue dosis dependiente; sólo a la concentración de 22 µg/mL se observó una diferencia en el efecto respecto al control (**Gráfica 2**) por lo que se decidió emplear esta concentración para los siguientes experimentos



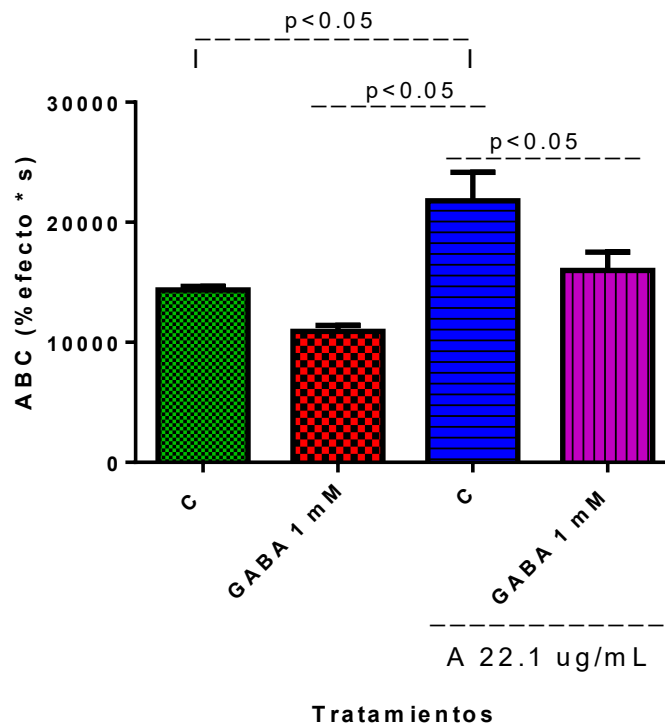
Gráfica 1 Curso temporal de la administración independiente de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes*. A= Mezcla de *N*-alquilamidas. Se presenta la media \pm EEM, $n \geq 3$



Gráfica 2. Área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la mezcla de *N*-alquilamidas. C= control; A= mezcla de *N*-alquilamidas. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA seguida de una prueba post hoc Tukey. *Se observa una diferencia significativa respecto al control, $p < 0.05$, $n \geq 3$.

7.2.3 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas en presencia de GABA

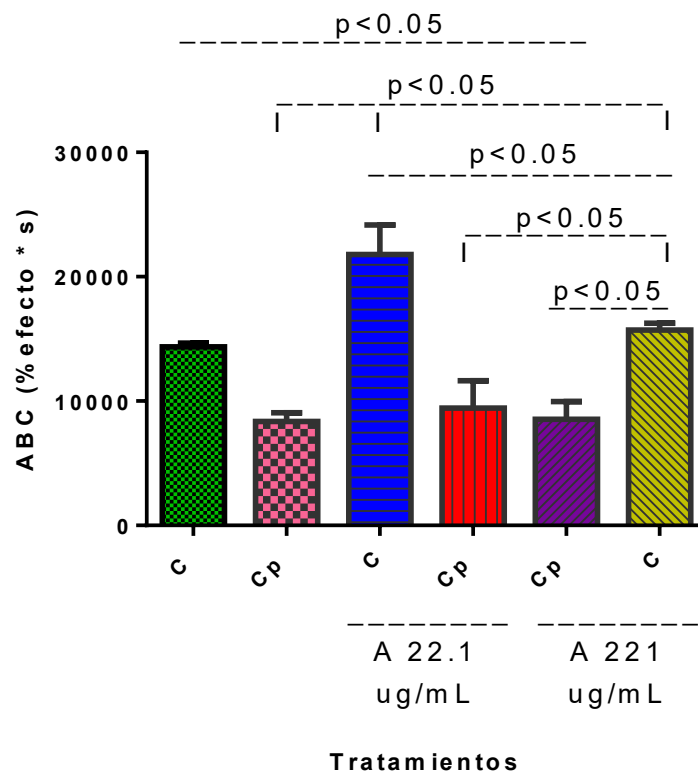
Debido a que algunos autores reportan que la afinina presenta un mecanismo de acción que involucra la participación de los receptores GABA (Rios et al., 2007), se empleó una concentración del GABA 1 mM, la cual no ejerce un efecto significativo respecto al control, sin embargo se observa que GABA reduce el efecto de las contracciones inducidas eléctricamente (**Gráfica 3**).



Gráfica 3 Área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la mezcla de *N*-alquilamidas. C= control; A= mezcla de *N*-alquilamidas. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA seguida de una prueba post hoc Tukey. Se observa una diferencia significativa con $p < 0.05$, $n \geq 3$.

7.2.4 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas en presencia de capsaicina

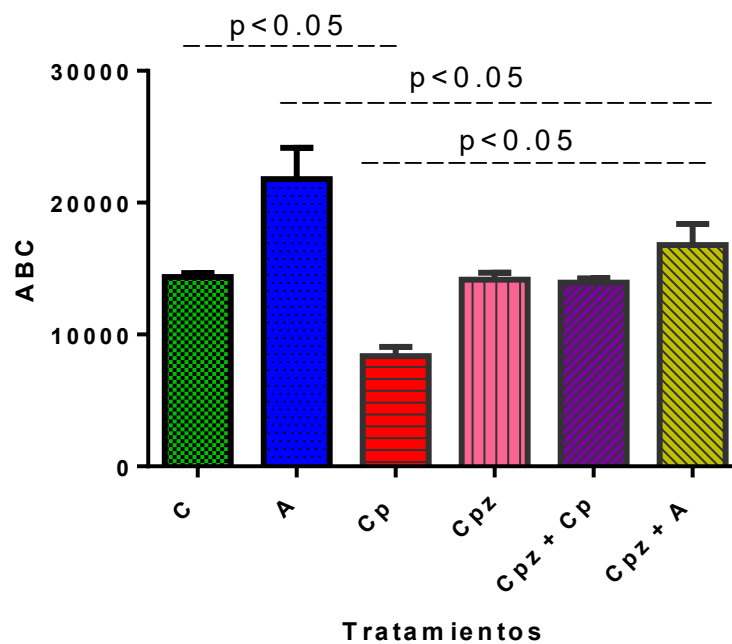
Al administrar una concentración de 100 μ M de capsaicina se observa una disminución significativa de la actividad respecto al control, en contraste con lo producido por la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes*. El efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* (22.1 y 221 μ g/mL) es anulado por la presencia de capsaicina (**Gráfica 4**).



Gráfica 4. Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes* en presencia de capsaicina. C= control; A= mezcla de *N*-alquilamidas; Cp= capsaicina 100 μ M. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA seguida de una prueba post hoc Tukey. Se observa una diferencia significativa con $p < 0.05$, $n \geq 3$.

7.2.5 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas en presencia de capsazepina

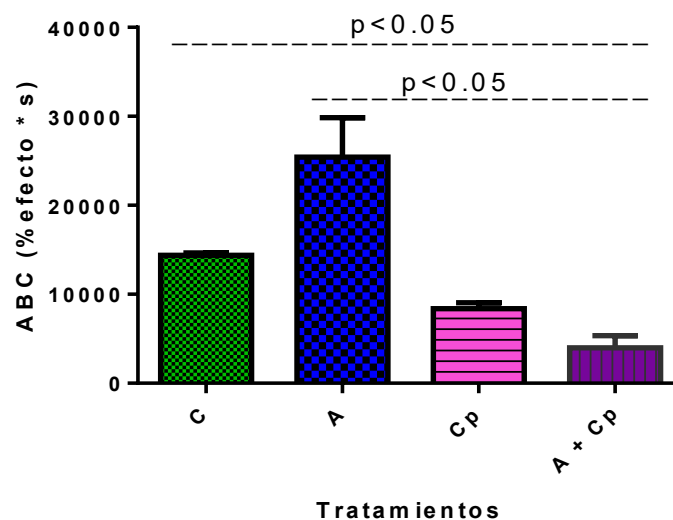
Para comprobar si el efecto observado con capsaicina es a través del receptor TRPV1, se adicionó capsazepina (antagonista de los canales TRPV1) en una concentración de 10 μ M. Se observó que a esta concentración de capsazepina (10 μ M) se antagoniza el efecto de capsaicina (100 μ M) (**Gráfica 5**). Esta misma concentración se empleó para evaluar el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes*. Se observa que la capsazepina disminuye el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas (**Gráfica 5**) pero no en igual magnitud que lo hace la capsaicina (**Gráfica 4**). Por lo que se puede proponer que el mecanismo de acción de la mezcla de *N*-alquilamidas es diferente de los receptores TRPV1.



Gráfica 5. Comportamiento de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes* en presencia de diferentes sustancias. C= control; A= mezcla de *N*-alquilamidas 22.1 μ g/mL; Cp= capsazepina 10 μ M; Cp= capsaicina 100 μ M. Se muestra la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey. Se observa una diferencia significativa con $p < 0.05$, $n \geq 3$.

7.2.6 Efecto de capsaicina en presencia de la mezcla de *N*-alquilamidas

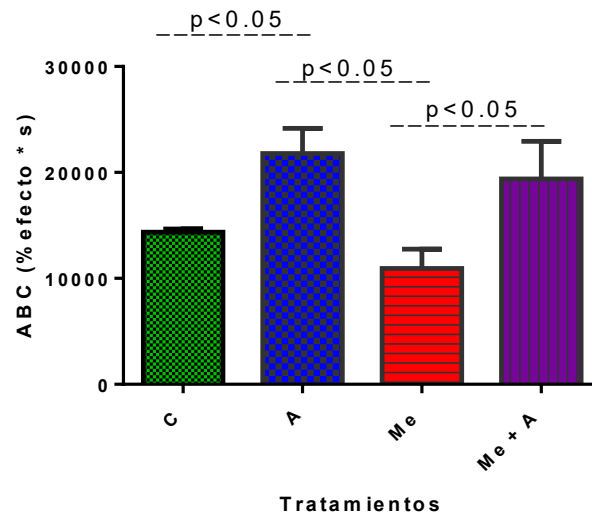
Tomando en cuenta que todas las concentraciones evaluadas de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* incrementan la estimulación inducida eléctricamente en los primeros 50 segundos, y luego esta actividad disminuía conforme avanzaba el tiempo de evaluación, analizamos si la mezcla sería capaz de bloquear el efecto global de la capsaicina. Para comprobar esta hipótesis se administró capsaicina (100 μ M) después del tiempo de estimulación con la mezcla de *N*-alquilamidas (150 segundos). La magnitud de las ABC de capsaicina y la mezcla de *N*-alquilamidas con capsaicina no presentó diferencia estadísticamente significativa (**Gráfica 6**). Este resultado sugiere que el efecto de la fracción de *N*-alquilamidas es por otra vía que no es por TRPV1. Estos resultados dieron pauta a proponer la existencia de otros mecanismo de acción de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes*.



Gráfica 6. Comportamiento de capsaicina en presencia de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes*. C= control; A= mezcla de *N*-alquilamidas 22.1 μ g/mL; Cp= capsaicina 100 μ g M. Se muestra la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey. Se observa una diferencia significativa $p < 0.05$, $n \geq 3$.

7.2.7 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas en presencia de mentol

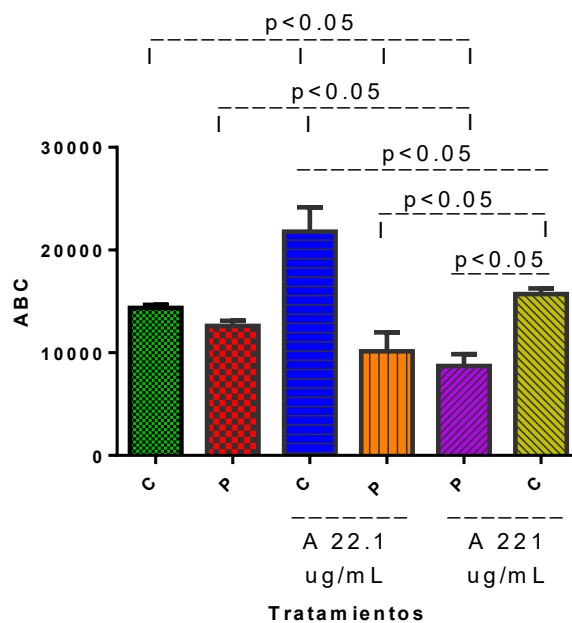
En una nueva serie de experimentos se analizó la posible participación del mentol, otro receptor TRP, en el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas. Para probar esta respuesta, se administró mentol 64 mM. Como se observa en la **Gráfica 7**, la administración de mentol no produjo cambios en la contracción basal, y fue incapaz de bloquear el aumento de actividad provocado por la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes*.



Gráfica 7 Comportamiento de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* en presencia de mentol. C= control; A= mezcla de *N*-alquilamidas 22.1 ug/mL; Me= mentol (64 mM). Se muestra la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey. Se observa una diferencia significativa, $p > 0,05$ y $n \geq 3$.

7.2.8 Efecto de la mezcla de N-alquilamidas en presencia de piperina

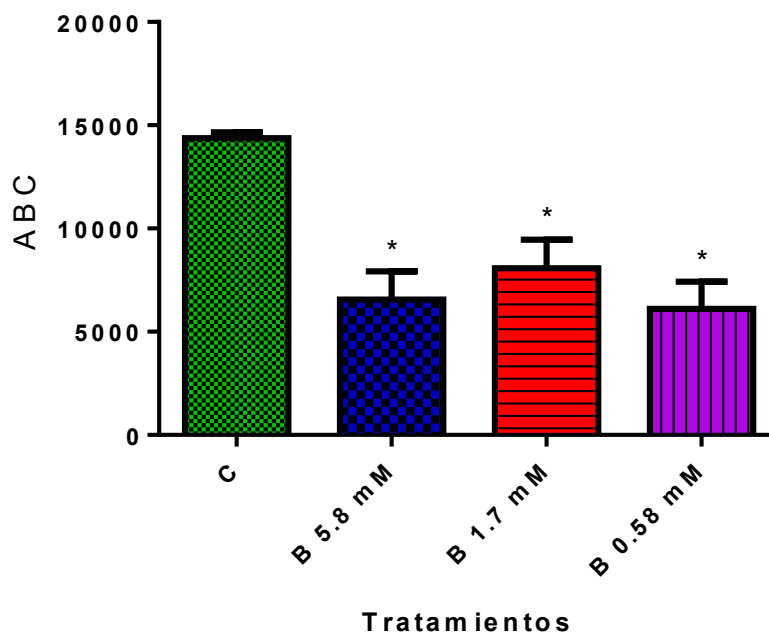
Posteriormente, se evaluó la actividad de la piperina, otro agonista TRP. La piperina no tiene un mecanismo único de acción, actúa sobre varios receptores, tanto TRP como algunos canales iónicos diferentes, como los canales de potasio de doble poro. En la **Gráfica 8** se muestra que la piperina no causa cambios a la actividad basal, pero sí reduce la respuesta de la mezcla de N-alquilamidas.



Gráfica 8. Comportamiento de la mezcla de N-alquilamidas de *H. longipes* en presencia de piperina (200 mM). C= control; A= mezcla de N-alquilamidas; P= piperina. Se muestra la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey. Se observa una diferencia significativa, $p < 0.05$ $n \geq 3$.

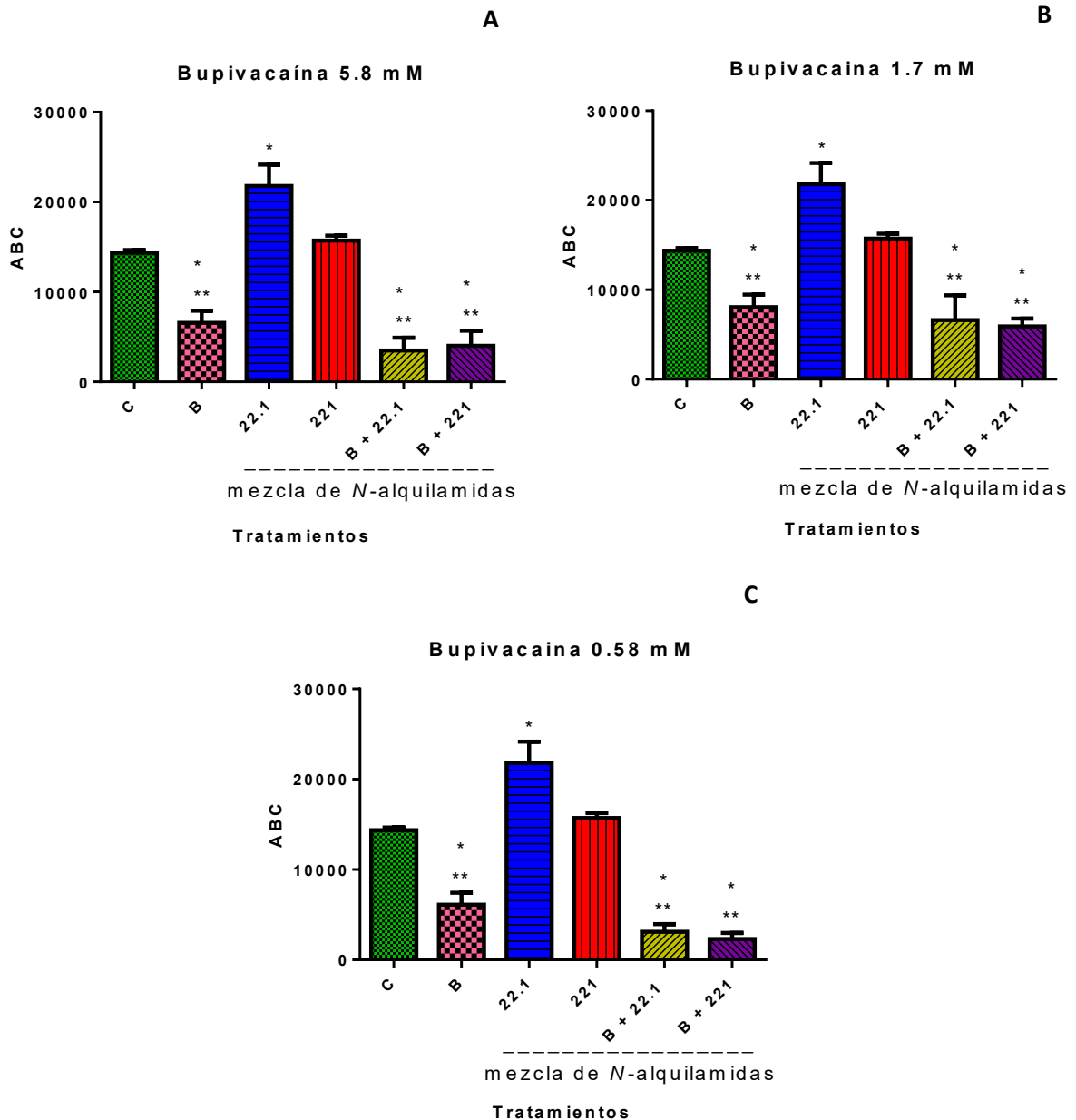
7.2.9 Efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas en presencia de bupivacaína

De acuerdo con las propiedades reportadas para el “chicuague”, como analgésico y anestésico en procedimientos dentales, se decidió emplear a la bupivacaína, un anestésico local cuyo mecanismo de acción involucra la activación de canales de potasio de doble poro. Al administrarla sobre el nervio vago se impide la transmisión del impulso inducido eléctricamente, pues el incremento de potasio intracelular ocasiona la hiperpolarización de la membrana. En la **Gráfica 9** se muestra el bloqueo de tres concentraciones de bupivacaína (0.58, 1.7 y 5.8 mM); el efecto no resultó concentración- dependiente.



Gráfica 9. Comportamiento de bupivacaína en diferentes concentraciones. C= control; B= bupivacaína. Se muestra la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey. *Se observa una diferencia significativa respecto al control $p < 0.05$ $n \geq 3$.

Los resultados de la evaluación de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes* con bupivacaína se observan en la **Gráfica 10** (A-C)



Gráfica 10. Comportamiento de la mezcla de *N*-alquilamidas en presencia de bupivacaína A) C= control y B=bupivacaína 5.8 mM; B) C=control y B= bupivacaína 1.7mM; C) C=control y B=bupivacaína 0.58mM. Se muestra la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey. *Se observa una diferencia significativa respecto al control y ** se observa una diferencia significativa respecto a la mezcla de *N*-alquilamidas 22,1 μ g/mL y 221 μ g/mL, $p < 0.05$, $n \geq 3$.

Cabe destacar que todas las concentraciones de bupivacaína empleadas, inclusive las más bajas, no permiten observar el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas proveniente de *H. longipes*, proponiéndose como mecanismo de acción la participación de los canales de potasio de doble poro.

8. Discusión de resultados

La obtención de las *N*-alquilamidas depende tanto del género de la planta como de la forma y lugar de crecimiento o cultivo, pero también del uso de plantas secas o frescas y su método de extracción. Las diferentes preparaciones implican alteraciones en el efecto y la toxicidad debido a un cambio en la estructura de las *N*-alquilamidas (Boonen et al., 2010). Por lo anterior, es importante contar con la elucidación correcta de la molécula a emplear.

La afinina es uno de los componentes mayoritarios del extracto obtenido de *H. longipes*. Se han reportado las características químicas del compuesto obtenido por síntesis estereoselectiva con un rendimiento del 61%. Es una sustancia amarilla pálido con un punto de fusión de 23 °C, un punto de ebullición de 165 °C y un máximo de absorción en el UV 228.5 nm. En el espectro de masas presenta ión molecular $[M+H]^+$ con una relación masa carga (m/z) de 222, el fragmento $[MH-C_4H_{11}N]^+$ con $m/z= 149$ (correspondiente a la pérdida del grupo isobutilamida) y el fragmento con $m/z= 99$ que muestra la presencia del grupo isobutilamida. El pico base correspondiente a afinina se observa en una relación masa carga de 81 y también se observa en el espectro del homospilantol, debido a la ruptura de la cadena alifática, que confirma que el metilo adicional no es en la terminación de la cadena alifática. El fragmento m/z 206 correspondiente a la pérdida del etilo de la cadena metilbutilo indica la posición del metilo adicional en este compuesto. Esto concuerda con lo reportado por Barbosa y colaboradores (Barbosa et al., 2016).

En estudios previos (Barbosa et al., 2016), se han reportado los métodos de purificación de la afinina a partir del extracto obtenido de *H. longipes*. En el presente trabajo se aplicaron las purificaciones señaladas en la literatura, sin embargo, se observó que el compuesto se presenta como una mezcla de *N*-alquilamidas (**Imagen 6** e **Imagen 10**). En el análisis por HPLC/EM se detectan al menos tres *N*-alquilamidas importantes con estructuras similares siendo el compuesto mayoritario la afinina. En nuestro caso corresponde al 67 % y el homospilantol corresponde al

18 %. Este último difiere de la afinina por un sustituyente metilo en el grupo isobutilo de la amina. Es por eso que la purificación resulta ser altamente complicada. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde se describe que, mediante un análisis cromatográfico realizado con un equipo UPLC a partir del extracto de *Acmella oleracea*, se presentan al menos tres picos de diferentes componentes de *N*-alquilamidas (Nomura et al., 2013).

Al realizar los estudios de RMN-¹H y RMN-¹³C de la fracción rica en *N*-alquilamidas (**Imagen 15** e **Imagen 16**) no se observan diferencias respecto a lo reportado en la literatura para la afinina (Barbosa et al., 2016), salvo por los desplazamientos observados en el espectro de RMN-¹H, sin embargo, como es mínimo, muchos autores han reportado que se trata del compuesto mayoritario afinina y atribuyen las propiedades de la mezcla únicamente a este componente perteneciente a la familia de las *N*-alquilamidas. También se ha reportado que es el extracto de *H. longipes* el que se almacena para su posterior uso y no el compuesto puro, ya que el extracto es estable durante varios meses según lo reportado por Bae y colaboradores (Bae, 2010). Lo cual podría interpretarse como un efecto benéfico de las demás sustancias para la estabilidad de la afinina.

Las *N*-alquilamidas obtenidas de las raíces de *H. longipes*, utilizadas en la medicina tradicional mexicana, deben su efecto analgésico a sus grupos farmacofóricos: la cadena alifática insaturada y el grupo amida (Ley et al., 2006; Rios and Olivo, 2014). Debido a su liposolubilidad atraviesa las membranas biológicas, por lo que puede absorberse a través de la piel y el intestino, también por las membranas mucosas y la barrera hematoencefálica, es por ello que presenta diferentes propiedades como: antinociceptiva, antioxidante, antiinflamatoria, antimutagénica, antifúngica, bacteriostática, insecticida, anti-malárico, antiarrugas (Barbosa et al., 2016), anestésica local, entre otras, como el aumento en la salivación tras la ingesta de las raíces de *H. longipes*, o el efecto afrodisíaco de esta *N*-alquilamida aislada de *Acmella oleracea* (da Rocha et al., 2018).

Es posible que el efecto estimulante de la salivación podría ser benéfico en diferentes patologías, como en la ERGE, ya que, uno de los estímulos nocivos en este padecimiento es la presencia de ácido estomacal en el esófago lo que puede llegar a dañar la estructura anatómica de este tejido. En estudios recientes se ha encontrado relación entre la secreción de saliva y el tratamiento de ERGE considerándose lo siguiente: la fase final del aclaramiento del ácido esofágico depende de la salivación. Así como el vaciamiento esofágico, cuando el proceso de la salivación se encuentra deteriorado prolonga la depuración del ácido, y la capacidad neutralizante de la saliva disminuye. Cuando las personas duermen ocurre una disminución de la salivación, con ello se explicaría los episodios de reflujo gástrico más comúnmente experimentados por la noche (Palmiero and Mosca, 2006).

El modelo *in vitro* seleccionado en el presente trabajo, se enfoca principalmente en la participación del nervio vago sobre la contractilidad esofágica inducida eléctricamente. También evalúa la sensibilidad a diferentes sustancias, así como la concentración efectiva en la que se producen cambios en la motilidad esofágica. Tras administrar la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* sobre el nervio vago y pese a lo reportado, como anestésico local, se observó que con la concentración de 0.22 µg/mL de la mezcla de *N*-alquilamidas se incrementan las contracciones inducidas eléctricamente sobre el nervio vago. Esto concuerda con los estudios electrofisiológicos donde se describe una superexcitación inmediata a la administración de extractos ricos en afinina seguida de una inhibición completa de la actividad en el nervio de cucaracha (Manuscript and Pet, 2007). Al administrar un extracto de *H. longipes* primero se observa un incremento en las estimulaciones inducidas eléctricamente y posteriormente una disminución, lo que haría referencia al proceso de salivación y pungencia, así como un posterior efecto analgésico de la sustancia. Revisando en la literatura se encontró que tras la administración de una dosis de 25 mg/kg en ratones, estos presentaban un incremento en la respiración y en la frecuencia cardiaca, seguida de una depresión y tremores que disminuían su actividad motora (Ogura et al., 1982).

En cuanto a la actividad antinociceptiva se ha reportado que la administración intraperitoneal de afinina produce un efecto dosis dependiente en el modelo de writhing y que es debido a la activación de los receptores de opioides, GABA y serotonina (Déciga-Campos et al., 2010). Lo autores reportan que el compuesto afinina, proveniente de un extracto de *H. longipes*, incrementa la liberación del neurotransmisor GABA y con ello desencadena una respuesta antinociceptiva. Sin embargo, en los experimentos realizados para el presente trabajo al pretratar el nervio vago con GABA se observa una disminución del efecto producido por un extracto de *H. longipes* pero no se ve potenciado el efecto inhibitorio que GABA ejerce por su cuenta. Con lo que se podría proponer que el mecanismo de acción de la mezcla de *N*-alquilamidas no involucra la participación de GABA ni la activación de los receptores GABA_A o GABA_B, por lo que se continuaron los estudios sobre un posible mecanismo de acción.

Referente al efecto analgésico de afinina se utilizó capsaicina, piperina y mentol. Los dos primeros pertenecen a la familia de las *N*-alquilamidas y el último es un monoterpeno, no obstante, estas moléculas tienen en común que actúan sobre diferentes subtipos de receptores TRP (Premkumar, 2014). El mentol es un compuesto de origen natural sintetizado en diferentes especies de plantas como: *Mentha piperita* y *Mentha arvensis*. El aceite de menta contienen del 50 y 70% de (-)-mentol. Esta molécula contiene 3 carbonos asimétricos, pero entre los isómeros ópticos (-)-mentol es más común en la naturaleza y es el que presenta el efecto farmacológico. En Farmacia es empleado como antiprurítico, antiséptico y en preparados fríos, pero también es incluido en formulaciones de anestésicos locales. Al aplicarse tópicamente causa sensación de estremecimiento y de frío debido a la estimulación de receptores sensibles a la temperatura que inhiben las corrientes de Ca²⁺ en las membranas neuronales (Galeotti et al., 2002). Estos receptores pertenecen a la familia de los TRP y en especial al subtipo TRPM8 (Premkumar, 2014).

El efecto antinociceptivo del (-)-mentol se ha evaluado en diferentes modelos *in vivo*, incluyendo la prueba de placa caliente (hot plate) y el modelo de contracción abdominal (inducido por ácido acético) (Galeotti et al., 2002), es por ello que se decidió emplear al mentol para conocer si el efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas estaba dado por la participación de los canales TRPM8. Sin embargo, al administrar el mentol en una concentración de (64 mM) no disminuye la sobre estimulación que produce la mezcla de *N*-alquilamidas. Con lo cual se descartó un posible mecanismo de acción sobre TRPM8.

Debido a que la familia TRP es muy extensa, en cuanto a la división en siete subfamilias y a su expresión a lo largo del organismo de mamíferos, se decidió evaluar la participación de los receptores TRPV1. Los receptores TRPV1 presentan una estructura tetramérica, donde cada subunidad posee seis dominios transmembranales, varios dominios repetidos de ankirina, con una secuencia de aminoácidos conservada y un grupo N-terminal en el poro del canal y una cadena carboxílica intracelular. La estructura del receptor TRPV1 en presencia de capsaicina adopta una orientación cola arriba, cabeza abajo, esto quiere decir que el sitio de unión de capsaicina es intracelular y además abre el canal para que puedan pasar los iones. La piperina también activa este receptor y se ha reportado que los TRPV1 están relacionado con la pungencia de las moléculas (Díaz-Franulic et al., 2016).

La capsaicina es un ingrediente pungente que se encuentra en una amplia variedad de especies del género *Capsicum*. La acción de la capsaicina ocurre en dos fases una de excitación aguda que inicia la liberación de transmisores seguida de otra de desensibilización (Boudaka et al., 2007). En los estudios realizados con capsaicina se observa el efecto desensibilizante sobre el nervio vago y debido a esta respuesta la mezcla de *N*-alquilamidas no presenta su efecto estimulante sobre las contracciones inducidas eléctricamente. Esto puede deberse a dos situaciones: que la desensibilización es de alta magnitud y por lo tanto no se puede reestablecer con esas concentraciones de la mezcla de *N*-alquilamidas, y la segunda porque en el

efecto de la mezcla estaría involucrando la participación de receptores TRPV1. Se evaluaron concentraciones mayores de la mezcla de *N*-alquilamidas mayores de 221 µg/mL que no se presentaron y el efecto producido por la capsaicina es superable. Sin embargo, no se descarta la participación de estos receptores en el mecanismo de acción de la mezcla de *N*-alquilamidas.

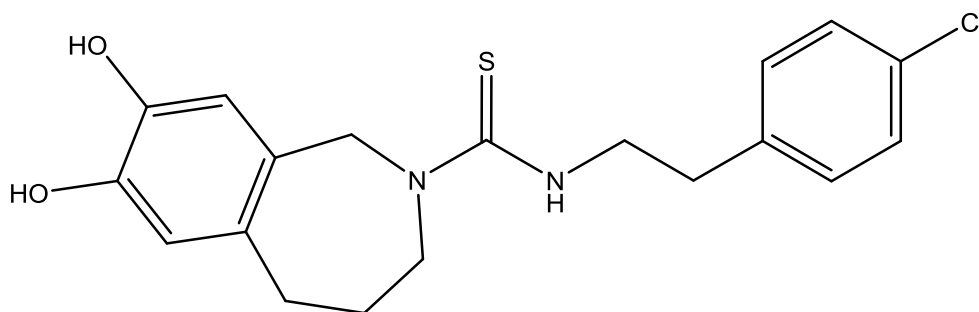


Imagen 20. Estructura química del antagonista TRPV1 capsazepina.

Capsazepina (**Imagen 20**), es una molécula obtenida por modificación química de capsaicina, es un antagonista competitivo por el sitio de unión a capsaicina, sobre los receptores TRPV1, su estructura además del grupo tioamida presenta un cloro en la molécula que le confiere la propiedad antagonista sobre el receptor. La capsaicina se une al sitio vainilloide y genera una configuración cabeza arriba, cola abajo con el cloro de la molécula posicionado extracelularmente (Díaz-Franulic et al., 2016). Al administrar capsazepina al nervio vago no se observa que modifiquen las contracciones inducidas eléctricamente, pero si se observa una ligera disminución del efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas sin llegar a inhibirlo completamente. Lo cual nos indica que el mecanismo de la mezcla de *N*-alquilamidas podría involucrar la activación de los receptores TRPV1 debido a la pungencia que presenta, sin embargo, no es el único mecanismo de acción posible.

En diferentes artículos se ha demostrado que la administración tanto de capsaicina, como de piperina inhiben las contracciones del músculo estriado esofágico mediadas por el nervio vago, y que probablemente se debe a la activación de

neuronas nitrérgicas que pueden liberar NO en las placas neuronales terminales. Ya que se han realizado experimentos evaluando el efecto antinociceptivo de estas moléculas y disminuye cuando son pretratados con el compuesto 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[1,2-*a*]-quinoxalin-1-ona (ODQ) y glibenclamida. Por ello se ha propuesto que el mecanismo de acción involucra la participación del NO así como de los canales de K⁺ dependientes de ATP (Déciga-Campos et al., 2010).

Continuando con la evaluación de los receptores TRP se empleó piperina. Este alcaloide proviene de la planta *Piper nigrum*. La piperina también presenta una sensación pungente como la capsaicina pero no posee un residuo vainilloide, este está remplazado en piperina por un grupo metilendioxi. Debido a ello presentan similitudes y diferencias en cuanto a sus efectos. En la **Gráfica 8**, se observa que, a pesar de que piperina no muestra un efecto marcado como la capsaicina al administrar la mezcla de *N*-alquilamidas, en los nervios pretratados con piperina, existe una anulación de los efectos sobreestimulantes de la mezcla de *N*-alquilamidas e incluso en la concentración de 221 µg/mL se observa una disminución de las contracciones inducidas eléctricamente, sin la inicial excitación del nervio. Esto podría estar acorde con lo reportado por Boudaka y colaboradores (Boudaka et al., 2007), quienes mediante la técnica de patch-clamp, realizada sobre oocitos de *Xenopus laevis*, reportan que la piperina, además de actuar sobre receptores TRPV1, puede actuar sobre los canales de potasio de doble poro (KCNK) en concentraciones equimolares. Algunos estudios se han realizado para corroborar estos resultados, los cuales señalan que al emplear bloqueadores de canales de K⁺ clásicos como TEA (1 mM) y 4-AP (1 mM), el efecto inhibitorio de la piperina no se modificó, lo mismo ocurrió tras la preincubación con XE-991 y linopiridina que son bloqueadores selectivos para los canales de K⁺ dependientes de voltaje (KCNQ), el cual disminuyó la corriente de K⁺ de fondo y a pesar de ello la respuesta de piperina se observó. Es por ello que los autores concluyen que además de que la piperina puede activar canales KCNK no se puede descartar la participación de los receptores TRP de su mecanismo de acción, especialmente los TRPV1 (Beltrán et al., 2017; Flockerzi, 2007). También se ha descrito que las *N*-

alquilamidas obtenidas de *Zanthoxylum*, que también presentan propiedades pungentes y con sensación de hormigueo como el hidroxil- α -sanshool, activan canales TRPV1 y TRPA1 y excitan neuronas sensoriales al inhibir canales de KCNK (Manuscript and Pet, 2007)

Diversos estudios sobre las *N*-alquilamidas muestran que estos compuestos presentan efectos anestésicos y recordando que la piperina posee propiedades anestésicas, además de ayudar en el mantenimiento de la anestesia inducida por lidocaína (López et al., 2016), se decidió evaluar al anestésico local bupivacaína, el cual se ha reportado que actúa sobre canales KCNK. Al pretratar el nervio vago con bupivacaína se disminuyeron las contracciones inducidas eléctricamente. Los anestésicos locales son bloqueadores reversibles de la generación y propagación de los mecanismo de acción y previenen la permeabilidad de la membrana a diferentes iones como Na^+ y K^+ . Debido a sus propiedades anestésicas de las *N*-alquilamidas de *H. longipes* y a su similaridad estructural con las *N*-alquilamidas de *Zanthoxylum*, se puede proponer que uno de los mecanismos de acción para la mezcla de *N*-alquilamidas podría involucrar la participación de los canales de potasio de doble poro. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos de la actividad de la mezcla de *N*-alquilamidas provenientes de *H. longipes* al pretratar el nervio vago con bupivacaína y con piperina.

Los canales de K^+ de doble poro (KCNK, $\text{K}_{2\text{P}}$) juegan un papel importante en el potencial de membrana en reposo y es de interés que algunos compuestos químicos que inhiben estos canales causan estremecimiento y excitación neuronal. En estudios previos se ha observado que la piperina en presencia de agonistas TRP logra activar las neuronas trigeminales del ratón, indicando que es capaz de inducir una despolarización neuronal que no requiere de los iones extracelulares de Na^+ y Ca^{2+} . Esto concordaría con lo encontrado en este trabajo para la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* y la propuesta de la probable participación de los KCNK en su mecanismo de acción (Beltrán et al., 2017).

9. Conclusión

El efecto de la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* sobre las contracciones inducidas eléctricamente en el nervio vago de esófago de rata se ven modificadas por la actividad de un agonista y antagonista TRPV1, por la piperina y bupivacaina, lo cual muestra que la mezcla de *N*-alquilamidas de *H. longipes* podría estar actuando sobre canales KCNK además de los canales TRPV1.

10. Referencias

- Acosta-Madrid, I.I., Castañeda-Hernández, G., Cilia-López, V.G., Cariño-Cortés, R., Pérez-Hernández, N., Fernández-Martínez, E., Ortiz, M.I., 2009. Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phytomedicine* 16, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.014>
- Anwar, I.J., Derbenev, A. V, 2013. TRPV1-dependent regulation of synaptic activity in the mouse dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *Front. Neurosci.* 7, 238. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00238>
- Barbosa, A.F., de Carvalho, M.G., Smith, R.E., Sabaa-Srur, A.U.O., 2016. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Brazilian J. Pharmacogn.* 26, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.024>
- Beltrán, L.R., Dawid, C., Beltrán, M., Levermann, J., Titt, S., Thomas, S., Pürschel, V., Satalik, M., Gisselmann, G., Hofmann, T., Hatt, H., 2017. The effect of pungent and tingling compounds from *Piper nigrum* L. on background K⁺ currents. *Front. Pharmacol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00408>
- Boonen, J., Baert, B., Burvenich, C., Blondeel, P., De Saeger, S., De Spiegeleer, B., 2010. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.010>
- Boudaka, A., Wörl, J., Shiina, T., Neuhuber, W.L., Kobayashi, H., Shimizu, Y., Takewaki, T., 2007. Involvement of TRPV1-dependent and -independent components in the regulation of vagally induced contractions in the mouse esophagus. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.005>
- Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J.A., Ortiz, M.I., Sánchez-Gutiérrez, M., García-Reyna, P.B., Cilia-López, V.G., Pérez-Hernández, N., Moreno, E., Ponce-Monter, H., 2010. Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *J. Ethnopharmacol.* 130, 216–

221. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.037>
- Colvard, M.D., Cordell, G.A., Villalobos, R., Sancho, G., Soejarto, D.D., Pestle, W., Echeverri, T.L., Perkowitz, K.M., Michel, J., 2006. Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. *J. Ethnopharmacol.* 107, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.005>
- Correa, J., Roquet, S., D??az, E., 1971. Multiple NMR analysis of the affinin. *Org. Magn. Reson.* 3, 1–5. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270030102>
- da Rocha, C.F., Medeiros Souza Lima, Y. de, Carvalho, H.O., Pinto, R.C., Ferreira, I.M., Castro, A.N., Lima, C.S., Carvalho, J.C.T., 2018. Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen on the reproductive performance of Wistar females rats: A popular female aphrodisiac from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* 214, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.024>
- De Spiegeleer, B., Boonen, J., Malysheva, S. V., Mavungu, J.D. Di, De Saeger, S., Roche, N., Blondeel, P., Taevernier, L., Veryser, L., 2013. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. *J. Ethnopharmacol.* 148, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.076>
- Déciga-Campos, M., Rios, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B., 2010. Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Med.* 76, 665–670. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240658>
- Dessirier, J.M., Nguyen, N., Sieffermann, J.M., Carstens, E., O'Mahony, M., 1999. Oral irritant properties of piperine and nicotine: Psychophysical evidence for asymmetrical desensitization effects. *Chem. Senses* 24, 405–413. <https://doi.org/10.1093/chemse/24.4.405>
- Díaz-Franulic, I., Caceres-Molina, J., Sepulveda, R. V, Gonzalez-Nilo, F., Latorre, R., 2016. Structure-Driven Pharmacology of Transient Receptor Potential Channel Vanilloid 1. *Mol. Pharmacol.* 90, 300–8. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104430>
- Escobedo-Martínez, C., Guzmán-Gutiérrez, S.L., Hernández-Méndez, M. de L.M., Cassani, J., Trujillo-Valdivia, A., Orozco-Castellanos, L.M., Enríquez, R.G., 2017. *Heliopsis longipes*: Anti-arthritic activity evaluated in a Freund's adjuvant-

- induced model in rodents. *Brazilian J. Pharmacogn.* 27, 214–219.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.09.003>
- Facchini, P.J., Hagel, J., Zulak, K.G., 2002. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* 80, 577–589.
<https://doi.org/10.1139/b02-065>
- Fass, R., Achem, S.R., 2011. Noncardiac chest pain: Epidemiology, natural course and pathogenesis. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 17, 110–123.
<https://doi.org/10.5056/jnm.2011.17.2.110>
- Flockerzi, V., 2007. An introduction on TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 179, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_1
- Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., Ghelardini, C., 2002. Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci. Lett.* 322, 145–148.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02527-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02527-7)
- Hayman, M., Kam, P.C.A., 2008. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Curr. Anaesth. Crit. Care* 19, 338–343.
<https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.07.003>
- Hernández, I., Márquez, L., Martínez, I., Dieguez, R., Delporte, C., Prieto, S., Molina-Torres, J., Garrido, G., 2009. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. *J. Ethnopharmacol.* 124, 649–652. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.060>
- Howland, R.H., 2014. Vagus Nerve Stimulation. *Curr. Behav. Neurosci. Reports* 1, 64–73. <https://doi.org/10.1007/s40473-014-0010-5>
- Kasting, G.B., 2001. Kinetics of finite dose absorption through skin 1. Vanillylnonamide. *J. Pharm. Sci.* 90, 202–212. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200102\)90:2<202::AID-JPS11>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200102)90:2<202::AID-JPS11>3.0.CO;2-E)
- Kerr, K.P., Mitchelson, F., Coupar, I.M., 1995. Vagal nerve stimulation of the guinea-pig oesophagus. *Acta Physiol. Scand.* 154, 213–220.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1995.tb09903.x>
- Ley, J.P., Krammer, G., Looft, J., Reinders, G., Bertram, H.J., 2006. Structure-activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkaloids related to spilanthol. *Dev. Food Sci.* 43, 21–24.

[https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80006-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80006-3)

- Little, E., 1948. *Heliopsis longipes* a Mexican insecticidal plant species. *J. Washington Acad. Sci.* 38, 269–274.
- López-Bucio, J., Acevedo-Hernández, G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Herrera-Estrella, L., 2006. Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 523–529. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2006.07.002>
- López, K., Marques, A.M., L. Moreira, D., Velozo, L.S., Sudo, R.T., Zapata-Sudo, G., Guimaraes, E., Kaplan, M. C., 2016. Local Anesthetic Activity from Extracts, Fractions and Pure Compounds from the Roots of. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* 88, 2229–2237.
- Manuscript, A., Pet, F., 2007. Author Manuscript. *Methods* 275–277. <https://doi.org/10.1080/10590500802708267>.Toxicity
- Melzer, E., Tiomny, A., Coret, A., Bar-Meir, S., 1995. Nutcracker esophagus: Severe muscular hypertrophy on endosonography. *Gastrointest. Endosc.* 42, 366–367. [https://doi.org/10.1016/S0016-5107\(95\)70141-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5107(95)70141-9)
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C., Armenta-Salinas, C., Ramírez-Chávez, E., 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkaloids from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amides. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4700–4704. <https://doi.org/10.1021/jf034374y>
- Mujumdar, A.M., Dhuley, J.N., Deshmukh, V.K., Raman, P.H., Naik, S.R., 1990. Anti-inflammatory activity of piperine. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 43, 95–100. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.43.95>
- Nakatani, N., Nagashima, M., 1992. Pungent Alkaloids from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 759–762. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.759>
- Nomura, E.C.O., Rodrigues, M.R.A., Da Silva, C.F., Hamm, L.A., Nascimento, A.M., De Souza, L.M., Cipriani, T.R., Baggio, C.H., De Paula Werner, M.F., 2013. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *J. Ethnopharmacol.* 150, 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.007>
- Ogura, M., Cordell, G.A., Quinn, M.L., Leon, C., Benoit, P.S., Soejarto, D.D.,

- Farnsworth, N.R., 1982. Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem — oral use of *Heliopsis longipes* — by means of a multidisciplinary approach. *J. Ethnopharmacol.* 5, 215–219. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(82\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(82)90045-9)
- Page, A.J., Blackshaw, L.A., 1998. An in vitro study of the properties of vagal afferent fibres innervating the ferret oesophagus and stomach. *J. Physiol.* 512, 907–916. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.907bd.x>
- Palmiero, F.D.E.G.M., Mosca, I.E.F., 2006. Pathophysiology of gastro-oesophageal reflux 241–246.
- Premkumar, L.S., 2014. Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 1117–1130. <https://doi.org/10.1021/cn500094a>
- Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., Molina-Torres, J., 2004. Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1058–1068. <https://doi.org/10.1104/pp.103.034553>
- Rios, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B., Gutiérrez, M. del C., 2007. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 110, 364–367. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.09.041>
- Rios, M.Y., Olivo, H.F., 2014. Natural and synthetic alkamides: Applications in pain therapy, *Studies in Natural Products Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00003-5>
- Romer, A.I., Singh, J., Rattan, S., Krauss, R.S., 2013. Smooth muscle fascicular reorientation is required for esophageal morphogenesis and dependent on Cdo. *J. Cell Biol.* 201, 309–323. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301005>
- Salazar, H., Jara-Oseguera, A., Rosenbaum, T., 2009. El canal TRPV como diana para tratar el dolor. *Rev. Neurofarmacología* 48, 357–364.
- Schey, R., Villarreal, A., Fass, R., 2007. Noncardiac chest pain: current treatment. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* 3, 255–62.
- Shiina, T., Shima, T., Suzuki, Y., Shimizu, Y., 2013. Inhibitory actions of a local neural reflex on propulsive activity of the esophageal striated muscle portion in

- rats. Res. Vet. Sci. 94, 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.014>
- Shiina, T., Shima, T., Suzuki, Y., Wörl, J., Shimizu, Y., 2012. Neural regulation of esophageal striated muscle in the house musk shrew (*Suncus murinus*). Auton. Neurosci. Basic Clin. 168, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.01.003>
- Shima, T., Shiina, T., Naitou, K., Nakamori, H., Sano, Y., Shimizu, Y., 2016. Does the capsaicin-sensitive local neural circuit constitutively regulate vagally evoked esophageal striated muscle contraction in rats? J. Physiol. Sci. 66, 105–111. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0401-8>
- Shin, H.W., Soh, J.S., Kim, H.Z., Hong, J., Woo, D.H., Heo, J.Y., Hwang, E.M., Park, J.Y., Lee, C.J., 2014. The inhibitory effects of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on K^{2P} (two-pore domain potassium) channel TREK-1. J. Anesth. 28, 81–86. <https://doi.org/10.1007/s00540-013-1661-1>
- Takeuchi, K., Nagahama, K., 2014. Animal model of acid-reflux esophagitis: Pathogenic roles of acid/pepsin, prostaglandins, and amino acids. Biomed Res. Int. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/532594>
- Tasleem, F., Azhar, I., Ali, S.N., Perveen, S., Mahmood, Z.A., 2014. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. Asian Pac. J. Trop. Med. 7, S461–S468. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60275-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60275-3)
- Tewksbury, J.J., Reagan, K.M., Machnicki, N.J., Carlo, T.A., Haak, D.C., Peñaloza, A.L.C., Levey, D.J., 2008. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 11808–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802691105>
- Vijayakumar, R.S., Surya, D., Nalini, N., 2004. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox Rep. 9, 105–110. <https://doi.org/10.1179/135100004225004742>
- Yu, S., Udem, B.J., Kollarik, M., 2005. Vagal afferent nerves with nociceptive properties in guinea-pig oesophagus. J. Physiol. 563, 831–842. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079574>