



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Caracterización del efecto antinociceptivo de las alcaloides afinina y piperina en el dolor neuropático”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Luis Arturo Sánchez Trujillo

TUTOR

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

“Caracterización del efecto antinociceptivo de las alcanidas piperina y afinina en el dolor neuropático”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Luis Arturo Sánchez Trujillo

TUTOR

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química UNAM



Ciudad de México, 2018

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTADO DE FIGURAS..... | 1 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 3 |
| 1. RESUMEN..... | 5 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 7 |
| 3.1. DOLOR | 7 |
| 3.1.1. <i>Fisiología del dolor</i> | 9 |
| 3.1.2. <i>Dolor Neuropático</i> | 10 |
| 3.1.2.1. Mecanismos del dolor neuropático | 12 |
| 3.1.2.2. Tratamiento del dolor neuropático | 14 |
| 3.2. USO DE PRODUCTOS NATURALES EN EL DOLOR NEUROPÁTICO..... | 17 |
| 3.3. ALCAMIDAS | 19 |
| 3.3.1. <i>Afinina</i> | 21 |
| 3.3.2. <i>Piperina</i> | 22 |
| 3.4. RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITORIO V1 (TRPV1)..... | 24 |
| 3.5. RECEPTOR DE ÁCIDO Γ -AMINO BUTÍRICO TIPO A (GABA _A) | 26 |
| 3.6. MODELOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DOLOR NEUROPÁTICO | 26 |
| 4. JUSTIFICACIÓN..... | 28 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 29 |
| 6. OBJETIVOS..... | 29 |
| 6.1. OBJETIVO GENERAL..... | 29 |
| 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES..... | 29 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 30 |
| 7.1. ANIMALES | 30 |
| 7.2. FÁRMACOS Y REACTIVOS | 30 |
| 7.3. EXTRACCIÓN DE LAS ALCAMIDAS | 30 |
| 7.3.1. <i>Extracción y purificación de piperina</i> | 30 |
| 7.3.2. <i>Extracción y purificación de afinina</i> | 31 |

| | | |
|----------|--|----|
| 7.4. | ANÁLISIS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (H1 Y C13) | 31 |
| 7.5. | DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL DE PIPERINA..... | 32 |
| 7.6. | CIRUGÍA DE LIGADURA DE NERVIOS L5/L6 | 32 |
| 7.7. | DETERMINACIÓN DE LA ALODINIA TÁCTIL | 33 |
| 7.8. | DISEÑO DEL ESTUDIO Y PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS..... | 34 |
| 7.9. | ANÁLISIS DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 34 |
| 8. | RESULTADOS | 35 |
| 8.1. | EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ALCAMIDAS..... | 35 |
| 8.1.1. | <i>Extracción, purificación y caracterización de piperina.....</i> | 35 |
| 8.1.2. | <i>Extracción, purificación y caracterización de afinina</i> | 37 |
| 8.2. | EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LAS ALCAMIDAS..... | 39 |
| 8.2.1. | <i>Evaluación de los controles.....</i> | 39 |
| 8.2.2. | <i>Efecto antialodínico de la piperina</i> | 40 |
| 8.2.2.1. | <i>Determinación de la DE₅₀ de la piperina.....</i> | 41 |
| 8.2.3. | <i>Efecto antialodínico de la afinina</i> | 42 |
| 8.3. | ANTAGONISTAS SOBRE EL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA PIPERINA. | 45 |
| 9. | DISCUSIÓN..... | 48 |
| 10. | CONCLUSIONES | 57 |
| 11. | PERSPECTIVAS..... | 58 |
| 12. | BIBLIOGRAFÍA..... | 59 |
| 13. | ANEXOS | 75 |
| | ANEXO I. CARTA DE APROBACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO POR EL CICUAL FACULTAD DE QUÍMICA..... | 75 |
| | ANEXO II. TABLA DE DIXON PARA LOS VALORES DE K CON BASE EN EL PATRÓN DE RESPUESTA..... | 76 |
| | ANEXO III. ESPECTRO RMN ¹ H DE PIPERINA..... | 77 |
| | ANEXO IV. ESPECTRO RMN ¹³ C DE PIPERINA..... | 78 |
| | ANEXO V. ESPECTRO RMN ¹ H DE AFININA..... | 79 |
| | ANEXO VI. ESPECTRO RMN ¹³ C DE AFININA..... | 80 |

Listado de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Los cuatro principales tipos de dolor..... | 8 |
| Figura 2. Esquema de las principales estructuras neuronales relacionadas con el dolor | 10 |
| Figura 3. Clasificación de algunos síndromes de dolor neuropático..... | 11 |
| Figura 4. Resumen de los principales mecanismos que subyacen el dolor neuropático periférico, su ubicación y los desencadeantes responsables de su activación | 13 |
| Figura 5. Resumen esquemático de los tratamientos para el dolor neuropático. | 15 |
| Figura 6. Esquema general de valoración del paciente con dolor neuropático..... | 16 |
| Figura 7. Tabla que presenta tres diferentes compuestos de origen natural con actividad en el dolor neuropático. | 18 |
| Figura 8. Propiedades estructurales de las alcaloides | 20 |
| Figura 9. Estructura química bidimensional de la afinina..... | 21 |
| Figura 10. Raíces de <i>Heliopsis longipes</i> | 22 |
| Figura 11. Estructura química bidimensional de la piperina..... | 22 |
| Figura 12. Hojas y frutos de <i>Piper nigrum</i> | 23 |
| Figura 13. Esquema de las subunidades del TRPV1 y esquema tetramérico del TRPV1 | 24 |
| Figura 14. Tabla donde se listan los diferentes modelos animales en el dolor neuropático | 26 |
| Figura 15. Diagrama esquemático mostrando la vista dorsal de las estructuras óseas en los niveles lumbar y sacro inferior | 31 |
| Figura 16 Esquema de las condiciones para la determinación de la alodinia táctil utilizando las fibras de von Frey | 32 |
| Figura 17. Cristales de piperina. Imagen tomada a través de microscopio estereoscópico..... | 34 |
| Figura 18. Estructura química de la piperina, (2E, 4E)-5-(1, 3-benzodioxol-5-il)-1-piperidin-1-ilpenta-2,4-dien-1-ona..... | 34 |
| Figura 19. Diagrama ORTEP de piperina..... | 35 |
| Figura 20. Perspectiva del empaqueo molecular de la celda unitaria del cristal de piperina..... | 36 |
| Figura 21. Estructura química de la afinina. (2E,6Z,8E)-N-Isobutil-2,6,8-decatrienamida..... | 36 |
| Figura 22. Alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios L5 y L6. Controles | 38 |
| Figura 23. Curso temporal del 50% de umbral de retirada de pata de piperina | 39 |
| Figura 24. %MEP de diferentes dosis de piperina..... | 40 |
| Figura 25. log Dosis vs. %MEP de la piperina administrada vía ip..... | 40 |
| Figura 26. Curso temporal del 50% de umbral de retirada de pata de afinina. | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 27. %MEP de diferentes dosis de afinina | 42 |
| Figura 28. log Dosis vs. %MEP de la afinina administrada vía ip | 43 |
| Figura 29. Efecto antialodínico de las coadministraciones de piperina con antagonistas TRPV1 y TRPA1. Cursos temporales y %MEP | 44 |
| Figura 30. Efecto antialodínico de las coadministraciones de piperina con antagonistas TRPC y GABA _A . Cursos temporales %MEP. | 46 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| %MEP | Porcentaje de Máximo Efecto Posible |
| °C | Grados Celcius |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| AINEs | Antiinflamatorios no esteroideos |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ARRIVE | Investigación Animal: Reporte de Experimentos <i>in vivo</i> |
| ATC | Antidepresivos tricíclicos |
| Bic | Bicuculina |
| BNDF | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| Ca ²⁺ | Ion calcio |
| CDCL ₃ | Cloroformo deuterado |
| CICUAL | Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio |
| CZP | Capsazepina |
| d | Doblete |
| dd | Doble de dobles |
| DE ₅₀ | Dosis Efectiva 50 |
| E.E.M. | Error estándar de la media |
| g | Gramos |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GRD | Ganglio de la Raíz Dorsal |
| GT | Ganglio Trigémino |
| GTV | Ganglio torácico vagal |
| H | Hipotálamo |
| h | Hora |
| Hex | Hexano |
| ip | Intraperitoneal |
| ISRS | Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina |
| it | Intratecal |
| K ⁺ | Ion Potasio |
| kg | Kilogramo |
| m | Multiplete |
| M | Concentración molar |
| mg | Miligramo |
| MHz | Megahertz |
| ml | Mililitro |
| mV | Milivoltios |
| Na ⁺ | Ion sodio |

| | |
|---------------------|--|
| NMDAr | Receptor de N-metil-D-aspartato |
| NO | Óxido nítrico |
| PGB | Pregabalina |
| RMN ¹³ C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 |
| RMN ¹ H | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno |
| s | Señal simple |
| SDRC | Síndrome doloroso regional complejo |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNP | Sistema Nervioso Periférico |
| SSI | Solución salina isotónica |
| t | Triplete |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TRP | Receptores de potencial transitorio |
| TRPA1 | Receptor de potencial transitorio de anquirina 1 |
| TRPC | Receptor de potencial transitorio canónico |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitorio vanilloide 1 |
| TRPV4 | Receptor de potencial transitorio vanilloide 4 |
| USAI | Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria |
| VBS | Sitio de unión vanilloide |
| δ | Desplazamiento químico |
| μg | Microgramo |

1. RESUMEN

El dolor neuropático actualmente afecta aproximadamente al 8% de la población mundial. Este síndrome es de difícil manejo debido a una falta de comprensión de su etiología y la carencia de un tratamiento efectivo y específico para el mismo. Las estrategias terapéuticas existentes presentan limitaciones importantes, por lo que la búsqueda de nuevos agentes con utilidad en el dolor neuropático es altamente necesaria. En este contexto los productos naturales se presentan como una alternativa muy importante para el tratamiento del dolor ya que siguen siendo la principal fuente de obtención de compuestos con utilidad terapéutica. Dentro de los productos naturales, los compuestos conocidos como alcanidas llaman la atención debido a sus múltiples efectos entre los que se destacan el inflamatorio y el analgésico. La afinina y la piperina son las alcanidas principales de las familias Asteraceae, y Piperaceae respectivamente, y han demostrado actividad analgésica en algunos modelos de dolor visceral e inflamatorio. A pesar de la falta de evidencia documentada, estudios previos sugieren que la afinina y piperina pueden intervenir en la modulación de algunos mecanismos comunes en el dolor de diversas etiologías como lo es el dolor neuropático.

En el presente trabajo se obtuvieron las alcanidas piperina y afinina de *Piper nigrum* y *Heliopsis longipes* las cuales fueron caracterizadas por métodos espectrométricos. El efecto analgésico de estas alcanidas se estudió en un modelo de ligadura de nervios espinales L5 y L6 utilizando el modelo de “up-and-down” y se determinó su mecanismo de acción farmacológicamente.

Los resultados indicaron que la afinina presentó bajo efecto antialodínico junto con efectos tóxicos por lo que fue descartada del estudio. Por el contrario, la piperina presentó buen efecto antialodínico con una DE₅₀ de 17.43 mg/kg administrada por vía intraperitoneal. Los estudios farmacológicos de la piperina sugieren un mecanismo de acción dual; una desensibilización aguda de los receptores TRPV1 en las fibras nociceptivas y una modulación positiva del receptor GABA_A.

Este estudio constituye la primera vez que se comprueba el efecto analgésico de la piperina en el dolor neuropático y lo hace un buen candidato para futuros estudios.

2. INTRODUCCIÓN

Las alcanidas son productos naturales frecuentemente presentes en plantas que se utilizan en la herbolaria tradicional de diferentes culturas en todo el mundo. Son compuestos abundantes de las familias Asteraceae, Solanaceae, Rutaceae y Piperaceae. Estos compuestos presentan una gran variedad de actividades biológicas como insecticidas, antibacterianas, inmunoestimulantes, antioxidantes, antiprotozoarias, ansiolíticas, antiinflamatorias y analgésicas, siendo estas dos últimas, sus cualidades más características. Muchas especies de plantas pertenecientes a estas familias producen una sensación de anestesia al contacto con la boca, lengua o los labios. Razón por la cual, desde hace siglos en la medicina tradicional, la planta completa o algunas partes de la misma, así como sus extractos presentan un uso como anestésico local y en remedios para el alivio dolor dental. En la actualidad la capsaicina es la alcanida más estudiada en relación con su actividad analgésica. A pesar de sus efectos secundarios, la capsaicina actualmente se usa como principio activo en diversas formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de diferentes tipos de dolor, estableciendo las bases para el eventual uso de otras alcanidas relacionadas al mismo fin.

La afinina y la piperina son las alcanidas principales de las familias Asteraceae, y Piperaceae respectivamente, y han demostrado actividad analgésica en algunos modelos de dolor visceral e inflamatorio. A pesar de la falta de evidencia documentada de sus propiedades analgésicas, el potencial terapéutico de estas alcanidas parece estar desaprovechado debido a que estudios previos sugieren que pueden intervenir en la modulación de algunos mecanismos comunes en el dolor de diversas etiologías, lo que las hace buenas candidatas para el tratamiento de algunos tipos de dolor crónico como el dolor neuropático. El dolor neuropático es un síndrome de muy difícil manejo en la práctica clínica debido a que aún existe una carencia del entendimiento etiológico y de un tratamiento efectivo y específico. La actualidad exige el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para su tratamiento.

El objetivo del presente trabajo fue aislar las alcanidas afinina y piperina de sus respectivas fuentes naturales y determinar farmacológicamente el efecto analgésico en el dolor neuropático, así como dilucidar los mecanismos de acción por los cuales ejercen su efecto.

3. MARCO TEÓRICO

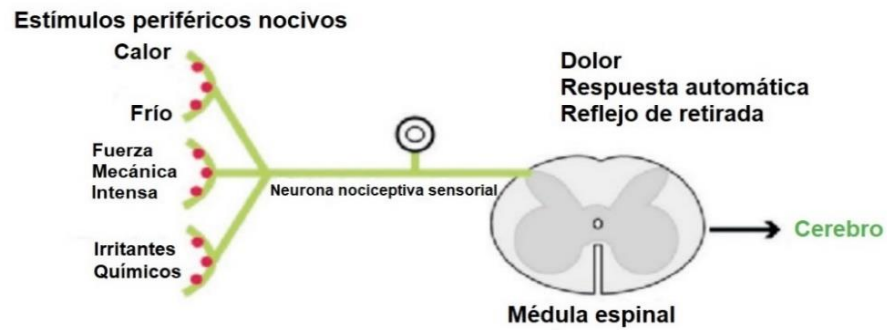
3.1. Dolor

El dolor tiene una función sumamente importante en la protección del organismo, ya que obliga al cuerpo a retirarse de estímulos físicos o químicos que ponen en peligro su integridad¹. Sin embargo, cuando existe un funcionamiento anormal en las estructuras que regulan este mecanismo, el dolor sobrepasa su función y se vuelve patológico². Dado que la sensación del dolor implica componentes fisiopatológicos y psicológicos que son difíciles de interpretar³, definirlo se vuelve muy complicado. Actualmente la Organización Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) tiene la definición más aceptada y lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño”⁴; de la misma manera, su clasificación resulta difícil debido a los diversos factores fisiológicos, anatómicos y psicológicos que lo integran⁵, actualmente, la clasificación más aceptada es la propuesta por Woolf y colaboradores, quienes se basan en el mecanismo neurofisiológico que origina el dolor para clasificarlo en 4 tipos (Fig. 1)⁶:

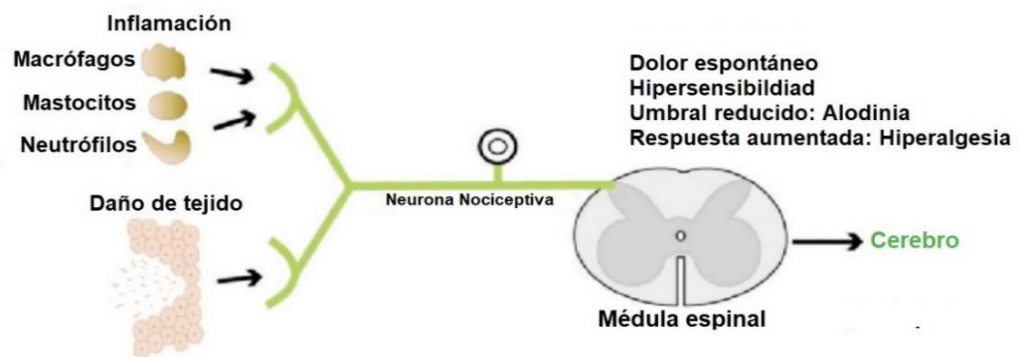
1. Dolor nociceptivo: Dolor transitorio que responde a estímulos nocivos mediante un sistema especializado de alto umbral. Se considera como un sistema de alerta ante estímulos potencialmente dañinos
2. Dolor inflamatorio: Dolor espontáneo que responde a un daño en el tejido y se acompaña de hipersensibilidad. Este dolor tiene como objetivo la reducción del contacto y movimiento de la zona afectada. Se considera como un sistema de protección para evitar un daño mayor al ya originado.
3. Dolor neuropático: Tipo de dolor espontáneo acompañado de hipersensibilidad que se genera por lesiones en el sistema nervioso, tanto a nivel periférico (polineuropatía diabética o neuralgia post-herpética) como a nivel central (lesión en la médula espinal o esclerosis múltiple)⁷.
4. Dolor funcional: Dolor no adaptativo ya que carece de un motivo de respuesta específico, se origina como consecuencia de sensibilidad anormal o procesamiento central alterado.

A pesar de que todos los tipos de dolor poseen etiologías distintas, el dolor neuropático, el funcional y el inflamatorio presentan una característica que los diferencia del dolor nociceptivo. Ésta es que se pueden presentar de manera espontánea en ausencia aparente de un estímulo, o bien, puede ser provocado por un estímulo capaz de producir dos respuestas distintas: Hiperalgnesia, una reacción exagerada ante un estímulo nocivo y alodinia, una respuesta nociceptiva ante un estímulo inocuo⁶.

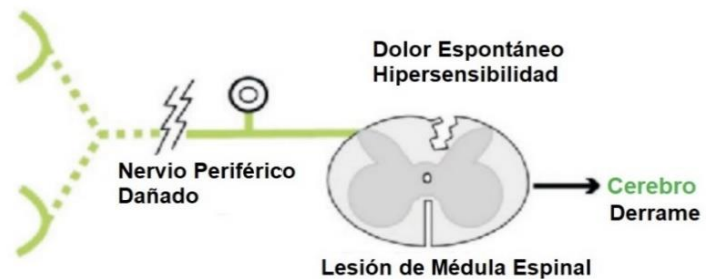
A. Dolor Nociceptivo



B. Dolor Inflamatorio



C. Dolor Neuropático



D. Dolor Funcional

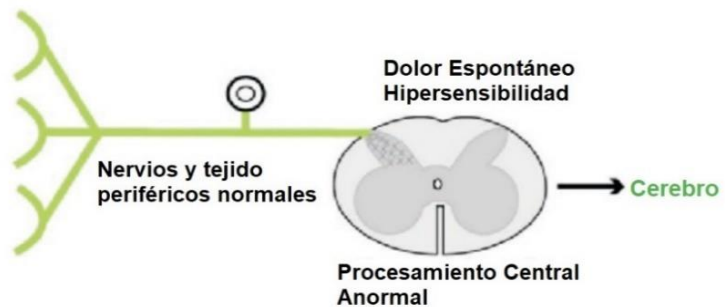


Figura 1. Los cuatro principales tipos de dolor, modificado de Woolf *et al.*⁶

El objetivo del estudio del dolor es la identificación de los mecanismos responsables y la búsqueda de herramientas que normalicen o impidan las alteraciones en el procesamiento nociceptivo.

3.1.1. Fisiología del dolor

Para entender la fisiología del dolor es necesario distinguir la diferencia entre dolor y nocicepción: Mientras que el primero es una experiencia subjetiva, producto de una percepción conjunta por el sistema nervioso central, que incorpora un importante componente emocional, la nocicepción es el proceso neurológico y fisiológico de codificación de estímulos nocivos y la sensación del dolor puede no estar precisamente implicada⁸. El proceso nociceptivo inicia con los nociceptores. Los nociceptores son neuronas sensoriales periféricas especializadas que nos alertan de estímulos potencialmente dañinos detectando extremos de temperatura, presión o sustancias químicas y traduciendo estos estímulos a una señal eléctrica que es transmitida de la periferia al sistema nervioso central a través de axones⁹. Existen dos tipos de nociceptores: Mecanorreceptores de alto umbral los cuales responden a la deformación mecánica y receptores polimodales que responden a una variedad de estímulos (temperatura, químicos, etc.) que dañan el tejido. Los nociceptores son, por tanto, las terminaciones de fibras nerviosas de las cuales hay dos tipos, fibras A δ y fibras C. Éstas son fibras aferentes primarias que tienen cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en el ganglio trigémino (GT) y terminan en el asta dorsal de la médula espinal⁹. Las raíces nerviosas de las fibras se pueden bifurcar en ramas ascendentes y descendentes que pueden terminar en diferentes segmentos del asta dorsal; las fibras C terminan en la lámina II y las fibras A δ terminan en las láminas I y V¹⁰. El asta dorsal de la médula espinal es el sitio donde las fibras aferentes primarias realizan sinapsis con las neuronas de segundo orden, es también donde ocurren interacciones complejas entre las interneuronas excitatorias e inhibitorias y donde ejercen su efecto los tractos inhibitorios descendentes de centros superiores del SNC¹⁰. Existen tres tipos de neuronas de segundo orden: (1) nociceptivo específicas (responden selectivamente a estímulos nocivos de alto umbral), (2) de amplio rango dinámico (responden a un amplio rango de estímulos sensoriales) y (3) de bajo umbral (responden únicamente a estímulos inocuos). Las neuronas de segundo orden ascienden a los centros superiores a través de los tractos espinotalámico y espinoreticular que se localizan en la sustancia blanca anterolateral de la médula espinal¹¹. El tálamo es el área clave para procesar información somatosensorial. Los axones que viajan en los tractos espinotalámico lateral y medial terminan en sus respectivos núcleos medial y lateral, y desde aquí las neuronas se proyectan hacia las cortezas somatosensoriales primaria y secundaria, la ínsula, la corteza cingulada anterior y la corteza prefrontal. Estas áreas desempeñan diversas funciones en la percepción del dolor y también interactúan con otras áreas del cerebro, por ejemplo, el cerebelo y los ganglios basales (que tradicionalmente se sabe que están más relacionadas con la función motora que con el dolor)¹². El proceso mencionado se ejemplifica esquemáticamente en la Fig. 2.

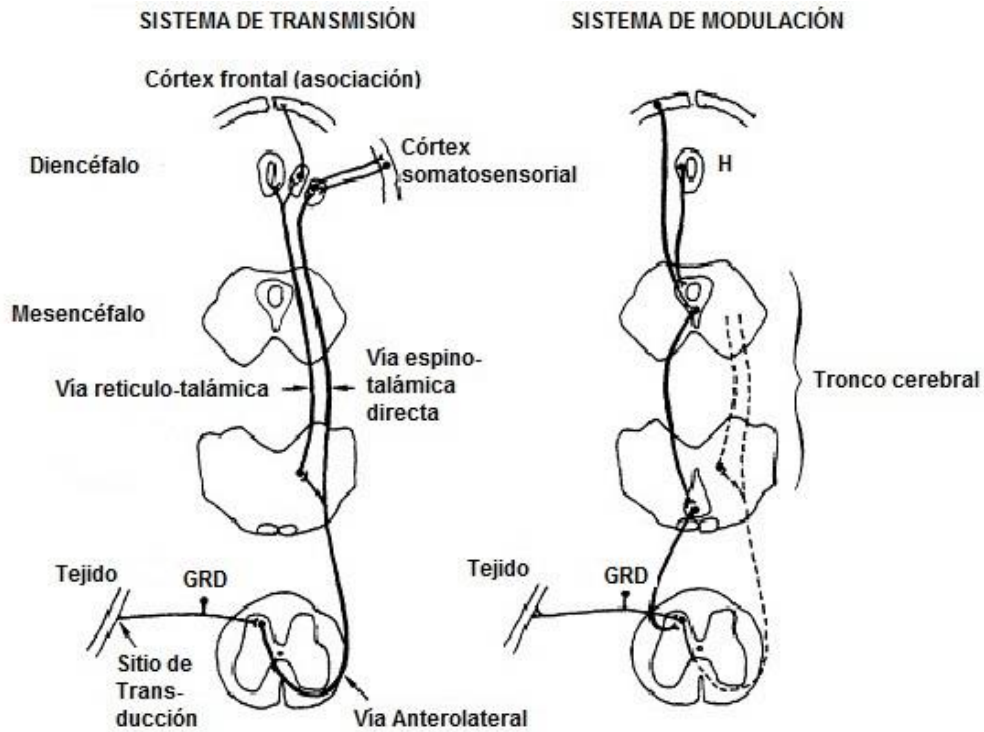


Figura 2. Esquema de las principales estructuras neuronales relacionadas con el dolor. (GRD: Ganglio de la raíz dorsal, H: Hipotálamo)¹³.

Es importante señalar que, aunque se explicaron las principales vías nociceptivas, la experiencia dolorosa va mucho más allá de sólo estímulos físicos o químicos desencadenando respuestas neuronales.

3.1.2. Dolor Neuropático

El dolor neuropático se desarrolla como consecuencia de una lesión o enfermedad que afecta las vías somatosensoriales en el sistema nervioso periférico o central y ocurre en muchas enfermedades neurológicas (neuropatía periférica, radiculopatía, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular y esclerosis múltiple), se considera una condición incapacitante que afecta del 6 al 8% de la población mundial¹⁴. En este tipo de dolor, se pierde la condición adaptativa del mismo, puesto que deja de ser una señal fisiológica asociada a la búsqueda de protección para convertirse en un estado patológico que involucra una serie de elementos que facilitan su generación y persistencia en el tiempo.

Algunos ejemplos de dolor neuropático son la neuralgia del trigémino¹⁵, la neuropatía diabética¹⁶, la neuralgia post-herpética¹⁷, las monorradiculopatías¹⁸, dolor neuropático inducido por quimioterapia^{19,20}, el dolor de nervio fantasma^{21,22}, el síndrome doloroso regional complejo²³.

El dolor neuropático presenta una gran variedad de síntomas, puede percibirse de diferentes maneras, ya sea como sensación quemante persistente y/o lancinante²⁴ y frecuentemente está asociado a signos sensoriales como la alodinia y la hiperalgesia^{25,26}.

También pueden presentarse signos sensoriales anormales de tipo espontáneo o evocado, como las disestesias (sensaciones anormales no placenteras) y parestesias (sensaciones anormales no desagradables)^{25,27}. Dichas características se originan por la presencia de sensibilización a nivel de las fibras aferentes primarias (sensibilización periférica) o a nivel del asta dorsal de la médula espinal (sensibilización central)²⁸. Estos fenómenos son consecuencia de una estimulación nociva repetida que genera un aumento en la actividad espontánea, una disminución del umbral de activación y un incremento en la respuesta a estímulos subsecuentes, por lo que supone modificaciones de la fisiología normal de las neuronas que integran la vía de transmisión nociceptiva tanto a nivel periférico como nivel central²⁸. Los síndromes de dolor neuropático pueden ser clasificados en periféricos y centrales, según la localización anatómica de la lesión o la enfermedad causante(Fig. 3)¹⁴.

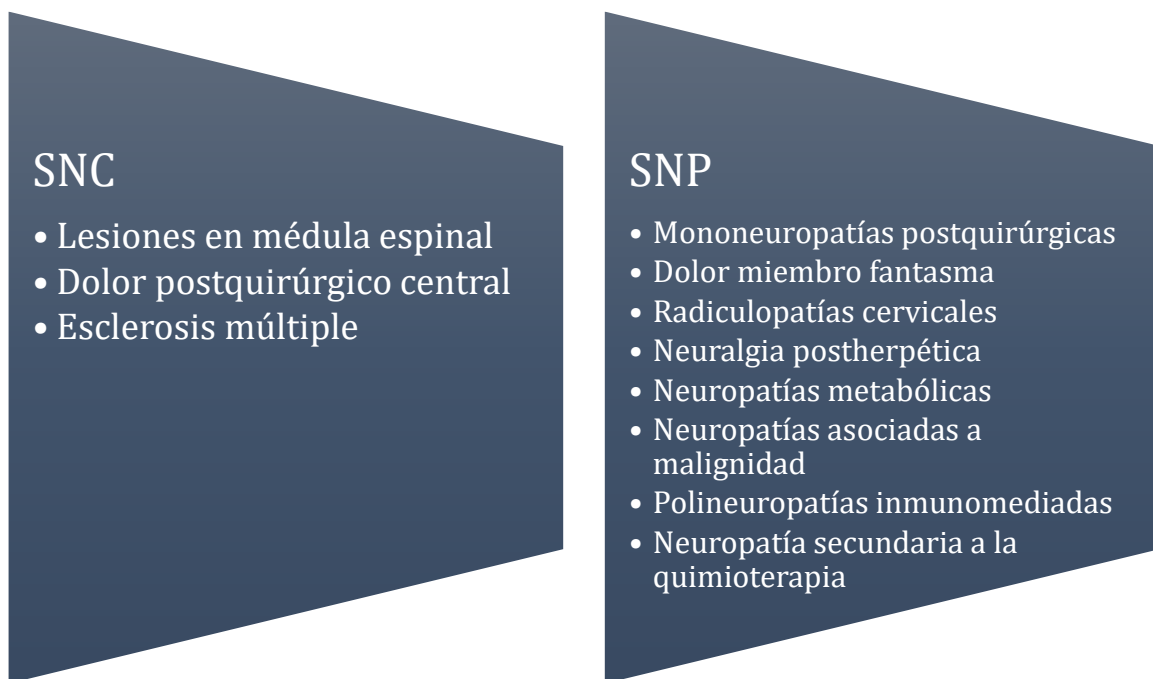


Figura 3. Clasificación de algunos síndromes de dolor neuropático, modificado de Magrinelli et. al. ¹⁴

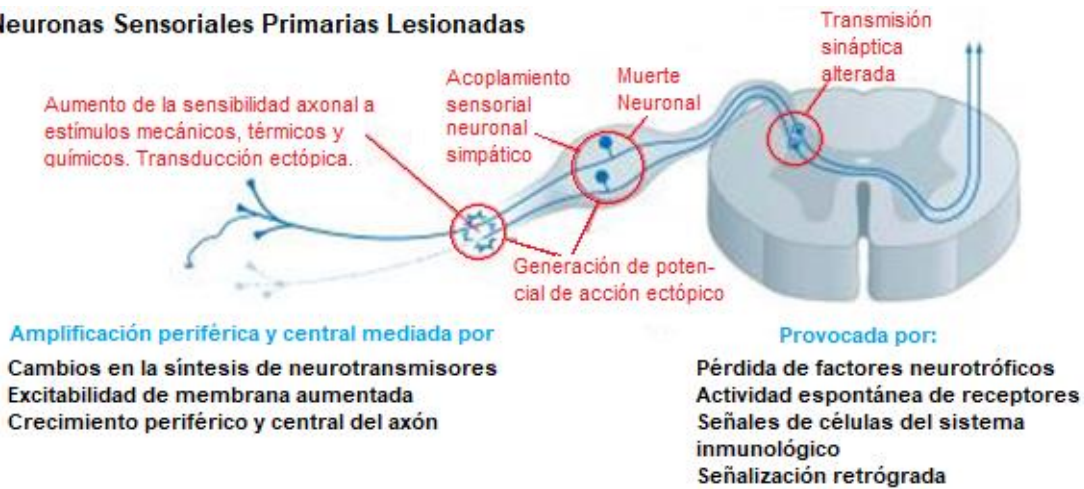
3.1.2.1. *Mecanismos del dolor neuropático*

Existen múltiples mecanismos que contribuyen a la generación y mantenimiento del dolor neuropático que pueden ocurrir a diferentes niveles del SN, como el sistema nervioso periférico, la médula espinal, los GRD y el cerebro²⁹, sin embargo, se ha descrito muy poco acerca de los mecanismos subyacentes al dolor neuropático central. Los mecanismos que mejor se han descrito hasta el momento son a nivel periférico, los cuales incluyen la sensibilización de nociceptores³⁰, el incremento y redistribución de canales de sodio³¹, aumento de la expresión de adrenoreceptores, sustancia P, galanina y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)²⁹. También se ha sugerido la participación de los receptores de potencial transitorio (TRP) que favorecen la entrada de Na⁺ y Ca²⁺ a la célula. Se sabe que el aumento de la función de los receptores TRPA1, TRPV1 y TRPV4 presentes en la membrana plasmática de los nociceptores aumenta la percepción de estímulos nocivos^{32, 33, 34}, entre otros.

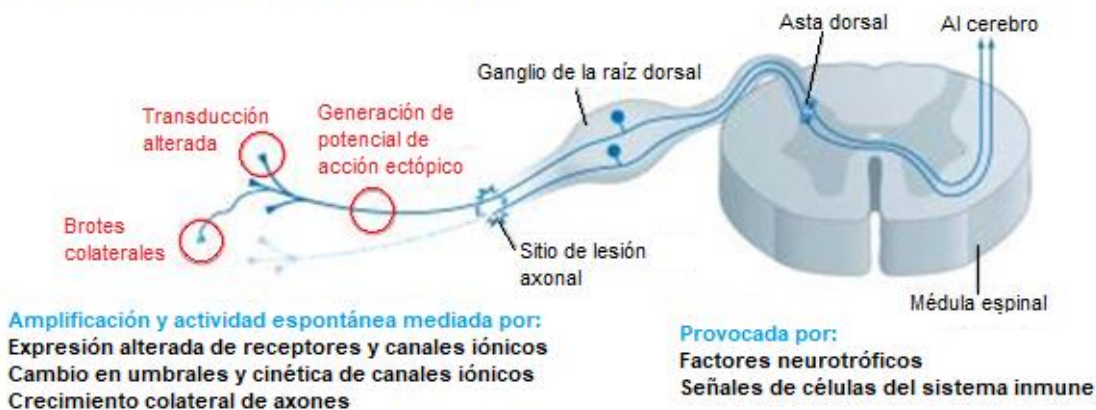
A nivel central la sensibilización del asta dorsal de la médula espinal es un evento considerado indispensable para la generación del dolor neuropático³⁵, durante este evento, el receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr) es fosforilado, lo cual incrementa su distribución y se traslada desde depósitos intracelulares hasta la membrana; una vez ahí, el aumento de potenciales de acción incrementa la sensibilidad a glutamato y a su vez el flujo de Ca²⁺ en dicho receptor. Esto origina un aumento en la excitabilidad de las células, una disminución del umbral de activación y, por lo tanto, modificaciones a la respuesta considerada normal de las diferentes fibras nociceptivas (A δ y C) ya que ahora responden a estímulos normalmente inocuos, mientras que a estímulos nocivos responden de manera exagerada⁶. La sensibilización del asta dorsal es debida en parte a la exposición de mediadores pronociceptivos en la zona de daño³⁶ siendo el óxido nítrico (NO) uno de los mediadores más estudiados. Se ha determinado un incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa en modelos de dolor neuropático en rata³⁷, obteniéndose un efecto antinociceptivo con inhibidores de la óxido nítrico sintasa³⁸. La acción propuesta para el NO a nivel espinal es que funciona como un transmisor retrogrado que incrementa la liberación de neurotransmisores y que ejerce control postsináptico de canales iónicos³⁹. También existe una reducción en el mecanismo de inhibición espinal a través de la disminución de la liberación de GABA y opioides endógenos desde las interneuronas inhibitoras que inervan la terminal central de las fibras aferentes primarias, lo que facilita el incremento de la transmisión del dolor^{34, 40}, así mismo, la modulación descendiente del dolor se ve afectada⁴¹. Las vías descendientes inhibitoras del dolor que involucran la liberación de serotonina, noradrenalina y péptidos opioides se ven severamente disminuidas⁴², mientras que las vías descendientes que

promueven el dolor a través de la liberación de serotonina aumentan^{43, 44}. Todos estos mecanismos se resumen en la Figura 4.

A. Neuronas Sensoriales Primarias Lesionadas



B. Neuronas Sensoriales Primarias Intactas



C. Neuronas Sensoriales de Segundo Orden



Figura 4. Resumen de los principales mecanismos que subyacen el dolor neuropático periférico, su ubicación y los desencadenantes responsables de su activación. Modificado de Costigan *et al.*⁴⁵

En resumen, los receptores TRP, la vía serotoninérgica, la opioidérgica, la GABAérgica y del óxido nítrico juegan un papel importante en la modulación del dolor neuropático tanto a nivel central como periférico. Esto explica por qué numerosos fármacos empleados para el tratamiento de este tipo de dolor tienen alguna de estas vías como diana farmacológica.

3.1.2.2. *Tratamiento del dolor neuropático*

Debido a la falta de un tratamiento verdaderamente efectivo para esta condición, se han propuesto algunas recomendaciones terapéuticas para el tratamiento del dolor neuropático. Existen numerosas guías que indican cuál es el medicamento de primera, segunda y tercera línea a utilizar con base en la causa de la condición neuropática^{46, 47, 48}, sin embargo, el tratamiento de esta condición sigue siendo de muy difícil manejo en la clínica debido a la falta del entendimiento etiológico del mismo⁴⁹. Los pacientes con neuropatía son considerados resistentes a los analgésicos clásicos (AINEs y opioides), por lo que requieren de otros medicamentos, entre los que podemos mencionar a los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores de la recaptura de serotonina y/o serotonina-norepinefrina⁵⁰, los antiepilépticos y anticonvulsivos activos en canales de Na⁺ y de Ca²⁺⁵¹. Así como también algunos opioides como el tramadol⁵², AINEs donadores de óxido nítrico⁵³, lidocaína y capsaicina, únicamente de manera tópica^{14, 54}. A pesar de la cantidad de fármacos disponibles, 3 de cada 5 pacientes logra una respuesta satisfactoria y aun así reportan menos alivio que aquellos pacientes con dolor nociceptivo⁴⁰.

La primera línea de tratamiento para la neuropatía son los antidepresivos tricíclicos (ATC), desafortunadamente, estos fármacos presentan eficacia limitada y efectos adversos severos⁵⁵. Los ATC actúan inhibiendo la recaptura de serotonina y noradrenalina, están contraindicados en pacientes con enfermedades cardíacas, retención urinaria o glaucomas y la aparición de sus efectos analgésicos aparecen después de semanas de tratamiento⁴⁷. Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina son mejor tolerados que los ATC aunque su eficacia es cuestionable ya que diversos estudios clínicos han mostrado poca o nula eficacia entre el placebo y estos fármacos^{56, 57}.

En la mayoría, los anticonvulsivos utilizados presentan efectos secundarios nada despreciables que se incrementan con el paso del tiempo. Entre ellos encontramos la pérdida de cabello, ganancia o pérdida de peso, hepatotoxicidad y pérdida de la función cognitiva⁵⁸.

El anticonvulsivo más utilizado para tratar el dolor neuropático es la gabapentina debido a su efectividad y menos efectos adversos, entre los que se encuentran: aumento de masa corporal, mareos, ataxia, sedación, euforia e hinchazón de tobillos. Al igual que los antidepresivos, gabapentina tarda varias semanas en alcanzar su efecto máximo y es necesaria la administración de tres dosis diarias⁵⁹.

A pesar de que algunos opioides son efectivos en la neuropatía, no son recomendados para su tratamiento debido a que el uso prolongado de estos fármacos resulta en la generación de efectos secundarios como constipación, retención urinaria, pérdida de la función inmune y cognitiva entre muchos otros asociados con la tolerancia y dependencia que generan⁵³. Finalmente, las pomadas de capsaicina y lidocaína, así como los AINEs y donadores de óxido nítrico han mostrado efectividad en estudios preliminares de dolor neuropático⁵⁴. Los tratamientos para el dolor neuropático se resumen en un esquema presentado en la Figura 5.

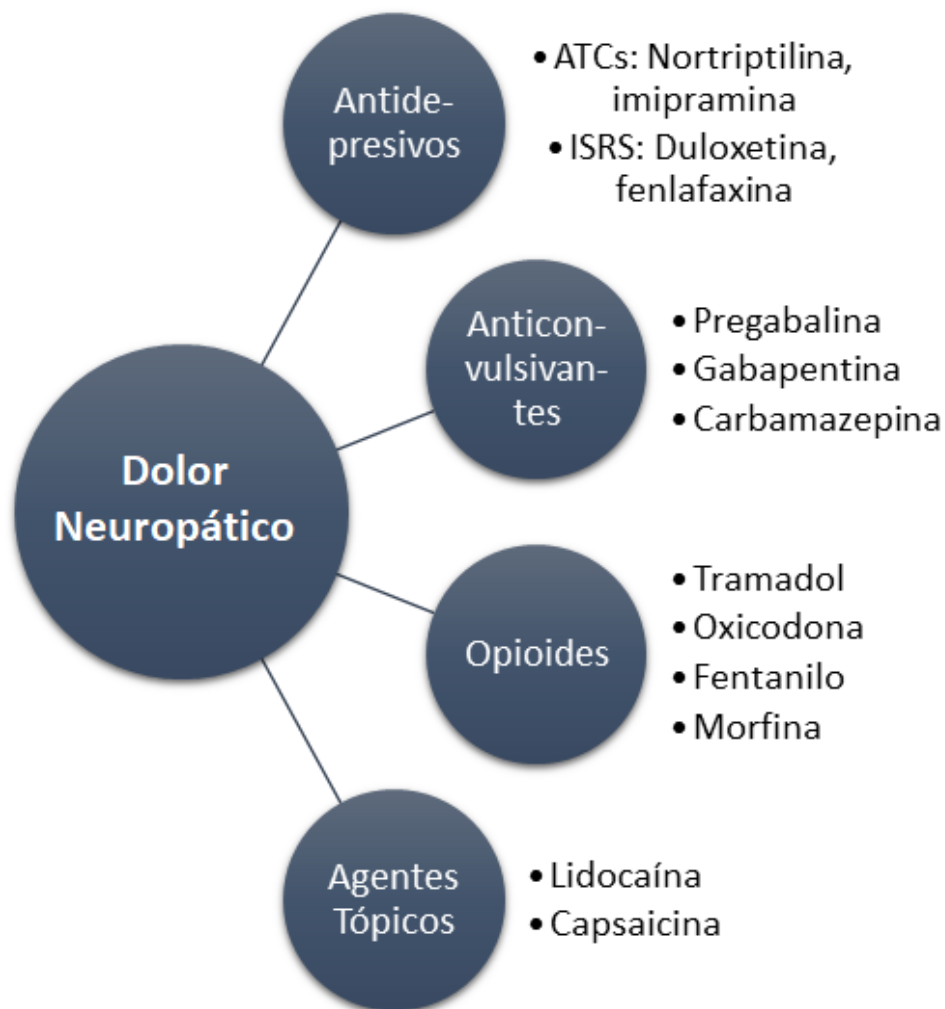


Figura 5. Resumen esquemático de los tratamientos para el dolor neuropático.

En nuestro país existe la Guía de Práctica Clínica del Tratamiento Farmacológico del Dolor Neuropático en Mayores de 18 años⁶⁰, donde se indica el tratamiento de primera, segunda y tercera línea dependiendo del tipo de dolor neuropático que presenta el paciente, así como los efectos adversos y recomendaciones de cada tratamiento. El algoritmo de tratamiento a seguir se muestra en la Figura 6.

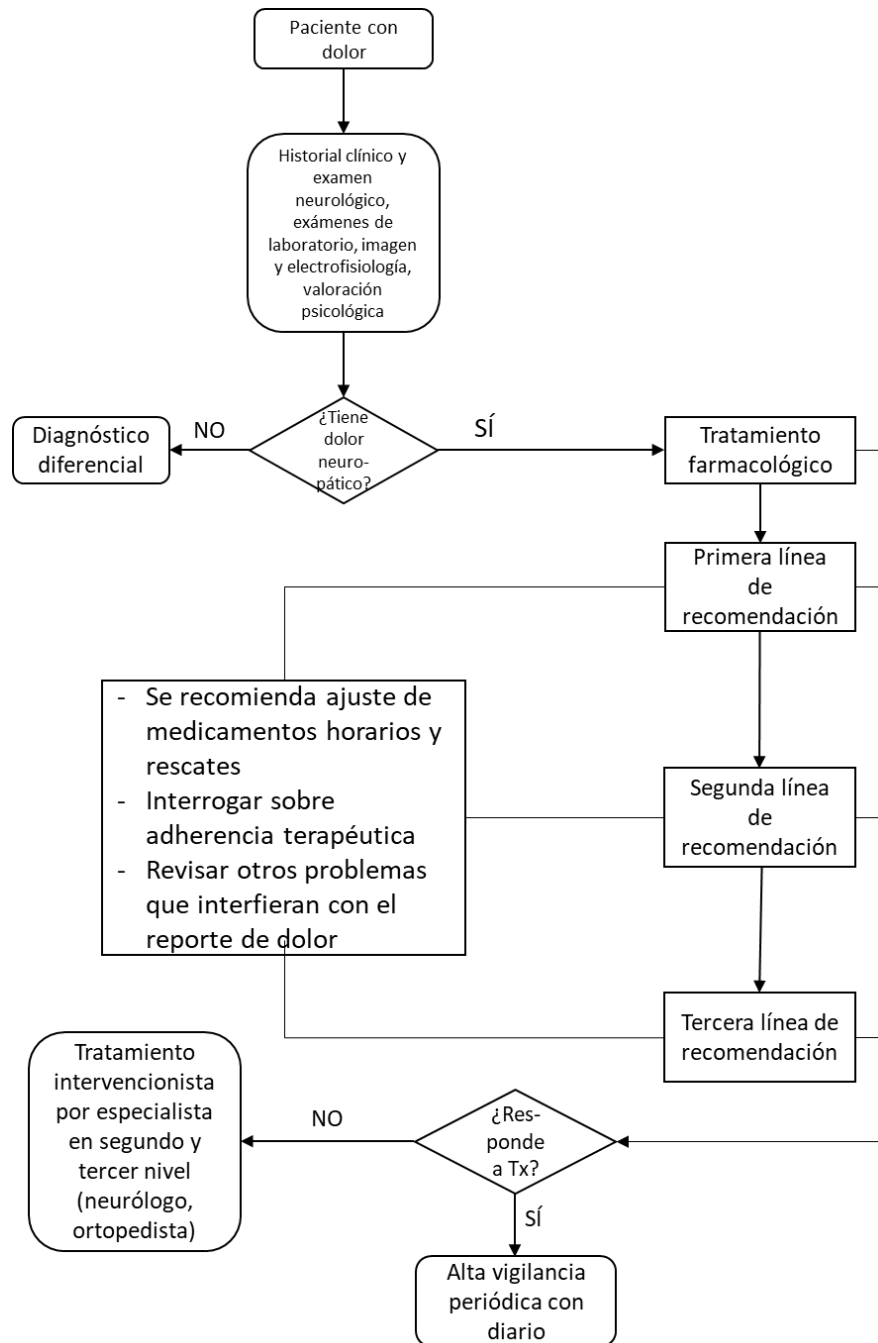


Figura 6. Esquema general de valoración del paciente con dolor neuropático⁶⁰.

En este contexto, se vuelve vital la investigación y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del dolor neuropático, y es necesario considerar el gran potencial que existe en el uso de productos naturales para este fin.

3.2. Uso de productos naturales en el dolor neuropático

Por las causas antes mencionadas, la búsqueda de nuevos compuestos químicos que puedan actuar como moléculas eficaces para el tratamiento del dolor neuropático ha tenido un auge en años recientes, y en esta búsqueda, los productos naturales juegan un papel muy importante ya que siguen siendo la fuente más prometedora de nuevos compuestos químicos con posible aplicación terapéutica.⁶¹ De acuerdo con una revisión sistemática de productos naturales evaluados en dolor neuropático, los cinco tipos de compuestos más estudiados son: flavonoides (28%), terpenos (17%), alcaloides (14%), fenoles (10%) y carotenoides (10%), los demás compuestos entran en el 21% restante. Todos los compuestos presentan diferentes mecanismos de acción, sin embargo, disminuir la neuroinflamación parece ser un mecanismo clave de éstos compuestos para aliviar el dolor neuropático⁶².

Comenzando por el grupo de compuestos más estudiado, los flavonoides son de los metabolitos secundarios más importantes para la industria farmacéutica y cosmética debido a sus múltiples propiedades biológicas. Éstos compuestos pueden controlar el dolor neuropático mediante la modulación de la proteína cinasa C y su actividad antioxidante. Los flavonoides que han resultado más prometedores son la quercetina, ginketina y la naringina ^{63, 64}.

Los terpenos son moléculas relativamente simples que se clasifican por el número de isoprenos que presentan en su estructura, tienen bajo peso molecular y son lipofílicos, por lo tanto, presentan un perfil de ser compuestos psicoactivos⁶⁵. En una revisión reciente, se ha descrito que los terpenos pueden actuar en el SNC modulando importantes sistemas de neurotransmisores como el glutamatérgico, serotoninérgico, opioidérgico y endocannabinoide⁶⁶, los cuales tienen un papel muy importante en la modulación del dolor neuropático.

Otros de los metabolitos secundarios estudiados contra la neuropatía son los alcaloides. Estos compuestos presentan un nitrógeno en su estructura, son sintetizados a partir de aminoácidos y presentan actividad farmacológica potente, muchos de ellos sobre el SNC⁶⁷. Los alcaloides koumina, cuya actividad puede estar relacionada con la regulación a la alza de alopregnanolona en la médula

espinal⁶⁸, y la lapaconitina, compuesto obtenido de especies del género *Aconitum*, que presenta un mecanismo de acción mediado por los receptores kappa opioides (κ OP)⁶⁹ son los que presentan una mejor actividad analgésica contra el dolor neuropático. Algunas moléculas derivadas de productos naturales con su respectiva clasificación y mecanismo de acción se muestran en la tabla de la figura 7

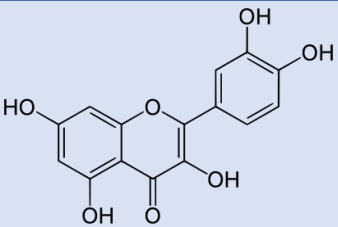
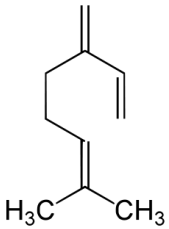
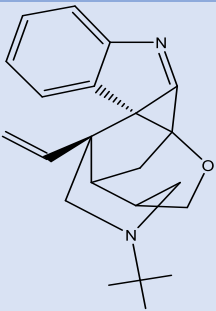
| Molécula | Clasificación | Fuente Natural | Mecanismo de acción | Cita bibliográfica |
|---|---------------|--|---|---|
|  <p>Quercetina</p> | Flavonoide | <i>Allium cepa</i> <i>Brassica olearacea</i> <i>Vitis vinifera</i> | Actividad antioxidante. Modulador de la Proteína Cinasa C. | Anjaneyulu <i>et al.</i> (2003) ⁷⁰ |
|  <p>β-Mirceno</p> | Monoterpeno | <i>Thymus vulgaris</i> <i>Humulus lupulus</i> <i>Verbena sp.</i> | Agonista α_2 adrenérgico con liberación estimulada de opioides endógenos | De Sousa <i>et al.</i> (2011) ⁶⁵ Rao <i>et al.</i> (1990) ⁷¹ |
|  <p>Koumina</p> | Alcaloide | <i>Gelsemium elegans</i> | Agonista kappa opioides(κ OP) | Xu <i>et al.</i> (2012) ⁶⁸ |

Figura 7. Tabla que presenta tres diferentes compuestos de origen natural con actividad en el dolor neuropático.

En la mayoría de los productos naturales evaluados frente al dolor neuropático destacan tres mecanismos farmacológicos: Mecanismos antioxidantes, reducción de mediadores pro inflamatorios, modulación de los sistemas neuronales clásicos implicados en el manejo del dolor⁶². En este sentido, Kissin realizó un extenso estudio de los fármacos analgésicos desarrollados y aprobados por la FDA durante el periodo de 1960 a 2009 y destaca que las nuevas investigaciones frente al dolor

neuropático deberían dirigirse hacia nuevos blancos terapéuticos: endocannabinoides, antagonistas NMDA, bloqueadores de canales de calcio tipo N y agonistas de Receptores de Potencial Transitorio V1(TRPV1) ⁷².

Estudios previos demostraron el efecto analgésico de la administración tópica de la capsaicina, agonista del receptor TRPV1 en pacientes con dolor neuropático, dicho efecto se vio acompañado de los efectos indeseables característicos de la capsaicina que limitan su uso terapéutico⁷³. La capsaicina pertenece a las alcanoides, grupo de productos naturales que muestran una amplia variabilidad estructural y una importante gama de actividades biológicas, incluida la analgésica, sin embargo, la investigación de estos compuestos sigue siendo muy escasa. El antecedente del uso de la capsaicina como tratamiento para la neuropatía, así como los registros del uso de plantas con alto contenido de alcanoides como analgésicos en la medicina tradicional⁷⁴ sugieren un gran potencial de estos compuestos frente al dolor neuropático.

3.3. Alcanoides

Las alcanoides o alquilalcanoides son compuestos constituidos por la unión de un ácido graso de cadena mediana o larga, de ocho a dieciocho carbonos generalmente alifática y una amina generalmente proveniente de algún aminoácido, ambos pueden incluir sistemas cíclicos o heterocíclicos. La esencia de estas moléculas es su enlace amida (Fig. 8) ⁷⁵.

Las alcanoides han sido utilizadas por sus propiedades organolépticas, sin embargo, son consideradas compuestos bioactivos con un gran número de actividades biológicas tanto en plantas como en animales. Sus actividades como insecticidas⁷⁶, antimaláricos⁷⁷, antibacterianos⁷⁸, inmunoestimulantes⁷⁹, analgésicos, antiinflamatorios y antioxidantes⁸⁰ son las más destacadas. Están distribuidas a lo largo del reino vegetal siendo sus fuentes más comunes las familias Asteraceae, Solanaceae, Rutaceae y Piperaceae, y actualmente se han logrado aislar más de 300 alcanoides ⁷⁵.

Las alcanoides de la familia Asteraceae se caracterizan por presentar una cadena alifática de ocho a dieciocho carbonos con presencia de uno o dos grupos alquinos en su conformación⁸¹. Las de la familia Rutaceae sólo poseen alquenos en su parte ácida, su cadena alifática consiste principalmente en cadenas de doce a catorce carbonos derivados del ácido graso.

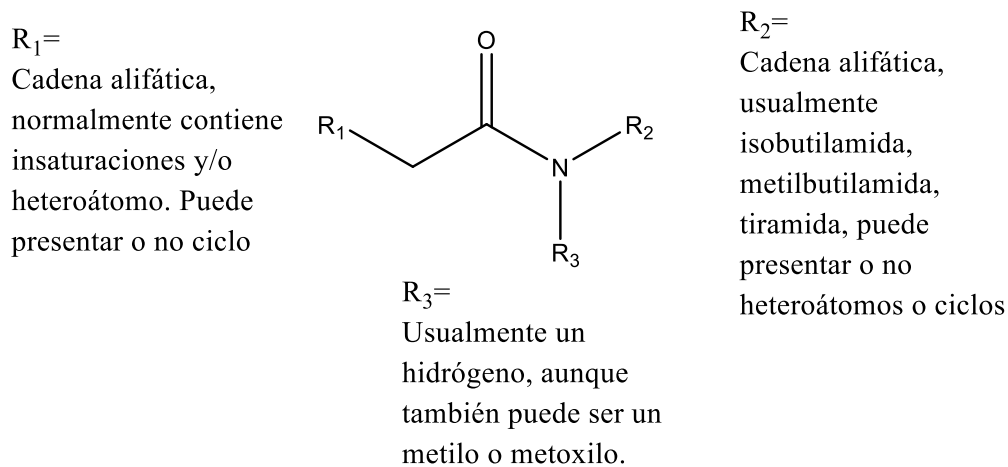


Figura 8. Propiedades estructurales de las alcanidas. Modificado de Boonen y cols.⁷⁵

Las alcanidas de Piperaceae tienen una cadena lineal desde 6 hasta 26 carbonos, con o sin terminal aromático, aunque generalmente está presente. En la mayoría de los casos la cadena del ácido graso tiene un número par de átomos de carbono cuando no hay sustituyente aromático, mientras que, si existe, el número de carbonos es impar⁸². Por su parte, los capsaicinoides son las alcanidas características de la familia Solanaceae y se obtienen de especies del género *Capsicum*. Estos compuestos son los responsables de la sensación de pungencia y calor que se produce al morder los frutos de este género, mejor conocidos como chiles⁸³. Los capsaicinoides se caracterizan por presentar un residuo N-vanillilamida unido a un ácido graso que puede ser lineal o ramificado. Las alcanidas de esta familia sólo difieren en la longitud de la cadena del ácido graso que puede ser desde siete hasta dieciocho carbonos.

Las plantas que contienen estos compuestos se usan como condimento en la comida en diferentes partes del mundo, sin embargo, en países como India, China, México, Malasia y Tailandia estas plantas también tienen un importante papel dentro de la medicina tradicional desde la antigüedad. Sin importar el género o la familia a la que pertenezcan, las plantas ricas en alcanidas producen una sensación de ardor no placentera, tienen un sabor ácido y pungente, producen salivación y hormigueo cuando están en contacto con diferentes partes de la boca. Estas sensaciones se acompañan de efectos de adormecimiento, parestesia y anestesia⁸⁴. Estas últimas sensaciones son la razón por la cual de manera tradicional se acostumbra a masticar o administrar de manera tópica alguna infusión o extracto de estas plantas para aliviar el dolor dental.

Como se mencionó anteriormente, cada familia de plantas presenta alcaloides diferentes, por lo tanto, el uso de plantas de diferentes familias para una misma función, como lo es el alivio de dolor, sugiere que los alcaloides presentes en las diferentes familias pueden tener una actividad analgésica similar, a pesar de su diferencia estructural, este hecho hace que resulte interesante estudiar la actividad analgésica producida por los miembros característicos de cada familia.

Recientemente se sugirió que el fragmento amida incluido en todas las alcaloides es el responsable de la actividad analgésica. Mientras que variaciones en los residuos alquilo en el ácido graso y/o en los grupos amino le confiere características distintivas a cada alcaloide. Tal es el caso de la presencia del residuo vanilloide en la capsaicina que le confiere sus propiedades de pungencia y características adversas que limitan su uso medicinal, por lo tanto, algunas otras alcaloides que carezcan de dicho fragmento vanilloide en su estructura podrían no presentar los aspectos farmacológicos adversos de su actividad analgésica⁸⁵. Con base en estos datos, una alcaloide con actividad analgésica, pero sin pungencia ni sensaciones dolorosas iniciales sería una valiosa herramienta terapéutica para el tratamiento del dolor neuropático.

3.3.1. Afinina

También conocida como *spilanthol*, la afinina (N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida) (Fig. 9) es considerada la alcaloide más característica de la familia y es el principal compuesto bioactivo en las raíces de la planta *Heliopsis longipes*⁸⁶ (Fig. 10). En México se conoce a esta planta como “Chilcuague” o “Chilcuan”, considerada como un recurso medicinal y culinario en estados como Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro. Su uso tradicional en México como condimento, saborizante, antimicrobiano, antiparasitario, analgésico bucal y anestésico se remonta a la época prehispánica⁸⁷. Existen diversos reportes que demuestran el efecto analgésico y antiinflamatorio de *Heliopsis longipes* en dolor dental, muscular e inflamatorio, tanto en ratones como en seres humanos^{88, 89}, sugiriendo la presencia de compuestos con actividad antinociceptiva.

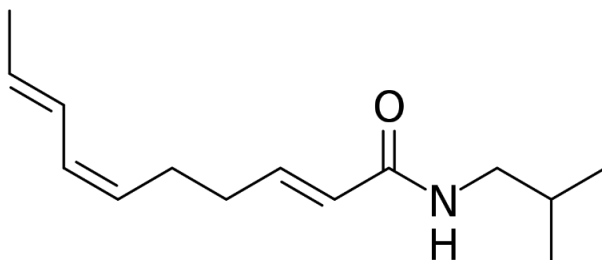


Figura 9. Estructura química de la afinina.

Algunos estudios han sugerido un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio tras la administración sistémica de afinina en modelos de dolor inflamatorio en ratones^{89, 90, 91}. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios sobre la posible participación de la afinina en la modulación del dolor neuropático. Además, aún se desconocen los mecanismos precisos y sitios de acción por los cuales la afinina produce sus efectos antinociceptivos. Un estudio sugiere interacciones con los sistemas opiodérgico, GABAérgico, serotoninérgico y del óxido nítrico para su efecto analgésico en el dolor inflamatorio, mientras que otro estudio sugiere la participación del receptor TRPV1 en el efecto antinociceptivo en la prueba orofacial de formalina, indicando que la sensibilización del receptor podría tener un papel importante en la alodinia mecánica y la hiperalgesia.



Figura 10. Raíces de *Heliopsis longipes*.

3.3.2. Piperina

La piperina, (2E, 4E)-5-(1, 3-benzodioxol-5-il)-1-piperidin-1-ilpenta-2,4-dien-1-ona (Fig. 11) es la alcaloide mayoritaria en el fruto de especies del género *Piper*, principalmente en los frutos de las especies *Piper nigrum* (Fig. 12) y *Piper longum*, consideradas las más importantes del género⁹². Las plantas de este género se han usado en China, India y América Latina como especias y sazónadores en la gastronomía. Dentro de la medicina tradicional se han utilizado como sedantes, analgésicos y para el tratamiento del reumatismo, artritis y mordidas de serpiente⁹³. Existen estudios de la piperina donde se demuestra la amplia variedad de efectos biológicos que exhibe, entre los que podemos mencionar el efecto antioxidante, antidiarreica, antimutagénica⁹⁴ y antinociceptiva⁹⁵.

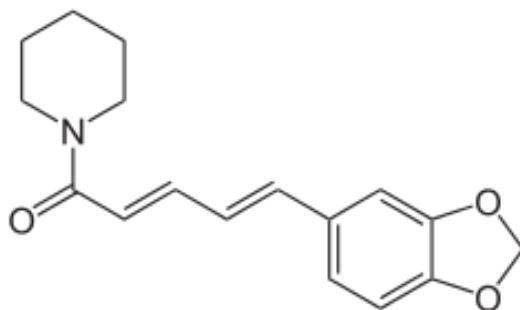


Figura 11. Estructura química de la piperina

Actualmente no existen estudios que evalúen el posible efecto analgésico de la piperina en el dolor neuropático ni su mecanismo de acción para producir dicho efecto. Se ha descrito que la piperina es capaz de activar al receptor TRPV1 *in vitro* por un mecanismo similar al de la capsaicina⁹⁶, mostrando menor potencia pero mayor eficacia para activar al receptor que la capsaicina, este hecho favorece una desensibilización más rápida del receptor TRPV1 en comparación con capsaicina⁹⁷, estos datos sugieren que la piperina es posiblemente una herramienta útil en el tratamiento del dolor de diferente etiología.



Figura 12. Hojas y frutos de *Piper nigrum*.

3.4. Receptor de Potencial Transitorio V1 (TRPV1)

El receptor de Potencial Transitorio Vanilloide 1 (TRPV1) es un canal catiónico que contienen seis dominios transmembranales con conformación homotetramérica y sus regiones amino y carboxilo terminales son intracelulares (Fig. 13, b)⁹⁸. El TRPV1 es un canal no selectivo expresado predominantemente en los ganglios sensoriales como el ganglio de raíz dorsal (GRD), ganglios trigeminales (TG), y ganglio Torácico Vagal (TV), en fibras sensoriales primarias nociceptivas C y A δ ⁹⁹ y en el SNC, además, fuera del sistema nervioso, TRPV1 está expresado en riñón, vías aéreas, piel, vejiga, hígado, riñón, bazo, entre otras⁹⁸.

El TRPV1 presenta una estructura tetramérica donde cada subunidad presenta 6 dominios transmembranales (S1-S6) y una vía de conducción iónica entre el quinto y sexto dominio (S5 y S6) (Fig. 13,a). La permeación de iones Na⁺ y Ca²⁺ está controlada por interacciones alostéricas entre las subunidades y por una puerta de activación que se ubica en la región interna del segmento seis (S6)¹⁰⁰.

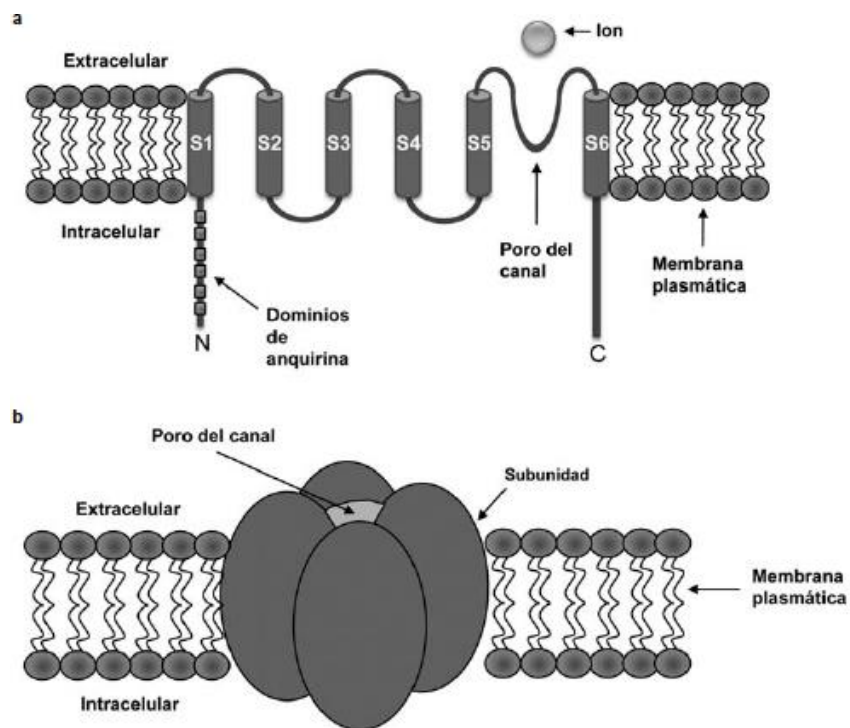


Figura 13. A) Esquema de las subunidades del TRPV1, cada una de ellas se compone por seis subunidades transmembranales, y sus segmentos amino (N) y carboxilo terminal (C) intracelulares. La Región amino terminal presenta seis dominios de unión a anquirina. **B)** Esquema del homotetrámero de TRPV1.

Puede ser activado por diferentes estímulos entre los que podemos mencionar al calor nocivo (>42°C), presión nociva, alta concentración de protones, capsaicina y sus análogos, alicina, alcanfor, óxido nítrico (NO) y por algunos eicosanoides y toxinas¹⁰¹. El TRPV1 muestra sitios de unión distintos para sus diversos agonistas, por ejemplo, la capsaicina, que es una molécula hidrofóbica pequeña, se une al sitio de unión vaniloide (VBS), localizado en el dominio intracelular del receptor, mientras que los protones se unen al dominio de los poros externos extracelulares, curiosamente, aunque estos sitios de unión están ubicados en regiones separadas físicamente a través de las subunidades del canal del receptor, ambos provocan la activación del canal¹⁰².

El TRPV1 juega un papel clave en la detección de una gran variedad de estímulos, y su presencia en las neuronas sensoriales aferentes, entre otras estructuras, lo hace un buen blanco terapéutico para tratar distintos tipos de dolor. Las neuronas que contienen el canal TRPV1 pueden volverse insensibles a más estímulos dolorosos a través de la desensibilización del receptor en respuesta a algunos agonistas, lo que puede dar como resultado una falta generalizada de respuesta de este receptor a estímulos nocivos adicionales¹⁰¹.

Existen dos tipos de desensibilización en estos receptores, el primero es una desensibilización aguda, caracterizada por una rápida pérdida de función en los receptores con la presencia del agonista, la segunda se conoce como taquifilaxia, y se evidencia por una disminución progresiva en la corriente debido a la administración repetida del agonista. La desensibilización aguda es debido a un cambio conformacional inducido por agonistas que resulta en el cierre del canal, se sabe que este proceso es dependiente de calcio intracelular y puede inhibirse utilizando secuestradores del mismo¹⁰³. Cuando la capsaicina se une al receptor, éste se abre y permite la entrada de calcio al interior de la célula, el calcio se une a la calmodulina activándola, ésta funciona como una subunidad accesoria del TRPV1, se asocia con el canal y promueve un cambio conformacional que induce el cierre del receptor. La taquifilaxia, en cambio, involucra el paso del canal entre estados en reposo o activos a estados intermedios no conductores⁹⁸.

3.5. Receptor de Ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A)

El receptor GABA_A es un receptor ionotrópico activado por ligando, siendo su ligando endógeno el ácido γ -aminobutírico (GABA), el cual es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Al activarse, el receptor permite la conductancia selectiva de iones Cl⁻ por su poro al interior de la célula, el Cl⁻ intracelular hiperpolariza la célula (-70 mV) lo que provoca un efecto inhibitorio en la neurotransmisión al disminuir la probabilidad de que un potencial de acción se desencadene¹⁰⁴.

Además del sitio de unión para su ligando endógeno, el receptor GABA_A presenta numerosos sitios alostéricos que modulan indirectamente la actividad del mismo. Estos sitios son blancos moleculares de diversos fármacos entre los cuales podemos mencionar benzodiazepinas, esteroides neuroactivos, barbitúricos, alcohol, anestésicos inhalados, picrotoxina, entre otros¹⁰⁵.

Se ha descrito que agonistas del GABA_A presentan propiedades antinociceptivas en diversos modelos animales de dolor, sin embargo, incluso con un mejor entendimiento de la relación entre la transmisión GABAérgica y el dolor, ha resultado difícil aplicar estos hallazgos en el diseño de nuevos fármacos analgésicos, siendo los efectos secundarios asociados con dichos agentes la principal limitación terapéutica. No obstante, los datos reportados afirman que, bajo ciertas circunstancias, la estimulación de los sitios del receptor GABA neuroanatómicamente discretos podría ser beneficiosa en el tratamiento del dolor. La investigación en esta área está justificada dadas las limitadas opciones terapéuticas y las dificultades clínicas asociadas con los analgésicos convencionales¹⁰⁶.

3.6. Modelos para la evaluación del dolor neuropático

Dado que el dolor neuropático tiene tratamientos limitados, existe una necesidad de explorar nuevos tratamientos para esta etiología, sin embargo, su evaluación en seres humanos es muy compleja ya que la mayoría de los estímulos necesarios para inducir dolor neuropático producen daños irreversibles al organismo, además de la dificultad de reclutar el número de seres humanos necesario para tales pruebas. Por lo tanto, hay una necesidad de generar y validar modelos animales fácilmente reproducibles de dolor neuropático para ampliar el conocimiento de los mecanismos involucrados en dolor neuropático y para evaluar el potencial analgésico de nuevas farmacoterapias; estos modelos deben producir déficits sensoriales reproducibles como alodinia, hiperalgesia y/o dolor espontáneo durante un periodo sostenido¹⁰⁷.

Actualmente existen varios modelos animales validados para investigar las diversas etiologías de este síndrome, por lo que las diversas manifestaciones de la neuropatía incluyen lesión del nervio periférico, modelos de neuropatía periférica y central inducidos por cirugía, agentes quimioterapéuticos, anticancerígenos, neuralgia postherpética, diabetes, así como modelos de neuralgia trigeminal y dolor orofacial¹⁰⁸. Los principales modelos utilizados se resumen en la Figura 14. El desarrollo de modelos de dolor neuropático ha ayudado al descubrimiento y caracterización de mecanismos de dolor y potenciales tratamientos. El estudio adicional de estos modelos y el desarrollo de nuevos modelos preclínicos contribuirán claramente a una mejor comprensión de la señalización nociceptiva y su tratamiento¹⁰⁷.

| Nombre del modelo | Causa de la neuropatía | Especie | Referencia |
|---|--|----------------------------|------------------------------------|
| Axotomía | Transección completa de nervio ciático | Rata | (Wall, P.D. 1979) ¹⁰⁹ |
| Lesión por constricción crónica | Ligaduras sueltas alrededor del nervio ciático | Rata Ratón | (Bennet G. J. 1988) ¹¹⁰ |
| Ligadura parcial del nervio ciático | Ligadura apretada de un tercio del nervio ciático | Rata Ratón | (Seltzer Z. 1990) ¹¹¹ |
| Ligadura de nervios espinales | Ligadura de nervios espinales L5 y L6 | Rata | (Kim y Chung 1992) ¹¹² |
| | Ligadura de nervio espinal L7 | <i>Macaca fascicularis</i> | (Carlton S.M. 1994) ¹¹³ |
| Transección nervio tibial y sural | Transección de ambos nervios | Rata | (Lee B.H. 2000) ¹¹⁴ |
| Neuritis inflamatoria ciática | Inyección de zymosan, TNF | Rata Ratón | (Chacur M. 2001) ¹¹⁵ |
| Agentes anticancerígenos (cisplatino, vincristina) | Lesión directa de los fármacos a los nervios periféricos | Rata Ratón | (Authier N. 2003) ¹¹⁶ |
| Neuropatía inducida por diabetes | Hiper glucemia induce cambios en los nervios | Rata Ratón | (Courteix 1993) ¹¹⁷ |
| Neuralgia postherpética | Inyección de células infectadas por virus <i>Herpes simplex</i> en la pata | Rata Ratón | (Krogel G.B. 1976) ¹¹⁸ |

Figura 14. Tabla donde se listan los diferentes modelos animales en el dolor neuropático. Modificado de Jaggi et. al.¹⁰⁸

4. JUSTIFICACIÓN

El dolor neuropático es una consecuencia de un desequilibrio entre factores excitadores e inhibidores de la nocicepción, que se produce como un mecanismo fallido de adaptación frente a una lesión nerviosa que genera cambios plásticos y perpetúa la experiencia dolorosa sin ningún papel protector. Actualmente, se calcula que la prevalencia de dolor con características neuropáticas afecta entre el 6.9 al 10% de la población mundial y al 2% de la población de América Latina¹¹⁹. Este tipo de dolor fue considerado durante mucho tiempo como intratable ya que los fármacos analgésicos habituales (AINEs y opioides) no son del todo eficaces. Debido a la existente carencia del entendimiento etiológico y de un tratamiento efectivo y específico para del dolor neuropático, la actualidad exige el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para su tratamiento. En este contexto, el uso de productos de origen natural representa una buena opción en la búsqueda de tratamientos novedosos para este tipo de padecimiento, y las evidencias del uso de plantas ricas en alcanidas como analgésicos en la medicina tradicional sugieren un gran potencial terapéutico de estos compuestos. Sin embargo, entre la gran cantidad de alcanidas existentes, actualmente la capsaicina es la única alcanida utilizada con fines terapéuticos para el tratamiento del dolor, desafortunadamente, el efecto analgésico de la capsaicina es precedido por una serie de efectos indeseables no placenteros que limitan su uso terapéutico, por lo que resulta necesario realizar un estudio sistemático para el eventual uso de otras alcanidas relacionadas al mismo fin. Por lo antes mencionado, y a pesar de la poca evidencia documentada de las propiedades analgésicas en algún otro tipo de dolor, el potencial terapéutico de las alcanidas piperina y afinina parece estar siendo desaprovechado, pues estudios previos sugieren que pueden intervenir en la modulación de algunos mecanismos comunes en el dolor de diversas etiologías, lo que las hace buenas candidatas para el tratamiento de algunos tipos de dolor crónico como el dolor neuropático⁸⁵.

Por lo tanto, el presente proyecto pretende establecer por primera vez evidencia científica documentada del efecto que tienen las alcanidas afinina y piperina en las conductas asociadas con el dolor neuropático, además de determinar su eficacia para el alivio del mismo y elucidar los mecanismos de acción a través de los cuales ejercen su efecto.

La información obtenida será de relevancia para establecer las bases científicas del uso de las alcanidas en el tratamiento del dolor neuropático, así como proveer información a la población y comunidad científica del verdadero potencial terapéutico que tienen los compuestos de origen natural en el tratamiento de padecimientos crónicos como la neuropatía.

5. HIPÓTESIS

Las alcanidas piperina y afinina presentarán efecto antinociceptivo por acción antialodínico en el modelo de dolor neuropático por la ligadura de las fibras nerviosas L-5 y L-6 a través de receptores TRP y la modulación de sistemas de neurotransmisión GABAérgico.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Determinar el efecto farmacológico antinociceptivo por la administración sistémica de las alcanidas piperina y afinina en el modelo de dolor neuropático por la ligadura de la fibras nerviosas L-5 y L-6 en ratas e investigar la participación de diferentes tipos de receptores TRP y GABA_A.

6.2. Objetivos Particulares

- Aislar la piperina de *Piper nigrum* y la afinina de *Heliopsis longipes* y caracterizarlas utilizando métodos espectroscópicos convencionales.
- Determinar el efecto antinociceptivo y establecer las dosis efectivas antialodínicas de la administración sistémica de las alcanidas piperina y afinina en el modelo de dolor neuropático por la ligadura de nervios espinales L5 y L6.
- Determinar farmacológicamente a nivel sistémico si las alcanidas piperina y afinina producen su efecto antialodínico a través de los receptores TRP y/o a través del sistema de neurotransmisión a GABA.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Animales

Todos los experimentos se realizaron en ratas macho Wistar con un peso entre 150 y 170 g. Los animales se obtuvieron del Centro de Producción Envigo México, S.A. de C.V. y del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento antes de los experimentos. Todos los experimentos cumplen con los lineamientos de “Investigación Animal: Reporte de Experimentos *in vivo*” (ARRIVE, por sus siglas en inglés). El manejo y cuidado de los animales fueron conforme a los requisitos publicados en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) así como a las directrices éticas para las investigaciones de dolor experimental en animales¹²⁰. Además, todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética local, CICUAL Facultad de Química, UNAM, OFICIO/FQ/CICUAL/199/17 (Anexo I).

7.2. Fármacos y reactivos

La piperina fue aislada de semillas comerciales de *Piper nigrum* mientras que la afinina se obtuvo de las raíces de *Heliopsis longipes* gentilmente donadas por el Laboratorio Mixim S.A. de C.V (Naucalpan, MC, MEX). La capsazepina, bicuculina, HC-030031, Tween 80 y Tween 20 fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El SKF-96365 fue comprado de TOCRIS (Elisville, MO, EUA). El pentobarbital sódico fue adquirido de los laboratorios PiSA (PISABENTAL®) (Atitalaquia, HG, MEX).

7.3. Extracción de las alcaloides.

7.3.1. Extracción y purificación de piperina

La piperina se obtuvo a partir de 1.8 kg de semillas comerciales de pimienta negra (*Piper nigrum*) adquiridos en la Central de Abastos de la Ciudad de México. Se realizó una extracción continua en Soxhlet durante 6 horas con 2 litros de diclorometano, posterior a la evaporación del disolvente se obtuvo un extracto de color negro y consistencia aceitosa. Al extracto obtenido se le adicionaron 15 gotas de éter isopropílico y se mantuvo en refrigeración a 4°C por 24 horas para promover la precipitación de cristales de piperina impura, los cuales se filtraron, mientras que las aguas madre se separaron en tres porciones a las cuales se les adicionó nuevamente éter isopropílico para volver a inducir la precipitación de cristales, las fracciones se mantuvieron en refrigeración a -4°C durante 48 horas, posteriormente se filtraron los cristales. Los cristales de piperina filtrados se lavaron con éter isopropílico y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvieron a disolver en

diclorometano para ser adsorbidos en 7.1 g gel de sílice y se procedió a separar la piperina mediante la técnica de cromatografía en columna abierta utilizando 140 g de gel de sílice como fase estacionaria y hexano y acetato de etilo a diferentes proporciones (Hex:AcOEt a 1:0, 9:1, 8:2, 7:3 y 1:1) como fase móvil, iniciando con hexano. La separación se monitoreó con cromatografía en capa fina. Las fracciones con alta concentración en piperina se purificaron mediante recristalización con metanol. Finalmente, los cristales se secaron a temperatura ambiente y se determinó su identidad mediante sus propiedades fisicoquímicas (aparición, punto de fusión, etc.) y mediante espectroscopia (RMN ^{13}C y ^1H). Adicionalmente se determinó su estructura cristalina por difracción de rayos X.

7.3.2. Extracción y purificación de afinina

La afinina se obtuvo a partir de 820 g de raíz de Chilcuague (*Heliopsis longipes*) adquiridos del Laboratorio Mixim S.A. de C.V. La raíz se trituró para posteriormente ser colocada en un Soxhlet para realizar una extracción continua durante 6 horas con 1 litro de una mezcla de disolventes de diclorometano y acetona en una proporción 9:1 respectivamente, este procedimiento se realizó por triplicado hasta completar la extracción de los 820 g de raíz previamente triturada. Después de concentrarse a presión reducida se obtuvieron 81 g de un aceite viscoso de color marrón oscuro de olor característico. Posteriormente se adsorbieron 15 g del extracto en 20 g de gel de sílice para posteriormente ser fraccionado mediante cromatografía en columna abierta de fase normal con 200 g de gel de sílice como fase estacionaria y un gradiente de disolventes de hexano y acetato de etilo (1:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4) como fase móvil. Se colectaron en total 60 fracciones de 200 ml cada una. La separación de afinina fue monitoreada por cromatografía en capa fina utilizando anisaldehído como revelador. Se obtuvieron 2 g de afinina los cuales se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas (RMN ^{13}C y ^1H).

7.4. **Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C)**

Las muestras de piperina y afinina, de 50 mg y 10 mg identificadas previamente mediante cromatografía en capa fina utilizando una referencia se diluyeron en cloroformo deuterado y se determinaron sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100MHz) en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI). Se utilizó un Espectrómetro de RMN de 9.4 T Marca Varian Modelo VNMRS. Sonda Broad Band Switchable de dos canales de radiofrecuencia ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$) (31P/15N). Sonda de Detección Indirecta de dos canales de radiofrecuencia (^1H) (31P/15N). Sonda Broad Band para RMN de sólidos (4mm) de dos canales de radiofrecuencia ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$) (31P/15N).

7.5. Difracción de rayos X en monocristal de piperina

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

7.6. Cirugía de ligadura de nervios L5/L6

Las ratas se prepararon respecto al modelo descrito previamente por Kim y Chung¹². El día de la cirugía, las ratas fueron anestesiadas con una dosis de 50 mg/kg de pentobarbital sódico *i.p.* Después de la preparación quirúrgica, los animales fueron trasladados a una zona adaptada para la operación y fue expuesta su columna vertebral en la zona lumbar, se seccionó cuidadosamente la apófisis lateral izquierda para dejar expuestos los nervios L4, L5 y L6 e identificarlos visualmente. Posteriormente los nervios L5 y L6 izquierdos fueron ligados fuertemente con sutura de seda 6-0 en la parte distal del ganglio de la raíz dorsal (Fig. 15). Finalmente se limpió la herida con una solución aséptica de cloruro de benzalconio y se suturó con Catgut simple y de seda 6-0, los animales se mantuvieron en recuperación durante 15 días. Para el grupo de ratas falsamente ligadas (Sham) el procedimiento quirúrgico fue idéntico al descrito anteriormente con la única diferencia de que los nervios espinales no fueron ligados. Los animales que mostraron deficiencia motora fueron excluidos del estudio.

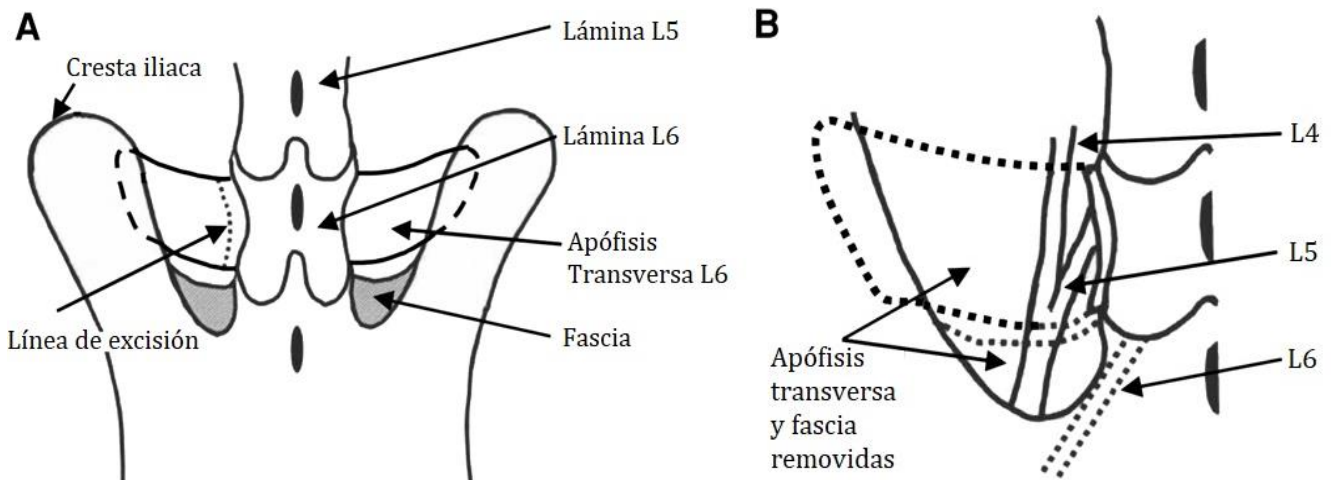


Figura 15. Diagrama esquemático mostrando la vista dorsal de las estructuras óseas en los niveles lumbar y sacro inferior (A). Ampliación del lado izquierdo después de la eliminación de la apófisis lateral L6 y fascia (B)¹²¹.

7.7. Determinación de la alodinia táctil.

La alodinia táctil se determinó conforme al método antes descrito por Chaplan y colaboradores¹²². En el 16° día posterior a la cirugía de ligación de nervios L5 y L6 o falsa ligadura (Sham), los animales fueron trasladados a cajas individuales de plástico transparentes con fondo de malla de alambre donde se dejaron aclimatar durante 30 minutos; los filamentos de von Frey se utilizaron para determinar el 50% del umbral de retiro utilizando el método de “up-and-down” (Fig. 16). Una serie de filamentos, iniciando con el correspondiente a una fuerza de pandeo de 2g, fueron aplicados consecutivamente a la superficie plantar de la pata trasera izquierda de la rata¹²³ (Fig. 16) con la fuerza suficiente para que el filamento se pandeara durante 10 segundos. La retirada o el levantamiento de la pata antes del tiempo establecido indicó una respuesta positiva, lo que inducía al estímulo con el siguiente filamento de menor fuerza, mientras que la ausencia de una retirada de pata después de 10 segundos indicó una respuesta negativa, induciendo el uso del filamento consecutivo de mayor fuerza. Este paradigma continuó hasta que se realizaron cuatro mediciones más después del cambio inicial de la respuesta conductual o hasta que ocurrieron 5 respuestas consecutivas negativas (asignadas a un valor de 15 g) o 4 respuestas positivas consecutivas (asignadas a un valor de 0.25 g). Los valores obtenidos fueron usados para calcular el 50% de umbral de retiro utilizando la fórmula:

$$50\% \text{ Umbral de Retiro} = \frac{10^{(Xf + \kappa\delta)}}{10000}$$

Donde **Xf** = el valor (en unidades logarítmicas) del último filamento de von Frey utilizado, **κ** = el valor de la tabla para el patrón de respuestas positivas y negativas publicado previamente por Dixon y colaboradores (Anexo II)¹²⁴ y **δ** = la diferencia de medias (en unidades logarítmicas) entre cada estímulo. El 50% de umbral de retiro se evaluó antes de la administración del tratamiento. Posteriormente se evaluó a los 30 minutos y después de esta medición, cada hora hasta completar 8 horas. Se consideró que la alodinia estaba presente cuando el 50% de umbral de retiro era menor a 4g¹²².

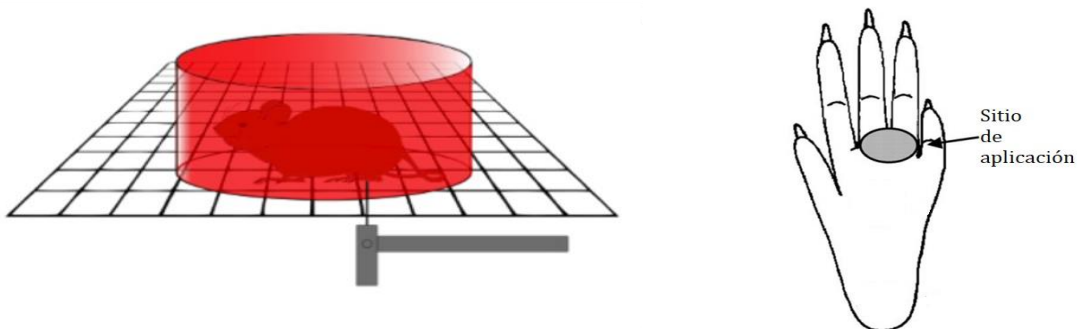


Figura 16. Esquema de las condiciones para la determinación de la alodinia táctil utilizando las fibras de von Frey.

7.8. Diseño del estudio y preparación de tratamientos

Se utilizaron grupos independientes de ratas sham y neuropáticas para cada condición experimental. El efecto antialodínico de los fármacos fue estudiado 14 días después de la ligación de nervios. Para asegurar que todas las ratas ligadas presentaran alodinia se midió el 50% de umbral de retiro en respuesta al estímulo mecánico antes de la administración de cualquier tratamiento. Para evaluar el efecto antialodínico de las alcanidas se realizaron administraciones intraperitoneales (ip) del vehículo (el cual se especifica más adelante), pregabalina 10mg/kg (testigo) o dosis crecientes (1-100 mg/kg) de las alcanidas piperina y afinina. Para confirmar farmacológicamente la participación de distintos receptores espinales de potencial transitorio (TRPs) y el receptor GABA_A en el efecto antialodínico inducido por la piperina se administraron por vía intratecal (it) previo a la administración de 56 mg/kg de piperina IP, dosis crecientes de los siguientes antagonistas: capsazepina (CZP) (5 – 30 nmol/rata, 20µL) para TRPV1¹²⁵, HC-030031 (3-100 µg/rata, 20µL) para TRPA1¹²⁶, SKF-96365 (3-100 µg/rata, 20µL) para TRPC¹²⁷ y bicuculina (3-30 µg/rata, 20µL) para GABA_A¹²⁸, las dosis seleccionadas fueron con base en estudios previos y en experimentos piloto de este trabajo. Todos los tratamientos fueron suspendidos en una mezcla de SSI, Tween 80 y Tween 20 en una proporción (70:15:15) a una temperatura de 40°C. Se utilizó un ultrasonificador para asegurar la correcta dispersión del fármaco en el vehículo.

7.9. Análisis de datos y análisis estadístico

Todos los resultados se muestran como la media ± E.E.M de al menos 6 animales por grupo. Los cursos temporales se construyeron graficando el 50% del umbral de retiro en función del tiempo. Un aumento del 50% del umbral de retiro fue considerado como efecto antialodínico. El área bajo la curva (ABC) del curso temporal del 50% del umbral de retiro fue calculada por el método de los trapecios utilizando el software GraphPad Prism. El % de máximo efecto posible (%MEP) se calculó a partir de las ABC utilizando la siguiente ecuación:

$$\%MEP = \frac{ABC_{Fármaco} - ABC_{Vehículo}}{ABC_{Sham} - ABC_{Vehículo}} \times 100$$

La DE₅₀ de la piperina se calculó de acuerdo al método descrito previamente por Tallarida *et al*¹²⁹ siendo el ajuste no lineal sigmoide (Ecuación de Hill) el que presentó una mejor correlación de los datos. Para comparar las diferencias entre tratamientos en los experimentos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p<0.05.

8. RESULTADOS

8.1. Extracción, purificación y caracterización de las alcaloides

8.1.1. Extracción, purificación y caracterización de piperina

De los 1800 g de semillas comerciales se obtuvieron 56 g de extracto y 12.2 g de piperina pura en forma cristalina. El rendimiento de la extracción de piperina respecto a la cantidad inicial de la planta fue de **0.67%**. Se determinaron las propiedades físicas de la piperina como determinación preliminar de su identidad. La piperina se obtuvo en forma de cristales (Fig. 17) los cuales presentaban un color amarillo claro, forma de prisma tetragonal y un punto de fusión de 129-131°C.



Figura 17. Cristales de piperina. Imagen tomada a través de microscopio estereoscópico

Posteriormente se identificó y caracterizó utilizando técnicas espectroscópicas (RMN) y cristalografía de rayos X. La estructura química de la piperina (Fig. 18) se caracterizó a partir de la asignación de las señales de los protones en el espectro RNM ^1H (400 MHz, CDCl_3). Los espectros de RNM ^1H y de RNM ^{13}C se muestran en el Anexo III y Anexo IV respectivamente.

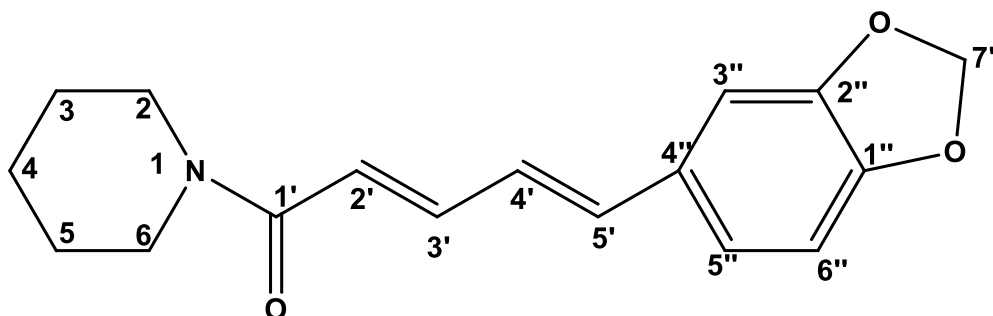


Figura 18. Estructura química de la piperina, (2E, 4E)-5-(1, 3-benzodioxol-5-il)-1-piperidin-1-ilpenta-2,4-dien-1-ona.

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

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

La estructura molecular (Fig. 19) y de la celda unitaria de cristal (Fig. 20) de piperina fue determinada por difracción de rayos X utilizando el software ORTEP-III.

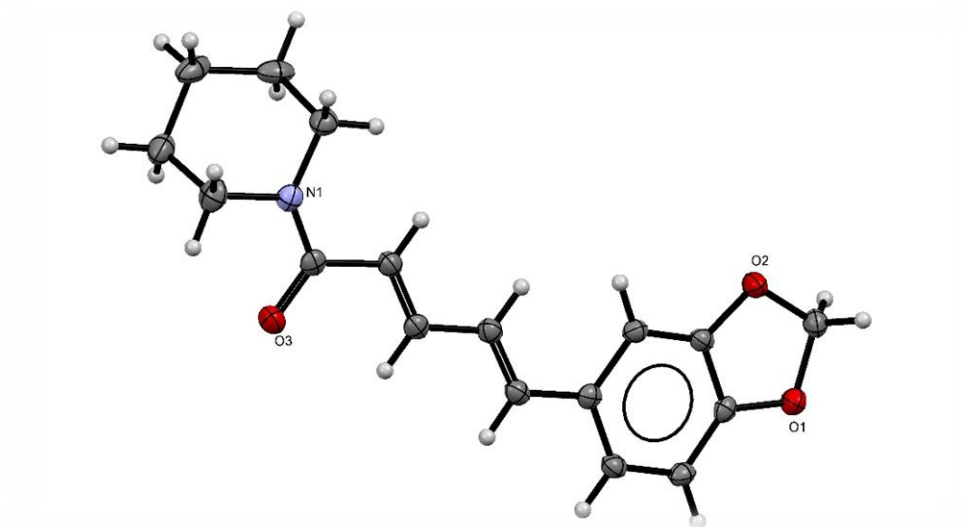


Figura 19. Diagrama ORTEP de piperina. Se representan en color azul los átomos de N, en color rojo los átomos de O, en gris los átomos de C y en blanco los átomos de H.

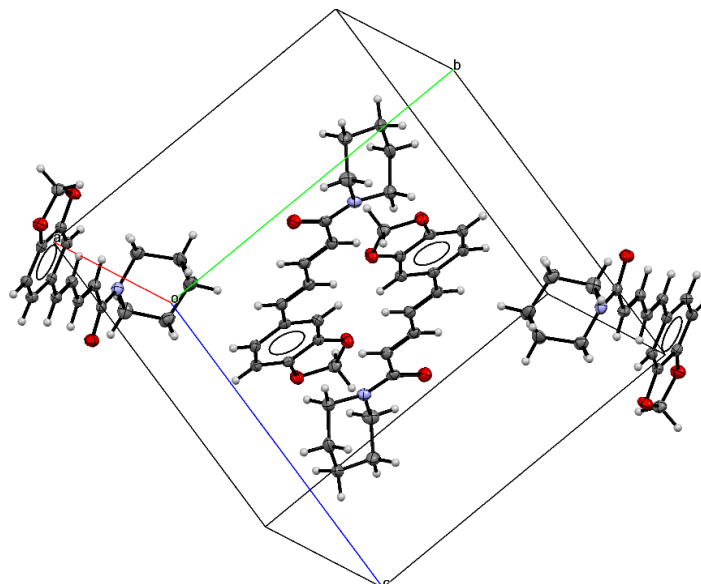


Figura 20. Perspectiva del empaqueo molecular de la celda unitaria del cristal de piperina. Se representan en color azul los átomos de N, en color rojo los átomos de O, en gris los átomos de C y en blanco los átomos de H.

8.1.2. Extracción, purificación y caracterización de afinina

De los 820g de raíz de *Heliopsis longipes* se obtuvieron 6.78g de un extracto rico en afinina, en forma de un aceite de consistencia viscosa, de color marrón oscuro y olor *sui generis*. El rendimiento de la extracción respecto a la cantidad total de raíz fue de **0.82%**.

La estructura química de la afinina (Fig. 21) se caracterizó a partir de la asignación de las señales de los protones en el espectro RNM ^1H (400 MHz, CDCl_3) y de sus carbonos en el espectro RNM ^{13}C (100 Mhz, CDCl_3) (Anexo V y VI respectivamente), siendo comparados con lo reportado previamente por Nakatani y Nagashima¹³⁰, sin embargo, el espectro muestra la presencia de otro compuesto.

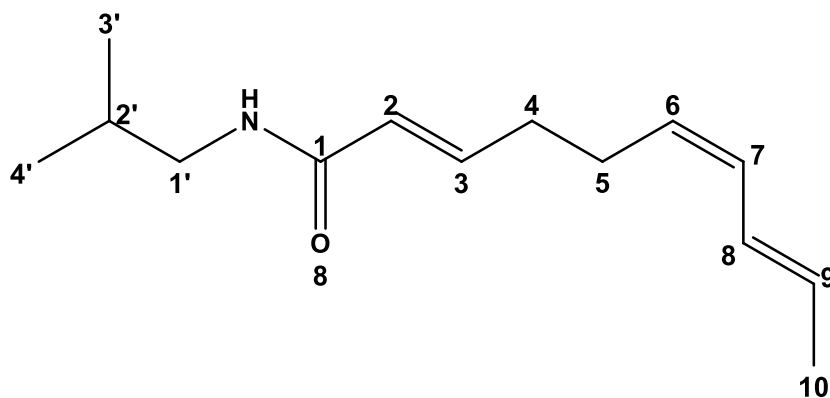


Figura 21. Estructura química de la afinina. (2E,6Z,8E)-N-Isobutil-2,6,8-decatrienamida.

La asignación de los protones en el espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) es el siguiente: δ = 6.82 (**H-3**) (dt, J = 15.3, 6.5 Hz, 1H), 6.30 (**H-2**) (m, 1H), 5.97 (**H-8**) (t, J = 10.9 Hz, 1H), 5.79 (**H-7**) (dd, J = 15.3, 1.3 Hz, 1H), 5.68 (**H-9**) (m, 1H), 5.26 (**H-6**) (m, 1H), 3.13 (**H-1'**) (dd, J = 11.6, 5.4 Hz, 3H), 2.36 – 2.22 (**H-4**), (m, 5H), 2.36 – 2.22 (**H-5**), (m, 5H), 1.82 (**H-2'**) (m), 1.78 (**H-10**) (dd, J = 13.0, 6.3 Hz, 1H), 0.93 (**H-3'**) (s, 4H) 0.91 (**H-4'**) (s, 4H), 1.25 (H₂O).

La asignación de los carbonos en el espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) es la siguiente: : δ = 165.96 (**C-1**), 143.55 (**C-3**), 129.95 (**C-9**), 129.45 (**C-7**), 127.66 (**C-6**), 126.7 (**C-8**), 124.14 (**C-2**), 46.86 (**C-1'**), 32.10 (**C-4**), 28.6 (**C-2'**), 26.39 (**C-5**), 20.13 (**C-3'**), 20.13 (**C-4'**), 18.3 (**C-10**).

8.2. Evaluación biológica de las alcanidas

8.2.1. Evaluación de los controles.

La ligadura de nervios L5 y L6 disminuyó el 50% de umbral de retiro en ratas naive de 14.13 ± 0.52 g a 0.82 ± 0.22 g en ratas neuropáticas. Como se esperaba, la cirugía sin ligadura no modifica el umbral de retiro de la pata después de 14 días de reposo, puesto que las ratas Sham presentaron un umbral de retiro de 13.46 ± 0.97 g, además, la administración del vehículo no modificó el umbral de retiro de las ratas neuropáticas (0.89 ± 0.15 g), lo que sugiere que cualquier cambio en la respuesta del umbral de retirada de la pata se debe al tratamiento farmacológico administrado (Fig. 22). Al realizar el análisis del %MEP se puede observar que no existe diferencia significativa entre Naive y Sham, ni entre Vehículo y Neuropáticas.

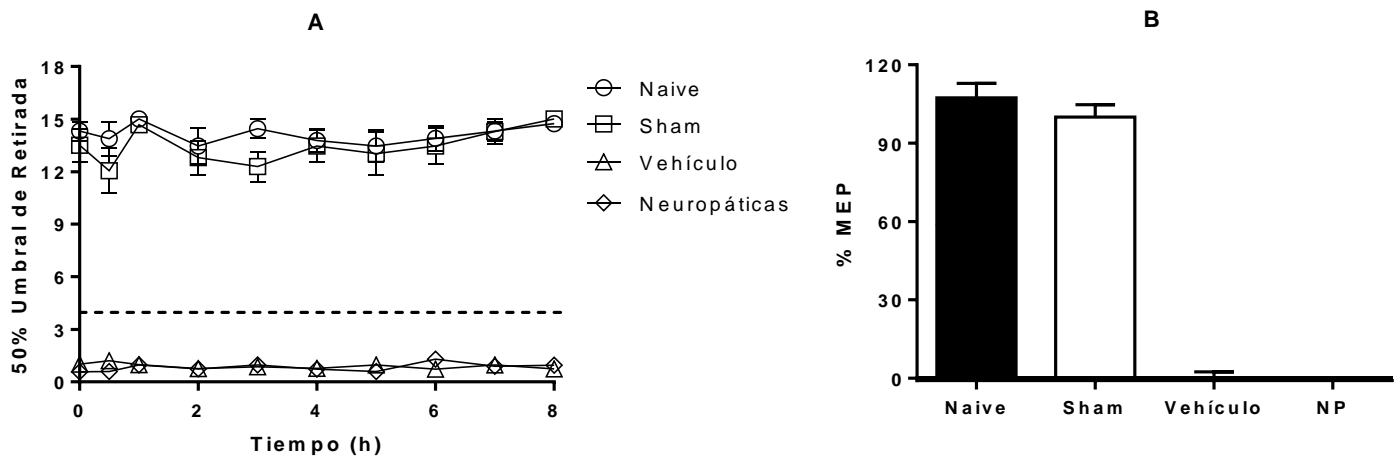


Figura 22. Alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios L5 y L6. **(A)** Comparación de cursos temporales del 50% de umbral de retirada de la pata en ratas con nervios ligados, neuropáticas (rombos) comparadas con las falsamente ligadas, sham (cuadrado). El grupo Naive (círculo) es una referencia en el umbral de retirada en ratas sin ningún tratamiento ni cirugía mientras que el grupo vehículo (triángulo) muestra que la alodinia no es afectada por el vehículo en las ratas neuropáticas. **(B)** Porcentaje de máximo efecto posible (%MEP) obtenido de los cursos temporales de los diferentes grupos. En ambas gráficas se representa la media \pm EEM de al menos 6 animales por grupo. NP: Ratas Neuropáticas.

8.2.2. Efecto antialodínico de la piperina

Con el fin de evaluar el efecto antialodínico de la piperina, dosis crecientes (3.1 – 100mg/kg) fueron administradas vía intraperitoneal 14 días después de la cirugía. Todas las dosis mostraron un efecto antialodínico a partir de los 30 minutos con excepción de la dosis 3.1, la cual lo presenta hasta la primera hora. Mientras que en las dosis bajas (3.1 y 10 mg/kg) se observa un aumento gradual del umbral alcanzando un máximo a las 5 horas para posteriormente disminuir, en las dosis altas (56 y 100 mg/kg) se alcanza un máximo efecto aproximadamente en la primera hora, el cual se mantiene alrededor de 4 horas y posteriormente disminuye sin regresar a la condición neuropática, (Fig. 23). La administración de piperina aumentó el umbral de retirada con un comportamiento dosis dependiente, alcanzando un máximo efecto con la dosis de 56 mg/kg ($92.82\pm 3.48\%$), efecto que se mantuvo en la dosis de 100 mg/kg ($89.41\pm 2.52\%$). Este efecto no es estadísticamente diferente respecto al grupo Sham y no lo es tampoco respecto al grupo testigo (PGB 10mg/kg) (Fig. 24).

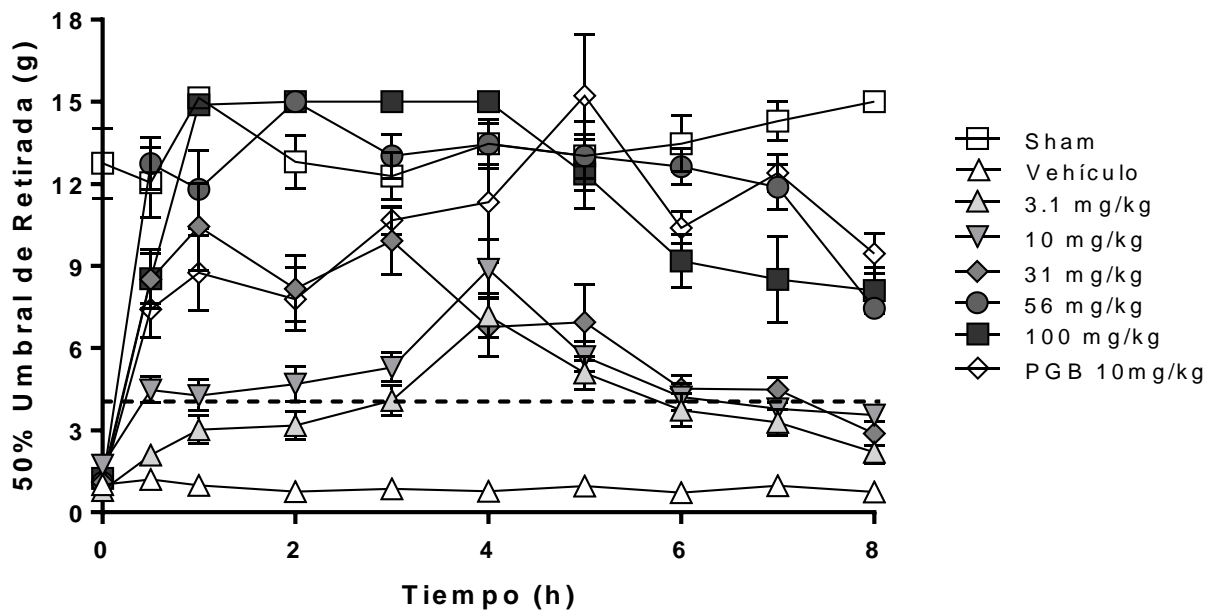


Figura 23. Se muestra el curso temporal del 50% de umbral de retirada de pata (g) en ratas previamente sometidas a ligadura de nervios espinales de las distintas dosis de piperina previamente administradas. La línea punteada señala la condición alodínica. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de seis animales por grupo. PGB: Pregabalina. * Estadísticamente significativo respecto al vehículo (V) determinado por un ANOVA de 2 vías seguido de una prueba *post hoc* de Sidak ($p < 0.05$), los asteriscos fueron omitidos en aras de la claridad.

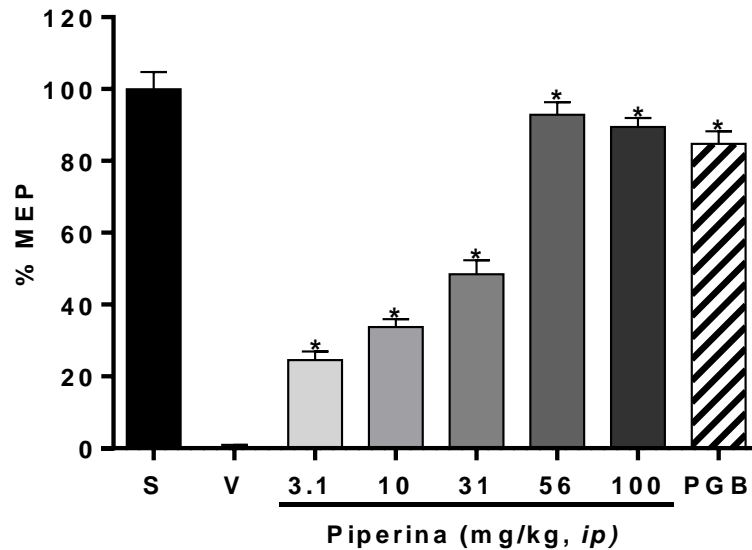


Figura 24. Efecto antialodínico de la piperina en ratas previamente sometidas a ligadura de nervios espinales. Se muestra el %MEP de cada tratamiento. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de seis animales por grupo. **S:** Grupo Sham. **V:** Grupo Vehículo. **PGB:** Pregabalina 10mg/kg. * Estadísticamente significativo respecto al vehículo (V) determinado por un ANOVA de 1 vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$).

8.2.2.1. Determinación de la DE_{50} de la piperina

Utilizando la curva dosis-respuesta de la piperina se determinó la DE_{50} su efecto antialodínico utilizando el modelo del efecto máximo sigmoide, siendo éste el modelo que presentó un mejor ajuste de los datos. La DE_{50} de la piperina ip fue de 17.478 ± 4.27 mg/kg (Fig. 25). La R^2 fue de 0.800 y la pendiente fue de 0.995 (Fig. 25).

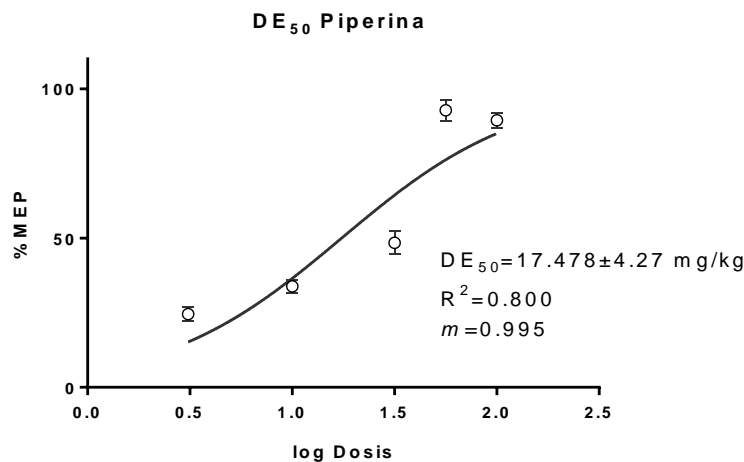


Figura 25. log Dosis vs. %MEP de la piperina administrada vía ip. Se presenta la media \pm EEM de seis animales por grupo.

8.2.3. Efecto antialodínico de la afinina

Dosis crecientes de afinina (0.3 – 17.7 mg/kg) fueron administradas vía intraperitoneal después de los 14 días de reposo post quirúrgico. En el curso temporal se puede observar que las dosis de 0.3 y 3 mg/kg no presentaron efecto antialodínico, el umbral de retirada de la pata no se elevó por encima de la condición de alodinia (4g) durante las 8 horas de experimento. La dosis de 10 mg/kg presentó un efecto a partir de la segunda hora, alcanzando un máximo a las 4 para posteriormente disminuir gradualmente y finalmente, la dosis de 17.7 mg/kg presentó un efecto desde los 30 minutos alcanzando su máximo a la primera hora, posteriormente dicho efecto fue en decremento hasta el final del experimento. Finalmente, todos los grupos tratados con afinina regresaron a su condición de alodinia después de 8 horas (Fig. 26).

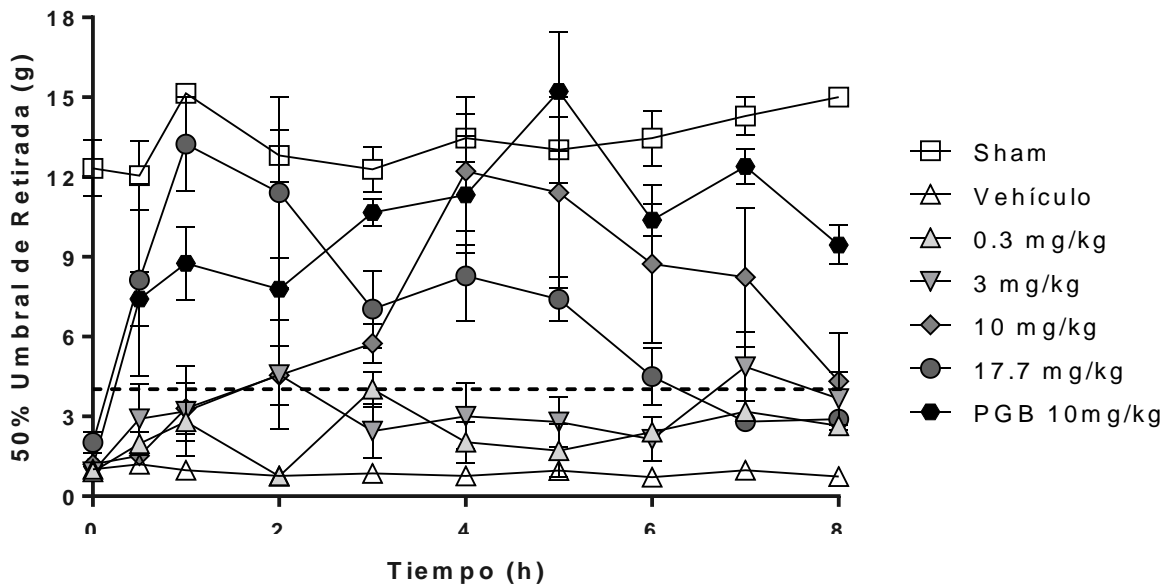


Figura 26. Se muestra el curso temporal del 50% de umbral de retirada de pata (g) en ratas previamente sometidas a ligadura de nervios espinales de las distintas dosis de afinina. La línea punteada señala la condición alodínica. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de seis animales por grupo. **PGB:** Pregabalina.

* Estadísticamente significativo respecto al vehículo determinado por un ANOVA de 2 vías seguido de una prueba *post hoc* de Sidak ($p < 0.05$), los asteriscos fueron omitidos en aras de la claridad.

Al obtener el %MEP se observa que en la dosis de 0.3 y 3 mg/kg no existe diferencia significativa respecto al grupo administrado únicamente con el vehículo. Las dosis de 10 y de 17 mg/kg, con valores de $50.45 \pm 15.31\%$ y $51.29 \pm 8.079\%$ respectivamente, presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo (Fig. 27).

Cabe mencionar que la dosis de 31 mg/kg, la afinina resultó letal para el 100% de los animales administrados, presentando conducta asociada al dolor agudo¹³¹, para posteriormente presentar convulsiones tónico clónicas y finalmente la muerte. Mientras que la dosis de 17.7 mg/kg resultó letal para algunos animales en el estudio, presentando la misma conducta asociada a dolor agudo.

Por los motivos anteriores se decidió no continuar los experimentos con afinina, ya que no se estaría cumpliendo con lo estipulado por la NOM-062-ZOO-1999,

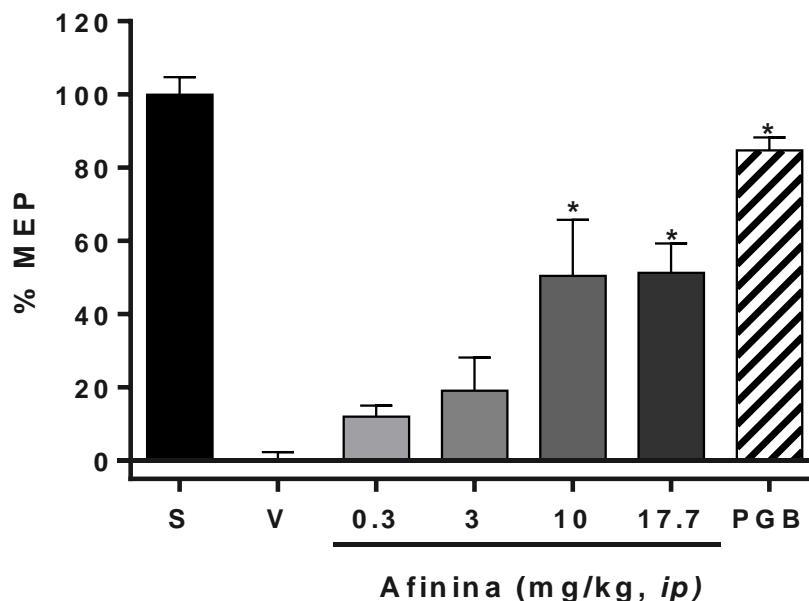


Figura 27. Efecto antialodínico de la afinina en ratas previamente sometidas a ligadura de nervios espinales. Se muestra el %MEP de cada tratamiento. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de seis animales por grupo. **S:** Grupo Sham. **V:** Grupo Vehículo. **PGB:** Pregabalina 10mg/kg. * Estadísticamente significativo respecto al vehículo (V) determinado por un ANOVA de 1 vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$).

Debido a que no se alcanzó un %MEP mayor al 50% en la afinina no se pudo calcular la DE_{50} de la misma, como se observa en la figura 28, la curva no está completa.

Curva log D vs. % MEP Afinina

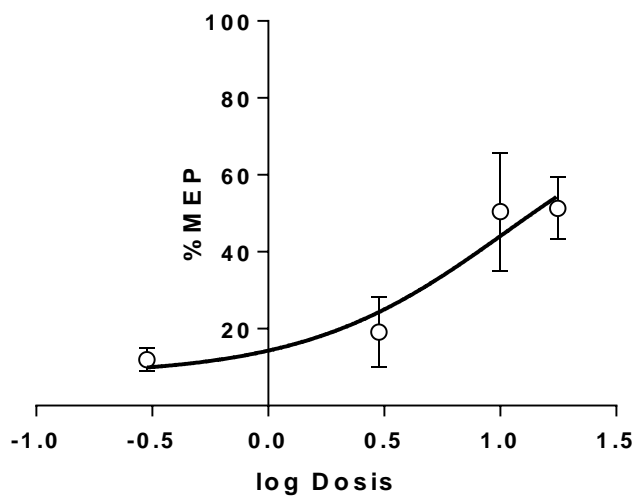


Figura 28. log Dosis vs. %MEP de la afinina administrada vía ip. Se presenta la media \pm EEM de al menos seis animales por grupo. Se observa que no se alcanza el 50% del efecto máximo.

8.3. Antagonistas sobre el efecto antialodínico de la piperina.

Para confirmar farmacológicamente la participación de distintos receptores espinales de potencial transitorio (TRPs) y el receptor GABA_A en el efecto antialodínico inducido por la piperina se administraron por vía intratecal (IT) previo a la administración de 56 mg/kg de piperina IP, dosis crecientes de los siguientes antagonistas: capsazepina (CZP) (5-30 nmol/rata, 20µL) para TRPV1, HC-030031 (3-100 µg/rata, 20µL) para TRPA1 (Fig. 29), SKF-96365 (3-100 µg/rata, 20µL) para TRPC y bicuculina (BIC) (3-30 µg/rata, 20µL) para GABA_A (Fig. 30).

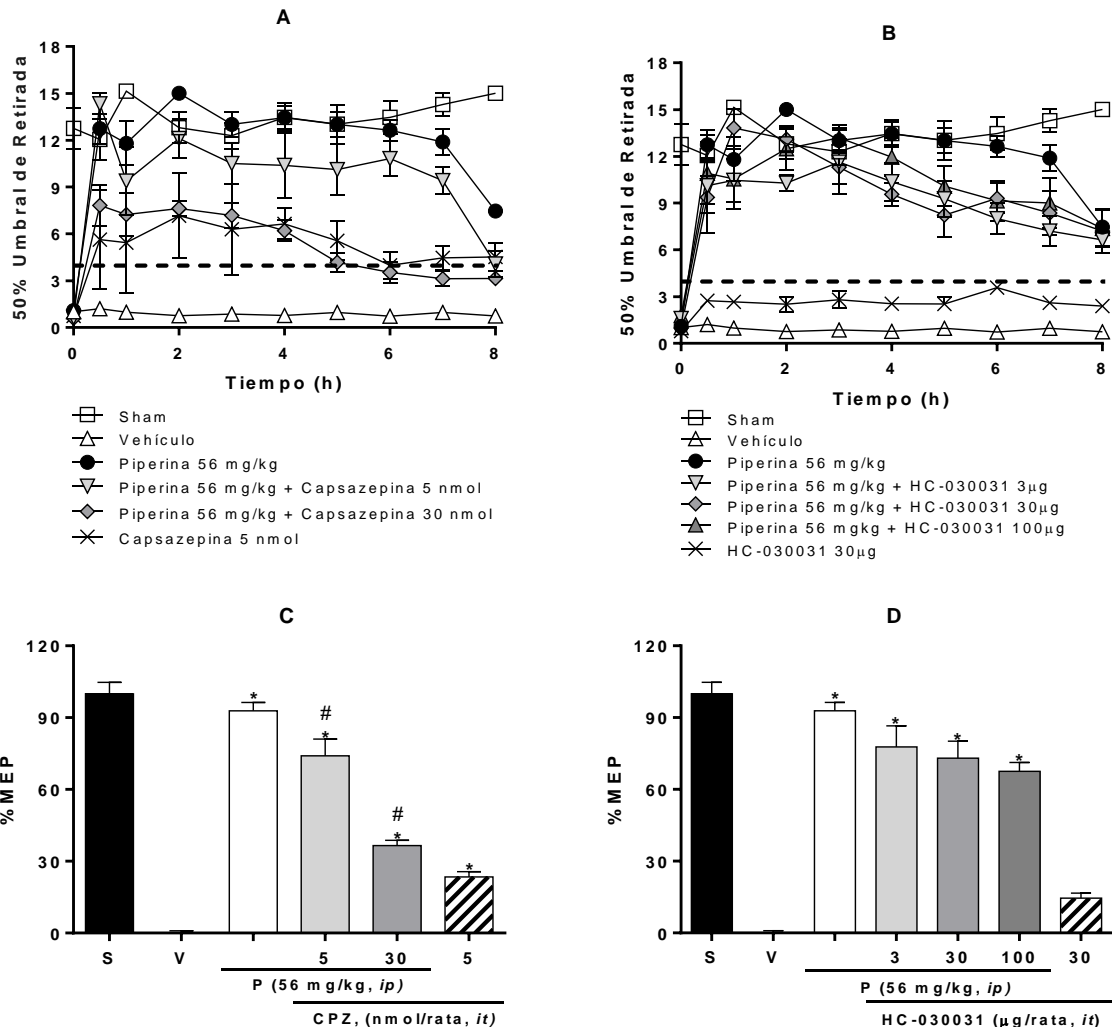


Figura 29. Efecto de la administración intratecal del antagonista TRPV1 (Capsazepina) y del antagonista TRPA1 (HC-030031) en el efecto antialodínico inducido por la administración intraperitoneal de piperina (56 mg/kg), así como el efecto del antagonista sólo (Capsazepina 5nmol, HC-030031, 30µmol) en ratas previa ligación de nervios espinales. Los datos se presentan como el 50% de umbral de retirada (A, B) o cómo % de Máximo Efecto Posible (%MEP) (C, D) de la media \pm EEM de al menos 6 animales por grupo. P: Piperina, S: Sham, V: Vehículo.

*: Diferencia significativa respecto a grupo vehículo ($p < 0.05$). #: Diferencia estadística respecto al grupo Piperina 56mg/kg ($p < 0.05$) determinado por una ANOVA de 1 vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

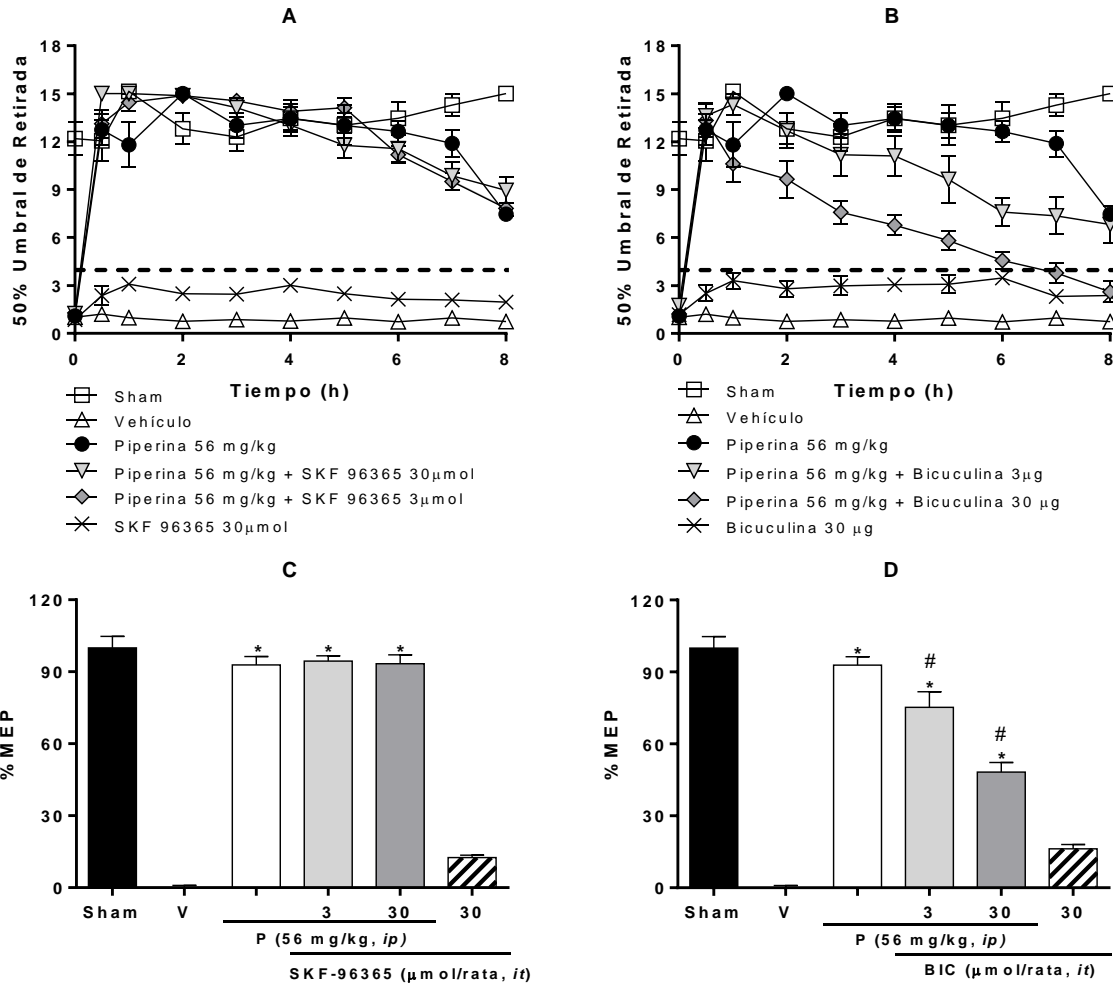


Figura 30. Efecto de la administración intratecal del antagonista TRPC (SKF-96365) y del antagonista GABA_A (Bicuculina) en el efecto antialodínico inducido por la administración intraperitoneal de piperina (56 mg/kg), así como el efecto del antagonista sólo (Bic 30 y SKF-96365, 30 μg) en ratas previa ligación de nervios espinales. Los datos se presentan como el 50% de umbral de retirada (A, B) o cómo % de Máximo Efecto Posible (%MEP) (C, D) de la media ±EEM de al menos 6 animales por grupo. P: Piperina, S: Sham, V: Vehículo.

*: Diferencia significativa respecto a grupo vehículo ($p < 0.05$). #: Diferencia estadística respecto al grupo Piperina 56mg/kg ($p < 0.05$) determinado por una ANOVA de 1 vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

En el caso de los cursos temporales de capsazepina y bicuculina se puede observar una disminución del 50% de umbral de retirada conforme se aumenta la dosis de antagonista en coadministración, regresando incluso a la condición alodínica inicial en la dosis más alta al final del experimento, (Fig. 29 A, Fig. 30, B).

Al comparar los %MEP se observa que la piperina pierde casi por completo su efecto antialodínico en presencia de capsazepina 30nmol, presentando un %MEP similar al del grupo administrado únicamente con el antagonista, siendo el único que presentó cierto efecto antialodínico (Fig. 29, C), en el caso de la administración de piperina y 30 μ g de bicuculina se puede observar que su %MEP disminuyó a un valor cercano al 50%, además presenta diferencia respecto al grupo administrado únicamente con piperina (Fig. 30, D).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los cursos temporales al administrar los antagonistas HC-030031 y SKF-96365 con piperina (Fig. 29, B y Fig. 30 A), así mismo no se presentó diferencia estadísticamente significativa en el %MEP respecto al grupo únicamente con piperina de las coadministraciones de ninguno de los dos antagonistas con la piperina (Fig. 29, D y Fig. 30, C).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró claramente el efecto antinociceptivo de las alcaloides piperina y afinina en un modelo de dolor neuropático. De la extracción y purificación de piperina, el rendimiento fue del 0.67% respecto a la masa total de las semillas, este rendimiento corresponde con lo reportado por Siddiqui y cols., 1997¹³², quienes obtuvieron un rendimiento del 0.5% respecto a la cantidad total de frutos de la planta *Piper nigrum* utilizando el mismo método de extracción que el presente estudio. Otro dato reportado por Epstein *et al.*, 1993¹³³ indica que el rendimiento por este método oscila entre el 2 y 4%, sin embargo, el artículo carece del paso de purificación del compuesto utilizando la cromatografía en columna, por lo que parte de nuestra piperina pudo perderse en dicho paso, no obstante la pureza del producto final queda constatada con los métodos espectroscópicos.

Un método de extracción ideal debe ser rápido, simple y barato, es sabido que la selección de un método de extracción y un solvente adecuado afecta profundamente la economía del proceso, se sabe que algunas veces el costo de las etapas de extracción y purificación es de casi 50% a 90% del costo final del producto, por lo que la selección del método y disolventes para la extracción de la piperina fue el más conveniente para este estudio. Se podría mejorar el rendimiento si se utilizan diferentes disolventes o se cambia el método. Actualmente existen numerosos métodos para la extracción de piperina que utilizan desde los tradicionales disolventes orgánicos hasta fluidos supercríticos, donde obtienen un rendimiento de hasta 98%¹³⁴.

Comparando las propiedades físicas de nuestro producto final con datos previamente reportados, el punto de fusión (128-131°C) obtenido corresponde con el indicado por Siddiqui¹³²(129-130°C) indica preliminarmente la identidad de la piperina, misma que se confirmó mediante la caracterización espectroscópica (RMN¹H, RMN¹³C y por Difracción de Rayos X).

En el espectro de RMN¹H de la piperina (Anexo III) se visualiza a δ 1.59 a δ 1.77 las señales características de hidrógenos alifáticos del anillo de piperidina (H-2, H-6, H-3, H-5, H-4), el cual contiene el átomo de nitrógeno. Por otro lado, los protones vinílicos muestran un desplazamiento químico experimental a δ =6.45 (H-2') y a δ =7.40 (H-3'), que se desplazan un poco debido al efecto del grupo carbonilo (C = O) unido al carbono vinílico principal. Las posiciones de los protones del fenilo, con desplazamiento teórico cercano a 7ppm se ven afectadas fuertemente por el sustituyente donador de electrones, el grupo metoxilo (-OR), el cual desplaza la resonancia del anillo, hasta

desplazamiento de 6.73 a 6.98 ppm. Finalmente se visualiza a un $\delta=5.97$ un singulete correspondiente a los protones del grupo metilen-dioxi (-O-CH₂-O-) (H-7'').

En el espectro de RMN¹³C (Anexo IV) se visualizan un total de 17 carbonos, siendo característicos el carbono C-7'' ($\delta= 101.39$) para el grupo metilen-dioxi (R-O-CH₂-O-R), los carbonos C-2, C-3, C-4, C-5 y C-6 ($\delta= 24.8- 43.12$) para el anillo de piperidina y el carbono C1' ($\delta=165.58$) para el grupo carbonilo de una amida .

Éste análisis, más la difracción de rayos X en monocristal y la comparación de los datos descritos con los reportados en la literatura¹³⁵ permitieron confirmar la identidad de la sustancia como Piperina.

De la extracción de la afinina, el rendimiento obtenido no concuerda con lo reportado en la literatura, donde se indican rendimientos de 2-6%¹³⁶. Esto podría ser resultado del método de extracción, y purificación. Se sabe que la afinina puede ser extraída utilizando disolventes con un gran rango de polaridad desde hexano hasta metanol:H₂O (4:1) debido a las características anfífilas de la molécula, por lo que los métodos de extracción varían mucho la cantidad que puede ser purificada y a la fecha no existe estudio que haya intentado comparar los rendimientos⁸⁶. La afinina obtenida en el presente estudio se identificó utilizando caracterización espectroscópica (RMN¹H, RMN¹³C).

Es necesario mencionar que factores como la fuente de material vegetal, las condiciones de colecta, el almacenamiento, el tiempo desde la colecta, entre otros influyen en la cantidad de metabolitos que pueden estar presentes en la planta, sin embargo, dichos factores no estuvieron en nuestro control ya que la colecta fue realizada en un tiempo previo y por personas ajenas a este trabajo.

En el espectro de RMN¹H (Anexo V) de afinina se visualiza los protones del grupo terbutil, se observa un doble de dobles correspondiente al protón H-1' ($\delta = 3.13$), un multiplete del H-2' ($\delta = 1.82$), y un singulete para cada uno de los protones H-3' y H-4' ($\delta = 0.93$ y 0.91). Finalmente, los protones vinílicos se observan en desplazamientos característicos H-2 ($\delta = 5.79$), H-3 ($\delta = 6.82$), H-6 ($\delta = 5.26$), H-7 ($\delta = 5.97$), H-8 ($\delta = 6.3$) y H-9 ($\delta = 5.68$).

En el espectro de RMN¹³C (Anexo VI) se visualizan las 14 señales, correspondientes a cada uno de los carbonos de la molécula. Podemos observar el carbono característico del grupo carbonilo de amida C-1 ($\delta = 165.96$), y los característicos carbonos vinílicos C-2 ($\delta = 124.14$), C-3 ($\delta = 143.55$), C-6 ($\delta = 127.66$), C-7 ($\delta = 129.45$), C-8 ($\delta = 126.7$) y C-9 ($\delta = 129.95$)

Este análisis, junto con la comparación de los datos descritos con los reportados previamente en la literatura^{130,137} permitieron confirmar la presencia e identidad de la afinina, sin embargo, en los espectros tanto de protón como de carbono (Anexo IV y V) se puede observar que el compuesto no está del todo puro.

Para realizar las pruebas biológicas del efecto antialodínico de las sustancias aisladas, se procedió a realizar la cirugía de ligadura de nervios espinales L5 y L6 a ratas y corroborar la condición alodínica de estas.

Los resultados muestran (Fig. 22) que posterior a la cirugía y los 14 días de reposo la ligadura de nervios disminuyó el 50% de umbral de retiro hasta 0.82 ± 0.22 g en el respectivo grupo de ratas, denominadas "Neuropáticas" respecto a las ratas a las cuales no se les realizó ninguna intervención quirúrgica, denominadas "Naive" que presentaron un 50% de umbral de retiro de 14.13 ± 0.52 g. Los animales que se intervinieron quirúrgicamente sin realizarse la ligadura de los nervios espinales presentaron un umbral de retirada de 13.46 ± 0.97 g, dato que corrobora la ausencia de neuropatía en dicho grupo, denominado "Sham". Estos datos comprueban que la condición neuropática es causada únicamente por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, y que la intervención quirúrgica realizada 14 días previos a la evaluación no figura como posible causa de la misma. Aunado a esto, el grupo que fue administrado únicamente con el vehículo presentó un 50% de umbral de retirada de (0.89 ± 0.15 g) en ratas previamente ligadas, lo que indica que el vehículo no modifica la condición alodínica en los animales y que cualquier cambio en la respuesta del umbral se debe al tratamiento farmacológico administrado.

La alodinia causada por la ligadura de nervios espinales es mencionada por los creadores del modelo Kim y Chung y es conocida como Síndrome Doloroso Regional Complejo (SDRC) tipo II, antes conocido como *causalgia*¹³⁸. El SDRC con frecuencia aparece tras un episodio nocivo desencadenante, principalmente cirugías, se manifiesta con dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia y no está limitado a la distribución de un nervio periférico¹³⁹. La fisiopatología del SDRC no se ha definido con exactitud,

aunque se han observado como mecanismos fisiopatológicos un factor desencadenante, a centros simpáticos regionales, la percepción distorsionada de la neurotransmisión del impulso nervioso como una respuesta exagerada en intensidad y extensión que desencadena una alteración regional y mantenida de la microcirculación¹⁴⁰.

Se decidió el uso de pregabalina como fármaco testigo en el experimento ya que es el fármaco de primera elección para el tratamiento del dolor neuropático de SDRC con etiología de lesión nerviosa similar a la presentada en el estudio⁶⁰. A pesar de ser un análogo de GABA, la gabapentina no interactúa con los receptores GABA_A o GABA_B y tampoco tiene influencia en la recaptura de GABA. Recientes estudios de estructura y actividad usando un modelo de ratón mutante de dolor neuropático han encontrado que la unión a la proteína $\alpha 2\text{-}\delta$ de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje es un requisito previo para las acciones analgésicas de la pregabalina ya que contribuye a la reducción de la liberación de neurotransmisores excitadores y la inhibición de la transmisión sináptica¹⁴¹. Además, se ha comprobado que la modulación de la conductancia del canal K⁺, el transportador de aminoácidos excitadores y la inflamación son otros posibles mecanismos responsables de sus acciones analgésicas. Sin embargo, aún se necesitan estudios para dilucidar su mecanismo de una manera más detallada¹⁴².

Una vez determinado el modelo, se procedió a evaluar el efecto de las alcanidas. Comenzando por la afinina, el curso temporal del 50% del umbral de retiro de este compuesto indica que sólo las dosis de 10 y 17.7 mg/kg presentaron efecto antialodínico, puesto que las dosis de 0.3 y 3 mg/kg no presentaron un umbral mayor a 4g, valor establecido para denotar la presencia de la condición alodínica. Al obtener el %MEP, las dosis de 10 y 17 mg/kg fueron las únicas que presentaron diferencia significativa respecto al vehículo, sin embargo, a la dosis de 17.7 mg/kg se comenzaron a observar en las ratas efectos tóxicos asociados con dolor agudo¹³¹ y convulsiones. Cabe mencionar que la dosis de 31 mg/kg de afinina resultó letal para el 100% de los animales administrados. Debido a lo anterior, se decidió no continuar con los estudios de afinina puesto que no se cumplían con los estatutos internacionales para el estudio del dolor ni con la NOM-062-ZOO-1999. Como se puede ver en la figura 29, no se alcanzó un valor mayor al 50% de MEP, por lo que no se logró calcular la DE₅₀ del efecto antialodínico de este compuesto.

Los resultados anteriores discrepan con los reportados por Déciga Campos *et al.* 2010, quienes administran hasta una dosis de 30 mg/kg sin reportar muertes o efectos tóxicos en la evaluación de

la actividad antinociceptiva de la afinina en el modelo de estiramientos abdominales⁹¹, las diferencias pueden ser explicadas por el uso de un modelo animal distinto en cada estudio. Mientras que Déciga Campos evaluó en ratones ICR, que presentan un metabolismo mayor que el de las ratas Wistar¹⁴³. El efecto convulsivante de alcanidas de este tipo ha sido reportado para alfa-sanshool por Navarrete y Hong en ¹⁴⁴, y recientemente para la afinina por Rosa-Lugo y Yolanda Ríos en el 2017¹⁴⁵, quienes proponen que la activación de los receptores TRPV1 expresados en el GRD y el hipocampo son dos posibles mecanismos convulsivantes de la afinina, al ser disminuídas utilizando capsazepina, por lo que merece poner atención a este efecto adverso y es necesario realizar estudios para establecer el riesgo convulsivo de las alcanidas o el posible uso de bloqueadores como anticonvulsivos. No obstante, los resultados del presente trabajo indican que la afinina no es buena candidata para el tratamiento del dolor neuropático.

El curso temporal de la piperina muestra un aumento del umbral de 50% de retirada y una pérdida de la condición alodínica relativamente lenta en dosis bajas, 3.1 y 10 mg/kg, ya que presentan antialodinia a partir de la cuarta y tercera hora del estudio respectivamente sin alcanzar los niveles de las dosis altas, 31, 56 y 100 mg/kg para retornar a la condición de alodinia en la sexta hora (Fig. 23). Al obtener el %MEP se observa que las dosis bajas presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto a las ratas administradas únicamente con el vehículo, sin embargo, no alcanzan un nivel similar al de las ratas Sham, por lo que no presentan actividad antialodínica total, (Fig. 24).

En contraste, las dosis de 31, 56 y 100 mg/kg presentan una condición antialodínica desde la primera hora manteniéndose constantes hasta la quinta, donde empiezan a decrecer, además, las dosis de 56 y 100 mg/kg presentan un comportamiento similar al de las ratas Sham (Fig. 23). Al graficar el %MEP (Fig. 24) estas dosis muestran diferencia significativa respecto al vehículo con niveles similares respecto de las ratas Sham e incluso superiores al del grupo testigo (pregabalina 10 mg/kg) lo que indica un alivio de la condición alodínica total durante el experimento, confirmando así el efecto analgésico de la piperina para un dolor de tipo neuropático. Se calculó la DE₅₀ de su efecto antialodínico utilizando el modelo del efecto máximo sigmoide, siendo éste el modelo que presentó un mejor ajuste de los datos (Fig. 25), la cual fue de **17.478±4.27 mg/kg**. Actualmente no existen otros datos acerca de DE₅₀ del efecto antialodínico de este compuesto.

Se le han atribuido propiedades analgésicas a la piperina en otros tipos de dolor como el inflamatorio¹⁴⁶ y el visceral⁹⁵, sin embargo este es el primer estudio que presenta evidencias de su eficacia frente al dolor neuropático.

El comportamiento dosis-dependiente, además de la duración de los efectos observados en el curso temporal sugieren que el mecanismo de acción de la piperina se deba a interacciones fármaco-receptor, ya que se sabe que un principio básico de la farmacología de los receptores es que el efecto de un fármaco es directamente proporcional al número de receptores ocupados, además, la duración del efecto del fármaco está relacionado con las tasas de asociación y disociación del complejo fármaco-receptor¹⁴⁷. Es bien sabido que la piperina es un agonista de los receptores TRPV1⁹⁶, y que este receptor está presente en estructuras neuronales relacionadas con la nocicepción (GRD, fibras nociceptivas A δ y C, etc.⁹⁹). Todo parece indicar que el mecanismo de acción de la piperina es a través de los receptores TRPV1, sin embargo, con el fin de no descartar otros posibles mecanismos de acción se evaluaron coadministraciones de piperina a 56 mg/kg vía ip y antagonistas de diferentes receptores TRP y un antagonista GABA_A administrados vía intratecal, utilizando una técnica de administración intratecal transcutánea directa previamente validada¹²⁵.

Las dosis de cada antagonista fueron seleccionadas con base en las reportadas previamente en la literatura. Para TRPV1, capsazepina (5-30 nM rata, 20 μ L)¹²⁵; para TRPA1, HC-030031 (3-100 μ g/rata, 20 μ L)¹²⁶; para TRPC, SKF-96365 (3-100 μ g/rata, 20 μ L)¹⁴⁸; y para GABA_A, bicuculina (3-30 μ g/rata, 20 μ L)¹²⁸.

Se decidió utilizar esta vía de administración ya que sólo se deseaba observar el antagonismo de estas sustancias en los receptores presentes en estructuras espinales, donde se asocian con la nocicepción, además de evitar los posibles efectos secundarios de los antagonistas, ya que los receptores TRP están distribuidos en numerosos tejidos y su antagonismo puede llegar a causar incluso la muerte⁹⁹.

El curso temporal de las coadministraciones muestra que la capsazepina disminuye el efecto antialodínico de la piperina conforme se aumenta su dosis, regresando incluso a la condición alodínica inicial en la dosis de 30nM al final del experimento (Fig. 29 A). Al comparar los %MEP (Fig. 29, C) se observa que la piperina pierde casi por completo su efecto antialodínico en presencia de capsazepina 30nmol, presentando un %MEP similar al del grupo administrado únicamente con el antagonista. Los resultados corroboran que la activación del receptor TRPV1 está implicada en el mecanismo de acción de la piperina.

El mecanismo de acción antialodínico de la piperina se explica como la desensibilización por la vía rápida dependiente de calmodulina y calcineurina del TRPV1 por la activación de la piperina⁹⁸. La desensibilización aguda es debido a un cambio conformacional inducido por agonistas que resulta en el cierre del canal; se sabe que este proceso es dependiente de calcio intracelular¹⁰³. La desensibilización de los receptores TRPV1 como mecanismo antialodínico también fue respaldado por Christoph *et al.* 2008, quienes demostraron un abatimiento de la alodina en ratones knock-out TRPV1-/-¹⁴⁹.

En concordancia con nuestros resultados, McNamara *et al.*, 2005, utilizando estudios electrofisiológicos *in vitro* demostraron que, al igual que la capsaicina, la piperina es un agonista del TRPV1, puesto que produjo una actividad agonista clara que fue antagonizada por el antagonista capsazepina, sin embargo, determina que, aunque la piperina fue un agonista menos potente ($CE_{50} = 37.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$) que la capsaicina ($CE_{50} = 0.29 \pm 0.05 \mu\text{m}$), demostró una eficacia mucho mayor (aproximadamente el doble) en TRPV1. Esto llevó a una desensibilización macroscópica más pronunciada para la piperina y también a una mayor taquifilaxia en respuesta a aplicaciones agonistas repetitivas ¹⁵⁰.

Se sabe que la capsaicina activa al receptor TRPV1 al acoplarse en el sitio de unión a vanilloides ubicado en las subunidades S3 y S4¹⁰⁰, sin embargo, al no presentar ese grupo vanilloide, la piperina debe de activar al TRPV1 en un sitio diferente, lo que explicaría las diferencias de su mayor eficacia e inducción de desensibilización del receptor a pesar de ser también una alcanida.

Así mismo, Correa *et al.* hicieron un estudio de derivados de piperina donde determinaron que su efecto agonista de TRPV1 dependía del anillo metilendioxi, ya que la apertura de dicho anillo, o los cambios en el anillo heterocíclico de la molécula redujeron o anularon su actividad, mientras que los cambios estructurales de dobles enlaces y estereoquímica en la cadena alifática de estos compuestos no modificaron su potencia o eficacia¹⁵¹.

En el caso de la coadministración de piperina y bicuculina se puede observar en el curso temporal el umbral de retirada una disminución del efecto antialodínico de la piperina respecto a la dosis de la primera (Fig. 30, B). Al momento de graficar el %MEP, se observa que, a la dosis de 30 μg de bicuculina el porcentaje disminuyó a un valor cercano al 50% (Fig. 30, D). Estos resultados indican que además

de la activación de los receptores TRPV1, la modulación positiva del receptor GABA_A está implicada en el mecanismo de acción del efecto antialodínico de piperina.

Se sabe que el sistema GABAérgico está implicado en la modulación del dolor neuropático por los estudios realizados por Bridges *et al*, en 2001³⁰. Las vías inhibitorias descendentes e interneuronales locales, como las vías GABAérgicas, contribuyen críticamente a la modulación del equilibrio entre el tono excitador e inhibitorio en la transmisión sináptica. Las interneuronas GABAérgicas producen inhibición sináptica y, por lo tanto, previenen o inhiben el dolor neuropático a través de los receptores GABA_A y GABA_B en el asta dorsal de la médula espinal¹⁵². Hwang *et al* en 1997, demostraron que los receptores espinales GABA_A y GABA_B modulan los sistemas espinales activados por mecanorreceptores de umbral bajo que median la alodinia observada después de la lesión del nervio periférico¹⁵³, y Zeilhofer *et al.* en 2008 demostraron que la inhibición GABAérgica se pierde en condiciones de dolor neuropático crónico¹. Por lo que una modulación positiva del receptor GABA_A es un mecanismo viable para explicar el efecto antialodínico de la piperina.

En el 2010, Zaugg y colaboradores descubrieron que la piperina era un modulador alostérico positivo del receptor GABA_A utilizando perfil de actividades in vitro basado en HPLC, además determinaron que no es por unión al sitio de las benzodiazepinas ya que al utilizar el antagonista flumazenil no se presentó disminución de la actividad, por lo que la piperina representaría un nuevo compuesto base para la interacción con moduladores del receptor alostérico positivo de GABA_A con un sitio de unión independiente de las benzodiazepinas¹⁵⁴.

Parte de la actividad de la piperina sobre el receptor TRPV1 puede ser causada por el anillo de piperidina que presenta, ya que en el 2013, Khom y colaboradores evaluaron la activación del receptor por piperina y un derivado de esta (SCT-66) que cambia el anillo de piperidina por dos grupos terbutilo unidos al átomo de nitrógeno y observaron ausencia de la activación de los TRPV1, no siendo así con los receptores GABA_A donde no hubo diferencia en la activación con la modificación realizada¹⁵⁵. Además, con el fin de evaluar la interacción de piperina con GABA_A se estudió la modulación de receptores compuestos por diferentes subunidades, expresados en ovocitos de *Xenopus*. Los resultados sugieren que la piperina interactúa con un sitio de unión localizado en las subunidades α y/o β o la interfaz α/β ¹⁵⁵.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los cursos temporales al administrar los antagonistas HC-030031 (antagonista de TRPA1) y SKF-96365 (antagonista de TRPC) junto con piperina, y en el %MEP no se observan diferencias significativas respecto al grupo tratado únicamente con piperina (Fig. 29, D y Fig. 30, C).

Además de ser un agonista de los receptores TRPV1, la piperina también es un agonista de los receptores TRPA1 pero con menor potencia y eficacia, esto fue estudiado por Okumura y colaboradores en 2010¹⁵⁶. Se sabe que la activación de los receptores TRPA1 contribuye a la señal dolorosa en lesiones nerviosas, sin embargo, el mecanismo que subyace a la regulación al alza de TRPA1 en sitios de lesiones nerviosas sigue siendo desconocido¹⁵⁷. Conjuntamente su desensibilización también produce efectos analgésicos¹⁵⁸. El hecho de no presentar una disminución del efecto se puede explicar por la baja afinidad que tiene la piperina al TRPA1 respecto al TRPV1, ya que la piperina activará primeramente al TRPV1 con una mayor efectividad y potencia, lo que provocará una gran desensibilización en comparación con el TRPA1 que puede activarse, pero no desensibilizarse. A pesar de que el receptor esté involucrado en el dolor neuropático y que la piperina sea agonista del mismo, los resultados indican que los receptores TRPA1 no están involucrados en el mecanismo de acción del efecto antialodínico de la piperina.

Actualmente, no existen reportes de la interacción de la piperina con los receptores TRPC, por lo que los resultados concuerdan con lo esperado, sin embargo, no se deben descartar rutas alternas donde podrían estar involucrados estos receptores y por las limitaciones de nuestro modelo, no fueron observables.

En resumen, los resultados anteriores indican que la afinina presenta un efecto antialodínico bajo, pero también presentan efectos tóxicos a partir de la dosis de 17.7 mg/kg. La piperina presenta un buen efecto antialodínico debido a la desensibilización aguda de los receptores TRPV1, así como una modulación positiva del receptor GABA_A en un sitio distinto al de las benzodiazepinas en las subunidades α y/o β o en la interfaz α/β , sin estar involucrada la activación de los receptores TRPA1 y TRPC.

10. CONCLUSIONES

Se aislaron y purificaron las alcaloides afinina y piperina de sus respectivas fuentes naturales con un rendimiento aceptable y se caracterizaron utilizando RMN ^1H y ^{13}C , comprobando así su identidad y pureza.

La afinina presentó un bajo efecto antialodínico además de efectos tóxicos en su administración intraperitoneal, por lo que no se continuó con su estudio.

La piperina presentó un efecto antialodínico claro tras la administración sistémica con una DE_{50} de 17.478 ± 4.27 mg/kg, i.p., aumentando el umbral nociceptivo hasta niveles cercanos a las ratas falsamente ligadas, con un efecto mayor al de la pregabalina, utilizado como fármaco testigo. Asimismo, se determinó farmacológicamente que el mecanismo de acción del efecto antialodínico de la piperina es la desensibilización aguda de los receptores TRPV1 y la modulación positiva del receptor GABA_A .

Los resultados obtenidos en el presente estudio justifican estudios posteriores de piperina como agente terapéutico en el dolor neuropático.

11. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto antialodínico de la piperina en administración subcrónica y crónica en el modelo de ligadura de nervios espinales.

Evaluar el efecto antialodínico de la piperina en otros modelos de dolor neuropático como el causado por agentes quimioterapéuticos.

Determinar si la piperina produce taquifilaxia utilizando técnicas de biología molecular para determinar la expresión del TRPV1 en los tejidos nerviosos posterior a la administración subcrónica de piperina.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Zeilhofer, H. U., Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain--contributions of inflammation and microglia. *International immunopharmacology* **2008**, *8* (2), 182-7.
2. Bowman WC, R. M., *Farmacología Bases bioquímicas y patologías. Aplicaciones clínicas*. Editorial Interamericana: 1984.
3. Marazziti, D.; Mungai, F.; Vivarelli, L.; Presta, S.; Dell'Osso, B., Pain and psychiatry: a critical analysis and pharmacological review. *Clinical practice and epidemiology in mental health : CP & EMH* **2006**, *2*, 31.
4. Andrew Baranowski, C. o. P. s. C. C., Paul Abrams, Richard Berger, Tony Buffington, Beverly Collett, Anton Emmanuel, Magnus Fall, Phil Hanno, Fred Howard, John Hughes, Curtis Nickel, Jorgen Nordling, Dean Tripp, Katy Vincent, Ursula Wesselmann and Amanda C de C Williams., Pain Terms: A Current List with Definitions and Notes on Usage. In *Classification of Chronic Pain*, Second Edition ed.; Harold Merskey, N. B., Ed. IASP Press: Seattle, USA, 2011; pp 20-214.
5. Turk, D. C.; Okifuji, A., Assessment of patients' reporting of pain: an integrated perspective. *Lancet* **1999**, *353* (9166), 1784-8.
6. Woolf, C. J., Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of internal medicine* **2004**, *140* (6), 441-51.
7. Koltzenburg, M.; Scadding, J., Neuropathic pain. *Current opinion in neurology* **2001**, *14* (5), 641-7.
8. Muir, W. W., 3rd; Woolf, C. J., Mechanisms of pain and their therapeutic implications. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **2001**, *219* (10), 1346-56.
9. Dubin, A. E.; Patapoutian, A., Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation* **2010**, *120* (11), 3760-3772.
10. D'Mello, R.; Dickenson, A. H., Spinal cord mechanisms of pain. *BJA: British Journal of Anaesthesia* **2008**, *101* (1), 8-16.

11. Purves D, A. G., Fitzpatrick D, et al., Central Pain Pathways: The Spinothalamic Tract. In *Neuroscience*, Second ed.; Sinauer Associates: Sunderland (MA), 2001.
12. Steeds, C. E., The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)* **2013**, *31* (2), 49-53.
13. Institute of Medicine Committee on Pain, D.; Chronic Illness, B., In *Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*, Osterweis, M.; Kleinman, A.; Mechanic, D., Eds. National Academies Press (US) Copyright (c) 1987 by the National Academy of Sciences.: Washington (DC), 1987; p 139.
14. Magrinelli, F.; Zanette, G.; Tamburin, S., Neuropathic pain: diagnosis and treatment. *Practical neurology* **2013**, *13* (5), 292-307.
15. Zakrzewska, J. M.; Patsalos, P. N., Long-term cohort study comparing medical (oxcarbazepine) and surgical management of intractable trigeminal neuralgia. *Pain* **2002**, *95* (3), 259-66.
16. Wilson, R. C., The use of low-dose trazodone in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Journal of the American Podiatric Medical Association* **1999**, *89* (9), 468-71.
17. Sabatowski, R.; Galvez, R.; Cherry, D. A.; Jacquot, F.; Vincent, E.; Maisonobe, P.; Versavel, M., Pregabalin reduces pain and improves sleep and mood disturbances in patients with post-herpetic neuralgia: results of a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Pain* **2004**, *109* (1-2), 26-35.
18. Jensen, M. P.; Chodroff, M. J.; Dworkin, R. H., The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. *Neurology* **2007**, *68* (15), 1178-82.
19. Caraceni, A.; Zecca, E.; Bonezzi, C.; Arcuri, E.; Yaya Tur, R.; Maltoni, M.; Visentin, M.; Gorni, G.; Martini, C.; Tirelli, W.; Barbieri, M.; De Conno, F., Gabapentin for neuropathic cancer pain: a randomized controlled trial from the Gabapentin Cancer Pain Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2004**, *22* (14), 2909-17.
20. Staats, P. S.; Yearwood, T.; Charapata, S. G.; Presley, R. W.; Wallace, M. S.; Byas-Smith, M.; Fisher, R.; Bryce, D. A.; Mangieri, E. A.; Luther, R. R.; Mayo, M.; McGuire, D.; Ellis, D., Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *Jama* **2004**, *291* (1), 63-70.

21. Huse, E.; Larbig, W.; Flor, H.; Birbaumer, N., The effect of opioids on phantom limb pain and cortical reorganization. *Pain* **2001**, *90* (1-2), 47-55.
22. Smith, D. G.; Ehde, D. M.; Hanley, M. A.; Campbell, K. M.; Jensen, M. P.; Hoffman, A. J.; Awan, A. B.; Czerniecki, J. M.; Robinson, L. R., Efficacy of gabapentin in treating chronic phantom limb and residual limb pain. *Journal of rehabilitation research and development* **2005**, *42* (5), 645-54.
23. van de Vusse, A. C.; Stomp-van den Berg, S. G.; Kessels, A. H.; Weber, W. E., Randomised controlled trial of gabapentin in Complex Regional Pain Syndrome type 1 [ISRCTN84121379]. *BMC neurology* **2004**, *4*, 13.
24. Chong, M. S.; Bajwa, Z. H., Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *Journal of pain and symptom management* **2003**, *25* (5 Suppl), S4-S11.
25. Baron, R., Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nature clinical practice. Neurology* **2006**, *2* (2), 95-106.
26. Cruciani, R. A.; Nieto, M. J., Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. *Revista de la Sociedad Española del Dolor* **2006**, *13*, 312-327.
27. Attal, N.; Bouhassira, D., Mechanisms of pain in peripheral neuropathy. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* **1999**, *173*, 12-24; discussion 48-52.
28. Latremoliere, A.; Woolf, C. J., Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **2009**, *10* (9), 895-926.
29. Woolf, C. J.; Mannion, R. J., Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* **1999**, *353* (9168), 1959-64.
30. Bridges, D.; Thompson, S. W.; Rice, A. S., Mechanisms of neuropathic pain. *British journal of anaesthesia* **2001**, *87* (1), 12-26.
31. O'Banion, M. K., Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Critical reviews in neurobiology* **1999**, *13* (1), 45-82.

32. Alessandri-Haber, N.; Dina, O. A.; Joseph, E. K.; Reichling, D. B.; Levine, J. D., Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2008**, *28* (5), 1046-57.
33. Shields, S. D.; Cavanaugh, D. J.; Lee, H.; Anderson, D. J.; Basbaum, A. I., Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* **2010**, *151* (2), 422-9.
34. Lee-Kubli, C. A.; Mixcoatl-Zecuatl, T.; Jolival, C. G.; Calcutt, N. A., Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. *Current topics in behavioral neurosciences* **2014**, *20*, 147-70.
35. Wu, L. J.; Zhuo, M., Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2009**, *6* (4), 693-702.
36. Baron, R., Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *The Clinical journal of pain* **2000**, *16* (2 Suppl), S12-20.
37. McHugh, J. M.; McHugh, W. B., Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN clinical issues* **2000**, *11* (2), 168-78.
38. Tassorelli, C.; Greco, R.; Wang, D.; Sandrini, G.; Nappi, G., Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *European journal of pharmacology* **2006**, *534* (1-3), 103-7.
39. Callsen, D.; Sandau, K. B.; Brune, B., Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases. *Free radical biology & medicine* **1999**, *26* (11-12), 1544-53.
40. Tesfaye, S.; Boulton, A. J.; Dickenson, A. H., Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. *Diabetes care* **2013**, *36* (9), 2456-65.
41. Morgado, C.; Silva, L.; Pereira-Terra, P.; Tavares, I., Changes in serotonergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1. *Neurobiology of disease* **2011**, *43* (1), 275-84.

42. Ossipov, M. H.; Dussor, G. O.; Porreca, F., Central modulation of pain. *The Journal of clinical investigation* **2010**, *120* (11), 3779-87.
43. Amaya-Castellanos, E.; Pineda-Farias, J. B.; Castaneda-Corral, G.; Vidal-Cantu, G. C.; Murbartian, J.; Rocha-Gonzalez, H. I.; Granados-Soto, V., Blockade of 5-HT₇ receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2011**, *99* (4), 591-7.
44. Godinez-Chaparro, B.; Barragan-Iglesias, P.; Castaneda-Corral, G.; Rocha-Gonzalez, H. I.; Granados-Soto, V., Role of peripheral 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* **2011**, *152* (3), 687-97.
45. Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C. J., Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience* **2009**, *32*, 1-32.
46. Attal, N.; Cruccu, G.; Baron, R.; Haanpää, M.; Hansson, P.; Jensen, T. S.; Nurmikko, T., EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European Journal of Neurology* **2010**, *17* (9), 1113-e88.
47. Edwards, J. L.; Vincent, A. M.; Cheng, H. T.; Feldman, E. L., Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & therapeutics* **2008**, *120* (1), 1-34.
48. Vinik, A.; Casellini, C., *Guidelines in the management of diabetic nerve pain: Clinical utility of pregabalin*. 2013; Vol. 6, p 57-78.
49. Hamidi, G. A.; Manaheji, H.; Janahmadi, M.; Noorbakhsh, S. M.; Salami, M., Co-administration of MK-801 and morphine attenuates neuropathic pain in rat. *Physiology & behavior* **2006**, *88* (4-5), 628-35.
50. Sindrup, S. H.; Otto, M.; Finnerup, N. B.; Jensen, T. S., Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **2005**, *96* (6), 399-409.
51. Wiffen, P. J., Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews.
52. Duhmke, R. M.; Cornblath, D. D.; Hollingshead, J. R., Tramadol for neuropathic pain. *The Cochrane database of systematic reviews* **2004**, (2), Cd003726.

53. Yuen, K. C.; Baker, N. R.; Rayman, G., Treatment of chronic painful diabetic neuropathy with isosorbide dinitrate spray: a double-blind placebo-controlled cross-over study. *Diabetes care* **2002**, *25* (10), 1699-703.
54. Barbano, R. L.; Herrmann, D. N.; Hart-Gouleau, S.; Pennella-Vaughan, J.; Lodewick, P. A.; Dworkin, R. H., Effectiveness, tolerability, and impact on quality of life of the 5% lidocaine patch in diabetic polyneuropathy. *Archives of neurology* **2004**, *61* (6), 914-8.
55. Ziegler, D., Treatment of diabetic polyneuropathy: Update 2006. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *1084*, 250-66.
56. Max, M. B.; Lynch, S. A.; Muir, J.; Shoaf, S. E.; Smoller, B.; Dubner, R., Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *The New England journal of medicine* **1992**, *326* (19), 1250-6.
57. Collins, S. L.; Moore, R. A.; McQuayHj; Wiffen, P., Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *Journal of pain and symptom management* **2000**, *20* (6), 449-58.
58. Kochar, D. K.; Rawat, N.; Agrawal, R. P.; Vyas, A.; Beniwal, R.; Kochar, S. K.; Garg, P., Sodium valproate for painful diabetic neuropathy: a randomized double-blind placebo-controlled study. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* **2004**, *97* (1), 33-8.
59. Dworkin, R. H.; O'Connor, A. B.; Backonja, M.; Farrar, J. T.; Finnerup, N. B.; Jensen, T. S.; Kalso, E. A.; Loeser, J. D.; Miaskowski, C.; Nurmikko, T. J.; Portenoy, R. K.; Rice, A. S.; Stacey, B. R.; Treede, R. D.; Turk, D. C.; Wallace, M. S., Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* **2007**, *132* (3), 237-51.
60. Sergio Méndez Acuña, M. P. C., José de Jesús Villafaña, Ivonne Nallely Pérez Sánchez, IMSS-441-11 Guía de Práctica Clínica del Tratamiento Farmacológico del Dolor Neuropático en mayores de 18 años. CENETEC, Ed. CENETEC: México, 2010.
61. Li, J. W.; Vederas, J. C., Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *325* (5937), 161-5.

62. Quintans, J. S.; Antonioli, A. R.; Almeida, J. R.; Santana-Filho, V. J.; Quintans-Junior, L. J., Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **2014**, *114* (6), 442-50.
63. Lim, E. Y.; Kim, Y. T., Food-Derived Natural Compounds for Pain Relief in Neuropathic Pain. *BioMed Research International* **2016**, *2016*, 12.
64. Meotti, F. C.; Missau, F. C.; Ferreira, J.; Pizzolatti, M. G.; Mizuzaki, C.; Nogueira, C. W.; Santos, A. R. S., Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochem Pharmacol* **2006**, *72* (12), 1707-1713.
65. De Sousa, D. P., Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules* **2011**, *16* (3), 2233.
66. Guimaraes, A. G.; Quintans, J. S.; Quintans, L. J., Jr., Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. *Phytotherapy research : PTR* **2013**, *27* (1), 1-15.
67. Williams, P., Review of Modern Alkaloids. Structure, Isolation, Synthesis and Biology. *Journal of natural products* **2012**, *75* (6), 1261-1261.
68. Xu, Y.; Qiu, H. Q.; Liu, H.; Liu, M.; Huang, Z. Y.; Yang, J.; Su, Y. P.; Yu, C. X., Effects of koumine, an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth., on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2012**, *101* (3), 504-14.
69. Ameri, A., The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system. *Progress in neurobiology* **1998**, *56* (2), 211-35.
70. Anjaneyulu, M.; Chopra, K., Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2003**, *27* (6), 1001-5.
71. Rao, V. S.; Menezes, A. M.; Viana, G. S., Effect of myrcene on nociception in mice. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **1990**, *42* (12), 877-8.
72. Kissin, I., The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesthesia and analgesia* **2010**, *110* (3), 780-9.

73. Anand, P.; Bley, K., Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *BJA: British Journal of Anaesthesia* **2011**, *107* (4), 490-502.
74. Garg, G.; Adams, J. D., Treatment of neuropathic pain with plant medicines. *Chinese journal of integrative medicine* **2012**, *18* (8), 565-70.
75. Boonen, J.; Bronselaer, A.; Nielandt, J.; Veryser, L.; De Tré, G.; De Spiegeleer, B., Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *Journal of ethnopharmacology* **2012**, *142* (3), 563-590.
76. Ramsewak, R. S.; Erickson, A. J.; Nair, M. G., Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry* **1999**, *51* (6), 729-32.
77. Ross, S. A.; Al-Azeib, M. A.; Krishnaveni, K. S.; Fronczek, F. R.; Burandt, C. L., Alkamides from the leaves of *Zanthoxylum syncarpum*. *Journal of natural products* **2005**, *68* (8), 1297-9.
78. Zacaes, L.; Lopez-Gresa, M. P.; Fayos, J.; Primo, J.; Belles, J. M.; Conejero, V., Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **2007**, *20* (11), 1439-48.
79. Raduner, S.; Majewska, A.; Chen, J. Z.; Xie, X. Q.; Hamon, J.; Faller, B.; Altmann, K. H.; Gertsch, J., Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (20), 14192-206.
80. Dalby-Brown, L.; Barsett, H.; Landbo, A.-K. R.; Meyer, A. S.; Mølgaard, P., Synergistic Antioxidative Effects of Alkamides, Caffeic Acid Derivatives, and Polysaccharide Fractions from *Echinacea purpurea* on in Vitro Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53* (24), 9413-9423.
81. Greger, H., Alkamides: structural relationships, distribution and biological activity. *Planta medica* **1984**, *50* (5), 366-75.

82. Strunz, G. M., Unsaturated Amides from Piper Species: Exploring the scope of recent methodology. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta ur, R., Ed. Elsevier: 2000; Vol. 24, pp 683-738.
83. Choi, S. H.; Suh, B. S.; Kozukue, E.; Kozukue, N.; Levin, C. E.; Friedman, M., Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54* (24), 9024-31.
84. Tsunozaki, M.; Lennertz, R. C.; Vilceanu, D.; Katta, S.; Stucky, C. L.; Bautista, D. M., A 'toothache tree' alkylamide inhibits Adelta mechanonociceptors to alleviate mechanical pain. *The Journal of physiology* **2013**, *591* (Pt 13), 3325-40.
85. Rios, M. Y.; Olivo, H. F., Chapter 3 - Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta ur, R., Ed. Elsevier: 2014; Vol. Volume 43, pp 79-121.
86. Barbosa, A. F.; Carvalho, M. G. d.; Smith, R. E.; Sabaa-Srur, A. U. O., Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2016**, *26*, 128-133.
87. Ogura, M.; Cordell, G. A.; Quinn, M. L.; Leon, C.; Benoit, P. S.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R., Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem--oral use of *Heliopsis longipes*--by means of a multidisciplinary approach. *Journal of ethnopharmacology* **1982**, *5* (2), 215-9.
88. Acosta-Madrid, I. I.; Castañeda-Hernández, G.; Cilia-López, V. G.; Cariño-Cortés, R.; Pérez-Hernández, N.; Fernández-Martínez, E.; Ortiz, M. I., Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phytomedicine* **2009**, *16* (4), 336-341.
89. Hernández, I.; Márquez, L.; Martínez, I.; Dieguez, R.; Delporte, C.; Prieto, S.; Molina-Torres, J.; Garrido, G., Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. *Journal of ethnopharmacology* **2009**, *124* (3), 649-652.
90. Cilia-Lopez, V. G.; Juarez-Flores, B. I.; Aguirre-Rivera, J. R.; Reyes-Aguero, J. A., Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharmaceutical biology* **2010**, *48* (2), 195-200.

91. Deciga-Campos, M.; Rios, M. Y.; Aguilar-Guadarrama, A. B., Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta medica* **2010**, *76* (7), 665-70.
92. Allameh, A.; Saxena, M.; Biswas, G.; Raj, H. G.; Singh, J.; Srivastava, N., Piperine, a plant alkaloid of the piper species, enhances the bioavailability of aflatoxin B1 in rat tissues. *Cancer letters* **1992**, *61* (3), 195-9.
93. Singh, A.; Duggal, S., Piperine-review of advances in pharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* **2009**, *2* (3), 615-620.
94. Srinivasan, K., Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. *Critical reviews in food science and nutrition* **2007**, *47* (8), 735-48.
95. Salam, O. M. E. A.; EL-Shenawy, S.; Nofal, S. M.; Gy, M., Piperine Inhibits Visceral Pain Caused by Acetic Acid in Mice. *J. Pharmacol. Toxicol* **2007**, *2*, 456-464.
96. Correa, E. A.; Högestätt, E. D.; Sterner, O.; Echeverri, F.; Zygmunt, P. M., In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (9), 3299-3306.
97. Szallasi, A., Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice. *Trends in Pharmacological Sciences* **2005**, *26* (9), 437-439.
98. Malmberg, A. B. B., Keith R, *Turning up the Heat on Pain: TRPV1 Receptors in Pain and Inflammation*. Birkhäuser Verlag: Switzerland, 2005.
99. Ramsey, I. S.; Delling, M.; Clapham, D. E., An introduction to TRP channels. *Annual review of physiology* **2006**, *68*, 619-47.
100. Liao, M.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng, Y., Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **2013**, *504* (7478), 107-12.
101. Jara-Oseguera, A.; Simon, S. A.; Rosenbaum, T., TRPV1: ON THE ROAD TO PAIN RELIEF. *Current molecular pharmacology* **2008**, *1* (3), 255-269.
102. Hazan, A.; Kumar, R.; Matzner, H.; Priel, A., The pain receptor TRPV1 displays agonist-dependent activation stoichiometry. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 12278.

103. Touska, F.; Marsakova, L.; Teisinger, J.; Vlachova, V., A "cute" desensitization of TRPV1. *Current pharmaceutical biotechnology* **2011**, *12* (1), 122-9.
104. Bormann, J., The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **2000**, *21* (1), 16-19.
105. Smith, T. A., Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *British journal of biomedical science* **2001**, *58* (2), 111-21.
106. Enna, S. J.; McCarson, K. E., The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **2006**, *54*, 1-27.
107. Jarvis, M. F.; Boyce-Rustay, J. M., Neuropathic pain: models and mechanisms. *Current pharmaceutical design* **2009**, *15* (15), 1711-6.
108. Jaggi, A. S.; Jain, V.; Singh, N., Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2011**, *25* (1), 1-28.
109. Wall, P. D.; Devor, M.; Inbal, R.; Scadding, J. W.; Schonfeld, D.; Seltzer, Z.; Tomkiewicz, M. M., Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* **1979**, *7* (2), 103-11.
110. Bennett, G. J.; Xie, Y. K., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **1988**, *33* (1), 87-107.
111. Seltzer, Z.; Dubner, R.; Shir, Y., A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **1990**, *43* (2), 205-18.
112. Kim, S. H.; Chung, J. M., An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **1992**, *50* (3), 355-63.
113. Carlton, S. M.; Lekan, H. A.; Kim, S. H.; Chung, J. M., Behavioral manifestations of an experimental model for peripheral neuropathy produced by spinal nerve ligation in the primate. *Pain* **1994**, *56* (2), 155-66.
114. Lee, B. H.; Won, R.; Baik, E. J.; Lee, S. H.; Moon, C. H., An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *Neuroreport* **2000**, *11* (4), 657-61.

115. Chacur, M.; Milligan, E. D.; Gazda, L. S.; Armstrong, C.; Wang, H.; Tracey, K. J.; Maier, S. F.; Watkins, L. R., A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain* **2001**, *94* (3), 231-44.
116. Authier, N.; Gillet, J. P.; Fialip, J.; Eschalier, A.; Coudore, F., A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* **2003**, *24* (6), 797-805.
117. Courteix, C.; Eschalier, A.; Lavarenne, J., Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* **1993**, *53* (1), 81-8.
118. Krohel, G. B.; Richardson, J. R.; Farrell, D. F., Herpes simplex neuropathy. *Neurology* **1976**, *26* (6 PT 1), 596-597.
119. van Hecke, O.; Austin, S. K.; Khan, R. A.; Smith, B. H.; Torrance, N., Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* **2014**, *155* (4), 654-62.
120. Zimmermann, M., Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **1983**, *16* (2), 109-10.
121. *Pain Research: Methods and Protocols*. 1st ed.; Humana Press: New Jersey, USA, 2004.
122. Chaplan, S. R.; Bach, F. W.; Pogrel, J. W.; Chung, J. M.; Yaksh, T. L., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods* **1994**, *53* (1), 55-63.
123. Leem, J. W.; Willis, W. D.; Chung, J. M., Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *Journal of neurophysiology* **1993**, *69* (5), 1684-99.
124. Dixon, W. J., Efficient analysis of experimental observations. *Annual review of pharmacology and toxicology* **1980**, *20*, 441-62.
125. Dickenson, A. H.; Dray, A., Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. *British journal of pharmacology* **1991**, *104* (4), 1045-1049.
126. Zhang, W.; Liu, Y.; Zhao, X.; Gu, X.; Ma, Z., The effect of intrathecal administration TRPA1 antagonists in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesia and analgesia* **2014**, *119* (1), 179-85.

127. Ding, J.; Zhang, J. R.; Wang, Y.; Li, C. L.; Lu, D.; Guan, S. M.; Chen, J., Effects of a non-selective TRPC channel blocker, SKF-96365, on melittin-induced spontaneous persistent nociception and inflammatory pain hypersensitivity. *Neuroscience bulletin* **2012**, *28* (2), 173-81.
128. John, J. M.; Kaneko, M.; Hammond, D. L., Intrathecal bicuculline does not increase formalin-induced inflammation. *Brain research* **1998**, *794* (2), 320-4.
129. Tallarida, R. J., *Drug synergism and dose-effect data analysis*. Chapman Hall/CRC Press: Boca Raton, 2000.
130. Nakatani, N.; Nagashima, M., Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1992**, *56* (5), 759-762.
131. Sciences, R.-C. U. L. Conducta asociada al dolor en rata. <https://www.humane-endpoints.info/es/rata/conducta-asociada-al-dolor> (accessed 24-07-2017).
132. Siddiqui, B. S.; Begum, S.; Gulzar, T.; Farhat; Noor, F., An amide from fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* **1997**, *45* (8), 1617-1619.
133. Epstein, W. W.; Netz, D. F.; Seidel, J. L., Isolation of piperine from black pepper. *Journal of Chemical Education* **1993**, *70* (7), 598.
134. Gorgani, L.; Mohammadi, M.; Najafpour, G. D.; Nikzad, M., Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2017**, *16* (1), 124-140.
135. Saha, K. C.; Seal, H. P.; Noor, M. A., *Isolation and characterization of piperine from the fruits of black pepper (Piper nigrum)*. 2014; Vol. 11.
136. Bae, S. S.; Ehrmann, B. M.; Etefagh, K. A.; Cech, N. B., A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochemical analysis : PCA* **2010**, *21* (5), 438-43.
137. Castro-Ruiz, J. E.; Rojas-Molina, A.; Luna-Vázquez, F. J.; Rivero-Cruz, F.; García-Gasca, T.; Ibarra-Alvarado, C., Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis longipes*, Induces Vasodilation via Activation of Gasotransmitters and Prostacyclin Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (1), 218.

138. Lau, F. H.; Chung, K. C., Silas Weir Mitchell, MD: the physician who discovered causalgia. *The Journal of hand surgery* **2004**, *29* (2), 181-7.
139. Cuenca González, C.; Flores Torres, M. I.; Méndez Saavedra, K. V.; Barca Fernández, I.; Alcina Navarro, A.; Villena Ferrer, A., Síndrome Doloroso Regional Complejo. *Revista Clínica de Medicina de Familia* **2012**, *5*, 120-129.
140. Schwartzman, R. J.; Alexander, G. M.; Grothusen, J., Pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Expert review of neurotherapeutics* **2006**, *6* (5), 669-81.
141. Taylor, C. P.; Angelotti, T.; Fauman, E., Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy research* **2007**, *73* (2), 137-50.
142. Verma, V.; Singh, N.; Singh Jaggi, A., Pregabalin in Neuropathic Pain: Evidences and Possible Mechanisms. *Current Neuropharmacology* **2014**, *12* (1), 44-56.
143. Martignoni, M.; Groothuis, G.; de Kanter, R., Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2006**, *34* (6), 1047-54.
144. Navarrete, A.; Hong, E., Anthelmintic properties of alpha-sanshool from *Zanthoxylum liebmannianum*. *Planta medica* **1996**, *62* (3), 250-1.
145. Rosa-Lugo, V.; Acevedo-Quiroz, M.; Déciga-Campos, M.; Rios, M. Y., Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2017**, *69* (7), 884-895.
146. Bang, J. S.; Oh da, H.; Choi, H. M.; Sur, B. J.; Lim, S. J.; Kim, J. Y.; Yang, H. I.; Yoo, M. C.; Hahm, D. H.; Kim, K. S., Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis research & therapy* **2009**, *11* (2), R49.
147. Rang, H. P., The receptor concept: pharmacology's big idea. *British journal of pharmacology* **2006**, *147* (Suppl 1), S9-S16.

148. Zhang, H. M.; Chen, S. R.; Cai, Y. Q.; Richardson, T. E.; Driver, L. C.; Lopez-Berestein, G.; Pan, H. L., Signaling mechanisms mediating muscarinic enhancement of GABAergic synaptic transmission in the spinal cord. *Neuroscience* **2009**, *158* (4), 1577-88.
149. Christoph, T.; Bahrenberg, G.; De Vry, J.; Englberger, W.; Erdmann, V. A.; Frech, M.; Kogel, B.; Rohl, T.; Schiene, K.; Schroder, W.; Seibler, J.; Kurreck, J., Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. *Molecular and cellular neurosciences* **2008**, *37* (3), 579-89.
150. McNamara, F. N.; Randall, A.; Gunthorpe, M. J., Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *British journal of pharmacology* **2005**, *144* (6), 781-790.
151. Correa, E. A.; Hogestatt, E. D.; Sterner, O.; Echeverri, F.; Zygmunt, P. M., In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18* (9), 3299-306.
152. Gwak, Y. S.; Hulsebosch, C. E., GABA and Central Neuropathic Pain following Spinal Cord Injury. *Neuropharmacology* **2011**, *60* (5), 799-808.
153. Hwang, J. H.; Yaksh, T. L., The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* **1997**, *70* (1), 15-22.
154. Zaugg, J.; Baburin, I.; Strommer, B.; Kim, H. J.; Hering, S.; Hamburger, M., HPLC-based activity profiling: discovery of piperine as a positive GABA(A) receptor modulator targeting a benzodiazepine-independent binding site. *Journal of natural products* **2010**, *73* (2), 185-91.
155. Khom, S.; Strommer, B.; Schoffmann, A.; Hintersteiner, J.; Baburin, I.; Erker, T.; Schwarz, T.; Schwarzer, C.; Zaugg, J.; Hamburger, M.; Hering, S., GABAA receptor modulation by piperine and a non-TRPV1 activating derivative. *Biochem Pharmacol* **2013**, *85* (12), 1827-36.
156. Okumura, Y.; Narukawa, M.; Iwasaki, Y.; Ishikawa, A.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M.; Watanabe, T., Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. *Biosci Biotechnol Biochem* **2010**, *74* (5), 1068-72.
157. Nassini, R.; Materazzi, S.; Benemei, S.; Geppetti, P., The TRPA1 channel in inflammatory and neuropathic pain and migraine. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **2014**, *167*, 1-43.

158. Ruparel, N. B.; Patwardhan, A. M.; Akopian, A. N.; Hargreaves, K. M., Desensitization of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) by the TRP Vanilloid 1-Selective Cannabinoid Arachidonoyl-2 Chloroethanolamine. *Molecular Pharmacology* **2011**, *80* (1), 117-123.

13. ANEXOS

ANEXO I. Carta de aprobación del presente estudio por el CICUAL Facultad de Química.



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

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Presente

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

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

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

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

APROBADO

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
"POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 7 de marzo del 2017


M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente


Dra. Ma. Elena Bravo Gómez
Secretaria

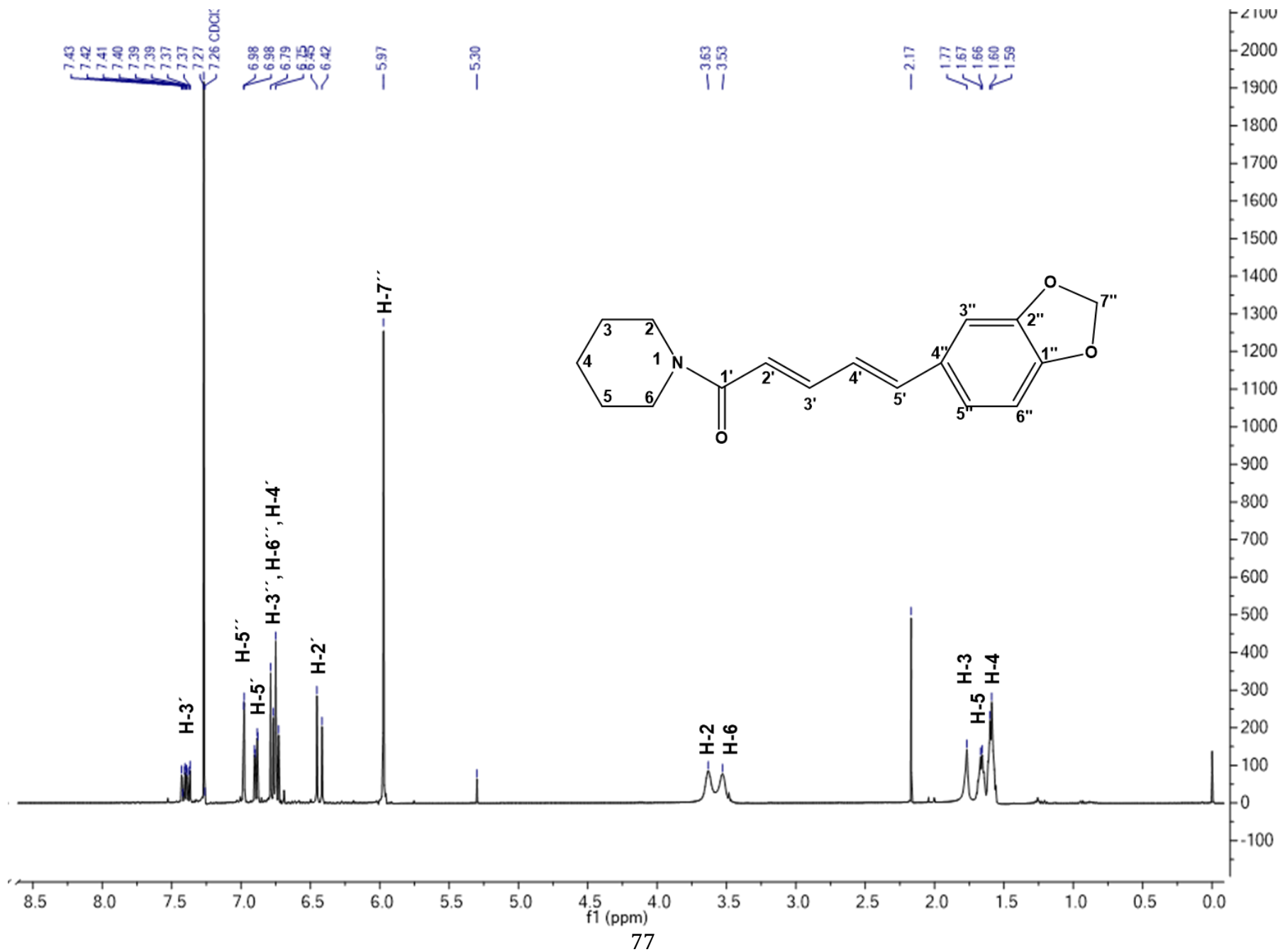
c.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaria Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.

ANEXO II. Tabla de Dixon para los valores de κ con base en el patrón de respuesta

Values for k , based on response pattern

| Pattern | Value for k | Pattern | Value for k | Pattern | Value for k | Pattern | Value for k |
|----------|---------------|----------|---------------|-----------|---------------|------------|---------------|
| OX | -0.5 | OOOXOOOO | -0.547 | XO | 0.5 | XXXOXXXX | 0.547 |
| OOX | -0.388 | OOOXOOOO | -0.547 | X XO | 0.388 | XXXOXOXXX | 0.547 |
| OOOX | -0.378 | OXOOOX | -1.25 | XXXO | 0.378 | XOXXXX | 1.25 |
| OOOOX | -0.377 | OOXOOOX | -1.247 | XXXXO | 0.377 | XXOXXXO | 1.247 |
| OXO | 0.842 | OOOXOOOX | -1.246 | XOX | -0.842 | XXXOXXXO | 1.246 |
| OOXO | 0.89 | OOOXOOOX | -1.246 | XXOX | -0.89 | XXXOXOXXXO | 1.246 |
| OOOXO | 0.894 | OXOOXO | 0.372 | XXXOX | -0.894 | XOXXOX | -0.372 |
| OOOOXO | 0.894 | OOXOOXO | 0.38 | XXXXOX | -0.894 | XXOXXOX | -0.38 |
| OXX | -0.178 | OOOXOOXO | 0.381 | XOO | 0.178 | XXXOXXOX | -0.381 |
| OOXX | 0 | OOOXOOXO | 0.381 | XXOO | 0 | XXXOXOXXO | -0.381 |
| OOOXX | 0.026 | OXOXX | -0.169 | XXXOO | -0.026 | XOXXOO | 0.169 |
| OOOOXX | 0.028 | OOXOXX | -0.144 | XXXXOO | -0.028 | XXOXXOO | 0.144 |
| OXOO | 0.299 | OOOXOXX | -0.142 | XOXX | -0.299 | XXXOXXOO | 0.142 |
| OOXOO | 0.314 | OOOXOXX | -0.142 | XXOXX | -0.314 | XXXOXOXXO | 0.142 |
| OOOXOO | 0.315 | OXOXOO | 0.022 | XXXOXX | -0.315 | XOXOXX | -0.022 |
| OOOOXOO | 0.315 | OOXOXOO | 0.039 | XXXXOXX | -0.315 | XXOXXOXX | -0.039 |
| OXOX | -0.5 | OOOXOXOO | 0.04 | XOXO | 0.5 | XXXOXOXX | -0.04 |
| OOXOX | -0.439 | OOOXOXOO | 0.04 | XXOXO | 0.439 | XXXOXOXX | -0.04 |
| OOOXOX | -0.432 | OXOXOX | -0.5 | XXXOXO | 0.432 | XOXOXO | 0.5 |
| OOOOXOX | -0.432 | OOXOXOX | -0.458 | XXXXOXO | 0.432 | XXOXOXO | 0.458 |
| OXXO | 1 | OOOXOXOX | -0.453 | XOOX | -1 | XXXOXOXO | 0.453 |
| OOXXO | 1.122 | OOOXOXOX | -0.453 | XXOOX | -1.122 | XXXOXOXO | 0.453 |
| OOOXO | 1.139 | OXOXO | 1.169 | XXXOXX | -1.139 | XOXOXX | -1.169 |
| OOOOXO | 1.14 | OOOXO | 1.237 | XXXXOXX | -1.14 | XXOXOXX | -1.237 |
| OXXX | 0.194 | OOOXOXXO | 1.247 | XOOO | -0.194 | XXXOXOXX | -1.247 |
| OOXXX | 0.449 | OOOXOXXO | 1.248 | XXOOO | -0.449 | XXXOXOXX | -1.248 |
| OOOXXX | 0.5 | OXOXXX | 0.611 | XXXOOO | -0.5 | XOXOOO | 0.611 |
| OOOOXXX | 0.506 | OOXOXXX | 0.732 | XXXXOOO | -0.506 | XXOXOOO | -0.732 |
| OXOOO | -0.157 | OOOXOXXX | 0.756 | XOXXX | 0.157 | XXXOXOOO | -0.756 |
| OOXOOO | -0.154 | OOOXOXXX | 0.758 | XXOXXX | 0.154 | XXXOXOXXXO | -0.758 |
| OOOXOOO | -0.154 | OXOXXX | -0.296 | XXXOXXX | 0.154 | XOXXX | 0.296 |
| OOOXOXXX | -0.154 | OOXXOXXX | -0.266 | XXXOXOXXX | 0.154 | XXOXXX | 0.266 |
| OXOXX | -0.878 | OOOXOXXX | -0.263 | XOXXX | 0.878 | XXXOXXX | 0.263 |
| OOXOXX | -0.861 | OOOXOXXX | -0.263 | XXOXXX | 0.861 | XXXOXXX | 0.263 |
| OOOXOXX | -0.86 | OXOXXX | -0.831 | XXXOXXX | 0.86 | XOXXX | 0.831 |
| OOOOXOXX | -0.86 | OOXXOXX | -0.763 | XXXXOXXX | 0.86 | XXOXXX | 0.763 |
| OXOXO | 0.701 | OOOXOXX | -0.753 | XOXXX | -0.701 | XXXOXXX | 0.753 |
| OOXOXO | 0.737 | OOOXOXX | -0.752 | XXOXXX | -0.737 | XXXOXXX | 0.752 |
| OOOXOXO | 0.741 | OXOXXX | 0.831 | XXXOXXX | -0.741 | XOXXX | -0.831 |
| OOOXOXO | 0.741 | OOXXOXX | 0.935 | XXXXOXXX | -0.741 | XXOXXX | -0.935 |
| OXOXX | 0.084 | OOOXOXX | 0.952 | XOXXX | -0.084 | XXXOXXX | -0.952 |
| OOXOXX | 0.169 | OOOXOXX | 0.954 | XXOXXX | -0.169 | XXXOXXX | -0.954 |
| OOOXOXX | 0.181 | OXOXXX | 0.296 | XXXOXXX | -0.181 | XOXXX | -0.296 |
| OOOXOXX | 0.182 | OOXXOXX | 0.463 | XXXXOXXX | -0.182 | XXOXXX | -0.463 |
| OXXOO | 0.305 | OOOXOXX | 0.5 | XOXXX | -0.305 | XXXOXXX | -0.5 |
| OOXXOO | 0.372 | OOOXOXX | 0.504 | XXOXXX | -0.372 | XXXOXXX | -0.504 |
| OOOXOO | 0.38 | OXOXXX | 0.5 | XXXOXXX | -0.38 | XOXXX | -0.5 |
| OOOXOXX | 0.381 | OOXXOXX | 0.648 | XXXXOXXX | -0.381 | XXOXXX | -0.648 |
| OXXOX | -0.305 | OOOXOXX | 0.678 | XOXXX | 0.305 | XXXOXXX | -0.678 |
| OOXXOX | -0.169 | OOOXOXX | 0.681 | XXOXXX | 0.169 | XXXOXXX | -0.681 |
| OOOXOX | -0.144 | OXOXXX | -0.043 | XXXOXXX | 0.144 | XOXXX | 0.043 |
| OOOXOXX | -0.142 | OOXXOXX | 0.187 | XXXXOXXX | 0.142 | XXOXXX | -0.187 |
| OXXXO | 1.288 | OOOXOXX | 0.244 | XOXXX | -1.288 | XXXOXXX | -0.244 |
| OOXXXO | 1.5 | OOOXOXX | 0.252 | XXOXXX | -1.5 | XXXOXXX | -0.252 |
| OOOXOXX | 1.544 | OXOXXX | 1.603 | XXXOXXX | -1.544 | XOXXX | -1.603 |
| OOOXOXX | 1.549 | OOXXOXX | 1.917 | XXXXOXXX | -1.549 | XXOXXX | -1.917 |
| OXXXX | 0.555 | OOOXOXX | 2 | XOXXX | -0.555 | XXXOXXX | -2 |
| OOXXXX | 0.897 | OOOXOXXX | 2.014 | XXOXXX | -0.897 | XXXOXXX | -2.014 |
| OOOXOXX | 0.985 | OXOXXX | 0.893 | XXXOXXX | -0.985 | XOXXX | -0.983 |
| OOOXOXXX | 1 | OOOXOXXX | 1.329 | XXXXOXXX | -1 | XXOXXX | -1.329 |
| OXOOO | -0.547 | OOOXOXXX | 1.465 | XOXXX | 0.547 | XXXOXXX | -1.465 |
| OOXOOO | -0.547 | OOOXOXXX | 1.496 | XXOXXX | 0.547 | XXXOXXX | -1.496 |

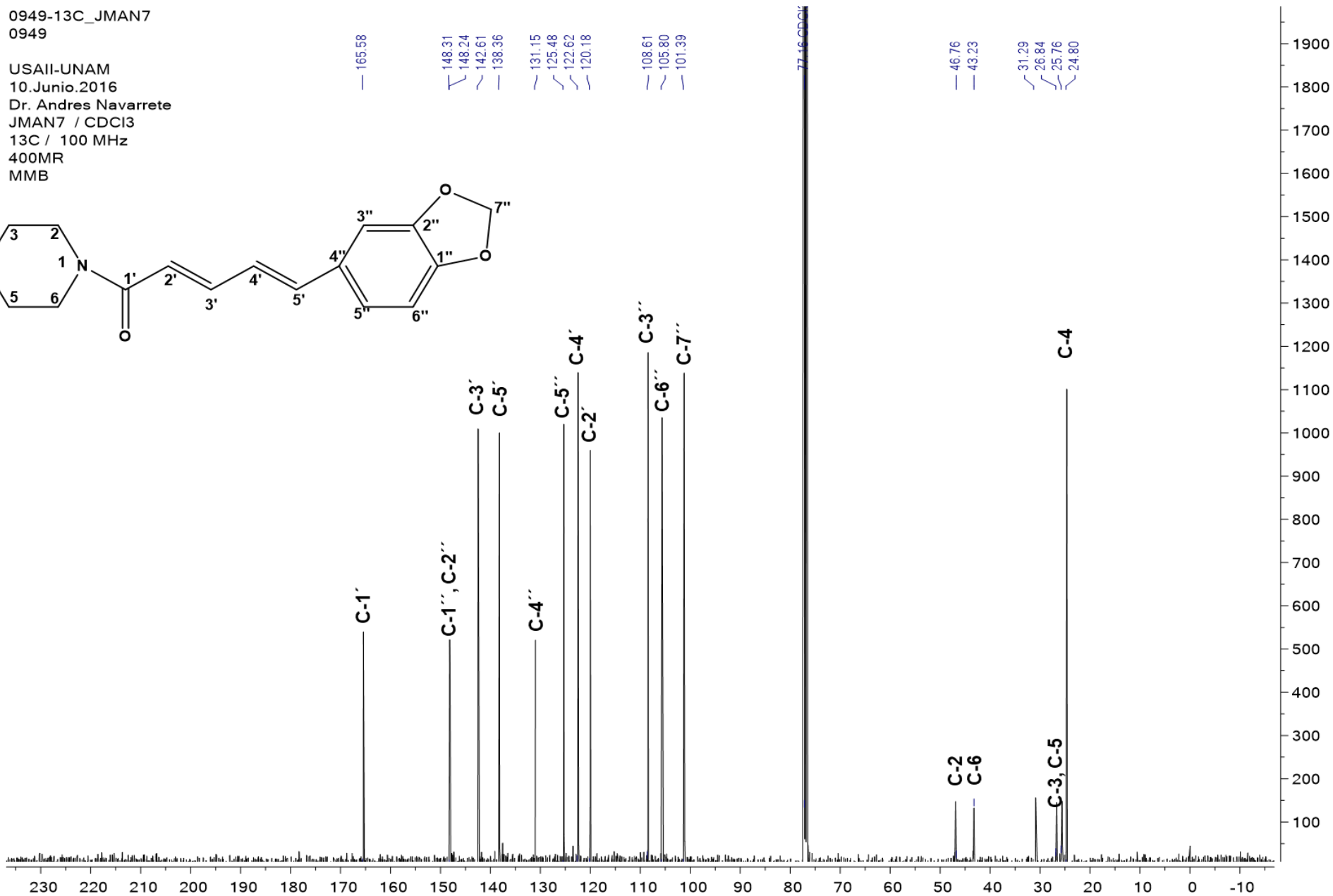
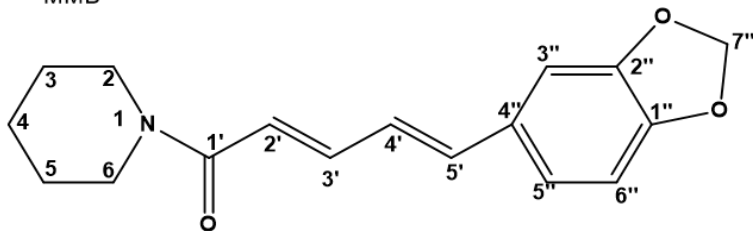
ANEXO III. Espectro RMN ¹H de Piperina



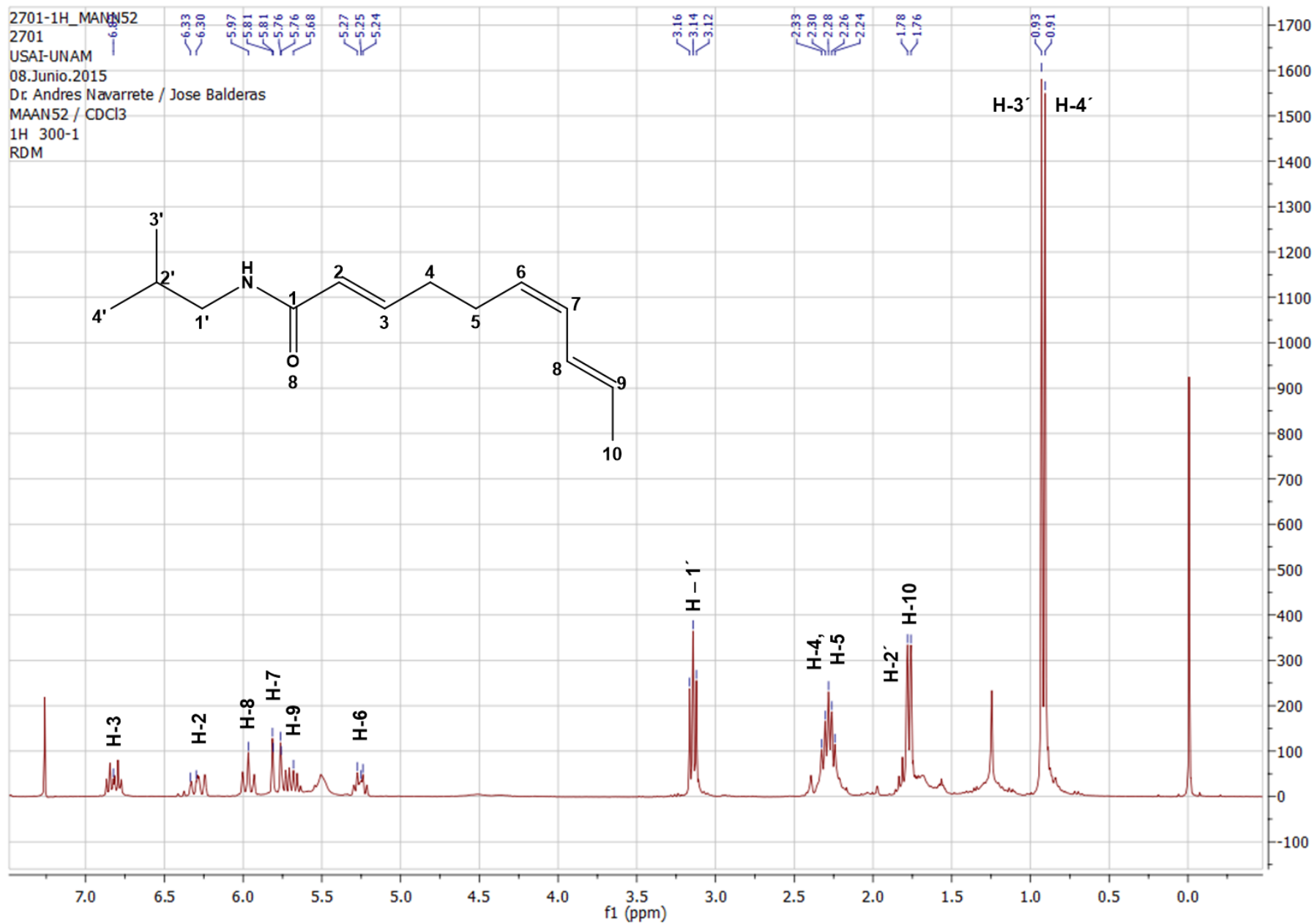
ANEXO IV. Espectro RMN ¹³C de Piperina

0949-13C_JMAN7
0949

USAII-UNAM
10.Junio.2016
Dr. Andres Navarrete
JMAN7 / CDCl₃
13C / 100 MHz
400MR
MMB



ANEXO V. Espectro RMN ¹H de Afinina



ANEXO VI. Espectro RMN ¹³C de Afinina

