

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA

**DISEÑO MOLECULAR IN SILICO DE UN ANESTÉSICO
LOCAL A PARTIR DEL METABOLITO ESPILANTOL
PRESENTE EN LA PLANTA *ACMELLA OLERACEA*
(*ASTERACEAE*) COMO AGONISTA NOCICEPTIVO DE
LA PROTEÍNA TRPV1**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA
EN FARMACIA**

Luis Diego Zúñiga Rojas

Tutor:

Msc. Dennis Jimenez Vargas

Lector:

Dr. Marco Vinicio Mejía Soto

San José, Diciembre, 2017

Contenido

Contenido.....	12
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	17
Planteamiento del problema.....	17
Hipótesis	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	18
Justificación	19
Antecedentes	22
Proyecciones	28
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	29
Generalidades del dolor	29
Definición de dolor	29
Fisiopatología del dolor	30
Tipos de dolor	31
Generalidades de los anestésicos locales	32
Clasificación de los anestésicos locales	33
Aplicaciones de los anestésicos locales	34
Ventajas y desventajas de la adición de un vasoconstrictor al anestésico local.....	35
Mecanismo de acción de los anestésicos locales	36
Farmacocinética de los anestésicos locales.....	37
Dosis de los anestésicos locales	39
Reacciones adversas de los anestésicos locales	40
Toxicidad de los anestésicos locales	41
Prevención de toxicidades de los anestésicos locales	42
Generalidades del espilantol	43
Descripción botánica de la planta que sintetiza el espilantol	43
Usos tradicionales de la <i>Acmella oleracea</i>	45
Principales metabolitos de la <i>Acmella oleracea</i>	45
Actividad biológica de los metabolitos productos por <i>Acmella oleracea</i>	46
Toxicidad del espilantol	50
Generalidades del receptor TRPV1.....	51

Descripción del receptor	51
Clasificación y tipos de receptores.....	51
Mecanismo de acción analgésico del receptor TRPV1	53
Mecanismo de acción anestésico del receptor TRPV1	54
Efectos termnociceptivos del receptor TRPV1	54
Generalidades del cribado virtual	55
Descripción del cribado virtual o <i>screening</i> virtual	55
<i>Scoring</i> o puntuación del acople molecular	58
Desarrollo de moléculas <i>hits</i> y <i>leads</i>	58
Acoplamiento molecular (<i>docking</i>) basado en <i>screening virtual</i>	60
Propiedades fisicoquímicas utilizadas como descriptores moleculares	61
Indicadores del acople molecular: energía libre de Gibbs	63
CAPÍTULO 3. MARCO METODOLÓGICO	65
Enfoque.....	65
Diseño	65
Objetos de investigación	65
Variables	66
Instrumentos de recolección de información	69
Procedimiento de recolección y análisis de los datos	69
Fase I. Diseño del ligando.....	69
Fase II. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los derivados.....	70
Fase III. Anclaje molecular.....	70
Fase IV. Proceso de optimización de la molécula <i>hit</i>	71
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	72
Biblioteca virtual de compuestos	72
Diseño de la biblioteca molecular.....	72
Propiedades fisicoquímicas de las moléculas incluidas en la biblioteca virtual	74
Masa molar.....	76
Coeficiente de reparto (LogP).....	78
Área polar superficial (APS).....	79
Refractividad molar	80
Donadores y aceptores de hidrógenos.....	81

	14
Enlaces rotables	82
Cantidad de átomos pesados	83
Número de anillos	84
Cumplimiento de los filtros	85
Selección del objetivo macromolecular (receptor)	87
<i>Scoring</i>	90
Análisis del acople molecular entre la macromolécula TRPV1 y el diseño 66	93
Optimización del diseño 66 como molécula <i>hit</i>	95
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	101
Conclusiones	101
Recomendaciones	102
Referencias.....	103

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de dolor (modificado a partir de Puebla, 2005)	31
---	----

Tabla 2. Acciones farmacológicas de la <i>Acmella oleracea</i>	47
Tabla 3. Clasificación de los receptores TRP	52
Tabla 4. Definición de los descriptores moleculares	62
Tabla 5. Variables	66
Tabla 6. Resultados del tratamiento estadísticos en los parámetros fisicoquímicos.....	75
Tabla 7. Rangos establecidos para Masa Molecular.	76
Tabla 8. Rangos establecidos para LogP	78
Tabla 9. Rangos establecidos para área polar superficial	79
Tabla 10. Rangos establecidos para donares y aceptores de hidrógeno	81
Tabla 11. Rangos establecidos para enlaces rotables.....	83
Tabla 12. Rango establecido para la cantidad de anillos	84
Tabla 13. Energía de unión para los diseños moleculares seleccionados de la biblioteca virtual.	91
Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas del diseño 66 y la lidocaína.....	95
Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas y energía de unión del diseño 66.....	98
Tabla 16. Distancias de enlace del diseño 66 y diseño 66 optimizado	99

Índice de figuras

Figura 1. Principales anestésicos locales de tipo éster y amida.....	34
--	----

Figura 2 Ilustración de la <i>Acmella oleracea</i>	44
Figura 3. Estructuras orgánicas bidimensionales de la lidocaína y el espilantol	45
Figura 4. Estructura de la TRPV1 de <i>Rattus norvegicus</i>	53
Figura 5. Clasificación de los diseños moleculares	57
Figura 6. Estructura tridimensional del espilantol proyectada en Chimera	73
Figura 7. Subunidades estudiadas en el diseño de anestésicos locales	74
Figura 8. Cantidad de moléculas desarrolladas en esta investigación que cumplen con los filtros de masa molecular	77
Figura 9. Cantidad de moléculas desarrolladas en esta investigación que cumplen con los filtros de Log P	78
Figura 10. Cantidad de moléculas desarrolladas en esta investigación que cumplen los distintos filtros de selección.....	86
Figura 11. Sitio de unión del objetivo macromolecular utilizando Chimera.....	88
Figura 12. Gridbox de la macromolécula TRPV1 preparada.	89
Figura 13. Regiones farmacofóricas de la capsaicina y la L-Muralatina.....	89
Figura 14. Sitio de unión de la L-muralatina con residuos claves de la estructura de TRPV1.	90
Figura 15. Distancias de enlaces entre residuos involucrados y el diseño 66. ($\Delta G = -7.90$ kcal/mol).....	95
Figura 16. Estructura tridimensional del diseño 66 y el diseño 66 optimizado proyectado en Chimera	97
Figura 17. Distancias de enlaces entre residuos involucrados y el diseño 66 optimizado. ($\Delta G = -7.30$ kcal/mol).....	99

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Las intoxicaciones sistémicas causadas por anestésicos locales conllevan al riesgo de un difícil manejo del control vital y reincorporación del paciente, pudiendo haber inclusive consecuencias mortales; por lo tanto, es necesario contar con un protocolo de prevención para evitar los efectos más alarmantes, como son los accidentes cardiorrespiratorios y la alta toxicidad cardíaca y neurológica. Además, esto hace pensar que no en todos los centros de salud, clínicas dentales o instituciones hospitalarias se cuenta con las medidas adecuadas en una emergencia, aún en pacientes sanos (Valencia y Silvia, 2013).

Dada esta necesidad se plantea la posibilidad de optar por terapias alternativas, con la factibilidad de compararse con medicamentos comercializados como lidocaína, benzocaína y bupivacaína. Por lo tanto, es de importancia prever estrategias para disminuir efectos adversos fisiológicos como bradicardia, cefalea, parestesia, eritemas, entre otros. Una estrategia es evitar la administración excesiva del anestésico local o fármacos innovadores que utilicen mecanismos de acción mediados en la vía anestésica (Freitas-Blanco *et al.* 2016; Andrade *et al.*, 2013).

Por lo anterior, descubrir compuestos con una amplia gama de efectos farmacológicos es esencial para el desarrollo de medicamentos. Al respecto, el espilantol es un derivado de la planta *Spilanthes acmella* y en los últimos años se ha estudiado su potencial efecto para ejercer anestesia local. Así mismo, el espilantol utiliza un mecanismo de acción termonociceptivo, a través del agonismo de una proteína perteneciente a la superfamilia de canales iónicos TRP, la cual muestra viabilidad para alcanzar analgesia y anestesia en pruebas preclínicas con animales (Gomtsyan *et al.*, 2015).

Según Kar y Roy (2013), en las últimas décadas el *screening* o cribado virtual se convierte en una herramienta esencial para el rápido descubrimiento de fármacos, por medio del diseño molecular y la optimización del fármaco a un bajo costo. Sin embargo, se requieren grandes bases de datos con información actualizada sobre el receptor y ligando, así como

programas informáticos que permitan un preciso análisis de las características fisicoquímicas de la molécula en diseño y del acople y la conformación tridimensional de la proteína estudiada (Kar y Roy, 2013).

Entonces, el uso de base de datos, artículos científicos y tesis universitarias como fuentes de información bibliográfica y el empleo de programas informativos son indispensables a lo largo de esta investigación para dar soporte y argumentar los distintos aspectos del desarrollo y modelaje de un nuevo fármaco. Ante el panorama propuesto, el autor de esta investigación se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es la viabilidad de una molécula diseñada a partir del espilantol como agonista de la proteína TRPV1 para el uso analgésico y anestésico en circunstancias quirúrgicas y postoperatorias?

Hipótesis

Un agonista diseñado a partir del espilantol de la proteína TRPV1 tiene gran viabilidad para el uso quirúrgico y postoperatorio al presentar efectos anestésicos.

Objetivo general

Modelar un agonista para la proteína TRPV1 por medio de un cribado virtual del metabolito espilantol y algunos de sus derivados, mediante el diseño molecular *in silico* de un potencial anestésico local.

Objetivos específicos

Diseñar una biblioteca virtual de cien derivados del metabolito espilantol utilizando un método *in silico*.

Determinar la molécula de la biblioteca virtual previamente diseñada con mayor acople a la proteína TRPV1, considerando las características de un fármaco prototipo.

Optimizar la molécula seleccionada para alcanzar una mejor interacción con TRPV1.

Justificación

Los anestésicos locales son fármacos utilizados para evitar el dolor en diferentes prácticas clínicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014), hace referencia a su uso en intervenciones odontológicas, quirúrgicas y cualquier otro uso de los anestésicos locales que conllevan el bloqueo nervioso. A lo largo de la vida se experimenta en mayor o menor medida sensaciones desagradables de dolor como consecuencia de enfermedades o traumas. No obstante, la interpretación del dolor es una experiencia subjetiva y su tratamiento debe ser estudiado individualmente. (Ministerio de Salud de Nicaragua, 2014)

De acuerdo al informe presentado por el *Global State of Pain Treatment* (2011), se estima que unas 33 millones de personas sufren dolor intenso e innecesario por falta de tratamiento paliativo. Por otro lado, el estudio revela que alrededor del 80% de la población mundial que presenta dolor intenso o moderado tienen un acceso insuficiente o nulo a algún tratamiento, incluyendo pacientes con VIH/SIDA y cáncer terminal. Así bien, la Fundación Grünethal, de Universidad de Salamanca (2011) menciona que más de 25 millones de personas sufren dolor agudo por un mal tratamiento y control de las lesiones o cirugías realizadas.

Actualmente la farmacología del dolor abarca gran variedad de fármacos para su tratamiento, como lo son los analgésicos opioides, anestésicos locales y los AINEs. Según Morón (2008) es importante reconocer el tipo de dolor al que se está enfrentando, para dar una adecuada indicación farmacológica. Se distinguen 3 tipos distintos de dolor, el nociceptivo (de origen somático y visceral), idiopático (de causa desconocida) y neuropático (atribuido a un trauma central o periférico). El dolor también se puede clasificar según su intensidad (leve, moderada o severa) y por su duración (agudo o crónico).

Por lo tanto, el uso de los anestésicos locales se asocia en la mayoría de los casos al dolor agudo o de corto tiempo, el cual podría ser causado por las intervenciones quirúrgicas perioperatorias (en el momento de la cirugía) y/o postoperatorias (después de la cirugía), así

como el alivio sintomático del dolor neuropático causado por herpes zóster (Davies y Galer, 2004). La administración de anestésicos locales es indispensable en la práctica profesional de rutina de anestesiólogos, cirujanos, odontólogos veterinarios y enfermeros. Actualmente los medicamentos para el bloqueo nociceptivo son bastante seguros y no poseen efectos adversos de gran riesgo. Sin embargo, el uso continuo en la práctica diaria podría causar complicaciones mucho más serias. (Säkkinen, 2005).

Según Säkkinen (2005), entre las complicaciones de la práctica diaria se hallan riesgos como ruptura de agujas, que podrían deberse a técnicas incorrectas, aleaciones débiles, agujas reutilizadas, defectos de fabricación y movimientos repentinos del paciente o profesional de salud. Dicho autor también menciona, que durante de la administración del anestésico local puede haber dolor en el paciente debido al bajo pH, lo que ocasiona irritación e incomodidad en la mucosa del paciente, además las inserciones agresivas de la aguja podría causar infecciones y desgarros en tejidos blandos, nervios o vasos sanguíneos. Así bien, aunque estas situaciones sean pocos comunes no se pueden descartar las reacciones adversas por hipersensibilidad, alergia, sobredosificación y toxicidad. (Säkkinen, 2005). También, la diaria administración post-operatoria de anestésicos locales que podrían desencadenar complicaciones tóxicas de importancia clínica a nivel cardíaco y neurológico. (Katzung, Brunton y Hernández, 2016).

Según lo anterior y haciendo referencia a Flórez (2014): “La toxicidad es consecuencia de la alta concentración plasmática alcanzada, siendo la inyección intravascular accidental la causa más frecuente de intoxicación”. Por ende, es necesario continuar con el estudio científico de nuevas terapias contra el dolor provocado por intervenciones quirúrgicas, que requieran el uso de anestésicos locales; estos métodos alternativos deben ser viables para disminuir todos estos efectos negativos.

El desarrollo *In Silico* de medicamentos ha sido en los últimos años un método de trascendencia científica, ya que permite explorar y descubrir un sinnúmero de estructuras químicas por un costo realmente menor en comparación con los métodos tradicionales como la síntesis química *In vitro* (Kar y Roy, 2013). Los ensayos *In Silico* utiliza métodos computacionales de gran detalle a nivel atómico e información tridimensional de la proteína en estudio para la

experimentación del acople con el nuevo fármaco en desarrollo. (Lionta, Spyrou, Vassilatis y Cournia, 2014)

El cribado molecular es una herramienta del desarrollo *In Silico* de fármacos flexible e ideal para el estudio virtual de los comportamientos farmacológicos entre la unión de moléculas pequeñas con su proteína diana, lo que permite seleccionar una molécula candidata con la mejor estabilidad fisicoquímica, que luego será sometida a un proceso de optimización con el fin de perfeccionar el efecto terapéutico. (Lionta, Spyrou, Vassilatis y Cournia, 2014).

Con la implementación de una biblioteca virtual de metabolitos se pueden analizar diferentes variables derivadas de una molécula de interés. Entre estas variables está la predicción conformacional y direccional del ligando al sitio de unión, la masa molecular, el logP, la refractividad molar, los enlaces rotables y los donares y aceptores de hidrógeno. Por lo que es de fundamental importancia conocer la estructura de la proteína diana y sus lugares de unión con el ligando, para así idear la estrategia de optimización del fármaco en diseño. Esta metodología, sugiere una reducción de tiempo y dinero en el proceso de desarrollo molecular, viéndose una amplia aplicación en las distintas etapas de los ensayos preclínicos. (Ou-Yang *et al.*, 2012). (Cruz, 2015)

Acmella oleracea, familia Asteraceae, es una planta conocida por sus múltiples usos medicinales a nivel popular, entre ellos la capacidad de ejercer efectos antipiréticos, anestésicos, analgésicos, antiinflamatorios y miorelajantes. Una revisión de estudios fitoquímicos revela que los efectos presentes en la planta se deben al contenido del metabolito espilantol, una alquilamina con significativa actividad antinociceptiva. (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Andrade *et al.* (2013), revela que el aceite de *Acmella oleracea* es rico en espilantol, y además presenta actividad anestésica, pues se comparó con el medicamento control benzocaína y encontraron que no hay diferencia significativa entre ambos; lo cual expone una considerable acción farmacológica y a la vez, sugiere realizar más estudios al respecto. El espilantol es una alquilamida con propiedades antinociceptivas que están relacionadas con la liberación de GABA, actividad opioide, serotoninérgica y de liberación de óxido nítrico.

La capsaicina (metabolito presente en el chile picante) y el espilantol tienen gran similitud estructural, precisamente en la cadena de ácidos grasos y el grupo funcional amida. Esto sugiere que comparten una misma vía de acción mediante la activación del receptor TRPV1. (de la Rosa-Lugo, *et al.*, 2017)

Por todo lo anterior, este trabajo de investigación propone realizar una biblioteca virtual de 100 o más derivados del metabolito espilantol, para luego analizar los parámetros fisicoquímicos de cada molécula obtenida. Una vez seleccionada la molécula hit (molécula candidata más estable) se iniciará la optimización de la misma comparando su acople conformacional y direccional a la proteína TRPV1 designada como el receptor. Cabe resaltar que todos los programas informáticos y de bases de datos que se van a utilizar se encuentran disponibles gratis en la web.

Antecedentes

En este trabajo de investigación se estudia la relación entre el receptor TRPV1 y la vía nociceptiva del dolor activada mediante el metabolito espilantol y algunos derivados de este, con el fin de profundizar en las características fisicoquímicas de sus estructuras orgánicas, para obtener un posible diseño molecular que permita un acople configuracional. Primeramente se hace una recopilación de información científica en las siguientes bases de datos: EBSCO, SCIELO, Pubchem, Google Académico, PubMed NCBI, Journal of Medicinal Chemistry, Journal of Ethnopharmacology, Scihub y Science Direct.

Facer *et al.* (2007) estudian la expresión diferencial de la capsaicina con el receptor TRPV1, TRPV3, TRPV4 y TRPM8 en tejidos humanos sanos y dañados por estrés traumático y neuropatía diabética. El estudio lo llevan a cabo utilizando distintos nervios, ganglios y raíces nerviosas de la médula espinal de pacientes sanos y diabéticos *post mortem*. Determinan que los receptores TRPV1 y TRPV3 son significativamente activos en nervios del plexo braquial y el TRPV1 en piel hipersensible. El TRPM8 no modifica la lesión por avulsión y el receptor TRPV3 se detecta en queratinocitos basales de la piel diabética. Se concluye la actividad de los

receptores TRP, en especial el TRPV1, el cual presenta un objetivo terapéutico con mayor selectividad para el dolor que los otros receptores.

En julio del 2008, en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, España, se reporta un caso por intoxicación de anestésicos locales. El caso lo presenta una mujer de 23 de años sin antecedentes de enfermedad, quien acude al Servicio de Urgencias por mareo, somnolencia, lenguaje torpe y lento. El caso clínico refiere que se le había aplicado por 3 horas una crema compuesta por lidocaína base y prilocaína base (EMLA®) en ambas piernas posterior a una depilación con láser. La mujer experimenta metahemoglobinemia adquirida por cianosis sin respuesta al oxígeno de alto flujo. En Cuidados Intensivos se le administra azul de metileno, viéndose una evolución clínica favorable. Se concluye que la cianosis es el signo más relevante en este caso y que el tiempo de exposición al fármaco tiene una relación directa con el riesgo de desarrollar metahemoglobinemia (Moreno *et al.*, 2008).

Otro caso de toxicidad por anestésicos locales se estudia en el 2008 por la Universidad Hospitalaria Carl Gustav Carus (Dresden, Alemania), donde un paciente masculino de 91 años con enfermedad obstructiva crónica exacerbada es admitido a cirugía de bursitis del olecranon. Se le administra mepivacaína y prilocaína para el bloqueo del nervio cubital. Pasados 5 minutos de la administración de estos medicamentos, el paciente empieza a mostrar signos de mareos, náuseas y agitación y no muestra respuestas a órdenes verbales, más tarde necesita ventilación por medio de mascarilla, el pulso cardíaco aumenta, así como la presión sanguínea. Como medida de rescate, se le administran lípidos al 20 % por vía intravenosa con repeticiones cada 3 minutos. La administración de lípidos continúa hasta la desaparición completa de los síntomas y la estabilidad del paciente. El bloqueo es probado de nuevo y funciona adecuadamente por lo que se prosigue con la operación (Litz *et al.*, 2008).

Un estudio realizado por Gregorio *et al.* (2010) en Italia y Estados Unidos describe la aparición de toxicidades por anestésicos locales a partir de 1979 hasta el 2009. Se determina que el 60 % de las reacciones estudiadas afectan el sistema nervioso central, también se observan únicamente síntomas a nivel cardiovascular después de la inyección del anestésico. La mayoría de los casos ocurren por administración de bupivacaína, seguido de ropivacaína y

levobupivacaína. A nivel neurológico, el síntoma más común es la convulsión, seguido de agitación y pérdida de conciencia. Otros signos como confusión y mareos suceden en menor frecuencia. A nivel cardiovascular, los síntomas más comunes corresponden a bradicardia e hipotensión, seguidos de arritmias de aparición grave. Los síntomas aparecen luego de 5 minutos de haber iniciado la administración del medicamento y dependen de la tasa de infusión, la sensibilidad a los anestésicos dependiendo de los pacientes, farmacocinética de los anestésicos y la calidad del monitoreo clínico para el control de los síntomas.

Un estudio efectuado en la India describe el caso de un paciente masculino de 25 años que es admitido a emergencia quirúrgica debido a que presenta un dolor abdominal agudo. El paciente es diagnosticado con perforación duodenal aguda y se le aplica una laparotomía de emergencia. Como parte del estudio, se destaca que el paciente no tiene historial de enfermedades médicas o quirúrgicas. Antes de iniciar el procedimiento quirúrgico abdominal, al paciente se le administra una dosis de prueba con lidocaína para descartar la vía intravascular del catéter, luego de haber sido puesto a nivel vertebral. Después, previamente a la incisión quirúrgica en la operación, se le administra una dosis de bupivacaína como analgesia intraoperativa. Sin embargo, a la hora de comenzada la operación, en el momento en que el paciente se encuentra en el punto más alto de bloqueo neuromuscular, se observa un movimiento tónico-clónico en todas las extremidades. Posteriormente, los movimientos cesan con la administración de la bupivacaína y se reformula la dosis de anestésico local; no obstante, los movimientos surgen de nuevo por lo que se toman otras medidas, mediante la administración de midazolam y fenitoína para disminuir su incidencia. La operación finaliza luego de dos horas sin aparición de dichos movimientos (Prakash *et al.*, 2015).

En el 2017, Hasan y colaboradores exponen un caso clínico sobre la intoxicación sistémica inducida por lidocaína en Estados Unidos, en el cual una mujer de 23 años, sin historial médico, se presenta a un centro quirúrgico ambulatorio para una septoplastia nasal por un desvío del tabique nasal. Durante la operación se le administra 4 veces la dosis recomendada de lidocaína al 2 % con adrenalina al 1 % por vía subcutánea. Poco después de la administración, la paciente experimenta bradicardia seguida de una actividad eléctrica sin pulso (paro cardíaco). Se le aplica RCP junto con 1 mg de epinefrina, sin respuesta alguna a los 20 minutos se le

administra un bolo de 100 mL al 20 % de emulsión lipídica intravenosa. Posteriormente es llevada a Cuidados Intensivos con infiltración de intralípidos y norepinefrina. Después de 2 días de recuperación la paciente es dada de alta sin rastros de daños por cardiomiopatía. Los autores concluyen que la toxicidad sistémica de la lidocaína puede ser mortal y la administración intravenosa de lípidos es la clave para prevenir la muerte cardíaca (Hasan y Asif, 2017).

Dado el historial toxicológico de los anestésicos locales a nivel cardíaco y nervioso, se plantea la posibilidad de diseñar un anestésico local con efectos terapéuticos comparables a la lidocaína a partir de un metabolito secundario existente en la especie *Acmella oleracea*, utilizando técnicas de *docking* virtual en un receptor nociceptivo de la familia TRP. Por lo tanto, se examinan antecedentes internacionales y nacionales que evidencien estudios científicos para el desarrollo *in silico* del prototipo de anestésico local.

Durante el 2009 en Bélgica, Boonena y colaboradores estudian la composición química de las plantas del género *Echinea*, *Xanthoxylum* y *Spilanthes*. Su objetivo consiste en realizar un extracto de estas plantas conteniendo el metabolito espilantol y probar el efecto por vía transdérmica, analizando la farmacocinética después de la aplicación tópica en tejido humano. La metodología empleada para el extracto se basa en el uso de dos disolventes aceptados en la producción farmacéutica, como lo son el etanol al 65 % y el propilenglicol al 10 % en combinación de tres fluidos receptores (PBS, PBS+HPCD y agua/alcohol 70:30) para así obtener el metabolito activo. Luego se aplican los extractos en un modelo de prueba *in vitro* denominado sistema de células de difusión de Franz, para comprobar la permeabilidad por extrapolación. Se observa que el extracto con el fluido receptor de agua/alcohol 70:30 presenta las mejores características transdérmicas para el espilantol que las demás preparaciones fitoquímicas, demostrando que el metabolito tiene absorción por vía transdérmica.

También en un estudio de la Universidad de Paraná (Paraná, Brasil), efectuado por Ogata *et al.* (2013), se analiza el efecto antinociceptivo de un extracto etanoalcohólico rico en espilantol en modelos animales para dolor nociceptivo y neuropático. Los estudios se llevan a cabo en ratones machos, donde se aplica por vía intraperitoneal el extracto de espilantol antes de la inducción dolorosa por calor térmico y químico y por lesión traumática del nervio ciático. Se

establece que las dosis de 10, 30 y 100 mg/kg reducen las fases inflamatorias causadas por el estrés de calor químico. La dosis de 100 mg/kg es la que mejores resultados tiene frente a la prueba de calor térmico y trauma mecánico con un efecto durante 3 horas. También se estima la dosis letal media que es de 889,14 mg/kg, por lo cual los autores concluyen que el extracto etanoalcohólico tiene efectos antinociceptivos sin presencia de efectos adversos.

Por otro lado, en la clínica dental de la Universidad de Paranaense (Brasil), Andrade *et al.* (2013) realizan un estudio para determinar la efectividad y seguridad de la *Spilanthes acmella* como un anestésico local de la mucosa bucal. Se aplica un ungüento con extracto de *S. acmella* sobre la mucosa seca en concentraciones del 15 % y 30 %, y se compara con la aplicación de benzocaína al 20 % inyectada como medicamento control. Es probada en pacientes con sensibilidad oral y la medición del dolor es hecha con una escala visual analógica y el monitoreo de la frecuencia cardiaca. Se obtiene como resultado que no hay diferencias entre la eficacia de ambas concentraciones del ungüento en comparación con el fármaco de referencia; viéndose en el ungüento de espilantol eficacia y seguridad en la reducción del dolor contra la inserción de la benzocaína por aguja.

A partir de la técnica del acoplamiento molecular o *docking*, se puede optimizar el ligando. Este estudio muestra cómo el cambio de ciertos grupos químicos dentro de la estructura del ligando ayudan a mejorar la unión de las estructuras y a definir las interacciones en el enlace proteico y la función nociceptiva del receptor en el acople molecular.

En la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, De la Rosa-Lugo *et al.* (2016) efectúan un estudio para establecer el papel que juega el receptor TRPV1 en el efecto antinociceptivo de distintas alquilamidas. Utilizan la prueba de formalina para evaluar la condición antinociceptiva de la región bucal en ratones. La capsaicina es la alquilamida control para determinar la participación del receptor TRPV1, también llevan a cabo un *docking* virtual para definir un posible mecanismo de acción. Notan que la activación del receptor a una posible interacción con los residuos de los aminoácidos Thr550 y Glu570. Concluyen que tanto la capsaicina como el espilantol tienen propiedades antinociceptivas por un posible estímulo del

receptor TRPV1, sin embargo incitan a desarrollar estudios a profundidad para el uso de las alquilamidas.

A nivel nacional, la tesis de investigación hecha por Cruz (2016) en la Universidad Internacional de las Américas, identifica un inhibidor de la proteasa NS3/NS2B del virus del dengue en productos naturales de la biodiversidad costarricense para diseñar un potencial prototipo de fármaco para el tratamiento del virus del dengue. El estudio expone la utilidad de descriptores moleculares para predecir las características fisicoquímicas de un prototipo de medicamento, así como el *docking* es útil en el análisis de las afinidades que poseen los ligandos con la diana.

En un estudio desarrollado por Blanco (2017) en la Universidad Internacional de las Américas, se hace referencia al empleo del *docking* para el diseño de ésteres derivados de benzotiazol como posibles antifúngicos inhibidores de la N-miristoiltransferasa para el uso en procedimientos de limpieza contra el hongo *Aspergillus fumigatis*. El objetivo de este trabajo consiste en abordar el problema de contaminación fúngica en cuartos limpios, donde se ejecutan procesos industriales críticos. Por medio de la técnica de *docking*, se efectúa la selección de una proteína que funciona como un objetivo macromolecular para la investigación. En dicho estudio se utiliza un inhibidor llamado RO-09-4879 que presenta una potente actividad inhibitoria en el hongo en estudio. La técnica ayuda a determinar la afinidad del ligando con la diana estudiada y así definir la energía de unión para realizar la actividad inhibitoria.

La importancia de los antecedentes descritos es que posibilitan ampliar la visión de los objetivos por desarrollar, ya que demuestran la necesidad de reducir los efectos adversos de los anestésicos locales, utilizando menores concentraciones del medicamento con una posible molécula antagonista del receptor TRPV1, siendo el espilantol una excelente candidata para implementar un cribado molecular y, de esta manera, lograr mejorías a nivel de la molécula, buscando seguridad y eficacia farmacología.

Proyecciones

Este trabajo permite seleccionar y optimizar un agonista de la proteína TRPV1 por medio de técnicas de diseño molecular y validación *in silico* a partir del metabolito espilantol, el cual posee propiedades antinoceptivas y analgésicas, con el propósito de perfeccionar el efecto terapéutico mediante la aplicación tópica y disminuir las intoxicaciones por anestésicos locales.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

En este apartado se mencionan las características teóricas de la patología del dolor, donde la definición es comentada por distintos autores, ya que la interpretación del dolor es subjetiva y personal. También abarca temas de índole médico como la fisiopatología del dolor, los tipos de dolor y la clasificación de los tratamientos utilizados en el dolor agudo con sus respectivos tratamientos farmacológicos. Además, se comentan las generalidades de la planta *Acmella oleracea*, la molécula espilantol y su importancia como fuente de investigación, así como el potencial del receptor TRPV1 en el impacto de un mecanismo de acción alternativo para alcanzar un efecto anestésico local. Por otro lado, se explica la relevancia del desarrollo de técnicas *in silico* en el descubrimiento de nuevas moléculas y cómo deben ser analizadas estas a la hora de ser seleccionadas.

Generalidades del dolor

Definición de dolor

Según la Asociación Internacional del Estudio del Dolor, el dolor se define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con el daño tisular actual o potencial o bien, descrita en términos de tal daño” (Kopf y Patel, 2010). Este concepto ayuda a estudiar el dolor no solo desde el punto de vista del daño somático o tisular, sino también atribuido a otras causas psicológicas y sociales, relacionadas al impacto cultural, familiar, económico, laboral, entre otros. A partir de esta definición, se concluye que el dolor es una experiencia individual y subjetiva.

Morón (2008) comenta que la experiencia subjetiva del dolor desde la perspectiva somática depende del estímulo de los receptores sensoriales o nociceptivos presentes en distintas regiones del cuerpo; como la piel, los músculos, las articulaciones, las vísceras y los vasos sanguíneos, viéndose involucrados estímulos de la vía química, térmica o mecánica. Por consiguiente, el dolor puede ser influenciado por un daño orgánico o anímico.

Por otro lado, los factores culturales e históricos como los conflictos bélicos, religiosos y ambientales dificultan el estudio de su tratamiento, dado que el manejo del dolor en campos clínicos depende tanto del acceso al medicamento como de la ayuda psicológica y paliativa para la integración social del paciente, considerándose como un problema primario de asistencia médica para todo aquel profesional de la salud que se halle envuelto en esta situación (Kopf y Patel, 2010).

Fisiopatología del dolor

El dolor se produce cuando las fibras aferentes del sistema nervioso comunican impulsos dolorosos, entre ellas las fibras amielínicas de conducción lenta o fibras C y las fibras mielinizadas conducción rápida o fibras A. La información sensorial comunicada por las acciones químicas, térmicas y mecánicas es transmitida por estas terminaciones nerviosas libres, tanto de las fibras C amielínicas como por las fibras A mielínicas de pequeño diámetro; la estimulación intensa de estas terminaciones genera la sensación del dolor. Por lo general, el daño de las terminaciones aferentes produce déficit de la discriminación de dolor y temperatura y puede ocasionar sensaciones dolorosas anormales en el área de la pérdida sensorial (McPhee y Hammer, 2011).

Morón (2008) hace una descripción anatómica de las fibras como unas sustancias gelatinosas de la médula espinal presentes en las raíces dorsales, que llevan los impulsos dolorosos al tálamo contralateral por el complejo espinotalámico lateral, los cuales son transmitidos hacia la corteza somasensorial, relacionada con el dolor. Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal modulan la información somatosensitiva proveniente de las vías aferentes, a la vez conducen impulsos dentro de un rango de velocidad de 0,5 a 120 m/s. Por consiguiente, esta velocidad de conducción depende del calibre de cada fibra nerviosa. Las fibras A son las de máxima velocidad de conducción y transmiten información de presión, frío y tacto cutáneo, así como el dolor mecánico y el dolor producido por calor. En contraparte, las fibras C de calibre menor transmiten sensaciones ligeras de tibio-caliente o dolores asociados a estímulos químicos y mecánicos (Porth, 2006).

Tipos de dolor

Como se expuso, los tipos de dolor son de difícil clasificación, ya que la causa y la interpretación del dolor es subjetiva, pueden ser muy variantes. Sin embargo a lo largo de los años se clasifican según su duración, patogenia, localización, curso e intensidad. Así bien, Puebla (2005) propone una clasificación para estos tipos del dolor, junto con sus respectivos subtipos (tabla 1).

Junto con la posible patología causante de la experimentación del dolor, cabe destacar que cada patología puede llevar una causa iatrogénica o psicológica. A efectos de esta tesis, se propone trabajar con el dolor de duración aguda e intensidad leve para patogenias neuropáticas y nociceptivas, en donde el apoyo de los anestésicos locales sea requerido, como en intervenciones quirúrgicas y posquirúrgicas para las zonas afectadas.

Tabla 1. Tipos de dolor

Tipos	Subtipos	Manifestación	Patología causante
Duración	Agudo	De corto tiempo y súbito. Taquicardia, hipertensión, sudoración.	Perforaciones de vísceras huecas, fracturas musculoesqueléticas.
	Crónico	De larga duración (desde meses hasta años). Acompañado de componentes psicológicos como depresión.	Cáncer.
Patogenia	Neuropático	Estímulo directo del sistema nervioso central y lesiones nerviosas periféricas. Dolor punzante y quemante.	Dolor neuropático, dolor posquimioterapia y posradioterapia, compresión medular.
	Nociceptivo	Somático y visceral.	Dolor tipo cólico, metástasis hepáticas, cáncer pancreático y dolor óseo producido por metástasis óseas.

	Psicógeno	Intervención del ambiente psicosocial.	Estrés.
Localización	Somático	Excitación anormal de nociceptores somáticos. Localizado, punzante.	Dolor óseo producido por metástasis óseas.
	Visceral	Excitación anormal de nociceptores viscerales. Mal localizado, continuo o profundo.	Dolor tipo cólico, metástasis hepáticas y cáncer pancreático.
Curso	Continuo	Persistente a lo largo del día.	Cáncer
	Irruptivo	Dolor transitorio en pacientes bien controlados.	Inducido por movimientos o acciones voluntarias del paciente.
Intensidad	Leve	Tolerable, permite realizar actividades diarias.	De carácter subjetivo y medido por una escala de analgesia.
	Moderado	Interfiere con las actividades diarias.	
	Severo	Interfiere con el descanso.	

Fuente: Elaboración propia con base en Puebla, 2005

Generalidades de los anestésicos locales

Los anestésicos locales corresponden a sustancias activas que realizan la acción de bloquear de manera reversible la conducción nerviosa en cualquier parte del sistema nervioso que se aplique; pasado el efecto de la sustancia activa, la conducción nerviosa se revierte por completo (Flórez, 2014).

Estos fármacos se utilizan principalmente con el objetivo de suprimir o bloquear los impulsos nociceptivos en los receptores sensitivos, a lo largo de un nervio, tronco nervioso o en los ganglios, y también si en la aferencia sensorial circula por nervios aferentes tanto somáticos como vegetativos. Por otro lado, el bloqueo puede servir para bloquear la actividad eferente simpática de carácter vasoconstrictor (Flórez, 2014).

Clasificación de los anestésicos locales

El principio activo de los anestésicos locales corresponde a una molécula compuesta por un anillo aromático y una amina secundaria o terciaria, separados por una cadena intermedia con un enlace tipo éster o amida. Dependiendo del tipo de enlace, se condiciona la velocidad del metabolismo, la duración de la acción y la toxicidad específica (Flórez, 2014).

De acuerdo con Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro y Portolés (2008), los anestésicos locales se pueden clasificar en dos grandes grupos, los ésteres y las amidas. La diferencia radica en el tipo de unión de la cadena intermedia con la cola lipófila, lo cual es importante en la práctica clínica al facilitar la elección del medicamento adecuado según el metabolismo y la capacidad alérgica.

Una de las razones para elegir el tipo anestésico local es por la duración de su efecto, viéndose que siempre hay una proporcionalidad entre el tiempo y el contacto de la fibra nerviosa. Los anestésicos locales tipo éster, como la cocaína, producen vasoconstricción debido al estímulo noreadrenérgico, aumentando el tiempo de duración de la anestesia. Sin embargo los anestésicos locales de tipo amida carecen de esta acción, por lo que se les debe agregar sustancias vasoconstrictoras (Morón, 2008).

En la figura 1 se pueden apreciar los anestésicos locales más utilizados de ambos grupos con sus respectivas estructuras orgánicas. Cabe rescatar que los tipos éster son fármacos que sufren en plasma hidrólisis rápida por enzimas pseudocolinesterasas y los tipos amida son degradados más lentamente por microsomas hepáticos (Lorenzo *et al.*, 2008).

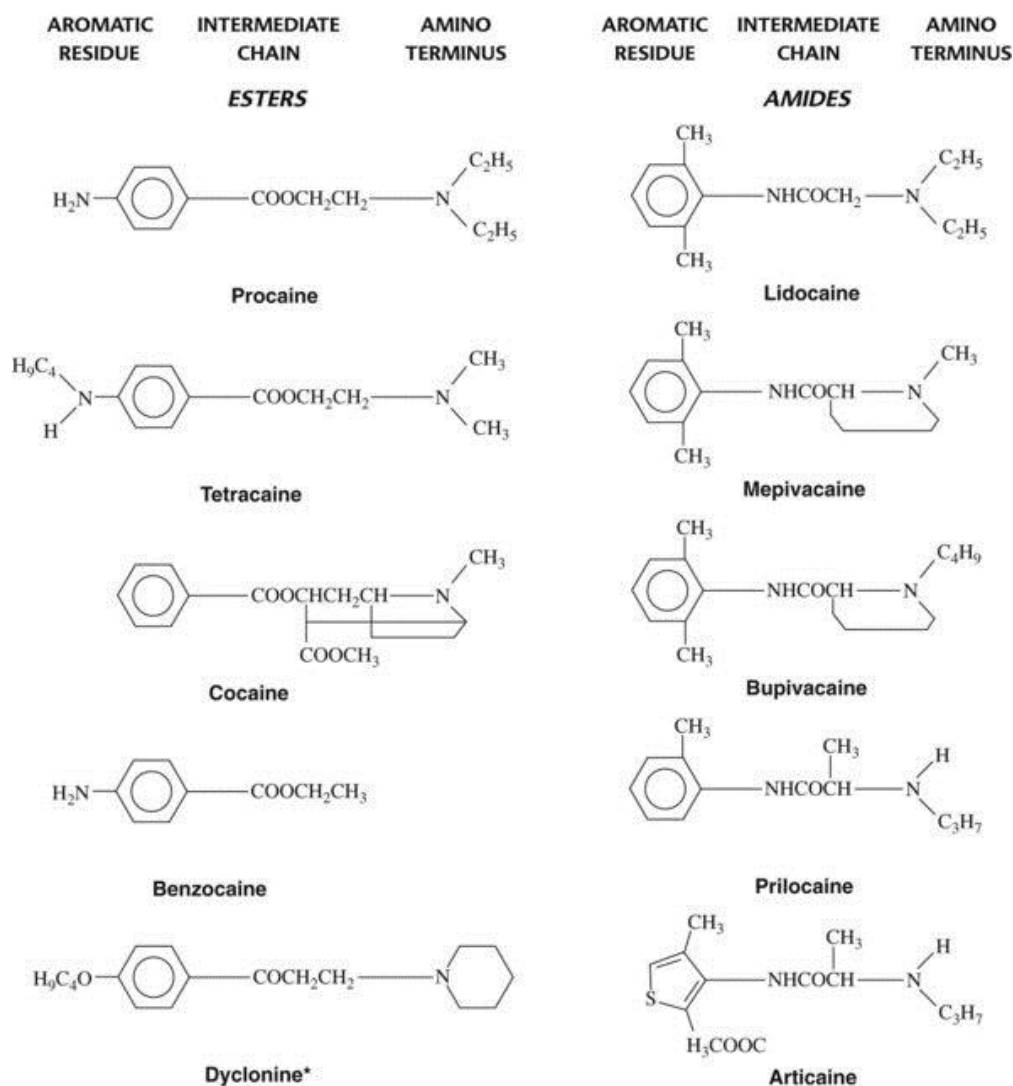


Figura 1. Principales anestésicos locales de tipo éster y amida

Fuente: Lorenzo *et al.*, 2008

Aplicaciones de los anestésicos locales

Los anestésicos locales se utilizan principalmente para tratar el dolor neuropático provocado por herpes zóster, en intervenciones quirúrgicas, cirugías y en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio. Por lo general se utilizan en la anestesia superficial de piel y mucosas, debido a sus capacidades fisicoquímicas de atravesar la membrana celular. Asimismo se pueden aplicar anestésicos locales en infiltración por vía subcutánea, viéndose una difusión mayor en las terminaciones nerviosas.

En esta administración es frecuente la asociación de adrenalina al 1:200000 para prolongar el tiempo acción. No obstante, se debe tener especial cuidado para evitar isquemias, puesto que la adrenalina se contraindica en enfermedad coronaria. Por vía intravenosa, el anestésico local típicamente utilizado es la lidocaína al 0,5 % para cirugías de mano y muñeca, y también como coadyuvante de analgesia del dolor crónico por neuropatía (Flórez, 2014).

Ventajas y desventajas de la adición de un vasoconstrictor al anestésico local

Morón (2008) menciona que al agregar un agente vasoconstrictor a los anestésicos locales se disminuye la velocidad de absorción *in situ*, por ende, aumenta la duración e intensidad del fármaco. Esto se debe a que reduce el paso del anestésico a la circulación sistémica y, por consiguiente, disminuye el riesgo a hemorragias en intervenciones quirúrgicas menores. Flórez (2014) expone: “Las administraciones de anestésicos locales por infiltración necesitan cantidades relativamente altas de fármaco para anestesiar una pequeña área”, lo cual puede aumentar las posibilidades de intoxicación sistémica, por consiguiente los síntomas cardiotóxicos y neurotóxicos.

El agente vasoconstrictor puede ser absorbido a nivel sistémico y producir importantes reacciones adversas cardiotóxicas. Antes de una cirugía u operación quirúrgica, se debe tener en especial consideración a pacientes cardiópatas que sufran de arritmias ventriculares, hipertensión y cardiopatía isquémica, por lo tanto el monitoreo de los signos cardíacos debe ser fundamental en la práctica clínica.

También la vasoconstricción puede ocasionar el retraso de la cicatrización de la herida, edema tisular e inclusive necrosis de la zona, debido a una hipoxia y lesión hística, consecuente al aumento del gasto de oxígeno en los tejidos no perfundidos asociados a la vasoconstricción. Por lo tanto, se debe procurar la asepsia y mejoría de las heridas en operaciones ortopédicas e intervenciones quirúrgicas de regiones terminales (Morón, 2008).

Mecanismo de acción de los anestésicos locales

El mecanismo de acción de los anestésicos locales aún es desconocido en su totalidad, por lo que existen diversas hipótesis para su dilucidación. Sin embargo, en los últimos años y gracias a las nuevas técnicas de estudio electrofisiológico, se analiza el mecanismo de acción de los anestésicos locales por medio un movimiento iónico a través de la membrana celular. Flórez (2014) hace referencia al mecanismo de acción de los anestésicos locales:

Los anestésicos locales deprimen la propagación de los potenciales de acción en las fibras nerviosas porque bloquean la entrada de iones de Na^+ a través de la membrana, en respuesta a la despolarización nerviosa, es decir, bloquean los canales de Na^+ dependientes de voltaje. A nivel electrofisiológico, los anestésicos locales no modifican el potencial de reposo, disminuyen la velocidad de despolarización, y por lo tanto, la velocidad de conducción; al bloquear el canal en su forma inactiva, alargan el período refractario, y como consecuencia, el número de potenciales de acción que el nervio puede transmitir por unidad de tiempo, irá disminuyendo a medida que aumenta la concentración, hasta que el bloqueo sea completo y el nervio sea incapaz de despolarizarse. La interacción con el canal es reversible y termina cuando su concentración desciende por debajo de un nivel crítico (concentración bloqueante mínima).

El mismo autor comparte en esta hipótesis que la acción anestésica se debe a que el sitio de fijación está en la porción interna transmembranal del canal de sodio y la forma no ionizada del anestésico es la responsable de atravesar la fase lipídica de la membrana neuronal. Esto se puede apreciar en cualquier membrana excitable, actuando en cualquier parte de la neurona (soma, dendritas, axones, terminaciones, entre otros), al igual que en la membrana muscular y el tejido cardíaco (Flórez, 2014).

Así bien, Lorenzo *et al.* (2008) complementan este mecanismo de acción señalando la relevancia del pH del anestésico local, donde usualmente se observa el medicamento en

soluciones de acidez ligera y en dos formas, catiónica y no ionizada. Por esto la mayoría de las preparaciones farmacéuticas se estabiliza con la sal de clorhidrato.

En la práctica clínica, la forma no ionizada difunde de manera fácil la membrana del nervio, una vez allí es ionizada y activada por la unión con el receptor de membrana. Este acoplamiento explica el bloqueo de los canales de sodio dependientes, por consecuente la inhibición de la despolarización de membrana. Cabe destacar que existe una posible interacción de los anestésicos locales con el calcio, ya que la forma catiónica compite con el calcio por la fijación de membrana, referente al control de la permeabilidad al sodio.

Farmacocinética de los anestésicos locales

La absorción sistémica, distribución y eliminación son parámetros cinéticos determinados para reducir el efecto anestésico, por eso su estudio es decisivo con el fin de analizar el tiempo de acción del medicamento y prever sus reacciones adversas, en especial las manifestaciones tóxicas en el corazón y sistema nervioso central (Flórez, 2014; Katzung *et al.*, 2016).

Absorción sistémica de los anestésicos locales.

La absorción sistémica de los anestésicos locales está determinada por factores como dosis, lugar de administración, unión a tejidos, adición de sustancias vasoconstrictoras, flujo sanguíneo y propiedades fisicoquímicas. Este último es esencial, ya que a mayor liposolubilidad, mayor potencia anestésica, mayor prolongación del efecto y mayor tiempo en alcanzar la concentración máxima (Flórez, 2014).

La adición de un vasoconstrictor tiene como objetivo eliminar la vasodilatación generada por los anestésicos locales. La absorción aumenta con la vascularización y disminuye en función de la abundancia de grasa. Por otro lado, agregar un vasoconstrictor posee ciertas ventajas que permiten una mejor acción del medicamento, entre ellas destacan la producción de una absorción gradual, incremento de la duración de acción del bloqueo, disminución de los niveles

plasmáticos y toxicidad producida y reducción del sangrado en el campo operatorio (Velázquez, 2015).

También el lugar de aplicación es determinante en la absorción del medicamento, pues las zonas más vascularizadas como la mucosa bucal tienen una absorción más rápida y, por tanto, concentraciones mayores en comparación con zonas menos perfundidas como el tejido adiposo (Flórez, 2014; Katzung *et al.*, 2016).

Una característica importante corresponde el grado de ionización, al depender del pH del medio y del pKa del anestésico (Velázquez, 2015). La constante de disociación de los anestésicos locales influye en el período de latencia, por lo cual al aproximarse este valor al pH del medio, hay mayor proporción del fármaco en la forma no ionizada, por lo que su penetración a través de las membranas de los nervios es más rápida. Al añadir un agente básico, se incrementa la proporción no ionizada del anestésico, lo que acelera el inicio de acción (Flórez, 2014).

Distribución de los anestésicos locales.

La distribución de los anestésicos locales depende especialmente de su coeficiente de solubilidad y su grado de unión a proteínas plasmáticas. Es decir, si existe un coeficiente de solubilidad alto y una unión a proteínas bajo, el fármaco se puede distribuir con mayor facilidad en los tejidos periféricos, pero presentar una menor concentración plasmática (Velázquez, 2015; Mendoza, 2008).

Los anestésicos tipo amida se unen altamente a las proteínas plasmáticas, en especial a la alfa 1-glicoproteína ácida, de gran especificidad, pero poca capacidad; también se unen en mayor medida a la albúmina (Flórez, 2014; Katzung *et al.*, 2016). Estos fármacos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria por difusión simple, y es mayor cuando la unión a proteínas plasmáticas es menor. Además, debido a esto, se encuentran restringidos en estos pacientes (Velázquez, 2015; Mendoza, 2008).

Metabolismo de los anestésicos locales.

El metabolismo de los anestésicos locales depende de su naturaleza química, además la velocidad de este proceso corresponde a la función hepática y flujo sanguíneo hepático. Como se indicó, los ésteres son metabolizados rápidamente por reacciones de hidrólisis realizadas por las enzimas pseudocolinesterasas de plasma e hígado. La velocidad de hidrólisis puede variar dependiendo del fármaco, lo que puede cambiar la toxicidad y la velocidad de acción.

La ausencia o déficit de estas enzimas puede aumentar la duración de acción y las concentraciones plasmáticas (Flórez, 2014; Velázquez, 2015). Mientras que los tipos amida son metabolizados por el microsoma hepático, mediante reacciones de N-desalquilación e hidrólisis del citocromo P450 (Flórez, 2014; Katzung *et al.*, 2016). El metabolismo de este tipo de anestésicos se encuentra disminuido en pacientes recién nacidos y en aquellos con enfermedad hepática, por lo que se requiere precaución (Flórez, 2014).

Excreción de los anestésicos locales.

La excreción de los anestésicos locales se produce por vía renal; los metabolitos y el fármaco no metabolizado se eliminan por la orina, en su mayoría en forma de metabolitos inactivos, aunque un pequeño porcentaje puede hacerlo de manera inalterada. Dicha excreción depende del pH urinario, se eliminan mejor a través de la orina ácida y más lentamente cuando la orina es alcalina. La toxicidad se incrementa en la insuficiencia renal (Flórez, 2014; Velázquez, 2015).

Dosis de los anestésicos locales

La dosis de los anestésicos locales depende del tipo y el uso clínico del anestésico. En el caso de los ésteres, la procaína se puede usar con una concentración 1 a 2 % para anestesia infiltrativa, bloqueos de nervios periféricos y anestesia epidural; la tetracaína al 2 % se puede emplear para anestesia subaracnoidea. Por otro lado, la benzocaína se aplica a nivel superficial para anestesia tópica. En el caso de las amidas; la lidocaína, prilocaína, bupivacaína, etidocaína,

ropivacaína y más amidas presentan diferentes concentraciones, que abarcan desde el 0,5 al 5 % que se utilizan para anestesia por infiltración, anestesia regional intravenosa, bloqueos de nervios periféricos, anestesia epidural o caudal, anestesia espinal y anestesia tópica (Velázquez, 2015).

Kopf y Patel (2010) se cuestionan la dosis máxima de anestésicos locales en niños. En su guía para el manejo del dolor sugieren que la dosis de lidocaína para infiltraciones debe ser igual o menor a 4 mg/kg sin epinefrina o 7 mg/kg con epinefrina. La bupivacaína no debe exceder de 2 mg/kg/día y 8 mg/kg/día en concentraciones de 0.125 % y 0.25 % respectivamente para uso epidural caudal.

Reacciones adversas de los anestésicos locales

La aparición de reacciones adversas debido al uso de anestésicos locales se produce principalmente por la inyección intravascular accidental y por sobredosis. Estos efectos se encuentran relacionados con sus niveles plasmáticos y se manifiestan principalmente en el sistema nervioso central (SNC) y en el aparato cardiovascular (Velázquez, 2015).

Las reacciones alérgicas generadas por estos fármacos no ocurren con mucha frecuencia, pero cuando suceden pueden tener localización dérmica o ser de carácter asmático o anafiláctico. La hipersensibilidad puede ser cruzada entre moléculas relacionadas estructuralmente; puede ocurrir irritación y daño tisular local, en especial a nivel muscular y neural (Flórez, 2014).

Las altas concentraciones de anestésicos locales afectan principalmente al sistema nervioso central. Dosis crecientes de los anestésicos locales pueden originar una serie de síntomas neurológicos, entre ellos: aturdimiento y acúfenos, inquietud y verborrea, dificultad para pronunciar palabras, escalofríos, espasmos musculares y convulsiones generalizadas. Al final, puede ocurrir una depresión en el SNC, que conlleva a hipotensión, hipoxia y a un estado de coma, que luego provoca paro respiratorio e inclusive la muerte (Flórez, 2014).

Toxicidad de los anestésicos locales

Las reacciones adversas de los anestésicos locales se encuentran ligadas a la toxicidad que pueden presentar estos fármacos. Dicha toxicidad ocurre como consecuencia de la alta concentración plasmática alcanzada; esto depende principalmente de la tasa de absorción con respecto a la tasa de eliminación. Factores como la vascularización, los tejidos y otros factores como el embarazo, el uso de anticonceptivos orales y los recién nacidos pueden incrementar la toxicidad de estos fármacos (Flórez, 2014).

Las reacciones tóxicas pueden ser sistémicas, es decir en el SNC y a nivel cardiovascular; locales o específicas de ciertos anestésicos. Ante estos efectos, el SNC es el más vulnerable y puede suceder una excitación seguida de una depresión o una serie de reacciones como vértigos, confusión, somnolencia, depresión del SNC con desaparición de convulsiones, inconsciencia y paro respiratorio (Velázquez, 2015).

A nivel cardiovascular se experimenta una serie de efectos en un orden específico, los cuales inician por depresión de la contractilidad, excitabilidad y velocidad de conducción, disminución del volumen minuto, aparición de hipotensión de intensidad leve a moderada, vasodilatación periférica, seguido de una hipotensión grave, bradicardia sinusal y finalmente colapso cardiovascular (Velázquez, 2015).

Morón (2008) comenta que cuando los anestésicos del tipo amida se metabolizan a nivel hepático, forman metabolitos tóxicos como la ortoluidina (residuo de la prilocaína), responsable de producir metahemoglobinemia. El carácter lipofílico de los anestésicos locales les confiere la facilidad de atravesar la barrera placentaria, produciendo hipotensión, reducción del gasto cardíaco materno y, por tanto, disminución del flujo sanguíneo uterino y oxígeno fetal (Guerrero, 2001).

Según Valencia y García (2011), la administración intravascular de los anestésicos locales puede ocasionar efectos tóxicos agudos, los cuales tienden a ser más severos y de corta duración que aquellos secundarios a la absorción sistémica lenta. De esta manera, puede suceder

toxicidad a nivel local o a nivel sistémico. A nivel local puede ocurrir miotoxicidad, en donde los anestésicos locales pueden llegar a producir necrosis tisular en el sitio de administración, sin excluir dentro de las causas de esta complicación el trauma y la hemorragia generados por la administración.

A nivel sistémico, se define la aparición de toxicidad en el sistema nervioso central ya que se observa un aumento de la concentración de medicamento a nivel sérico, lo cual incrementa el riesgo de toxicidad a nivel central. Al comienzo de estos efectos se observa un efecto depresor sobre las vías inhibitorias mediadas por receptores GABA y efectos estimulantes sobre receptores NMDA, lo que provoca agitación, mareos, contracturas musculares, alteración en la percepción de los sabores y otros efectos. Al aumentar la concentración sérica, se bloquean las vías excitatorias, produciendo depresión respiratoria y coma (Valencia y García, 2011).

A nivel sistémico también se identifica toxicidad a nivel cardiovascular, en estos casos se originan cambios hemodinámicos agudos, por lo que se presentan cambios en el sistema circulatorio y nervioso central. La toxicidad cardiovascular sucede por dos mecanismos, uno en donde es asociado con disfunción de ganglio autonómico y el segundo como efecto sobre los sistemas de conducción miocárdicos. Concentraciones tóxicas de anestésicos locales cursan con taquicardia, hipertensión, luego hipotensión y bradicardia, depresión miocárdica y bajo gasto cardíaco relacionado con arritmias (Valencia y García, 2011).

La aparición de reacciones tóxicas locales depende principalmente de la naturaleza del anestésico, en específico de la duración de la acción, del solvente y de la concentración de la solución. Debido a esto, se reportan lesiones neurotóxicas con déficit sensitivomotor prolongado y lesiones en el músculo esquelético con elevación de los niveles séricos de creatinfosfocinasa (Velázquez, 2015).

Prevención de toxicidades de los anestésicos locales

La prevención de los efectos tóxicos de los anestésicos locales se puede llevar a cabo de distintas maneras. El objetivo de estas acciones corresponde a disminuir la incidencia de

aparición de estos efectos y, por consiguiente, una mejor respuesta terapéutica. Una de estas acciones es la prevención de sobredosificación, por lo que se deben tener en cuenta elementos para el manejo adecuado de las vías aéreas y así seleccionar el anestésico local adecuado, las dosis y concentraciones óptimas, la técnica más favorable y el abordaje anatómico adecuado (Valencia y García, 2011).

La respuesta temprana ante la aparición de efectos tóxicos también ayuda a reducir la incidencia de estos efectos. La detección temprana de los síntomas incrementa la posibilidad de éxito en el tratamiento; por lo tanto, ante la aparición mínima de síntomas, se deben iniciar las maniobras terapéuticas necesarias para evitar cualquier tipo de acontecimiento grave (Valencia y García, 2011).

Generalidades del espilantol

Descripción botánica de la planta que sintetiza el espilantol

La *Acmella oleracea*, también conocida como *Spilanthus acmella*, es una planta perteneciente al reino *Plantae*, del subreino *Traqueobionta*, superdivisión *Spermatophyta*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, orden *Asterales*, familia *Asteraceae*, subfamilia *Asteroideae*, tribu *Heliantheae*, género *Acmella*, especie *A. oleracea* (Jansen, 1985).

Los derivados de esta planta se utilizan en la medicina ayurveda para aliviar el dolor asociado a molestias dentales, reumatismo, inflamación, estomatitis e infecciones de encías y garganta (Sharma, Boonrn, Chauhan, Thakur, De Spiegeleer y Dixit, 2011).

De acuerdo con el estudio de Chakraborty, Devi, Sanjebam, Khumbong y Thokchom (2010), el extracto de la *Acmella oleracea* obtenido por técnica de soxhlet utilizando 60 gramos de flores secas y pulverizadas con agua destilada como disolvente muestra presencia de isobutilamidas, entre ellas la más abundante es la llamada espilantol. La actividad antinociceptiva se observa cuando el espilantol es aplicado intercutáneamente y absorbido a

través de la piel, produciendo una anestesia del 70,36 % al 87,02 % en 5 minutos y siendo comparada con la lidocaína al 2 %, la cual genera anestesia en un 97.22 % en 2 minutos.



Figura 2 Ilustración de la *Acmella oleracea*

Fuente: Jansen, 1985

A. oleracea es una planta cultivada ampliamente a lo largo del planeta, estando presente al norte de Estados Unidos, Haití, India, Suráfrica, Malasia y Suramérica. Por lo general es una planta que crece en climas tropicales húmedos. No se enraíza en nodos, por lo que no logra gran alcance de extensión territorial. Su floración es anual, entre los meses de abril y julio (Jansen, 1985).

A. oleracea puede alcanzar una altura de 60 a 90 cm, de tallo rojizo, glabro, recto, de entre 10 y 40 cm; tiene hojas verde olivo, sencillas, opuestas, ovaladas, con peciolo largos y planos (figura 2) (Janzen, 1985). La inflorescencia es de cabezuelas amarillas o naranjas con una mancha central castaña-rojiza, solitarias y con pedúnculos de hasta 25 cm de largo. La semilla necesita condiciones especiales de temperatura (21 °C) para alcanzar la germinación (Jansen, 1985; Hind y Biggs, 2003).

Usos tradicionales de la *Acmella oleracea*

La planta *A. oleracea* es muy popular en las comunidades antiguas de la India, Sudán, Sumatra y Java, en donde se emplea frecuentemente como un ingrediente especial en las comidas de actividades religiosas. Asimismo, la planta es muy utilizada como remedio folclórico en dolores dentales y para infecciones de encías y garganta. Las tribus hindús usan distintas partes de la planta para diferentes problemas (Dubey, Maity, Singh, Saraf y Saha, 2013).

Los habitantes de Tamil Nadu (India) utilizan las flores para dolores dentales y la raíz como una pasta para tratar los problemas de garganta. La planta también se emplea como estimulante para tratar la estomatitis y curar las heridas. Además es utilizada en el tratamiento de reumatismo articular y en la tuberculosis. En la India, las flores son usadas para el tratamiento de la tartamudez en niños y en Bangladesh para tratar la leucorrea en mujeres (Dubey *et al.*, 2013).

Principales metabolitos de la *Acmella oleracea*

Acmella oleracea es utilizada por muchas culturas principalmente como remedio para molestias dentales. Esto se debe a sus metabolitos que presentan similitud con los anestésicos locales tipo amida (Dubey *et al.*, 2013). Las estructuras moleculares de la lidocaína y el espilantol señalan que la amida es el grupo funcional encargado del efecto anestésico (figura 3).



Figura 3. Estructuras orgánicas bidimensionales de la lidocaína y el espilantol Fuente:

Fuente: Elaboración propia con base en Morón, 2008

Los alcaloides son metabolitos secundarios derivados de aminoácidos, la amida del espilantol es considerada un alcaloide de la *Acmella oleracea*. En su mayoría los alcaloides son

sustancias psicoactivas que por su liposolubilidad pueden atravesar la barrera hematoencefálica (McMurry, 2008).

El espilantol es una isobutilamida, la cual posee varias bioactividades, desde proteger las plantas hasta ser agonista antibacteriano, antifúngico y analgésico. Esta molécula corresponde a un compuesto anfipático, respondiente a un extremo polar, en este caso un grupo amida y un grupo acilo menos polar. Estas partes de la molécula son las responsables de la actividad analgésica y de causar la salivación. Otras características fisicoquímicas son un color amarillo leve, punto de fusión de 23 °C, punto de ebullición de 165 °C y una máxima absorción en el UV de 228.5 nm (Barbosa, Carvalho, Veronesi y Sabaa-Sur, 2015).

La molécula del espilantol provee de un sabor amargo a la planta, estimula la salivación y, debido a su sabor, puede producir astringencia local y efectos anestésicos. Se reportó que las flores y la raíz de *A. oleracea* corresponden a una fuente rica de metabolitos y triperpenos con importancia farmacológica (Dubey *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Espada, Ferrer, Batista, Bandera y Almeida (2016) revela que la mayoría de metabolitos secundarios presentes en hojas y flores de *S. acmella* son solubles en agua, entre ellos alcaloides, saponinas, taninos, triterpenos, cumarinas y poliuródinos. Sin embargo, dependiendo del solvente utilizado, se pueden obtener sustancias más lipofílicas; empleando un extracto con éter se logran pruebas de identificación positivas para aceites esenciales y flavonoides.

Actividad biológica de los metabolitos productos por *Acmella oleracea*

A. oleracea es una planta con gran potencial farmacológico, desde sus empleos etnoculturales hasta sus más recientes estudios demuestran gran variabilidad de actividad biológica. Este trabajo se enfoca a la actividad de anestésica local; no obstante, la bioactividad de la planta contempla efectos antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios, antifúngicos, diuréticos, vasorrelajantes, inhibitorios de la lipasa pancreática, larvicidas, afrodisiacos, inmunomoduladores y antinociceptivos (tabla 2) (Dubey *et al.*, 2013).

Tabla 2. Acciones farmacológicas de la *Acmella oleracea*

Actividad biológica	Acción farmacológica
Antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios	La actividad antipirética está ligada a los flavonoides, mediada por la ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Estas mismas enzimas están asociadas al mecanismo de acción de la mayoría de los AINEs por medio de la inhibición de prostaglandinas.
Antifúngicos	Se demuestra que un extracto de <i>Spilanthes acmella</i> puede inhibir 4 cepas distintas de hongos, entre ellas <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium moniliform</i> .
Diuréticos	La diuresis inducida por la planta se demuestra por el incremento de los niveles de sodio y potasio presentes en muestras de orina después de su ingestión.
Vasorrelajantes	El efecto vasorrelajante surge por la estimulación del óxido nítrico en el endotelio de manera dosis dependiente. Este efecto ocurre utilizando un extracto de las hojas.
Larvicida	Las dosis bajas del extracto de la planta demuestran efectividad contra huevos y pupas del género <i>Anopheles</i> , mosquitos responsables de la propagación de la malaria. Los investigadores sugieren que la actividad está mediada por un proceso de histólisis en las larvas.
Afrodisiaco	Un extracto de planta probada en ratos machos muestra un incremento en la frecuencia eyaculatoria de manera dosis dependiente. Dosis de 150 mg/kg por 28 días administradas por vía oral incrementan los niveles séricos de testosterona de los ratones.
Inmunomodulador	Extractos de hexano y cloroformo de la planta producen estimulación de macrófagos, menor actividad de la óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa 2, además de menos producción de citoquinas.

Fuente: Elaboración propia con base en Dubey *et al.*, 2013

El espilantol posee actividad anestésica local, la cual se debe principalmente a la presencia de alcanoides en la planta, pero al compararlo con la xilocaína, la acción terapéutica ocurre a una velocidad menor. Al ser evaluados en modelos animales, la acción anestésica local de esta molécula se produce a través del bloqueo de canales de sodio; algunos anestésicos locales actúan de forma similar al presentar alcanoides (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

La actividad antinociceptiva del espilantol puede ocurrir debido a la activación de sistemas opioides, serotoninérgicos y GABAérgicos al administrar una dosis dependiente del espilantol. Por otro lado, además de tener un efecto antinociceptivo, se observa en animales que puede modificar la ansiedad. A nivel antiinflamatorio, se determina que el espilantol puede inhibir la producción de óxido nítrico sintasa, así como la de ciclooxigenasa-2, por lo que disminuye la inflamación (Barbosa *et al.*, 2015).

El espilantol inhibe la actividad del citocromo P450, 1A1/2, 2D6 y 3A4, por lo que intervienen en el metabolismo de ciertos medicamentos y pueden inducir a interacciones entre los medicamentos y la planta. La inhibición de citocromo CYP 1A1/2 se asocia con una disminución del riesgo carcinogénico. No obstante, estos resultados conducen a una precaución en el uso de esta planta, ya que pueden ocurrir peligros clínicos por su consumo a largo plazo (Barbosa *et al.*, 2015).

La actividad antiinflamatoria del espilantol se debe principalmente a la inhibición dual de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa debido a la similitud con la estructura del ácido araquidónico, en donde este último es un precursor de la síntesis de las prostaglandinas y leucotrienos. La acción antiinflamatoria del espilantol sucede por los flavonoides presentes en la planta y en la fase tardía de la inflamación, por medio de la inhibición de la ciclooxigenasa (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

La acción analgésica de la planta se debe en principio a los flavonoides, los cuales reducen la aparición de prostaglandinas, PGE2 y PGF2, que están involucrados en la percepción del dolor. Por otro lado, en el extracto frío de las flores de la planta se identifica actividad contra el dolor persistente y actividad hiperalgésica; el mecanismo de acción de estas actividades

sucede en especial por la inhibición de las prostaglandinas debido al extracto del espilantol (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

El espilantol tiene actividad antimicrobiana, a partir de análisis se comprueba que presenta acciones contra la *Klebsiella pneumoniae*, las cuales son mayores comparadas a la doxiciclina. Estudios indican que esta actividad se debe a la existencia de flavonoides, taninos y otros fitoquímicos que son antimicrobianos conocidos. Asimismo, muestra actividad contra el *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium diphtheriae* (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

También se evalúa la actividad antibacteriana que posee esta planta a nivel oral contra las bacterias *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. Destaca que el tallo de la planta contiene metabolitos secundarios, como flavonoides, cumarinas y taninos, además del espilantol, que son los responsables de actuar contra estas bacterias (Fragoso, Manzur, Días y Herrera, 2016).

Por otra parte, la extracción del espilantol y alcanida acetilénica muestra ser un agente que actúa contra la malaria al presentar actividad contra dos cepas del *Plasmodium falciparum*. Entre ambos fitoquímicos, el espilantol tiene mayor actividad contra esta enfermedad, por lo que es un agente importante en la prevención de la misma (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

Igualmente se establece que el extracto de *A. oleracea* tiene actividad antioxidante en las flores, las cuales poseen la mayor actividad antioxidante por la captación de radicales libres. La actividad antioxidante de esta planta ocurre por la presencia de compuestos cumarínicos y fenólicos que actúan en la captación de radicales hidroxilos y radicales superóxidos (Mallikarjuna, *et al.*, 2012).

Asimismo, en la planta se identifica actividad diurética debida en principio a la existencia de taninos, esteroides y carotenoides en sus hojas, mientras que sus flores poseen alcaloides que les confieren actividad similar a los diuréticos del asa (Prachayasittikul *et al.*, 2013). Esta actividad diurética es potente, similar a la de la furosemida con aumentos marcados de sodio y potasio urinario. Por ende, el uso de esta planta puede ser de un agente terapéutico natural no

tóxico para este tratamiento. Además se determina que la acción ocurre con rapidez, pero se mantiene por un tiempo prolongado (Dubey *et al.*, 2013).

La extracción de las hojas de la planta muestra una gran actividad inmunomoduladora al aumentar el conteo de macrófagos con un número máximo de células al 15^{to} día de tratamiento. Las hojas tienen distintos compuestos como alcaloides, amidas picantes, carbohidratos, taninos, esteroides, carotenoides, aceites esenciales, sesquiterpenos y aminoácidos responsables de la acción. Por otro lado, el espilantol muestra estimulación inmunológica y atenuación de la respuesta inflamatoria en macrófagos. También, diferentes alcaloides se consumen para mejorar la respuesta inmune, como en resfriados, infecciones respiratorias e influenza (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

Toxicidad del espilantol

La toxicidad de la planta es evaluada solo en animales. Las pruebas en animales ayudan a determinar los niveles de toxicidad en estos y los resultados pueden ser utilizados como datos básicos para la toxicidad en animales más grandes, así como en regulaciones de contaminación ambiental. A partir de estudios se establece que una concentración de 20 % en el embrión de un pez cebra no posee efectos letales ni tóxicos, por lo que un extracto de esta planta con una concentración de 0,01 a 1 % puede ser utilizada en animales sin peligros letales (Dubey *et al.*, 2013).

Como agente insecticida, se observa que el espilantol es tóxico en distintas especies de insectos. Por la presencia de alcaloides, sesquiterpenoides y saponinas, la planta tiene propiedades insecticidas que son activos ante ciertos mosquitos, particularmente ante la larva del *Aedes aegypti* (Dubey *et al.*, 2013) y otras especies de mosquitos del género *Anopheles*, portadores del *Plasmodium* en la enfermedad de malaria (Barbosa *et al.*, 2015).

Generalidades del receptor TRPV1

Descripción del receptor

En 1997 se describe la participación de una proteína transmembrana llamada *Transient Receptor Potential* (TRP) por sus siglas en inglés o receptores de potencial transitorios, en la transducción del estímulo nocivo del dolor y pertenece al complejo de la superfamilia de canales iónicos regulados por ligandos (Caterina, Schumacher, Tominaga, Rosen, Levine y Julius, 1997).

De forma general, estas proteínas son canales catiónicos, no selectivos, permeables al calcio y con poca sensibilidad al potencial de membrana. Por consiguiente, su activación está desencadenada por el estímulo físico, mecánico, químico y de ligandos endógenos y exógenos (Nilius y Owsianik, 2011). Además hay una amplia distribución tisular, incluyendo músculo esquelético, liso, cardíaco, células inmunes, epitelio y neuronas. Por otro lado, tiene una importante participación fisiología como mediadores de funciones celulares, entre ellas la iniciación del dolor, termorregulación, secreción salival, inflamación, regulación cardiovascular, tono del músculo liso y homeostasis del calcio y magnesio (Vassort y Fauconnier, 2008).

Clasificación y tipos de receptores

Desde el 2002, la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica denomina una nomenclatura internacional para toda la superfamilia de canales iónicos TRP, la cual se subdivide en siete subfamilias, establecidas por las similitudes estructurales de la secuencia proteica en la cadena de aminoácidos y/o en la acción de los ligandos endógenos. Según los receptores involucrados, se describen varios tipos de receptores (tabla 3) (Martínez *et al.*, 2015).

Tabla 3. Clasificación de los receptores TRP

Nombre	Abreviación	Receptores involucrados
Canónico o clásico	TRPC	C1/C4/C5, C3/C6/C7, y C2
Melastatina	TRPM	M1/M3, M7/M6, M2/M8, y M4/M5
Vaniloide	TRPV	V1/V2/V3/V4 y V5/V6
Ankirina	TRPA	A1
Policistina	TRPP	P1, P2 y P3
Mucolipina	TRPML	ML1, ML2 y ML3

Fuente: Elaboración propia con base en Martínez *et al.*, 2015

Todas las proteínas de esta superfamilia son complejas y presentan similitudes en los segmentos de transmembrana (S1 a S6), una región que forma un poro entre los segmentos S5 y S6 y las terminales carboxilo y amino intracelulares. Los miembros de la subfamilia V y A se expresan en las neuronas somatosensoriales de los ganglios del trigémino. Particularmente el canal catiónico TRPA1 desempeña un papel en la generación y mantenimiento del dolor inflamatorio; mientras que el TRPV1 funciona como transductor térmico en el cuerpo y es activado por mediadores inflamatorios o estímulos dañinos en el tejido (Gualdani *et al.*, 2015).

Esta investigación se centra en el estudio del receptor TRPV1, el cual se identifica como un modulador de los estímulos térmicos en condiciones de temperaturas extremas, por lo tanto se denomina como un termosensor. Esta característica también se aprecia en la sensación de ardor del chile picante o en la sensación fría del mentol (Gualdani *et al.*, 2015).

El receptor TRPV1 consiste en un canal catiónico localizado en fibras nociceptivas periféricas y en áreas involucradas en la nocicepción en el sistema nervioso central (SNC) (Karlsten, 2017). Este receptor es expresado en tejidos con puertos de entrada, como por ejemplo, la piel, conjuntiva y vías respiratorias, asimismo en células con características similares. En el SNC se encuentran las neuronas motoras de la médula espinal, cerebelo e hipocampo, además de las células de este sistema que se relacionan con la inflamación y la neurodegeneración (Veronesi y Oortgiesen, 2006).

Las estructuras analizadas por el método de microscopía electrónica del complejo de proteínas TRP se estudian ampliamente en diferentes miembros de la superfamilia, entre ellas se encuentran TRPV2, TRPV6, TRPA1 y TRPA2. El interés de este trabajo de investigación es estudiar la macromolécula TRPV1 de la especie *Rattus norvegicus*. Por esta razón, se realizan búsquedas en la base de datos de proteínas Protein Data Bank y se elige la 5IRX debido a la resolución de la estructura (*spacing* de 2.9 Å) y a las publicaciones científicas que respaldan su importancia (Gao, Cao, Julius y Cheng, 2016).

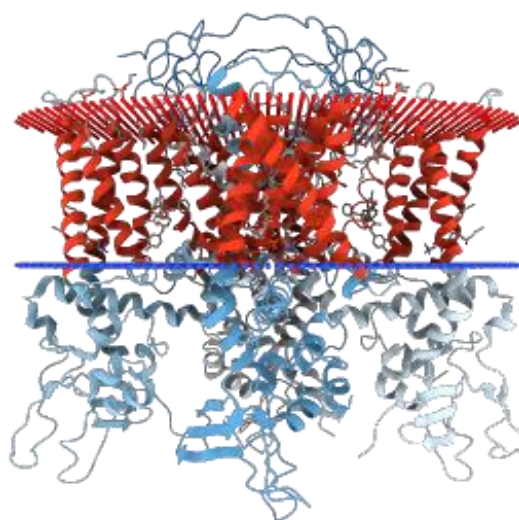


Figura 4. Estructura de la TRPV1 de *Rattus norvegicus*

Fuente: Protein Data Bank, 2017

Mecanismo de acción analgésico del receptor TRPV1

El receptor TRPV1 es activado por una gran diversidad de estímulos mecánicos, químicos y térmicos que dañan la piel, como la capsaicina (compuesto del grupo vanilloide presente en el chile picante), las temperaturas superiores a los 45 °C, los cambios de presión y osmolaridad, las depleciones en los depósitos intracelulares de calcio y los distintos agentes endógenos como la anandamida, bradicinina y lipooxidasas; la activación ocurre a través de segundos mensajeros como proteínas G, fosfolipasas C y proteína cinasa C (Martínez *et al.*, 2015).

Por otro lado, este receptor también es activado por pH ácido, estados óxido reducción intracelular y cargas electrostáticas y genera una apertura de canales iónicos permeables a cationes como el calcio; produciendo una despolarización de membrana en el axón nociceptivo (Veronesi y Oortgiese, 2006; Karlsten, 2017).

Lo anterior describe la fase 1 de activación del receptor, conocida como fase de excitación, mientras que la segunda fase o fase de analgesia ocurre seguidamente por una disminución de pronociceptores, como la sustancia P; explicando efectos adversos, entre ellos prurito, quemazón, vasodilatación cutánea e hiperalgeia al calor (Martínez *et al.*, 2015). Los estímulos parecen alterar la conformación y estabilidad de proteínas del receptor a través de residuos de aminoácidos, lo cual resulta en una afluencia de iones e interrupciones de la puerta estructural (Veronesi y Oortgiese, 2006).

Mecanismo de acción anestésico del receptor TRPV1

Leffer *et al.* (2008) afirman que la lidocaína activa los receptores TRPV1, al ser un receptor polimodal, esto significa que por diversos medios se sensibiliza, también los irritantes químicos como vanilloides, protones, etanol, alcanfor y poliaminas lo activan. Estudios en ratas demuestran que la lidocaína induce un aumento de calcio en el ganglio de la raíz dorsal, casi en las mismas células que actúa la capsaicina. Así bien, los autores afirman que otros anestésicos locales (mepivacaína, bupivacaína, procaína y tetracaína) activan el canal transitorio de la proteína TRPV1 por un aumento en las concentraciones de iones de calcio, lo cual explica el dolor similar al ardor producido por la inyección subcutánea o intradérmica. Además, el pH bajo en las soluciones inyectables contribuyen al dolor por el estímulo ácido del receptor, el cual desaparece por el bloqueo de la conducción neural del anestésico local.

Efectos termonociceptivos del receptor TRPV1

Según Veronesi y Oortgiese (2006), la sensibilidad de este receptor a múltiples factores fisicoquímicos, como la temperatura y acidez, y su distribución abundante sobre el cerebro y otros órganos en sistemas periféricos sugieren que es la clave de la inflamación asociada a

químicos ambientales. El rol que juega este receptor en la iniciación y modulación de la inflamación neurogénica propone factores que influyen en la expresión funcional, también pueden influenciar la respuesta del organismo a xenobióticos inflamatorios. Un determinante de esto es la genética pues explica las diferencias individuales de acuerdo a las toxicidades respiratorias y enfermedades relacionadas con la exposición química (Veronesi y Oortgiese, 2006).

Uno de los efectos que produce este receptor corresponde a la modificación de temperatura corporal, ya que puede causar hipotermia o hipertermia al ser estimulado. Dependiendo del objetivo que se requiera, este efecto puede corresponder a un efecto positivo o a un efecto adverso que puede cambiar el curso del tratamiento. Un agente antagonista de este receptor puede provocar hipertermia que puede ser un efecto adverso no deseado, mientras que un agente agonista puede generar un estado de hipotermia que puede ocasionar efectos positivos en determinados pacientes (Muzzi, *et al.*, 2012; Gomtsyan, *et al.*, 2015).

Sin embargo, el efecto hipotérmico del receptor se correlaciona con protección isquémica, por lo que sugiere que este efecto puede ser usado para aplicaciones farmacológicas específicas. De esta manera, la termorregulación se debe a la modulación de receptores fuera de la barrera hematoencefálica, por lo que puede ser un efecto positivo en el tratamiento de distintas condiciones (Muzzi *et al.*, 2012).

Generalidades del cribado virtual

Descripción del cribado virtual o *screening* virtual

El proceso de descubrimiento de una nueva droga se inicia porque existe un deseo o una condición clínica que no posee los medicamentos adecuados para su tratamiento, lo que motiva a la investigación de un producto apropiado. La investigación inicial genera información para desarrollar una hipótesis en donde la activación o inhibición de una proteína origina un efecto terapéutico en una enfermedad o condición específica (Hughes Rees, Kalindjian y Philpott, 2010).

Con el pasar de los años, el avance tecnológico de la química combinatoria permite desarrollar procesos de descubrimiento de medicamentos de una manera más eficiente, creando importantes bases de datos con bibliotecas de proteínas y enzimas biológicas para una visualización más acertada y acelerada del ambiente fisiológico, por el cual un fármaco puede ser sometido durante su acople molecular con una determinada diana. También la investigación y desarrollo son beneficiados por los métodos *in silico* empleados en la actualidad, ya que hay una simplificación de las fases investigativas, ahorro de recursos y riesgos de fallo durante el proceso de innovación de medicamentos (Ou-Yang *et al.*, 2012).

El uso de técnicas computacionales para el desarrollo y diseño de fármacos alcanza un rango muy amplio para el control, análisis, identificación y optimización de los compuestos en estudio; generando resultados evaluativos de potenciales candidatos para el uso farmacéutico. Ou-Yang *et al.* (2012) definen este como *Computer-aided drug design* o CADD por sus siglas en inglés. A continuación Kar y Roy (2013) exponen por medio de la figura 5 la representación más común de la práctica del descubrimiento de medicamentos durante el proceso de *screening* virtual.

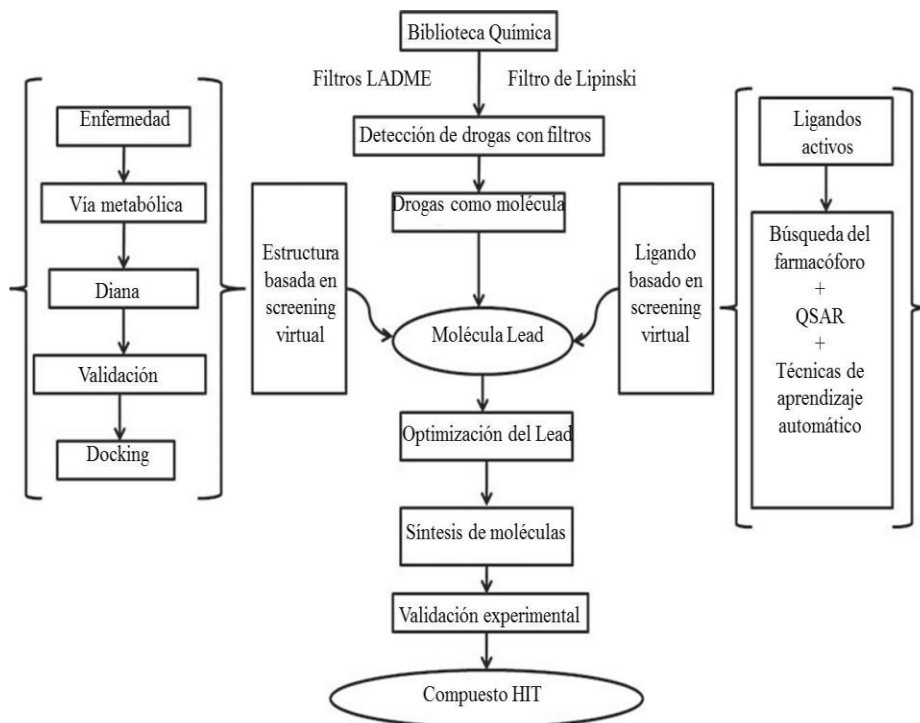


Figura 5. Clasificación de los diseños moleculares

Fuente: Kar y Roy, 2013

La clasificación del diseño molecular se puede estudiar con base en su estructura, su interacción con el ligando y sus secuencias. Los primeros, por ejemplo, se basan en el acoplamiento molecular o *docking* y diseño de nuevas drogas, los cuales se obtienen principalmente de estructuras cristalinas, información recopilada por resonancia magnética nuclear, rayos X y homología en los modelos (Ou-Yang *et al.*, 2012).

Por otro lado, el diseño basado en la interacción del ligando es funcional cuando no hay estructuras tridimensionales que se puedan utilizar como dianas. En este método se mencionan las relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR), el análisis del campo molecular, el diseño y búsqueda de farmacóforos y la similitud bidimensional y tridimensional; estos parámetros originan información acerca de la naturaleza fisicoquímica de las interacciones, lo que permite la predicción y optimización en el proceso de desarrollo.

Asimismo, el diseño basado en la secuencia se utiliza como herramienta en situaciones donde no se cuenta ni con la estructura del receptor ni con información del ligando. Por

consiguiente, el análisis y la comparación de las secuencias proteicas son útiles para la identificación de potenciales dianas (Ou-Yang *et al.*, 2012).

Scoring o puntuación del acople molecular

Uno de los pasos que se siguen en el desarrollo de moléculas corresponde al *scoring*, el cual es una función que se utiliza para aproximar la energía libre de unión entre la proteína y el ligando en cada posición del *docking*, es decir, evalúa la calidad de posiciones del *docking*. La función de *scoring* se basa en la afinidad de unión de una molécula con su receptor y se representa como la suma de los términos independientes.

Por lo tanto, cada ligando tiene un algoritmo del *docking* que produce usualmente un gran número de soluciones. Lo primero que realiza el *scoring* es clasificar las soluciones de acuerdo a su calidad, o sea, el que presente las mejores características. Lo segundo que lleva a cabo consiste en acomodar los resultados del *docking* a partir de las afinidades relativas de unión de diferentes ligandos. La función para clasificar las posiciones de cada ligando puede ser distinta a la que se usa para clasificar ligandos (Tuccinardi, 2009).

Estas funciones se clasifican en físicas, empíricas o basadas en el conocimiento. El *scoring* físico se basa en los campos de fuerza y la afinidad de unión es estimada por la suma de las fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals. El *scoring* empírico se basa en las propiedades físicas de la unión, como los puentes de hidrógeno, contactos hidrofóbicos y cambios entrópicos. Mientras que el *scoring* basado en conocimiento previo se caracteriza por análisis estadístico de estructuras complejas determinadas experimentalmente (Tuccinardi, 2009).

Desarrollo de moléculas *hits* y *leads*

Para iniciar el proceso del descubrimiento de un nuevo fármaco, se identifica un objetivo, el cual requiere de estudios previos antes de continuar con la fase de descubrimiento de un *lead*. El objetivo corresponde a un término que se aplica a distintas formas biológicas que pueden

incluir, por ejemplo, proteínas y genes. Para ser considerado un objetivo factible, tiene que cumplir ciertos aspectos; algunos de ellos son que debe ser eficaz, seguro, poseer necesidades clínicas y comerciales, pero sobre todo que sea viable a un acople molecular.

Un objetivo macromolecular quiere decir que es accesible a molécula de la droga, el cual al unirse genera una respuesta biológica que puede ser medida. En la identificación del objetivo, se procede a validar su actividad y determinar su modulación en pacientes enfermos (Hughes *et al.*, 2010).

Posteriormente, se prosigue a identificar el *hit* por medio de diversos ensayos para distinguir moléculas *hit*. Uno de estos ensayos es la proyección de alto impacto (HTS, por sus siglas en inglés), el cual implica la detección de toda la librería de compuestos contra el objetivo identificado. La meta de este ensayo, y otros similares, consiste principalmente en distinguir moléculas que interactúan con el objetivo, y así tener una librería de *hits* potenciales a ser *leads* (Hughes *et al.*, 2010).

Una vez obtenida la serie de *hits*, se optimizan para producir compuestos más potentes y selectivos que posean propiedades farmacocinéticas adecuadas y, de esta manera, examinar su eficacia en distintos modelos, conocidos como *leads*. Las moléculas que no cumplen con los criterios deseados, se descartan y las que sí los cumplen se consideran para efectuar más ensayos con el fin de lograr su optimización.

Dichos criterios abarcan la potencia y selectividad del objetivo, además de características fisicoquímicas y los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. En estos ensayos se determina la actividad de las moléculas en el objetivo identificado, así como la solubilidad y la permeabilidad de la molécula para poder actuar adecuadamente en los pacientes (Hughes *et al.*, 2010).

Luego, se prosigue con el descubrimiento del *lead*, en donde una molécula *lead* corresponde a un compuesto o una serie de compuestos que poseen actividad y selectividad probada de forma virtual, y cumple con ciertos criterios de desarrollo de fármacos como, por

ejemplo, originalidad, patentabilidad y accesibilidad, por métodos como extracción o síntesis (Blanco, 2017).

Una vez determinado el *lead* o la serie de *leads*, se prosigue a optimizarlos para mantener propiedades favorables mientras se mejoran las deficiencias en dicho compuesto. Los compuestos que se encuentran en esta fase cumplen los objetivos iniciales de la optimización y están listos para la última caracterización antes de ser declarados candidatos preclínicos (Hughes *et al.*, 2010).

Seguidamente, cuando no demuestre tener toxicidad en modelos celulares y animales, se convierte en un candidato clínico. Por último, si este *lead* cumple con los criterios de seguridad y eficacia en humanos y supera las limitaciones de comercialización, se convierte en una nueva entidad farmacológica (Blanco, 2017).

Acoplamiento molecular (*docking*) basado en *screening virtual*

El cribado virtual fundamentado en el acoplamiento molecular o *docking* es una de las técnicas más utilizadas en los métodos de diseño basado en estructura. Se rige en principio por la precisión del acople, por la precisión de puntuación o *scoring* y por la eficiencia computacional. Los procesos de optimización en los programas de *docking* virtual tienen el único objetivo de mejorar la energía de unión, la complementariedad estructural o la complementariedad química (Kar y Roy, 2013)

El *docking* se divide en los subtipos basados en la búsqueda de métodos y en los basados en las funciones de *scoring* a través de algoritmos. A la vez, los basados en la búsqueda de métodos se clasifican en el método de Monte Carlo y el algoritmo genético. El método de Monte Carlo es uno de los procedimientos de simulación más utilizados y reconocidos y consiste en la generación de estados conformacionales de baja energía. El sistema realiza movimientos aleatorios fundamentados en la probabilidad de Boltzmann con el propósito de aceptar o rechazar cada conformación. El movimiento aleatorio del ligando permite la búsqueda local del espacio,

tomando en cuenta la condición del sistema, por lo tanto, en una disminución de la temperatura también hay una disminución de la energía.

Por otro lado, el método del algoritmo genético es una técnica adaptiva basada en las ideas evolutivas de selección y genética, haciendo uso de poblaciones que presentan mutaciones y transformaciones cruzadas. El algoritmo mantiene una presión selectiva dirigiéndose a una solución óptima, viéndose un intercambio de información aleatorio para la exploración del espacio de búsqueda (Kar y Roy, 2013).

Existen programas de acoplamiento molecular que se emplean para posicionar distintas moléculas pequeñas dentro de una representación tridimensional de la estructura de la proteína. Por lo que se desarrollan varios programas para permitir la generación de diferentes conformaciones de ligandos como parte del proceso de acoplamiento. Algunos de estos programas corresponden a DOCK, AutoDock, FlexX, Hammerhead, GOLD, Darwin, entre otros (Cruz, 2015; Patrick, 2013).

El programa DOCK utiliza un método donde un algoritmo identifica enlaces rotables presentes en un ligando, posibilitando determinar regiones rígidas y flexibles. Seguidamente, la molécula es dividida en componentes moleculares. El fragmento más rígido se define como el anclaje y se encuentra acoplado por complementariedad de forma (Patrick, 2013).

Propiedades fisicoquímicas utilizadas como descriptores moleculares

El uso de propiedades químicas para predecir las características de un fármaco se fundamenta en los descriptores moleculares mediante filtros o reglas con criterios preestablecidos que limitan en rangos aceptables las propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas a fármacos (tabla 4) (Tian, Wang, Li, Li, Xu y Hou, 2015). El objetivo de estas reglas consiste en filtrar moléculas con problemas de absorción potenciales. No obstante, estas reglas no proveen un estimado de la absorción del compuesto o sobre el mecanismo de transporte (Georges, 2011).

En el proceso de selección de moléculas por descriptores moleculares se desarrollan los conceptos de *drug-likeness* y *lead likeness*. El término *drug-likeness* (similar a drogas conocidas) ayuda a definir mejor las características estructurales o propiedades moleculares de una biblioteca de moléculas. También descarta moléculas que posean baja probabilidad de biodisponibilidad oral. Mientras el concepto de *lead-likeness* ayuda a racionalizar los criterios de selección de *leads* (Georges, 2011).

Lead-likeness quiere decir similar a *leads* conocidos y corresponde a una guía táctica que permite seleccionar un punto de inicio para la optimización química que ofrece la mejor opción de desarrollar moléculas similares a las drogas al final del proceso de descubrimiento. Existen características moleculares que se conoce causan toxicidad, falta de biodisponibilidad u otros efectos no deseados. Para evitar estas situaciones, se definen una serie de filtros que se aplican a librerías de moléculas con el objetivo de eliminar estas características y tener moléculas con las propiedades adecuadas para ser utilizadas (Georges, 2011).

Tabla 4. Definición de los descriptores moleculares

Lipinski	La regla de los cinco de Lipinski estudia el peso molecular, el logP y la capacidad de donar o aceptar hidrógenos. En su estudio establece que cerca del 90 % de los fármacos cumplen este criterio y se utiliza en la elección y predicción de la absorción por vía oral (Lipinski Lombardo, Dominy y Feeney, 2001).
Ghose	El filtro de Ghose estudia el cumplimiento del LogP, el peso molecular, la refractividad molar y el número total de átomos. Ghose en este filtro define rangos preferibles para estos parámetros fisicoquímicos, lo cual hace más restrictivo los criterios de aceptación (Ghose, Viswanadhan y Wendoloski, 1999).
Muegge	Muegge estudia el peso molecular, la cantidad de anillos, los átomos de carbono, el logP, los aceptores y donares de hidrogeno, los enlaces rotables y el área polar superficial. Este último es incluido como contraparte del LogP, ya que se define como la suma de los átomos polares en la superficie de la molécula (Muegge, 2003).
Veber	El filtro Veber sugiere que es de importancia analizar la biodisponibilidad oral de un medicamento independientemente a la masa molecular. Así, incluye en su filtro los enlaces rotables, el área polar superficial y los donares o aceptores de hidrógeno (Veber, Johnson, Cheng, Smith, Ward y Kopple, 2002).
Biodisponibilidad	Para predecir la biodisponibilidad oral de un fármaco, es necesario que cumpla con los rangos dados por Chemaxon (2015) en cuanto a la

	masa molecular, el logP, los enlaces rotables, el área polar superficial, los anillos aromáticos y los donares y aceptores de hidrógeno.
<i>Lead likeness</i>	Por último, Oprea, Davis, Teague y Leeson (2001) sugieren que los prototipos de fármacos deben mostrar similitud estructural a medicamentos ya aprobados, así como ser susceptibles a un proceso de optimización, contemplando buenas características del sistema ADME. En este filtro se incluyen la masa molecular, el logP, la cantidad de anillos, los enlaces rotables y los donares y aceptores de hidrogeno.

Fuente: Elaboración propia

Indicadores del acople molecular: energía libre de Gibbs

La energía libre de Gibbs es la energía de un sistema que puede convertirse libremente en trabajo útil a temperatura y presión constante. Para cualquier reacción química a temperatura y presión constante, la variación de la energía libre es directamente proporcional a la diferencia entre la energía libre de los productos menos la de los reactivos. En un sistema no aislado, para que un proceso ocurra de forma espontánea, la energía libre de Gibbs disminuye, por lo que puede realizar trabajo útil (Bottani, Odetti, Pliego y Villarealm 2006; Ayensa, 2017).

Asimismo, para que un proceso sea espontáneo debe ir acompañado de una disminución de la energía libre. Cuando en un proceso, a presión y temperatura constantes, la energía libre permanece constante, el sistema está en equilibrio. En el caso de cualquier proceso donde la energía libre aumenta, se dice que es un proceso forzado (Bottani *et al.*, 2006).

La energía libre de Gibbs se puede utilizar como un parámetro para describir la interacción de los patrones de unión entre la molécula y el objetivo. Por medio de este parámetro se mide la magnitud y describe la probabilidad de la ocurrencia de los procesos biológicos. De esta manera, un evento de unión que sucede con una energía libre negativa, ocurre espontáneamente. No obstante, si se obtiene una energía libre positiva, la unión no se presenta de forma espontánea, pero requiere de energía para que suceda la interacción (Garbett y Chaires, 2012).

La energía libre de Gibbs también se encuentra acompañada de cambios estructurales ya sea en el compuesto o en la enzima. Esto provee un medio para definir las contribuciones energéticas de tipos específicos de interacciones entre grupos de la enzima y funcionalidades en los compuestos a la interacción global de enlace (Copeland, 2013).

CAPÍTULO 3. MARCO METODOLÓGICO

Este apartado abarca los métodos y procedimientos por utilizar durante la elaboración del trabajo de investigación, que emplea técnicas de ensayos *in silico*. Además se presenta el enfoque y diseño de investigación, los instrumentos requeridos para la recopilación y análisis de datos, las distintas variables por evaluar en la creación de la biblioteca y el acople molecular.

Enfoque

Este trabajo de investigación tiene un enfoque cuantitativo, al caracterizarse por el análisis y tratamiento de datos e información de las distintas propiedades fisicoquímicas del espilantol y los derivados moleculares de este. Asimismo, busca estudiar los resultados del anclaje o acople molecular entre el receptor TRPV1 y los derivados moleculares.

Diseño

Hernández, Fernández y Baptista (2014) comentan que el enfoque cuantitativo debe contener un diseño de investigación que permita visualizar la información más actual de manera práctica y confiable para responder preguntas, cumplir objetivos propuestos y someter las hipótesis a prueba.

La investigación también posee características de un diseño transeccional descriptivo, debido a que pretende clasificar y describir las propiedades moleculares de los derivados del espilantol, el impacto fisicoquímico en el acomodo espacial del receptor involucrado y los efectos del mismo en el tratamiento de dolor (Hernández *et al.*, 2014).

Objetos de investigación

La biblioteca virtual de los derivados del espilantol es el principal objeto de estudio y fuente poblacional para la búsqueda de la optimización de la molécula con actividad anestésica y potencial farmacológico. El estudio se realiza sobre la molécula *hit* más estable y con mejores

propiedades toxicológicas y farmacodinámicas, la cual es seleccionada como resultado del análisis de las características fisicoquímicas en el anclaje molecular.

Variables

A continuación se exponen las variables con su respectivo concepto e instrumento por utilizar, mediante un parámetro medible y estandarizado para la selección o filtrado riguroso de las moléculas con mejores actividades (tabla 5). Estas variables son algunas de las utilizadas por Cruz (2015) y Blanco (2017) en su metodología de investigación.

Tabla 5. Variables

N°	Variable	Conceptual	Operacional	Instrumental
1	Masa molecular	Representa la suma de las masas atómicas en una molécula (Chemaxon, 2015).	Lipinski, biodisponibilidad, Ghose, Muegge	Biblioteca virtual
2	Logaritmo del coeficiente de reparto entre agua y n-octanol (LogP)	Es una relación de concentraciones de un compuesto no ionizado en dos fases de disolventes inmiscibles (agua y n-octanol) en equilibrio. LogP es la medida logarítmica en base 10 del coeficiente (Chemaxon, 2015).	Lipinski, biodisponibilidad, Ghose, Muegge	Biblioteca virtual
3	Área polar superficial	Está formado por los átomos polares de una molécula. Muestra una buena correlación con el transporte molecular pasivo a través de membranas, y así permite la estimación de las propiedades de transporte de fármacos (Chemaxon, 2015).	Biodisponibilidad, Muegge, Veber	Biblioteca virtual
4	Donares de	Es el cálculo de los donares y	Lipinski,	Biblioteca

	puentes de hidrógeno	aceptores atómicos de hidrógeno. Se toman microespecies y proporciones de donares y aceptores según diferentes valores de pH (Chemaxon, 2015).	biodisponibilidad	virtual
5	Aceptores de puentes de hidrógeno		Lipinski, biodisponibilidad	Biblioteca virtual
6	Refractividad	Está fuertemente relacionada con el volumen de las moléculas y las fuerzas de dispersión de London que tienen efecto importante en la interacción fármaco-receptor (Chemaxon, 2015).	Ghose	Biblioteca virtual
7	Número de átomos	Un átomo se define como la unidad básica de un elemento que puede intervenir en la combinación química (Chang, 2007).	Ghose, Muegge	Biblioteca virtual
8	Números de enlaces rotables	El enlace rotable se define como cualquier enlace sencillo, que no está en un anillo, unido a un átomo pesado no terminal (Veber <i>et al.</i> , 2002).	Biodisponibilidad, Muegge, Veber	Biblioteca virtual
9	Número de anillos	Un anillo es un compuesto cuyos átomos están conectados para formar un ciclo (Smith y March, 2007).	Muegge	Biblioteca virtual
10	<i>Docking</i>	Es un término utilizado para los esquemas computacionales, en el cual se intenta encontrar el mejor acople entre la diana y el ligando (Halperin <i>et al.</i> , 2002). El proceso comienza con la aplicación de algoritmos de acoplamiento que	Diseño de unión con el receptor	Modelaje por anclaje molecular

		enlazan las moléculas en el sitio activo de la diana (Kitchen <i>et al.</i> , 2004).		
11	Scoring	Función que predice la actividad biológica a través de la evaluación de las interacciones entre los compuestos y las dianas potenciales y se basan en las interacciones de los compuestos mediante aproximaciones de la estructura y sus propiedades electroestáticas (Kitchen, Decornez, Furr y Bajorath, 2004).	Energía de unión con el receptor	Modelaje por anclaje molecular
12	Energía libre de Gibbs	Es la energía libre necesaria para realizar un trabajo (Chang, Chen y Gilson, 2007). Es determinante como criterio de aceptación; menor energía, mayor afinidad con el receptor.	Energía de unión con el receptor	Modelaje por anclaje molecular

Fuente: Cruz, 2015; Blanco, 2017

Por otro lado, dado que este trabajo de investigación utiliza los datos y la metodología propuesta por Cruz (2016) para el análisis de resultados de los parámetros fisicoquímicos, donde se toman como referencia los parámetros de 1380 fármacos aprobados por la FDA para ser comparados con los 101 de la biblioteca virtual, se decide comparar solo los datos de los medicamentos comercializados, puesto que hay mayor similitud en las estructuras de las moléculas sintéticas con respecto a la complejidad de muchos los productos naturales.

Instrumentos de recolección de información

Durante este trabajo de investigación es esencial el uso de computadoras, programas informáticos y técnicas virtuales para desarrollar la biblioteca y el cribado molecular, por lo que los datos son generados como aplicaciones como Microsoft Excel (Microsoft 2010), UCSF Chimera (Universidad de California San Francisco, Diciembre 2016, Versión 1.11.2), Marvin Sketch (ChemAxon 2014), Marvin View (ChemAxon 2014), PYRx Virtual Screening tool (Python Prescription, 2010, versión 0.8).

La información teórica científica y conceptual es obtenida por medio de artículos científicos, revistas científicas, libros, bases de datos y revisiones bibliográficas.

Procedimiento de recolección y análisis de los datos

Para obtener la biblioteca virtual por medio de un cribado molecular, se debe establecer un procedimiento de recolección de la información, el cual se muestra a continuación. Cabe mencionar que este procedimiento se planea realizar cien veces para obtener la mayor cantidad de derivados del espilantol y así aumentar las posibilidades de tener una mejor molécula *hit*.

Fase I. Diseño del ligando

El primer punto de este trabajo de investigación es el desarrollo de la biblioteca virtual, el programa Marvin Sketch permite el diseño bidimensional de cada uno de los 101 modelos por utilizar. La herramienta es capaz de dibujar sobre el espilantol con el fin de obtener análogos derivados de este. Cada molécula es sometida a dos o más modificaciones estructurales para agregar nuevas características fisicoquímicas.

Seguidamente, en Marvin View se pueden visualizar las estructuras de manera tridimensional, las cuales son guardadas en una carpeta con numeración del 1 al 101. Por consiguiente, conforme el diseño de una molécula se encuentre listo, se recopilan los datos en un documento de Excel, el cual es programado mediante un algoritmo de función condicional

anidada, esto facilita el análisis de resultados a la hora de seleccionar las moléculas por el cumplimiento de los distintos filtros. Es necesario señalar que se toman 8 derivados del espilantol identificados por Prachayasittikul, *et al.* (2013) para ser incluidos en la biblioteca, con el propósito de analizar otros metabolitos con características similares al espilantol.

Cada molécula contiene un código alfanumérico que es una identificación estructural química y física, este código se llama SMILES. El SMILES es desplegado por Marvin Sketch y funciona para obtener las características de cada molécula.

Fase II. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los derivados

Con cada código SMILES se obtienen las propiedades fisicoquímicas por analizar, estas son calculadas con la herramienta Marvin Sketch. Luego deben ser sometidas a los filtros o criterios de aceptación establecidos por Lipinski, Ghose, Muegge, Veber, biodisponibilidad y *Drug Lead likeness*. Estos rangos determinan una selección por descarte, ya que con solo un parámetro no cumplido la molécula no tiene el valor farmacológico deseado; al contrario, puede alcanzar características no óptimas para la biodisponibilidad oral.

Por lo anterior, el diseño molecular en la fase I debe contemplar estas posibilidades de fallos estructurales y ser meticuloso a la hora de agregar grupos funcionales orgánicos que provean nuevas características. A partir de este análisis, se seleccionan las mejores moléculas que cumplan con todos los parámetros establecidos y alcancen la mejor energía de unión durante el *docking*; la molécula con mejor energía de unión es la candidata final para la fase IV.

Fase III. Anclaje molecular

Por medio del sitio web Protein Data Bank Japan se obtiene el archivo del modelo tridimensional del receptor TRPV1, para utilizarlo durante el acople con el ligando. El rastro del receptor se halla con el PDB 5IRX, el cual especifica un método experimental de microscopía electrónica a una resolución 2.95 Å. Este archivo funciona en el primer punto por evaluar de esta metodología, al facilitar la definición la diana y a partir de ahí el acople molecular. Utilizando la

herramienta Chimera se preparan las estructuras orgánicas, tanto el receptor como los ligandos seleccionados.

En PYRx Virtual Screening tool se realiza el acople molecular de todos análogos para definir el sitio de unión de la molécula y el receptor. Esto se lleva a cabo por medio de las interacciones de los aminoácidos del receptor y los átomos de la molécula. El Gridbox definido en los acoplos moleculares se efectúa con las siguientes especificaciones: *Center* X: 115 Y: 140 Z: 125, *Dimensions* X: 23 Y: 18 Z: 20, tomando como referencia el *pocket* propuesto por Gao *et al.* (2016). De esta forma se establece por medio de fuerzas termodinámicas la unión y la estabilidad de cada molécula, para encontrar el sitio de unión más acertado. Con Chimera se visualizan los anclajes moleculares y se obtienen distancias de enlaces entre la molécula y el receptor.

Según el procedimiento anterior, se logra una biblioteca virtual de cien derivados análogos del espilantol con su respectivo acople molecular. Este cribado posibilita recopilar información intrínseca de cada molécula, no obstante, se debe formular un procedimiento para hacer el correcto análisis de los datos correspondientes a las regiones funcionales de la diana como sitios de unión y las propiedades fisicoquímicas.

Fase IV. Proceso de optimización de la molécula *hit*

Una vez identificada la molécula candidata, se somete de nuevo a un proceso de diseño molecular para agregarle estratégicamente grupos funcionales distintos, con el fin de conseguir una nueva molécula y optimizarla con respecto al ligando original; sin embargo, en esta ocasión el modelaje es mínimo y de un solo cambio, para obtener un mayor control de las características, dado que el cambio más pequeño puede generar inestabilidades en las propiedades. Así, a la nueva molécula se le aplica el mismo procedimiento de las fases I, II y III. Tomando en cuenta los mismos parámetros, se comparan los resultados para determinar si alcanza una mejor energía de unión.

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Biblioteca virtual de compuestos

Por lo general, las bases de datos de compuestos moleculares están basadas en colecciones de moléculas disponibles con un registro químico. Las grandes compañías farmacéuticas poseen los medios para llevar a cabo los estudios necesarios de diseño y desarrollo de moléculas. Sin embargo, también es posible hacer uso de bibliotecas virtuales por medio de un método *in silico*, las cuales se construyen con pequeños fragmentos de un compuesto orgánico original (Tuccinardi, 2009; Lahlou, 2013).

Las bibliotecas virtuales tienen la misión de establecer una molécula prototipo con las características farmacológicas esperadas, por lo que se deben descartar todos aquellos compuestos que presenten riesgos de toxicidad o efectos adversos relacionados al sitio de unión. De esta manera, el uso de técnicas *in silico* posibilita aplicar distintos filtros para reducir el número de componentes según sus propiedades físicas y funcionalidades químicas. Esto hace que la molécula *lead* tenga un mayor índice de seguridad y eficiencia como modelo a futuro fármaco (Tuccinardi, 2009).

Con frecuencia los protocolos de filtrado se aplican a los compuestos de las bibliotecas con el objetivo de proveer reglas o criterios específicos para obtener una buena biodisponibilidad oral y un número limitado de enlaces rotables, además de eliminar estructuras que contengan una estabilidad química pobre y estén asociadas a un efecto tóxico (Tuccinardi, 2009). Por esta razón, durante el diseño de moléculas se utilizan archivos con formatos .mol2 y .pbd para lograr estados tautoméricos necesarios, así como generar enantiómeros que presenten quiralidad.

Diseño de la biblioteca molecular

Debido a la evidencia científica del espilantol como derivado de un producto natural que presenta gran potencial para ser utilizado como fármaco (figura 6), se decide realizar una biblioteca de compuestos orgánicos donde se toma la estructura original del espilantol como base

para elaborar un total de 101 diseños moleculares. El farmacóforo o estructura biológicamente activa se mantiene intacta en los 101 diseños, al ser el grupo amida el que se encuentra mediado en procesos farmacocinéticos de distribución, metabolismo y eliminación. La estructura del espilantol es de carácter hidrofóbico, esta característica es dada por la cadena alifática insaturada, la cual tiene capacidad de atravesar membranas biológicas (Lipinski *et al.*, 2001).

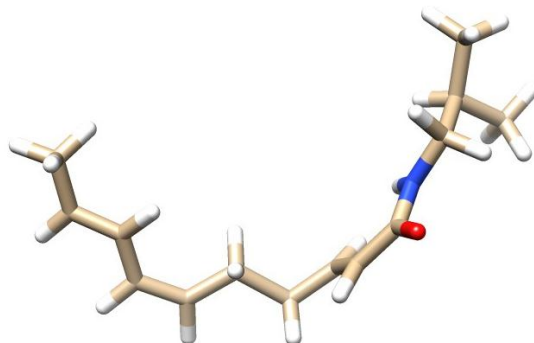


Figura 6. Estructura tridimensional del espilantol proyectada en Chimera

Fuente: PubChem, 2017

La estrategia para iniciar el diseño de un anestésico local tipo amida se basa en tres pilares. La mayoría de los anestésicos locales poseen un anillo de benceno sustituido, unido a una amida por medio de una cadena alifática que contiene un enlace éster o amida. Todos los anestésicos, ya sean tipo amida o éster, tienen una estructura química superponible que se puede dividir en tres subunidades (figura 7) (Cousins y Mather, 1980). La primera es un anillo aromático sustituido, responsable de la liposolubilidad de la molécula. Por otro lado, la adición de benceno le provee estabilidad a la molécula, debido a la resonancia de la densidad electrónica en los enlaces π (McMurry, 2008).

La segunda subunidad se basa en la cadena hidrocarbonada o alifática y la unión, ya sea amida o éster. La diferencia entre amida o éster radica principalmente a nivel metabólico y condiciona la velocidad metabólica y, por tanto, la duración del efecto, lo cual está estrechamente relacionado con la toxicidad específica de cada fármaco. Por otro lado, la eliminación del medicamento es disminuida en recién nacidos, en hepatopatías y en insuficiencia renal (Flórez, 2014; Cousins y Mather, 1980).

La tercera subunidad determina la hidrosolubilidad de la molécula y la unión a las proteínas plasmáticas. Está conferida por el grupo amida, ya sea terciaria o cuaternaria, donde las variables de los sustituyentes del átomo de nitrógeno causan distintos caracteres de solubilidad (Flórez, 2014; Cousins y Mather, 1980).

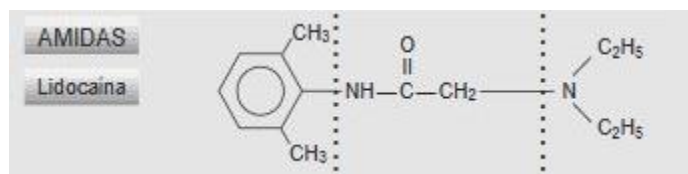


Figura 7. Subunidades estudiadas en el diseño de anestésicos locales

Fuente: Cousins y Mather, 1980

Según Flórez (2014), todos los anestésicos locales son bases débiles, con valores de pKa que oscilan entre 7,5 y 9, esto indica que a pH fisiológico el anestésico local se encuentra ionizado en gran cantidad, sin embargo es la fracción no ionizada la que atraviesa las vainas lipófilas del nervio y es responsable del acceso de la molécula hasta la membrana axonal.

Propiedades fisicoquímicas de las moléculas incluidas en la biblioteca virtual

Con el objetivo de analizar y evaluar la factibilidad de las moléculas diseñadas en la biblioteca virtual, se establecen parámetros topológicos, estructurales y fisicoquímicos para definir los aspectos de mayor relevancia y que pueden influir en la predicción del futuro prototipo de fármaco. Cada molécula debe mostrar las propiedades fisicoquímicas necesarias para ser consideradas como óptimas en el desarrollo de medicamentos; deben ser propiedades de fácil análisis y que permitan realizar mejoras durante una posterior fase de optimización (Cruz, 2015; Oprea *et al.*, 2001).

Gracias a los avances de las técnicas computacionales, se economizan recursos antes de la síntesis de las moléculas deseadas, por medio de programas de simulación donde se captura de forma confiable y segura el cálculo de las propiedades que satisfagan criterios como masa molecular, logP, número de aceptores y donores de hidrógenos, refractividad molar, área polar superficial, enlaces rotables y cantidad de átomos pesados y de anillos aromáticos. Es esencial

tener el conocimiento necesario de todas las propiedades fisicoquímicas para facilitar el diseño de medicamentos, ya que estas son las que condicionan la biodisponibilidad oral y la permeabilidad a través de las membranas (Cruz, 2015; Ghose *et al.*, 1999; Lipinski *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002; Muegge, 2003).

Ciertos parámetros tienden a aumentar con respecto a otros; en otras palabras, el área polar superficial y el número de donares y aceptores de hidrógenos incrementan con la masa molecular, al igual que el logP aumenta con la adición carbonos y grupos funcionales no polares (Veber *et al.*, 2002; Cruz, 2015). Por otro lado, los parámetros que se relacionan con el tamaño molecular se ven reflejados en el número total de átomos y la refractividad molar, lo cual funciona para la correcta predicción de biodisponibilidad oral (Oprea *et al.*, 2001).

También es importante mencionar que la unión con el receptor depende del paso de la molécula por las membranas permeables y a la vez se ve mediada por las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas de la molécula con el sitio de unión que recaen sobre el LogP y la refractividad (Cruz, 2015; Ghose *et al.*, 1999). A continuación se muestran los resultados del tratamiento estadístico realizado en los parámetros fisicoquímicos de la biblioteca de moléculas (tabla 6), esta es de apoyo para comparar las medias y medianas de los parámetros estudiados por Gu *et al.* (2013) para los 1380 fármacos aprobados por la FDA.

Tabla 6. Resultados del tratamiento estadísticos en los parámetros fisicoquímicos

Parámetro fisicoquímico	Media	Desviación estándar	Mediana	Moda
Masa molar (g/mol)	237.74	40.38	231.34	210.28
LogP	1.82	1.50	1.97	2.26
Número aceptores de hidrógeno	2.35	1.14	2.00	2.00
Número donares de hidrógeno	1.54	0.78	1.00	1.00
Refractividad molar	71.30	13.28	69.73	64.91

Número total de átomos	36.48	6.95	35.00	33.00
Área polar superficial (Å)	48.08	17.90	49.33	29.10
Cantidad de anillos	0.97	0.71	1.00	1.00
Enlaces rotables	5.06	2.45	5.00	5.00

Fuente: Elaboración propia, 2017

Masa molar

Según Cruz (2015) y Veber *et al.* (2002), la masa molecular es una de las propiedades que caracteriza el tamaño molecular, la diversidad estructural y uno de los parámetros básicos para determinar la biodisponibilidad oral, pues a menor masa molecular, mayor biodisponibilidad. Los rangos establecidos por los distintos filtros que se utilizan para determinar la masa molecular son Lipinski, Ghose, Muegge y biodisponibilidad (tabla 7).

Tabla 7. Rangos establecidos para la masa molecular

Filtro	Rango
Lipinski	Menor a 500 Da
Ghose	Entre 160 y 480 Da, con un rango de preferencia de 230 a 390 Da
Muegge	Entre 200 y 600 Da
Biodisponibilidad	Menor a 500 Da

Fuente: Cruz, 2015

Con este resultado se determina que Ghose es el filtro de mayor restricción a nivel de masa molecular (figura 8), al depurarse 48 moléculas con una masa molecular inadecuada para la biodisponibilidad oral. Por otro lado, todas las moléculas cumplen con el filtro de Lipinski, porque generalmente los productos naturales tienen pesos moleculares altos, debido a la complejidad estructural (Bindseil, Jakupovic, Wolf, Lavayre, Leboul y Van der Pyl, 2001; Cruz, 2015).

No obstante, al ser una molécula relativamente pequeña, el espilantol (221,33 Da) no cumple con el comportamiento adecuado de biodisponibilidad para ser candidato a fármaco según Ghose. A partir de lo indicado, se toma ventaja la proximidad de la masa molecular del espilantol para que la estrategia de diseño contemple el cumplimiento de este valor con la adición de al menos un carbono o nitrógeno.

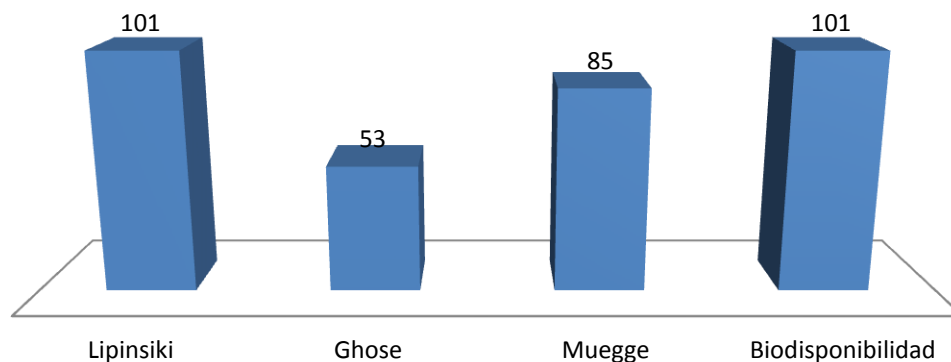


Figura 8. Cantidad de moléculas desarrolladas en esta investigación que cumplen con los filtros de Masa Molecular

Cruz (2015) se refiere a la importancia de la biodiversidad costarricense en el estudio de productos naturales, donde resalta la posibilidad de hallar derivados naturales que cumplan con filtros de predicción para alcanzar una buena biodisponibilidad, a la vez en su análisis comparativo demuestra que tanto las medias y medianas de las masas molares de 197 201 muestras estudiadas por Gu *et al.* (2013), así como 1380 fármacos aprobados por la FDA y además 231 moléculas estudiadas en la biodiversidad costarricense, se encuentran dentro del criterio de aceptación para biodisponibilidad oral.

Por otro lado, tomando como referencia los 1380 fármacos de moléculas pequeñas aprobados por la FDA (Gu *et al.*, 2013), se comparan los datos obtenidos de masa molecular y se determina una media de $237,74 \pm 40,38$ y una mediana de 231,34 contra $360,8 \pm 199,1$ y 322,45 respectivamente. A pesar de tener un resultado menor al de los medicamentos comercializados, es un aporte significativo, dado que la biodisponibilidad aumenta conforme la masa molecular disminuye.

Coefficiente de reparto (LogP)

El coeficiente de reparto entre agua y octanol, también conocido como LogP, determina la hidrofobicidad de una molécula. Mediante técnicas de modelo es posible relacionar varios parámetros y una actividad biológica QSAR (Talevi y Bruno, 2009). De acuerdo con Waring (2010), se necesita un mínimo de 0.8 de LogP para que haya permeabilidad de membrana y aclaramiento renal. A continuación se exponen los rangos establecidos por los distintos filtros para el logP (tabla 8).

Tabla 8. Rangos establecidos para LogP

Filtro	Rango
Lipinski	Menor a 5
Ghose	Entre -0,4 y 5,6 con un rango de preferencia de 1,3 a 4,1
Muegge	Entre -2 y 5
Biodisponibilidad	Menor a 5

Fuente: Cruz, 2015

Con estos parámetros se confirma que Ghose es el filtro que limita los valores de LogP en mayor medida, pero la tendencia de filtrado en las moléculas de la biblioteca virtual se refleja por Muegge (figura 9), ya que la mitad de moléculas no tienen el grado de hidrofobicidad necesario para ser consideradas como prototipos de fármaco.

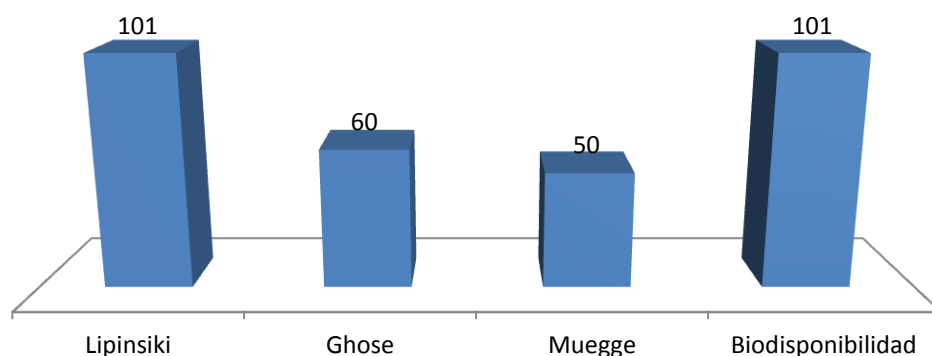


Figura 9. Cantidad de moléculas desarrolladas en esta investigación que cumplen con los filtros de Log P

Al comparar los datos estadísticos de las medias y medianas de Cruz ($2,60 \pm 1,4$ y $2,60$) y los fármacos aprobados por la FDA ($1,89 \pm 2,81$ y $2,64$) con los de la biblioteca virtual ($1,82 \pm 1,50$ y $1,97$), se puede ver la similitud de la permeabilidad que hay con los medicamentos en el mercado y los derivados naturales, no obstante, la mitad de las moléculas que sí cumplen con el coeficiente de reparto deben ser estudiadas individualmente por la influencia que recae en el sistema ADME, en especial respecto a anestésicos locales.

Área polar superficial (APS)

Esta propiedad fisicoquímica es de gran importancia, puesto que determina la penetración de las moléculas a través de membranas neurológicas, es decir, una molécula con un rango menor entre 60 y 70 Å de área polar superficial tiene la capacidad atravesar la membrana hematoencefálica, además es un valor que predice la absorción pasiva transmembrana a nivel intestinal (Kelder, Grootenhuis, Bayada, Delbressine y Ploemen, 1999). Veber, Muegge y el filtro de biodisponibilidad analizan los rangos que deben cumplir los prototipos de moléculas para alcanzar un APS adecuado en el desarrollo de fármacos 0 (tabla 9).

Tabla 9. Rangos establecidos para el área polar superficial

Filtro	Rango
Veber	Menor a 140 Å
Muegge	Menor a 150 Å
Biodisponibilidad	Menor a 200 Å

Fuente: Cruz, 2015

A partir de los datos obtenidos en la biblioteca virtual, se observa que todos los componentes cumplen con el filtro de área polar superficial, además 80 diseños presentan un APS menor a 60 Å, por lo que se prevé la llegada a nivel nervioso. Esto también es un comportamiento habitual en los anestésicos locales porque actúan a nivel nociceptivo deprimiendo el SNC, lo que se refleja en la neurotoxicidad de ciertas reacciones adversas, como la somnolencia, cefalea y parestesia (Morón, 2008).

También el APS define la posibilidad de crear puentes de hidrógenos por medio de la interacción entre los nitrógenos y oxígenos de los diseños, los cuales proveen los caracteres polares de la molécula y los residuos de aminoácidos del receptor; esto es esencial en el diseño molecular, al determinar el tipo de enlace en el sitio unión (Kelder *et al.*, 1999).

Los valores estadísticos obtenidos en la biblioteca virtual (media $48,08 \pm 17,90$ y mediana 49,33) no son comparables con los compuestos analizados por Cruz (2015) ni con los medicamentos aprobados por la FDA ($93,9 \pm 84,1$ y 75,00), ya que por la naturaleza y comportamiento del espilantol y en general de los anestésicos locales se esperaban APS de valores menores, por esta razón no se pueden incluir las moléculas desarrolladas en la biblioteca con los 1380 medicamentos aprobados por la FDA, porque no todos atraviesan membrana hematoencefálica. Esta baja APS se contempla desde el principio del diseño, así como el cuidado de seleccionar un *lead* con un valor que no recaiga en una neurotoxicidad severa.

Refractividad molar

Una de las propiedades fisicoquímicas más usadas en los estudios QSAR es la refractividad molar, la misma está relacionada con la lipofilidad, la masa molar y el volumen estérico (Carrasco, Padrón y Gálvez, 2004). Según Ghose *et al.* (1999), estas propiedades se relacionan con la unión del receptor, la absorción y la biodisponibilidad, al estar mediado en un carácter hidrofóbico y dispersivo de las interacciones de Van der Waals. El filtro de Ghose es el único que contempla la refractividad molar con un valor de 40 a 130 y un rango preferible de 70 a 110.

Utilizar la refractividad molar como parámetro de filtrado es una ventaja a la hora de seleccionar moléculas *hit*, ya que permite predecir interacciones entre ligando-diana (Cruz, 2015). Así, 51 moléculas presentan refractividad molar adecuada y 32 se encuentran dentro del rango preferible. La refractividad molar ayuda a la estimación del tipo de enlace por formar en el sitio de unión, pues describe el tamaño molecular por medio de la masa molecular y el número de átomos, lo cual brinda una idea de la conformación espacial que la molécula puede necesitar para obtener una mejor afinidad en el receptor diana (Ghose *et al.*, 1999).

Donadores y aceptores de hidrógenos

Siguiendo el lineamiento de hallar un prototipo de fármaco en la biblioteca virtual que cumpla con los filtros respectivos para la biodisponibilidad oral, se decide trabajar con el parámetro fisicoquímico de donación o aceptación de hidrógenos. Lipinski *et al.* (2001) afirman que la presencia de estos afecta la permeabilidad de la molécula en la membrana, no obstante los hidrógenos en una molécula son necesarios, al ser un átomo clave en la interacción del sitio de unión para formar enlaces químicos (McMurry, 2008). A continuación se presentan los rangos establecidos por los diferentes filtros para los donares y aceptores de hidrógenos (tabla 10).

Tabla 10. Rangos establecidos para donares y aceptores de hidrógeno

Filtro	Rango
Lipinski	Menos de 10 aceptores Menos de 5 donares
Muegge	Menos de 10 aceptores Menos de 5 donares
Biodisponibilidad	Menos de 10 aceptores Menos de 5 donares
Veber	APS menor a 140 Å o menos de 12 aceptores y donares

Fuente: Cruz, 2015

Kelder *et al.* (1999) explican que se puede hacer una correlación entre el área polar superficial de los átomos poseedores de polaridad y la cantidad de donares y aceptores de hidrógeno que logren hacer los enlaces durante la interacción con el sitio de unión, lo cual se refleja en los resultados obtenidos, donde al igual que el área polar superficial hay un cumplimiento del 100 % de las moléculas para esta propiedad fisicoquímica. El cumplimiento absoluto para la biblioteca virtual en ambos parámetros asegura que haya tanto interacción con la diana como una buena absorción y permeabilidad.

Las medias de los aceptores y donares de hidrógeno de la biblioteca son de 2.35 ± 1.14 y 1.54 ± 0.78 respectivamente y las medianas de 2 y 1. Estos datos son comparables con la tendencia que tienen los medicamentos aprobados para donares y aceptores de hidrógenos, donde los resultados para las medias de aceptores son 5.2 ± 4.2 y los donadores de 2.3 ± 2.6 con medianas de 4 y 2 respectivamente. Sin embargo, la brecha entre los medicamentos aprobados y las moléculas desarrolladas en la investigación es de aproximadamente un 55 %, que indica un punto fuerte por mejorar en el proceso de optimización, pues a pesar tener buena penetrabilidad de membrana, existe el riesgo de tener interacción molecular deficiente para los enlaces formados por puentes de hidrógeno (Cruz, 2015).

Enlaces rotables

Determinar el número de enlaces rotables es esencial en un análisis de predicción de *drug lead likeness*, puesto que a mayor número de enlaces rotables, hay mayor libertad de movimiento (Cruz, 2015). Se debe buscar exhaustivamente la mejor conformación por considerar en la unión con el receptor; si hay mayor rigidez y el movimiento en el espacio disminuye, ocurre una pérdida de entropía y, por tanto, mayor afinidad al receptor debido a que el cambio entrópico es compensado con el intercambio de energía en el ambiente (entalpía). Es decir, en un proceso espontáneo hay también disminución de la energía del sistema (Chang *et al.*, 2007).

La rigidez de una molécula se asocia con la cantidad de anillos, por consiguiente, los anillos proveen estabilidad estructural. Más adelante se analiza el impacto de la cantidad de anillos sobre la molécula, pero es necesario definir el papel de un anillo, en cuanto al grado de rigidez, permeabilidad e interacción que tiene en el diseño molecular. Los filtros que incluyen la cantidad de enlaces rotables como propiedad para ubicar una molécula dentro de un prototipo de fármaco ideal son Veber, Muegge y biodisponibilidad (tabla 11).

Tabla 11. Rangos establecidos para enlaces rotables

Filtro	Rango
Veber	Menos de 10 enlaces
Muegge	Menos de 15 enlaces
Biodisponibilidad	Menos de 10 enlaces

Fuente: Cruz, 2015

Al comparar las medias y medianas de la biblioteca virtual ($5.06 \pm 2,45$ y 5 respectivamente) con los fármacos comercializados (5.5 y 4 respectivamente) (Cruz, 2015), se observan valores similares en los datos, además sabiendo que el 96.03 % de la biblioteca cumple con los tres filtros, se determinan afinidades y permeabilidades adecuadas para un posible prototipo de fármaco.

Cantidad de átomos pesados

Según Ghose *et al.* (1999), relacionando las propiedades descritas de masa molecular y refractividad molar, se puede conocer el tamaño molecular de un ligando y la energía libre de unión. La adición de grupos benceno, anillos heterocíclicos, ésteres, carboxiamidas e hidroxilos alcohólicos tiene como objetivo dar una respuesta de estabilidad estructural, por lo que se liga estrechamente también con el aumento de átomos pesados e interacciones moleculares y a la vez con la permeabilidad de membrana y unión a receptor.

Sin embargo, Reynolds *et al.* (2007) comentan sobre la eficacia del ligando que se estudia la potencia de ajuste óptimo con la proteína receptora. Bajo la comparación de 8000 ligandos y 28 dianas determinan que la afinidad de unión de un ligando es inversamente proporcional al tamaño molecular. Con este criterio, se puede analizar si el ligando tiene un acople adecuado y potente y no el hecho que hayan muchos puntos de contacto entre distintos átomos (Cruz, 2015; Reynolds, *et al.*, 2007).

Ghose *et al.* (1999) incluyen esta propiedad en su filtro para definir la eficiencia del ligando y prediciendo un adecuado tamaño molecular, donde el rango establecido es entre 20 y

70 átomos pesados. De esta manera, el 100 % de los diseños cumplen el parámetro, por lo que la molécula más pequeña es de 23 átomos y la más grande de 62 átomos. En comparación con los medicamentos comercializados, la media se encuentra en 23.5 átomos y la mediana en 22 átomos, mientras que la media de la biblioteca es de $36.48 \pm 6,95$ y la mediana de 35.

Por lo tanto, existe la posibilidad de contar con moléculas que puedan presentar interacciones adecuadas con la proteína, pues a mayor cantidad de átomos, mayor interacciones con la diana. Sin embargo, cada caso se debe estudiar individualmente, debido a que también puede haber afinidad con poco número de átomos, siendo dependiente de la estructura proteica y los residuos determinados en el sitio de unión (Cruz, 2015; Ghose *et al.*, 1999).

Número de anillos

El hecho de estudiar las propiedades fisicoquímicas de los diseños moleculares por separado no supone que no haya relación entre ellas. Como se sugirió, la complejidad y rigidez estructural, la hidrofóbicidad, el grado de afinidad con la diana y la capacidad de atravesar membranas celulares dependen del aumento de la masa molecular, esta última a la vez aumenta proporcionalmente según sea la estrategia de adición de átomos pesados, como por ejemplo agregar grupos funcionales con anillos o heterociclos.

Tabla 12. Rango establecido para la cantidad de anillos

Filtro	Rango
Muegge	Menor a 7 anillos
Biodisponibilidad	Menor a 5 anillos

Fuente: Elaboración propia, 2017

Como la masa molecular del espilantol se encuentra relativamente cercana al rango más estricto de 230 Da, se contempla la inclusión anillos bencénicos y fenólicos como una estrategia adecuada para proveer estabilidad e interacción al ligando. Por esta razón, se decide trabajar con un máximo de tres anillos, pues a diferencia de los productos naturales, los fármacos sintéticos

en el mercado presentan estructuras planas y no tan complejas que superponen estructuras más grandes y con baja biodisponibilidad oral.

Nuevamente el 100 % de los diseños cumple con el parámetro establecido. Dada la la simplicidad del espilantol de no contar con anillos y a la estrategia de encontrar una masa molecular adecuada, se trabaja con una cantidad de anillos razonable y proporcional a la cantidad de átomos pesados que se desea agregar sin sobre pasar los 500 Da (Cruz, 2015).

Así, los fármacos comercializados cuentan con un promedio de 2.7 anillos versus la media de la biblioteca que es de 0.96 ± 0.71 anillos. Este resultado no necesariamente condiciona la masa molecular adecuada del ligando, pero sí la posibilidad de presentar mayor grado de interacción con el receptor. Por lo tanto, se sugiere analizar las estructuras individualmente y someter al ligando a proceso de optimización con inclusión de anillos si necesario para alcanzar la afinidad y permeabilidad esperada.

Cumplimiento de los filtros

Las propiedades fisicoquímicas descritas utilizan distintos filtros con el objetivo de descartar todas aquellas moléculas que no cumplan satisfactoriamente los criterios de selección para alcanzar una adecuada biodisponibilidad oral y semejanza con un fármaco. El análisis comparativo demuestra que los 101 diseños virtuales cumplen por separado una gran mayoría de los criterios *drug likeness*, al igual que los 1380 fármacos aprobados por la FDA. Así, los diseños moleculares presentan una tendencia de distribuciones similares de medias y medianas con respecto a los fármacos aprobados (Gu *et al.*, 2003).

El hecho de utilizar una biblioteca de diseños moleculares da la posibilidad de perfeccionar las moléculas conforme se avanza en el estudio para obtener un mayor número de candidatos que encajen dentro de los parámetros de un prototipo. Sin embargo, los prototipos por lo general están dirigidos a la manipulación y optimización una vez que se hayan seleccionado (Cruz, 2015; Pascolutti y Quinn, 2011). Por ende, la depuración de la mayor cantidad de prototipos acerca un único diseño a la molécula ideal para ser candidata de medicamento.

De los resultados obtenidos a partir de las moléculas diseñadas que cumplen los parámetros estudiados (figura 10), se observa que Lipinski, Veber y biodisponibilidad son filtros con criterios similares que permiten predecir propiedades básicas de estabilidad química y permeabilidad de membrana; aproximadamente el 100 % de la biblioteca cumple estos tres parámetros.

Por su parte, Muegge y Ghose son filtros que incluyen más propiedades por cumplir, por lo tanto, son más restrictivos y funcionales al momento de delimitar el número moléculas, ya que contemplan los mismos parámetros según sea la rigidez, hidrofobicidad, unión a receptor, etc. Además, Ghose excluye una mayor cantidad de moléculas, donde se observan 31 moléculas de 101 diseños, debido a que los criterios presentan un rango preferible para LogP, refractividad molar y masa molecular.

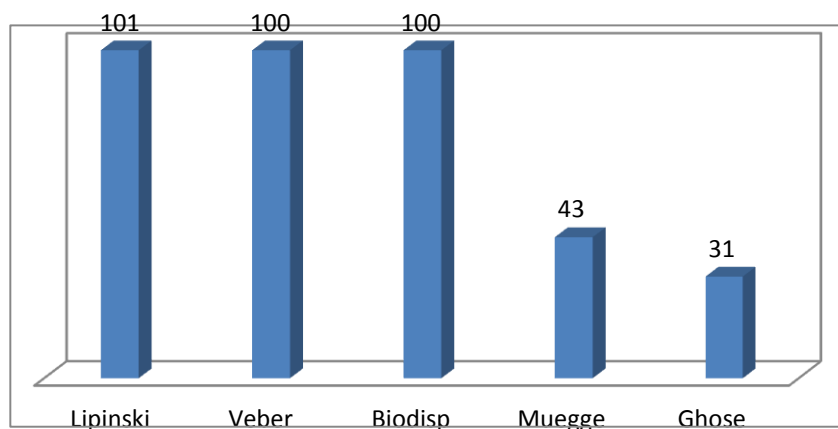


Figura 10. Cantidad de moléculas desarrolladas en esta investigación que cumplen los distintos filtros de selección

Por último, se analizan las moléculas que cumplieran con todos los filtros a la vez, con el objetivo de contemplar todos los criterios y seleccionar el diseño con mejores propiedades fisicoquímicas. Se obtienen como resultado 23 moléculas con parámetros adecuados para ser candidatos a *lead*. No obstante, entre los diseños estudiados se descartan 4 derivados del espilantol, pues a pesar de cumplir con los criterios de aceptación, Lipinski excluye claramente a los derivados de productos naturales porque usualmente utilizan transportadores de membrana, en vez de difusión pasiva (Lipinski *et al*, 2001).

También, se aplica el filtro de *drug lead likeness* para no solo estudiar las propiedades adecuadas de biodisponibilidad, sino también analizar la similitud de los diseños con fármacos aprobados. El filtro de *drug lead likeness* incluye moléculas con una masa molecular menor a 450 Da, un LogP entre -3.5 y 4.5, no más de 4 anillos, no más de 10 enlaces rotables, menos de 5 donadores de hidrógeno y menos de 8 aceptores de hidrógeno (Oprea *et al.*, 2001).

Así bien, se descarta el diseño 54, al no obtener los resultados deseados para que el criterio de *drug lead likeness* (Oprea *et al.*, 2001). De esta manera, se alcanzan un total de 19 moléculas con características adecuadas de prototipo y biodisponibilidad oral.

Selección del objetivo macromolecular (receptor)

La selección de un receptor u objetivo macromolecular conlleva a la identificación de una estructura por microscopía electrónica que presente cualidades potenciales para definir un sitio de unión con la intención de proyectar interacciones que puedan estar involucradas en cambios conformacionales que desencadenen un efecto o respuesta como parte de un cambio esperado en la actividad fisiológica (Blanco, 2017). Las búsquedas en PBD permiten identificar un objetivo macromolecular con una resolución o *spacing* de 2.9 Å. También en esta sección se define el sitio de unión de receptor TRPV1 para moléculas con estructuras similares para el grupo alquilamida.

Por otro lado, el área de la macromolécula es el sitio donde se realiza la unión de los ligandos, esto desencadena una respuesta fisiológica mediada en la conductancia de iones a nivel extracelular. Gao *et al.* (2016) mencionan una interacción de la TPV1 con el residuo Thr-550 que forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo proximal del grupo vanilloide, así como la Ser-512 y la Arg-557 con el hidroxilo del vanilloide.

Antes de definir el sitio de unión, se analizan con la herramienta ExPasy los cuatro dominios principales de la estructura 5IRX, efectuando un alineamiento de las secuencias de aminoácidos presentes en cada cadena. Se obtiene una puntuación del cien por ciento y se confirma que los cuatro dominios siguen exactamente el mismo orden en la secuencia de

aminoácidos, por lo tanto, se decide trabajar con la cadena A para facilitar la interacción visual del ligando con el sitio unión.

Mediante la herramienta Chimera y según la literatura científica, se determina el *pocket* (hendidura en la estructura proteica del receptor) (figura 11), el cual está compuesto por 636 residuos de aminoácidos, entre ellos los correspondientes al sitio activo: Tyr-511, Thr-550 y Glu-570 (Gao *et al.*, 2016).

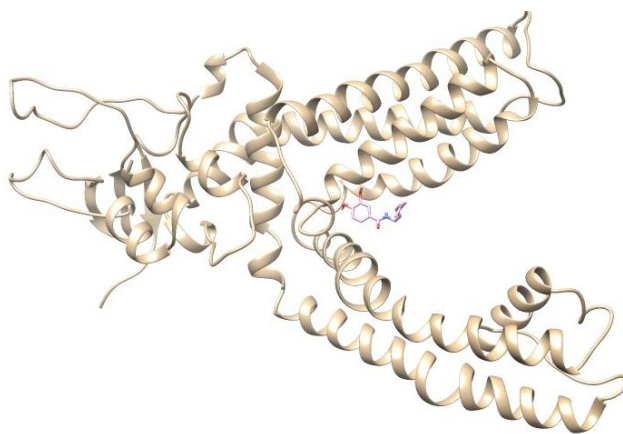


Figura 11. Sitio de unión del objetivo macromolecular utilizando Chimera

Fuente: Gao *et al.*, 2016

Una vez identificado el sitio de unión, se prepara el receptor utilizando Chimera, por lo que se eliminan todas las moléculas de agua, ligandos, iones y ácidos nucleicos que rodean la estructura. La exactitud del cálculo de acoplamiento depende principalmente de las especificaciones para restringir el sitio de unión, por lo cual se define el Gridbox en PyRX (figura 12), donde se aprecian las dimensiones y los aminoácidos específicos para la unión esperada según el *pocket* propuesto por Gao *et al.* (2016).

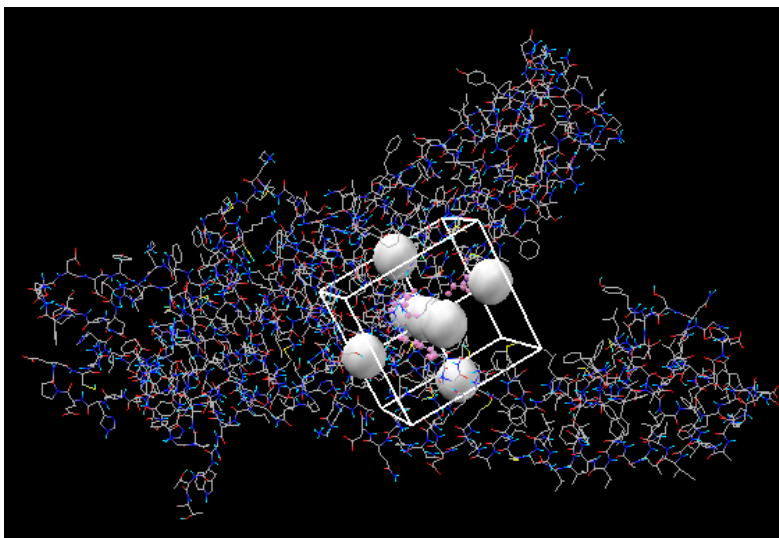


Figura 12. Gridbox de la macromolécula TRPV1 preparada

Fuente: PyRX, 2017

Por otra parte, con intenciones de confirmar y reforzar el argumento del uso del correcto sitio de unión, se compara el espacio propuesto con los estudios de Wei *et al.* (2016), quienes definen que el acople molecular de la L-muralatina, un derivado de cumarinas, interactúa de manera muy similar a la capsaicina, porque estructuralmente ambos presentan un anillo aromático involucrado en la actividad del sitio de unión con la TRPV. Sin embargo, la L-muralatina carece de cola lipofílica, estructura clave para lograr una mayor actividad. Así bien, los autores identifican que los residuos Tyr-511, Met-547, Thr-550 y Glu-570 están mediados en la acción de la L-muralatina, siendo la Tyr-511 un residuo crítico en la formación de puentes de hidrógeno (figura 13).

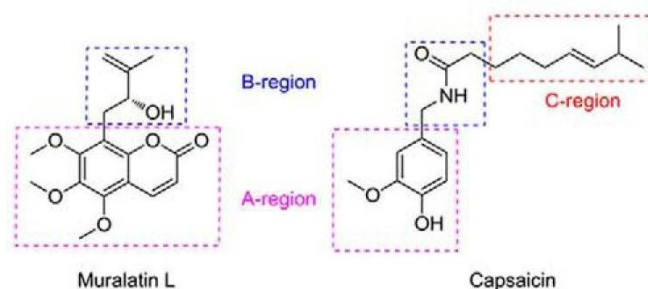


Figura 13. Regiones farmacofóricas de la capsaicina y la L-Muralatina

Fuente: Wei *et al.* 2016

Efectivamente, la capsaicina, el espilantol y la mayoría de los ligandos diseñados mantienen alguna estructura básica esencial para la interacción con los residuos proteicos, ya sea una cadena lipofílica, un anillo aromático o un fenol que tenga el protagonismo del hidroxilo perteneciente al grupo vanilloide. Cabe destacar que en todos los casos de diseño molecular el farmacóforo del grupo amida se mantiene sin modificación (figura 14) (Wei *et al.*, 2016). Lo anterior corresponde a uno de los enfoques de las técnicas computacionales, ya que en las investigaciones en la mayoría de los casos se buscan estructuras con homología proteica o similitud conformacional para lograr una buena unión ligando-diana (Blanco, 2017).

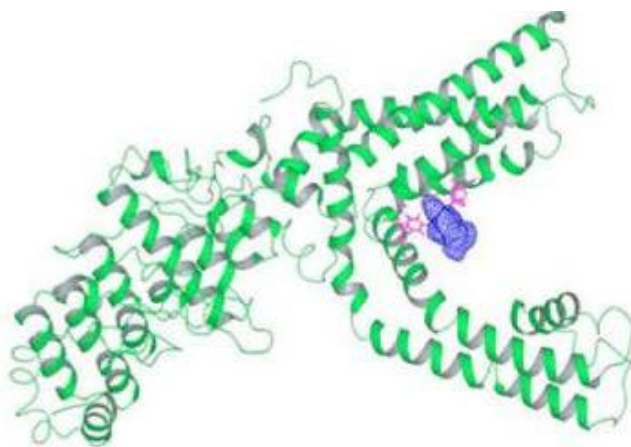


Figura 14. Sitio de unión de la L-muralatina con residuos claves de la estructura de TRPV1

Fuente: Wei *et al.*, 2016

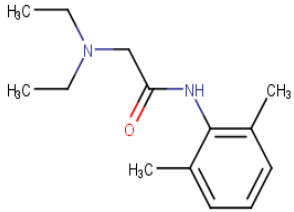
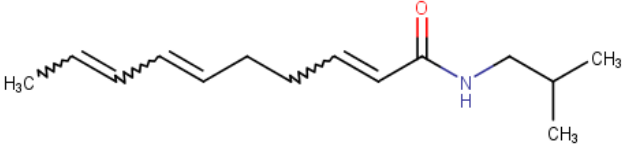
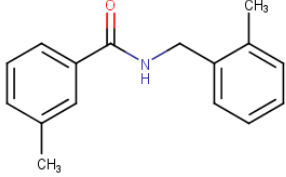
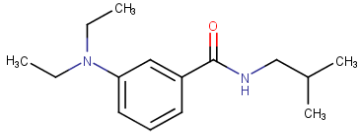
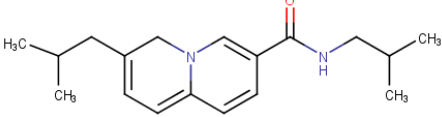
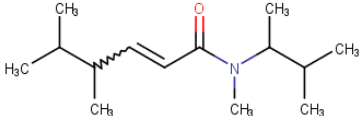
Scoring

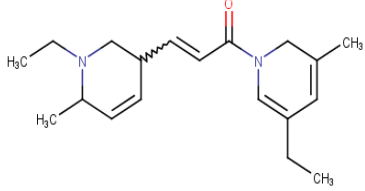
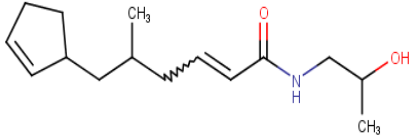
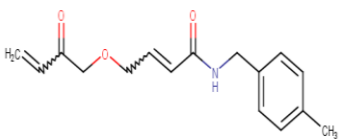
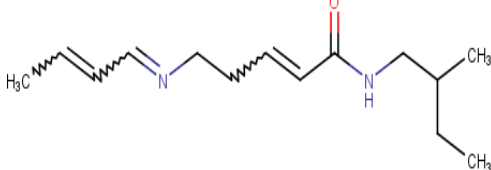
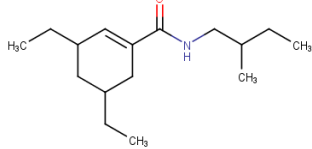
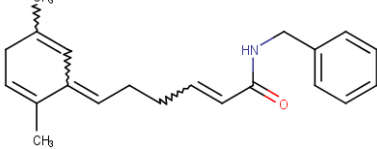
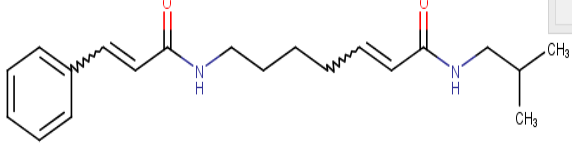
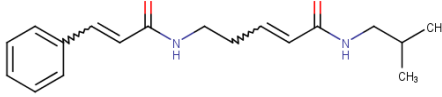
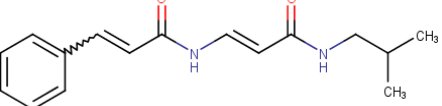
El enlace de afinidad al receptor está dado por el *scoring*, es decir, en el modelo físico se estima la suma las energías electrostáticas y las interacciones de Van der Waals. El modelo empírico se basa en las propiedades fisicoquímicas como puentes de hidrógeno, cambios de entropía y contactos hidrofóbicos (Tuccinardi, 2009). En esta investigación se trabaja comparando las energías de unión entre la lidocaína y el espilantol como control y los 19 ligandos seleccionados (tabla 13).

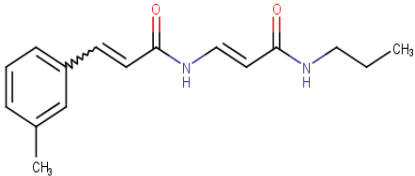
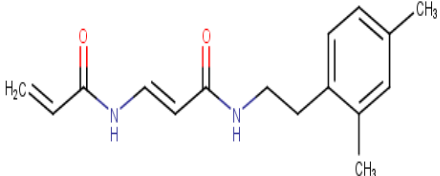
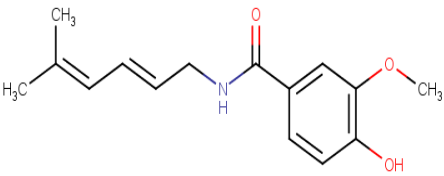
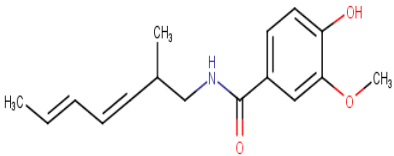
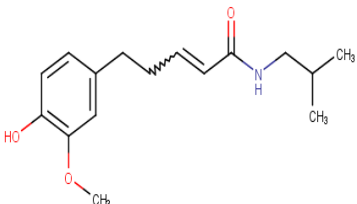
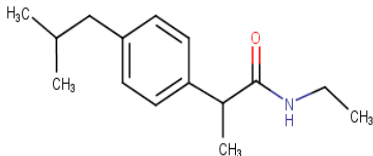
El objetivo de este estudio es identificar un agonista del receptor TRPV1 que considere todas las características ideales de un prototipo de medicamento, así bien, la selección del

prototipo debe alcanzar una afinidad con el receptor lo suficientemente significativa para desencadenar una respuesta biológica. Por esta razón, se analizan los 19 diseños seleccionados por medio de un *docking* para comprobar la afinidad con el receptor.

Tabla 13. Energía de unión para los diseños moleculares seleccionados de la biblioteca virtual

Diseños molecular	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)
Lidocaína		-5,10
Espilantol		-5,40
Diseño 17		-7.10
Diseño 47		-5.40
Diseño 50		-6.00
Diseño 55		-5.20

Diseño 57		-6.00
Diseño 58		-5.40
Diseño 60		-6.10
Diseño 63		-5.30
Diseño 65		-7.30
Diseño 66		-7.90
Diseño 69		-6.60
Diseño 70		-6.60
Diseño 71		-6.30

Diseño 72		-6.50
Diseño 73		-7.60
Diseño 82		-6.90
Diseño 96		-6.10
Diseño 100		-6.40
Diseño 101		-7.60

Fuente: Elaboración propia, 2017

Análisis del acople molecular entre la macromolécula TRPV1 y el diseño 66

Los ligandos identificados en su mayoría presentan grupos bencil que según los principios de Cousins (1980) sobre la estructura de los anestésicos locales, son necesarios para que haya una adecuada lipoficidad y, por ende, penetración a través de membranas biológicas. Así mismo, Burley y Petsko (1985) señalan que las estructuras aromáticas son útiles para

alcanzar una mayor estabilidad molecular e interacción con macromoléculas, puesto que los residuos peptídicos tienden a formar contactos de Van der Waals con ciclos aromáticos.

En los resultados de energía de unión de los 19 diseños moleculares seleccionados, se observa que existe una afinidad favorable porque los valores obtenidos son menores con respecto a las moléculas control, pues a menor valor, mayor afinidad con la diana (Cruz, 2015). Estos resultados reflejan la posibilidad de los diseños seleccionados en convertirse en posibles candidatos de fármacos y sugieren futuras pruebas *in vitro* para evaluar la activación del receptor. Así bien, se demuestra que el diseño 66 alcanza la mayor afinidad con una energía de unión de -7.90.

Los resultados anteriores indican que el modelo 66 tiene las mejores características de acople molecular en comparación con los ligandos control; además, se observan interacciones por puentes de hidrógeno con los residuos Arg557 (7,11 Å), la Ser512 (3,52 Å), Thr550 (14,60 Å) y la Glu570 en dos grupos carboxilos (2,68 Å y 4,05 Å) (figura 15). Por otro lado, la Tyr511 difiere en interacción con el diseño 66, con respecto a los datos residuos involucrados en la literatura. A pesar de ello, se decide elegir el diseño 66 como molécula *hit* para ser sometida a un proceso de optimización, por sus buenas características fisicoquímicas, energía de unión e interacciones moleculares.

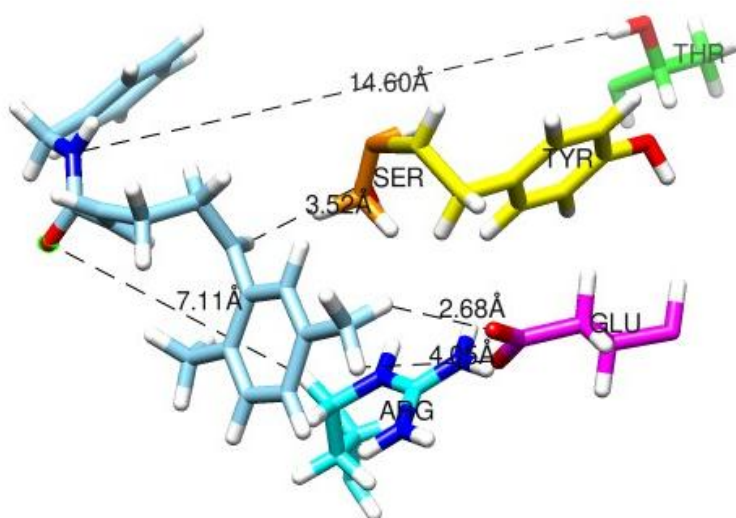


Figura 15. Distancias de enlaces entre residuos involucrados y el diseño 66 ($\Delta G = -7.90$ kcal/mol)

Optimización del diseño 66 como molécula *hit*

A partir de los resultados anteriores, se decide proponer una estrategia para optimizar el diseño 66 con el fin de lograr una mayor estabilidad y acople molecular con el receptor estudiado. Por esta razón se comparan los parámetros fisicoquímicos entre la molécula *hit* y la lidocaína, que cumple con todos los descriptores moleculares y es considerada el fármaco de referencia para anestésicos locales tipo amida (tabla 14).

Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas del diseño 66 y la lidocaína

Parámetro fisicoquímico	Diseño 66	Lidocaína
Masa molecular	307,437	234,343
LogP	4.04	2.86
Número de aceptores	1	2
Número de donores	1	1
Refractividad molar	100,9	73,93
Área polar superficial	29,1	32,34
Anillos	2	1

Número total de átomos	48	39
Enlaces rotables	6	5

Fuente: Marvin Sketch (2017)

Estrategia de optimización del diseño 66

Conociendo estas características, la masa molecular y el LogP son los parámetros más significativos por mejorar; no obstante, el incremento o la disminución de estas propiedades repercuten en las demás, ya que si se disminuye el LogP, el APS aumenta, asimismo la molécula es menos lipófila y tiene menor capacidad de traspasar membranas biológicas. Sin embargo, el logP del diseño 66 se encuentra en el límite del criterio de aceptación según Ghose, lo cual sugiere que se debe disminuir de tal forma que alcance una liposolubilidad comparada con la lidocaína. Por consiguiente, la neurotoxicidad puede disminuir al aumentar el APS y acercar el valor a los 60 Å.

Por otro lado, también se desea mejorar la distancia de enlace con los residuos formadores de puentes de hidrógeno. Para esto se planea incluir más donares y aceptores de hidrógeno, por lo que es indispensable la modificación en la posición de carbonos y la adición mínima de átomos que provean una disminución en la distancia de enlace y, por ende, una mejor energía de unión. Razón por lo cual se descarta la posibilidad de incluir otro anillo, ya que aumentaría en gran medida la masa molecular, el logP y la cantidad de átomos pesados, causando cambios indeseables en los parámetros fisicoquímicos.

Lo anterior indica que el agregar átomos de naturaleza polar ocasiona un aumento en la masa molecular y, al mismo tiempo, una disminución de la biodisponibilidad. A pesar de esto, se compensa con una mayor posibilidad de generar enlaces intermoleculares y volumen estérico. En otras palabras, aumentar el tamaño espacial de la molécula. Un parámetro que se relaciona directamente con la conformación espacial es la refractividad molar, esta puede ayudar a obtener un mejor *scoring* en la afinidad con la diana, por lo que su valor debe encontrarse preferiblemente entre 70 y 110.

Como ambas moléculas -el diseño 66 y la lidocaína- se encuentran en este rango, se debe mantener inalterada la refractividad molar. Por lo tanto, se deben elegir átomos de carácter polar que alcancen mayor cantidad de enlaces intermoleculares, reduzcan el LogP, el APS y mejoren la energía de unión. Así, se propone modificar el anillo de carbono terminal correspondiente al grupo para-xileno o 1,4-dimetilbenzenceno por un grupo vanilloide, similar a la capsaicina (figura 16).

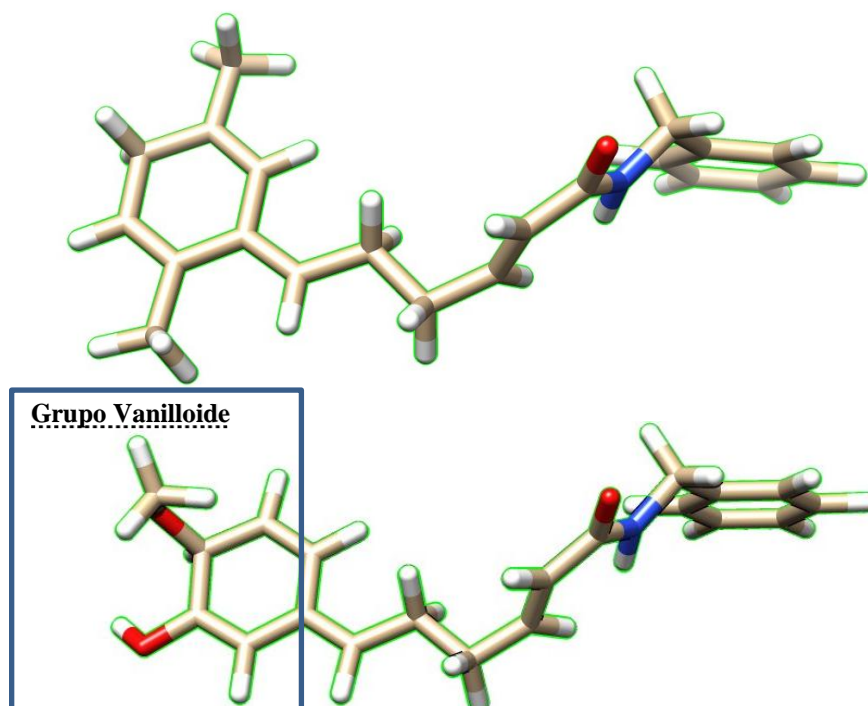


Figura 16. Estructura tridimensional del diseño 66 y el diseño 66 optimizado proyectado en Chimera

Fuente: Elaboración propia

Este cambio incorpora no solo la reducción de átomos pesados, sino también la adición de dos oxígenos fundamentales en la polaridad para la disminución del LogP y el APS. Según Yang *et al.* (2015), el grupo vanilloide de la capsaicina apunta hacia una buena convergencia estructural con el receptor, al mostrar interacciones con cuatro residuos específicos del receptor (Tyr511, Ser512, Glu570 y Thr671) a través de enlaces de hidrógeno.

A nivel de masa molecular hay un aumento previsto, dado que el oxígeno tiene un peso atómico de 15,99 g/mol, mientras el carbono de 12,01 g/mol. Por otro lado, esta modificación también afecta la cantidad de enlaces rotables, al disminuir la rigidez estructural de la molécula, agregando entropía en la energía de unión y disminuyendo la afinidad en el proceso espontáneo. De esta manera se procede a capturar las nuevas propiedades fisicoquímicas del diseño optimizado y realizar el acoplamiento molecular en el *pocket* mencionado (tabla 15).

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas y energía de unión del diseño 66

Parámetro fisicoquímico	Diseño 66 optimizado
Masa molecular	325,408 g/mol
LogP	2,22
Número de aceptores	3
Número de donares	2
Refractividad molar	100,34
Área polar superficial	58,56
Anillos	2
Número total de átomos	47
Enlaces rotables	7
Energía de unión	-7,3 kcal/mol

Fuente: Marvin Sketch y PyRX, 2017

4.7.2 Resultados de la optimización del diseño 66

De acuerdo a los resultados anteriores, se fundamenta la estrategia y optimización de las propiedades fisicoquímicas discutidas, con el propósito de obtener cambios importantes a nivel estructural e hidrofóbico. Así, la masa molecular aumenta en un 5,85 %, al igual que los aceptores (66,67 %) y donares de hidrógeno (50,00 %), los enlaces rotables (14,29 %) y el APS (50,30 %); mientras que el LogP disminuye un 45,05 %, la refractividad molar un 0,55 % y el número total de átomos pesados un 2,08 %. Destaca que el número de anillos se mantiene inalterado.

Por otro lado, la energía de unión aumenta en un 7,60 % debido al incremento de los enlaces rotables y APS, sin embargo, este aumento ocasiona una disminución de la afinidad con el receptor, la cual es compensada por una reducción en las distancias de enlace (figura 17) donde se mejoran las interacciones de los puentes de hidrógeno en los residuos Thr550 y Glu570. No obstante, las distancias de los residuos Ser512 Arg557 y Glu570 en uno de sus carboxilos disminuyen (tabla 16), siendo la Arg557 la de mayor relevancia por el acomodo estructural en el peso de la adición de oxígenos.

Residuo de aminoácido	Distancias de enlace del diseño 66	Distancias de enlace del diseño 66 optimizado
Tyr511	NA	2,65 Å
Ser512	3,52 Å	3,89 Å
Arg557	7,11 Å	8,82 Å
Thr550	14,60 Å	14,44 Å
Glu570	2,68 Å y 4,05 Å	2,79 Å y 3,69 Å

Tabla 16. Distancias de enlace del diseño 66 y diseño 66 optimizado

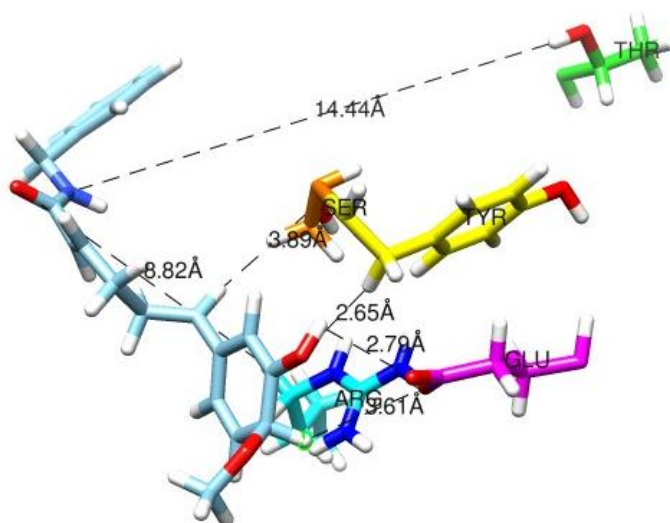


Figura 17. Distancias de enlaces entre residuos involucrados y el diseño 66 optimizado ($\Delta G = -7.30$ kcal/mol)

Fuente: Chimera, 2017

Finalmente, se obtiene una interacción extra de gran importancia con respecto al diseño 66, donde la forma optimizada hace enlaces por puentes de hidrógeno en la Tyr511 con una distancia de enlace de 2,65 Å; esta interacción asegura una mayor estabilidad en el acople molecular. Siendo el grupo vanilloide clave en la predicción de la neurotoxicidad, interacción con la diana y permeabilidad transmembrana. De esta manera se determina el diseño 66 optimizado como molécula *lead* y se nombra según la IUPAC como (2E)-N-bencil-6-[(1E,4S)-3-hidroxi-4-metoxiciclohexa-2,5-dien-1-ilideno]2-hexenamida (ChemAxon, 2017).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se propone el modelaje de un anestésico local tipo amida a partir de la planta *Acmella oleracea*, la cual produce un metabolito conocido como espilantol, que presenta efectos activadores de la proteína TRPV1. Se determina que el espilantol muestra gran potencial en el uso terapéutico del dolor como producto natural ya que su estructura contempla características similares a los anestésicos locales tipo amida.

Se estudian las características del dolor mediado en la activación del receptor TRPV1 ante situaciones de daño celular por temperaturas nocivas, así como la comunicación nerviosa en los impulsos sensoriales de la patología. Además de las principales características farmacológicas y toxicológicas de los anestésicos locales tipo amida y su relación con la activación del receptor.

Se genera una biblioteca virtual de 101 derivados del espilantol por modificación virtual, obteniendo moléculas con similitud estructural a los anestésicos locales. Se utilizan técnicas *in silico* para determinar las características fisicoquímicas de la biblioteca virtual por medio de los descriptores moleculares propuestos por Lipinski *et al.* (2001), Ghose *et al.* (1999), Muegge *et al.* (2003), Veber *et al.* (2002), Oprea *et al.* (2001) y ChemAxon (2015), donde 19 moléculas cumplen con los filtros descritos para alcanzar una adecuada estabilidad molecular y biodisponibilidad oral.

Se realiza el acople molecular entre el receptor TRPV1 y las 19 moléculas seleccionadas, determinando las energías de unión y las afinidades con el receptor. Se selecciona el diseño 66 como molécula *hit*, la cual presenta la mejor afinidad con el receptor, siendo de -7,9 kcal/mol; además se estudian las distancias de enlace entre 5 residuos de aminoácidos descritos en la literatura para la capsaicina.

Se plantea una estrategia de optimización para el diseño 66 considerando mejorar las características fisicoquímicas de tal forma que alcanzaran similitud con la lidocaína como anestésico local de referencia, mejorando el LogP un 45,05 % y el APS un 50,30 %. Por otro lado, a pesar de no mejorar la energía de unión con respecto al diseño 66 sin modificar, se logra predecir una disminución en la neurotoxicidad y alcanzar una mayor afinidad con el receptor con respecto a la lidocaína, la cual es de -7.3 kcal/mol.

Recomendaciones

La investigación realizada sugiere que es necesario desarrollar estudios de síntesis orgánica de la molécula optimizada, con el objetivo de establecer una ruta química funcional que abarque la menor cantidad de pasos sintéticos para alcanzar un mejor rendimiento químico. Asimismo, los estudios con anestésicos locales derivados de espilantol deben desarrollarse ampliamente en ensayos *in vitro* con animales, específicamente pruebas de dosificación y toxicidad, así como efectuar exámenes de sensibilidad al dolor ocasionado por calor, donde el ensayo de la plancha caliente es ideal para profundizar la tolerancia del dolor por medio del receptor TRPV1.

La formulación de un fármaco que contenga el diseño 66 debe orientarse hacia presentaciones farmacéuticas compatibles con la naturaleza de la molécula (características liposolubles), como lo son ungüentos, espráis, pastas y parches transdérmicos a nivel tópico. Por consiguiente, se sugiere utilizar el LogKp como coeficiente de permeabilidad para analizar la toxicidad dérmica de la molécula propuesta.

Referencias

- Andrade, L., Welter, I., Revay, S., Tiemi, D., Cristiani, Z., Borges, F. *et al.* (2013). Effectiveness of *Acmella oleracea* for topical anesthesia on buccal mucosa. *Journal of Dental Science*, 28 (3).
- Barbosa, A., Carvalho, M., Veronesi, R. y Sabaa-Sur, A. (2015). Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 (1).
- Biggs, N. y Hind, N. (2003). Plate 460. *Acmella Oleracea Compositae*. *Curtis's Botanical Magazine*, 20 (1), 31-39. DOI: 10.1111/1467-8748.00368.
- Bindseil, K. U., Jakupovic, J., Wolf, D., Lavayre, J., Leboul, J. y Van der Pyl, D. (2001). Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today*, 6 (16), 840.
- Blanco, A. (2017). *Docking para el diseño de ésteres derivados de benzotiazol como posibles antifúngicos inhibidores de la N-miristoiltransferasa para el uso en procedimientos de limpieza contra el hongo Aspergillus fumigatis*. (Tesis). Universidad Internacional de las Américas. San José, Costa Rica.
- Boonena, J., Baerta, B., Rocheb, N., Burvenichc, C. y De Spiegeleera, B. (2009). Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthus acmella* (compositae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (77-84).
- Burley, S. y Petsko, G. (1985). Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science*, 229. DOI: 10.1126/science.3892686.
- Carrasco, R., Padrón, A. y Gálvez, J. (2004). Definition of a novel atomic index for QSAR: the refractotopological state. *J Pharm Pharm Sci.*, 23 (7), 19-26.
- Caterina, J., Schumacher, A., Tominaga, M., Rosen, T., Levine, D. y Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389 (6653), 816-824.
- Chakraborty, A., Devi, B., Sanjebam, R., Khumbong, S. y Thokchom, S. (2010). Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthus acmella* Murr. in experimental animal models. *Indian J Pharmacol*, 42 (5): 277-279. DOI: 10.4103/0253-7613.70106.

- Chang, C., Chen, W. y Gilson, M. (2007). Ligand configurational entropy and protein binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (5): 1534-1539. DOI: 10.1073/pnas.0610494104.
- Chang, R. (2007). *Química*, (9° ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Chemaxon. (2017). *Marvin Sketch (descripción del programa)*. Recuperado de: <https://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch>.
- Chemaxon. (2015). *Drug Discovery Filtering*. Recuperado de: https://www.chemaxon.com/jchem4excel/userguide/drug_discovery_filtering.html
- Cousins, M. y Mather, L. (1980). *Clinical Pharmacology of Local Anesthetics*. Estados Unidos: Anaesth Intensive Care.
- Cruz, C. (2015). *Identificación de un inhibidor de la proteasa NS3/NS2B en productos naturales descritos en la biodiversidad costarricense por técnicas de modelaje molecular para el diseño de un potencial prototipo de fármaco para el tratamiento del virus del dengue*. (Tesis). Universidad Internacional de las Américas. San José, Costa Rica.
- Davies, P. y Galer, B. (2004). *Review of lidocaine patch 5% studies in the treatment of postherpetic neuralgia*. Washington, Estados Unidos: Departamento de Neurología del Centro Médico de Veteranos de Seattle.
- De la Rosa-Lugo, V., Acevedo-Quiroz, M., Déciga-Campos, M. y Rios, Y. (2017). Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *J Pharm Pharmacol*, 69 (7): 884-895. DOI: 10.1111/jphp.12721.
- Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S. y Saha, S. (2013). Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. *Adv Pharmacol Sci.*, 2013.
- Espada, L., Ferrer, A., Batista, Y., Bandera, A. y Almeida, Y. (2016). Separación y clasificación de los alcaloides presentes en las hijas y flores de la especie *Spilanthes Acmella*. *Rev Cubana Quím*, 28.
- Facer, P., Casula, M., Smith, G., Benham, C., Chessell, I., Bountra, C. *et al.* (2007). Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurology*, 23 (7), 11. DOI: 10.1186/1471-2377-7-11.
- Flórez, J. (2014). *Farmacología humana*, (6° ed.). Elsevier Masson.

- Fragoso, J., Manzur, I., Díaz, A. y Herrera, A. (2016). *Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de Spilanthes acmella en Porphyromonas gingivalis y Streptococcus mutans*. (Tesis). Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena. Colombia.
- Fundación Grünethal de la Universidad de Salamanca. (2011). *Manejo del paciente con dolor*. Salamanca, España.
- Gao, Y., Cao, E., Julius, D. y Cheng, Y. (2016). TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature*, 16 (534), 347-351.
- Ghose, K., Viswanadhan, V. N. y Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1 (1), 55–68. DOI:10.1021/cc9800071.
- Gomtsyan, A., McDonald H., Schmidt, R., Daanen, J., Voight, E., Segreti, J. *et al.* (2015). TRPV1 ligands with hyperthermic, hypothermic and no temperature effects in rats. *Temperature (Austin)*, 2 (2): 297–301.
- Gregorio, G., Neal, J., Rosenquist, R. y Weinberg, G. (2010). Clinical Presentation of Local Anesthetic Systemic Toxicity A Review of Published Cases, 1979 to 2009. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 35 (2), 181-183. DOI: 10.1097/AAP.0b013e3181d2310b.
- Gu, J., Gui, Y., Chen, L., Yuan, G., Lu, H. Z. y Xu, X. (2013). Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. *PLoS ONE*, 8 (4), 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0062839.
- Gualdani, R., Ceruti, S., Magni, G., Merli, D., Di Casare, L., Francesconi, O. *et al.* (2015). Lipoic-Based TRPA1/TRPV1 Antagonist to Treat Orofacial Pain. *ACS Chem. Neurosci.*, 6 (3), 380-385. DOI: 10.1021/cn500248u.
- Guerrero, A. (2001). *Toxicología*, (4° ed.). Bogotá, Colombia: Editorial Manual Moderno.
- Hasan, B. y Asif, T. (2017). Lidocaine-Induced Systemic Toxicity: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*, 9. DOI: 10.7759/cureus.1275.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. México: McGraw Hill.
- Human Rights Watch. (2011). *Global state of Pain treatment: Access to Medicines and Palliative Care*. Nueva York, Estados Unidos.

- Jansen, R. K. (1985). The systematics of *Acmella* (Asteraceae-Heliantheae). *Systematic Botany Monographs*, 8: 1-115.
- Kar, S. y Roy, K. (2013). How far can virtual screening take us in drug discovery *Expert Opin Drug Discov.*, 8 (3): 245-61. DOI: 10.1517/17460441.2013.761204.
- Karlsten, R. (2017). Finally a promising analgesic signal in a long-awaited new class of drugs: TRPV1 antagonist mavatrep in patients with osteoarthritis (OA). *Scandinavian Association for the Study of Pain*, 17, 154-155.
- Katzung, B., Brunton, L. y Hernández, A. (2016). *Farmacología general*. Tomo I. México: Editorial McGraw Hill.
- Kelder, J., Grootenhuis, P. D., Bayada, D. M., Delbressine, L. P. y Ploemen, J. P. (1999). Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharmaceutical Research*, 16 (10), 1514-1519. DOI: 10.1023/A:1015040217741.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. y Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3, 935–949. DOI: 10.1038/nrd1549.
- Kopf, A. y Patel, N. (2010). *Guía para el manejo del dolor en condiciones de bajos recursos*. Estados Unidos: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP).
- Lahlou, M. (2013). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology and Pharmacy*, 4, 17–31. DOI: 10.4236/pp.2013.43A003.
- Leffer, A., Fischer, M., Rehner, D., Kienel, S., Kistner, K., Sauer, S. *et al.* (2008). The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (2), 763-776. DOI: 10.1172/JCI32751.
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. y Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14 (16), 1923-1928.
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B. W. y Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (1-3), 3–26. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

- Litz, R., Roessel, T., Heller, A. y Stehr, S. (2008). Reversal of Central Nervous System and Cardiac Toxicity After Local Anesthetic Intoxication by Lipid Emulsion Injection. *Alemania International Anesthesia Research Society*, 106 (5), 1575-1577.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, L., Leza, J. C., Moro, M. A. y Portolés, A. (2008). *Velásquez farmacología básica y clínica*, (18° ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Mallikarjuna, T., Ganga, B. y Venkateswara, Y. (2012). Antioxidant activity of *Spilanthes acmella* extracts. *International Journal of Phytopharmacology*, 3 (2), 216-220.
- Martínez, L., Souto, R., Valdés, S. y Minaberriet, E. (2015). Canales iónicos receptores de potencial transitorio y su papel protagónico en la terapia analgésica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 34 (3).
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica*, (7° ed.). México: Editorial Cengage Learning Editores.
- McPhee, S. y Hammer, G. (2011). *Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina clínica*, (6° ed.). México: Editorial McGraw-Hill.
- Mendoza, N. (2008). *Farmacología médica*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Ministerio de Salud de Nicaragua. (2014). *Formulario Nacional de Medicamentos. Organización Mundial de Salud*, (7° ed.). Nicaragua: Autor.
- Moreno, M., López, C., Giner, P. y Cantero., J. (2008). Metahemoglobinemia debida a la administración de anestésico local previa a depilación con láser. *Medicina Clínica*, 131, 198-199. DOI: 10.1157/13124266.
- Morón, F. (2008). *Farmacología clínica*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Muegge, I. (2003). Selection criteria for drug-like compounds. *Medicinal Research Reviews*, 23 (3), 302–321. DOI:10.1002/med.10041.
- Muzzi, M., Felici, R., Cavone, L., Gerace, E., Minassi, A., Appendino, G. *et al.* (2012). Ischemic neuroprotection by TRPV1 receptor-induced hypothermia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32 (6), 978-982.
- Nilius, B. y Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.*, 12 (3), 218. DOI: 10.1186/gb-2011-12-3-218.
- Ogata, E., Alves, M., Da Silva, C., Alencar, L., Machado, A., De Souza, L. *et al.* (2013). Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 150 (2), 583-589.

- Oprea, T. I., Davis, M., Teague, S. J. y Leeson, P. D. (2001). Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41 (5), 1308–1315. DOI:10.1021/ci010366a.
- Ou-Yang, S., Lu, J., Kong, X., Liang, Z., Luo, C. y Jiang, H. (2012). Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33 (9), 1131–1140. DOI:10.1038/aps.2012.109.
- Pascolutti, M. y Quinn, R. J. (2014). Natural products as lead structures: chemical transformations to create lead-like libraries. *Drug Discovery Today*, 19 (3), 215–221. DOI:10.1016/j.drudis.2013.10.013.
- Porth, C. (2006). *Fisiopatología. Salud-enfermedad: un enfoque conceptual*, (7° ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S. y Ruchirawat, S. (2013). High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. *EXCLI Journal*, 12, 291-312.
- Prakash, R., Gautam, S., Kumar, S. y Singh, R. (2015). Local Anaesthetic Systemic Toxicity in a Patient under General Anaesthesia (GA): A Diagnostic Challenge. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9. DOI: 10.7860/JCDR/2015/11104.5540.
- Protein Data Bank. (2017). *Structure of TRPV1 in complex with DkTx and RTX, determined in lipid nanodisc*. Recuperado de: <https://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=5IRX>
- Puebla, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS. Dolor iatrogénico. *Oncología*, 28 (3).
- Reynolds, C. H., Bembenek, S. D. y Tounge, B. A. (2007). The role of molecular size in ligand efficiency. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17 (15), 4258–4261. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.05.038.
- Säkkiken, J., Huppunen, M. y Suuronen, R. (2005). Complications following local anaesthesia. *Nor Tannlegeforen Tidende*.
- Santana de Freitas-Blanco, V., Franz-Montan, M., Groppo, F. C., De Carvalho, J. E., Figueira, G. M., Serpe, L. *et al.* (2016). Development and Evaluation of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Acmella oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. *PLOS ONE*, 11 (9).
- Sharma, V., Boonrn, J., Chauhan, N., Thakur, M., De Spiegeleer, y Dixit, V. (2011). *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual

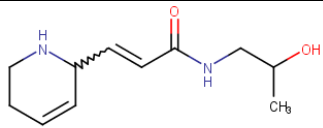
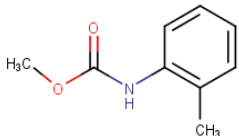
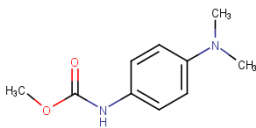
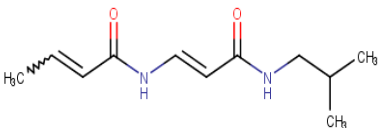
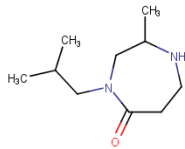
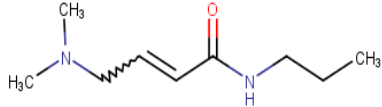
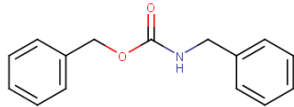
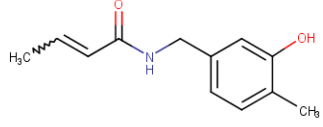
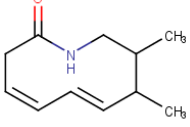
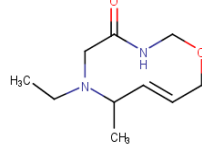
- behavior in male rats. *Phytomedicine*, 18 (13), 1161-1169. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.06.001.
- Smith, M. y March, J. (2007). *March's Advanced Organic Chemistry*, (6° ed.). John Wiley & Sons.
- Talevi, A. y Bruno, L. (2009). Screening virtual: una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en latinoamérica. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (1).
- Tian, S., Wang, J., Li, Y., Li, D., Xu, L. y Hou, T. (2015). The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86, 2–10. DOI: 10.1016/j.addr.2015.01.009
- Tuccinardi, T. (2009). *Docking-Based virtual screening: Recent Developments*. Pisa, Italia: Bentham Science Publishers.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2007). *Dermamal Exposure Assessment: A summary of EPA Approaches*. Recuperado de: <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=183584>
- Valencia, M. y Silva, F. (2013). Protocol and importance of using the kit for local anesthetic systemic toxicity. *Rev Colomb Anestesiol*, 41, 274–279.
- Valencia, R., y García, H. (2011). Toxicidad por anestésicos locales: revisión de la literatura. *Rev. Col. Anes.*, 39. DOI: 10.5554/rca.v39i1.160.
- Vassort, G. y Fauconnier, J. (2008). Les canaux TRP (transient receptor potential) Une nouvelle famille de canaux à expression varié. *Medecine/Sciences*, 24 (2), 163-168. DOI: 10.1051/medsci/2008242163.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W. y Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (12), 2615–2623. DOI: 10.1021/jm020017n
- Veronesi, B. y Oortgiesen, M. (2006). The TRPV1 Receptor: Target of Toxicants and Therapeutics. *Toxicological Science*, 89 (1), 1-3. DOI: 10.1093/toxsci/kfj034.
- Waring, M. J. (2010). Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5 (3), 235–48. DOI: 10.1517/17460441003605098
- Wei, N., Lv, H., Wu, Y., Yang, S., Sun, X., Lai, R. *et al.* (2016). Selective Activation of Nociceptor TRPV1 Channel and Reversal of Inflammatory Pain in Mice by a Novel

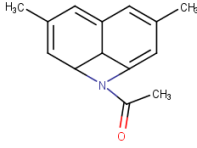
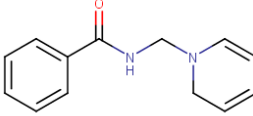
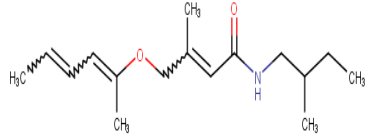
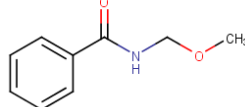
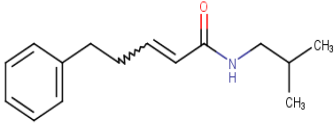
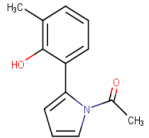
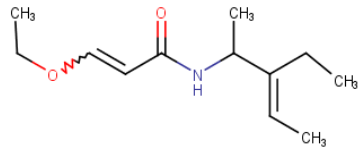
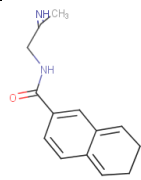
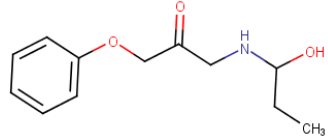
Coumarin Derivative Muralatin L from *Murraya alata*. *J Biol Chem*, 8 (2), 640-651.
DOI: 10.1074/jbc.M115.654392

Apéndice A. Estructura de los derivados de espilantol

Diseños moleculares	SMILES	Fórmula molecular	Estructura molecular
Derivado 1	<chem>CC(C)CNC(=O)C=C\C=C/CC#CC#C</chem>	$C_{14}H_{17}NO$	
Derivado 2	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CCCCC#CC#C</chem>	$C_{15}H_{21}NO$	
Derivado 3	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CCC#CC#C</chem>	$C_{12}H_{15}NO$	
Derivado 4	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CCCCCCC#CC#C</chem>	$C_{17}H_{25}NO$	
Derivado 5	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CCC\C=C\CC#CC#C</chem>	$C_{16}H_{21}NO$	
Derivado 6	<chem>C\C=C\C=C\CCC=C C(=O)NCC(C)C</chem>	$C_{14}H_{23}NO$	
Derivado 7	<chem>C\C=C\C=C\CC\C=C C\C=CC(=O)NCC(C)C</chem>	$C_{16}H_{25}NO$	
Derivado 8	<chem>CCCCCC\C=C\C=C\ CC\C=C\C\C=C\CC C C(=O)NCCO</chem>	$C_{22}H_{37}NO_2$	

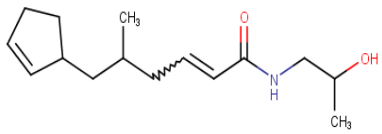
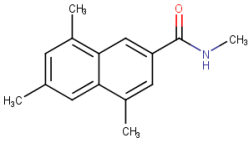
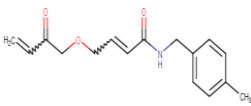
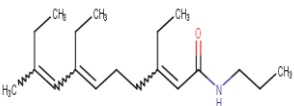
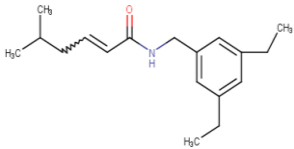
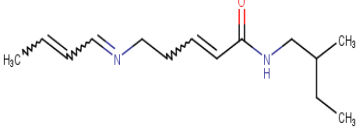
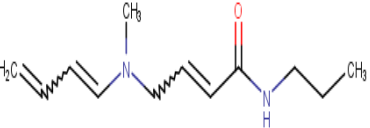
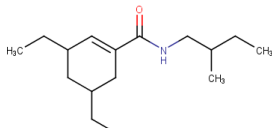
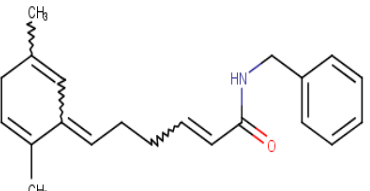
Diseño 9	<chem>CC(C)CNC(=O)C1=CC(OC(C)=O)=CC=C1</chem>	$C_{13}H_{17}NO_3$	
Diseño 10	<chem>CC(C)CNC(=O)C1=CC(OC(C)=O)=C(C(=O)O)C1</chem>	$C_{14}H_{17}NO_5$	
Diseño 11	<chem>CCNCC(=O)N1C(C)=CC=C1C</chem>	$C_{10}H_{16}N_2O$	
Diseño 12	<chem>CC(=O)NC1=C(C)C=C(C)C=C1C</chem>	$C_{11}H_{15}NO$	
Diseño 13	<chem>CC1=CC=C(C)C(=C1)C(=O)NCCO</chem>	$C_{11}H_{15}NO_2$	
Diseño 14	<chem>CCN1C=CCC1=CC(=O)NCC(C)C</chem>	$C_{12}H_{20}N_2O$	
Diseño 15	<chem>CC1=C(NC(=O)C2=CC=CC=C2)n[cH]=C1</chem>	$C_{12}H_{11}N_2O$	
Diseño 16	<chem>CCCNC(=O)C=CC1CCCC(C1)N(C)C</chem>	$C_{14}H_{20}N_2O$	
Diseño 17	<chem>CC1=CC(=CC=C1)C(=O)NCC1=CC=C(C=C1)C</chem>	$C_{16}H_{17}NO$	
Diseño 18	<chem>CC(C)CNC(=O)C1=CC=CC(C=O)=C1</chem>	$C_{12}H_{15}NO_2$	

Diseño 19	<chem>CC(O)CNC(=O)C=CC1NCCC=C1</chem>	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	
Diseño 20	<chem>COC(=O)NC1=C(C)C=CC=C1</chem>	$C_9H_{11}NO_2$	
Diseño 21	<chem>COC(=O)NC1=CC=C(C(C=C1)N(C)C)C</chem>	$C_{10}H_{14}N_2O$	
Diseño 22	<chem>CC=CC(=O)N\C=C\C(=O)NCCC(C)C</chem>	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	
Diseño 23	<chem>CC(C)CN1CC(C)NCCC1=O</chem>	$C_{10}H_{20}N_2O$	
Diseño 24	<chem>CCCNC(=O)C=CCN(C)C</chem>	$C_9H_{18}N_2O$	
Diseño 25	<chem>O=C(NCC1=CC=C(C=C1)OCC1=CC=C(C=C1)C=C1</chem>	$C_{15}H_{15}NO_2$	
Diseño 26	<chem>CC=CC(=O)NCC1=CC=C(C(C1)C(O)=C1</chem>	$C_{12}H_{15}NO_2$	
Diseño 27	<chem>CC1CNC(=O)C\C=C\C/C=C/C1C</chem>	$C_{11}H_{17}NO$	
Diseño 28	<chem>CCN1CC(=O)NCOCC1=C\C=C\C1C</chem>	$C_{10}H_{18}N_2O_2$	

Diseño 29	<chem>CC(=O)N1C2C=C(C)C=C3C=C(C)C=C1C23</chem>	$C_{14}H_{15}NO$	
Diseño 30	<chem>O=C(NCN1CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	$C_{13}H_{14}N_2O$	
Diseño 31	<chem>CCC(C)CNC(=O)C=C(C)COC(C)=CC=CC</chem>	$C_{16}H_{27}NO_2$	
Diseño 32	<chem>COCNC(=O)C1=CC=CC=C1</chem>	$C_9H_{11}NO_2$	
Diseño 33	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CCCC1=CC=CC=C1</chem>	$C_{15}H_{21}NO$	
Diseño 34	<chem>CC(=O)N1C=CC=C1C1=CC=CC(C)=C1O</chem>	$C_{13}H_{13}NO_2$	
Diseño 35	<chem>CCOC=CC(=O)NC(C)C(\CC)=C\C</chem>	$C_{12}H_{21}NO_2$	
Diseño 36	<chem>CC(=N)CNC(=O)C1=CC2=CCCC=C2C=C1</chem>	$C_{14}H_{16}N_2O$	
Diseño 37	<chem>CCC(O)NCC(=O)COC1=CC=CC=C1</chem>	$C_{12}H_{17}NO_3$	

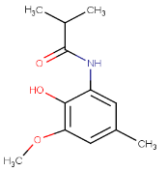
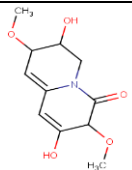
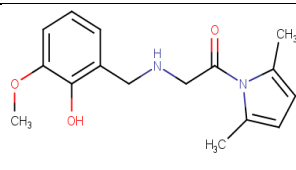
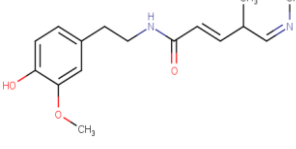
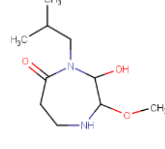
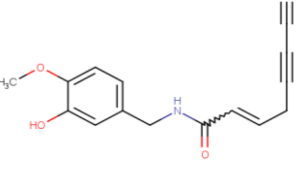
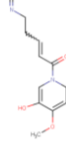
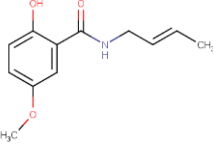
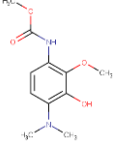
Diseño 38	<chem>CC(C)CNC(=O)C1=CC(C)=CC(C)=C1</chem>	$C_{13}H_{19}NO$	
Diseño 39	<chem>CC(C)CNC(=O)CC1=CC=C(C)N1</chem>	$C_{11}H_{18}N_2O$	
Diseño 40	<chem>CC1=CC(=CC(C)=C1)C(=O)NCC(O)O</chem>	$C_{11}H_{15}NO_3$	
Diseño 41	<chem>CCNC(=O)C=CNC(C)=O</chem>	$C_8H_{14}N_2O_2$	
Diseño 42	<chem>CC(C)CNC(=O)C1=CC2=CC=CC=C2C=C1</chem>	$C_{15}H_{17}NO$	
Diseño 43	<chem>C\C=C\CNC(=O)C=CC(C)N(C)C=O</chem>	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	
Diseño 44	<chem>C\C=C\N\C(C)CNC(=O)C=CC(C)OC=C</chem>	$C_{12}H_{20}N_2O_2$	
Diseño 45	<chem>CCC(O)NC(=O)C1=CC(CC)=C(CC)C=C1</chem>	$C_{14}H_{21}NO_2$	
Diseño 46	<chem>CCCNC(=O)C=CCN\C=C\CC(C)C</chem>	$C_{13}H_{24}N_2O$	
Diseño 47	<chem>CCN(CC)C1=CC=C(C(=O)NCC(C)C)C=C1</chem>	$C_{15}H_{24}N_2O$	

Diseño 48	<chem>CC(NC(=O)C1=CC(C)=CC=C1)C(\C)=C\O</chem>	$C_{13}H_{17}NO_2$	
Diseño 49	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CCC(C)N(C)CCO</chem>	$C_{13}H_{26}N_2O_2$	
Diseño 50	<chem>CC(C)CNC(=O)C1=CN2CC(CC(C)C)=CC=C2C=C1</chem>	$C_{18}H_{26}N_2O$	
Diseño 51	<chem>CC(C)CNC(=O)C=CC1=CC(C)=CN=C1</chem>	$C_{13}H_{18}N_2O$	
Diseño 52	<chem>CCCNC(=O)\C=C\C(C)\C=C/N/C</chem>	$C_{10}H_{18}N_2O$	
Diseño 53	<chem>C\N=C/C(C)\C=C\C(=O)NCC(C)C(C)O</chem>	$C_{12}H_{22}N_2O_2$	
Diseño 54	<chem>O=C(NCC1=CC=C(C=C1)\C=C\C1=CC=CC=C12</chem>	$C_{20}H_{17}NO$	
Diseño 55	<chem>CC(C)C(C)C=CC(=O)N(C)C(C)C(C)C</chem>	$C_{14}H_{27}NO$	
Diseño 56	<chem>C=NCCC=CC(=O)N1CC=CC=C1</chem>	$C_{11}H_{14}N_2O$	
Diseño 57	<chem>CCN1CC(C=CC(=O)N2CC(C)=CC(CC)=C2)C=CC1C</chem>	$C_{19}H_{28}N_2O$	

Diseño 58	<chem>CC(O)CNC(=O)C=CCC(C)CC1CCC=C1</chem> 1	$C_{15}H_{25}NO_2$	
Diseño 59	<chem>CNC(=O)C1=CC2=C(C)C=C(C)C=C2C(C)=C1</chem>	$C_{15}H_{17}NO$	
Diseño 60	<chem>CC1=CC=C(CNC(=O)C=CCOCC(=O)C=C)C=C1</chem>	$C_{16}H_{19}NO_3$	
Diseño 61	<chem>CCCNC(=O)C=C(C(C)CCC=C(CC)C=C(C)CC</chem>	$C_{19}H_{33}NO$	
Diseño 62	<chem>CCC1=CC(CNC(=O)C=CCC(C)C)=CC(CC)=C1</chem>	$C_{18}H_{27}NO$	
Diseño 63	<chem>CCC(C)CNC(=O)C=CCCNC=CC=CC</chem>	$C_{14}H_{24}N_2O$	
Diseño 64	<chem>CCCNC(=O)C=CCN(C)C=CC=C</chem>	$C_{12}H_{20}N_2O$	
Diseño 65	<chem>CCC(C)CNC(=O)C1=CC(CC)CC(CC)C1</chem>	$C_{16}H_{29}NO$	
Diseño 66	<chem>CC1=CC(=CCCC=C(C(=O)NCC2=CC=C(C=C2)C(C)=CC1</chem>	$C_{21}H_{25}NO$	

Diseño 66 Optimizado	<chem>COC1C=CC(=CCC C=CC(=O)NCC2=C C=CC=C2)C=C1O</chem>	$C_{20}H_{23}NO_3$	
Diseño 67	<chem>CC(C)CNC(=O)C= CC(O)C(O)C=CC(O)=C(C)O</chem>	$C_{14}H_{23}NO_5$	
Diseño 68	<chem>CC(C)CNC(=O)C= CC(=O)N(C)C=CC(O)=C(C)O</chem>	$C_{14}H_{22}N_2O_4$	
Diseño 69	<chem>CC(C)CNC(=O)C= CCCCNC(=O)C= CC1=CC=CC=C1</chem>	$C_{20}H_{28}N_2O_2$	
Diseño 70	<chem>CC(C)CNC(=O)C= CCCNC(=O)C=CC1 =CC=CC=C1</chem>	$C_{18}H_{24}N_2O_2$	
Diseño 71	<chem>CC(C)CNC(=O)\C= C\NC(=O)C=CC1= CC=CC=C1</chem>	$C_{16}H_{20}N_2O_2$	
Diseño 72	<chem>CCCNC(=O)\C=C\N C(=O)C=CC1=CC= CC(C)=C1</chem>	$C_{16}H_{20}N_2O_2$	
Diseño 73	<chem>CC1=CC=C(CCNC(=O)\C=C\NC(=O)C =C)C(C)=C1</chem>	$C_{16}H_{20}N_2O_2$	
<u>Diseño 74</u>	<chem>CC(=O)NC=CC(=O) NCC1=CC(C)=CC(C)=C1</chem>	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	

Diseño 75	<chem>CNC(=O)CC1=CC=CC(NC(C)=O)O1</chem>	$C_{10}H_{14}N_2O_3$	
Diseño 76	<chem>CSCNC(=O)C=CC1=CC(C)=C(C)C=C1C</chem>	$C_{15}H_{21}NOS$	
Diseño 77	<chem>OCNC(=O)C=CNC1=CC=CC1=O</chem>	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	
Diseño 78	<chem>COC1=CC(=CC1O)C(C)C=CC(=O)N(C)C(C)C(C)C</chem>	$C_{17}H_{27}NO_3$	
Diseño 79	<chem>CCC1=CC=C(C(=O)NC2=C(OC)C(O)=CC2)C(CC)=C1</chem>	$C_{17}H_{21}NO_3$	
Diseño 80	<chem>COC1=C(O)C(=CC=C1)C(=O)NCN1C=CC=C1</chem>	$C_{13}H_{14}N_2O_3$	
Diseño 81	<chem>COC1=C(O)C(C)=C(NC(=O)\C=C\C)C=C1</chem>	$C_{12}H_{15}NO_3$	
Diseño 82	<chem>COC1=C(O)C=CC(=C1)C(=O)NC\C=C\C=C(C)C</chem>	$C_{15}H_{19}NO_3$	
Diseño 83	<chem>CCNC(=O)C=CNC1=CC(OC)C(O)=CC=C1</chem>	$C_{12}H_{16}N_2O_3$	

Diseño 84	<chem>COC1=C(O)C(NC(=O)C(C)C)=CC(C)=C</chem> 1	$C_{12}H_{17}NO_3$	
Diseño 85	<chem>COC1C=C2C=C(O)C(OC)C(=O)N2CC1O</chem> O	$C_{11}H_{15}NO_5$	
Diseño 86	<chem>COC1=CC=CC(CNCC(=O)N2C(C)=CC=C2C)=C1O</chem>	$C_{16}H_{20}N_2O_3$	
Diseño 87	<chem>COC1=CC(CCNC(=O)\C=C\C(C)\C=N/C)=CC=C1O</chem>	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	
Diseño 88	<chem>COC1NCCC(=O)N(CC(C)C)C1O</chem>	$C_{10}H_{20}N_2O_3$	
Diseño 89	<chem>COC1=CC=C(CNC(=O)C=CCC#CC#C)C=C1O</chem>	$C_{16}H_{15}NO_3$	
Diseño 90	<chem>COC1=CCN(C=C1O)C(=O)C=CCCN=C</chem> C	$C_{12}H_{16}N_2O_3$	
Diseño 91	<chem>COC1=CC=C(O)C(=C1)C(=O)NC\C=C\C</chem> C	$C_{12}H_{15}NO_3$	
Diseño 92	<chem>COC(=O)NC1=C(O)C(C(O)=C(C=C1)N(C)C</chem>	$C_{11}H_{16}N_2O_4$	

Diseño 93	<chem>CCN1CC2NC(=O)C=CC2=C(OC)C1O</chem>	$C_{11}H_{16}N_2O_3$	
Diseño 94	<chem>COC1=C(O)C=C(C C(=O)NCC(C)C)N1</chem>	$C_{11}H_{18}N_2O_3$	
Diseño 95	<chem>COC1=CC=C(C=C1 O)C(=O)NC1=C(C) C=[cH]n1</chem>	$C_{13}H_{13}N_2O_3$	
Diseño 96	<chem>COC1=CC(=CC=C1 O)C(=O)NCC(C)C=C\C=C\C</chem>	$C_{16}H_{21}NO_3$	
Diseño 97	<chem>CCN1C=C(CC)C\C 1=C\C(=O)NCC1=C C=C(O)C(OC)=C1</chem>	$C_{18}H_{24}N_2O_3$	
Diseño 98	<chem>COC1=C(O)C=C(C =C1)C(=O)NCC(C) O</chem>	$C_{11}H_{15}NO_4$	
Diseño 99	<chem>COC1=CC=C(OCC(=O)CNC(C)O)C=C1 O</chem>	$C_{12}H_{17}NO_5$	
Diseño 100	<chem>COC1=C(O)C=CC(CCC=CC(=O)NCC(C)C)=C1</chem>	$C_{16}H_{23}NO_3$	
Diseño 101	<chem>CCNC(=O)C(C)C1= CC=C(CC(C)C)C=C 1</chem>	$C_{15}H_{23}NO$	
Espilantol	<chem>CC=CC=CCCC=CC (=O)NCC(C)C</chem>	$C_{14}H_{23}NO$	

Apéndice B. Propiedades fisicoquímicas de los derivados de espilantol

ID	Masa molar (Da)	LogP	ADH ⁺	DDH ⁺	Refractividad Molar	APS (Å)	Anillos	Total de átomos	Enlaces Rotables
Derivado 1	215,296	2,48	1	1	69,67	29,1	0	33	5
Derivado 2	231,339	3,13	1	1	73,46	29,1	0	38	8
Derivado 3	189,258	1,94	1	1	56,66	29,1	0	29	5
Derivado 4	259,393	3,93	1	1	82,66	29,1	0	44	10
Derivado 5	243,350	3,27	1	1	79,78	29,1	0	39	8
Derivado 6	221,344	3,39	1	1	73,27	29,1	0	39	7
Derivado 7	247,382	3,92	1	1	83,59	29,1	0	43	8
Derivado 8	347,543	4,8	2	2	112,97	49,33	0	62	16
Diseño 9	235,283	1,66	2	1	64,91	55,4	1	34	8
Diseño 10	279,292	1,17	4	2	72,17	92,7	1	37	9
Diseño 11	180,251	0,46	2	1	53,27	34,03	1	29	3
Diseño 12	177,247	2,77	1	1	56,04	29,1	1	28	1
Diseño 13	193,246	1,14	2	2	56,41	49,33	1	29	3
Diseño 14	208,305	0,82	2	1	64,91	32,34	1	35	4
Diseño 15	199,233	1,55	2	1	89,11	29,1	2	26	2
Diseño 16	238,375	1,9	2	1	73,5	32,34	1	43	5
Diseño 17	239,318	3,66	1	1	74,73	29,1	2	35	3
Diseño 18	205,257	1,83	2	1	60,36	46,17	1	30	4
Diseño 19	210,277	-0,28	3	3	61,38	61,36	1	33	4
Diseño 20	165,192	2,46	2	1	47,59	38,33	1	23	2
Diseño 21	194,234	2,26	3	1	56,97	41,57	1	28	3
Diseño 22	210,277	0,96	2	2	61,15	58,2	0	33	5
Diseño 23	184,283	0,6	2	1	53,29	32,34	1	33	2
Diseño 24	170,256	0,55	2	1	52,46	32,34	0	30	5
Diseño 25	241,290	3,39	1	1	70,21	38,33	2	33	5
Diseño 26	205,257	2,28	2	2	61,32	49,33	1	30	3
Diseño 27	179,263	1,55	1	1	56,52	29,1	1	30	0
Diseño 28	198,266	0,39	3	1	56,16	41,57	1	32	1
Diseño 29	213,280	0,1	1	0	67,99	20,31	3	31	0
Diseño 30	214,268	2,03	2	1	66,06	32,34	2	30	3
Diseño 31	265,397	2,4	2	1	84,34	38,33	0	46	8
Diseño 32	165,192	1,15	2	1	45,89	38,33	1	23	3
Diseño 33	231,233	3,54	1	1	72,73	29,1	1	38	6
Diseño 34	215,252	2,21	2	1	62,12	42,23	2	29	1
Diseño 35	211,305	1,84	2	1	63,63	38,33	0	36	5

Diseño 36	228,295	0,96	2	2	82,86	52,95	2	33	3
Diseño 37	223,272	1,59	4	2	60,7	58,56	1	33	6
Diseño 38	205,301	3,09	1	1	63,86	29,1	1	34	3
Diseño 39	198,278	1,06	1	2	57,61	44,89	1	32	4
Diseño 40	209,245	0,73	3	3	57,44	69,56	1	30	3
Diseño 41	170,212	-0,34	3	2	46,8	58,2	0	26	5
Diseño 42	227,307	3,16	1	1	70,23	29,1	2	34	3
Diseño 43	210,277	0,44	2	1	62,22	49,41	0	33	6
Diseño 44	224,304	0,67	3	1	65,44	50,69	0	36	7
Diseño 45	235,327	2,88	2	2	69,73	49,33	1	38	5
Diseño 46	224,348	2,25	2	2	70,28	41,13	0	40	8
Diseño 47	248,370	3,11	2	1	77,7	32,34	1	42	6
Diseño 48	219,284	2,26	2	2	64,92	49,33	1	33	3
Diseño 49	242,363	0,87	3	2	72,4	52,57	0	43	8
Diseño 50	286,419	2,11	2	1	91,95	32,34	2	47	5
Diseño 51	218,300	2,15	2	1	66,41	41,99	1	34	5
Diseño 52	182,267	0,86	2	1	55,83	41,46	0	31	5
Diseño 53	226,320	0,27	3	2	66,55	61,69	0	38	6
Diseño 54	387,362	4,56	1	1	90,84	29,1	3	39	4
Diseño 55	255,376	3,64	1	0	71,04	20,31	0	43	5
Diseño 56	190,246	0,48	2	0	59,31	32,67	1	28	4
Diseño 57	300,446	2,63	2	0	96,67	23,55	2	50	4
Diseño 58	251,378	2,26	2	2	76,41	49,33	1	43	7
Diseño 59	227,307	3,35	1	1	71,61	29,1	2	34	1
Diseño 60	273,332	2,68	3	1	80,15	55,4	1	39	9
Diseño 61	291,479	4,64	1	1	95,44	29,1	0	54	10
Diseño 62	273,420	4,94	1	1	87,33	29,1	1	47	7
Diseño 63	236,359	2,38	2	1	75,29	41,46	0	41	8
Diseño 64	208,305	1,67	2	1	66,47	32,34	0	35	7
Diseño 65	251,414	3,95	1	1	78,09	29,1	1	47	6
Diseño 66	307,437	4,04	1	1	100,9	29,1	2	48	6
Diseño 66 Optimizado	325,408	2,22	3	2	100,34	58,56	2	47	7
Diseño 67	285,340	-1,02	5	5	80,01	110,02	0	43	7
Diseño 68	282,340	-0,52	4	3	80,39	89,87	0	42	6
Diseño 69	328,456	3,62	2	2	100,68	58,2	1	52	10
Diseño 70	300,402	2,83	2	2	91,48	58,2	1	46	8
Diseño 71	272,348	2,43	2	2	81,25	58,2	1	40	6
Diseño 72	272,348	2,49	2	2	81,82	58,2	1	40	6
Diseño 73	272,348	2,36	2	2	81,19	58,2	1	40	6
Diseño 74	246,310	1,36	2	2	71,78	58,2	1	36	4
Diseño 75	210,233	-1,55	3	2	56,91	67,43	1	29	3

Diseño 76	263,400	4,34	1	1	81,57	29,1	1	39	5
Diseño 77	208,217	-0,78	4	3	57,69	78,43	1	27	4
Diseño 78	293,407	1,07	3	1	88,41	49,77	1	48	6
Diseño 79	287,359	0,76	3	2	86,88	58,56	2	42	5
Diseño 80	246,266	2,55	3	2	67,03	63,49	2	32	4
Diseño 81	221,256	2,41	3	2	64,73	58,56	1	31	3
Diseño 82	261,321	2,18	3	2	77,91	58,56	1	38	5
Diseño 83	236,271	0,86	4	3	67,17	70,59	1	33	5
Diseño 84	223,272	2,49	3	2	63,61	58,56	1	33	3
Diseño 85	241,243	-2,63	5	2	61,33	79,23	2	32	2
Diseño 86	288,347	1,35	4	2	81,58	63,49	2	41	5
Diseño 87	290,363	1,54	4	2	84,36	70,92	1	43	7
Diseño 88	216,281	-0,05	4	2	55,68	61,8	1	35	3
Diseño 89	269,300	1,97	3	2	78,97	58,56	1	35	6
Diseño 90	236,271	-1,64	4	1	67,84	62,13	1	33	5
Diseño 91	221,256	2,15	3	2	63,31	58,56	1	31	4
Diseño 92	240,259	1,72	5	2	65,42	71,03	1	33	4
Diseño 93	224,260	-1,58	4	2	61,42	61,8	2	32	2
Diseño 94	226,276	0,45	3	3	60,16	74,35	1	34	5
Diseño 95	245,248	1,02	4	2	97,56	58,56	2	31	3
Diseño 96	275,348	2,69	3	2	82,86	58,56	1	41	6
Diseño 97	316,401	1,4	4	2	93,11	61,8	2	47	6
Diseño 98	225,244	0,08	4	3	59,19	78,79	1	31	4
Diseño 99	255,270	0,49	6	3	64,68	88,02	1	35	7
Diseño 100	277,364	3	3	2	81,17	58,56	1	43	7
Diseño 101	233,355	3,55	1	1	72,2	29,1	1	40	5
Lidocaína	234,343	2,86	2	1	73,93	32,34	1	39	5