



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SEDE SUR**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**“Síntesis de porfirinas con diferentes patrones de  
sustitución y caracterización de sus efectos  
antinociceptivos”**

Tesis que presenta

**Q.F.B. Cristina Martínez Nava**

Para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

**Directores de la Tesis:** Dr. Francisco Javier López Muñoz  
Dr. Cuauhtemoc Pérez González

Ciudad de México.

Agosto, 2020

## Agradecimientos

- A mis padres por todo lo que me han brindado y su apoyo incondicional ante cualquier situación.
- A mi carismática hermana por todos los buenos momentos que hemos pasado y las distracciones ocasionadas.
- Al Dr. Francisco Javier López Muñoz por su confianza y apoyo incondicional en la realización de este proyecto.
- Al Dr. Cuauhtemoc Pérez González por siempre ser permisivo conmigo y proporcionarme todo lo necesario para el proyecto, aun cuando pedía las cosas de último momento.
- A la Dra. Guadalupe Bravo por siempre mantener buenas expectativas de mí y cuya orientación contribuyó a mi formación académica.
- Al Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha por su amabilidad, ayuda y comprensión que fueron una gran aportación para mi formación y proyecto.
- Al Dr. Miguel Ángel Zavala por ayudarme a conseguir materiales, a pesar de que no era su obligación.
- Al Sr. Sabino del Laboratorio No. 7 "*Dolor y Analgesia*" porque sin él gran parte de este proyecto no hubiera sido posible.
- A mis compañeros de la maestría que siempre hicieron agradable mi estancia durante mi formación académica.
- A Hernán, Alejandro e Iván por estar a mi lado cuando necesite su ayuda y por no correrme cuando iba a molestarlos.
- A mi compañero del laboratorio de Química Orgánica Erick y al M. en B.E. Roberto por la compañía, ayuda y diversión durante el transcurso del posgrado.

Quisiera agradecer en especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado con la beca de posgrado No. **635596**, gracias a la cual fue posible la realización de este proyecto.

## Dedicatoria

A la memoria de esas personitas que estuvieron ahí para consentirme cuando fui pequeña, que a pesar de sus raíces humildes me inculcaron que lo principal era la educación y con quienes por desgracia no pude estar en su último aliento.

Quizá esto no sea merecedor de un novel ni nada por el estilo, pero quisiera que de algún modo sepan que fue gracias a ustedes que pude lograr esto.

Aunque ya no estén conmigo, espero de todo corazón que el camino que he seguido sea uno del que estén orgullosos.

# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1 Marco teórico</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Porfirinas</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Síntesis de porfirinas .....	3
1.1.2 Reactividad del sustituyente .....	8
<b>1.2 Dolor</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Tipos de dolor.....	11
1.2.1.1 Normal o Adaptativo .....	11
1.2.1.1.1 Dolor nociceptivo .....	12
1.2.1.1.2 Dolor inflamatorio.....	13
1.2.1.2 Anormal o Maladaptativo.....	14
1.2.1.2.1 Dolor neuropático.....	14
1.2.2 Nocicepción .....	15
1.2.3 Nociceptores.....	15
<b>1.3 Inflamación</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Tipos de inflamación.....	17
1.3.2 Mediadores .....	17
1.3.2.1 Citocinas proinflamatorias.....	18
1.3.2.2 Quimiocinas.....	18
<b>2 Justificación</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>4 Objetivos</b> .....	<b>21</b>
4.1 Objetivo General .....	21
4.2 Objetivos específicos.....	21
<b>5 Metodología</b> .....	<b>22</b>
5.1 Animales .....	22

5.2	Fármacos y sustancias.....	22
5.3	Reacción de síntesis.....	23
5.4	Caracterización.....	24
5.4.1	Resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .....	24
5.4.2	Espectroscopia Ultravioleta-Visible.....	24
5.5	Evaluación del efecto antinociceptivo.....	25
5.5.1	Modelo de disfunción inducida por dolor en rata (PIFIR).....	25
5.5.2	Obtención de cursos temporales y área bajo la curva.....	26
5.5.3	Determinación del efecto antinociceptivo individual.....	27
5.6	Análisis estadístico.....	27
6	Resultados.....	28
6.1	Obtención de porfirinas simétricas.....	28
6.2	Elucidación estructural de las porfirinas sintetizadas mediante RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ y espectrofotometría UV-Visible.....	28
6.2.1	5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP).....	28
6.2.1.1	Resonancia magnética nuclear $^1\text{H}$ .....	28
6.2.1.2	Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$ .....	30
6.2.1.3	Espectroscopia UV-Vis.....	31
6.2.2	5,10,15,20-tetra( <i>p</i> -N,N-dimetilaminofenil)porfirina (TMe <sub>2</sub> NPP).....	32
6.2.2.1	Resonancia magnética nuclear $^1\text{H}$ .....	32
6.2.2.2	Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$ .....	33
6.2.2.3	Espectroscopia UV-Vis.....	35
6.2.3	5,10,15,20-tetra( <i>m</i> -nitrofenil)porfirina (TNO <sub>2</sub> PP).....	35
6.2.3.1	Resonancia magnética nuclear $^1\text{H}$ .....	35
6.2.3.2	Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$ .....	37
6.2.3.3	Espectroscopia UV-Vis.....	38
6.3	Optimización de la reacción de síntesis.....	39
6.4	Efecto antinociceptivo de las porfirinas en el modelo PIFIR AU 30%.....	40
6.5	Efecto antinociceptivo de TPP en el modelo PIFIR AU 15%.....	42
6.6	Efecto antinociceptivo de TMe <sub>2</sub> NPP en el modelo PIFIR AU 15%.....	44
6.7	Efecto antinociceptivo de TNO <sub>2</sub> PP en el modelo PIFIR AU 15%.....	45

6.8	Comparación de los efectos antinociceptivos de las porfirinas e ibuprofeno	47
7	Discusión.....	49
7.1	Elucidación estructural.....	49
7.2	Modelo experimental.....	51
7.3	Efecto de las porfirinas.....	53
8	Conclusión.....	55
9	Referencias.....	56

## ABREVIATURAS

%IF: Porcentaje de índice de funcionalidad

ABC: Área bajo la curva

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

ANOVA: Análisis de varianza

ASIC: Canales iónicos sensibles a ácidos

ATP: Adenosín trifosfato

AU: Ácido úrico

CDR: Curva dosis respuesta

COX: Ciclooxygenasa

CT: Curso temporal

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DE<sub>25</sub>: Dosis efectiva 25

E<sub>4h</sub>: Efecto a las 4 horas

E<sub>máx</sub>: Efecto máximo

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

GRO: Oncogén relacionado con el crecimiento

IL: Interleucina

KC: Queratinocito quimioatrayente

kg: Kilogramos

LADME: Liberación, administración, distribución, metabolismo y excreción

MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos

mg: Miligramos

MIP: Proteína inflamatoria de monocitos

ml: Mililitro

nm: Nanómetros



OMS: Organización Mundial de Salud

p.o.: per oral

PIFIR: Disfunción inducida por dolor en rata

PMN: Polimorfonucleares

ppm: Partes por millón

RANTE: Quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T

RMN: Resonancia magnética nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

TFA: Ácido trifluoroacético

T<sub>máx</sub>: Tiempo en el que se presenta el efecto máximo

TMe<sub>2</sub>NPP: 5,10,15,20-tetra(*p*-N,N-dimetilaminofenil)porfirina

TMS: Tetrametilsilano

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNO<sub>2</sub>PP: 5,10,15,20-tetra(*m*-nitrofenil)porfirina

TPP: 5,10,15,20-tetrafenilporfirina

TREK: Canal de K<sup>+</sup> relacionado con TWIK

TRPM8: Receptor de potencial transitorio familia M8

TRPV: Receptor de potencial transitorio vaniloide

u.a.: Unidades de área

UV-Vis: Ultravioleta visible

μl: Microlitro

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Datos fisicoquímicos de las porfirinas con sustituyentes TPP, TMe<sub>2</sub>NPP, TNO<sub>2</sub>PP.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 2. Optimización de la técnica de síntesis para la TPP y TMe<sub>2</sub>NPP. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 3. Optimización de la técnica de síntesis para la TNO<sub>2</sub>PP. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 4. Comparación del efecto máximo con el efecto a la 4h de TPP. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 5. Comparación del efecto máximo con el efecto a la 4h de TMe<sub>2</sub>PP. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 6. Comparación del efecto máximo con el efecto a la 4h de TNO<sub>2</sub>PP.....</i>	<i>47</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura molecular de la porfirina.</i>	2
<i>Figura 2. Posiciones de sustitución de las porfirinas.</i>	2
<i>Figura 3. Primera síntesis de TPP (Rothemund).</i>	4
<i>Figura 4. Síntesis de tetrametilporfirinas (Rothemund).</i>	5
<i>Figura 5. Metodología de Adler-Longo.</i>	6
<i>Figura 6. Metodología de Lindsey.</i>	7
<i>Figura 7. Síntesis de MacDonald.</i>	8
<i>Figura 8. Reactividad de los sustituyentes.</i>	9
<i>Figura 9. Los estímulos nocivos como golpes, quemaduras, pinchazos, cortes, entre otros, se traducen en señales eléctricas en las fibras C y A<math>\delta</math> por receptores como los de potencial transitorio vaniloide (TRPV), de potencial transitorio familia M8 (TRPM8), canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC) y canales de K<sup>+</sup> de dos poros activados por estímulos mecánicos (TREK); que enviarán la señal a la corteza cerebral. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.</i>	12
<i>Figura 10. El dolor inflamatorio es promovido por un daño tisular o infección. En él, participan diversas células del sistema inmune que liberarán mediadores inflamatorios como bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandinas, ATP, Factor de necrosis tumoral-<math>\alpha</math>, interleucinas, entre otras moléculas que activarán las fibras nociceptivas. Los opioides e inhibidores de la ciclooxigenasa-2 son analgésicos usados para su tratamiento. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.</i>	13
<i>Figura 11. El dolor neuropático tiene como característica una combinación de déficit neurológicos y dolor, que pueden ser producidos por síndromes como el del túnel Carpiano o daños en la médula espinal o a nivel cerebral. Se utilizan antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivantes, opioides, entre otros, como posibles tratamientos. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.</i>	14
<i>Figura 12. Fibras aferentes y características principales. Modificado de Julius y Basbaum, 2001.</i>	16
<i>Figura 13. Metodología de Adler-Longo.</i>	23
<i>Figura 14. Aplicación de la inyección intra-articular. Modificado de Grossin y col., 2003.</i>	25
<i>Figura 15. Representación esquemática del modelo PIFIR. A; dispositivo contador de tiempo (computador). B; caja de interruptores. C; interruptores. D; electrodos. E; cilindro rotatorio de acero inoxidable. F; Motor eléctrico. Lopez-Muñoz y col., 1993.</i>	26
<i>Figura 16. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TPP.</i>	29
<i>Figura 17. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TPP.</i>	29
<i>Figura 18. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TPP.</i>	30
<i>Figura 19. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TPP.</i>	31
<i>Figura 20. Espectro de absorción UV-Visible de la TPP en CHCl<sub>3</sub>.</i>	31
<i>Figura 21. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TMe<sub>2</sub>NPP.</i>	32

<i>Figura 22. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TMe<sub>2</sub>NPP. ....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 23. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TMe<sub>2</sub>NPP. ....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 24. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TMe<sub>2</sub>NPP. ....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 25. Espectro de absorción UV-Visible de la TMe<sub>2</sub>NPP en CHCl<sub>3</sub>. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 26. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TNO<sub>2</sub>PP. ....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 27. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TNO<sub>2</sub>PP. ....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 28. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TNO<sub>2</sub>PP. ....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 29. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TNO<sub>2</sub>PP. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 30. Espectro de absorción UV-Visible de la TNO<sub>2</sub>PP en CHCl<sub>3</sub>. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 31. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TMe<sub>2</sub>NPP administrado por vía oral a dosis de 50, 100, 177.8 y 200 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 30%. Los datos son presentados como la media ± error estándar. Prueba t de Student *P&lt;0.05 vs TMe<sub>2</sub>NPP 177.8 mg/kg. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 32. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TNO<sub>2</sub>PP administrado por vía oral a dosis de 100, 177.8 y 316.2 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 30%. Los datos se muestran como la media ± error estándar. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 33. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TPP administrado por vía oral a dosis de 100, 316.2 y 1000 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 30%. Los datos se muestran como la media ± error estándar. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 34. Curso temporal de la disfunción inducida con ácido úrico al 15% en el modelo PIFIR. Los datos se muestran como la media ± error estándar. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 35. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TPP administrado por vía oral a dosis de 177.8, 316.2, 562.3 y 1000 mg/kg, usando como fármaco de referencia Ibuprofeno 100 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 15%. Los datos se muestran como la media ± error estándar. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 36. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TMe<sub>2</sub>NPP administrado por vía oral a dosis de 177.8, 316.2 y 562.3 mg/kg, usando como fármaco de referencia Ibuprofeno 100 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 15%. Los datos se muestran como la media ± error estándar. ....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 37. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TNO<sub>2</sub>PP administrado por vía oral a dosis de 177.8, 316.2, 562.3, 1000 y 1778.2 mg/kg, usando como fármaco de referencia Ibuprofeno 100 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 15%. Los datos se muestran como la media ± error estándar. ....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 38. Comparación de la curva dosis respuesta de TPP, TNO<sub>2</sub>PP, TMe<sub>2</sub>NPP e ibuprofeno. La línea punteada ubica la DE<sub>25</sub> que se puede obtener del modelo experimental. ....</i>	<i>48</i>

## RESUMEN

El dolor es un síntoma que posee una gran prevalencia en la población y para tratar el problema se utilizan fármacos con dianas terapéuticas distintas. Algunos de los analgésicos más utilizados son los AINEs y los opioides, sin embargo, como todos los fármacos, estos pueden variar en su eficacia y poseer efectos no deseados. Esto ha conllevado a la búsqueda de nuevos tratamientos. Las porfirinas son compuestos que han presentado diversas actividades biológicas y a la vez presentan una variedad de funcionalidades químicas y estéricas, por lo que, el objetivo de este trabajo fue realizar la síntesis, caracterización y evaluación del grado de actividad antinociceptiva de las porfirinas simétricas en un modelo de dolor inflamatorio. Para ello fueron sintetizadas, purificadas y caracterizadas tres porfirinas: TPP, TMe<sub>2</sub>NPP y TNO<sub>2</sub>PP. Se identificaron los efectos antinociceptivos de los compuestos mediante el modelo de disfunción inducida por dolor en rata usando ácido úrico al 15%. Se determinaron los cursos temporales del efecto, así como las curvas dosis-respuesta (CDR) de las moléculas, obteniendo como resultado que TPP (562.3 mg/kg) presenta un efecto antinociceptivo global de  $112.6 \pm 15$  u.a., TMe<sub>2</sub>NPP (562.3 mg/kg) presentó un efecto global de  $192.7 \pm 21.69$  u.a. y TNO<sub>2</sub>PP (1000 mg/kg) presentó un efecto global de  $199.7 \pm 20.14$  u.a. Al comparar las CDR, TNO<sub>2</sub>PP fue el compuesto de mayor eficacia, seguido por TMe<sub>2</sub>NPP y TPP respectivamente. En conclusión, al evaluar las porfirinas en el modelo experimental, estas evidenciaron efectos antinociceptivos, aunque con menor eficacia que ibuprofeno, un fármaco AINE conocido empleado como control positivo.

## ABSTRACT

Pain is a highly prevalent symptom in the population and drugs with different therapeutic targets are used to treat this problem. Some of the most widely used analgesic are NSAIDs and opioids, however, like all drugs, these can vary in their effectiveness and have unwanted effects. This has led to the search for new treatments. Porphyrins are compounds that have presented various biological activities and at the same time present a variety of chemical and steric functionalities, therefore, the objective of this work was to carry out the synthesis, characterization and evaluation of the degree of antinociceptive activity of symmetric porphyrins in an inflammatory pain model. For this, three porphyrins were synthesized, purified and characterized: TPP, TMe<sub>2</sub>NPP and TNO<sub>2</sub>PP. The antinociceptive effects of the compounds were identified by the rat pain-induced dysfunction model using 15% uric acid. The time courses of the effect were determined, as well as the dose-response curves of the molecules, obtaining as a result that TPP (562.3 mg / kg) presents an antinociceptive overall effect of  $112.6 \pm 15$  a.u., TMe<sub>2</sub>NPP (562.3 mg / kg) presents an overall effect of  $192.7 \pm 21.69$  a.u. and TNO<sub>2</sub>PP (1000 mg / kg) presents an overall effect of  $199.7 \pm 20.14$  a.u. When comparing the CDRs, TNO<sub>2</sub>PP was the compound with the highest efficacy, followed by TMe<sub>2</sub>NPP and TPP respectively. In conclusion, when evaluating porphyrins in the experimental model, they showed antinociceptive effects, although with less efficacy than ibuprofene, a known NSAID used as a positive control.

# 1 Marco teórico

## 1.1 Porfirinas

Las porfirinas y algunos otros tetrapirroles relacionados como las clorinas, corroles y bacterioclorinas, han sido objeto de estudio por parte de la comunidad científica desde el siglo pasado debido a la importancia que presentan en la naturaleza, ya que desempeñan funciones importantes para la vida y por este motivo se les ha buscado utilidad en diferentes aplicaciones de la vida diaria. Son estructuras que pueden ser encontradas en moléculas endógenas de gran importancia para la vida como la clorofila, hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasas, peroxidasas y bacterioclorofilas, todas ellas cumpliendo un papel importante en el desarrollo de procesos esenciales para la supervivencia de los seres vivos (Chapman y col., 1997; Su & Hamilton, 2019).

Debido a su relevancia en temas como la ciencia de los materiales, la biología y la medicina, se han estudiado las características básicas de este tipo de estructuras, así como, la capacidad de sintetizar estos macrociclos con una variedad de funcionalidades químicas y estéricas (Vicente & Smith, 2014).

Estructuralmente las porfirinas son macrociclos formados por cuatro pirroles conectados entre sí por un carbono conocido como puentes metino (Figura 1), debido a la orientación de los nitrógenos hacia el centro de la conformación, estos compuestos tienen la capacidad de enlazar firmemente átomos metálicos (Figura 2a). Aparte de la inserción de metales en el centro de estos compuestos, las porfirinas pueden tener sustituyentes en la posición *meso* ubicada en los puentes metino (Figura 2b) o en las posiciones  $\beta$  del anillo pirrólico (Figura 2c) (Auwärter y col., 2015).

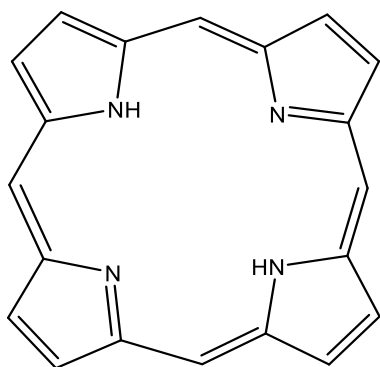


Figura 1. Estructura molecular de la porfirina.

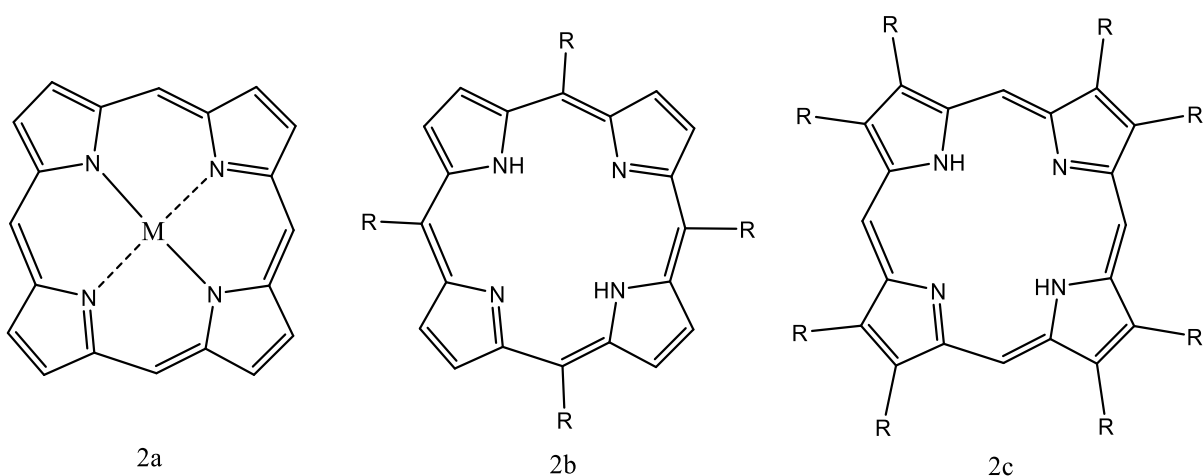


Figura 2. Posiciones de sustitución de las porfirinas.

Estos macrociclos cumplen con la regla de Hückel al tener  $4n+2$  electrones  $\pi$ , dando como resultado una molécula aromática. En total cuentan con 18 electrones  $\pi$  conjugados, ya que los electrones de las aminas no entran en la conjugación, aun así, la molécula es altamente estable. Existe una diferencia en el grado de reactividad entre las 12 posiciones de la periferia de la estructura, las más electrónicamente reactivas son las posiciones *meso* en donde se pueden llevar a cabo reacciones de sustitución electrofílica aromática, radicalarias. Así mismo, las posiciones  $\beta$  pueden tener el mismo tipo de interacciones con la ventaja de que son estéricamente más accesibles. Por otro lado, los nitrógenos centrales y sus conjugados, pueden protonarse o desprotonarse produciendo aniones o cationes, al igual que pueden



interaccionar con algún metal. Todos estos cambios influyen fuertemente en la reactividad química, las propiedades fotofísicas y las funciones biológicas de los macrociclos (Wijesekera & Dolphin, 1994).

### 1.1.1 Síntesis de porfirinas

La síntesis de porfirinas es necesaria como punto de partida para una amplia variedad de temas de química biológica, que fue impulsada inicialmente con la intención de recrear moléculas de productos naturales a partir de materiales estructuralmente similares, con la posibilidad de realizar cambios en los sustituyentes al usar reacciones químicas conocidas.

Actualmente la síntesis se enfoca más en las características estructurales del sitio diana en lugar del material de partida, para ello se deben conocer los patrones de sustitución del macrociclo, en donde se distinguen dos tipos de posiciones funcionalizables: las posiciones  $\beta$  y las *meso*. Las porfirinas  $\beta$ -sustituidas normalmente se encuentran en estructuras provenientes de la naturaleza, tienen un parecido estructural con aquellas de origen biológico, mientras que las *meso*-sustituidas no tienen análogos biológicos, por lo que solo son accesibles por medios sintéticos. (Mann, 1989).

En la actualidad para diseñar la estrategia para la preparación de una porfirina es necesario llevar a cabo un análisis retrosintético que permitirá planificar mejor la metodología a usar.

La elección del patrón de sustitución de la molécula debe ser primordial para formar la base de la estrategia sintética. Para ello existen tres factores importantes a considerar (Wijesekera & Dolphin, 1994):

- a) La simetría global de la molécula. Se puede realizar una estructura simétrica con solo uno o dos pasos en la reacción de síntesis, por otro lado, los sistemas asimétricos requieren de múltiples pasos y sobre todo de experiencia por parte del experimentador.

- b) La naturaleza del sustituyente. Los heteroátomos como los halógenos, grupos amino, nitro, sulfónico, etc., son sustituyentes de fácil introducción en la molécula por su naturaleza electrofílica o radicalaria, mientras que, los sustituyentes unidos a carbono y sus derivados, usualmente deben ser introducidos antes o durante la formación del anillo porfirínico.
- c) La posición del sustituyente. Para lograr la sustitución de la posición  $\beta$  del anillo pirrólico se debe sintetizar previamente del pirrol con el precursor acíclico que contenga el grupo deseado.

La síntesis de porfirinas fue descrita por primera vez por Rothmund en 1935, quien para obtener meso-tetrafenilporfirinas calentó pirrol y un aldehído en piridina en un tubo sellado a 150 °C o más durante 24 h (Figura 3). Esta reacción más tarde fue ampliada para incluir más de 25 aldehídos aromáticos, alifáticos (Rothmund & Menotti, 1948) y anteriormente se había utilizado para preparar tetrametilporfirinas por reacción de pirrol y formaldehído en metanol (Figura 4) (Rothmund, 1935, 1936). Básicamente la metodología consistía en colocar reactivos en un tubo sellado a altas temperaturas durante 24 a 48 horas en ausencia de aire o de cualquier oxidante y los rendimientos de esta reacción eran, en general, menos de 5% (Shy et al., 2014).

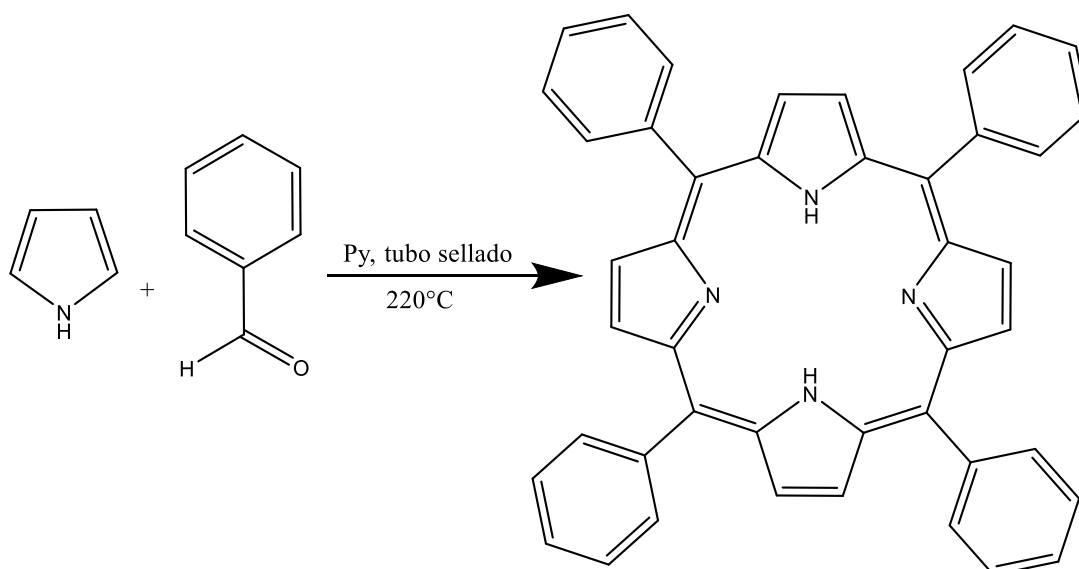


Figura 3. Primera síntesis de TPP (Rothmund).

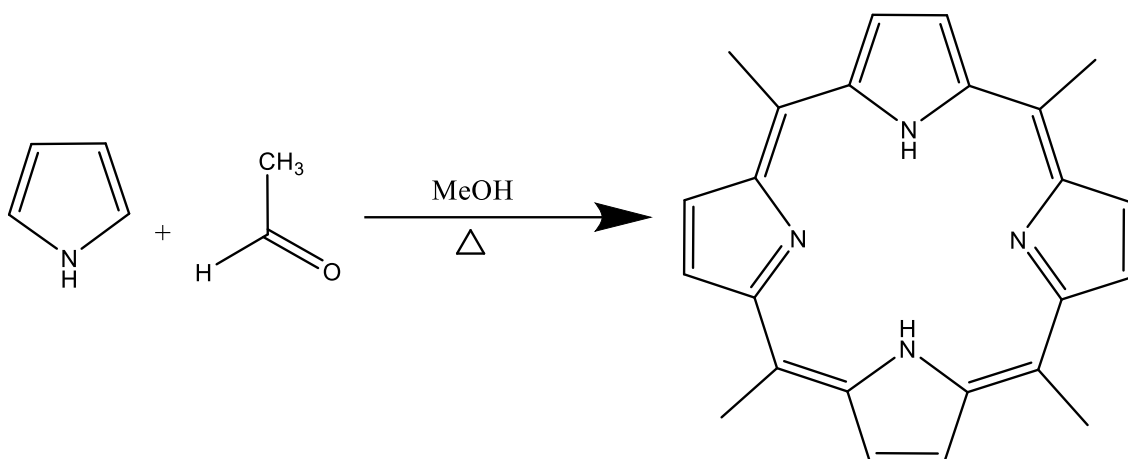


Figura 4. Síntesis de tetrametilporfirinas (Rothemund).

Sin embargo, no todos los benzaldehídos sustituidos podrían sobrevivir a este proceso y producir la porfirina. Adler y colaboradores modificaron la técnica a modo que involucrará el uso de un medio ácido para la reacción como por ejemplo el ácido propiónico en un sistema abierto. Este procedimiento implica la adición de cantidades equimolares de pirrol y aldehído al ácido propiónico a ebullición (Figura 5) (Adler et al., 1967); después de calentar durante un periodo de tiempo, la mezcla se deja enfriar y la TPP se filtra, obteniendo un rendimiento de 20-25% de TPP a partir de estos químicos simples de estante (Su & Hamilton, 2019). Al suavizar las condiciones de reacción amplió el abanico de aldehídos sustituidos que podían ser utilizados, aunque seguían limitados a solo aquellos que eran estables en un medio ácido a ebullición (Lindsey y col., 1987).

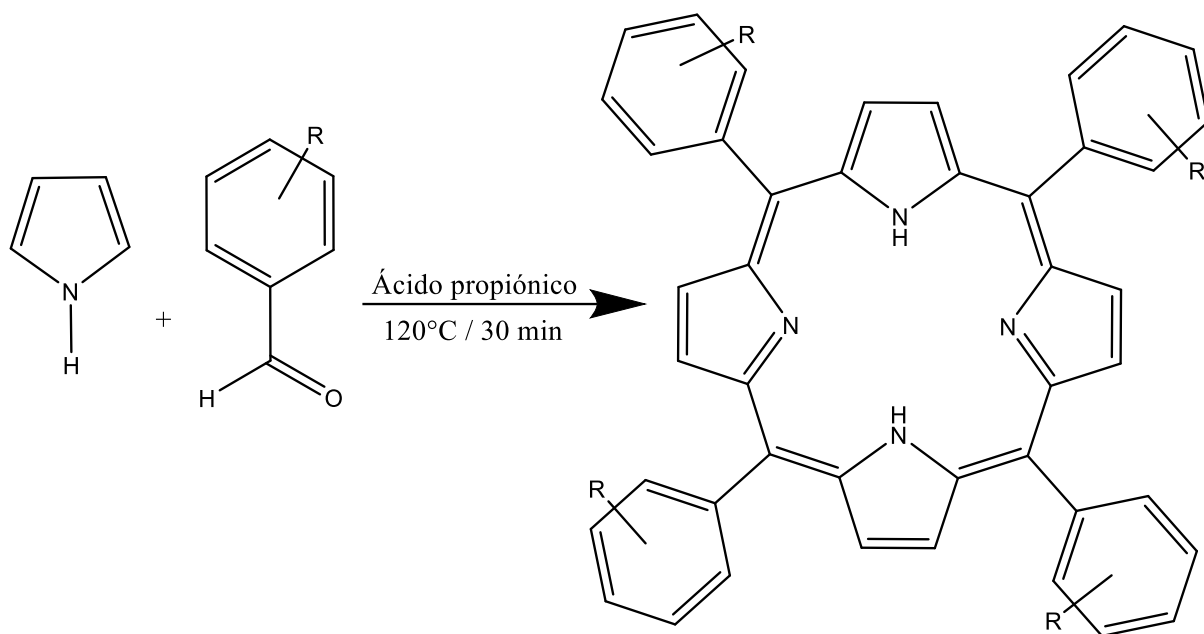


Figura 5. Metodología de Adler-Longo.

La síntesis fue finalmente optimizada por el grupo de Lindsey, que mostró que se pueden obtener excelentes rendimientos (del 10 al 60%) (Shy et al., 2014) de una amplia variedad de porfirinas usando una reacción de dos etapas, en la primera etapa reacciona pirrol y algún aldehído, en presencia de un catalizador de ácido de Lewis (ácido trifluoroacético, (TFA); o dietiletearato de trifloruro de boro,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) a temperatura ambiente en ausencia de oxígeno para evitar una oxidación antes de que se establezca el equilibrio de la reacción. El producto obtenido del primer paso es un porfirinógeno. En el segundo paso de la reacción, el porfirinógeno se oxida a porfirina mediante el uso de un oxidante (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, DDQ; o *p*-cloranilo), este tipo de reacción es irreversible, evita subproductos y facilita la purificación (Figura 6) (Lindsey y col., 1994; Vicente & Smith, 2014).

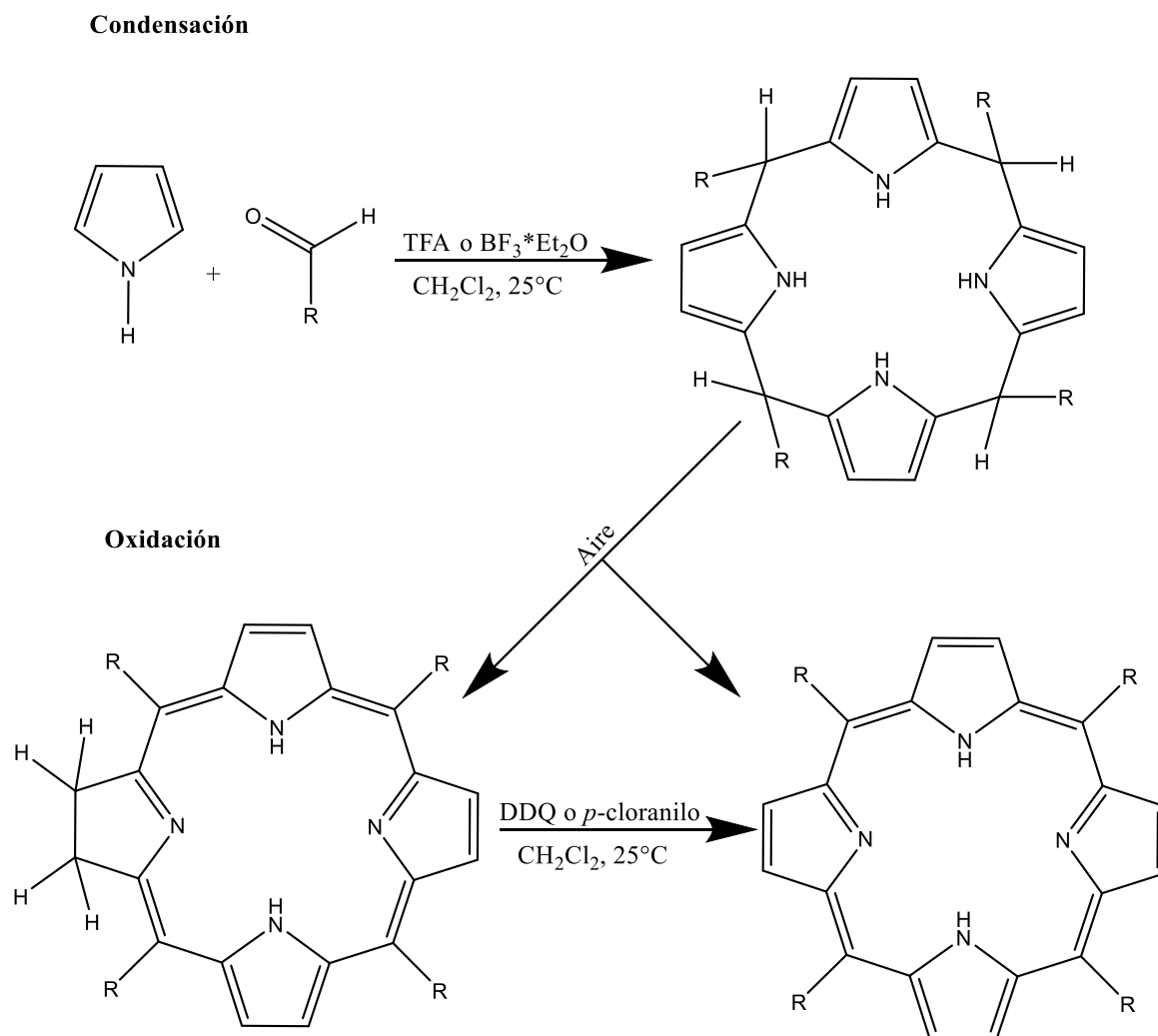


Figura 6. Metodología de Lindsey.

Otro método utilizado para la síntesis de porfirinas es el descrito por MacDonald, este método de condensación 2+2 es una estrategia útil para preparar porfirinas simétricas. En esta ruta el 1,9-diformildipirrometano se condensa con un 1,9-dipirrometano no sustituido o su ácido 1,9-dicarboxílico en presencia de un catalizador ácido, para producir la porfirina (Figura 7). En principio, se puede aplicar a la síntesis de porfirinas asimétricas mediante la condensación de dipirrometanos diferentes, pero este método rara vez se usa porque los componentes se pueden acoplar en más de una forma para dar productos que generalmente son difíciles de separar (Arsenault, 1960; Latos-Grazynski y col., 2000; Montierth y col., 2000).

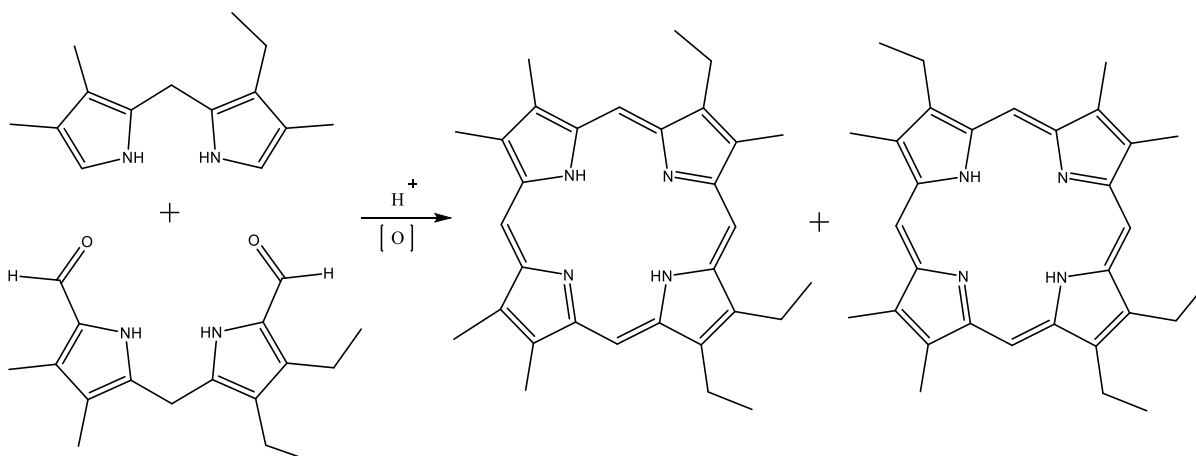


Figura 7. Síntesis de MacDonald.

### 1.1.2 Reactividad del sustituyente

A las porfirinas se les han atribuido diversas actividades farmacológicas, sin embargo, los sustituyentes adicionados en las moléculas no son específicos para cada efecto probado, con excepción de las porfirinas usadas en la terapia fotodinámica en donde se busca mayoritariamente que los sustituyentes posean oxígenos para que el compuesto pueda ejercer el efecto deseado (Weishaupt y col., 1976; Jelic y col., 2012; Kurniawan y col., 2018). Tomando en cuenta que no existe un patrón específico para la elección del sustituyente, se tienden a buscar grupos funcionales que al adicionarse permitan que las cargas no estén localizadas en un punto para que haya interacciones en más de un sitio de la molécula.

Estos grupos funcionales se pueden clasificar de acuerdo a su reactividad química en activadores y desactivadores.

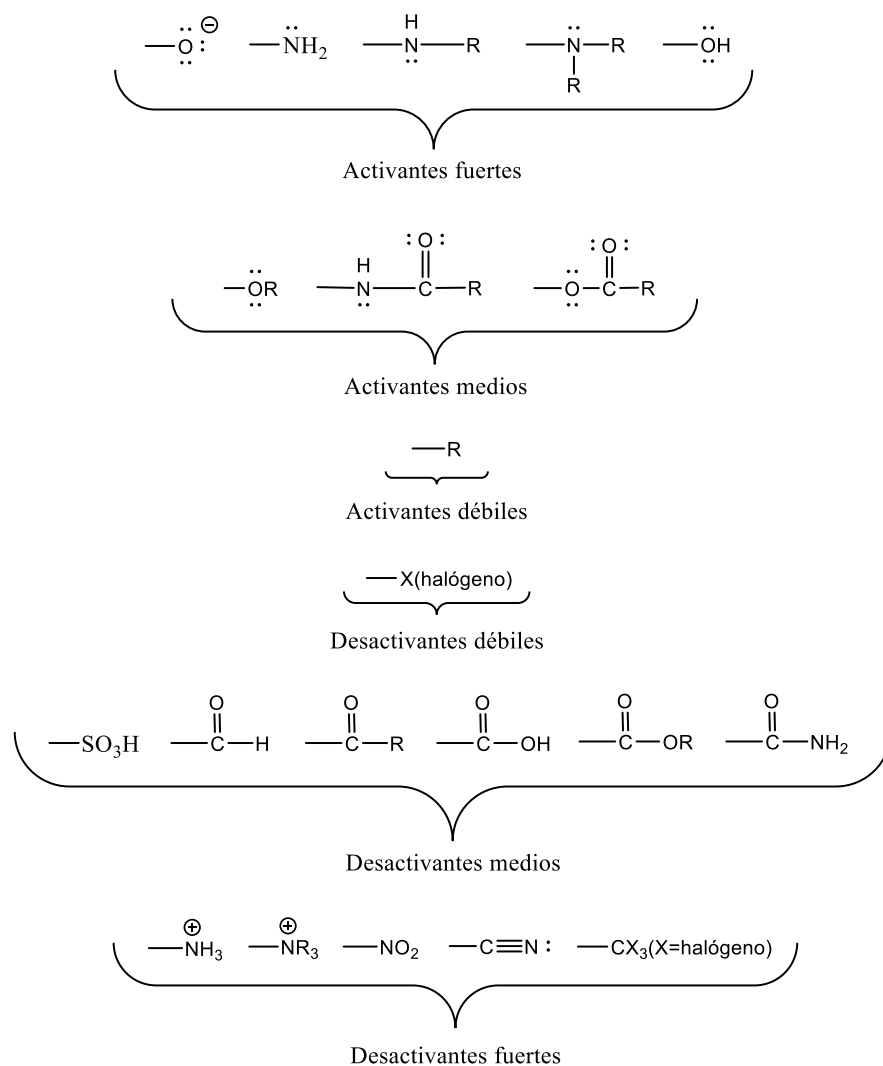


Figura 8. Reactividad de los sustituyentes.

Los grupos funcionales que se clasifican como activadores poseen una gran velocidad de reacción, son generalmente grupos electrodonadores que se unen a un anillo bencénico en posición *orto-para* y se dividen a su vez en activadores débiles, medios y fuertes. Un ejemplo son las aminas, estas son un grupo frecuentemente utilizado por su alto grado de actividad biológica. Son activadores fuertes que, al unirse a un anillo, deslocalizan el par electrónico no compartido del nitrógeno disminuyendo la densidad electrónica de este mismo, a la vez que la aumenta en el sistema  $\pi$  del anillo aromático, teniendo como consecuencia un alto grado de reactividad de la arilamina (McMurry, 2012).

Por otro lado, los grupos desactivadores tienen una velocidad de reacción lenta, son sustituyentes electroattractores que orientan principalmente a la posición *meta* (con excepción de los halógenos), al igual que los activadores, se subdividen en débiles, medios y fuertes. Un ejemplo de ellos son los grupos nitro que al estar unidos a un grupo aromático atraen la densidad electrónica hacia el nitrógeno, esto provoca que el elemento quede con una carga positiva o parcialmente positiva e impide que el anillo reaccione con electrófilos (Carey y col., 2006; L. G. Wade, 2012).

## 1.2 Dolor

El dolor es uno de los signos que ha acompañado al hombre a través de los tiempos, al inicio su definición fue establecida por aspectos cristianos, políticos y filosóficos, muchos creían que el dolor era una manera de probar su fe y que el uso de la anestesia atentaba contra esta, incluso los médicos se oponían a su uso porque creían que la ausencia de dolor podía aplazar el proceso de mejora del paciente pero con el paso de los años los pensamientos cambiaron y tratar el dolor se volvió un tema de importancia médica (Meldrum, 2003).

El opio, el láudano y la morfina fueron usados para aliviar este síntoma, no obstante, su libre venta y falta de regulación, convirtió el consumo de estos en un problema de salud social (Kerr, 1894). En 1899, la farmacéutica Bayer introdujo el ácido acetilsalicílico como un tratamiento para aliviar el dolor de cabeza, pero con el efecto de causar daños gástricos. Este compuesto con actividad analgésica y antipirética, mejor conocido comercialmente como aspirina, demostró ser seguro y reemplazó el uso de opiáceos como terapia para dolor de leve a moderado (McTavish, 1987). Sin embargo, para el dolor severo los opiáceos siguen siendo fundamentales.

A lo largo del siglo XX existió una gran controversia con el uso de fármacos para el tratamiento del dolor, por un lado, querían aliviar el síntoma, pero por otro, temían provocar una adicción. Durante un tiempo se optó por usar opioides (anteriormente conocidos como narcóticos) cuando ninguna otra terapia fuera efectiva (Schiffrin,



1956), pero con el desarrollo de evidencia neurofisiológica y farmacológica, se sintetizaron fármacos específicos que tuvieran como dianas a mediadores o canales implicados en la transmisión del dolor (Dray & Urban, 1996).

Hay cuestiones que han trascendido hasta nuestros días como la atenuación del dolor causado por enfermedades progresivas como el cáncer y el alivio tanto del dolor agudo como del crónico que puede ser causado por padecimientos como la artritis, migraña o neuropatías. Sin embargo, una sola terapia no aliviará el síntoma, aunque este tenga la misma etiología y sea del mismo tipo, debido a que existen factores cognitivos, afectivos y conductuales que modifican las percepciones de cada individuo y por ende su respuesta al tratamiento. Por eso, a pesar de los avances que se tienen, sigue siendo un reto encontrar una terapia para este padecimiento (Meldrum, 2003).

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor este “*es una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño real o potencial en un tejido, o descrito en términos de dicho daño*”. Esta definición considera que el dolor no es una respuesta puramente nociceptiva sino que involucra emociones y otros factores cognitivos para dar lugar a la sensación dolorosa (Woolf, 2004).

### 1.2.1 Tipos de dolor

Puede ser clasificado de diversas maneras, por su duración (agudo o crónico), localización (somático o visceral), intensidad (leve, moderado o severo), curso (continuo o irruptivo), patogenia (nociceptivo, inflamatorio, neuropático o funcional) e incluso por su farmacología. A la vez, puede tener 2 tipos de naturaleza: normal o adaptativa y anormal o maladaptativo.

#### 1.2.1.1 Normal o Adaptativo

El dolor normal o adaptativo se da como una señal de alerta para evitar un daño al tejido y para repararlo en caso de una lesión existente. En esta categoría se encuentra el dolor nociceptivo y el dolor inflamatorio.

### 1.2.1.1.1 Dolor nociceptivo

El sistema nociceptivo cumple la función específica de informar, mediante sensaciones desagradables, la aparición de un daño inminente al organismo. Esto lo puede lograr mediante la interacción de receptores ubicados en la periferia del cuerpo que convierten los estímulos físicos, químicos y mecánicos en señales eléctricas que viajan a través de la médula espinal, el tallo cerebral y el tálamo para finalizar en la corteza cerebral y producir la sensación de dolor (Woolf, 2004).

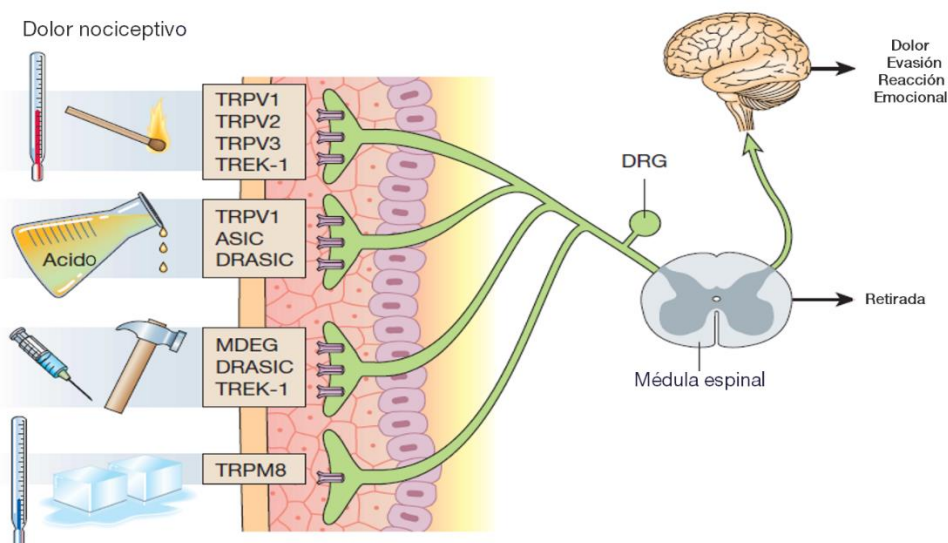


Figura 9. Los estímulos nocivos como golpes, quemaduras, pinchazos, cortes, entre otros, se traducen en señales eléctricas en las fibras C y A $\delta$  por receptores como los de potencial transitorio vaniloide (TRPV), de potencial transitorio familia M8 (TRPM8), canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC) y canales de K<sup>+</sup> de dos poros activados por estímulos mecánicos (TREK); que enviarán la señal a la corteza cerebral. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.

Cabe mencionar que, aunque el dolor nociceptivo es una sensación poco agradable, este no debe ser inhibido porque se puede perder su función protectora y con ello aumentar el daño tisular.

### 1.2.1.1.2 Dolor inflamatorio

Este tipo de dolor se da cuando existe una lesión y funciona para reparar el daño producido en el tejido. Durante el proceso inflamatorio se liberan sustancias como citocinas, cininas, aminas, prostanoides, iones y otros mediadores de la inflamación. Algunos de estos activan fibras nociceptivas y otros las sensibilizan, de modo que estímulos que normalmente no causarían dolor, ahora lo hacen. Esto último es con la finalidad de evitar el movimiento de la parte lesionada para no causar un mayor daño y permitir la recuperación (Scholz & Woolf, 2002).

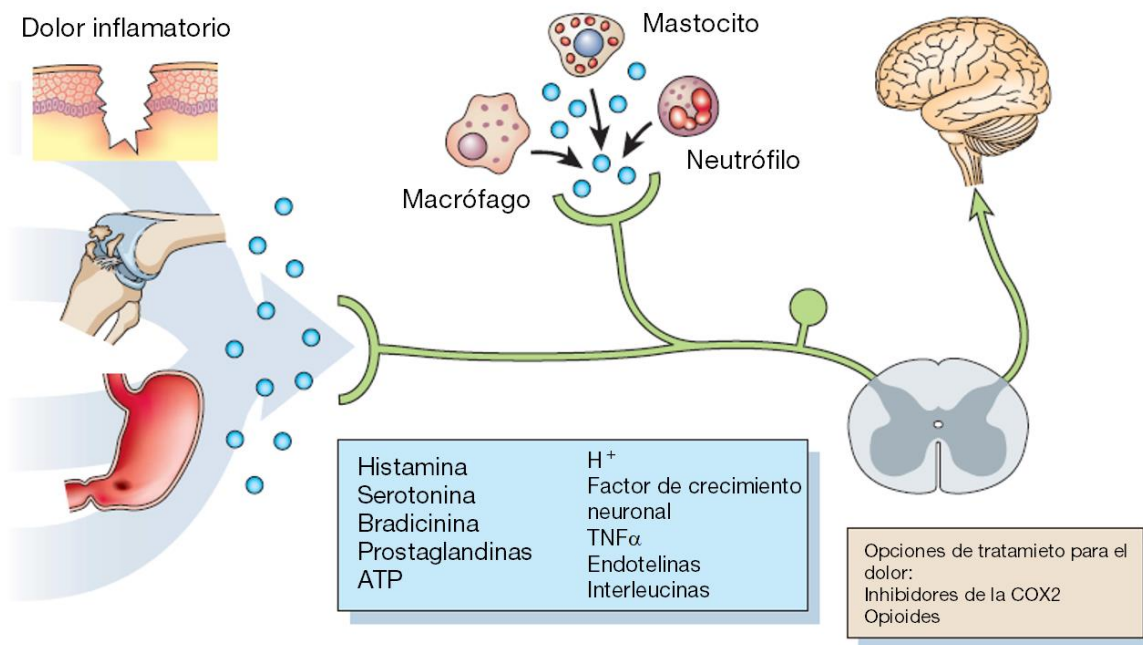


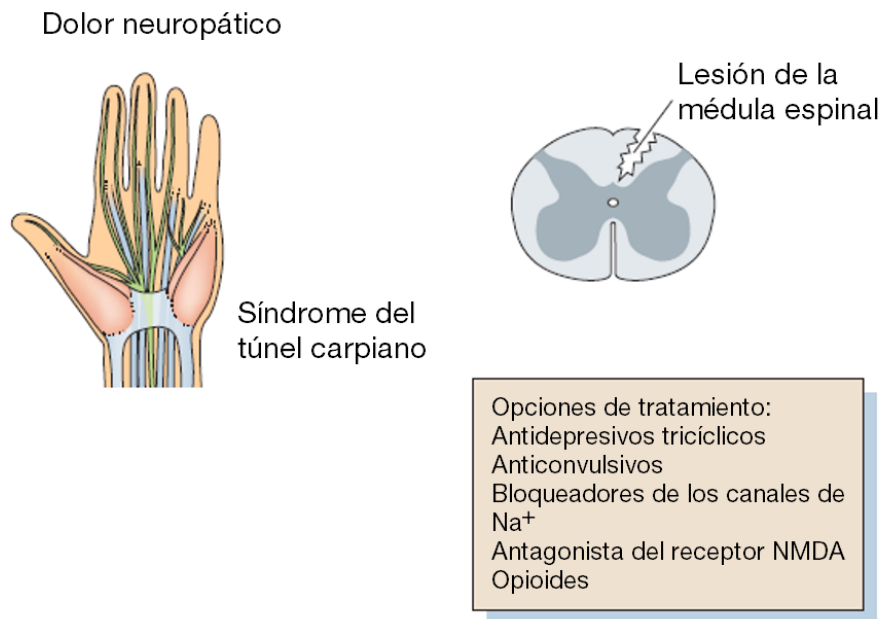
Figura 10. El dolor inflamatorio es promovido por un daño tisular o infección. En él, participan diversas células del sistema inmune que liberarán mediadores inflamatorios como bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandinas, ATP, Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , interleucinas, entre otras moléculas que activarán las fibras nociceptivas. Los opioides e inhibidores de la ciclooxigenasa-2 son analgésicos usados para su tratamiento. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.

### 1.2.1.2 Anormal o Maladaptativo

Este se presenta cuando existe un daño en el sistema nervioso (dolor neuropático) o un mal funcionamiento en este mismo (dolor funcional). Que de un modo u otro provocan la sensibilización del sistema, produciendo una amplificación del síntoma.

#### 1.2.1.2.1 Dolor neuropático

Surge por una lesión en el sistema nervioso, su etiología es muy variada, va desde lesiones cerebrales hasta enfermedades en la médula espinal o neuropatías periféricas. Puede ser causado por enfermedades como la diabetes, esclerosis múltiple, tratamientos anticancerígenos, etc. En este tipo de dolor no se presenta alguna actividad protectora o reparadora, por lo que se considera que el síntoma es una patología (Smith, 2018).



*Figura 11. El dolor neuropático tiene como característica una combinación de déficit neurológicos y dolor, que pueden ser producidos por síndromes como el del túnel Carpiano o daños en la médula espinal o a nivel cerebral. Se utilizan antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivantes, opioides, entre otros, como posibles tratamientos. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.*

### 1.2.2 Nocicepción

A lo largo del cuerpo humano existen diferentes tipos de neuronas sensoriales, una subpoblación de estas son los nociceptores, los cuales se activan por estímulos nocivos. El estímulo puede ser de distinta índole por lo que activa receptores específicos para el tipo de inducción, por ejemplo, un cambio en la presión activa mecanorreceptores, termorreceptores en caso de cambios en la percepción del frío o calor y los quimiorreceptores se activan por sustancias químicas como la capsaicina o ácidos (Bjorkman, 1995).

Los nociceptores son extremadamente heterogéneos, por lo que difieren en los neurotransmisores, receptores y canales iónicos que expresan, así como, en la velocidad de conducción. Esto influye en la capacidad de convertir los estímulos nocivos en potenciales de acción y en la sensibilización durante procesos de inflamación, lesión y enfermedad (Stucky y col., 2001).

### 1.2.3 Nociceptores

Las fibras nerviosas que participan en el proceso del dolor se dividen en dos grupos: las fibras A $\delta$  y las C. Las primeras son fibras ligeramente mielinizadas con un diámetro de 1-6  $\mu\text{m}$  y una velocidad de conducción intermedia de 6-30 m/s. Estas tienen distintos umbrales de estimulación, los mecanorreceptores de umbral alto (HTMs) tipo 1 son activados por calor ( $>50^{\circ}\text{C}$ ) y estímulos nocivos, son los responsables de la primera sensación de dolor y se sensibilizan con las lesiones, mientras que los de tipo 2 tienen un umbral térmico menor ( $45^{\circ}\text{C}$ ) pero con un umbral mecánico más elevado. Las segundas, son fibras aferentes polimodales desmielinizadas de diámetro  $<1.5 \mu\text{m}$ , con una velocidad de conducción lenta menor a 2 m/s, responden a una amplia gama de estímulos mecánicos, térmicos y químicos, aparte de que tienen una subpoblación de receptores que responde a cambios de temperatura que en condiciones normales

son insensibles y otra que responde a sensaciones como picazón, enfriamiento y algunas sensaciones agradables al tacto ( Julius & Basbaum, 2001; Hudspith, 2016).

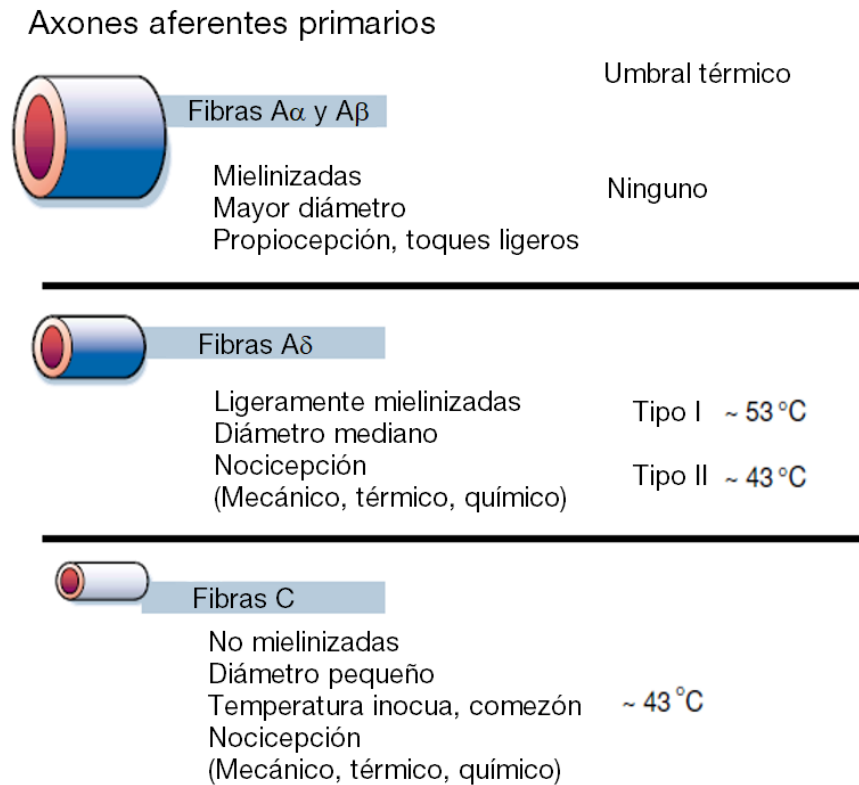


Figura 12. Fibras aferentes y características principales. Modificado de Julius y Basbaum, 2001.

### 1.3 Inflamación

La inflamación es un padecimiento que ha acompañado al hombre a través de los tiempos y se ha caracterizado (desde el punto de vista clínico) mediante la manifestación de “los cinco signos cardinales de la inflamación”, estos son: rubor, calor, dolor, tumor y pérdida de la función.

El proceso inflamatorio es inespecífico y los organismos lo emplean cuando existe un estímulo externo de carácter químico, biológico o físico que causa algún daño al tejido. Es regulado por una serie de señales que se pueden clasificar en inductoras y

reguladoras, las cuales se encargan de comenzar el proceso y también de reparar el daño producido por este ( Ortega-Gómez y col., 2013; Noack & Kolopp-Sarda, 2018).

Por otra parte, la respuesta inflamatoria también juega un papel clave en la persistencia del dolor mediante la liberación de estímulos químicos que tienen la capacidad de sensibilizar, de manera directa o indirecta, a las fibras nociceptivas (Schaible, 2014; Cook y col., 2018).

### 1.3.1 Tipos de inflamación

La inflamación se puede clasificar en dos tipos: aguda y crónica.

La inflamación aguda es de una duración corta que puede ir desde minutos hasta unos pocos días, en esta predominan procesos vasculares como la vasodilatación local y el aumento de la permeabilidad capilar, así como la participación principalmente de células polimorfonucleares (PMN) y monocitos (Noack & Kolopp-Sarda, 2018).

La inflamación crónica aparece cuando no existe una resolución al proceso inflamatorio agudo por lo que tiende a prolongarse la respuesta inflamatoria, esta puede durar desde semanas hasta años. En este tipo de inflamación predominan los procesos proliferativos y participan los linfocitos, plaquetas y mastocitos (Lawrence & Gilroy, 2007).

### 1.3.2 Mediadores

Existe una variedad de agentes químicos como: las cininas, aminas, ATP, prostaglandinas, leucotrienos y protones, que forman la llamada “sopa inflamatoria”. Estos mediadores tienen la función de regular el proceso inflamatorio (mediante interacciones y comunicaciones entre las células) y a su vez sensibilizan a los nociceptores al ser detectados por sus extremos terminales (Woolf y Ma, 2007; Dubin & Patapoutian, 2010).

Los mediadores o citocinas pueden actuar de manera autocrina, paracrina o endocrina y reciben diferentes nombres dependiendo de la célula que los produce o por su función. Por ejemplo, las linfoquinas son producidas y liberadas por los linfocitos T, las monocinas son producidas por monocitos, las quimiocinas poseen actividades quimiotácticas y las interleucinas son producidas por un leucocito y actúan sobre otros leucocitos (Zhang & An, 2007).

#### 1.3.2.1 Citocinas proinflamatorias

Son producidas mayoritariamente por macrófagos activados y participan en la regulación positiva del proceso inflamatorio como es el caso de la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , que estimulan la producción de proteínas de fase aguda, atraen células inflamatorias, inician la cascada de citocinas e incluso actúan como pirógenos endógenos, lo que lleva a la persistencia del infiltrado inmune, la hiperplasia celular y la destrucción del tejido, por lo que, contribuye en gran medida a la cronicidad de la inflamación (Noack & Kolopp-Sarda, 2018).

#### 1.3.2.2 Quimiocinas

Son un subgrupo particular de citocinas estructuralmente relacionadas que son liberadas principalmente por macrófagos, células endoteliales, linfocitos T, fibroblastos y monocitos. Estas señales moleculares tienen como principal función controlar la adhesión y quimiotaxis de monocitos y leucocitos circulantes hacia el tejido dañado, pero también inducen otros efectos inflamatorios, incluida la liberación de histamina de basófilos y mastocitos y activación de eosinófilos (White, 1999; Moser & Willmann, 2004).

Las quimiocinas tienen residuos de cisteína en el extremo amino terminal que les permiten ser asignados a cuatro grupos: quimiocinas CC que poseen las dos primeras cisteínas de forma adyacente (RANTES, proteína quimiotáctica de monocitos o MCP-



1, proteína inflamatoria de monocitos o MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ); quimiocinas CXC, en las cuales las dos cisteínas se encuentran separadas por un aminoácido (IL-8 también llamada oncogén relacionado con el crecimiento o GRO / KC); quimiocinas C que solo presenta dos cisteínas a lo largo de su estructura (linfotactina) y quimiocinas CXXXC quienes presentan tres aminoácidos entre las dos cisteínas (fractalquina) (Zhang & An, 2007; Ortega-Gómez y col., 2013).

## 2 Justificación

El dolor es un síntoma y a la vez un problema que se ha estudiado durante mucho tiempo. Puede presentarse desde una pequeña incomodidad en alguna parte del cuerpo debida a un raspón o un ligero golpe hasta una sensación tan intensa que incluso con los fármacos más eficaces sería difícil disminuirla. Todos los días estamos propensos a sentir dolor, sin necesidad de realizar acciones riesgosas. Aunado a esto, algunas personas que padecen dolor tienen serias consecuencias en su calidad de vida, como tener bajo rendimiento laboral, problemas para concentrarse, dormir o socializar (McDermott y col., 2006). Para tratar el problema se utilizan fármacos con dianas terapéuticas distintas entre ellos, debido a la heterogeneidad de factores etiológicos. Algunos de los analgésicos más utilizados son los AINEs y los opioides, sin embargo, como todos los fármacos, estos poseen efectos no deseados. En el caso de los AINEs, el principal efecto adverso que pueden provocar es úlcera gástrica. Por otro lado, los opioides al ser usados para tratamientos crónicos pueden provocar adicción, tolerancia o problemas de sobredosis en los pacientes (Scholz & Woolf, 2002).

Las porfirinas son moléculas a las que se les han encontrado diversas actividades terapéuticas como anticancerígenas, antiinflamatorias, antihelmínticas, etc. (Jelic y col., 2012) y a la vez, se ha demostrado en modelos animales que a dosis altas no presentan efectos tóxicos. Sin embargo, en contraste con la multitud de información disponible sobre su función endógena en la fisiología humana, biosíntesis y biodegradación, se conoce relativamente poco acerca de sus propiedades analgésicas o antinociceptivas. Un estudio realizado con estos macrociclos indicó que tienen efecto en esta terapia aunque se desconoce la farmacología de los compuestos (Alonso-Castro y col., 2015), por lo que, con este trabajo se busca aportar conocimiento sobre las porfirinas en el tratamiento del dolor.

### 3 Hipótesis

Las porfirinas que poseen un grupo activador como 5,10,15,20-tetra(*p*-N,N-dimetilaminofenil)porfirina y un grupo desactivador como 5,10,15,20-tetra(*m*-nitrofenil)porfirina presentarán mayor actividad antinociceptiva que 5,10,15,20-tetrafenilporfirina.

### 4 Objetivos

#### 4.1 Objetivo General

Sintetizar porfirinas con diferentes patrones de sustitución y caracterizar sus efectos antinociceptivos.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener mediante síntesis porfirinas sustituidas simétricamente con patrones de sustitución: activador (TMe<sub>2</sub>NPP), neutro (TPP) y desactivador (TNO<sub>2</sub>PP).
- Caracterizar la estructura de las porfirinas simétricas por métodos espectrométricos.
- Optimizar la reacción de síntesis de las porfirinas sustituidas de forma simétricamente.
- Determinar el grado de actividad antinociceptiva de las porfirinas simétricas empleando curvas temporales y curvas dosis-respuesta en un modelo de disfunción inducida por dolor inflamatorio.
- Comparar los cursos temporales y curvas dosis-respuesta de las porfirinas con los mostrados por Ibuprofeno, un control positivo de tipo AINES estandarizado.

## 5 Metodología

### 5.1 Animales

Para establecer los modelos experimentales de nocicepción, se usaron ratas Wistar machos con un peso de 180 g. proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20-22° C y humedad relativa entre 50-55 %. Se alimentaron con dieta comercial Lab Diet. El agua y el alimento fueron suministrados “*ad libitum*” con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El manejo de los animales en los modelos experimentales se realizó de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a las Guías de los estándares éticos para investigaciones de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983).

### 5.2 Fármacos y sustancias

El pirrol, benzaldehído, 4-(dimetilamino)benzalaldehído y 3-nitrobenzalaldehído propiónico se obtuvo de Sigma-Aldrich. Se usó ácido úrico (Sigma) al 15 y 30% en aceite mineral (droguería Cosmopolita S.A. de C.V.).

El principio activo Ibuprofeno (Sigma) fue administrado por vía oral (p.o.), empleando como vehículo polivinilpirrolidona (Sigma) en proporción 1:4.

### 5.3 Reacción de síntesis

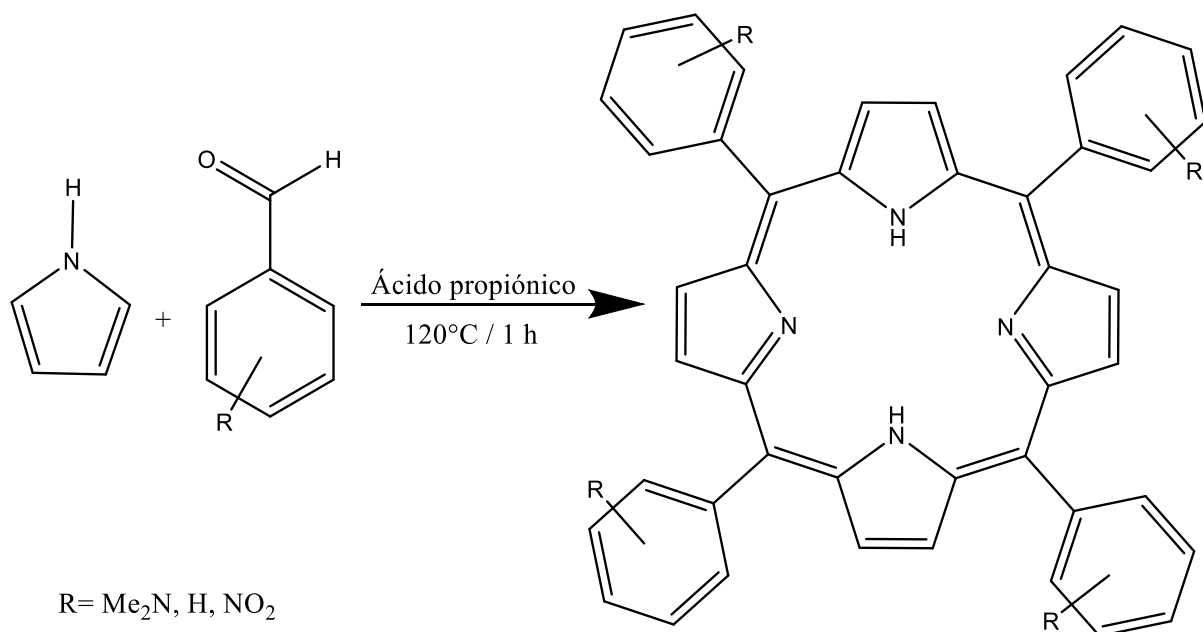


Figura 13. Metodología de Adler-Longo.

Para la síntesis de los compuestos, se preparó una solución de ácido propiónico (100 ml) a temperatura de ebullición con el aldehído correspondiente (0.0144 mol), a esto se le añadió 300  $\mu$ l de pirrol cada 15 minutos hasta completar 1 ml (0.0144 mol), siendo la última adición de 400  $\mu$ l (Figura 13). La mezcla de reacción se mantuvo en ebullición aproximadamente 2 h. Después de detener la reacción, la solución se enfrió a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se dejó durante la noche, a dicha temperatura, para permitir la precipitación del producto. El sólido de reacción se filtró al vacío para posteriormente ser lavado con cloroformo. Todas las porfirinas fueron conservadas en frascos ámbar para protegerlas de la luz (Adler y col., 1967).

## 5.4 Caracterización

### 5.4.1 Resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  se realizaron en un equipo Agilent modelo DD2 de 600 MHz. Se utilizó  $\text{CHCl}_3$  como disolvente y TMS como referencia a 0. Este análisis proporcionó información relevante con respecto a los hidrógenos presentes en cada compuesto como: desplazamiento químico ( $\delta$ , ppm), multiplicidad (m), constantes de acoplamiento (J) y la cantidad de protones. La RMN de carbono-13 proporcionó información del tipo de carbonos presentes en la molécula.

### 5.4.2 Espectroscopia Ultravioleta-Visible

Se determinó el espectro de absorción UV-Vis (380-700 nm) de los compuestos en estudio en un espectrofotómetro modelo UV-1800 Shimadzu en solución de  $\text{CHCl}_3$ . Esto con la finalidad de identificar su presencia mediante un patrón característico, una banda intensa llamada Soret a  $\sim 420$  nm y cuatro bandas Q entre 480-800 nm.

## 5.5 Evaluación del efecto antinociceptivo

### 5.5.1 Modelo de disfunción inducida por dolor en rata (PIFIR)

Los animales fueron anestesiados en una cámara de vidrio (Pirex) con isofluorano. Para establecer el modelo de nocicepción en rata, se indujo la nocicepción mediante una inyección de 50  $\mu$ l de ácido úrico al 15% y 30% (dependiendo de la intensidad del dolor que se requería inducir) en la articulación fémoro-tibio-rotular de la extremidad posterior derecha de la rata (Figura 14).

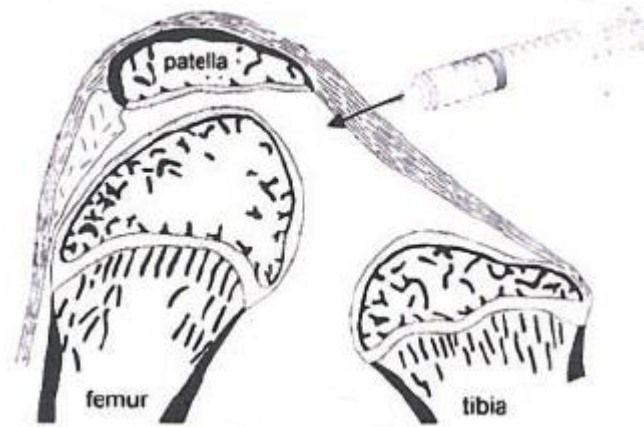


Figura 14. Aplicación de la inyección intra-articular. Modificado de Grossin y col., 2003.

Posteriormente se colocó un electrodo en las almohadillas plantares de cada extremidad trasera y una vez se recuperaron de la anestesia, las ratas fueron puestas a caminar en unos cilindros rotatorios de acero inoxidable a una velocidad de 4 rpm. Cada cilindro consta de 6 carriles con divisiones entre sí que están cubiertos con una malla de acero para proporcionar un mejor soporte a los animales, evitando que estos se caigan al momento de hacer la prueba (Lopez-Muñoz y col., 1993).

La variable medida en este modelo fue el tiempo de contacto de los electrodos ubicados en las almohadillas traseras de los animales con la superficie del cilindro. Cuando existía contacto entre estos dos elementos, el circuito se cerraba y se registraba el tiempo que permanecía en ese estado (Figura 15). El esquema de lectura

se estableció de manera que el cilindro girara por periodos de 2 minutos, obteniéndose los datos cada 30 minutos durante un total de 4 h.

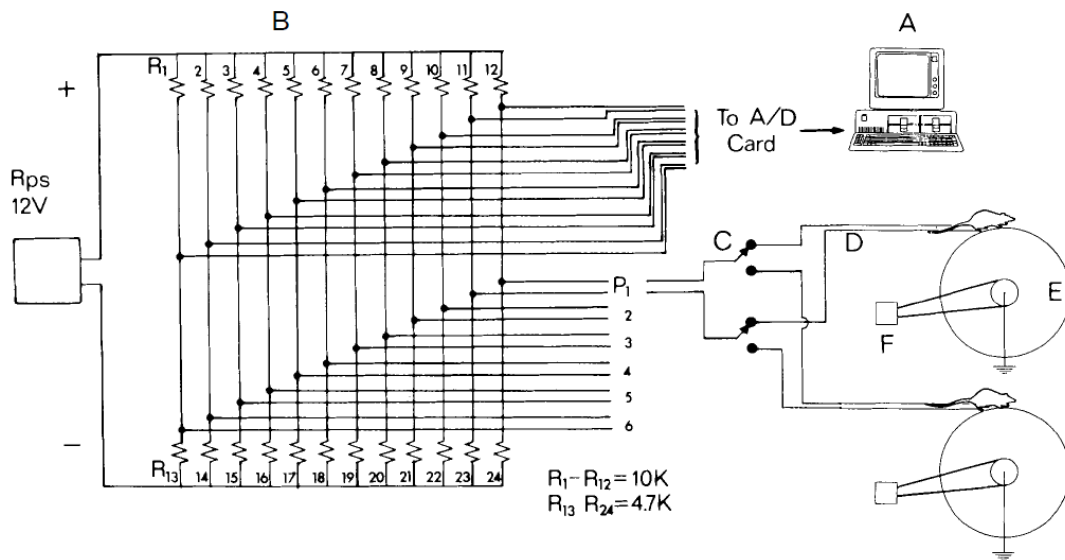


Figura 15. Representación esquemática del modelo PIFIR. A; dispositivo contador de tiempo (computador). B; caja de interruptores. C; interruptores. D; electrodos. E; cilindro rotatorio de acero inoxidable. F; Motor eléctrico. López-Muñoz y col., 1993.

Para la medición del efecto antinociceptivo, se administró el fármaco por vía oral una vez que se alcanzó una medición  $\leq$  al 10% de la funcionalidad de la extremidad posterior derecha, tomando ese momento como el tiempo cero del efecto.

Todos los experimentos fueron realizados a las 7:00 a.m. y mantenidos con una temperatura ambiental controlada. Al finalizar los experimentos, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>.

### 5.5.2 Obtención de cursos temporales y área bajo la curva

Los datos fueron expresados como porcentaje de índice de funcionalidad (%IF) que es la división de los valores obtenidos del tiempo de contacto de la extremidad posterior derecha entre los de la izquierda y el cociente de la operación fue multiplicado



por 100. Se calculó el área bajo la curva (ABC) de cada dosis empleada, graficando el %IF contra el tiempo. El valor del ABC representa el efecto antinociceptivo total durante el periodo de observación y se calculó usando el método de los trapecios (Rowland y Tozer, 1989). En este modelo, el valor máximo de ABC que se puede obtener es de 375 unidades de área (u.a.) (López-Muñoz y col., 1993).

### 5.5.3 Determinación del efecto antinociceptivo individual

Fueron estudiados los efectos antinociceptivos de las porfirinas simétricas y de ibuprofeno administrado por vía oral. Cada dosis de fármaco administrado correspondió a un grupo de 6 animales y dichas dosis fueron seleccionadas con la intencionalidad de tener intervalos logarítmicos de 0.25 (ibuprofeno: 5.6, 10, 17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg; TPP: 177.8, 316.2, 562.3 y 1000 mg/kg; TMe<sub>2</sub>NPP: 177.8, 316.2 y 562.3 mg/kg; TNO<sub>2</sub>PP: 177.8, 316.2, 562.3, 1000 y 1778.2 mg/kg).

Se obtuvieron los cursos temporales (CT) y a partir del ABC obtenida de estos, fueron elaboradas las curvas dosis respuesta (CDR) para cada compuesto.

## 5.6 Análisis estadístico

Para la evaluación estadística de los resultados del efecto antinociceptivo de cada tratamiento se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett. Para la comparación del %IF a dos tiempos de muestreo se utilizó la prueba *t* de Student para muestras pareadas, en el caso de la comparación entre eficacias de diferentes compuestos se usó la prueba *t* de Student para muestras independientes. Un valor de  $P \leq 0.05$  se consideró como criterio para establecer diferencias significativas.

## 6 Resultados

### 6.1 Obtención de porfirinas simétricas

Fueron obtenidas las siguientes tres porfirinas simétricas: 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP), 5,10,15,20-tetra(*p*-N,N-dimetilaminofenil)porfirina (TMe<sub>2</sub>NPP) y 5,10,15,20-tetra(*m*-nitrofenil)porfirina (TNO<sub>2</sub>PP). Las porfirinas con nitrógeno en el sustituyente presentaron cristales negros y la que contiene el sustituyente H presentó una coloración morada metálica. Las tres moléculas presentaron puntos de fusión mayores a los 300°C y rendimientos cercanos al reportado con esta técnica, como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos fisicoquímicos de las porfirinas con sustituyentes TPP, TMe<sub>2</sub>NPP, TNO<sub>2</sub>PP.

	R=	Peso Molecular	Descripción	Punto de fusión	Rendimiento
1	TPP	614.75 kg/mol	Cristales morados	> 300°C	14.32%
2	TMe <sub>2</sub> NPP	787.03 kg/mol	Cristales negros	> 300°C	18.38%
3	TNO <sub>2</sub> PP	794.74 kg/mol	Cristales negros	> 300°C	36.75%

### 6.2 Elucidación estructural de las porfirinas sintetizadas mediante RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y espectrofotometría UV-Visible.

#### 6.2.1 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)

##### 6.2.1.1 Resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (ppm) (Figura 16) muestra las siguientes señales:  $\delta$  = 8.84 (s, 8H) (a), 8.22-8.20 (d, 8H) (b), 7.74-7.72 (d, 8H) (c), 7.21 (s, 4H) (d), -2.76 (s, 2H) (e).

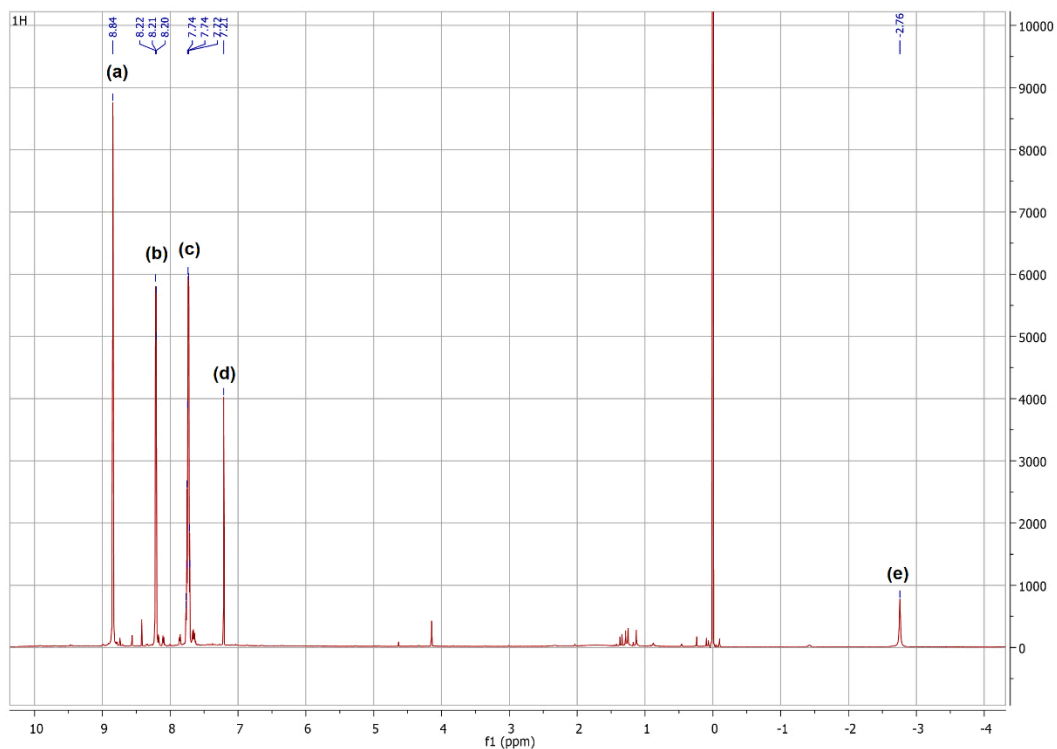


Figura 16. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TPP.

En la figura 17 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

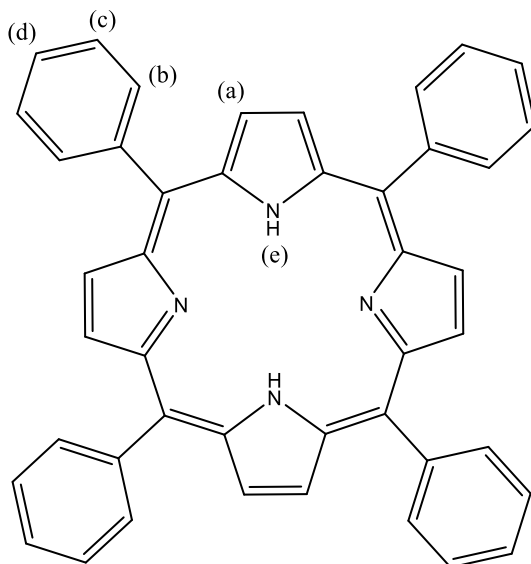


Figura 17. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TPP.

### 6.2.1.2 Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 18) muestra las siguientes señales:  $\delta = 142.18$  ppm (a), 134.56 ppm (b), 127.7 ppm (c), 126.68 ppm (d), 120.15 ppm (e).

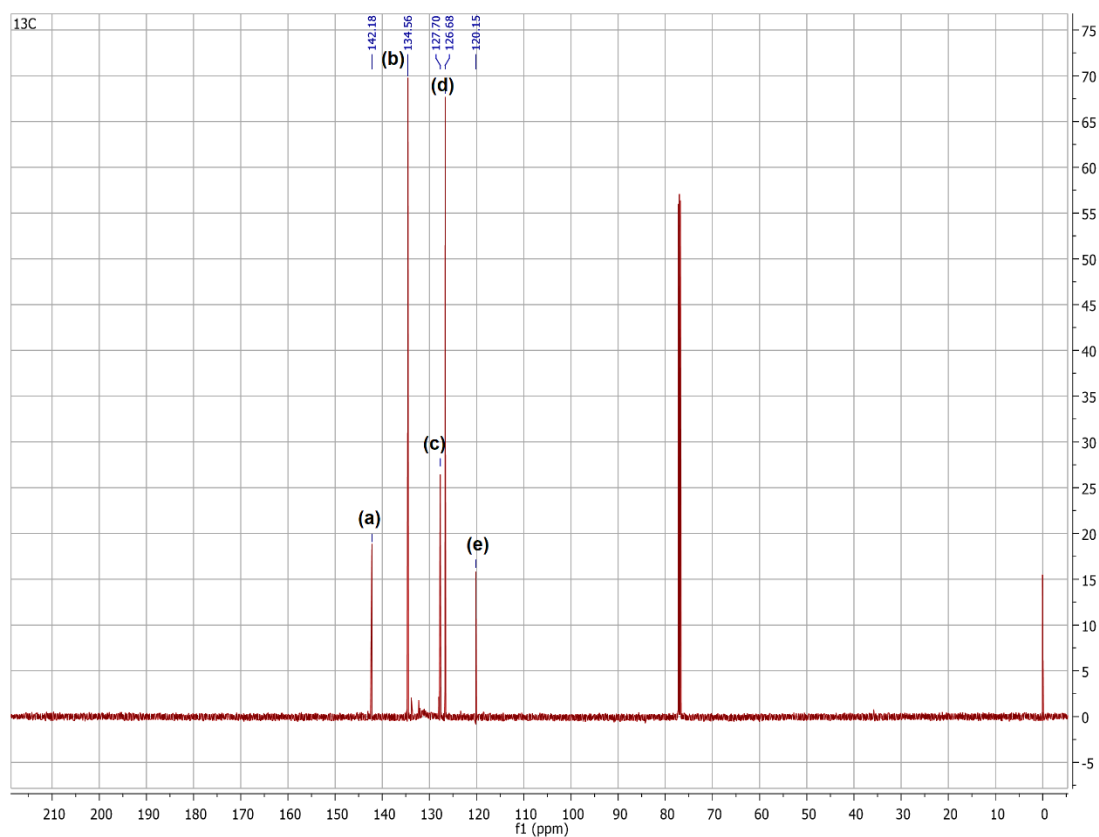


Figura 18. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la TPP.

En la figura 19 se marcan los carbonos descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

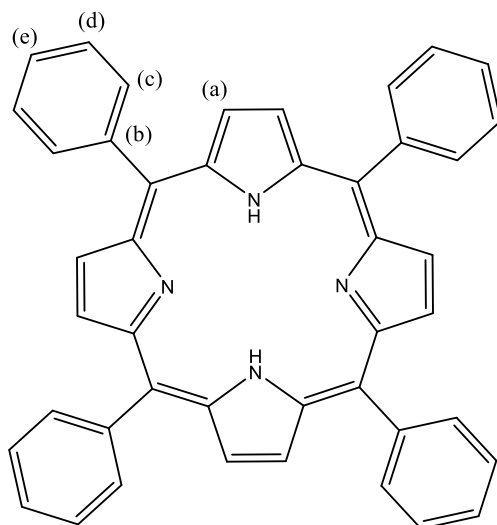


Figura 19. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TPP.

### 6.2.1.3 Espectroscopia UV-Vis

El espectro de UV-Vis (nm, absorbancia) (Figura 20) muestra las siguientes señales:  $\lambda$  414 (3.619), 514 (0.401), 549 (0.172), 590 (0.121), 647 (0.115) que son correspondientes a la banda de Soret y las cuatro bandas Q características de la molécula.

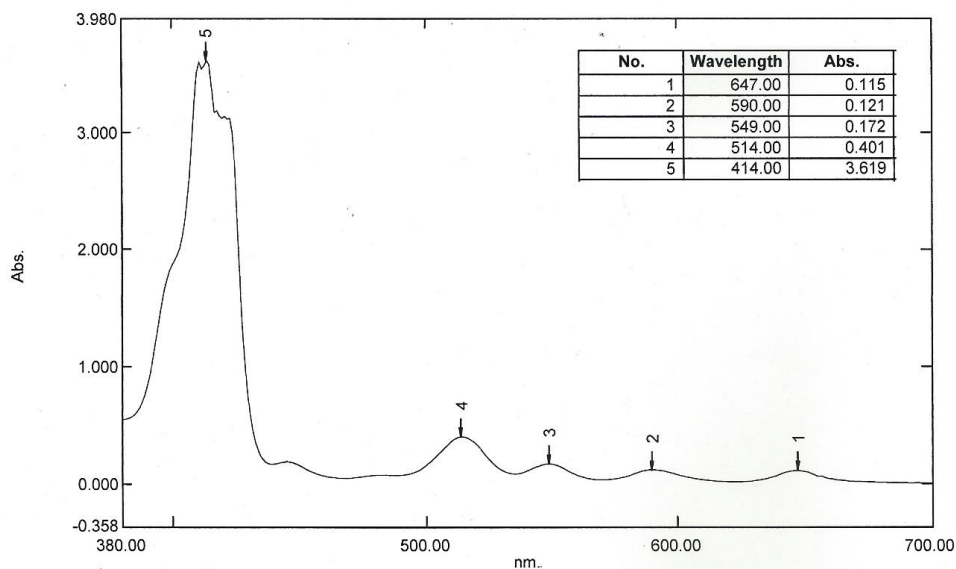


Figura 20. Espectro de absorción UV-Visible de la TPP en CHCl<sub>3</sub>.

## 6.2.2 5,10,15,20-tetra(*p*-N,N-dimetilaminofenil)porfirina (TMe<sub>2</sub>NPP)

### 6.2.2.1 Resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (ppm) (Figura 21) muestra las siguientes señales: δ = 8.83 (s, 8H) (a), 8.22-8.20 (d, 8H) (b), 7.77-7.73 (d, 8H) (c), 2.04 (s, 24H) (d), -2.83 (s, 2H) (e).

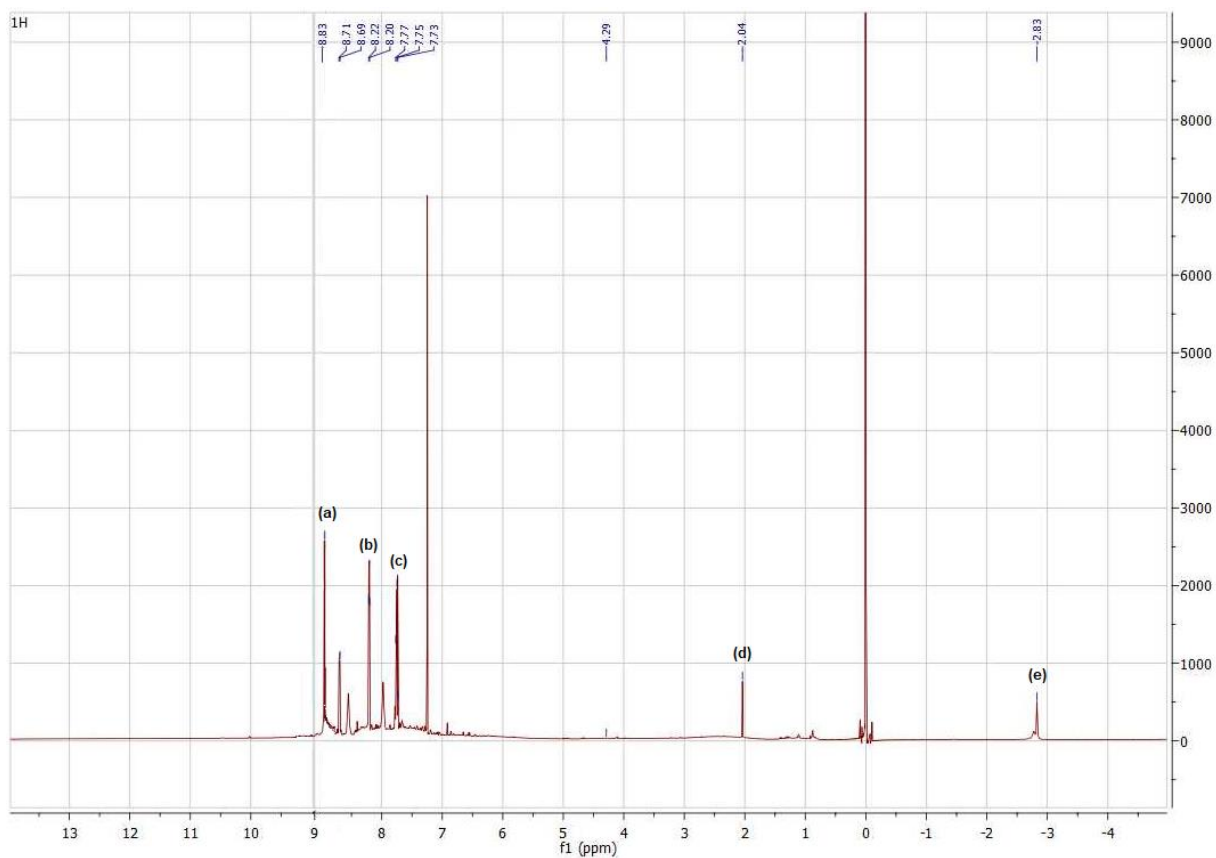


Figura 21. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TMe<sub>2</sub>NPP.

En la figura 22 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

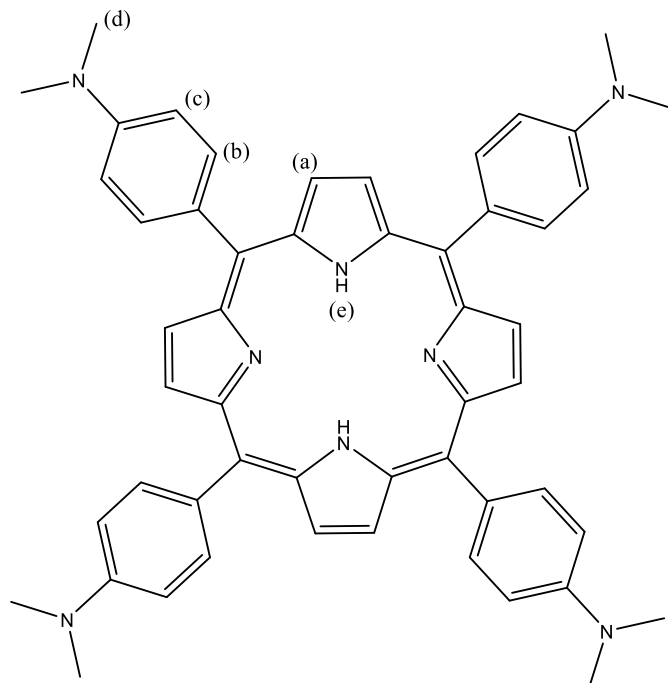


Figura 22. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TMe<sub>2</sub>NPP.

#### 6.2.2.2 Resonancia magnética nuclear <sup>13</sup>C

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 23) muestra las siguientes señales:  $\delta = 143.27$  ppm (a), 142.19 ppm (b), 139.13 ppm (c), 134.42 ppm (d), 126.65 ppm (e), 123.12 ppm (f), 120.06 ppm (g), 117.81 ppm (h), 31.54 ppm (i).

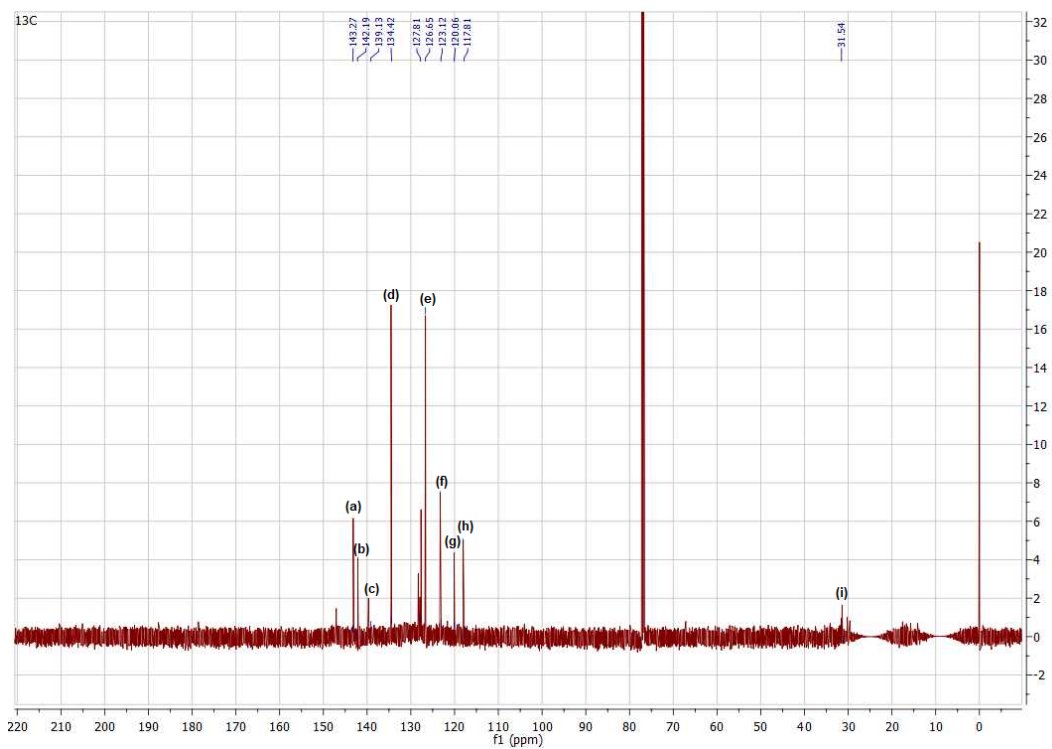


Figura 23. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la  $\text{TMe}_2\text{NPP}$ .

En la figura 24 se marcan los carbonos descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

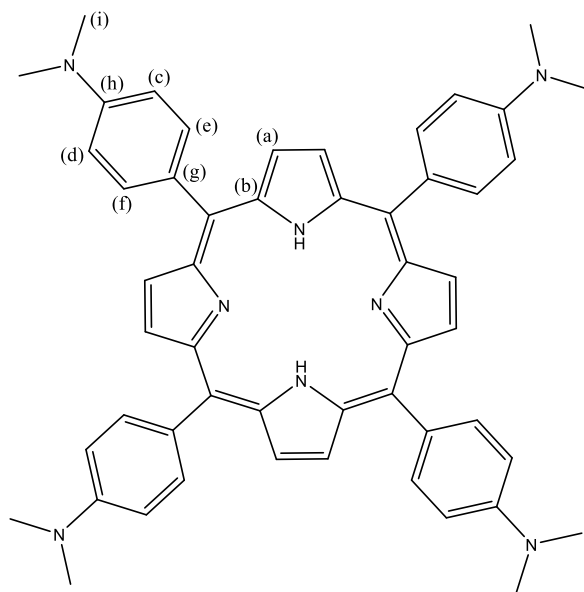


Figura 24. Asignación de las señales del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la  $\text{TMe}_2\text{NPP}$ .



### 6.2.2.3 Espectroscopia UV-Vis

El espectro de UV-Vis (nm, absorbancia) (Figura 25) muestra las siguientes señales:  $\lambda$  417 (1.587), 514 (0.054), 549 (0.020), 590 (0.012), 650 (0.017) que son correspondientes a la banda de Soret y las cuatro bandas Q características de la molécula.

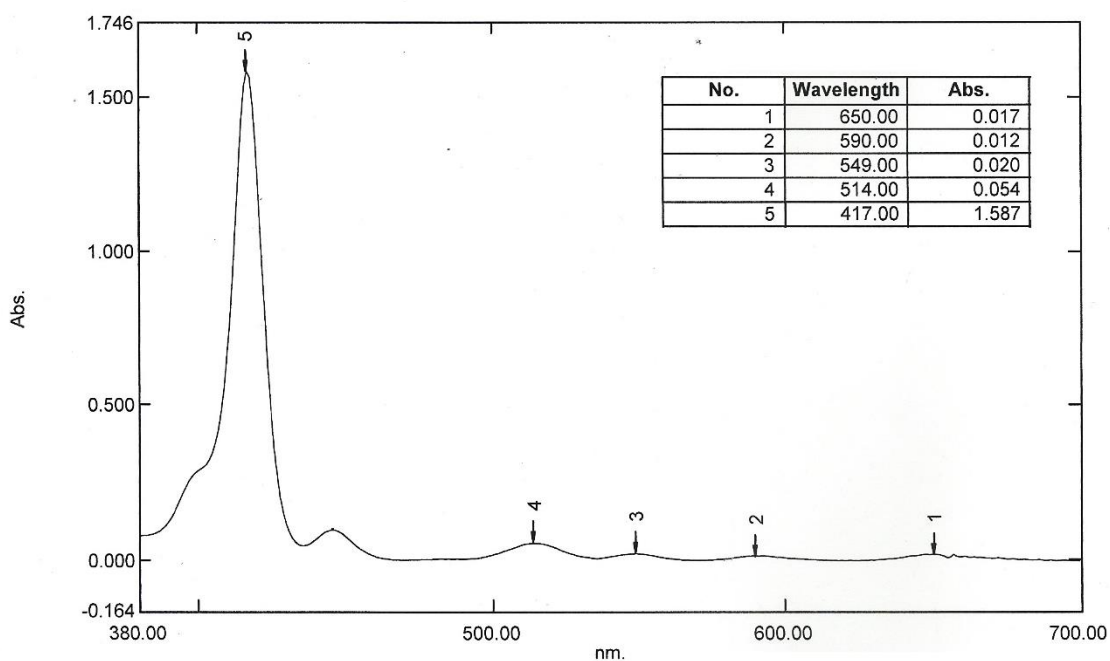


Figura 25. Espectro de absorción UV-Visible de la  $TMe_2NPP$  en  $CHCl_3$ .

### 6.2.3 5,10,15,20-tetra(*m*-nitrofenil)porfirina ( $TNO_2PP$ )

#### 6.2.3.1 Resonancia magnética nuclear $^1H$

El espectro de RMN- $^1H$  (ppm) (Figura 26) muestra las siguientes señales:  $\delta = 8.55$  (s, 8H) (a), 8.21-8.20 (d, 8H) (b), 7.75-7.74 (d, 8H) (c), -2.83 (s, 2H) (d).

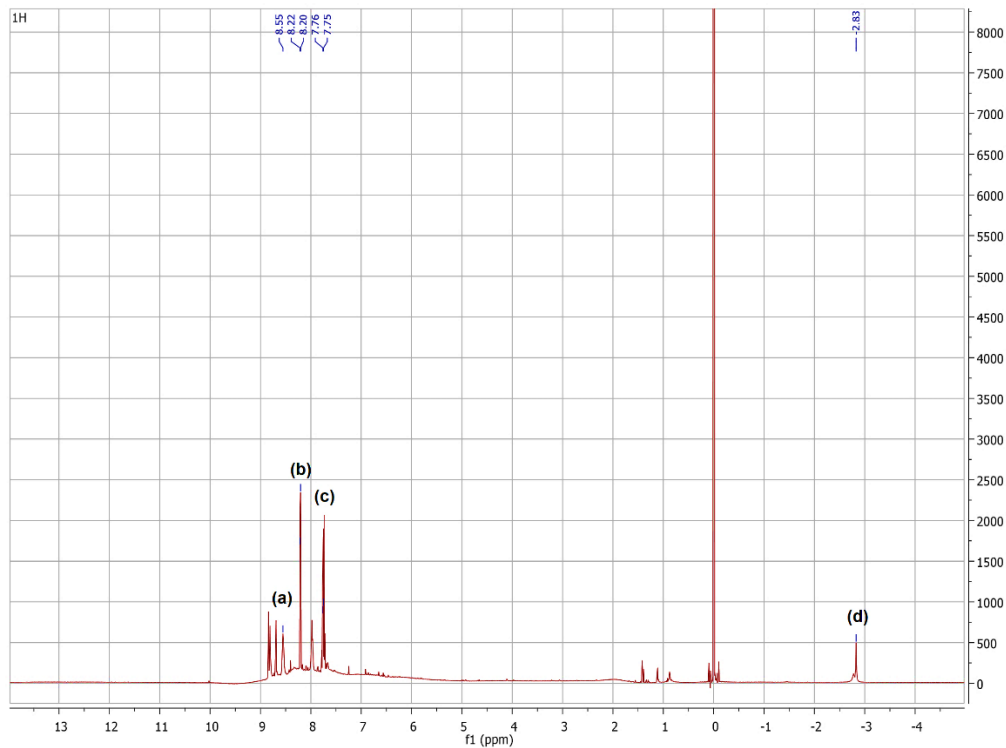


Figura 26. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TNO<sub>2</sub>PP.

En la figura 27 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

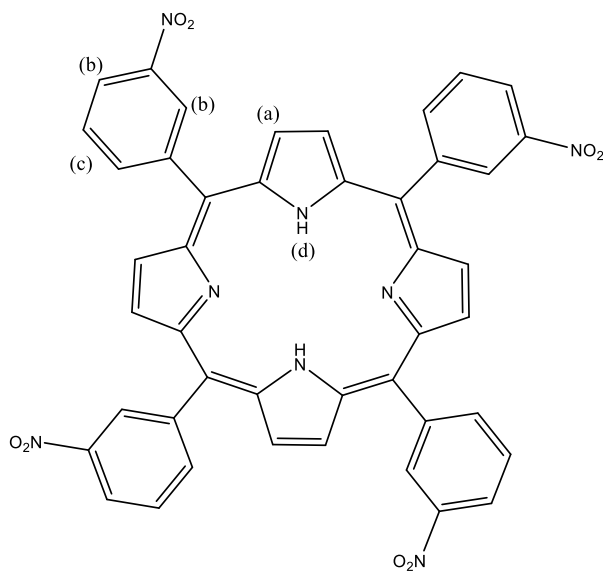


Figura 27. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la TNO<sub>2</sub>PP.

### 6.2.3.2 Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 28) muestra las siguientes señales:  $\delta = 143.17$  ppm (a), 142.13 ppm (b), 134.52 ppm (c), 127.68 ppm (d), 126.65 ppm (e), 123.28 ppm (f), 120.11 ppm (g), 118.03 ppm (h).

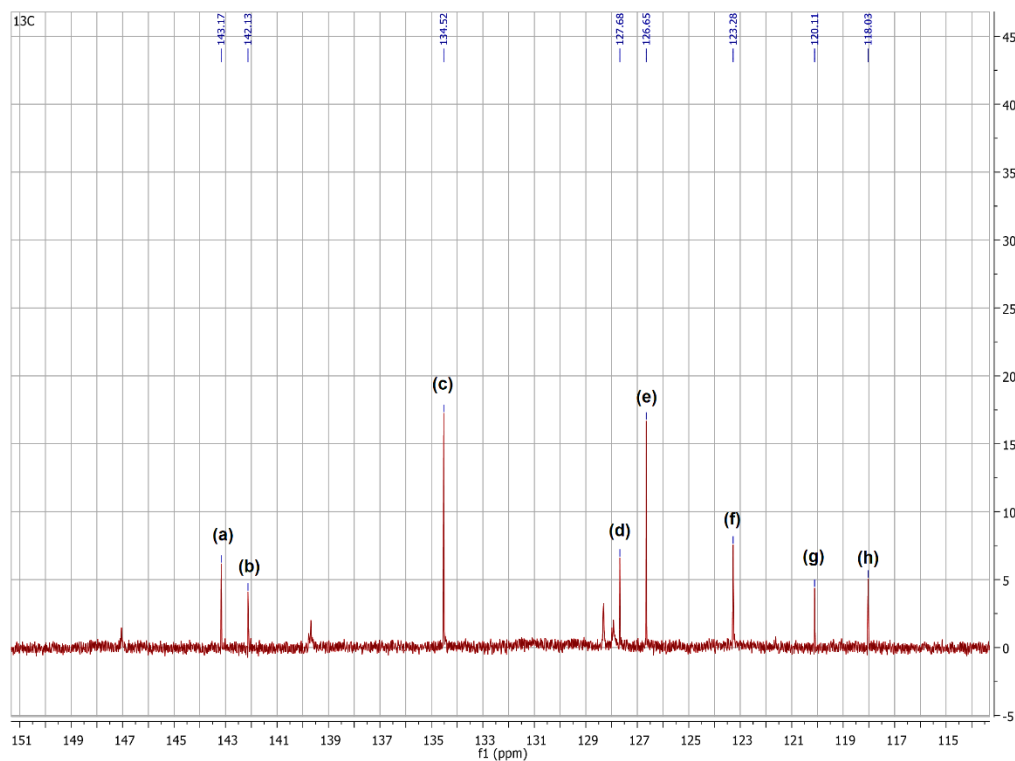


Figura 28. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la TNO $_2$ PP.

En la figura 29 se marcan los carbonos descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

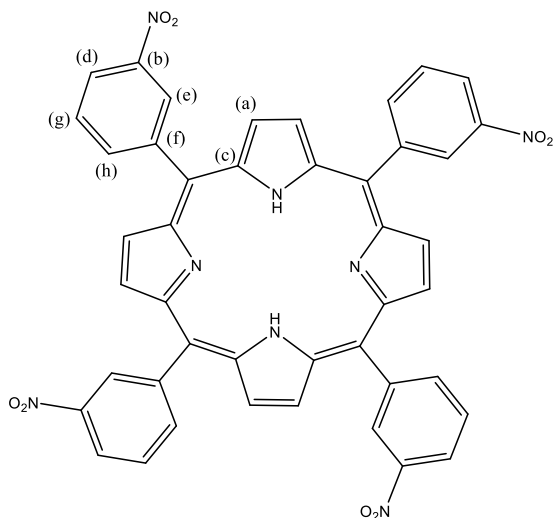


Figura 29. Asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la TNO<sub>2</sub>PP.

### 6.2.3.3 Espectroscopia UV-Vis

El espectro de UV-Vis (nm, absorbancia) (Figura 30) muestra las siguientes señales:  $\lambda$  421 (0.593), 514 (0.039), 547 (0.017), 589 (0.016), 651 (0.009) que son correspondientes a la banda de Soret y las cuatro bandas Q características de la molécula.

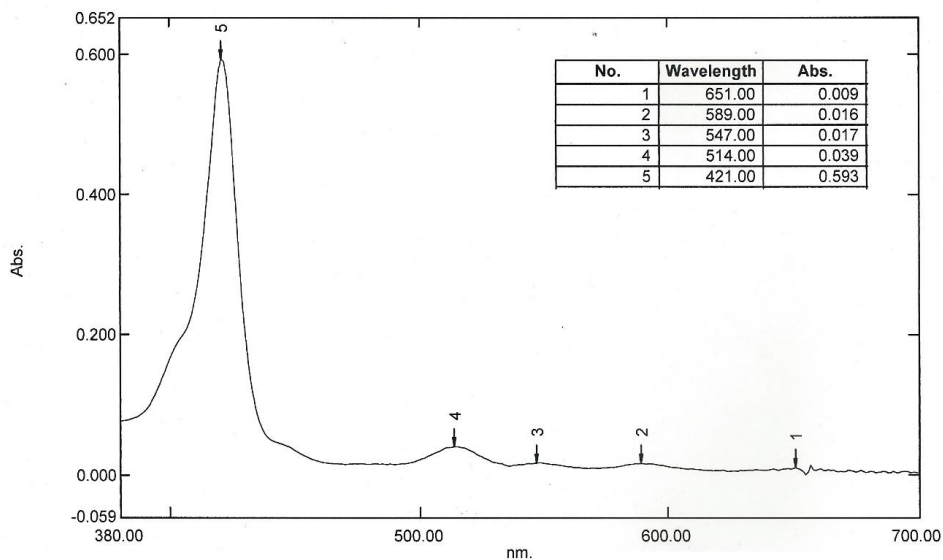


Figura 30. Espectro de absorción UV-Visible de la TNO<sub>2</sub>PP en CHCl<sub>3</sub>.

### 6.3 Optimización de la reacción de síntesis

Fueron realizados cambios en la proporción de medio utilizado para la reacción con la finalidad de mejorar el rendimiento obtenido. Como se puede observar en la Tabla 2, el rendimiento de la TPP mejoró al disminuir el volumen de ácido propiónico usado como medio, al contrario, la TMe<sub>2</sub>NPP, tuvo mejor rendimiento al utilizar 100 ml (1.34 mol) del medio, sin embargo, con esa cantidad de volumen se observó que el compuesto tardaba tres días en precipitar. En la Tabla 3 se puede observar que mejora el rendimiento de la TNO<sub>2</sub>PP al aumentar el volumen de medio.

*Tabla 2. Optimización de la técnica de síntesis para la TPP y TMe<sub>2</sub>NPP.*

	TPP	TMe <sub>2</sub> NPP
100 ml ácido propiónico	5.64% (124 mg)	18.38% (522 mg)
70 ml ácido propiónico	14.32% (317 mg)	2.11% (60 mg)
30 ml ácido propiónico	14.26% (315 mg)	10.59% (298 mg)

*Tabla 3. Optimización de la técnica de síntesis para la TNO<sub>2</sub>PP.*

TNO <sub>2</sub> PP	
100 ml ácido propiónico	19.39% (510 mg)
120 ml ácido propiónico	36.75% (966 mg)

#### 6.4 Efecto antinociceptivo de las porfirinas en el modelo PIFIR AU 30%

En el modelo experimental PIFIR generalmente es empleado ácido úrico al 30% intra-articular en las ratas para generar nocicepción. Bajo estas condiciones experimentales, fueron evaluadas las 3 porfirinas en estudio y se evidenciaron pobres o nulos efectos antinociceptivos. El compuesto TMe<sub>2</sub>NPP fue evaluado en dosis de 50 a 200 mg/kg, pero solo presentó ligeros efectos antinociceptivos sobre todo en la dosis de 200 mg/kg (Figura 31).

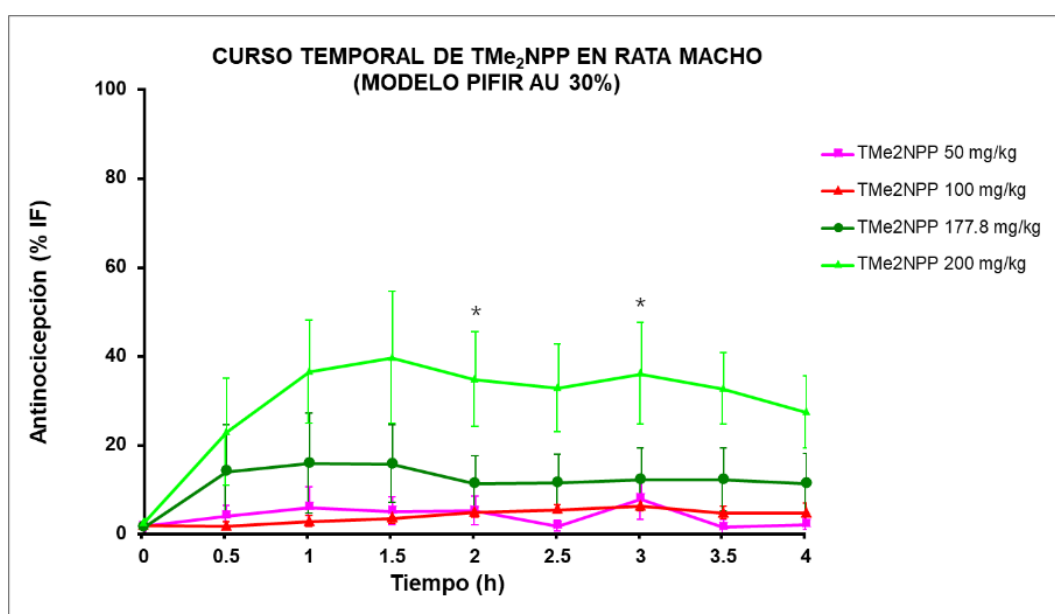


Figura 31. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TMe<sub>2</sub>NPP administrado por vía oral a dosis de 50, 100, 177.8 y 200 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 30%. Los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Prueba t de Student \* $P < 0.05$  vs TMe<sub>2</sub>NPP 177.8 mg/kg.

Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales ni el compuesto TNO<sub>2</sub>PP a dosis de 100 a 316.2 mg/kg (Figura 32), ni el compuesto TPP a dosis de 100 a 1000 mg/kg (Figura 33), evidenciaron efectos antinociceptivos.

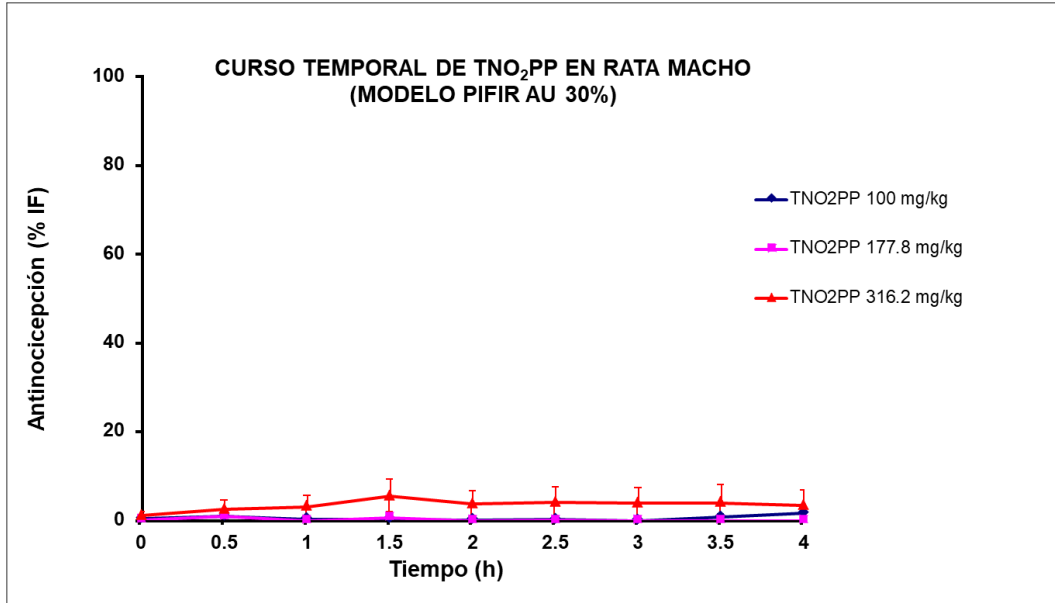


Figura 32. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TNO<sub>2</sub>PP administrado por vía oral a dosis de 100, 177.8 y 316.2 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 30%. Los datos se muestran como la media ± error estándar.

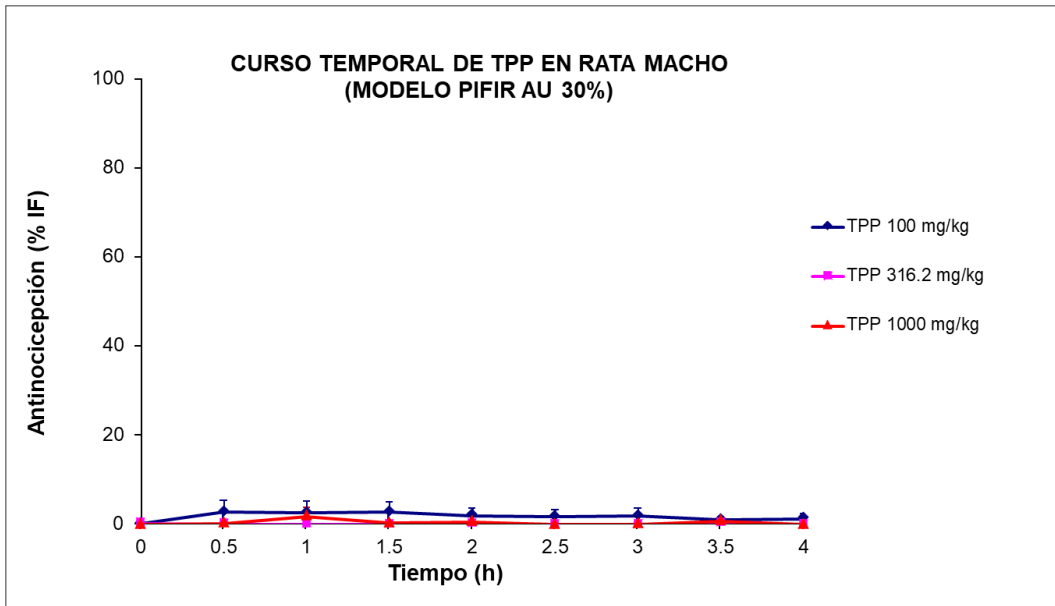


Figura 33. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TPP administrado por vía oral a dosis de 100, 316.2 y 1000 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 30%. Los datos se muestran como la media ± error estándar.

Dados los resultados obtenidos al emplear AU al 30%, se tomó la decisión de bajar al nivel inferior de nocicepción aplicando ahora AU al 15%. Para corroborar que esa acción fuera viable, se realizó una curva con animales que sólo fueron administrados con AU al 15%. Teniendo como resultado un %IF <10% en el lapso de las 3 a las 7 horas posteriores a la administración (Figura 34).

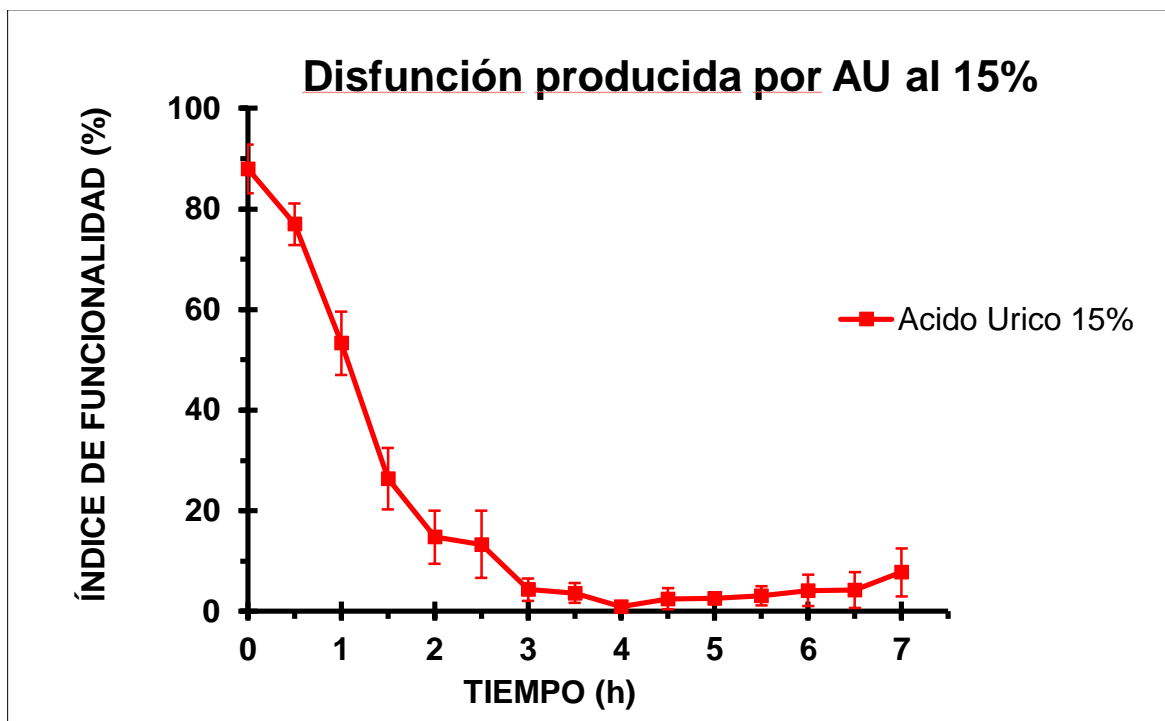


Figura 34. Curso temporal de la disfunción inducida con ácido úrico al 15% en el modelo PIFIR. Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar.

### 6.5 Efecto antinociceptivo de TPP en el modelo PIFIR AU 15%

En la figura 35 se muestran los cursos temporales del efecto antinociceptivo de TPP (p.o.) a dosis de 177.8, 316.2, 562.3 y 1000 mg/kg evaluadas en el modelo PIFIR usando ácido úrico al 15%.



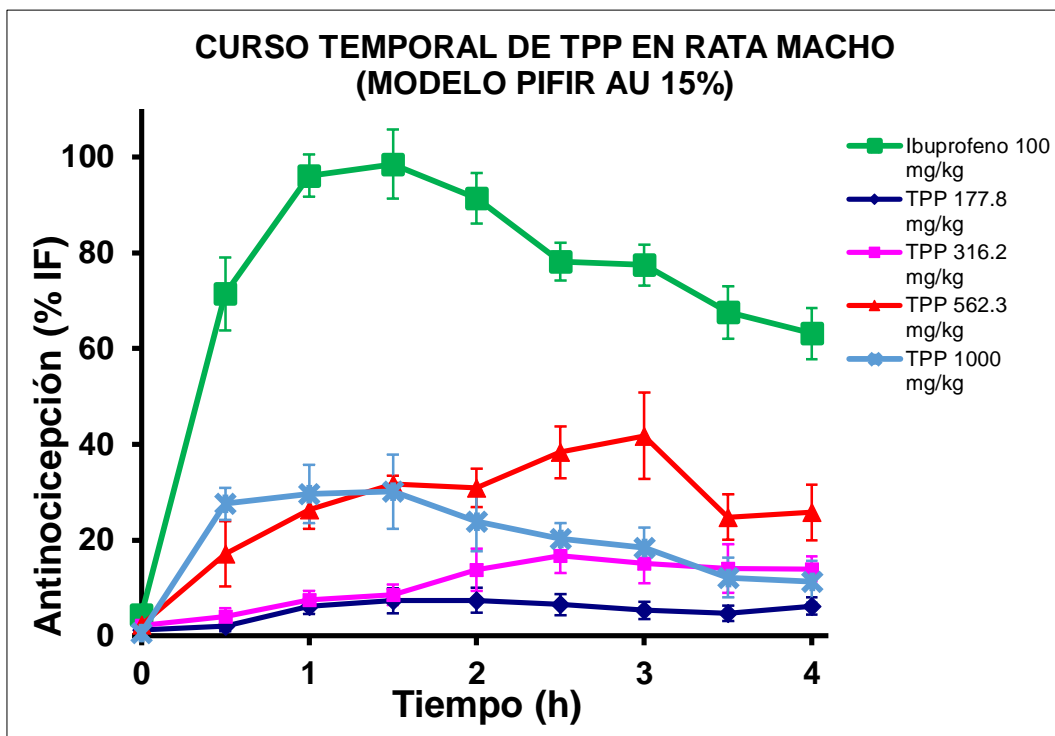


Figura 35. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TPP administrado por vía oral a dosis de 177.8, 316.2, 562.3 y 1000 mg/kg, usando como fármaco de referencia ibuprofeno 100 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 15%. Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar.

La dosis de 177.8, 316.2 y 1000 mg/kg no presentaron efectos antinociceptivos importantes ( $21.62 \pm 6.77$ ,  $43.93 \pm 10.74$  y  $84.08 \pm 12.35$  u.a., respectivamente). La dosis de 562.3 mg/kg presentó efectos de  $112.6 \pm 15$  u.a. siendo ésta la de mayor efecto global. Con relación a esta dosis se puede observar una tendencia a conservar el efecto en función del tiempo, es decir, el %IF no tuvo una disminución estadísticamente significativa (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación del efecto máximo con el efecto a la 4h de TPP.

Dosis de TPP (mg/kg)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$E_{4h}$ (%)
562.3	$38.34 \pm 5.40$	2.5	$25.79 \pm 5.81$

La figura 38 corresponde a la CDR que recopila las ABC calculadas a partir de los cursos temporales de TPP. Se observa claramente que TPP produce un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis.

## 6.6 Efecto antinociceptivo de TMe<sub>2</sub>NPP en el modelo PIFIR AU 15%

En la figura 36 se muestran los cursos temporales del efecto antinociceptivo de TMe<sub>2</sub>NPP (p.o.) a dosis de 177.8, 316.2 y 562.3 mg/kg evaluadas en el modelo PIFIR usando ácido úrico al 15%.

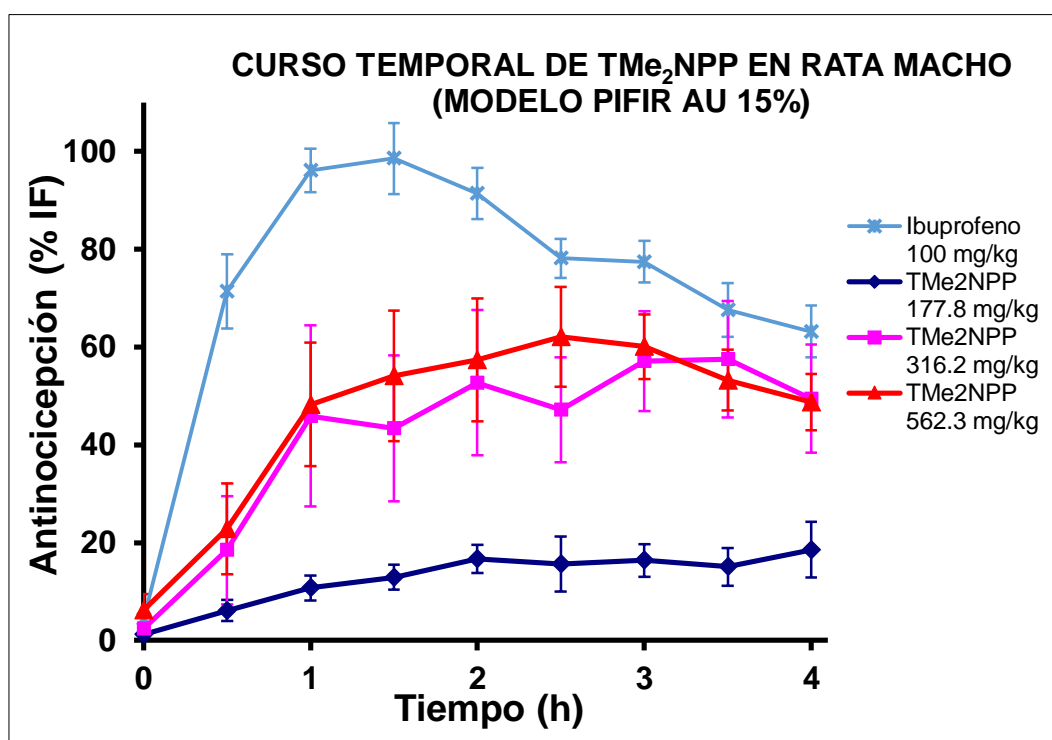


Figura 36. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TMe<sub>2</sub>NPP administrado por vía oral a dosis de 177.8, 316.2 y 562.3 mg/kg, usando como fármaco de referencia Ibuprofeno 100 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 15%. Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar.

La dosis de 177.8 mg/kg no presentó efectos antinociceptivos importantes ( $51.67 \pm 10.13$  u.a.). Con el resto de las dosis los efectos fueron de  $174.1 \pm 46.48$  u.a. para la dosis de 316.2 mg/kg y de  $192.7 \pm 21.69$  u.a. para 562.3 mg/kg, siendo ésta última la

de mayor efecto global. Con relación a estas dos dosis se puede observar una tendencia a conservar el efecto en función del tiempo, es decir, el %IF no tuvo una disminución estadísticamente significativa (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación del efecto máximo con el efecto a la 4h de TMe<sub>2</sub>PP.

Dosis de TMe <sub>2</sub> PP (mg/kg)	E <sub>máx</sub> (%)	T <sub>máx</sub> (h)	E <sub>4h</sub> (%)
316.2	45.88 ± 18.52	1	49.43 ± 11.06
562.3	48.27 ± 12.65	1	48.75 ± 5.74

La figura 38 ilustra la CDR elaborada a partir de los cursos temporales de TMe<sub>2</sub>NPP. Se observa igual que con TPP que se produce un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis.

## 6.7 Efecto antinociceptivo de TNO<sub>2</sub>PP en el modelo PIFIR AU 15%

En la figura 37 se muestran los cursos temporales del efecto antinociceptivo de TNO<sub>2</sub>PP (p.o.) a dosis de 177.8, 316.2, 562.3, 1000 y 1778.2 mg/kg evaluadas en el modelo PIFIR usando ácido úrico al 15%.

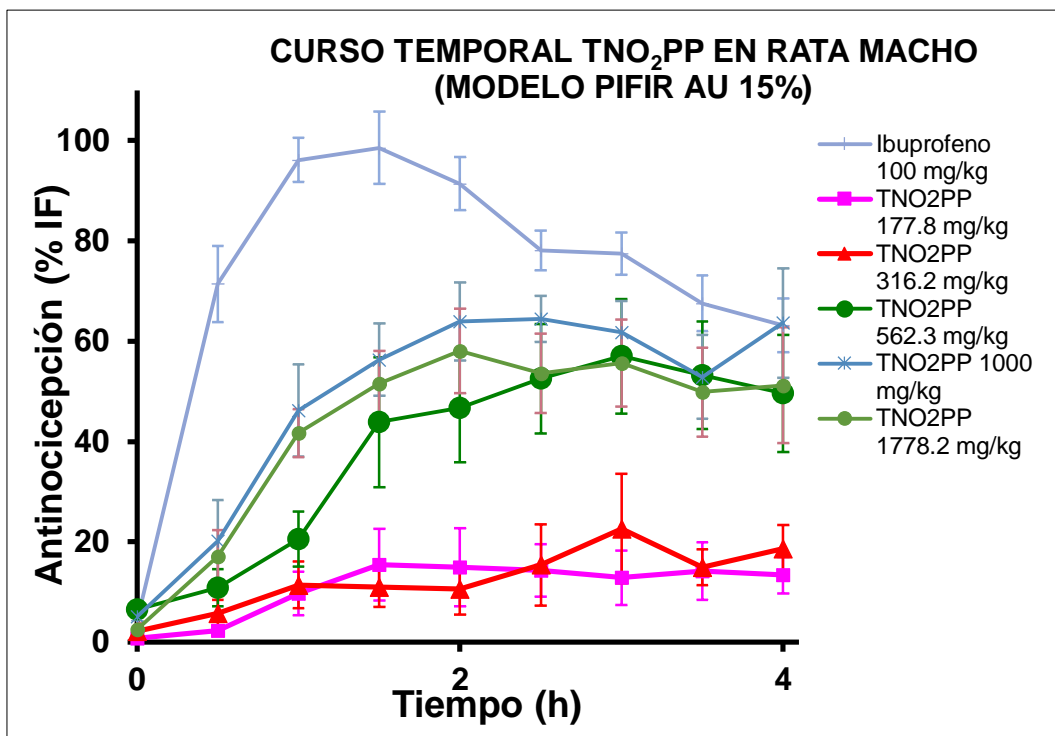


Figura 37. Curso temporal del efecto antinociceptivo de TNO<sub>2</sub>PP administrado por vía oral a dosis de 177.8, 316.2, 562.3, 1000 y 1778.2 mg/kg, usando como fármaco de referencia Ibuprofeno 100 mg/kg en el modelo de PIFIR con ácido úrico al 15%. Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar.

Las dosis de 177.8 y 316.2 mg/kg no presentaron efectos antinociceptivos importantes ( $45.36 \pm 18.52$  y  $51 \pm 18.89$  u.a. respectivamente). Con el resto de las dosis los efectos fueron de  $156.6 \pm 32.87$  u.a. para la dosis de 562.3 mg/kg, de  $199.7 \pm 20.14$  u.a. para 1000 mg/kg y de  $177.2 \pm 25.42$  u.a. para 1778.2 siendo la dosis de 1000 mg/kg la de mayor efecto global. Con relación a estas dos dosis se puede observar una tendencia a conservar el efecto en función del tiempo, es decir, el %IF no tuvo una disminución estadísticamente significativa (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación del efecto máximo con el efecto a la 4h de TNO<sub>2</sub>PP.

Dosis de TNO <sub>2</sub> PP (mg/kg)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$E_{4h}$ (%)
562.3	43.86 ± 12.92	1.5	49.60 ± 11.67
1000	56.32 ± 7.19	1.5	63.62 ± 10.86
1778.2	51.56 ± 6.44	1.5	51.20 ± 11.57

La figura 38 ilustra la CDR elaborada a partir de los cursos temporales de TNO<sub>2</sub>PP en donde se puede observar que produce un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis.

#### 6.8 Comparación de los efectos antinociceptivos de las porfirinas e ibuprofeno

La Figura 38 muestra las CDR de los compuestos sintetizados e ibuprofeno, se aprecia que existe una diferencia significativa entre la eficacia que presenta ibuprofeno (a 100 mg/kg presenta un efecto global de 307.2 ± 10.06 u.a.) contra las que presentan las porfirinas (TPP a 562.3 mg/kg presenta un efecto global de 112.6 ± 15 u.a.; TMe<sub>2</sub>NPP a 562.3 mg/kg presenta un efecto global de 192.7 ± 21.69 u.a.; TNO<sub>2</sub>PP a 1000 mg/kg presenta un efecto global de 199.7 ± 20.14 u.a.). En el caso de la porfirina TMe<sub>2</sub>NPP y TNO<sub>2</sub>PP, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre sus eficacias.

Calculando la DE<sub>25</sub> (dosis necesaria para producir el 25% del efecto máximo alcanzado por el modelo empleado), se observa que ibuprofeno muestra menor DE<sub>25</sub> (8.94 mg/kg) seguido de TMe<sub>2</sub>NPP (217.66 mg/kg), TNO<sub>2</sub>PP (358.6 mg/kg) y TPP (488.47 mg/kg), por lo que de las tres porfirinas sintetizadas se considera que la TMe<sub>2</sub>NPP presenta mayor potencia a este nivel de efecto, para producir estos efectos antinociceptivos.

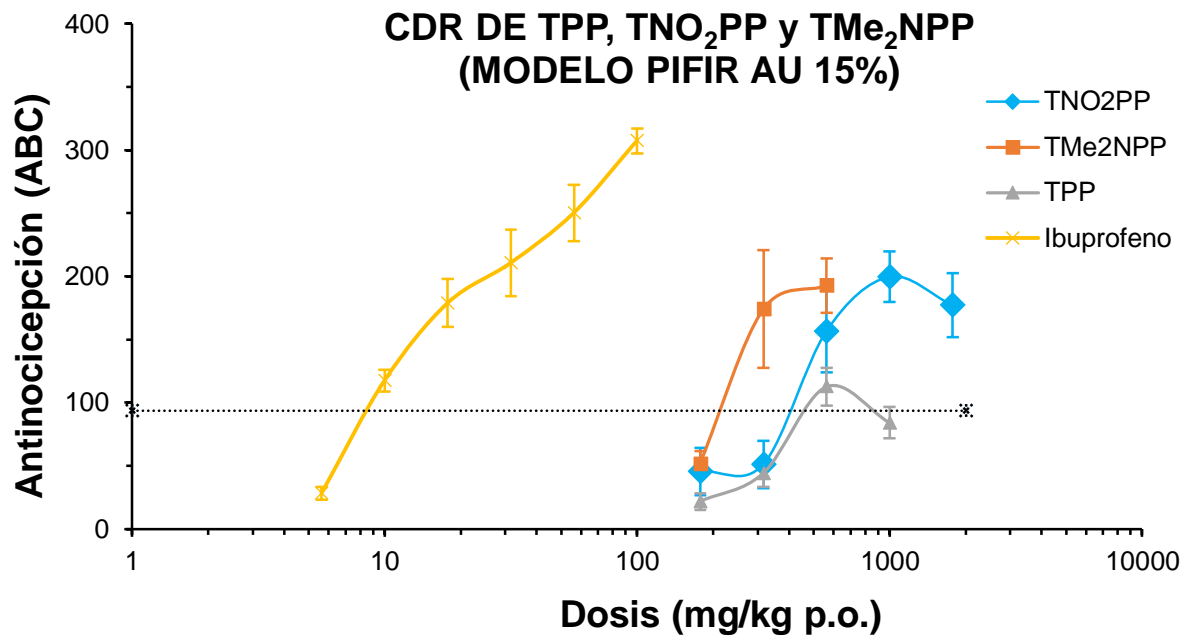


Figura 38. Comparación de la curva dosis respuesta de TPP, TNO<sub>2</sub>PP, TMe<sub>2</sub>NPP e ibuprofeno. La línea punteada ubica la DE<sub>25</sub> que se puede obtener del modelo experimental.

## 7 Discusión

### 7.1 Elucidación estructural

Para la TPP el espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra una señal  $\delta$  de 8.84 ppm correspondiente a los 8 hidrógenos  $\beta$  del pirrol que constituyen la porfirina, las señales  $\delta$  de 8.20-8.22, 7.74-7.72 y 7.21 ppm corresponden a los hidrógenos del anillo de benceno en la posición meso de la porfirina, la señal  $\delta$  de -2.76 ppm muestra un singulete que corresponde a los dos hidrógenos enlazados a los nitrógenos de la parte central de la porfirina. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C muestra una señal con  $\delta$  de 142.18 ppm correspondiente a los carbonos  $\beta$  del anillo de pirrol, las señales  $\delta$  de 134.56 ppm, 127.7 ppm, 126.68 ppm, 120.15 ppm corresponden a los carbonos que conforman el anillo de benceno.

Para la TMe<sub>2</sub>NPP el espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra una señal con  $\delta$  -2.83 ppm un singulete que integra para los dos protones unidos al N del núcleo porfirínico, a 2.04 ppm se tiene un singulete que integra para 24 hidrógenos correspondientes a los metilos de la amina, en 8.83 ppm se observa un singulete correspondiente a los 8 hidrógenos  $\beta$  de los pirroles, el doblete de la señal  $\delta$  de 8.22-8.20 ppm corresponde a los 8 hidrógenos *orto* del N,N-dimetilaminofenilo, a un desplazamiento químico de 7.77-7.73 ppm se observa un doblete que integra para 8 hidrógenos *meta* del N,N-dimetilaminofenilo. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C muestra una señal con  $\delta$  de 143.27 ppm y 142.19 correspondiente los carbonos  $\beta$  y  $\alpha$  del pirrol respectivamente, las señales  $\delta$  de 139.13 ppm, 134.42 ppm, 126.65 ppm, 123.12 ppm y 120.06 ppm corresponden al anillo aromático, la señal  $\delta$  de 117.81 ppm corresponde al carbono enlazado al grupo amino, la señal  $\delta$  de 31.54 ppm corresponde a los carbonos de los metilos unidos al grupo amino.

Para la TNO<sub>2</sub>PP el espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra una señal  $\delta$  de 8.55 ppm corresponde a los 8 hidrógenos  $\beta$  del pirrol, los dobletes de la señal  $\delta$  de 8.21-8.20 ppm corresponden a los 8 hidrógenos *orto* con respecto al grupo nitro, el doblete observado a un desplazamiento químico de 7.75-7.74 ppm corresponde a los 8 hidrógenos adyacentes a la unión con la porfirina, la señal  $\delta$  de -2.83 ppm corresponde al singulete

de los dos hidrógenos enlazados a los nitrógenos centrales de la porfirina. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C muestra una señal con  $\delta$  de 143.17 ppm correspondiente los carbonos  $\beta$  del pirrol, la señal  $\delta$  de 142.13 ppm corresponde a los carbonos enlazados al grupo nitro, la señal  $\delta$  de 134.52 ppm corresponde al carbono  $\alpha$  del pirrol, las señales  $\delta$  de 127.68 ppm, 126.65 ppm, 123.28 ppm, 120.11 ppm, 118.03 ppm corresponden al anillo aromático.

Podemos decir que todas las porfirinas presentaron en el espectro de protón, una señal entre -2 y -3 ppm que es característica de los protones de los grupos NH dentro del anillo porfirínico que se encuentran altamente apantallados, debido al sistema de electrones  $\pi$  deslocalizados en el macrociclo de la porfirina. También todas presentaron señales a campos bajos de los protones  $\beta$  pertenecientes a los pirroles debido a la desprotección que sufren por la corriente en el anillo porfirínico (Mamardashvili & Golubchikov, 2001).

Los espectros de absorción de UV-Visible de los tres compuestos muestran la presencia de cinco bandas características de una porfirina en su forma de base libre (Banda de Soret y bandas IV, III, II, I, también conocidas como bandas Q). La Banda de Soret es un pico con una intensidad de absorción cercana a los 400 nm que surge de una fuerte transición electrónica que va desde el estado fundamental al segundo estado excitado ( $S_0 \rightarrow S_2$ ). Posterior a este patrón se observan las bandas Q provocadas por una débil transición al primer estado excitado ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), estas se encuentran en un intervalo entre 450-700nm y dependiendo de la intensidad que presenta cada una de estas bandas se pueden clasificar en 4 tipos diferentes, en este caso, tomando en cuenta lo descrito por Wijesekera & Dolphin se puede decir que los tres espectros son de tipo etio ( $IV > III > II > I$ ).



## 7.2 Modelo experimental

Para la investigación de la actividad farmacológica de los analgésicos, se han y se siguen utilizando métodos *in vivo* en animales. Generalmente en los modelos experimentales son empleados los roedores como la rata y el ratón, aunque también se pueden utilizar otros animales como los conejos o monos.

Existen muchos modelos destinados a evaluar la actividad antinociceptiva, estos pueden variar según la naturaleza e intensidad del estímulo, el tipo de cambio de conducta, entre otros. Para roedores, se usa con frecuencia el método de pinzamiento de la cola, de calor radiado, de inmersión de la cola, de plancha caliente, de estimulación eléctrica, de estiramiento abdominal y de formalina.

El modelo de disfunción inducida por dolor en ratas (PIFIR por sus siglas en inglés) es un modelo de dolor inflamatorio, muy similar a la condición clínica conocida como “artritis tipo gota”. La nocicepción se produce al aplicar ácido úrico por vía intra-articular en la unión fémoro-tibio-rotular de una de las extremidades posteriores del animal. Este modelo es sensible a la acción antinociceptiva tanto de fármacos opioides como de no opioides. Cuenta con las ventajas de permitir la evaluación de cursos temporales en el mismo animal, no genera aprendizaje o condicionamiento, la administración del fármaco es después del proceso doloroso, posee una alta sensibilidad y los individuos después de un tiempo restituyen sus capacidades normales. El modelo PIFIR es un buen ejemplo de dolor inflamatorio, que no causa molestias graves en los animales, como movimientos excesivos de las extremidades, lamidas o vocalizaciones. Se ha demostrado, en este modelo, que ni el vehículo ni la manipulación en el momento de la administración intra-articular *per se* producen la disfunción. Es decir, en este modelo, solo se observa el efecto de los fármacos, sin la participación de algún otro factor. Esta fue una razón importante para elegir este modelo para la investigación.

Con el modelo se puede observar que la disfunción del animal disminuye gradualmente y se totaliza al cabo de 2 y 3 horas posteriores a la administración, manteniéndose la disfunción por al menos las 5 h siguientes. Estudios anteriores han demostrado que la concentración de ácido úrico (30%) puede producir nocicepción y disfunción total dos

horas y media después de la administración de ácido úrico durante el período de tiempo anteriormente mencionado y solo puede recuperarse espontáneamente después de 7.5 horas. Este periodo de pérdida de funcionalidad de la extremidad administrada con ácido úrico resulta la más adecuada para evaluar compuestos de tipo AINE y su combinación con otros fármacos.

En contexto, el modelo experimental PIFIR puede determinar la eficacia y la duración del efecto antinociceptivo, así como, permitir evaluar los efectos cinéticos de los fármacos que ejercen efecto sobre el dolor inducido por inflamación. También se puede determinar el curso temporal del efecto antinociceptivo en el mismo animal y un punto positivo para los animales de investigación y los experimentadores, es que en este modelo no se requiere de un periodo prolongado de entrenamiento. La respuesta evaluada es confiable, los datos pueden reproducirse y cuantificarse mediante programas computacionales y la respuesta tipo sedante puede distinguirse de la respuesta antinociceptiva.

Como se menciona anteriormente, en el modelo experimental PIFIR generalmente es empleado ácido úrico al 30%. Bajo estas condiciones experimentales, fueron evaluadas las 3 porfirinas en estudio y se evidenciaron pobres o nulos efectos antinociceptivos.

Otra de las múltiples ventajas que posee este modelo es que es posible modificar las concentraciones de ácido úrico (AU) a administrar por vía intra-articular, para generar la nocicepción en el animal de laboratorio, y con esto establecer diferentes niveles de nocicepción ya bien caracterizados, y en los cuales se pueden analizar los posibles efectos antinociceptivos de los compuestos en estudio. Estas concentraciones de AU intra-articular van desde AU al 10% que genera la nocicepción menos intensa, hasta emplear AU al 50% en doble administración, el cual genera el nivel de nocicepción más intenso en este modelo experimental (López-Muñoz, 1986; López-Muñoz y col, 2008.)

Por esta razón, y dados los resultados obtenidos al emplear AU al 30%, se tomó la decisión de bajar al nivel inferior de nocicepción aplicando ahora AU al 15%. Primeramente, se tuvo que realizar una curva control para verificar que los datos que

obtendríamos en estas nuevas condiciones serían los observables por el efecto de los compuestos y no un reflejo de la recuperación espontánea de los animales o algún otro factor.

Al realizar el experimento se observó que la disfunción total sucedía a las tres horas después de la administración del AU al 15% y no a las dos horas y media como sucedía cuando se administraba AU al 30%, y esta disfunción se mantenía aproximadamente en "0" durante 4 horas más. Tomando en consideración que en el modelo experimental se establece un periodo de tiempo de evaluación del efecto antinociceptivo de 4 horas (después de observada la disfunción), se decidió administrar los compuestos en estudio a las 3 h después de administrado el ácido úrico, en donde se observó que las mediciones eran menores al 10% del índice de funcionalidad de cada individuo. Esto nos indicó que las nuevas condiciones eran factibles para el análisis farmacológico de los compuestos.

### 7.3 Efecto de las porfirinas

En relación con los efectos de los compuestos administrados individualmente, se puede mencionar que las tres porfirinas presentaron efectos antinociceptivos dependientes de la dosis. No obstante, la TPP demostró ser menos eficaz en la dosis de 562.3 mg/kg, con un efecto global de  $111.2 \pm 22.46$  u.a. significativamente menor al observado en TNO<sub>2</sub>PP ( $215.84 \pm 41.34$  u.a.) y TMe<sub>2</sub>NPP ( $192.69 \pm 21.69$  u.a.).

Si se compara el comportamiento del efecto del fármaco de referencia (Ibuprofeno) y de la TNO<sub>2</sub>PP en la curva dosis-respuesta, se pueden observar diferencias claras en los patrones de trazo. De algún modo, lo anterior proporciona indicios de las diferencias existentes en cuanto a los mecanismos de acción.

Ibuprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo que actúa en la nocicepción inhibiendo la acción de las enzimas COX-1 y COX-2, también ejerce su efecto al activar diversas vías como la de la L-arginina-ON-GMPc, la opioide, la serotoninérgica, la noradrenérgica, la colinérgica, la activación de corrientes de Na<sup>+</sup> en el asta dorsal, el

incremento en niveles de endocannabinoides, así como, la inhibición de actividad de expresión de canales sensibles a ácido y la inhibición de la producción de citocinas. Por otro lado, los efectos antinociceptivos de los compuestos porfíricos pueden deberse a la inhibición de la actividad de una tirosina cinasa de la familia Src no receptora llamada Fyn, que desencadena eventos antiinflamatorios asociados con la cascada de transducción de señales del receptor de células T, lo que conduce a la inhibición de la expresión de citocinas, que su vez, disminuye la sensibilización de las fibras nociceptivas periféricas (Jelic et al., 2012). Esta diferencia en cuanto a los mecanismos conocidos de ambos tipos de moléculas da un indicio del porque las diferencias observadas en los efectos, sin embargo, otro factor a tomar en cuenta es la farmacodinamia de las porfirinas. Como bien se sabe, un fármaco debe pasar por diferentes etapas en el organismo (proceso LADME), la liberación y la absorción son considerados pasos clave para que el producto pueda ejercer su acción en el individuo. En el caso de los compuestos evaluados, estos dos pasos no están bien estudiados, se desconoce una vía efectiva de administración y un vehículo que facilite su liberación y absorción. Lo que nos deja con la incertidumbre de si los efectos observados fueron realmente los máximos alcanzados con las dosis administradas.

En perspectiva, se requiere más experimentación sobre estos compuestos, debido a que los resultados podrían ser mayormente influenciados por la falta de solubilidad o absorción que por el efecto propio de la molécula. Quizá el empleo de otros modelos de dolor o nocicepción como el edema plantar inducido por carragenina o pruebas *in vitro* que nos ofrezcan datos cuantitativos de los mediadores liberados por células inmunitarias, puedan darnos más pistas acerca de un posible mecanismo de acción.

## 8 Conclusión

- Se logró realizar la síntesis de las porfirinas con diferentes densidades electrónicas, lo que establece la factibilidad de poder sintetizarlas y obtenerlas en cantidades adecuadas en el laboratorio
- Al evaluar las porfirinas en el modelo experimental preclínico de dolor o nocicepción moderada, evidenciaron efectos antinociceptivos, aunque con menor eficacia que un fármaco AINE conocido como ibuprofeno.
- La introducción de un grupo activador o desactivador aumentó el efecto antinociceptivo de la molécula de porfirina, lo cual puede establecer bases para realizar modificaciones estructurales útiles en las porfirinas.

## 9 Referencias

- Adler, A. D., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Goldmacher, J., Assour, J., & Korsakoff, L. (1967). A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *The Journal of Organic Chemistry*, 32(2), 476-476.
- Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., Hernandez-Munive, A., Campos-Xolalpa, N., Perez-Gutierrez, S., & Perez-Gonzalez, C. (2015). Synthesis, antinociceptive and anti-inflammatory effects of porphyrins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(10), 2529-2537. doi:10.1016/j.bmc.2015.03.043
- Arsenault, G. P. (1960). Bullock, E. and MacDonald, SF: Pyrromethanes and porphyrins therefrom. *J. Am. Chem. Soc*, 82, 4384-4389.
- Auwärter, W., Écija, D., Klappenberger, F., & Barth, J. V. (2015). Porphyrins at interfaces. *Nature Chemistry*, 7, 105. doi:10.1038/nchem.2159
- Bjorkman, R. (1995). Central antinociceptive effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs and paracetamol - experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 39, 3-44.
- Carey, F. A., Arellano, J. A. V., y Pozo, V. G., & Herranz, R. Z. (2006). Química orgánica: *McGraw-Hill*. 482 - 961
- Chapman, S. K., Daff, S., & Munro, A. W. (1997). Heme: the most versatile redox centre in biology? In *Metal Sites in Proteins and Models* (pp. 39-70): Springer.
- Cook, A. D., Christensen, A. D., Tewari, D., McMahon, S. B., & Hamilton, J. A. (2018). Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain. *Trends in immunology*, 39(3), 240-255.
- Dray, A., & Urban, L. (1996). New pharmacological strategies for pain relief. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 253-280.
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3760-3772.
- Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Mir, L. M., Liagre, B., Dumas, D., Etienne, S., . . . Gillet, P. (2003). Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *The FASEB journal*, 17(8), 829-835.

- Hudspith, M. J. (2016). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 17(9), 425-430. doi:10.1016/j.mpaic.2016.06.003
- Jelic, D., Tatic, I., Trzun, M., Hrvacic, B., Brajsa, K., Verbanac, D., . . . Mildner, B. (2012). Porphyrins as new endogenous anti-inflammatory agents. *European Journal of Pharmacology*, 691(1-3), 251-260. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.049
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210. doi:10.1038/35093019
- Kerr, N. S. (1894). *Inebriety; Or, Narcomania; Its Etiology, Pathology, Treatment, and Jurisprudence*: Lewis.
- Kurniawan, F., Miura, Y., Kartasasmita, R. E., Yoshioka, N., Mutalib, A., & Tjahjono, D. H. (2018). In silico study, synthesis, and cytotoxic activities of porphyrin derivatives. *Pharmaceuticals*, 11(1), 8.
- Latos-Grazynski, L., Kadish, K. M., Smith, K. M., & Guillard, R. (2000). The porphyrin handbook. In: : *Academic Press*.
- Lawrence, T., & Gilroy, D. W. (2007). Chronic inflammation: a failure of resolution? *International journal of experimental pathology*, 88(2), 85-94.
- Lindsey, J. S., Maccrum, K. A., Tyhonas, J. S., & Chuang, Y. Y. (1994). Investigation of a synthesis of meso-porphyrins employing high-concentration conditions and an electron-transport chain for aerobic oxidation. *Journal of Organic Chemistry*, 59(3), 579-587. doi:10.1021/jo00082a014
- Lindsey, J. S., Schreiman, I. C., Hsu, H. C., Kearney, P. C., & Marguerettaz, A. M. (1987). Rothmund and adler-longo reactions revisited - synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *Journal of Organic Chemistry*, 52(5), 827-836. doi:10.1021/jo00381a022
- López-Muñoz FJ. (1986). Análisis de algunos factores que determinan la farmacodinamia de agentes analgésicos. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias, *Departamento de Farmacología y Toxicología del Cinvestav*, Mexico.
- López-Muñoz, F. J., Salazar, L. A., Castaneda-Hernández, G., & Villarreal, J. E. (1993). A new model to assess analgesic activity - pain-induced functional

- impairment in the rat (PIFIR). *Drug Development Research*, 28(2), 169-175.  
doi:10.1002/ddr.430280207
- López-Muñoz, F. J., Godínez-Chaparro, B., Huerta-Cruz, J. C., Guevara-López, U., Domínguez-Ramírez, A. M., & Cortés-Arroyo, A. R. (2008). The antinociceptive efficacy of morphine, metamizol, or their combination in an experimental rat model with different levels of inflammatory pain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(1), 196-201.
- Mann, J. (1989). The logic of chemical synthesis - corey,ej, cheng,xm. *Nature*, 341(6238), 118-118. doi:10.1038/341118a0
- Mamardashvili, N. Z., & Golubchikov, O. A. (2001). Spectral properties of porphyrins and their precursors and derivatives. *Russian Chemical Reviews*, 70(7), 577.
- McDermott, A. M., Toelle, T. R., Rowbotham, D. J., Schaefer, C. P., & Dukes, E. M. (2006). The burden of neuropathic pain: Results from a cross-sectional survey. *European Journal of Pain*, 10(2), 127-127.
- McMurry, J. (2012). Química orgánica. 8a. edición. *Cengage Learning Editores*. 944 - 981.
- McTavish, J. R. (1987). What's in a name? Aspirin and the American Medical Association. *Bulletin of the History of Medicine*, 61(3), 343-366.
- Meldrum, M. L. (2003). A capsule history of pain management. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 290(18), 2470-2475.  
doi:10.1001/jama.290.18.2470
- Montierth, J. M., Duran, A. G., Leung, S. H., Smith, K. M., & Schore, N. E. (2000). The polymer-supported MacDonald-type porphyrin synthesis: coupling of two dissimilar dipyrromethanes. *Tetrahedron Letters*, 41(39), 7423-7426.
- Moser, B., & Willmann, K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(suppl 2), ii84-ii89.
- Noack, M., & Kolopp-Sarda, M.-N. (2018). Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018(499), 28-37.
- Ortega-Gómez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine*, 5(5), 661-674.



- Rothmund, P. (1935). Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *Journal of the American Chemical Society*, *57*, 2010-2011. doi:10.1021/ja01313a510
- Rothmund, P. (1936). A new porphyrin synthesis. The synthesis of porphin. *Journal of the American Chemical Society*, *58*, 625-627. doi:10.1021/ja01295a027
- Rothmund, P., & Menotti, A. R. (1948). Porphyrin studies .5. The metal complex salts of alpha,beta,gamma,delta-tetraphenylporphine. *Journal of the American Chemical Society*, *70*(5), 1808-1812. doi:10.1021/ja01185a047
- Rowland, M., Tozer, T.N. *Clinical Pharmacokinetics: concepts and applications*. Second ed. Philadelphia, London, Lea & Febiger; 1989. p. 255–257, p. 459–63.
- Schaible, H.-G. (2014). Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis research & therapy*, *16*(5), 470.
- Schiffirin, M. J. (1956). *Management of Pain in Cancer*. year books publishers.
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature neuroscience*, *5*, 1062.
- Shy, H., Mackin, P., Orvieto, A. S., Gharbharan, D., Peterson, G. R., Bampos, N., & Hamilton, T. D. (2014). The two-step mechanochemical synthesis of porphyrins. *Faraday Discussions*, *170*, 59-69. doi:10.1039/c3fd00140g
- Smith, E. S. (2018). Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of Neurology*, *265*(2), 231-238. doi:10.1007/s00415-017-8641-6
- Stucky, C. L., Gold, M. S., & Zhang, X. (2001). Mechanisms of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(21), 11845-11846. doi:10.1073/pnas.211373398
- Su, Q. W., & Hamilton, T. D. (2019). Extending mechanochemical porphyrin synthesis to bulkier aromatics: tetramesitylporphyrin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *15*, 1149-1153. doi:10.3762/bjoc.15.111
- Vicente, M. d. G. H., & Smith, K. M. (2014). Syntheses and Functionalizations of Porphyrin Macrocycles. *Current Organic Synthesis*, *11*(1), 3-28. doi:10.2174/15701794113106660083
- Wade, L. G. (2012). Química orgánica: *Pearson Educación*, Vol. 2, 751-936.
- Weishaupt, K. R., Gomer, C. J., & Dougherty, T. J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer research*, *36*(7 Part 1), 2326-2329.

- White, M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), S378-S381.
- Wijesekera, T. P., & Dolphin, D. (1994). Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry. *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, 193-239.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441-451. doi:10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010
- Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors—noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353-364.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2), 109-110.