

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
INVESTIGACIÓN FITOFARMACOLÓGICA**

**“ESTUDIO DEL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA EN DOLOR
NEUROPÁTICO EN RATA”**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

PRESENTA

Q.F.B. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS ZÚÑIGA

2142800415

COMITÉ TUTORAL

DRA. BEATRIZ GODÍNEZ CHAPARRO

DR. MIGUEL CONDÉS LARA

DR. HECTOR ISAAC ROCHA GONZÁLEZ

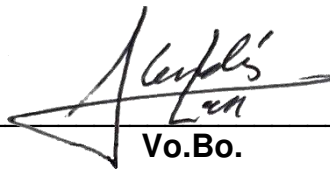
OCTUBRE, 2016

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA EN DOLOR
NEUROPÁTICO EN RATA**

Comité Tutorial



Vo.Bo.
Dra. Beatriz Godínez Chaparro



Vo.Bo.
Dr. Miguel Condés Lara



Vo.Bo.
Dr. Héctor Isaac Rocha González

Q.F.B Antonio Espinosa de los Monteros Zúñiga
2142800415

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA EN DOLOR
NEUROPÁTICO EN RATA**

Jurado del examen de grado

**Vo.Bo. Presidente
Dr. Vinicio Granados Soto**

**Vo.Bo. Vocal
Dra. Francisca Pérez Severiano**

**Vo.Bo. Secretario
Dra. Beatriz Godínez Chaparro**

**Q.F.B Antonio Espinosa de los Monteros Zúñiga
2142800415**

RESUMEN

El dolor neuropático es aquel dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso. Éste resulta particularmente complejo ya que puede ser causado por una gran cantidad de factores ya sean enfermedades metabólicas o traumatismos sobre el sistema nervioso central o en nervios periféricos. El tratamiento para el dolor neuropático implica el uso de una amplia variedad de agentes entre los que se incluyen: antidepresivos, anticonvulsivos, opioides, agentes tópicos, etc., pero al ser variado resulta poco efectivo. Por lo tanto, la búsqueda y caracterización de nuevas moléculas de origen natural o sintético resulta de vital importancia.

La manguiferina es un compuesto extraído del árbol de mango, que ha demostrado propiedades antidiabéticas, anti-cáncerígenas, anti-VIH, antiinflamatorias, antinociceptivas y en especial antioxidantes que podrían modular blancos moleculares en el dolor neuropático. En este estudio se determinó el efecto antialodínico de manguiferina en un modelo de dolor neuropático en ratas, así como los mecanismos de acción que subyacen en el efecto antialodínico producido por este compuesto. Para ello, las ratas fueron sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6, con el fin de generar alodinia, síndrome característico del dolor neuropático. La alodinia se evaluó a través del método "up-down". La administración intratecal de manguiferina bloqueó de manera dosis dependiente la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales. Además, el efecto antialodínico inducido por la manguiferina se bloqueó por glibenclamida (50 µg/rata, bloqueador selectivo de los canales de K⁺ sensibles a ATP), metiotepina (30 µg/rata, antagonista no selectivo de los receptores 5-HT), L-NAME (100 µg/ rata, inhibidor de la Sintasa del óxido nítrico), ODQ (10 µg/rata, inhibidor de la guanilato ciclasa), SB-699551 (0.6 µg/rata, antagonista selectivo del receptor 5-HT_{5A}), SB-224289 (0.5 µg/rata, antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B}), BRL-15572 (0.4 µg/rata, antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}) y WAY-100635 (0.6 µg, antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}), pero no por la naloxona (50 µg/rata, antagonista no selectivo de los receptores de opioides). Estos datos sugieren que el efecto antialodínico inducido por la manguiferina está mediado por el sistema serotoninérgico vía la activación de los receptores 5-HT_{5A}, _{1A}, _B y _D, así como por la vía del óxido nítrico-GMPc-canales de K⁺, pero no por el sistema opioidérgico.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría (381256) que me permitió continuar con este camino.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, como mi formadora y *alma máter*, que me permitió el uso de sus instalaciones y laboratorios para la realización de los experimentos necesarios para el desarrollo de esta maestría, en especial al laboratorio 004 de Farmacodinámia de inflamación y dolor del Departamento de Sistemas Bilógicos, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

AGRADECIMIENTOS

PARTICULARES

Primero me gustaría agradecer a mi tutora de tesis la Dra. Beatriz Godínez Chaparro, que con esfuerzo, dedicación, paciencia y perseverancia así como su motivación por el trabajo fue y es una parte fundamental para mi formación como investigador. Gracias Dra. por los conocimientos brindados y los consejos ofrecidos que serán de ahora en adelante los cimientos para mi vida profesional.

A la Dra. Teresa Izquierdo Sánchez que fue la que me abrió las puertas de su laboratorio para iniciar este camino y que me alentó a seguir en el mundo de la investigación, gracias por su compañía y sus consejos.

Agradezco de todo corazón a mi comité tutorial al Dr. Miguel Condés Lara y al Dr. Héctor Isaac Rocha González, gracias por su atención, paciencia, motivación y aliento, ya que sin su guía el camino hasta este punto hubiera sido imposible. Ha sido un privilegio contar con su guía y su apoyo, gracias por las risas compartidas y en especial por el tiempo brindado.

A mis padres Laura y Juan que siempre me impulsaron a seguir en este camino, por sus consejos y apoyo, que sin ustedes no hubiera podido llegar tan lejos.

A mis hermanos Iván y Alejandro, que no importando las peleas, siempre tenían una palabra o un gesto de apoyo para conmigo en este camino que decidí tomar ya hace dos años.

A mis amigos y colegas del laboratorio N-004 de la Universidad Autónoma Metropolitana que siempre me ayudaron y dieron ánimos para seguir.

A mis amigos del laboratorio B-16 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, que compartieron largas horas de su tiempo ya fuera para trabajar o reír.

ABREVIATURAS

5-HI: 5-Hidroxiindol

5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT: 5-Hidroxitriptamina o serotonina

AC: Adenilato Ciclasa

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AMPA: receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APP: Proteína Precursora de amiloides

ATP: Adenosín Trifosfato

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

CGRP: Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina

CGN: Canales dependientes de nucleótidos cíclicos

COX: Ciclooxygenasa

CVD: Enfermedad Cardiovascular

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOR: Receptor opioide Delta

ERC: Especies Reactivas de Cobre

ERH: Especies Reactivas de Hierro

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

Fe: Hierro

GABA: Ácido γ -amino butírico

GCs: Guanilato Ciclasa Soluble

GM-CSF: Factor Estimulador de Colonias de Granucitos y Macrófagos

GMPc: Guanosín Monofosfato cíclico

GRD: Gánglio de la Raíz Dorsal

H⁺: Protón

HCN: Canales Activados por Hiperpolarización y Modulados por Nucleótidos Cíclicos

IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor

ICAM: Moléculas de Adhesión

IFN- γ : Interferón Gamma

IkB: Inhibidor kB

IL: Interleucina

K⁺: Potasio

K⁺c: Canales de Potasio

K_{2p}: Canales de Potasio de Doble poro

K_{ATP}: Canales de Potasio sensibles a ATP

K_{Ca}: Canales de Potasio dependientes de Calcio

K_{ir}: Canales de Potasio de Rectificación Entrante

KOR: Receptor Opioide Kappa

L-NAME: N ω -nitro-L-arginina-metil-éster

LPS: Lipopolisacárido

LT: Leucotrieno

MAPK: Proteínas Cinasas activadas por Mitogeno

MOR: Receptor Opioide Mu

MTP: Membrana Mitocondrial Interna

NAFLD: Enfermedad de Hígado Graso no Alcohólico

NAÏVE: Ratas Normales

NF-kB: Factor Nuclear kB

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido Nítrico

NOS: Sintasa del Óxido Nítrico

ODQ: H-(1,2,4)-oxidiazol[4,2-a]quinoxalin-1-onea

PDE: Fosfodiesterasa

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PGE: Prostaglandina E

PKA: Proteína Cinasa A

PKC: Proteína Cinasa C

PKG: Proteína Cinasa G

PLA2: Fosfolipasa A2

POM: Parte Medial del Tálamo Posterior

RAGE: Receptor a Productos de Glicosilación Avanzada

RVM: Médula Rostral Ventromedial

SHAM: Ratas Falsamente Operadas

SNC: Sistema Nervioso Central

SNL: Ratas con Ligadura en los Nervios Espinales

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TRx: Oxidorreductasa Tioredoxena

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VPL: Núcleos Talámicos Ventroposterolaterales

XDH: Xantina Deshidrogenasa

XO: Xantina Oxidasa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
DOLOR	5
CLASIFICACIÓN DEL DOLOR.....	5
DOLOR NEUROPÁTICO.....	5
NEUROFISIOLOGÍA DE LA TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA	6
FIBRAS NERVIOSAS AFERENTES PRIMARIAS	6
VÍAS ASCENDENTES.....	8
VÍAS DESCENDENTES (MODULADORAS).....	9
FISIOPATOLOGIA DEL DOLOR NEUROPÁTICO.....	9
SENSIBILIZACIÓN PERIFÉRICA.....	10
SENSIBILIZACIÓN CENTRAL	12
PARTICIPACIÓN DE LA GLÍA EN EL MANTENIMIENTO DEL DOLOR.....	15
MANEJO Y TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO	17
TRATAMIENTOS PARA EL DOLOR NEUROPÁTICO.....	17
PLANTAS MEDICINALES	20
MANGUIFERINA	21
MARCO TEÓRICO.....	26
ESPECIES REACTIVAS, VÍAS Y RECEPTORES IMPLICADOS EN EL DOLOR ..	26
ESPECIES REACTIVAS.....	26
SEÑALIZACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS.....	27
DAÑO OXIDATIVO.....	28
AUMENTO EN LOS NIVELES DE Ca^{2+} INTRACELULAR.....	28
PROCESOS INFLAMATORIOS	29
MODULACIÓN DEL DOLOR	30
VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO-GMP CÍCLICO-CANALES DE POTASIO SENSIBLES A ATP	30
CANALES DE POTASIO	33
VÍA OPIOIDÉRGICA.....	38
VÍA SEROTONINÉRGICA	41
HIPÓTESIS	48
OBJETIVO GENERAL	48
OBJETIVOS PARTICULARES.....	48
METODOLOGÍA.....	49
ANIMALES.....	49
FÁRMACOS.....	49
MODELOS	50
LIGADURA DE NERVIOS ESPINALES L ₅ -L ₆	50
MÉTODO DE INYECCIÓN INTRATECAL.....	51

MÉTODO PARA DETERMINAR EL UMBRAL DE RETIRO DE LA PATA	52
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	54
ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA.....	55
RESULTADOS.....	58
REPRODUCIBILIDAD DEL MODELO.....	58
EFECTOS DE LA MANGUIFERINA SOBRE LA ALODINIA INDUCIDA POR LA LIGADURA DE LOS NERVIOS ESPINALES L ₅ -L ₆ , EN EL MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO.....	59
EFECTOS DE LA NALOXONA SOBRE EL EFECTO ANTIALODÍNICO INDUCIDO POR MANGUIFERINA	61
EFECTO DE METIOTEPINA, SB-699551, SB-224289, BRL-15572 Y WAY-100635 SOBRE EL EFECTO ANTIALODÍNICO INDUCIDO POR MANGUIFERINA	62
EFECTO DEL L-NAME, ODQ Y GLIBENCLAMIDA SOBRE EL EFECTO ANTIALODÍNICO INDUCIDO POR MANGUIFERINA	64
DISCUSIÓN	66
REPRODUCIBILIDAD DEL MODELO.....	66
SEÑALES DE LA GENERACIÓN DE ALODINIA	66
EFECTOS ANTIALODÍNICOS DE LA MANGUIFERINA	67
POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN QUE SUBYACE AL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA	67
POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA OPIOIDÉRGICO EN EL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA	68
POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA.....	68
POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO-GMP _{CÍCLICO} - CANALES DE K ⁺ EN EL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA .	69
POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN QUE SUBYACE AL EFECTO ANTIALODÍNICO DE LA MANGUIFERINA, MEDIADO POR LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS Y POR LA VÍA DEL NO-GMPC-CANALES DE K ⁺ DEPENDIENTES DE ATP.....	70
CONCLUSIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE LA MANGUIFERINA	22
TABLA 2. ANTAGONISTAS, ACCIÓN FARMACOLÓGICA Y MODELOS OCUPADOS SOBRE LOS RECEPTORES DE 5-HT	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. TIPOS DE FIBRAS SENSORIALES CLASIFICADAS SEGÚN SU DIÁMETRO, VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN Y LOS RECEPTORES A LOS QUE SE ASOCIAN.....	7
FIGURA 2. SENSIBILIZACIÓN PERIFÉRICA EN SITUACIONES DE DOLOR CRÓNICO.....	12
FIGURA 3. SENSIBILIZACIÓN CENTRAL EN LA ASTA DORSAL DE LA MÉDULA EN SITUACIONES DE DOLOR CRÓNICO.....	15
FIGURA 4. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES EN EL MANTENIMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO.	17
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MANGUIFERINA.....	21
FIGURA 6. MECANISMO DE PRODUCCIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GUANILATO CICLASA SOLUBLE.	32
FIGURA 7. ESTRUCTURA ESQUEMÁTICA DE LAS CUATRO CLASES PRINCIPALES DE CANALES DE K ⁺	36
FIGURA 8. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA SEROTONINA	42
FIGURA 9. VÍA SEROTONINÉRGICA DESCENDENTE.....	44
FIGURA 10. DIAGRAMA QUE MUESTRA LA LIGADURA DE LOS NERVIOS ESPINALES L ₅ -L ₆	50
FIGURA 11. DIAGRAMA QUE MUESTRA LA INSERCIÓN DE LA AGUJA EN EL ESPACIO INTERVERTEBRAL ENTRE L ₅ Y L ₆	51
FIGURA 12. MÉTODO PARA DETERMINAR EL UMBRAL DE RETIRO DE LA PATA	53
FIGURA 13. DISEÑO EXPERIMENTAL	57
FIGURA 14. CURSO TEMPORAL DE LA LIGADURA DE LOS NERVIOS ESPINALES DE LOS GRUPOS CONTROL.	58
FIGURA 15. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL E INTRATECAL DE LA MANGUIFERINA EN EL MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO DE LIGADURA DE NERVIOS ESPINALES	60
FIGURA 16. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON EL ANTAGONISTA NO SELECTIVO DE LOS RECEPTORES OPIOIDES NALOXONA.....	61
FIGURA 17. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON EL ANTAGONISTA NO SELECTIVO DE LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS METIOTEPINA .	62
FIGURA 18. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON LOS ANTAGONISTAS SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} Y 5-HT _{5A}	63
FIGURA 19. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE LA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO, EL INHIBIDOR DE LA GUANILATO CICLASA Y EL BLOQUEADOR DE CANALES DE K ⁺ DEPENDIENTES DE ATP	65
FIGURA 20. POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MANGUIFERINA	72

INTRODUCCIÓN

Una de las sintomatologías patológicas agudas y crónicas que afectan a la población y es de relevancia en la salud pública por su gran incidencia es el dolor ya que afecta de diversas maneras a la persona que lo padece provocando en ella grandes sufrimientos e incapacidad que puede transcurrir hacia una situación crónica que suele dar lugar a enfermedades degenerativas debido a que puede llevar al organismo a una reacción exagerada contra un agente nocivo o daño físico (Millan, 1999).

Es por eso que el dolor atrae el interés en las investigaciones clínicas y básicas ya que es un estado complejo que posee fenómenos generales no muy bien definidos debido a la gran cantidad de factores y vías que en él influyen. Para su estudio, el dolor puede ser dividido ya sea por su temporalidad en agudo o crónico o por su fisiopatología en nociceptivo, inflamatorio, funcional o neuropático (Woolf, 2010). Resultando este último especialmente interesante debido a la gran cantidad de factores que pueden desencadenarlo y a la falta de un tratamiento eficaz para su alivio.

Para ello la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor neuropático como el dolor que surge como consecuencia directa de una lesión o enfermedades que afectan el sistema somatosensorial (Finnerup et al., 2016; Jensen et al., 2011; Treede et al., 2008). Esta lesión podría ser parcial o total ya sea a nivel del sistema nervioso central o periférico lo que desencadena en una posible alteración de los mecanismos de control y/o modulación de las vías de la transmisión nociceptiva (Merskey y Bogduk, 1994; Treede et al., 2008). Varios factores incluyendo enfermedades metabólicas o un traumatismo directo en la médula espinal o sobre los nervios pueden desencadenar este tipo de dolor. Por su parte el dolor neuropático puede producir síndromes caracterizados por sensaciones dolorosas espontáneas o evocadas como podrían ser la alodinia (una sensación dolorosa provocada por estímulos inocuos) y la hiperalgesia (un incremento en la sensibilidad a los estímulos dolorosos) (Cervero, 2009).

El dolor neuropático resultado de un daño en nervios periféricos es un problema clínico importante que frecuentemente presenta refractariedad a los tratamientos farmacológicos actuales para este tipo de dolor. Por mencionar algunos factores que contribuyen en el inadecuado tratamiento del dolor neuropático se enlistan los siguientes (Clark et al., 2013; Gálvez et al., 2007):

- 1) La dificultad y el retraso en el diagnóstico.
- 2) La falta de respuesta a los analgésicos clásicos (antiinflamatorios no esteroideos [AINE] y opioides).
- 3) El empleo de diversos fármacos con diferentes mecanismos de acción debido a que las vías implicadas en la generación del dolor neuropático no son del todo conocidas ni están del todo claras debido a la neuroplasticidad del sistema nervioso.

Es por estas razones que el manejo del dolor neuropático implica el uso de una amplia variedad de agentes entre los que se incluyen: antidepresivos, anticonvulsivos, opioides, agentes tópicos, entre otros (Ballantyne et al., 2010; Dworkin et al., 2007). Sin embargo aún con la generación actual de estos fármacos el alivio eficaz del dolor se logra en menos de la mitad de los pacientes con dolor neuropático (Attal et al., 2010, 2006; Finnerup et al., 2005).

Tomando en cuenta lo anterior la búsqueda, evaluación y caracterización de nuevas moléculas de origen natural o sintético que no provoquen efectos adversos y que aporten beneficios potenciales para el tratamiento del dolor neuropático resulta de gran interés (Ballantyne et al., 2010).

Una alternativa a los tratamientos clásicos es el empleo de compuestos o extractos de frutas, verduras y especies de origen natural con alto contenido de compuestos antioxidantes, esto debido a que estudios recientes sugieren que las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) juegan un papel importante en la generación del dolor neuropático (Twining et al., 2004). Como se sabe las ERO en los tejidos nerviosos se forma a partir de diversas causas y tienen un papel importante en el modelo de dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios (Kim et al., 2004). Además estudios recientes indican que las ERO, también, están implicados en el dolor persistente incluyendo neuropático e inflamatorio (Kim et al., 2004; Salvemini et al., 1999; Tal, 1996; Wang et al., 2004). En ratas neuropáticas, por ejemplo, la alodinia temporal generada después de la ligadura del nervio fue significativamente contrarrestada después del tratamiento con antioxidantes (Kim et al., 2006, 2004) sugiriendo que las ERO están implicadas en el mantenimiento del dolor neuropático.

Es por eso que el empleo de agentes antioxidantes como tratamientos alternativos para el manejo y control de los síntomas del dolor neuropático resulta de gran interés (Prado et al., 2015).

Un ejemplo de estos compuestos antioxidantes de origen natural es la manguiferina, una glucosilxantona generalmente distribuida en especies vegetales como la *Mangifera indica* L. (Núñez Sellés et al., 2002). Esta especie es frecuentemente utilizada en la medicina tradicional ya que exhibe una gran cantidad de efectos biológicos (García et al., 2002; Garrido et al., 2004; Pardo-Andreu et al., 2008), la mayoría de los cuales pueden ser explicados por el mecanismo que involucra la inhibición de la ruta de señalización del Factor Nuclear κ B (NF- κ B) (J. Leiro et al., 2004). Como se sabe el NF- κ B induce la transcripción de genes implicados en la expresión de varios mediadores y enzimas involucradas en inflamación, dolor, estrés oxidativo, plasticidad sináptica, así como la inducción de la óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Liu et al., 2007; Wei et al., 2007).

Por ejemplo en el modelo de neurotoxicidad inducida por glutamato la manguiferina muestra efectos neuroprotectores en neuronas de la corteza cerebral de rata previniendo la muerte neuronal, estrés oxidativo y despolarización mitocondrial (Gottlieb et al., 2006; Lemus-Molina et al., 2009).

Estudios recientes demuestran que la administración periférica, intratecal y oral de manguiferina disminuye de manera dosis-dependiente la nocicepción inducida por formalina. Además, el efecto antinociceptivo de la manguiferina fue similar al inducido con diclofenaco después de la administración oral y periférica. También la manguiferina fue capaz de reducir las conductas antinociceptivas agudas inducidas por serotonina o capsaicina (Izquierdo et al., 2013). Así mismo el efecto antinociceptivo periférico de la manguiferina en la prueba de la formalina fue bloqueado por naloxona, naltrindol, 5-guanidinnaltrindol, N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), H-(1,2,4)-oxidiazol[4,2-a]quinoxalin-1-onea (ODQ), pero no por metiotepina. Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo inducido por manguiferina es mediado por el sistema opioidérgico periférico involucrando la activación de receptores δ , K y probablemente μ , pero no por receptores serotoninérgicos. Los datos también sugieren que la manguiferina es capaz de activar

la vía de NO-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP y en consecuencia producir su efecto antinociceptivo periférico en la prueba de la formalina (Izquierdo et al., 2013).

Debido a los variados efectos biológicos y a las características antioxidantes de la manguiferina se propone un papel en el efecto modulador sobre algunos de los blancos moleculares implicados en el dolor neuropático promoviendo un efecto antialodínico en un modelo de dolor neuropático.

ANTECEDENTES

DOLOR

La asociación internacional para el estudio del dolor (IASP) define al dolor como *una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño* (Merskey, 1979). El dolor, aunque indeseable representa una estrategia adaptativa que protege al organismo de las agresiones del medio exterior. Sin embargo en algunas circunstancias el dolor pasa de cumplir un papel benéfico a convertirse en una patología que por sí misma debe ser suprimida para permitir la supervivencia del organismo (Gomezese Ribero et al., 2010).

Clasificación del dolor

El dolor para su estudio puede clasificarse por: su temporalidad, en agudo que va desde 1 segundo a tres meses o crónico cuando supera los tres meses de prevalencia (Woolf, 2010) y/o por su neurofisiopatología en nociceptivo, infamatorio, funcional y neuropático, siendo definido el primero como una respuesta fisiológica secundaria experimentada por la activación normal de nociceptores (mecánico, térmico o químico); el segundo, como una respuesta a un daño con la subsecuente liberación de citocinas y sustancias proinflamatorias; el tercero, como una sensación dolorosa perceptible pero sin la existencia de un daño que lo ocasione; mientras que el cuarto se produce como una respuesta a una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso periférico o central y por tanto esta asociado a trastornos motores y sensitivos (Gao y Ji, 2010; Nakagawa y Kaneko, 2010; Woolf, 2010). Siendo el dolor neuropático el tema central de este trabajo será el que procederemos a definir.

Dolor neuropático

La IASP define al dolor neuropático como *el dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso central o periférico* (Merskey y Bogduk, 1994), esta definición es modificada en 2008 donde define al dolor neuropático como *aquel dolor que surge como consecuencia directa de una lesión o enfermedades que afectan el sistema somatosensorial* (Finnerup et al., 2016; Jensen et al., 2011; Treede et al., 2008). Esta lesión puede ser parcial o total a nivel del sistema nervioso central o periférico derivando en una posible alteración de los mecanismos de control y

modulación de las vías de transmisión nociceptiva (Merskey y Bogduk, 1994; Treede et al., 2008). Varios agentes incluyendo un traumatismo directo en la médula espinal o a los nervios periféricos, infecciones virales y enfermedades metabólicas como la diabetes pueden desencadenar el dolor neuropático (Finnerup et al., 2016).

Por otra parte, el dolor neuropático puede producir síndromes caracterizados por sensaciones dolorosas espontáneas o evocadas como la alodinia (una sensación dolorosa provocada por estímulos inocuos) y la hiperalgesia (un incremento en la sensibilidad a los estímulos dolorosos) que también pueden producirse ante estímulos térmicos o mecánicos después del daño tisular (Cervero, 2009; LaMotte et al., 1991; Raja et al., 1984).

Para el entendimiento de los posibles mecanismos que favorecen al establecimiento y mantenimiento del dolor neuropático es necesario conocer la neurofisiología de la transmisión de la señal nociceptiva y de las diferentes entidades que en ella participan.

NEUROFISIOLOGÍA DE LA TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA

La sensación nociceptiva cumple un papel fundamental en la supervivencia de las especies (ya que alerta de posibles de daños y peligros), por lo que su estudio resulta particularmente interesante, debido a que los fenómenos que subyacen en su transmisión son particularmente complejos (Julius y Basbaum, 2001). Desde el punto de vista anatómico-funcional, el principal sistema de transmisión nociceptivo (como ocurre con otras modalidades sensoriales), comprende tres neuronas dispuestas en serie, denominadas neuronas de primer, segundo y tercer orden respectivamente, las cuales transmiten la información sensorial desde los órganos periféricos (piel, articulaciones, músculos, vísceras) hasta las estructuras del sistema nervioso central encargadas de la discriminación, la integración y el procesamiento del dolor (Coggeshall et al., 1997; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001; Kohama et al., 2000), a través de las denominadas fibras aferentes y de las vías descendentes.

Fibras nerviosas aferentes primarias

Las fibras aferentes primarias o fibras sensoriales están constituidas por los axones de las neuronas de primer orden, cuyo cuerpo celular está localizado en los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal (ganglios raquídeos) o en los ganglios sensoriales de los nervios craneales V, VII, IX y X (Cingolani y Houssay, 2000). Del

cuerpo celular de estas neuronas emergen dos prolongaciones, una larga que termina ramificándose a nivel distal en la piel o en otros tejidos, la cual constituye la fibra aferente primaria y otra prolongación más corta, que se dirige hacia la asta dorsal de la médula espinal, donde se conecta con las neuronas de segundo orden. Las fibras sensoriales (Figura 1) pueden tener una capa de mielina o carecer de esta, así mismo se clasifican según su diámetro (que a su vez está condicionado por la capa de mielina) y velocidad de conducción (Cingolani y Houssay, 2000).

Las fibras sensoriales que intervienen en la transmisión nociceptiva fisiológica son las fibras A β , A δ y C (Coggeshall et al., 1997; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001; Kohama et al., 2000), también denominadas nociceptores, que a nivel distal forman ramificaciones nerviosas libres, a diferencia de otras fibras aferentes primarias cuyas terminaciones son receptores sensoriales los cuales forman estructuras complejas (Cingolani y Houssay, 2000; Kohama et al., 2000).

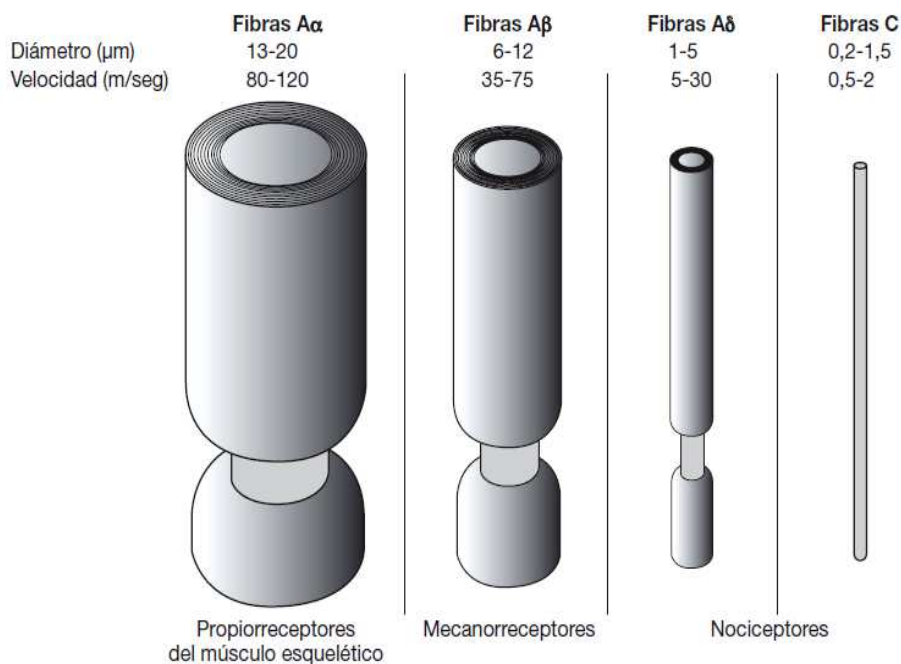


Figura 1. Tipos de fibras sensoriales clasificadas según su diámetro, velocidad de conducción y los receptores a los que se asocian. Modificado de Bear et al., 2016.

Por otra parte, las fibras aferentes primarias entran en la médula a través de la raíz dorsal y hacen conexiones con las neuronas espinales de la sustancia gris del asta posterior (neuronas de segundo orden), ya sea directa o indirectamente a través de interneuronas espinales (Coggeshall et al., 1997; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001; Kohama et al., 2000).

En la asta dorsal se pueden identificar dos tipos básicos de neuronas nociceptivas de segundo orden, las cuales se clasifican según la naturaleza de su respuesta a las entradas nociceptivas. Las primeras son las neuronas propiamente nociceptivas que se concentran en la lámina I y responden a estímulos nocivos de tipo mecánico y térmico, pero no a estímulos inocuos, siendo sus principales aferentes las fibras A δ y C (que conectan con las neuronas nociceptivas específicas y polimodales, respectivamente)(Cingolani y Houssay, 2000). Estas dos clases de neuronas nociceptivas se asocian con diferentes tipos de dolor, el primero punzante y el segundo quemante (Coggeshall et al., 1997; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001; Kohama et al., 2000).

El segundo tipo de neuronas son las denominadas multirreceptoriales o de amplio rango dinámico, que predominan en la lámina V. Se denominan así debido a que responden con una frecuencia variable de descarga, que depende de la intensidad del estímulo (Bushnell y Basbaum, 2009). Este tipo de neuronas reciben aferencias de fibras nociceptivas A δ y C, así como de fibras sensoriales no nociceptivas del tipo A β y A α ; por lo que son capaces de responder a una gran variedad de estímulos tanto inocuos como nocivos, ya sean de tipo químico, térmico o mecánico, integrando así estímulos viscerales y somáticos (Bushnell y Basbaum, 2009). Por lo tanto, los axones de las neuronas de segundo orden constituyen las vías de transmisión sensorial ascendente (Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001).

Vías ascendentes

La información sensorial somática está funcionalmente segregada. Por un lado, la transmisión dolorosa y térmica que procede de la piel, las articulaciones y el músculo, está canalizada en el *sistema espinotalámico* que corresponde al *sistema anterolateral* (Mas y Blanch, 2007). Este sistema está constituido por los axones mielinizados de neuronas de segundo orden localizadas principalmente en las láminas I, II y V del asta dorsal. Los axones de las neuronas sensoriales primarias llevan la información hasta la médula espinal donde establecen sinápsis con neuronas de segundo orden en la sustancia gris medular, éstas neuronas de segundo orden cruzan la línea media y ascienden por medio de tractos anterolaterales de la sustancia blanca medular formando el funículo lateral proyectando en los núcleos talámicos ventroposterolaterales (VPL) y en la parte medial del tálamo posterior (POm) donde

hacen sinapsis con neuronas talámicas (neuronas de tercer orden), las cuales proyectan en la corteza somatosensorial; mientras que, la información inócua como lo es el tacto, la presión, vibración o propioceptiva, se transmite por el sistema de *columnas dorsales*, el cual está formado por los axones de las neuronas de segundo orden de las láminas profundas del asta dorsal (IV- IX) y de la lámina X que ascienden ipsilateralmente hasta proyectar en los núcleos dorsales del bulbo raquídeo, el núcleo gracilis y el núcleo cuneatus donde cruzan al lado contralateral y ascienden mediante el sistema del lemniscus medial hasta conectar con estructuras talámicas (núcleos VPL) (Cingolani y Houssay, 2000; Mas y Blanch, 2007).

Vías descendentes (moduladoras)

Las vías descendentes modulan la transmisión nociceptiva. Éstas se originan en la corteza del lóbulo frontal, en el hipotálamo y en estructuras del sistema límbico (amígdala, núcleo accumbens) para proyectar a nivel del mesencéfalo en la sustancia gris periacueductal, desde donde proyectan hacia la médula rostral ventromedial (RVM), el cual es un conjunto de redes neuronales localizadas en el bulbo raquídeo, que comprenden los núcleos del rafe magno y núcleos adyacentes de la formación reticular (Cingolani y Houssay, 2000). Desde la RVM se pueden ejercer dos tipos de influencias sobre la transmisión nociceptiva excitatoria e inhibitoria mediante la proyección de fibras nerviosas descendentes en el asta posterior de la médula espinal (Coggeshall et al., 1997; Julius y Basbaum, 2001).

Clásicamente se ha asumido que las vías excitatorias e inhibitorias descendentes son distintas; las primeras, forman el funículo ventrolateral y activan a neuronas de la lámina I; mientras que, las inhibidoras son canalizadas mediante el funículo dorsolateral. En circunstancias fisiológicas la influencia inhibitoria es predominante sobre la excitatoria, sin embargo en los estados de dolor neuropático adquiere relevancia la vía excitatoria (Coggeshall et al., 1997; Julius y Basbaum, 2001).

FISIOPATOLOGIA DEL DOLOR NEUROPÁTICO

Se debe diferenciar el dolor neuropático del dolor fisiológico y del inflamatorio. El dolor fisiológico representa una reacción que alerta al organismo de la presencia, localización, intensidad y duración de una señal nociva, cesando cuando desaparece el daño o estímulo que la originó (Finnerup et al., 2016; Millan, 2002). El dolor

inflamatorio es fruto de la sensibilidad aumentada que ocurre en respuesta al daño tisular y subsiguiente inflamación, en él se producen fenómenos reversibles de amplificación a nivel de la terminal nerviosa periférica y a nivel espinal (Finnerup et al., 2016). Sin embargo, el dolor neuropático representa una reacción patológica del sistema sensorial el cual responde amplificando la señal nociva inicial tanto a nivel periférico como central, distorsionando profundamente el procesamiento de la transmisión nociceptiva (Dworkin et al., 2007; Finnerup et al., 2016). Este envío de señales es persistente aún cuando la lesión que lo originó haya desaparecido acompañándose de manifestaciones dolorosas características como: la alodinia pudiendo coexistir en el mismo organismo manifestaciones de hiperalgesia y alteraciones sensoriales en forma de disestesias, parestesias e hipoestesias (Attal et al., 2010; Finnerup et al., 2005; LaMotte et al., 1991).

Además, los mecanismos que participan en el desarrollo y/o mantenimiento de la neuropatía no son del todo claros. Ya que en él se han identificado diferentes procesos en la generación y el mantenimiento de estas condiciones dolorosas:

- 1) Activación y sensibilización de los nociceptores periféricos también llamada sensibilización periférica (Costigan y Woolf, 2000);
- 2) Amplificación de la señal nociceptiva a nivel central, conocida como sensibilización central (Latremoliere y Woolf, 2009).

Sensibilización periférica

Una de las características del dolor neuropático es la presencia de respuestas exageradas a ciertos estímulos que se manifiestan debido a una disminución del umbral de activación de los nociceptores, de tal forma que se genera alodinia e hiperalgesia.

Cuando un estímulo nociceptivo produce daño al tejido se generan cambios profundos en el ambiente químico de la fibra aferente primaria. En primer lugar las células dañadas liberan su contenido intracelular con la subsecuente disminución de pH, se reclutan células inflamatorias al sitio del daño con la producción y liberación de agentes neuroactivos por parte de las células inflamatorias y no inflamatorias entre los que se incluyen: iones (K^+ y H^+) (Waldmann y Lazdunski, 1998), aminas (serotonina, histamina) (Dray, 1995), bradicinina (Walter y Chau, 1995), prostanoïdes (PGE_2) (Bley

et al., 1998), purinas (ATP) (Burnstock y Wood, 1996), citocinas (IL-1, IL-6, TNF α) y factores de crecimiento. Estos mediadores químicos actúan sobre sus receptores específicos o sobre canales iónicos en la terminal nociceptiva periférica. Los receptores activados inician cascadas de transducción que generan la modulación post-traduccional de las moléculas efectoras y cambios en la transcripción de genes (Costigan y Woolf, 2000). Por otra parte la activación de los nociceptores (fibras A δ y C) genera potenciales antidrómicos y ortodrómicos que liberan neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Wall y Devor, 1983). A su vez estos péptidos despolarizan las terminales nerviosas vecinas siendo los responsables de la vasodilatación y extravasación plasmática así como de la regulación y secreción de diversos mediadores inflamatorios en varias células (Costigan y Woolf, 2000). Todos estos cambios disminuyen el umbral de activación de la terminal nociceptiva lo que provoca una frecuencia de descarga aumentada con cada estímulo periférico (Costigan y Woolf, 2000) (Figura 2).

La interrupción de la continuidad de los axones o auxotomía generada por la lesión a los nervios periféricos produce una degeneración waleriana de las fibras afectadas a nivel distal (Koltzenburg et al., 2013). Este fenómeno está facilitado por la actividad de los macrófagos residentes y de las propias células de Schwann (Cingolani y Houssay, 2000). Los axones lesionados inducen la liberación de sustancias con actividad vasoactiva (tales como el CGRP, sustancia P, bradicininas, óxido nítrico) que favorecen la hiperemia y la llegada al foco de células con actividad inflamatoria e inmunológica (macrófagos infiltrados, granulocitos, neutrófilos, linfocitos T, mastocitos), que a su vez liberan mediadores de la inflamación como prostaglandinas y citocinas produciéndose una reacción inflamatoria local con liberación de mediadores celulares los cuales no sólo contribuyen al daño neuronal sino que también modulan la actividad espontánea de los nociceptores aumentando así su sensibilidad frente a los estímulos (Koltzenburg et al., 2013). En adición a estos fenómenos las células de Schwann liberan factores de crecimiento nervioso o neurotrofinas (factor de crecimiento nervioso y factor neurotrófico derivado de la glía [GCDNF]) que tienen funciones diversas como pueden ser la regeneración axonal y la modificación de las propiedades intrínsecas de los nociceptores los cuales desarrollan una gran sensibilidad a la estimulación sensorial (Scholz y Woolf, 2007).

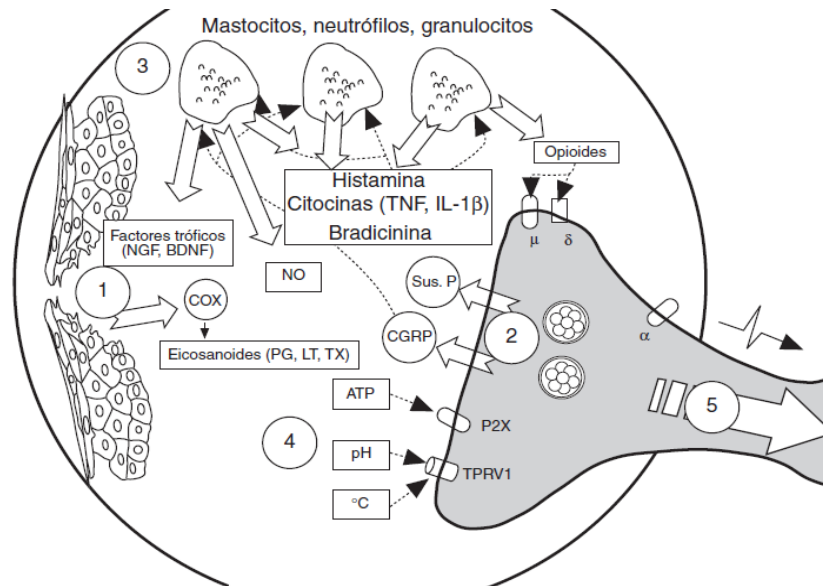


Figura 2. Sensibilización periférica en situaciones de dolor crónico. 1: la lesión origina el envío de información la asta dorsal; 2: liberación de sustancia P y CGRP; 3: liberación de sustancias pronociceptivas e inflamatorias desde los mastocitos y los neutrófilos; 4: activación de los receptores vanilloides y sensibles a ATP; 5: transmisión de la señal amplificada al sistema nervioso central. Las flechas blancas indican liberación y las punteadas, unión a receptor. Abreviaturas: NGF: factor de crecimiento nervioso; BDNF: factor nervioso derivado del cerebro; COX: ciclooxigenasa; NO: óxido nítrico; Sust. P: sustancia P; CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; TNF: factor de necrosis tumoral; IL-1 β : interleucina 1 β ; ATP: adenosintrifosfato; μ , δ : receptores opioides; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanos; P2X: receptor de ATP; TPRV1: receptor vanilloide. Modificado de Martín v García. 2006.

Resumiendo lo anterior la sensibilización periférica se caracteriza por:

1. Lesión y subsecuente vaciamiento del contenido intracelular.
2. Activación de nociceptores (fibras A δ y C) y liberación de sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).
3. Reclutamiento de células inflamatorias y no inflamatorias, así como, liberación de iones, aminas, bradicinina, prostanoideos, purinas, ATP, citosinas y factores de crecimiento.
4. Unión a receptores y cascadas de transducción.
5. Facilitación del envío de la señal dolorosa.

Sensibilización central

A nivel espinal la entrada continua de señales nociceptivas origina cambios que contribuyen a la cronicidad del dolor. La estimulación aferente repetitiva genera un aumento de la capacidad de amplificación del sistema nociceptivo a nivel central, este fenómeno es conocido como *sensibilización central* (Cingolani y Houssay, 2000; Koltzenburg et al., 2013). En ésta se originan cambios en la respuesta eléctrica de la

membrana plasmática así como en las propiedades intrínsecas de los receptores, canales iónicos y en la expresión de neurotransmisores clave en el procesamiento de la información nociceptiva. Además, se produce muerte neuronal con una reorganización sináptica de la asta posterior (Cingolani y Houssay, 2000). Estos fenómenos contribuyen al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático, lo cual explica la aparición de algunos síntomas característicos, como la alodinia (Scholz y Woolf, 2007; Ueda, 2006).

En condiciones normales un estímulo nociceptivo que no genera daño al tejido promueve la liberación de glutamato de las terminales centrales de las fibras aferentes primarias. El glutamato transmite el impulso nociceptivo a través de los receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que generan potenciales post-sinápticos excitadores rápidos que señalan la duración, la intensidad y la localización del estímulo periférico nociceptivo (Woolf y Costigan, 1999). Pero cuando el estímulo nociceptivo provoca un daño al tejido los potenciales generados son más intensos y sostenidos liberando glutamato, sustancia P y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), los cuales activan a sus respectivos receptores post-sinápticos desencadenando cascadas de transducción de señales (Costigan y Woolf, 2000; Khasabov et al., 2002).

La sensibilización central se inicia cuando el glutamato activa a los receptores AMPA provocando una despolarización de las neuronas post-sinápticas. Esta despolarización al ser prolongada remueve el “tapón” de Mg^{2+} que bloquea a los canales N-metil-D-aspartato (NMDA), permitiendo al glutamato activar a estos receptores promoviendo el flujo de Ca^{2+} , con lo que se incrementaría la concentración de este ion en el espacio intracelular (Woolf y Salter, 2000). El incremento de Ca^{2+} así como la activación de múltiples receptores estimulan la participación de diversas enzimas como la sintasa de óxido nítrico (NOS) o la ciclooxigenasa (COX), además de la activación de múltiples cinasas como la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC) o las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Woolf y Costigan, 1999). Las proteínas cinasas una vez activadas fosforilan a los receptores de membrana y a los canales iónicos generando una mayor excitabilidad de la neurona. Por otra parte las enzimas NOS y COX sintetizan óxido nítrico y prostaglandinas, respectivamente (Costigan y Woolf, 2000), ambas sustancias son

capaces de difundir hacia la neurona pre-sináptica, lo que provoca un incremento de la señal nociceptiva. Estos cambios incrementan la frecuencia de descarga espontánea de las neuronas post-sinápticas disminuyendo su umbral de activación a estímulos periféricos e incrementando la respuesta a los estímulos nociceptivos y amplificando los campos receptivos (Latremliere y Woolf, 2009) (Figura 3). Por lo tanto, la sensibilización central produce hipersensibilidad al dolor favoreciendo el mantenimiento de alodinia e hiperalgesia.

Como consecuencia de la lesión nerviosa, también, se altera la expresión de genes tanto en las neuronas lesionadas como en las adyacentes (Cingolani y Houssay, 2000). En las neuronas lesionadas hay una inducción de genes relacionados con la muerte celular lo que provoca la apoptosis de fibras C. A nivel de la lesión también se observa una disminución de la expresión de neurotransmisores peptídicos excitadores (sustancia P) y de receptores inhibidores ($GABA_A$, opioides), probablemente relacionado con la degeneración neuronal (Koltzenburg et al., 2013). Por otro lado se observa un incremento de la producción de mediadores excitadores en cuerpos de neuronas proximales no lesionadas que junto con la disminución de la transmisión inhibitoria observada contribuye a mantener el foco de excitabilidad a nivel espinal (Koltzenburg et al., 2013; Scholz y Woolf, 2007; Ueda, 2006).

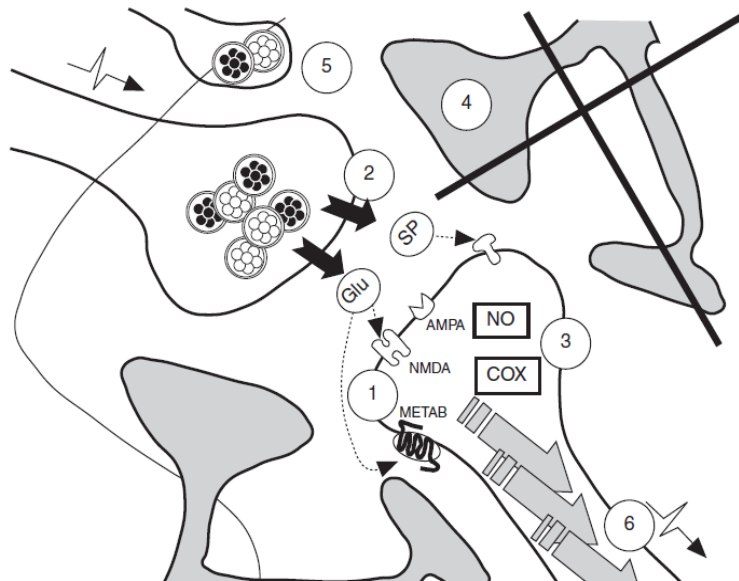


Figura 3. Sensibilización central en la asta dorsal de la médula en situaciones de dolor crónico, 1: liberación de glutamato y unión a receptores específicos (NMDA y METAB); 2: liberación de sustancia P; 3: liberación de sustancias pronociceptivas (NO, COX); 4: inhibición de las vías modulatoras centrales; 5: desarrollo de nuevas colaterales axónicas; 6: transmisión de la señal amplificada al sistema nervioso central. Las flechas blancas indican liberación y las punteadas, unión a receptor. Abreviaturas: COX: ciclooxigenasa; NO: óxido nítrico; SP: sustancia P; Glu: glutamato; NMDA: receptor de glutamato; METAB: receptor de glutamato. Modificado de Martín y García, 2006.

La sensibilización central se puede resumir en:

1. Liberación de Sustancia P, glutamato y BDNF.
2. Activación de múltiples receptores (NK1, mGluR, AMPA, NMDA y TrkB).
3. Incremento de Ca^{2+} intracelular.
4. Activación de enzimas (COX y NOS) y múltiples cinasas (PKA, PKC, MPAK).
5. Producción de sustancias pro-inflamatorias (PGE_2 y NO) que difunden a la neurona presináptica, produciendo un incremento en la señal nociceptiva.

Participación de la glía en el mantenimiento del dolor

Clásicamente se había considerado a la glía como a un conjunto de células que participaba únicamente en cuestiones de soporte físico y nutricional de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) (Scholz y Woolf, 2007). No obstante, está demostrada su participación en procesos de inflamación, crecimiento tumoral, respuesta inmunitaria y dolor. En lo que concierne al dolor está descartada la participación de la glía en el procesamiento del dolor agudo ya que no se ha detectado ningún signo de actividad glial en animales sometidos a estímulos nociceptivos de

corta duración (Watkins et al., 2001). Sin embargo en el dolor neuropático está claramente demostrada la participación de la microglía y de los astrocitos, 2 de las 3 especies celulares que forman a la glía (Watkins et al., 2001). Hasta el momento no se ha podido confirmar la participación de los oligodendrocitos la tercera especie de la glía en el procesamiento del dolor (Scholz y Woolf, 2007).

La participación de la glía en el dolor neuropático se iniciaría con la presencia de factor de necrosis tumoral (TNF- α) en la sinapsis del asta dorsal de la médula (Marchy et al., 2005), que puede ser liberado por neutrófilos infiltrados en el SNC o por las células de Schwann (Marchy et al., 2005). Una vez liberado el TNF- α se une a unos receptores presinápticos específicos denominados TNFR1. La unión a este receptor favorece una serie de cambios metabólicos en la neurona entre ellos: la síntesis y la liberación de una quimiocina denominada fractalcina (CX3CL1), que se libera al espacio intersináptico y se une a un receptor específico denominado CX3CR1 localizado en la membrana microglial (Marchy et al., 2005). Esta unión promueve la migración y la activación de la microglía, así como la síntesis de una enzima denominada p38map cinasa que facilita la liberación de sustancias algógenas y proinflamatorias (Marchy et al., 2005). Otros datos parecen indicar que el ATP liberado por la propia microglía o por otros tipos celulares puede unirse específicamente a otro tipo de receptor purinérgico denominado P2X4 que se expresa únicamente en la microglía. Esta unión al receptor aumenta la expresión de la p38map cinasa lo que promueve la activación microglial (Scholz y Woolf, 2007). Resulta especialmente interesante desde un punto de vista farmacológico la participación de la p38map cinasa y el receptor P2X4 ya que en la asta posterior de la médula estas entidades sólo se expresan en la microglía y no en las neuronas (Scholz y Woolf, 2007). Hay indicios de la participación de otro subtipo de células gliales, los astrocitos que se activan más tardíamente que la microglía (una vez bien desarrollada la neuropatía), liberando el mismo tipo de sustancias algogénicas y proinflamatorias que la microglía (citocinas, aminoácidos excitadores, PG, NO, COX, etc.)(Marchy et al., 2005; Watkins et al., 2001).

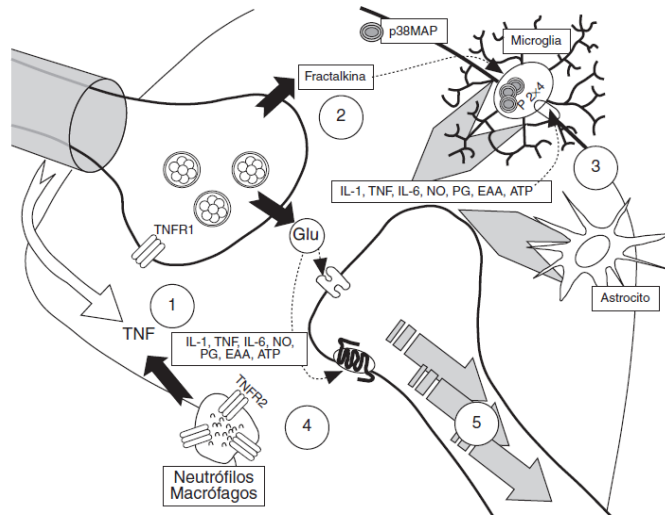


Figura 4. Participación de las células gliales en el mantenimiento del dolor neuropático. 1: liberación de TNF desde los neutrófilos y las células de Schwann; 2: liberación de quimiocinas; 3: activación glial y liberación de factores pronociceptivos; 4: activación de receptores de TNF en los macrófagos; 5: transmisión de la señal amplificada al sistema nervioso central. Las flechas blancas indican liberación y las punteadas, unión a receptor. Abreviaturas: IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral; NO: óxido nítrico; EAA: aminoácidos excitadores; ATP: adenosintrifosfato; PG: prostaglandina. Modificado de Martín y García, 2006.

MANEJO Y TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO

Debido a la gran cantidad de factores y a las diferentes vías que se ven involucradas en la generación y mantenimiento de los estados neuropáticos, es que se emplea una extensa variedad de agentes farmacológicos incluyendo antidepresivos, anticonvulsivos, opioides, agentes tópicos y otros para el tratamiento del dolor es inevitable. Sin embargo incluso con la actual generación de estos fármacos el alivio eficaz del dolor se logra en menos de la mitad de los pacientes con dolor neuropático crónico (Carter y Galer, 2001).

Aunque el dolor neuropático puede resultar de lesiones al sistema nervioso central, la mayoría de los estudios clínicos y preclínicos se han centrado en un reducido número de síndromes específicos del dolor neuropático periférico.

Tratamientos para el dolor neuropático

Como se ha mencionado anteriormente el dolor neuropático es causado por una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial (Finnerup et al., 2016; Jensen et al., 2011; Treede et al., 2008). El diagnóstico diferencial de las neuropatías es importante ya que evita la solicitud de exámenes complementarios que pueden resultar innecesarios. Es por eso que el diagnóstico debe estar basado en la historia clínica, en el examen físico, en cuestionarios específicos, pruebas de laboratorio que

utilizan instrumentos cuantitativos y en pruebas sensitivo-cuantitativos (O'Connor y Dworkin, 2009).

El tratamiento del dolor debe ser multimodal incluyendo técnicas farmacológicas y no farmacológicas. Sin embargo, las recomendaciones terapéuticas deben estar basadas en evidencias clínicas y fundamentadas por estudios clínicos controlados (Bennett et al., 2006; Bohlega et al., 2010; Chong y Bajwa, 2003; Dworkin, 2009; Dworkin et al., 2007; Finnerup et al., 2007, 2005; Fishman, 2012; Jensen et al., 2009; Jensen y Finnerup, 2009; McQuay et al., 1996; O'Connor y Dworkin, 2009; Pappagallo, 2003; Rowbotham et al., 1998; Smith y Sang, 2002), cumpliendo con los siguientes puntos:

- Diagnóstico preciso del dolor neuropático con la utilización de instrumentos;
- Identificación y tratamiento de otras enfermedades asociadas que pueden contribuir a las manifestaciones clínicas del dolor neuropático;
- Reconocimiento de otras morbilidades que, a menudo, complican la evolución clínica del dolor neuropático, como la depresión, la ansiedad y trastornos del sueño;
- Mejoría de la relación médico-paciente, aclarando sobre la enfermedad, expectativas de resultado y efectos colaterales;
- Orientación sobre las técnicas no farmacológicas, incluyendo la reducción del estrés, la mejoría del sueño y la terapia física;
- Comprensión de las diferencias en los efectos farmacodinámicos de los agentes;
- Evaluación de la influencia de la cultura (hábito de ejercicios, dieta, alcohol o cigarro) y de las posibles enfermedades asociadas (obesidad, enfermedad metabólica, insuficiencia renal o hepática), en los resultados del tratamiento.

En cuanto a la administración de medicamentos ésta siempre debe iniciarse por la vía oral con el cuidado de no asociar fármacos con el mismo mecanismo de acción. La elección del fármaco debe estar fundamentada en las características farmacocinéticas y farmacodinámicas teniendo en cuenta la experiencia clínica, los riesgos de los efectos colaterales, la dependencia física, el abuso o el riesgo relacionado a una dosis excesiva (Ballantyne et al., 2010; O'Connor y Dworkin, 2009). Además es importante evaluar las contraindicaciones en determinadas enfermedades o la posibilidad de que el agente sea también eficaz en el tratamiento de la depresión, la ansiedad o el

insomnio. Siendo necesario recordar los efectos colaterales, los riesgos de interacción medicamentosa y la cuestión costo-beneficio para el paciente (Bohlega et al., 2010). El tratamiento del dolor neuropático exige el uso de fármacos que reduzcan la hiperexcitabilidad neuronal a través de las siguientes acciones (Smith y Sang, 2002):

1. Bloqueo de los canales de sodio y de calcio;
2. Aumento de la transmisión GABAérgica;
3. Inhibición de la liberación del glutamato;
4. Inhibición de la formación del óxido nítrico;
5. Aumento de la acción serotoninérgica.

El tratamiento del dolor neuropático debe ser escalonado pero progresivo y debe reunir las siguientes características (Ballantyne et al., 2010):

1. Enfoque multidisciplinario.
2. Tratamiento cinesiterápico.
3. Apoyo psicológico.
4. Tratamiento farmacológico.
5. Técnicas especiales como TENS (estimulación eléctrica transcutánea o de neuromodulación, estimulación de cordones medulares posteriores o perfusión de fármacos por vía intratecal) o bloqueos anestésicos.

Los posibles fármacos que se pueden utilizar en el tratamiento del dolor neuropático son los siguientes (Attal, 2001; Caraceni et al., 1999; Eckhardt et al., 2000; Portenoy, 2000; Watson, 2000):

1. **ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS** Los más eficaces son los que inhiben la recaptación de serotonina y noradrenalina (amitriptilina y clomipramina).
2. **ANTIEPILÉPTICOS** Son útiles en el tratamiento del dolor neuropático que cursa con paroxismos y en general en todos los cuadros del dolor. Tanto con los antidepresivos como con los antiepilépticos el tratamiento debe iniciar con dosis bajas y aumentar gradualmente. La dosis de antidepresivos para el tratamiento del dolor neuropático es menor que para el tratamiento de la depresión, mientras que la dosis de antiepilépticos es mayor que para el tratamiento de la epilepsia (ejemplo la gabapentina).
3. **ANALGÉSICOS**
 - a. AINEs

- b. Opioides
- 4. OTROS FÁRMACOS
 - a. Lidocaína I.V.
 - b. Mexiletina
 - c. Baclofen
 - d. Capsidol
 - e. Clonidina
 - f. Adenosina
- 5. Bloqueadores de los receptores NMDA
 - a. Ketamina

Plantas medicinales

Por otra parte, el empleo de las plantas medicinales o sus extractos con fines terapéuticos es una práctica clínica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales (Lovkova et al., 2001; Silva y Fernandes Júnior, 2010). Durante mucho tiempo los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que se disponía para un tratamiento (Huie, 2002). Las plantas medicinales son todas aquellas especies de origen vegetal que contienen en alguno de sus órganos principios activos o metabolitos los cuales al ser administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en las enfermedades que sufren los humanos o los animales (Silva y Fernandes Júnior, 2010). Los metabolitos que contienen las plantas medicinales pueden interaccionar con otros compuestos bien sean de otras plantas o inclusive fármacos. Los principios activos de las plantas pueden ser variados (como alcaloides, lípidos, gomas, mucilagos, taninos, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, etc.) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.) (Rivera y Ojeda, 2010).

Desde hace algunos años tanto países desarrollados como subdesarrollados han retomado el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos, movimiento al cual se le ha llamado la *Revolución Verde de la Medicina* (Huie, 2002; Silva y Fernandes Júnior, 2010). En el caso del dolor el uso cada vez más extendido de las plantas medicinales así como de sus preparados ha ido aumentando dado que es una alternativa al tratamiento farmacológico que puede llegar a generar efectos adversos (Siñani, 2009; Vicet Muro, 2009).

Manguiferina

Un ejemplo de lo anterior es el extracto obtenido de la corteza del árbol de mango (*Mangifera indica* L.) el cual es empleado como un remedio tradicional contra el dolor e inflamación (Núñez-Sellés et al., 2007). En Cuba, el Vimang® es la marca comercial del extracto acuoso y es usado para producir tabletas y cremas. Ambos productos presentan una actividad protectora para el paciente y están registrados como un fitofármaco, suplemento alimenticio o como un cosmético (Bhatia et al., 2008; Garrido-Suárez et al., 2010).

El extracto acuoso de la *Mangifera indica* L. se compone de una mezcla de polifenoles que incluyen ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido benzoico), ésteres fenólicos (galato de metilo, galato de propilo y benzoato de propilo), flavan-3-oles (catequina y epicatequina) y xantonas como la manguiferina (Figura 5). Este último compuesto es el componente más abundante del extracto (7.5%) (Núñez-Sellés et al., 2007). El extracto acuoso Vimang® ha demostrado tener múltiples efectos farmacológicos tales como: antioxidante (Leiro et al., 2003; Pauletti et al., 2003; Pinto et al., 2005; Sato et al., 1992), antivirales (Wang et al., 2011), antialérgicos (Lee et al., 2009), hepatoprotectores (Das et al., 2012), antidiabéticos (Ichiki et al., 1998), inmunomoduladores (Leiro et al., 2003), antiinflamatorios (Dar et al., 2005; Márquez et al., 2012) y antinociceptivos (Garrido et al., 2001; Garrido-Suárez et al., 2014b, 2010).

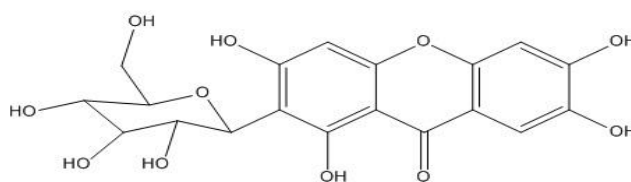


Figura 5. Estructura química de la manguiferina.

Estos efectos pueden ser el resultado de las acciones ejercidas por los diferentes tipos de polifenoles que están incluidos dentro del extracto (Garrido-Suárez et al., 2010).

Un ejemplo de lo anterior es que en estudios previos queda demostrado que el extracto alcohólico de las semillas del mango presenta actividad antiinflamatoria equivalente al producido por fármacos como el naproxeno sódico y la indometacina,

en la prueba de carragenina (Garrido et al., 2001). A su vez este extracto demostró ejercer una actividad inhibitoria frente a inductores de inflamación como el dextrán y la bradicinina (Pardo-Andreu et al., 2008). Además en modelos subagudos de inflamación en animales se pudo constatar una apreciable actividad antiinflamatoria de este compuesto en la prueba de granuloma de algodón (debido a la actividad antiquinina) (Dar et al., 2005). El extracto acuoso también redujo la nocicepción inducida por ácido acético (Garrido-Suárez et al., 2010; Ojewole, 2005) y formalina (Garrido-Suárez et al., 2010) en ratones. Además el extracto aumentó el tiempo de latencia en el ensayo de la placa caliente (Ojewole, 2005).

La manguiferina ya aislada del extracto acuoso posee por si misma una amplia variedad de actividades farmacológicas (Tabla 1) incluyendo: actividad antioxidante (Sánchez et al., 2000), antiinflamatoria (Morais et al., 2015), anti-NAFLD (enfermedad de hígado graso no alcohólico, por sus siglas en inglés) (Lim et al., 2014; Niu et al., 2012) antidiabético (Apontes et al., 2014; Miura et al., 2001), anti-CVD (enfermedad cardiovascular) (Muruganandan et al., 2002), anti-cáncer (Li et al., 2013; Rajendran et al., 2008), anti-VIH (García et al., 2003; Muruganandan et al., 2005; Wang et al., 2011), antinociceptiva (Garrido et al., 2001; Garrido-Suárez et al., 2014b, 2010), entre otras tantas actividades.

Tabla 1. Efectos farmacológicos de la manguiferina

Efecto farmacológico	Animal	Vía de administración	Referencias
Antidepresivo	Ratón	p.o.	(Jangra et al., 2014)
Ansiolítico	Rata	p.o.	(Sethiya et al., 2010)
Antiamnésico	Rata	p.o.	(Sethiya y Mishra, 2014)
Antioxidante	Ratón	p.o.	(Sánchez et al., 2000)
Antiinflamatorio	Rata, Ratón	p.o., p, e i.t.	(Morais et al., 2015)
Mejoramiento de la respuesta inmune	Rata, Ratón	p.o. e i.p.	(García et al., 2003; Muruganandan et al., 2005)
Anti-NAFLD	Rata, Ratón, Hámster	p.o.	(Lim et al., 2014; Niu et al., 2012)
Antidiabético	Ratón	p.o.	(Apontes et al., 2014; Miura et al., 2001)
Protector de células β	Ratón	p.o.	(Wang et al., 2014)
Neuropatía diabética	Rata	p.o.	(Pal et al., 2014)

Tabla 1. Efectos farmacológicos de la manguiferina (Continuación)

Anticardiotoxicidad	Rata	p.o.	(Arozal et al., 2015)
Anti-CVD	Rata	i.p.	(Muruganandan et al., 2002)
Antitumoral	Ratón	i.p. e i.m.	(Guha et al., 1996)
Anticancerígeno	Ratón	p.o.	(Li et al., 2013; Rajendran et al., 2008, 2008)

Abreviaciones: i.p., intraperitoneal; i.m., intramuscular; i.t., intratecal; p, periférico; o, oral; NAFLD, enfermedad de hígado graso no alcohólico; CVD, enfermedad cardiovascular

Las propiedades antioxidantes de la manguiferina, se deben a que estructuralmente posee un residuo de tipo catecol el cual permite que se formen complejos manguiferina-Fe²⁺/Fe³⁺ estables previniendo así las reacciones de tipo Fenton y por ende las correspondientes reacciones de peroxidación de lípidos (Andreu et al., 2005). La manguiferina también es capaz de captar especies reactivas de oxígeno (Leiro et al., 2003), inhibiendo los procesos antes mencionados, lo que lleva a la disminución de la carga energética y protege contra la pérdida del potencial disminuyendo así un posible proceso inflamatorio en la membrana de la mitocondria (Masibo y He, 2008; Pardo Andreu et al., 2005). Por otra parte, la manguiferina también ayuda a mantener el equilibrio del sistema entre las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión (Rajendran et al., 2008).

Estudios *in vitro* demuestran que la manguiferina previene la degradación del inhibidor de kappa B (IκB) inducida por el TNF-α y la unión del Factor Nuclear de κB (NF-κB) al Ácido Desoxirribonucleico (ADN), que induce la transcripción de genes implicados en la expresión de mediadores y enzimas involucradas en la inflamación, el dolor, el estrés oxidativo y la plasticidad sináptica (Garrido et al., 2004; Leiro et al., 2004).

Además, una contribución decisiva para el efecto antiinflamatorio que pudiera tener tanto el extracto de mango como la manguiferina es el efecto modulador que tienen sobre las citosinas pro-inflamatorias, como el TNF-α, la interleucina 1 beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), moléculas de adhesión (ICAM-1), quimiotaxis, proliferación de células T y sobre el Factor Nuclear-κB (NF-κB) (Campos-Esparza et al., 2009; Garrido et al., 2004; Gottlieb et al., 2006). Además la manguiferina inhibe la activación de la enzima inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la secreción de fosfolipasa A2 (PLA2) y la cascada

activadora del ácido araquidónico que resulta en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) y Leucotrieno B4 (LTB4) (Bhatia et al., 2008).

La reducción de la expresión de genes relacionados con la inflamación, por medio de la inhibición de la translocación del NF-kB podría ser el principal efecto antiinflamatorio de este compuesto (Leiro et al., 2004).

También estudios recientes demuestran que la administración periférica, intratecal y oral de manguiferina disminuye de manera dosis-dependiente la nocicepción inducida por formalina (Izquierdo et al., 2013). Mientras que el efecto antinociceptivo de la manguiferina es similar al inducido con diclofenaco después de la administración oral y periférica (Izquierdo et al., 2013). Así mismo, la manguiferina es capaz de reducir las conductas antinociceptivas agudas inducidas con serotonina o capsaicina (Izquierdo et al., 2013). Por otra parte, el efecto antinociceptivo periférico de la manguiferina en la prueba de la formalina es bloqueado por naloxona, naltrindol, 5-guanidinnaltrindol, N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) y H-(1,2,4)-oxidiazol[4,2-a]quinoxalin-1-onea (ODQ), pero no por metiotepina. Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo inducido por manguiferina es mediado por el sistema opioidérgico periférico involucrando la activación de receptores δ , K y probablemente μ , pero no por receptores serotoninérgicos periféricos. Los datos también sugieren que la manguiferina activa la vía de NO-GMPc- canales de K⁺ sensibles a ATP y en consecuencia ésta pueda producir su efecto antinociceptivo periférico en la prueba de la formalina (Izquierdo et al., 2013).

En adición a estos efectos farmacológicos también se ha demostrado que la manguiferina que puede actuar a nivel del sistema nervioso central (Bhattacharya et al., 1972; Jangra et al., 2014). En cultivos de neuronas (línea celular de neuroblastoma, Neuro-A2) ha demostrado que la manguiferina tiene un efecto protector en la prueba de neurotoxicidad inducida por β -amiloides (Sethiya y Mishra, 2014). Estos efectos protectores de la manguiferina pueden ser atribuidos a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos por la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, respectivamente (Bhatia et al., 2008; Sethiya y Mishra, 2014). Es por eso que resulta de gran importancia dilucidar las posibles vías o receptores por los cuales la manguiferina presenta sus efectos a nivel central.

Muchos de los efectos farmacológicos de la manguiferina pueden deberse en parte a su vía de administración, en animales este compuesto se ha administrado por diferentes vías tales como: intravenosa (i.v.) (Hou et al., 2010), intragástrica (i.g.) (Liu et al., 2010) y oral (Liu et al., 2012), estas vías de administración resultan en una alta o baja biodisponibilidad. En vía oral, por ejemplo, la manguiferina presenta una baja biodisponibilidad (1.2%) (Han et al., 2010; Hou et al., 2012; Ma et al., 2014), esto debido principalmente a que la manguiferina es poco soluble en solventes acuosos y orgánicos debido a sus características anfipáticas (Ma et al., 2014).

Además, la vía por la cual sea administrada la manguiferina influye en el posible metabolismo que pueda sufrir, por ejemplo los C-glucósidos como la manguiferina, son bastante resistentes a las hidrólisis ácidas, alcalinas y enzimáticas en comparación con los O-glucósidos (Sanugul et al., 2005). Aunque la manguiferina puede ser biotransformada en el intestino hacia un metabolito secundario conocido como noratiriol (Sanugul et al., 2005). Hasta el momento no está claro qué componente(s) específico(s) de la manguiferina son los que llevan a cabo directamente las bioactividades observadas (Liu et al., 2012). Es posible que algunos de los metabolitos sean biológicamente activos, lo que podría explicar por qué la manguiferina es capaz de modular múltiples vías de señalización y posiblemente interactuar con múltiples dianas moleculares (Hsu et al., 2004).

Por otra parte en cuanto a la toxicidad de la manguiferina, ésta es bastante segura en cantidades pequeñas para los seres humanos, esto puede deberse a que la manguiferina está contenida en el fruto del árbol del mango, fruto que es ampliamente consumido por los humanos y que presenta beneficios para la salud humana (Kim et al., 2009; McLendon et al., 2013). Muestra de esto es que los extractos de mango han sido probados en seres humanos y han demostrado ser no sólo seguros sino también beneficiosos ya que reducen el peso corporal en sujetos con sobrepeso y obesidad (McLendon et al., 2013). La manguiferina aislada también ha sido probada en seres humanos, donde la administración por vía oral de 0.9 g de manguiferina en adultos no fue capaz de causar efectos secundarios observables (Hou et al., 2012), por lo que la manguiferina podría ser una opción viable y segura para el tratamiento del dolor de tipo neuropático, aunque faltan realizar más estudios que respalden esta afirmación.

MARCO TEÓRICO

ESPECIES REACTIVAS, VÍAS Y RECEPTORES IMPLICADOS EN EL DOLOR

Especies reactivas

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante preservando así el equilibrio entre la producción de especies pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo (Beckman y Ames, 1998; Ghadge et al., 1997; Gutteridge y Halliwell, 1992; Harman, 2002), caracterizado por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular. Esto ocurre en patologías degenerativas de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, etc (Limongi y Baldelli, 2016; Twining et al., 2004).

La alteración del balance entre especies pro-oxidantes y antioxidantes puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidativo leve las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo crónico se llega a graves alteraciones en el metabolismo celular como ruptura de la cadena de ADN, aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartmentalización de iones catalíticos de Fe^{+2} y Cu^{+2} , daño a canales iónicos, así como a otras proteínas específicas y peroxidación de lípidos. El daño por estrés oxidativo puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican a los sistemas antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 1992).

Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ERO), hierro (ERH), cobre (ERC), así como a las de nitrógeno (ERN) (Colton y Gilbert, 2007). Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres y aunque no todas son radicales libres son moléculas oxidantes rápidamente que se transforman en radicales libres, lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (Colton y Gilbert, 2007).

Estas especies reactivas dañan tanto al ADN como a las proteínas transportadoras. Las ERC a través de proteínas detectoras específicas de oxidación (como oxyR),

pueden alterar la expresión genética; asimismo, causan daño en las enzimas reparadoras y a las polimerasas por lo que existen una mayor cantidad de errores en la codificación de los genes. Aunado a esto los productos finales de la lipoperoxidación provocan daño a las proteínas y al ADN. El radical hidroxilo por ejemplo, ataca las bases del ADN este daño sumado al de los productos derivados del $\bullet\text{NO}$ (HNO_2 y ONOO^-) (Zhang et al., 1993), los cuales provocan nitración y desaminación (en adenina, guanina y citosina), ocasiona alteraciones en la codificación y transcripción del material genético.

Señalización de las especies reactivas

El término “señalización de especies reactivas” se utiliza para describir a las funciones reguladas por señales oxidativas que inducen respuestas protectoras contra el daño oxidativo. Muchas de las respuestas mediadas por las ERO protegen a las células contra el estrés oxidativo y restablecen la homeostasis redox. Se ha encontrado que niveles bajos de ERO estimulan la proliferación celular mientras que niveles más altos tienen una acción inhibitoria. Las ERO tienen una participación fundamental en la regulación del sistema inmune (Chiueh, 1994; Finkel, 1998). Mientras que altas concentraciones de ERO pueden resultar en un daño oxidativo masivo e indiscriminado; es posible que bajas concentraciones de ERO sean suficientes para activar genes específicos. También las ERO pueden activar al factor de transcripción nuclear κB (NF- κB). Este factor juega un papel fundamental en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria; por ejemplo, muchas citocinas pro-inflamatorias, quimocinas, moléculas de adhesión celular, factores estimulantes de colonias y enzimas inflamatorias son producto de genes regulados por NF- κB .

Las ERO tienen un papel muy importante en la comunicación célula-célula ya que actúan como mensajeros celulares, activan la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en el músculo liso, a la adenilato ciclasa y también activan a las proteínas reguladoras de Fe^{2+} (transferrina, ceruloplasmina, hemosiderina y ferritina). La regulación redox de la expresión génica se da a través de OxyR (un activador de la transcripción inducida por peróxido de hidrógeno). La presencia de peróxido de hidrógeno, radiaciones ultravioletas y otras condiciones durante las cuales hay estrés oxidativo, induce la expresión de la oxidorreductasa

tioredoxena (Trx). La Trx junto con el sistema de glutatión se ocupa de mantener un estado intracelular reducido (Finkel, 1998).

Daño oxidativo

Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. Este daño oxidativo es común en las enfermedades neurodegenerativas y aún no está claro si contribuye iniciando el proceso o es una consecuencia del mismo (McCord, 2000).

La formación de lípidos modificados por oxidación puede causar disfunción celular y muerte en células posmitóticas como las neuronas. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares inicia un deterioro acumulativo de las funciones membranales y provoca disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad de la membrana (McCord, 2000).

La oxidación causa alteraciones en la estructura de algunas proteínas y la formación de agregados proteínicos. Estas proteínas anormales inducen daño oxidativo y están presentes en las enfermedades neurodegenerativas (Harman, 2002; Poli, 2000). Un ejemplo de lo anterior es la enfermedad de Alzheimer en la cual los β -amiloides pueden estimular la oxidación a través de múltiples vías actuando sobre el receptor p75 o al receptor a productos de glicosilación avanzada (RAGE), lo que provoca una entrada masiva de Ca^{2+} y la activación de caspasas que llevan a la muerte celular.

Aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular

La producción aumentada de ERO y un aumento sostenido de Ca^{2+} intracelular son componentes muy importantes en varios tipos de neuropatologías. Un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular activa la liberación de neurotransmisores pero cuando este aumento se mantiene por más tiempo también se activan proteasas, lipasas y endonucleasas. La activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} puede dañar al citoesqueleto y a las proteínas de membrana. La activación de las lipasas cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, (la PLA2 al ser activada actúa sobre los fosfolípidos de membrana promoviendo la liberación de ácido araquidónico, cuyos metabolitos son de considerable importancia como mediadores del daño oxidativo en varios trastornos clínicos). Además la activación de las endonucleasas

dependientes de Ca^{2+} provoca la fragmentación del ADN el cual es un evento importante en la apoptosis (Gutteridge y Halliwell, 1992). El aumento intracelular de Ca^{2+} también estimula la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO), así como la activación de la NOS dependiente de calmodulina. La entrada masiva de Ca^{2+} a la mitocondria hace que se forme el poro de transición en la membrana mitocondrial interna (MTP), llevando a un colapso en el potencial electroquímico de protones lo que provoca una disminución en los niveles de ATP y un aumento en las especies de oxígeno parcialmente reducidas. La disminución en la producción de ATP resulta en una despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más Ca^{2+} a través de varios canales iónicos creando un círculo vicioso que lleva a la pérdida de la función neuronal y muerte de la célula (Olanow, 1992).

Procesos inflamatorios

A nivel neuronal las células de la microglia son células inmunoefectoras que se activan por daño o por cambios en el microambiente. Con frecuencia la microglia se activa antes de que ocurran daños detectables en otros tipos de células. Los neurotransmisores pueden actuar como moléculas activadoras en la microglia. Al ser activada la microglia esta libera una serie de productos citotóxicos que provocan daño y muerte neuronal: ERO como H_2O_2 , $\bullet\text{NO}$ (particularmente cuando se estimula con interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) y factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$)), proteínas como catepsina B/L, activador de plasminógeno tipo urocinasa, interleucinas (como IL-1), glutamato y aspartato (aminoácidos excitatorios) y proteína precursora de amiloides (APP). El $\bullet\text{NO}$ producido por la glía activada o por los astrocitos en respuesta a ERO actúa como mediador en la neurodegeneración y activa procesos inflamatorios.

El aumento excesivo de NO y ERO inhibe la respiración mitocondrial en las neuronas que están alrededor provocando la liberación de glutamato (a través del transportador de glutamato GluT) proveniente de las neuronas (y de los astrocitos en menor medida) estimulando a los receptores NMDA (NMDA_R). La activación de estos receptores dispara la entrada masiva de Ca^{2+} a las neuronas llevando a las células a muerte necrótica o apoptótica (Simonian y Coyle, 1996).

MODULACIÓN DEL DOLOR

VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO-GMP CÍCLICO-CANALES DE POTASIO SENSIBLES A ATP

Óxido Nítrico (NO)

El NO es un radical libre sin carga que ha demostrado estar envuelto en la formación de diversos procesos fisiológicos como son: la relajación del músculo liso, neurotransmisión, agregación plaquetaria y mecanismos de defensa del organismo (Nathan, 1992; Rapoport y Murad, 1983; Walter, 1989; Zhao et al., 2000). Sumado a esto se cree que el NO juega un papel en la patología de diversos estados de enfermedades inflamatorias como son artritis, miocarditis, colitis, nefritis y otras condiciones patológicas como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Davis et al., 2001; Hanafy et al., 2001). Los efectos de NO pueden ser organizados en 2 grandes ramas:

- 1) Los dependientes de 3',5'-guanosin monofostato cíclico (GMPc), el cual involucra la producción del segundo mensajero GMPc por parte de la guanilato ciclasa soluble (sGC); y
- 2) Las independientes de GMPc, este tipo de señalización es mediada por especies reactivas de nitrógeno que se producen como resultado de la interacción de NO con oxígeno (O_2) o radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Davis et al., 2001).

Por otra parte, existen tres isoformas de la enzima que produce el NO mejor conocida como Óxido Nítrico Sintasa (NOS). Cada isoforma es derivada de genes específicos. La NOS-1 también conocida como NOS neuronal (NOSn), se encuentra en grandes cantidades en células neuronales, así como en algunos tejidos no neuronales. Esta isoforma es activada por calmodulina en condiciones donde la concentración de calcio es elevado produciendo NO el cual actúa como neurotransmisor (Bredt y Snyder, 1992; Schmidt y Walter, 1994). La NOS-2 mejor conocida como de macrófago o inducible (NOSi) ya que puede ser inducida en una gran variedad de células incluyendo macrófagos, hepatocitos, células del músculo liso entre otras. Cuando las células están en reposo esta enzima generalmente no está presente y se activa cuando se produce una respuesta a lipopolisacárido (LPS), así como por la estimulación de citocinas como un mecanismo de respuesta citotóxica. La NOS-2 es

la única isoforma que es independiente de calcio (Nathan, 1992; Nathan y Xie, 1994). Mientras que la NOS-3 también llamada endotelial (NOSe), es producida como un factor relajante derivado del endotelio. Ésta isoforma también es dependiente de calcio (Nathan, 1992; Pollock et al., 1991). Las NOS necesitan de cierto periodo de tiempo (horas) para manifestarse. La actividad de las NOS perdura durante un periodo de tiempo largo (horas/días) después de su inducción para después comenzar a declinar. Un factor importante en esta reducción de actividad es el *feed-back* negativo irreversible sobre la enzima, éste es producido por el mismo NO (Flórez et al., 1998).

El NO solo puede reaccionar con otras sustancias o compuestos que tengan electrones desapareados (Beckman y Koppenol, 1996), como lo es la interacción con complejos metálicos, oxígeno o radicales superóxido que dan lugar a diferentes efectos y eventos posteriores en función de la localización, cantidad de NO y de sustratos disponibles. Bajo condiciones biológicas normales el NO está presente en concentraciones relativamente bajas (<1 μM) y probablemente menos cuando interactúa con los grupos hemo presentes en las proteínas como es con la GCs, la hemoglobina, el citocromo P450, o la Protoporfirina IX (Davis et al., 2001). La interacción de NO con la GCs es de suma importancia ya que esta enzima parece ser uno de los principales blancos para el NO. Esta enzima al ser activada promueve la transformación de GTP a GMPc iniciando así varios mecanismos de acción involucrados en el procesamiento del dolor (Denninger y Marletta, 1999).

Guanosín Monofosfato Cíclico (GMPc)

El guanosín monofosfato cíclico o GMPc fue descubierto en la orina, no mucho tiempo después del descubrimiento del AMPc (Ashman et al., 1963). Después de su descubrimiento, éste fue localizado en una gran variedad de células y tejidos (Hardman y Sutherland, 1969) y ahora es conocido como un segundo mensajero que participa o regula una gran cantidad de cascadas de señalización como son: la activación de proteínas quinasas, canales iónicos y fosfodiesterasas (Denninger y Marletta, 1999; Feil y Kleppisch, 2008; Poulos, 2006).

El GMPc es sintetizado por una familia de enzimas conocidas como guanilato ciclasas que comparten algunos aminoácidos de secuencia idéntica en la región catalítica a las adenilato ciclasa (Krupinski et al., 1989; Thorpe y Garbers, 1989). Existen dos tipos de guanilato ciclasa las cuales generan GMPc a partir del GTP intracelular:

- 1) La particulada o membranal: Las guanilato ciclasas particuladas o GCp son moléculas receptoras acopladas a la membrana que son activadas después de que el ligando se una a su dominio extracelular; se conocen 7 isoformas de este tipo de guanilato ciclasa que van desde la GCpA hasta la GCpG (Mann et al., 1997; Schulz et al., 1997), y
- 2) La soluble: La guanilato ciclasa soluble o GCs es una hemoproteína citosólica generadora de GMPc que tiene un receptor para el NO, donde las subunidades α y β constituyen la porción catalítica de la enzima (Kimura et al., 1975).

Por otro lado, la elucidación de los mecanismos de acción del GMPc en los sistemas nociceptivos han sido complicados, por dos factores:

1. Participa en la activación de proteínas cinasas (PKG), activación de canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CGN), modulación de canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) y en la activación de fosfodiesterasas (PDE) (Craven y Zagotta, 2006; Feil y Kleppisch, 2008), y
2. La producción del GMPc no solo depende de la NO-GCs sino que también puede ser producido independiente de NO por las GC particuladas, las cuales se activan en respuesta a la estimulación de péptidos natriuréticos (Garbers et al., 2006). En este trabajo nos centraremos en los mecanismos dependientes de NO, más específicamente en la vía NO-GMPc-canales de K^+ .

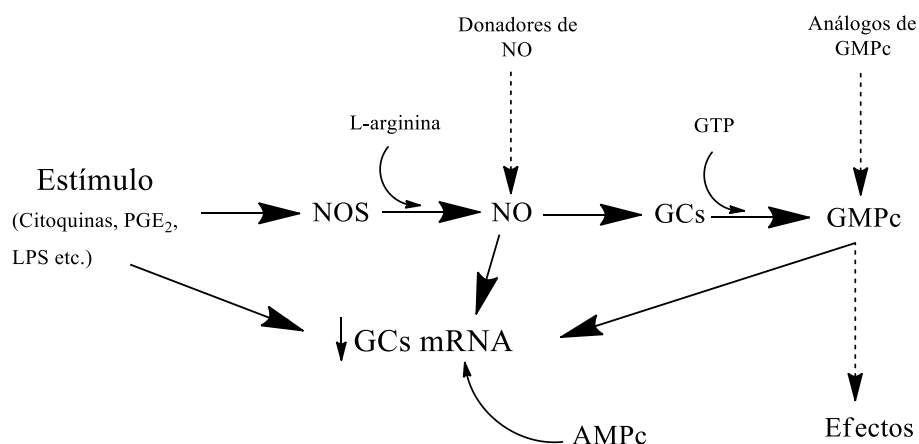


Figura 6. Mecanismo de producción y regulación de la expresión de guanilato ciclasa soluble. Abreviaturas: NOS, óxido nítrico sintetasa; NO, óxido nítrico; GCs, Guanilato ciclasa soluble; GTP, guanosín trifosfato; GMP, guanosín monofosfato cíclico; AMPc, adenosín monofosfato cíclico.

Canales de potasio

Los canales de potasio (K^+) son una extensa familia de proteínas integrales de membrana los cuales forman poros por donde es capaz de fluir el K^+ del espacio extracelular al intracelular y viceversa. Entre todos los tipos de canales iónicos estos son los únicos que se encuentran en todos los tipos de células de los organismos, a excepción de algunos tipos de parásitos (Kuo et al., 2005), debido a que estos canales participan en un amplio rango de funciones biológicas (Edwards y Weston, 1993; Goldstein et al., 2005; Gutman et al., 2005; Kubo et al., 2005). En muchas células estos canales juegan un papel esencial en el mantenimiento y estabilización del potencial de membrana mientras esta en reposo. La apertura de los canales de K^+ puede ocurrir por un amplio rango de señales y conduce casi universalmente a la salida de K^+ de la célula causando que el potencial de membrana comience a ser más negativo. En nervios y células musculares esta habilidad de repolarizar o hiperpolarizar la membrana ayuda en el control de la frecuencia y duración de los potenciales de acción mientras que otras funciones incluyen la regulación en la liberación de los neurotransmisores, la secreción de hormonas, la homeostasis del potasio en el organismo, el transporte electrolítico epitelial, la proliferación celular, la apoptosis y el crecimiento tumoral (Ashcroft, 2005; Jan y Jan, 2012; Stühmer et al., 2006; Wickenden, 2002).

Los canales de K^+ están formados por hélices transmembranales que forman un poro a través de la bicapa lipídica de la membrana celular. Estos canales pueden ser divididos en dos partes:

- a. El dominio formado por el poro. Este dominio es el responsable del transporte de los iones de K^+ y es estructuralmente similar en todos los tipos de canales de K^+ (Enyedi y Czirják, 2010; Hibino et al., 2010; Pongs y Schwarz, 2010; Zhang y Yan, 2014).
- b. El dominio regulador. Este dominio responde a una variedad diversa de estímulos y es diferente entre todos los tipos de canales de K^+ conocidos (Enyedi y Czirják, 2010; Hibino et al., 2010; Pongs y Schwarz, 2010; Zhang y Yan, 2014).

Como se ha mencionado, los canales de potasio están formados generalmente por la asociación de cuatro subunidades α que forman el poro del canal y de subunidades accesorias que son moduladoras. Gracias a estas últimas los canales de potasio pueden ser divididos estructuralmente en:

- 1. Canales de potasio de rectificación entrante (K_{ir} por sus siglas en inglés, **Inwardly Rectifying K^+ channels**).** En términos de estructura la familia de los K_{ir} son los canales de K^+ más simples donde cada subunidad está formada por solo 2 dominios transmembranales, separados por el dominio formador del poro. Estas subunidades tetraméricas forman la parte funcional de los canales K_{ir} (Bichet et al., 2003) (Figura 7a). Esta familia consiste en los canales de K^+ altamente rectificadores ($K_{ir2.x}$), los canales de K^+ de rectificación interna activados por proteína G ($K_{ir3.x}$) y los canales de K^+ sensibles a ATP ($K_{ir6.x}$ que están acompañados por una subunidad reguladora con receptor a sulfonilureas o SUR1), estos últimos son los canales de K^+ que pueden ser localizados en el SNC, específicamente el canal de K^+ $K_{ir6.2}$ (Kubo et al., 2005; Zawar et al., 1999; Zawar y Neumcke, 2000). Funcionalmente, todos los miembros de esta familia poseen un rango de rectificación interna, con una conductancia asimétrica de K^+ característica, es decir, transportan más fácilmente el K^+ del exterior al interior que del interior al exterior de la membrana (Lopatin et al., 1994; Matsuda et al., 1987). Estos tienden a ser activos alrededor del potencial de equilibrio del K^+ ($E_K = -100mV$), ayudando así a establecer y mantener el potencial de membrana en reposo; pero se cierran en presencia de una despolarización larga con el fin de no oponerse a la excitación de la membrana (Ashcroft, 2005; Hibino et al., 2010).
- 2. Canales de K^+ de doble poro (**Two-P K^+ channels**).** Conocidos también como canales “tándem” o “con poros gemelos” (K_{2P}). Estos tienen 4 dominios transmembranales, con 2 dominios formadores de poro por subunidad. La parte funcional del canal está formada probablemente por un dímero (Figura 7b). Entre los miembros de esta familia se encuentran los canales: TWIK ($K_{2P1.1}$), TREK ($K_{2P2.1}$), TASK ($K_{2P3.1}$), THIK ($K_{2P13.1}$), TALK ($K_{2P16.1}$) y TRESK ($K_{2P18.1}$) y constituyen una “pérdida” en la conductancia del K^+ (Enyedi y Czirják, 2010). Estos canales son regulados por varios estímulos como pueden ser: pH, presión parcial de O_2 , ensanchamiento de la membrana, temperatura,

proteínas G, ácidos grasos y por la inhalación de anestésicos (Bittner et al., 2010; Goldstein et al., 2005; Goonetilleke y Quayle, 2012).

- 3. Canales de K⁺ dependientes de voltaje o de apertura por voltaje (Voltage-gated K⁺ channels).** Estos incluyen varias subfamilias muy importantes, como son los canales de K⁺ Shaker, Shab, Shaw y los relacionados a Shal (K_v1.x, 2.x, 3.x y 4.x, respectivamente), los canales KCNQ (K_v7.x) y los canales eag, erg y elk (K_v 10.x, 11.x y 12.x, respectivamente). Estos canales poseen 6 dominios transmembranales por subunidad, con un sensor de voltaje localizado sobre 4 segmentos transmembranales (S4), que les permite detectar y abrir el poro como respuesta a una despolarización de la membrana (Bezanilla, 2000; Gutman et al., 2005; Long et al., 2005) (Figura 7c). Es por eso, que este tipo de canales tiene un papel importante en la repolarización de las membranas en neuronas y en las células musculares, controlando así, la frecuencia y duración de los potenciales de acción.
- 4. Canales de K⁺ activados por Ca²⁺.** Este tipo de canal comparte una estructura similar a los canales de K⁺ dependientes de voltaje, pero con la diferencia que estos poseen un dominio extra transmembranal, llamado S0, involucrado en la regulación por subunidades β (Figura 7d). Esta familia consiste en los canales activados por Ca²⁺: los Slo (BK) (K_{Ca}1.x, 4.x y 5.x), los SK (K_{Ca}2.x) y los IK (K_{Ca}3.x). Estos canales no son sólo regulados por voltaje, sino también por Ca²⁺ intracelular; los canales BK_{Ca} poseen un “depósito para Ca²⁺” en la porción C-terminal, mientras que los canales SK/IK_{Ca} son regulados por el Ca²⁺ unido a la calmodulina (Bao et al., 2004; Maylie et al., 2004; Tempel et al., 1987; Wei et al., 2005).

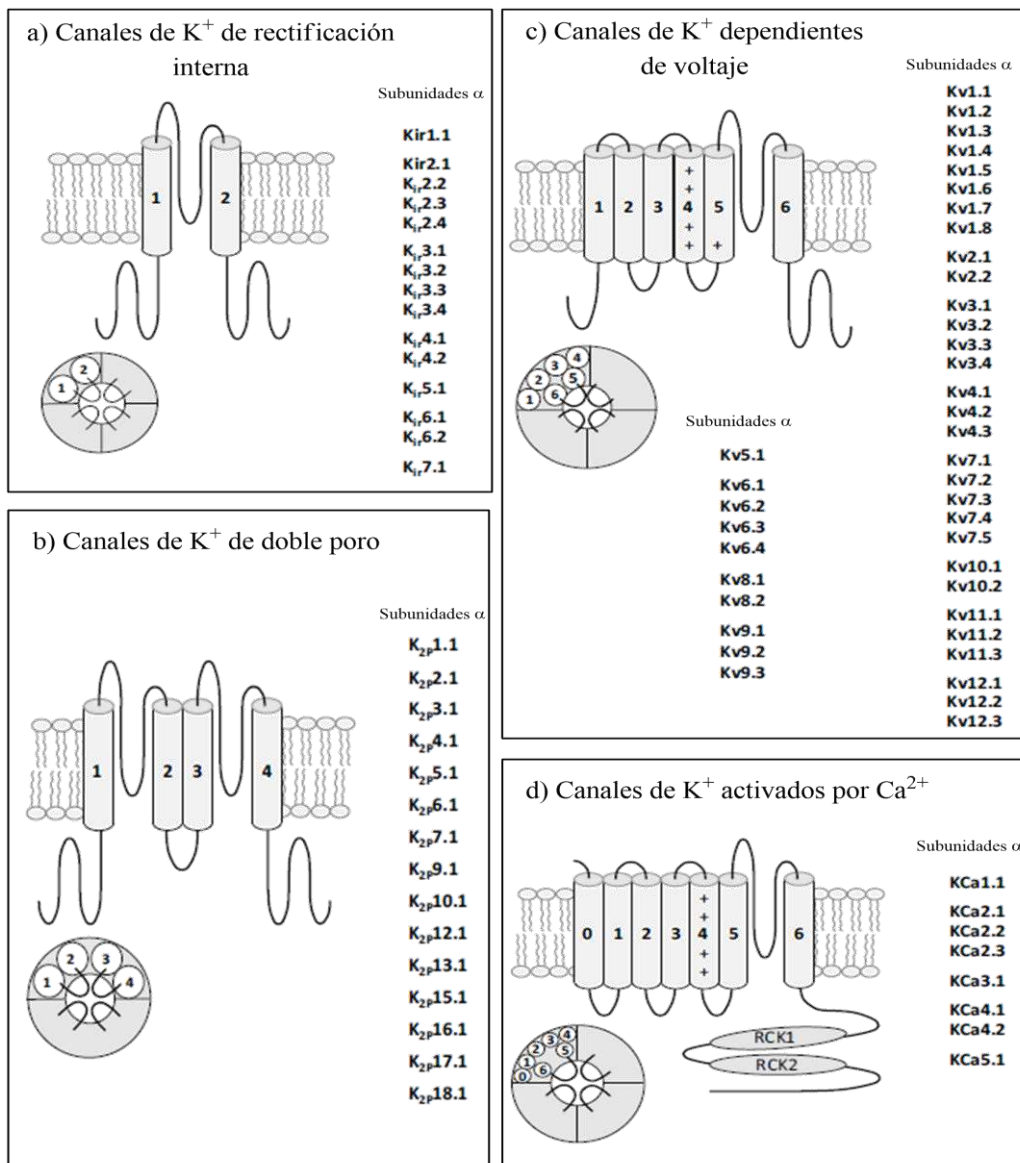


Figura 7. Estructura esquemática de las cuatro clases principales de canales de K⁺ descritas por la Unión Internacional de Farmacología. RC, regulador de la conductancia de K⁺.

Los diferentes tipos de canales de K⁺ pueden ser encontrados en varios tipos de tejidos y células siendo un componente crítico en el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo (Kuang et al., 2015). Al ser los canales de K⁺ dependientes de ATP de interés de este trabajo serán los que a continuación abordaremos.

Los canales de K⁺ sensibles a ATP (K_{ATP}) pueden ser encontrados en una amplia variedad de células excitables tales como miocitos cardiacos, células secretoras de hormonas, en el músculos liso y esquelético así como en neuronas (Seino, 1999). A pesar de que los canales de K⁺ sensibles a ATP están funcionalmente expresados en varios núcleos del cerebro y del SNC tales como corteza cerebral (Luhmann y

Heinemann, 1992; Ohno-Shosaku y Yamamoto, 1992), hipocampo (Fujimura et al., 1997; Grigg y Anderson, 1989; Matsumoto et al., 2002), hipotálamo (Miki et al., 2001), ganglio basal (Liss et al., 1999; Schwanstecher y Panten, 1993; Stanford y Lacey, 1996; Watts et al., 1995; Yamada et al., 2001), prosencéfalo (Allen y Brown, 2004), tallo cerebral (Jiang y Haddad, 1991).

Como se ha mencionado antes los canales Kir6.2 son el tipo de canales de K⁺ sensibles a ATP que se expresan en la red neuronal. Estos canales responden a las fluctuaciones en los niveles intracelulares de nucleótidos de adenina siendo inhibidos por ATP, pero activados por nucleótidos unidos a Mg²⁺, particularmente, MgADP (Nichols, 2006). Esta habilidad de percibir los cambios en los niveles intracelulares de ATP/ADP promueve cambios en el metabolismo celular que se traducen como variaciones en la permeabilidad al K⁺ y alteración del potencial y la excitabilidad de la membrana celular (Ashcroft, 2005; Blondeau et al., 2000; Liss et al., 1999; Schwanstecher y Panten, 1993; Yamada et al., 2001; Zawar et al., 1999; Zawar y Neumcke, 2000).

Mecanismo de acción (vía del óxido nítrico-GMP cíclico-canales de K⁺)

Debido a la acción dual del NO el mecanismo de acción resultante dependerá de la activación de diferentes proteínas. Por un lado, la producción de NO por la NOS requiere de un flujo constante de Ca²⁺ por parte de los receptores NMDA (Garthwaite et al., 1988; Oess et al., 2006), esta entrada masiva de Ca²⁺ inicia con una cascada de eventos que incluye la activación de la NOS con el subsecuente aumento de NO intracelular (Miyamoto et al., 2009). A diferencia de la mayoría de las moléculas que transmiten información entre células (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.) mediante su acción sobre receptores específicos asociados generalmente a las membranas plasmáticas, el NO difunde desde la célula que lo genera hasta la célula efectora donde interactúa con dianas moleculares específicas. Aunque interactúa con varias dianas siendo la mejor caracterizada la unión con el ion hierro de la guanilato-ciclasa soluble. Cuando esta enzima es activada (por la unión NO-Fe) produce GMPc, el cual actúa sobre proteínas cinasas dependientes de GMPc (PKG), canales iónicos y fosfodiesterasas. También, el NO con su alta permeabilidad puede difundir a las terminales de las fibras C promoviendo la liberación de sustancia P y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Miyamoto et al., 2009),

contribuyendo así al desarrollo de la hiperalgesia secundaria (Miyamoto et al., 2009). Más aún se ha sugerido que el NO presente en la médula participa en los mecanismos glutamatérgicos descendentes provocadas por la inflamación. Este proceso debilita la influencia de la inhibición descendente sobre las neuronas del asta dorsal, este debilitamiento se produce al menos parcialmente al interferir con mecanismo inhibitorio GABAérgico y glicininérgico sobre las neuronas de proyección (Millan, 2002; Watkins y Maier, 1999), promoviendo así comportamientos pronociceptivos.

Por otra parte, esta cascada de activación también puede desencadenar efectos analgésicos. Esto sucede cuando la ruta NO-GC-GMPc-PKG inhibe la actividad de la fosfolipasa C, promueve la actividad de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} , inhibe la actividad del IP_3 , inhibe a los canales de Ca^{2+} y por último actúa directamente sobre canales catiónicos (canales de K^+), sin que haya de por medio ninguna cinasa manteniéndolos abiertos y dejando a la membrana en un estado de parcial despolarización (Flórez et al., 1998; Sachs et al., 2004) evitando así el envío de la señal dolorosa.

Vía opioidérgica

Los opioides son los analgésicos más efectivos y ampliamente utilizados para el tratamiento del dolor y desordenes relacionados con éste (Ballantyne et al., 2010). Los opioides han sido usados a lo largo de la historia para el tratamiento del dolor y en el último siglo se han hecho grandes avances en el desarrollo de fármacos opioides derivados de opiáceos de origen natural dentro de los campos de la farmacología y la química médica. Además del dolor los opioides se utilizan con frecuencia en el tratamiento de otra gran cantidad de trastornos que incluyen diarrea, tos, dolor postoperatorio y cáncer (Flórez et al., 1998).

Los receptores opioides son proteínas receptoras presentes en el sistema nervioso de los grandes mamíferos a los que se unen los neurotransmisores tipo opioides (Bordés, G.R. et al., 1994; Carregal, A., 2010; Flórez et al., 1998; García B. P., 2008; Siñani, 2009; Vicet Muro, 2009), ya sean endógenos (producidos por el propio organismo) o exógenos (administrados externamente). Estos opioides se unen de forma específica y reversible a estos receptores produciendo de este modo sus acciones biológicas (Bordés, G.R. et al., 1994; Carregal, A., 2010; Flórez et al., 1998; García B. P., 2008; Siñani, 2009; Vicet Muro, 2009).

Es por ello que el sistema opioidérgico es crítico en la modulación del dolor y de conductas antinociceptivas. Los péptidos opioides y sus receptores se expresan en todo el circuito neuronal nociceptivo así como en regiones críticas del sistema nervioso central incluidas estructuras cerebrales relacionadas con la emoción y la recompensa (Walwyn et al., 2010). Hasta la fecha, se conocen cuatro tipos diferentes de receptores opioides Mu (μ), Delta (δ), kappa (κ) y el receptor opioide a nociceptina (NOP) (Dhawan et al., 1996; Shang y Filizola, 2015).

Los opioides más comúnmente utilizados para el tratamiento del dolor actúan sobre los receptores opioides μ (MOR) (Flórez et al., 1998). Es por eso que los agonistas de los MOR siguen siendo algunos de los analgésicos más eficaces, aunque este tipo de fármacos se ha visto desarrollan tolerancia a los tratamientos, llevado a los investigadores a estudiar activamente a otro tipo de receptores opioides como dianas farmacológicas para el alivio del dolor (Dhawan et al., 1996).

Por otra parte, los subtipos de receptores opioides fueron identificados farmacológica y genéticamente hace más de dos décadas (Dhawan et al., 1996) a partir de entonces numerosos estudios han implicado a los cuatro subtipos de receptores opioides en una gran variedad de efectos en el comportamiento incluyendo: analgesia, depresión, ansiedad y adicción (Walwyn et al., 2010). Además, los cuatro subtipos de receptores se han caracterizado a nivel celular en las vías de transducción descendentes. Sin embargo, hay un menor número de estudios que han vinculado directamente la transducción de la señal de opioides a eventos de comportamiento. La comprensión de la diversidad en la señalización de los receptores opioides así como la activación de los segundos mensajeros que conducen a la modulación del dolor son un interesante objeto de estudio (Bruchas y Chavkin, 2010; Walwyn et al., 2010).

Se ha demostrado la presencia de receptores opioides en todo el SNC, estos son esteroespecíficos y de alta afinidad. Por su parte los receptores μ , κ y δ son considerados como verdaderos receptores opioides (Bordés, G.R. et al., 1994; Carregal, A., 2010; Flórez et al., 1998; García B. P., 2008b; Siñani, 2009; Vicet Muro, 2009). Los receptores opioides μ , κ , δ y NOP son receptores que están asociados a la proteína G_i y al igual que los demás receptores asociados a proteínas G_i pertenecen a la familia de proteínas con siete segmentos transmembrana (Flórez et al., 1998; Toll et al., 2016).

- 1. Receptor μ :** fue el primer receptor descubierto. Muestra una gran afinidad por la morfina y por el antagonista opiáceo naloxona. Su ligando endógeno natural es la β -endorfina y las endomorfina. Su estimulación por un agonista produce miosis, depresión respiratoria, bradicardia, hipotermia, indiferencia al dolor y disminuye el reflejo flexor nociceptivo. Estos efectos son revertidos por la naloxona. El receptor μ se encuentra distribuido por todo el SNC pero existe mayor densidad de éstos en la sustancia gris periacueductal (SGPA), en la médula espinal y en zonas del sistema límbico. El receptor μ tiene dos poblaciones: la μ_1 de predominio supraespinal y la μ_2 de predominio espinal (Bordés, G.R. et al., 1994; Carregal, A., 2010; Flórez et al., 1998; Siñani, 2009).
- 2. Receptor κ :** su ligando natural endógeno es la dinorfina (proencefalina A). La naloxona muestra una sensibilidad intermedia por este receptor. Su estimulación produce miosis, sedación, disforia, reacciones psicomiméticas y disminución del reflejo flexor nociceptivo. El receptor κ se encuentra distribuido por las mismas zonas que el μ y en las capas profundas de la corteza cerebral (Bordés, G.R. et al., 1994; Carregal, A., 2010; Flórez et al., 1998; Siñani, 2009).
- 3. Receptor δ :** su ligando endógeno natural es la encefalina (proencefalina A). la naloxona presenta una débil afinidad por este receptor. Su estimulación produce depresión respiratoria. Su acción analgésica está básicamente mediada a nivel espinal (Bordés, G.R. et al., 1994; Carregal, A., 2010; Flórez et al., 1998; Siñani, 2009).
- 4. Receptor NOP:** sus ligandos endógenos son la nociceptina y la orfanina (Mucio-Ramírez et al., 2001). La activación de este receptor promueve una inhibición en la conductancia del Ca^{2+} disminuyendo con esto la liberación de neurotransmisores. Su acción analgésica está básicamente mediada a nivel espinal (Toll et al., 2016)

Señalización del receptor opioide

Como se ha descrito anteriormente los receptores opioides son expresados en las vías descendentes moduladoras del dolor que incluyen a la medula del locus coeruleus y al área gris periacueductal (Millan, 2002). Estos receptores son expresados en estructuras límbicas, corticales y del mesencéfalo. La activación de los

receptores opioides en estos lugares inhiben directamente las neuronas que a su vez inhiben la transmisión del dolor de la médula espinal (Ahlbeck, 2011; McNicol et al., 1996).

Los cuatro tipos de receptores opioides son proteínas con 7 segmentos transmembranales que están unidas a proteínas G inhibitorias. (Childers et al., 1979; Childers y Snyder, 1978). El aspecto clásico y quizás más importante de la transducción de señales de los receptores opioides es la habilidad que tienen estos para modular a los canales iónicos de K^+ y Ca^{2+} (Díaz et al., 1995; Hsia et al., 1984; Rusin et al., 1997; Taussig et al., 1993; Zamponi y Snutch, 1998).

Vía Serotoninérgica

La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor de tipo monoamina, más específicamente una indolalquilamina sintetizada a partir del aminoácido esencial triptófano en una vía metabólica que involucra dos enzimas: la hidroxilasa del triptófano y la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (Boadle-Biber, 1993). La 5-HT se encuentra ampliamente distribuida tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC) (Beitz et al., 1983; Kazakov et al., 1992; Kirifides et al., 2001; Li et al., 1997, 1993; Wang y Nakai, 1994). Esta distribución se debe a que el transporte de serotonina del SNP al SNC es impedido por la barrera hematoencefálica. En ambos sitios (SNP y SNC) la concentración de serotonina está cuantitativamente muy desequilibrada por lo que la 5-HT puede ejercer diversos efectos sobre los mecanismos de señalización del dolor (Godínez-Chaparro et al., 2011; Lin et al., 2011; Sasaki et al., 2006; Sommer, 2004).

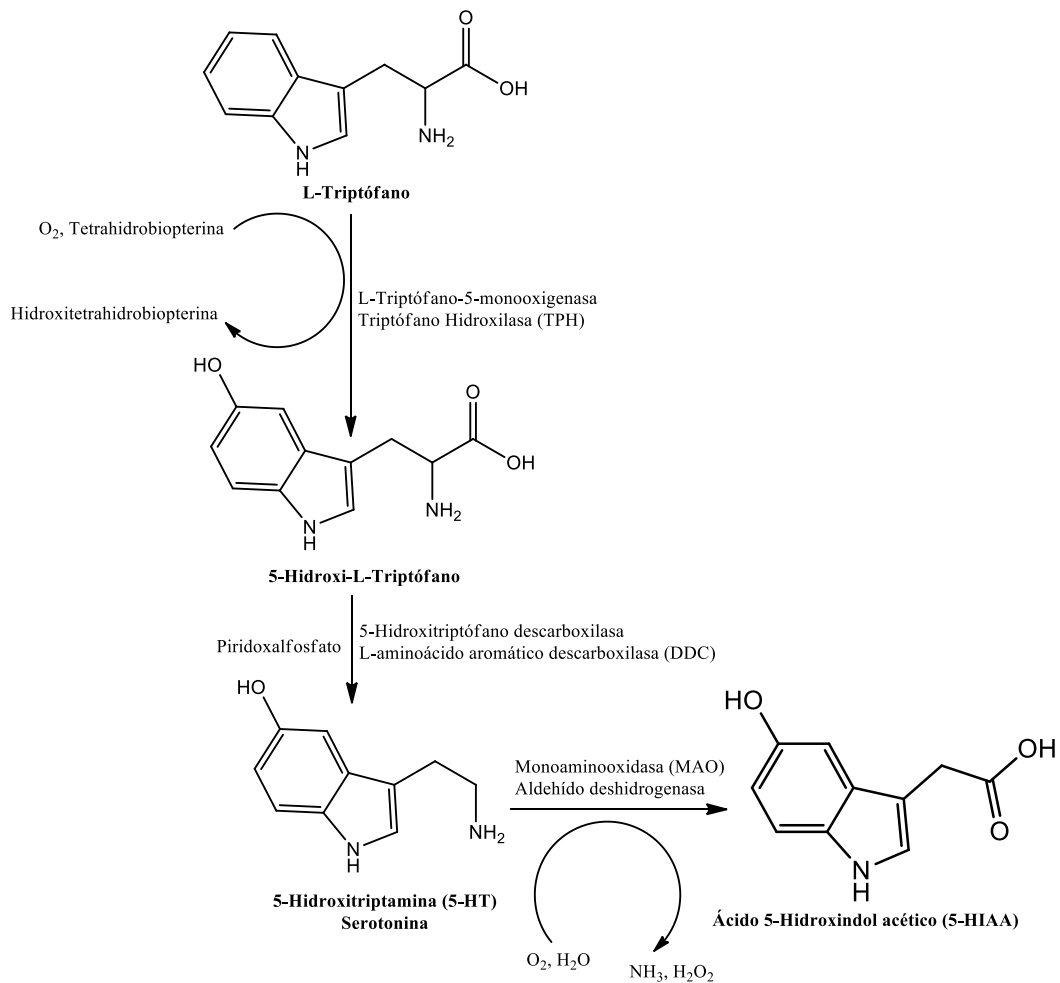


Figura 8. Biosíntesis y metabolismo de la serotonina

En la periferia junto con otros mediadores proinflamatorios (prostaglandinas, histamina, bradicinina, ácido láctico, etc.) la 5-HT es un componente activo de la “sopa inflamatoria” que contribuye al dolor generado por una lesión (inflamación) (Hamon, M. y Bourgoin, S., 1999). Prueba de ello es que una inyección sistémica de 5-HT desencadena la excitación y sensibilización de fibras aferentes primarias nociceptivas (fibras A δ y C) contribuyendo así a la sensibilización e hiperalgesia periférica (Sommer, 2004).

En la periferia el papel pronociceptivo de la 5-HT ha sido bien establecido, sin embargo a nivel de la espina dorsal y a niveles supraespinales sus efectos han sido causa de debate (Bardin, 2011; Bardin et al., 1997; Kayser et al., 2011; Millan, 2002).

La activación de cualquiera de los numerosos tipos de receptores de la 5-HT presentes en las fibras C como son los receptores 5-HT_{2A}, 2B, 2C, 3, 4, 6 y 7 promueven efectos

pronociceptivos (Amaya-Castellanos et al., 2011; Castañeda-Corral et al., 2009; Cervantes-Durán et al., 2016, 2013; Godínez-Chaparro et al., 2011; Lin et al., 2011; Rocha-González et al., 2009; Sasaki et al., 2006; Sommer, 2004), mientras que la activación de los receptores 5-HT_{1A,B,D} y 5 han sido asociados a efectos antinociceptivos a niveles periféricos (Diniz et al., 2015; Granados-Soto et al., 2010; Muñoz-Islas et al., 2014).

Dentro del SNC se han identificado una pequeña población de los cuerpos de células serotoninérgicas en la parte ventral del canal central (LaMotte, 1988), pero prácticamente toda la inervación serotoninérgica de la médula espinal se deriva de fuentes supraespinales (Beitz et al., 1983; Kazakov et al., 1992; Kirifides et al., 2001; Li et al., 1997, 1993; Wang y Nakai, 1994). El papel del sistema serotoninérgico bulboespinal en el control de los mecanismos del dolor se da desde el núcleo del rafe magnus, el núcleo paragigantocellularis y la porción ventral del núcleo gigantocellularis en la médula rostroventral desde donde se da la entrada de las proyecciones serotoninérgicas en la médula espinal (Bowker et al., 1983; Bullitt y Light, 1989; Jones y Light, 1992; Kwiat y Basbaum, 1992; Loeb, 1983; Mason, 1999; Wang y Nakai, 1994). Dentro de la médula espinal existe una extensa red de fibras serotoninérgicas las cuales son abundantes en las zonas superficiales del asta dorsal (láminas I/II), aunque en láminas más profundas (IV-VI) también existe una gran cantidad de proyecciones serotoninérgicas (Basbaum y Fields, 1984; Besson y Chaouch, 1987; Li et al., 1997; Maxwell et al., 1996; Ruda et al., 1986; Stewart y Maxwell, 2000). Estas proyecciones serotoninérgicas reciben la información de fibras aferentes primarias las cuales transmiten señales nociceptivas a neuronas de segundo orden (principalmente espinotalámicas donde dependiendo del tipo de neurona (pre o post sináptica) y del receptor que active se llevará a cabo la inhibición o la excitación (Ito et al., 2000; Kwiat y Basbaum, 1992; Larkman y Kelly, 1995; Takahashi et al., 1995; Takahashi y Berger, 1990).

Estudios realizados de la administración directa de 5-HT sobre la médula espinal indican que las vías descendentes serotoninérgicas ejercen una influencia dosis dependiente en el procesamiento nociceptivo en el asta dorsal, procesos tanto anti (Apkarian et al., 2011; Muñoz-Islas et al., 2014; Rocha-González et al., 2014, 2010) como pronociceptivos (Amaya-Castellanos et al., 2011; Castañeda-Corral et al., 2009;

Cervantes-Durán et al., 2013, 2013; Godínez-Chaparro et al., 2011; Rocha-González et al., 2005).

La influencia de la 5-HT en la actividad de las neuronas en asta dorsal es heterogénea tanto de inhibición como de excitación, aunque esta última es menos frecuente (Ali et al., 1994; Garraway y Hochman, 2001a, 2001b, 2001c; Jordan et al., 1979; Khasabov et al., 1999; Li y Zhuo, 2001; Lopez-Garcia y King, 1996; Millan, 1999; Willcockson et al., 1984; Fig. 9). Estas acciones duales pueden ser observadas:

- 1) Sobre las neuronas de las láminas superficiales y profundas del asta dorsal;
- 2) Sobre su actividad en reposo y su respuesta a la entrada de señales nociceptivas provenientes de las fibras aferentes primarias;
- 3) En la interacción con los transmisores pronociceptivos (glutamato y SP) de las fibras aferentes primarias, y
- 4) En neuronas nociceptivas específica y de amplio rango dinámico.

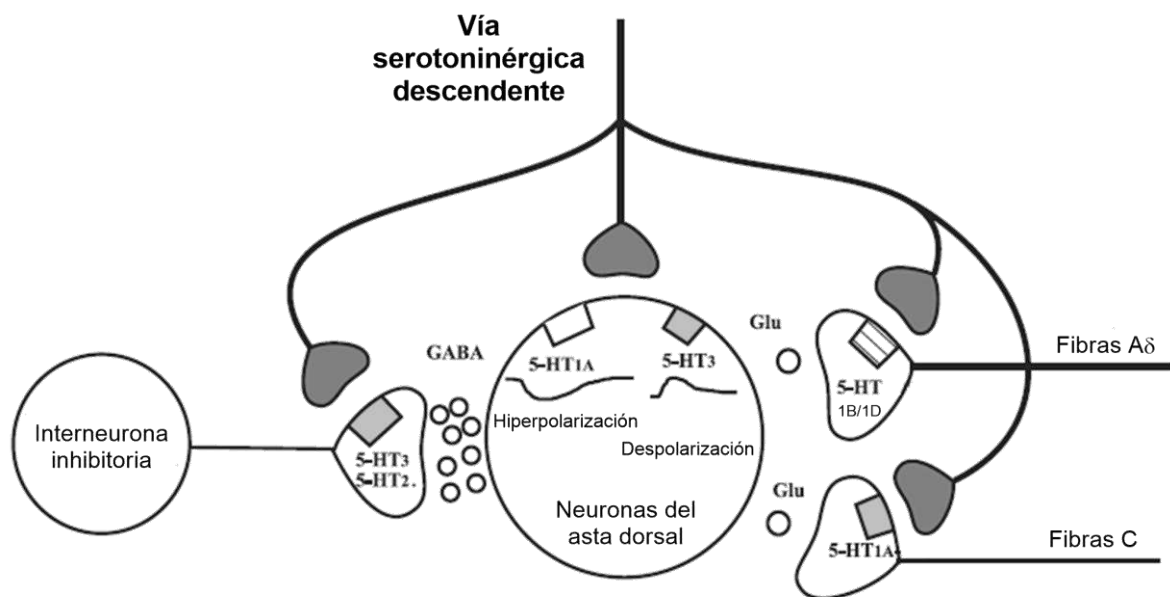


Figura 9. Vía serotoninérgica descendente. La influencia de la 5-HT en la actividad de las neuronas en asta dorsal es heterogénea, dependiendo a que tipo de receptor active y al tipo de estímulo recibido. Abreviaturas: Glu: glutamato. Modificado de Millan, 2002.

Hasta la fecha muchos de los estudios concernientes a la 5-HT han estado enfocados sobre dos niveles centrales del control del dolor: el asta dorsal de la médula espinal y el mesencéfalo, los cuales están interconectados anatómicamente y funcionalmente a un circuito espino-bulbo espinal (Millan, 2002). Sin embargo está bien establecido que la

modulación de dolor se da a través de la influencia descendente corticofugal (una fibra nerviosa que se origina en la corteza cerebral y se extiende al tálamo somatosensorial), aunque también la corteza somatosensorial ejerce una fuerte modulación directa sobre estímulos inocuos y nocivos a nivel de la médula espinal (Monconduit et al., 2006; Saadé y Jabbur, 2008).

Como se ha visto la activación de vías descendentes serotoninérgicas no conlleva universalmente a la inducción de la analgesia debido a los mecanismos tanto anti como pronociceptivos y al tipo de estímulo nociceptivo o a la naturaleza del receptor serotoninérgico activado (Millan, 2002).

Receptores serotoninérgicos

Hasta la fecha se han caracterizado 7 tipos de receptores serotoninérgicos (5-HT₁₋₇) con alrededor de 15 subtipos. A excepción del receptor 5-HT₃ que es un canal iónico todos los demás tipos de receptores están acoplados a proteínas G tanto inhibitorias como estimuladoras por lo cual pueden ejercer distintos efectos en la neurona en la que están localizados (Masson et al., 2012).

- **Receptor 5-HT₁:** La subfamilia del receptor 5-HT₁ está formada por 5 miembros 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. Los receptores de esta familia están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa disminuyendo la producción de AMPc, además su activación abre y cierra canales de K⁺ y Ca²⁺, respectivamente (Rocha-González et al., 2009). Por lo tanto la activación de los receptores 5-HT₁ tiene una influencia inhibitoria pronunciada sobre la excitabilidad neuronal así como efectos antinociceptivos al ser activados a nivel periférico o central (Avila-Rojas et al., 2015; Colpaert et al., 2002; Deseure et al., 2003; Godínez-Chaparro et al., 2013; Granados-Soto et al., 2010; Lladó-Pelfort et al., 2011; Wu et al., 2003).
- **Receptor 5-HT₂:** La subfamilia del receptor 5-HT₂ tiene tres miembros 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. Dos de los tres subtipos de receptores 5-HT₂ (5-HT_{2A} y 5-HT_{2B}), están acoplados positivamente a la fosfolipasa C y ejercen una influencia inhibitoria sobre las corrientes de K⁺ para producir excitación neuronal (Barnes y Sharp, 1999; Boess y Martin, 1994), mientras que el receptor 5-HT_{2C} ha sido asociado a fenómenos antinociceptivos (Nakai et al., 2010) aunque estos resultados han sido contradictorios, pues estos receptores también han sido

asociados a efectos pronociceptivos a nivel periférico y central (Cervantes-Durán et al., 2016).

- **El receptor 5-HT₃:** Es un miembro de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando. Está formado por un complejo proteico pentamérico y es permeable a Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. La unión de la 5-HT a receptor 5-HT₃ produce una respuesta excitadora rápida de la neurona (Niesler et al., 2007). Por lo tanto la activación del receptor 5-HT₃ en el sistema nervioso central y periférico promueve la excitación neuronal y la liberación de neurotransmisores (Barnes et al., 2009) teniendo efectos pronociceptivos cuando son activados a nivel periférico y central (Bravo-Hernández et al., 2012; Castañeda-Corral et al., 2011; McCleane et al., 2003).
- **Receptor 5-HT₄:** El receptor 5-HT₄ está acoplado a una proteína G estimuladora que permite el incremento de la concentración intracelular de AMPc por activación de la adenilato ciclasa (Blondel et al., 1997), activando a la proteína cinasa A que al ser activada promueve el cierre y la apertura de los canales de K⁺ y Na⁺, respectivamente (Hoyer et al., 2002). La activación de este tipo de receptores produce una influencia excitadora neuronal (Cervantes-Durán et al., 2013; Godínez-Chaparro et al., 2011).
- **Receptor 5-HT₅:** El receptor 5-HT₅ está compuesto por dos miembros 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}. Estudios demuestran que los receptores 5-HT_{5A} están acoplados a una proteína G_{i/o} que inhibe a la adenilato ciclasa (Francken et al., 2000, 1998). Por lo tanto se sugiere que estos receptores pudieran tener un papel hiperpolarizante sobre la actividad neuronal que al ser activados promueven conductas antinociceptivas a nivel espinal (Avila-Rojas et al., 2015; Cervantes-Durán et al., 2013; Muñoz-Islas et al., 2014; Quiñonez-Bastidas et al., 2013).
- **Receptores 5-HT₆:** El receptor 5-HT₆ está acoplado a una proteína G_s (Cardenas et al., 1999). La activación de este receptor estimula a la adenilato ciclasa y aumenta la concentración de AMPc lo que indica una influencia facilitadora sobre la actividad neuronal (Monsma et al., 1993; Ruat et al., 1993). Datos recientes demuestran que los receptores 5-HT₆ están localizados en los ganglios de la raíz dorsal médula espinal (Gérard et al., 1996) y astrocitos (Hirst et al., 1998, 1997). Estudios recientes han demostrado que la activación de este tipo de receptores serotoninérgicos promueve respuestas nociceptivas tanto a nivel periférico como central (Godínez-Chaparro et al., 2012, 2011).

- **Receptores 5-HT₇:** El receptor 5-HT₇ está acoplado a una proteína Gs (Bard et al., 1993). Estudios demuestran que existe la expresión del RNAm y de la proteína del receptor 5-HT₇ en las neuronas nociceptivas a nivel periférico (Pierce et al., 1997, 1996a, 1996b; Terrón et al., 2001; Wu et al., 2001). Es por ello que el receptor 5-HT₇ participa en efectos pro-nociceptivos a nivel periférico y espinal cuando es activado (Amaya-Castellanos et al., 2011; Godínez-Chaparro et al., 2012, 2011).

Tabla 2. Antagonistas, acción farmacológica y modelos ocupados sobre los receptores de 5-HT.

Receptor	Fármaco	Efecto	Modelo	Referencia
5-HT _{1A}	Befiradol (agonista selectivo)	Antinociceptivo, anihiperalgésico y antialodínico	Formalina (inf), contricción severa del nervio ciático (neu) y constricción del nervio infraorbital (neu)	(Colpaert et al., 2002; Deseure et al., 2003; Lladó-Pelfort et al., 2011; Wu et al., 2003)
5-HT _{1B/1D}	Triptanos (agonistas)	Antinociceptivo	Constricción del nervio infraorbital (neu)	(Kayser et al., 2002)
5-HT _{2C}	MK212, RO 60-0175, WAY-161503 (agonistas)	Antinociceptivo	Constricción del nervio trigémino (neu)	(Nakai et al., 2010)
5-HT _{2A}	Sarprorelato (antagonista)	Proalodínico	Constricción del nervio ciático (neu)	(Nitanda et al., 2005)
5-HT ₃	Ondansetron (agonista)	Antihiperalgésico	Dolor neuropático en humanos	(McCleane et al., 2003)
5-HT ₄	SDZ-205.557.SDZ (antagonista)	Pronociceptivo	Constricción del nervio ciático (neu)	(Song et al., 2011)
5-HT ₅	SB-699551 (antagonista)	Antinociceptivo	Ligadura de nervios espinales L5-L6 (neu)	(Avila-Rojas et al., 2015)
5-HT ₆	SB-742457 (antagonista)	Pronociceptivo	Ligadura parcial del nervio ciático (neu)	(Jayarajan et al., 2015)
5-HT ₇	SB-269970 (antagonista)	Pronociceptivo	Ligadura de nervios espinales L5-L6 (neu)	(Amaya-Castellanos et al., 2011)

Neu: Modelo de dolor tipo neuropático

HIPÓTESIS

Debido a las características antioxidantes de la manguiferina, se propone que esta molécula presenta un efecto modulador en alguno de los blancos moleculares implicados en la generación y mantenimiento del dolor neuropático, así como de sus posibles efectos a largo plazo, mediados principalmente por cambios transcripcionales y con ello, promover efectos antialodínicos en ratas con dolor neuropático.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con lesión en los nervios espinales L5-L6, así como determinar los posibles mecanismos de acción involucrados en el efecto antialodínico inducido por este compuesto.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el posible efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - Estandarizar la cirugía de la ligadura de los nervios espinales L5-L6, modelo animal de dolor neuropático en ratas propuesto por Kim y Chung en 1992.
 - Estandarizar el modelo conductual de up-down para la evaluación de la alodinia táctil en ratas.
 - Realizar la curva dosis respuesta de la administración intratecal (1, 10, 30 y 60 µg/rata) de manguiferina en alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6, en ratas.
- Determinar el mecanismo de acción que subyace en el efecto antialodínico inducido con manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - Determinar la participación de la vía óxido nítrico-GMP cíclico-canales de K⁺ en el efecto antialodínico inducido con manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - Evaluar el efecto de L-NAME (10–100 µg/rata, i.t.), ODQ (1–100 µg/rata, i.t.), glibenclamida (5–50 µg/rata, i.t.) y vehículo sobre el efecto antialodínico inducido con manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.

- Determinar la participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico inducido con manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - Evaluar el efecto de naloxona (5–50 µg/rata, i.t.).
- Determinar la participación del sistema serotoninérgico en el efecto antialodínico inducido con manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - Evaluar el efecto de Metiotepina (3–30 µg/rata, i.t.), SB-699551 (0.6–6 µg/rata, i.t.), SB-224289 (0.5–5 µg/rata, i.t.), BRL-15572 (0.4–4 µg/rata, i.t.) y WAY-100635 (0.6–6 µg/rata, i.t.) en el efecto antialodínico inducido con manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.

METODOLOGÍA

Animales

Los experimentos se realizaron sobre ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 120 a 140 gramos con acceso libre a agua y alimentos antes de cada experimento. Los animales fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los Lineamientos y Estándares para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983).

Fármacos

La manguiferina, WAY-100635, SB-699551, SB-224289 y BRL-15572 se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO) donde el porcentaje máximo de DMSO en cada dosis era del 1%. La Naloxona, el N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), la glibenclamida, se disolvieron en DMSO al 5%. El ODQ (1H-(1,2,4)oxadiazol(4,3-A)quinoxalin-1-ona) se disolvió en DMSO al 10%. Manguiferina, L-NAME, glibenclamida, ODQ y DMSO se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Mientras que Naloxona se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (California, USA).

MODELOS

Ligadura del nervio espinal (SNL) modelo de ligadura de Kim y Chung

Kim y Chung (Kim y Chung, 1992) desarrollaron un modelo animal de mononeuropatía periférica generada por la ligadura de los nervios espinales (SNL). En este modelo las ratas son anestesiadas y colocadas en posición prona (boca abajo) donde se afeita la espalda baja. A partir de entonces se realiza una incisión larga de aproximadamente 2 cm a nivel de la cresta ilíaca posterior con la finalidad de acceder a los nervios espinales lumbares izquierdos. Los nervios espinales L5 y L6 se identifican y se separan cuidadosamente del músculo librando el nervio espinal L4 adyacente y a continuación se ligan fuertemente distal al ganglio de la raíz dorsal (GRD) usando una sutura de seda (Kim y Chung, 1992; Komori et al., 2007; Lin et al., 2007)(Figura 10). Se debe evitar la ligadura del nervio espinal L4 pues esta ligadura no produce un modelo de dolor relevante ya que este nervio contiene una gran cantidad de fibras motoras y la ligadura de dicho nervio provoca deficiencias motoras graves y por tanto interfiere con las pruebas de comportamiento.

En este modelo las alteraciones de comportamiento como la alodinia mecánica, alodinia fría, hiperalgesia térmica y dolor espontáneo se desarrollan dentro de las primeras 24 a 48 h después de la intervención quirúrgica y persisten durante las 10 a 16 semanas posteriores a la cirugía (Choi et al., 1994; Kim y Chung, 1992; Kinnman y Levine, 1995; LaBuda y Little, 2005; Moon et al., 1999).

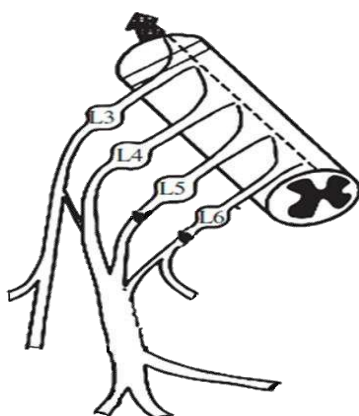


Figura 10. Diagrama que muestra la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, en el modelo de dolor neuropático propuesto por Kim y Chung. Modificado de Jaggi et al., 2011.

Método de inyección intratecal, método de Mestre

En el método desarrollado por Mestre y col. en 1994 la administración se realiza tomando firmemente a la rata por la cintura a la altura de la pelvis con una sola mano. Una vez sujetado el animal se inserta una aguja de calibre 25-G conectada a una jeringa Hamilton de 25- μ L sobre el tejido localizado que cubre los espacios intervertebrales dorsales que se ubican entre las vértebras lumbares L5 y L6 de forma perpendicular a la columna vertebral hasta un pequeño orificio localizado entre ambas vértebras (Figura 11). Este sitio se selecciona de modo que la inyección se limite a la región donde termina la médula espinal y comienza la “cola de caballo”, con el fin de reducir la posibilidad de provocar un daño sobre la médula y aumentar así la accesibilidad al espacio intervertebral. Cuando la aguja entra en el espacio subaracnoideo se observa un movimiento brusco y repentino de la cola, este movimiento se hace de manera lateral. Este reflejo es usado como un indicador de que la punción se llevó a cabo con éxito. Además de esto no se observa ningún otro comportamiento específico como signo de sufrimiento o dolor. Por otra parte una vez que la aguja se encuentra en posición se inyecta un volumen constante de 20 μ L. Entonces la jeringa se mantiene en posición por unos pocos segundos y se retira progresivamente para evitar una salida no deseada del fármaco (Mestre et al., 1994).

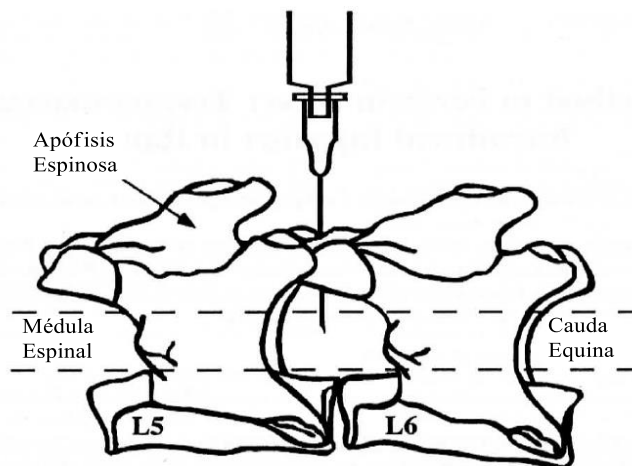


Figura 11. Diagrama que muestra la inserción de la aguja en el espacio intervertebral, entre L5 y L6. Modificado de Mestre et al., 1994 .

Método para determinar el umbral de retiro de la pata desarrollado por Chaplan y colaboradores en 1994

Una respuesta nocifensiva exagerada a los estímulos mecánicos se considera un indicador clave del procesamiento sensorial anormal en la mayoría de los modelos animales de dolor neuropático (Mogil, 2009; Ruscheweyh et al., 2011).

La sensibilidad a estímulos mecánicos se puede determinar por medio de la cantidad de fuerza requerida para provocar un cambio en el comportamiento del animal. Ejemplo de esto es el retiro de la pata que es provocado al ser aplicados diferentes estímulos táctiles como los generados por los filamentos de von Frey (Chaplan et al., 1994). Existen diferentes métodos disponibles para calcular el umbral de retiro de la pata con el uso de los filamentos de von Frey pero el método *up-down* de Dixon (Dixon, 1980, 1965), aplicado a roedores como lo hicieron Chaplan y colaboradores en 1994 (Chaplan et al., 1994) continúa siendo de los más utilizados.

En este modelo todas las pruebas de comportamiento se realizan sobre grupos independientes de ratas. La hipersensibilidad mecánica se cuantifica mediante la determinación de los umbrales de retiro de la pata en respuesta a la estimulación generada por los filamentos de von Frey aplicados sobre el área de la piel de la superficie plantar de la extremidad posterior ipsilateral como describen previamente Chaplan y colaboradores en 1994 (Chaplan et al., 1994). Se debe evitar la estimulación de los dedos, almohadillas y talón de dicha extremidad, para no provocar una respuesta falso-positivo generada por la activación de fibras A β o mecano receptores que son fibras extremadamente sensibles (Leem et al., 1993), que están ampliamente distribuidas en estas zonas de la pata. Lo que se busca con la estimulación táctil por medio de los filamentos de von Frey es la activación de las fibras A δ y C mejor conocidas como fibras nociceptoras (Leem et al., 1993), que son las encargadas de la transmisión de la señal nociceptiva.

Para llevar a cabo este modelo las ratas son colocadas dentro de cajas de acrílico (cámaras de observación) que se encuentran encima de un soporte metálico cuyo piso es de malla de alambre lo que permite el acceso completo a las patas del animal. Para la aclimatación conductual se colocan a las ratas en las cámaras de observación 30 minutos antes de realizar los ensayos. Los umbrales de retiro de la pata se miden usando el paradigma del ensayo *up-down* (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1980, 1965),

esto es mediante el incremento de presión y fuerza ejercida (la fuerza y presión van desde 0.4 hasta los 15 gramos) generada por la aplicación de los filamentos de von Frey en la zona de la extremidad ensayada. La presión debe ser constante durante aproximadamente 3 segundos con un intervalo de 1 minuto aproximadamente entre estímulo y estímulo. El estímulo de 2 gramos de presión se aplica primero en cada ocasión. Cada vez que se produce una respuesta de retirada con un filamento dado se aplica el filamento inmediatamente más pequeño. Por el contrario, cuando se produce una respuesta negativa se aplica el filamento inmediatamente superior (Figura 12). La prueba continúa hasta que:

- 1) Se hayan producido respuestas a cuatro estímulos idénticos después del primer cambio en la respuesta
- 2) Se de una respuesta negativa al filamento de von Frey más alto o una respuesta positiva al filamento de von Frey más pequeño.

Una retirada abrupta de la pata, lamido de la extremidad y estremecimiento general se consideran como respuestas positivas. Para determinar si existe el desarrollo de alodinia en los animales ensayados el umbral de retiro de la pata debe mantenerse por debajo de los 4 gramos ya que bajo este umbral se activan las fibras nociceptoras A δ y C (Leem et al., 1993).

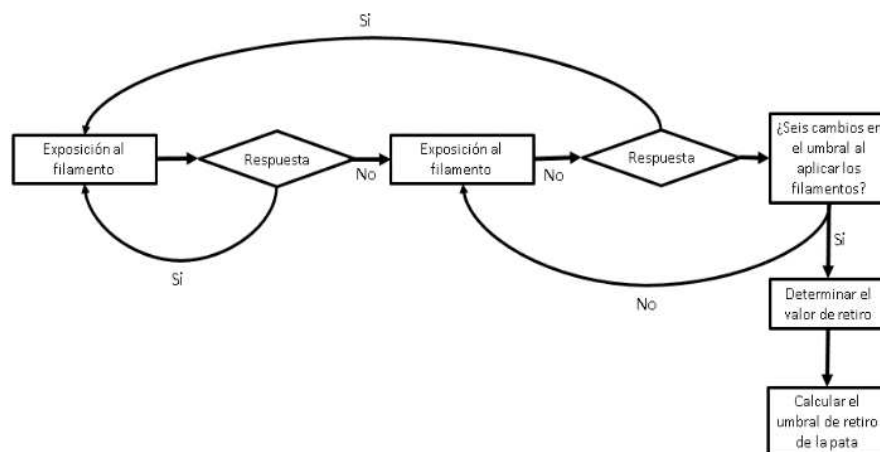


Figura 12. Método para determinar el umbral de retiro de la pata desarrollado por Chaplan y col. en 1994

DISEÑO EXPERIMENTAL

Fueron utilizadas grupos independientes de ratas (n=6) en cada condición experimental. Con el propósito de estandarizar la medición de la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 las ratas fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Kim y Chung en 1992 (Kim y Chung, 1992). Para ello los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina (45/12 mg/Kg, i.p.). Posteriormente se realizó la cirugía en donde se expusieron los nervios espinales L5-L6 de la médula espinal. Estos se ligaron con sutura de seda 4-0 distal al ganglio del asta dorsal. En el grupo de las ratas falsamente operadas (sham) los nervios se expusieron, pero no se ligaron. Después de cerrar la incisión a los animales se les dió un periodo de recuperación de 15 días. Las ratas que presentaban algún tipo de déficit motor se descartaron del estudio. La alodinia táctil se evaluó en ratas con lesión de los nervios espinales L5-L6 como reportaban Chaplan y col. en 1994 (Chaplan et al., 1994). Se realizó un curso temporal del umbral de retiro de la pata por el método *up-down* los días 1, 3, 5, 9, 12 y 15 posteriores a la ligadura de los nervios espinales para corroborar que la operación había sido llevada con éxito.

Con el propósito de determinar el posible efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6 el día 15 a los animales que presentaban alodinia se les administraron dosis crecientes de manguiferina por vía oral (10, 30, 60 y 100 mg/Kg) e intratecal (1, 10, 30, 60 µg/rata), 10 minutos antes de evaluar la conducta nociceptiva (alodinia táctil) por el método *up-down*. Posteriormente se monitoreó el efecto de la manguiferina sobre el umbral de retiro de la pata a los 15, 30, 60, 120 y 240 minutos posteriores de la administración i.t y oral.

Para evaluar si el efecto antialodínico inducido por la manguiferina en animales que presentan ligadura de los nervios espinales era mediado por la vía óxido nítrico-GMP cíclico-canales de K⁺ se utilizaron: el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico neuronal, L-NAME (10-100 µg, i.t.)(Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004), el inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ (1-10 µg, i.t.)(Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004) y el bloqueador de canales de potasio sensibles a ATP, glibenclamida (5-50 µg, i.t.)(Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004). Así mismo, para determinar la naturaleza del receptor serotoninérgico que podría participar en el efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con dolor neuropático se utilizaron: el antagonista no selectivo de los receptores 5-HT, metiotepina (3-30 µg,

i.t.)(Hazael Ávila-Rojas et al., 2015), el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{5A}, SB-699551 (0.6 - 6 µg, i.t.)(Muñoz-Islas et al., 2014), el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B}, SB-224289 (0.5-5 µg, i.t.)(Godínez-Chaparro et al., 2013), el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}, BRL-15572 (0.4-4 µg, i.t.)(Godínez-Chaparro et al., 2013) y el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635 (0.6 - 6 µg, i.t.)(Hazael Ávila-Rojas et al., 2015). Además para determinar la posible participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con dolor neuropático se utilizó el antagonista no selectivo de los receptores opioides µ, κ y δ, naloxona (5–50 µg/rata, i.t.)(Doi y Jurna, 1982). Todos los antagonistas se administraron 20 minutos antes de la administración de una dosis eficaz de manguiferina y el efecto antialodínico se determinó en el tiempo en el que la manguiferina presentó el mejor efecto.

ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Se utilizaron los filamentos de Von Frey para determinar el 50% de umbral de retiro de la pata, para ello se empleó el método de Dixon (Dixon, 1980), en donde se emplea una serie de filamentos, comenzando con el que genera una presión de 2g, estos filamentos son colocados en la planta de la pata de la rata de manera consecutiva. El levantamiento o retiro de la pata se considera una respuesta positiva, mientras que una inactividad o falta de respuesta se considera negativa, con lo cual se procede al empleo de un filamento de peso menor o mayor, respectivamente. En caso de que se generen cuatro o cinco respuestas negativas consecutivas será asignado un valor de 15 g o, por el contrario, si se dan cuatro respuestas positivas consecutivas se asignará un valor de 0.25 g. De acuerdo con Dixon (Dixon, 1980) el cálculo del umbral del 50% de retiro de la pata óptimo requiere de 6 cambios próximos en las respuestas de retiro después del cambio inicial. Los valores asignados a los resultados obtenidos se dieron gracias a la fórmula:

$$50\% \text{ Umbral} = \frac{10^{(Xf + \kappa\delta)}}{10,000}$$

Donde Xf es el valor (en unidades logarítmicas) del último filamento de Von Frey usado, κ es el valor obtenido a partir de las tablas de Dixon (Dixon, 1980) para calificar el patrón de respuestas positivas y/o negativas y δ es la media de las diferencias

entre los puntos fuertes de estímulo (en unidades logarítmicas). Se considerada que la alodinia está presente cuando el umbral de retiro está por debajo de los 4g.

Con el fin de determinar la dosis requerida para reducir el 50% de umbral de retiro de la pata, se calculó el Máximo Efecto Posible (%MEP) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%MEP = \left(\frac{(ABC_{MGF} - ABC_{SNL})}{(ABC_{Sham} - ABC_{SNL})} \right) \times 100$$

Donde ABC_{MGF} es el área bajo la curva de la evolución temporal de la disminución del 50% del umbral de retiro de la pata comparada con los grupos Sham y SNL. Todos los resultados experimentales se presentan como la media \pm el error estándar de los datos obtenidos de 6 animales por grupo. Las curvas se construyeron a partir del umbral de retiro de la pata en función del tiempo. Un incremento en el umbral de retiro de la pata del 50% fue considerado como un efecto antialodínico. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido de la prueba de Tukey o Bonferroni (según fuere el caso) para comparar las diferencias entre los tratamientos. Se consideró que existían diferencias estadísticas cuando se obtuviera un nivel de significancia $P < 0.05$.

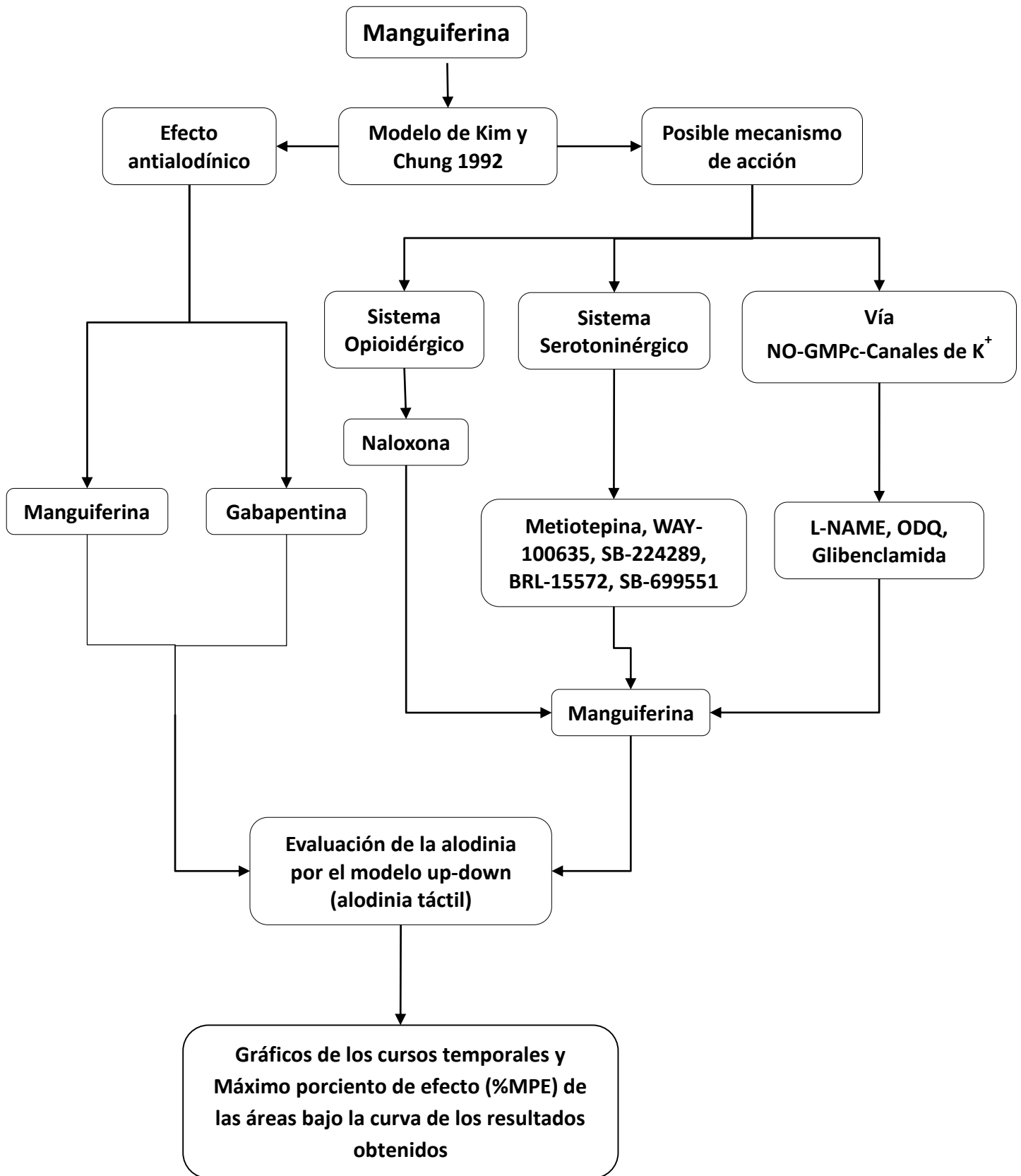


Figura 13. Diseño experimental para la evaluación del efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con lesión en o nervios espinales L5-L6.

RESULTADOS

Reproducibilidad del modelo de dolor neuropático

Con el propósito de demostrar que la ligadura de los nervios espinales era reproducible en nuestras manos, se realizó el curso temporal de la respuesta de retiro de la pata en animales que fueron ligados de los nervios L5-L6 (grupo SNL), así como en los animales a los que no se les realizó ningún procedimiento quirúrgico (grupo naive) y el grupo al cual se les expusieron los nervios, pero no fueron ligados (grupo sham o falsamente operados) durante un periodo de 15 días. La ligadura de los nervios espinales L5-L6 disminuyó el umbral de retiro de la pata disminuye a partir del día 1 manteniéndose de esta manera hasta el día 15 (Figura 14).

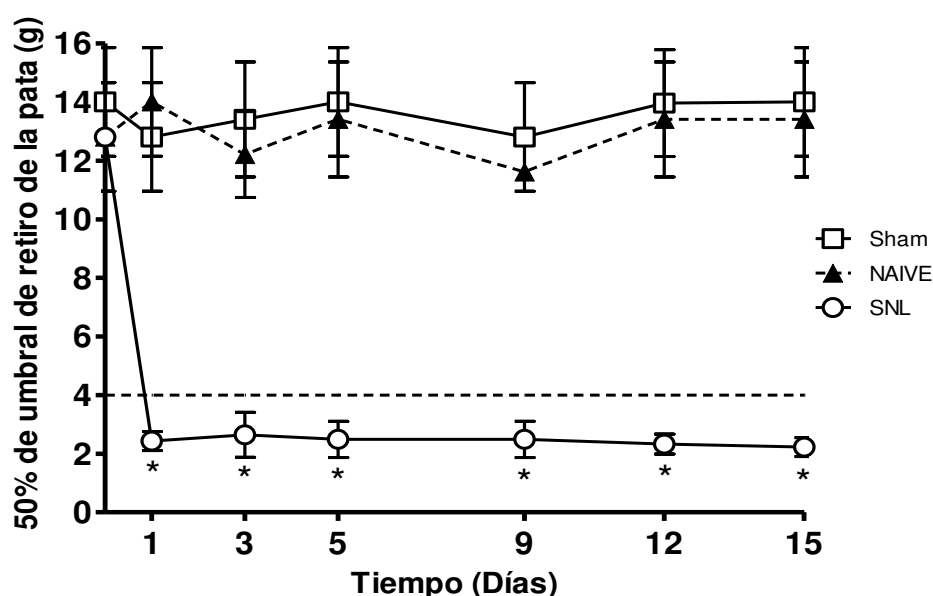


Figura 14. Curso temporal (en días) de la alodinia táctil en los grupos control. El umbral de retiro de la pata es mostrado después de ser estimuladas con los filamentos de von Frey (los cuales ejercen una presión diferente dependiendo del calibre empleado) esto en ratas con ligadura en los nervios espinales L5-L6 (Grupo SNL, círculos blancos), comparados contra los grupos de ratas falsamente operadas (Grupo Sham, cuadros blancos) y ratas a las cuales no se les realizó ninguna operación (Grupo Naive, triángulos negros). Los resultados están expresados como la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo. *Significativamente diferente ($P < 0.05$) contra el grupo control (SNL) determinado por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Bonferroni. Abreviaturas: SNL: Grupo de ratas con ligadura de nervios espinales.

Efectos de la manguiferina sobre la alodinia inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6.

La administración de dosis crecientes de manguiferina por vía oral (10, 30, 60 y 100 mg/kg) e intratecal (1, 10, 30 y 60 μ g/rata) produjeron una reducción significativa ($P < 0.5$) en el umbral de retiro de la pata de manera dosis-dependiente. Las dosis orales de 30 y 60 mg/kg (Figura 15 A y B) e intratecales de 30 y 60 μ g (Figura 15 C y D) de manguiferina por rata disminuyeron la sensación dolorosa (alodinia) a un punto en el cual no hay una diferencia significativa con los grupos de ratas falsamente operadas (sham) o de las que no tienen ninguna operación (Naive). El pico máximo de efecto se observó entre los 30 minutos, para la dosis de 30 μ g/rata y 60 minutos para la dosis de 60 μ g/rata con un punto máximo de 87% y de 88% en el umbral de retiro de la pata respectivamente. Además, se observó que la administración de gabapentina (fármaco antiepiléptico de uso común en el tratamiento del dolor neuropático) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004) produjo un efecto antialodínico que se mantuvo hasta 8 horas (datos no mostrados) después de la administración oral e intratecal de este fármaco con un pico máximo en su efecto antialodínico situado al rededor del 77% en el umbral de retiro de la pata (Figura 15).

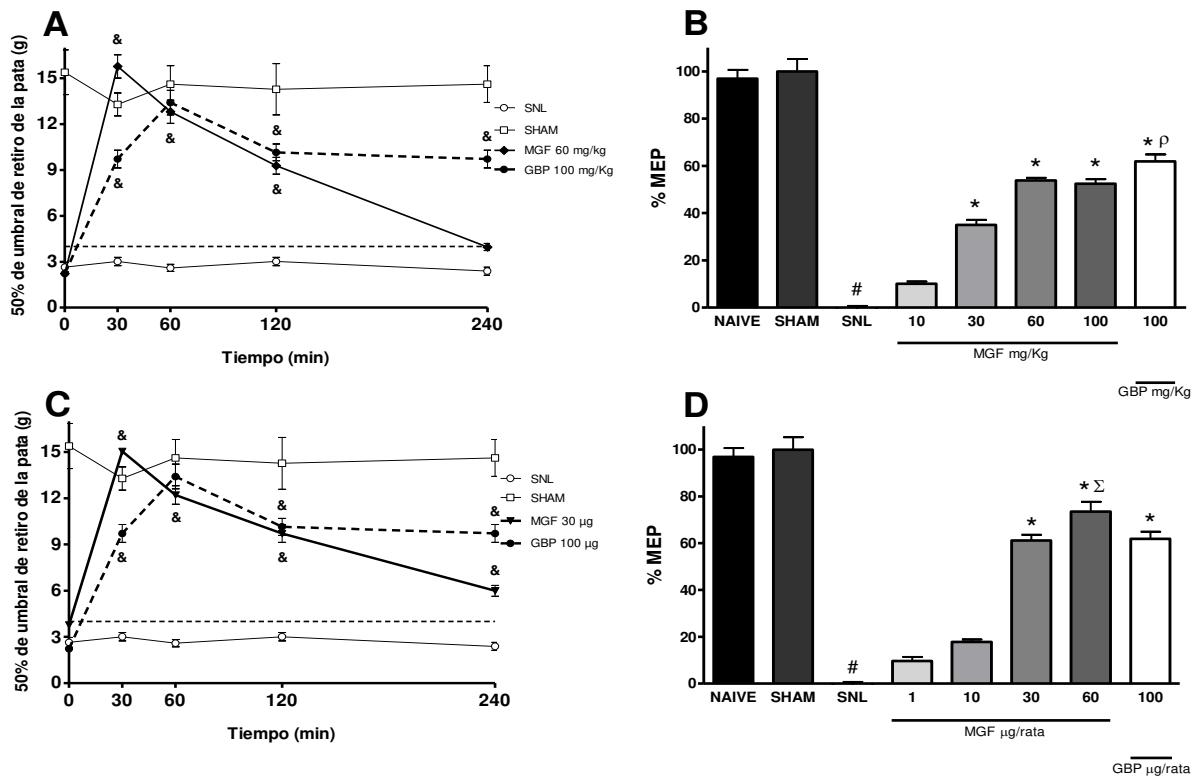


Figura 15. Efecto de la administración oral (A y B) e intratecal (C y D) de la manguiferina en ratas sometidas a la ligadura de nervios espinales L5-L6. Los datos muestran que la manguiferina reduce la sensación dolorosa (alodinia). Los resultados están expresados como la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del curso temporal del efecto antialodínico de la administración oral (A) e Intratecal (C) de manguiferina y gabapentina. Ambos tratamientos fueron significativamente diferentes ($^{\&}P < 0.05$) al grupo control SNL en un espacio de tiempo de 1 a 4 horas después de la administración, esto fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido por la prueba de Bonferroni. Las barras son la media \pm S.E.M. de seis animales por grupo del porcentaje de efecto máximo posible (%MEP) de la administración oral (B) e intratecal (D) de manguiferina y gabapentina sobre la evaluación del comportamiento nociceptivo (alodinia táctil) por el método de up-down. La significancia se consideró $^*P < 0.05$ vs grupo SNL, $^{\#}P < 0.05$ vs grupo Sham, $^{\rho}P < 0.05$ vs grupo MGF y $^{\Sigma}P < 0.05$ vs grupo GBP, determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de Tukey. SNL: Grupo de ratas con ligadura de nervios espinales, MGF: manguiferina, GBP: Gabapentina.

Efectos de la naloxona en el efecto antialodínico inducido por manguiferina

El pre-tratamiento intratecal con naloxona (50 µg/pata)(Doi y Jurna, 1982), antagonista no selectivo de los receptores μ , κ , y δ opioides, no bloqueó a ningún tiempo del análisis (Figura 16 A) el efecto antialodínico inducido por la manguiferina. Además, la administración de naloxona, *per se*, no afectó las conductas nociceptivas generadas por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Figura 16 B).

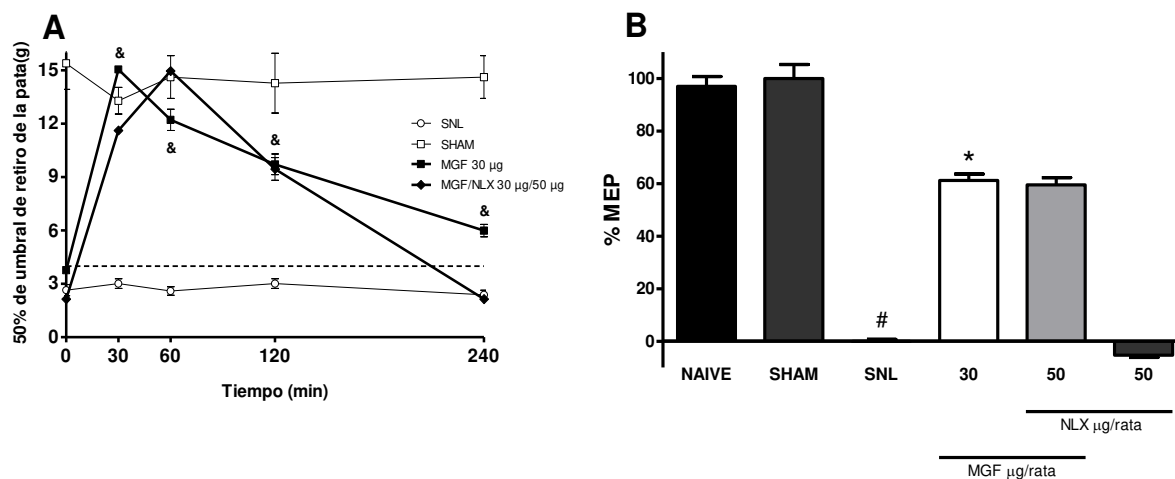


Figura 16. Efecto del pretratamiento con el antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona, sobre el efecto antialodínico inducido por la manguiferina. Los resultados son expresados como la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del curso temporal del efecto antialodínico de la administración Intratecal de la combinación de manguiferina y naloxona (A). El tratamiento no demostró ser significativamente diferente ($^{\circ}P < 0.05$) al grupo al cual le fue administrado manguiferina, mientras que el grupo de manguiferina si fue significativamente diferente ($^{\&}P < 0.05$) al grupo control SNL, en un espacio de tiempo de 1 a 4 horas después de la administración, esto fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido por la prueba de Bonferroni. Las barras son la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del porcentaje efecto máximo posible (%MEP) de la administración intratecal de la combinación de manguiferina y naloxona (B) sobre la evaluación del comportamiento nociceptivo (alodinia táctil) por el método de up-down. La significancia se consideró $^*P < 0.05$ vs grupo SNL y $^{\#}P < 0.05$ vs grupo Sham, determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de Tukey. SNL: Grupo de ratas con ligadura de nervios espinales, MGF: manguiferina, NLX: naloxona.

Efecto de metiotepina, SB-699551, SB-224289, BRL-15572 y WAY-100635 en el efecto antialodínico inducido por manguiferina

La administración intratecal de metiotepina (antagonista no selectivo de los receptores 5-HT, Figura 16) (Rocha-González, y col, 2010), previno significativamente ($P < 0.05$) el efecto antialodínico inducido por manguiferina (Figura 17 A). Además, la administración de metiotepina, *per se*, no afectó la alodinia táctil generada por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Figura 17 B). Asimismo la administración intratecal de SB-699551 (antagonista selectivo del receptor 5-HT_{5A}) (Muñoz-Islas et al., 2014), SB-224289 (antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B}) (Godínez-Chaparro et al., 2013), BRL-15572 (antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}) (Godínez-Chaparro et al., 2013) y WAY-100635 (antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}) (Rocha-González et al., 2005) previnieron significativamente ($P < 0.05$) el efecto antialodínico inducido por manguiferina (Figura 18 A, C, E y G). Además, la administración de SB-699551, SB-224289, BRL-1557 y WAY-100635, *per se*, no afectaron la alodinia táctil generada por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Figura 18 B, D, F y H).

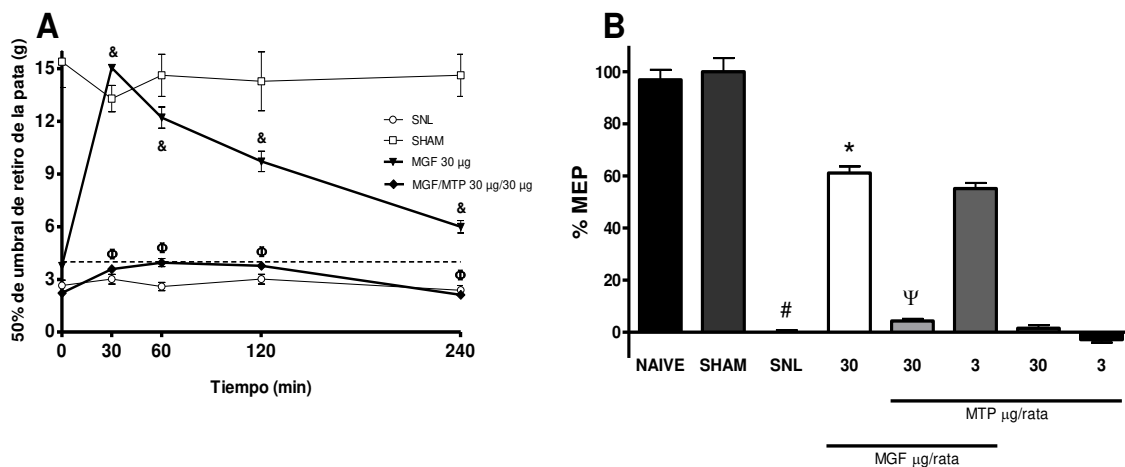


Figura 17. Efecto del pretratamiento con el antagonista no selectivo de los receptores serotoninérgicos metiotepina, sobre el efecto antialodínico inducido por la manguiferina. Los resultados son expresados como la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del curso temporal del efecto antialodínico de la administración Intratecal de la combinación de manguiferina y metiotepina (A). El tratamiento demostró ser significativamente diferente ($^{\phi}P < 0.05$) al grupo al cual le fue administrado manguiferina, mientras que el grupo de manguiferina si fue significativamente diferente ($^{\&}P < 0.05$) al grupo control SNL, en un espacio de tiempo de 1 a 4 horas después de la administración, esto fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido por la prueba de Bonferroni. Las barras son la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del porcentaje efecto máximo posible (%MEP) de la administración intratecal de la combinación de manguiferina y metiotepina (B) sobre la evaluación del comportamiento nociceptivo (alodinia táctil) por el método de up-down. La significancia se consideró $^*P < 0.05$ vs grupo SNL, $^{\#}P < 0.05$ vs grupo Sham y $^{\psi}P < 0.05$ vs grupo MGF, determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de Tukey. SNL: Grupo de ratas con ligadura de nervios espinales, MGF: manguiferina, MTP: metiotepina.

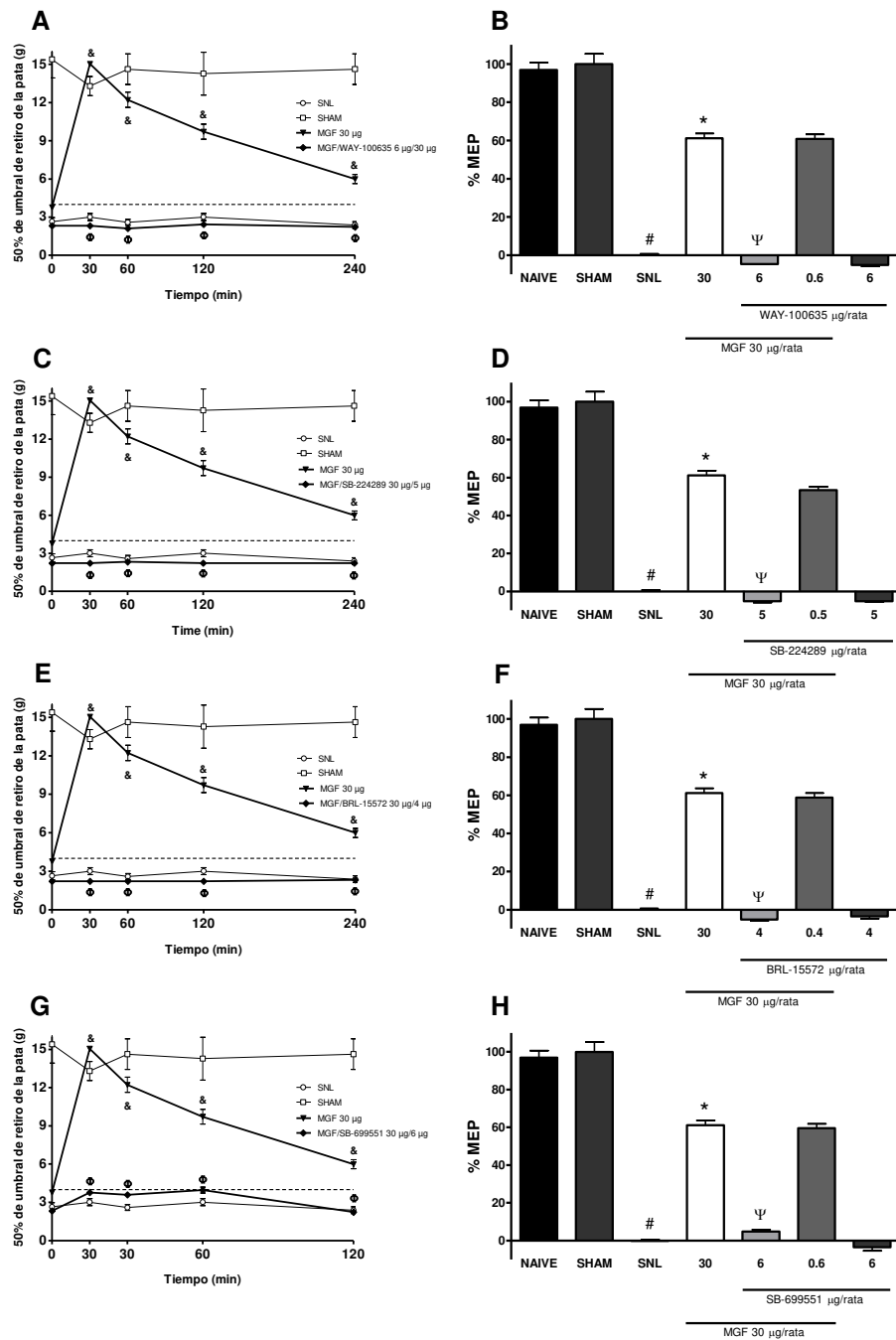


Figura 18. Efecto del pretratamiento con los antagonistas selectivos de los receptores serotoninérgicos, 5-HT_{1A} WAY-100635 (A y B), 5-HT_{1B} SB-224289 (C y D), 5-HT_{1D} BRL-15572 (E y F) y 5-HT_{5A} SB-699551 (G y H), sobre el efecto antialodínico inducido por la manguiferina. Los resultados son expresados como la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del curso temporal del efecto antialodínico de la administración Intratecal de la combinación de manguiferina y WAY-100635, SB-224289, BRL-15572 y SB-699551 (A, C, E y G), respectivamente. El tratamiento demostró ser significativamente diferente ($^{\circ}$ $P < 0.05$) al grupo al cual le fue administrado manguiferina, mientras que el grupo de manguiferina si fue significativamente diferente ($^{\&}$ $P < 0.05$) al grupo control SNL, en un espacio de tiempo de 1 a 4 horas después de la administración, esto fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido por la prueba de Bonferroni. Las barras son la media \pm S.E.M. de seis animales por grupo del porcentaje de efecto máximo posible (%MEP) de la administración intratecal de la combinación de manguiferina y WAY-100635, SB-224289, BRL-15572 y SB-699551 (B, D, F y H) sobre la evaluación del comportamiento nociceptivo (alodinia táctil) por el método de up-down. La significancia se consideró * $P < 0.05$ vs grupo SNL, $^{\#}$ $P < 0.05$ vs grupo Sham y $^{\psi}$ $P < 0.05$ vs grupo MGF, determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de Tukey. SNL: Grupo de ratas con ligadura de nervios espinales, MGF: manguiferina, MTP: metiotepina. 63

Efecto del L-NAME, ODQ, o glibenclamida en el efecto antialodínico inducido por manguiferina

El efecto antialodínico de la manguiferina también se bloqueó significativamente ($P < 0.05$) (Figura 19 A y C) por el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (NOS) L-NAME (Gibson et al., 1990) y el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble ODQ (Moro et al., 1996). La administración de L-NAME y ODQ, *per se*, no modificó la alodinia táctil generada por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Figura 19 B y D). Del mismo modo la administración intratecal de glibenclamida (bloqueador de los canales de K^+ sensibles a ATP) (Edwards y Weston, 1993; Hernández-Pacheco et al., 2008; Mixcoatl-Zecuatl et al., 2006) también bloqueó significativamente ($P < 0.05$) el efecto antialodínico de la manguiferina durante la totalidad de la duración del ensayo (Figura 19 E). Además, la administración de glibenclamida, *per se*, no afectó a las conductas neuropáticas generadas por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Figura 19 F).

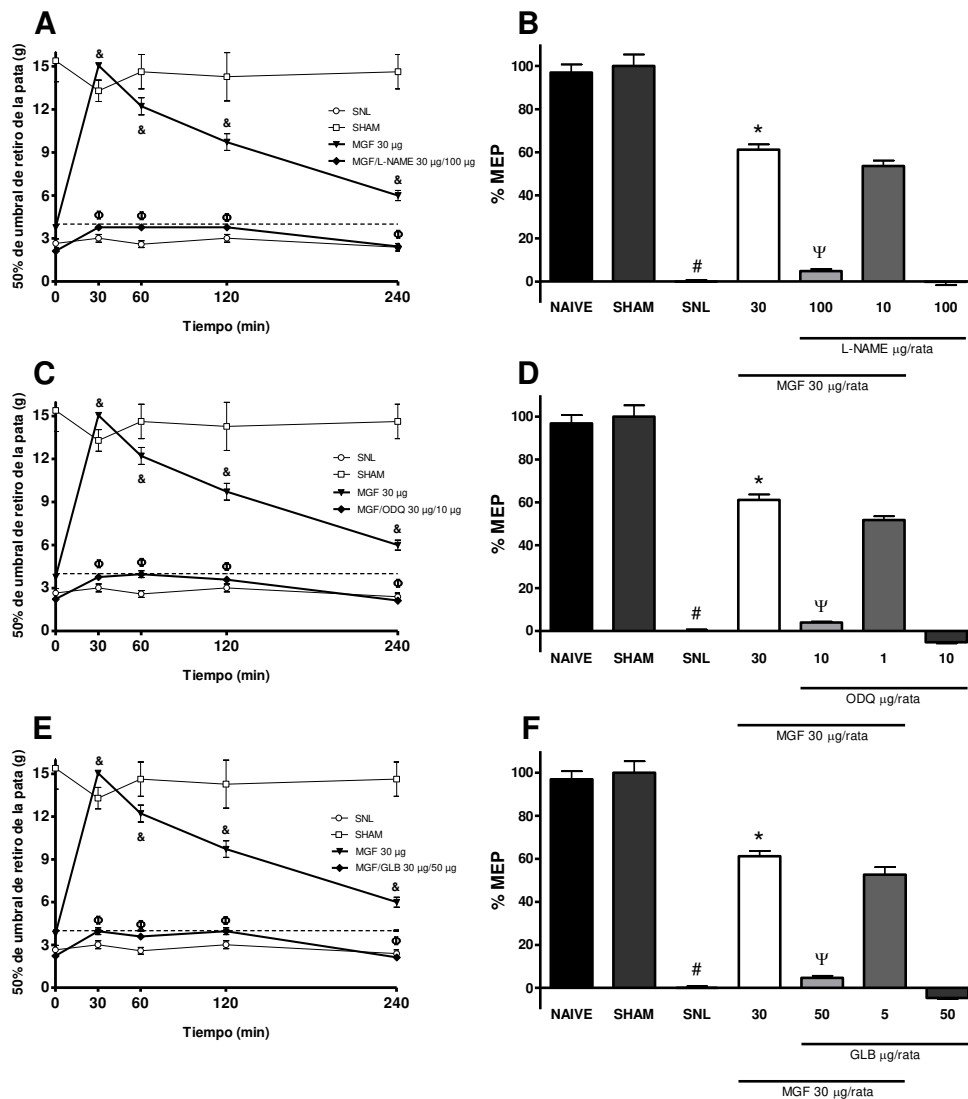


Figura 19. Efecto del pretratamiento con el inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, L-NAME (A y B), el inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ (C y D) y el bloqueador de canales de K^+ dependientes de ATP, glibenclamida (E y F), sobre el efecto antialodínico inducido por la manguiferina. Los resultados son expresados como la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del curso temporal del efecto antialodínico de la administración Intratecal de la combinación de manguiferina y L-NAME, ODQ y glibenclamida (A, C y E), respectivamente. El tratamiento demostró ser significativamente diferente ($^D P < 0.05$) al grupo al cual le fue administrado manguiferina, mientras que el grupo de manguiferina si fue significativamente diferente ($^E P < 0.05$) al grupo control SNL, en un espacio de tiempo de 1 a 4 horas después de la administración, esto fue determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido por la prueba de Bonferroni. Las barras son la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo del porcentaje de efecto máximo posible (%MEP) de la administración intratecal de la combinación de manguiferina y L-NAME, ODQ y glibenclamida (B, D y F) sobre la evaluación del comportamiento nociceptivo (alodinia táctil) por el método de up-down. La significancia se consideró $^* P < 0.05$ vs grupo SNL, $^# P < 0.05$ vs grupo Sham y $^\Psi P < 0.05$ vs grupo MGF, determinado por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de Tukey. SNL: Grupo de ratas con ligadura de nervios espinales, MGF: manguiferina, GLB: glibenclamida.

DISCUSIÓN

Las observaciones del comportamiento general de las ratas sugieren que el dolor espontáneo se desarrolla en la extremidad posterior ipsilateral después del procedimiento quirúrgico. Mientras las ratas descansaban en sus jaulas estas lamian repetidas veces de la pata trasera del lado operado seguido por la inmovilidad durante unos pocos segundos sin ningún tipo de estímulo externo aparente. También se observó que algunas de las ratas lamían los dedos de sus patas. A pesar de la presencia de signos de dolor espontáneo que eran característicos como el evitar apoyar la pata ipsilateral a la lesión durante periodos prolongados, estremecimiento, entre otros, ninguno de los animales en los grupos analizados mostró señales de autotomía lo que concuerda con lo reportado por Kim y Chung en 1992 (Kim y Chung, 1992).

Reproducibilidad del modelo propuesto por Kim y Chung en 1992

Señales de la generación de alodinia

Las ratas en los grupos a los que se les ligaron los nervios espinales desarrollaron una marcada sensibilidad a la estimulación mecánica inocua después de la lesión del nervio periférico. Lo que indica que la ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo alodinia táctil que fue visible en la pata ipsilateral. Sumado a esto, las ratas analizadas levantaban la pata cuando ésta era estimulada con los filamentos de von Frey. Estos reflejos de retiro de la pata fueron claros comportamientos aversivos asociados a la presión generada por los filamentos (≤ 4 g), lo cual es un indicativo del desarrollo de la alodinia, síndrome característico de la presencia de dolor neuropático. Además, las ratas mostraron signos de dolor sostenido después de la terminación de la estimulación. Estos comportamientos indican que un contacto ligero que por lo general no es doloroso, evoca dolor en la pata que recibió una lesión del nervio periférico (Kim y Chung, 1992). Aunque un aumento de la sensibilidad mecánica es obvia desde el primer día después de la operación su desarrollo no es inmediato pues se tarda horas para iniciar y poco a poco se incrementa durante varios días después de la lesión del nervio.

Los datos sugieren que todos los animales a los que les fueron ligados los nervios espinales L5-L6 presentaron alodinia no así los animales a los cuales sólo se les expusieron sin ser ligados (ratas sham). En consecuencia el grupo sham no presentó

alodinia. En conjunto y teniendo en cuenta que nuestras ratas presentaron alodinia desde el día 1 hasta el día 15 donde los animales cuyos nervios fueron ligados presentaron alodinia a partir del día 1 posterior al procedimiento quirúrgico y dado que esto concuerda con lo reportado por Kim y Chung en 1992 (Kim y Chung, 1992), podemos argumentar que el modelo experimental utilizado en el laboratorio fue reproducible en nuestras manos.

Efecto antialodínico de la manguiferina

La administración de manguiferina por vía oral (10 – 100 mg/kg) e intratecal (1 – 60 µg/rata) previene la sensación dolorosa (alodinia) inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 en ratas de manera dosis-dependiente. Esta reversión de la sensación dolorosa es representada por el aumento del umbral de retiro de la pata hasta un punto donde es similar al grupo Naive y al grupo Sham. A nuestro conocimiento éste es el primer informe que demuestra el efecto antialodínico producido por manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5 y L6.

Por otra parte, informes anteriores muestran el efecto antihipernociceptivo inducido por la manguiferina en ratas con ligadura en el nervio ciático (Garrido-Suárez et al., 2014). En ese estudio, la manguiferina se administró por vía intraperitoneal a los 7 y 14 días posteriores a la operación donde las conductas fueron cuantificadas en la pata ipsilateral por el método de pinchazo (*pinprick method*) (Tal y Bennett, 1994; Garrido-Suárez et al., 2014) desmotrando que este fármaco es capaz de reducir las conductas nociceptivas. En conjunto, los datos sugieren que la manguiferina administrada de manera sistémica e intratecal es capaz de ejercer efectos antialodínicos en ratas a las que les fueron ligados los nervios espinales L5-L6 similares e inclusive en algunos casos superiores a dosis de 30 µg/rata por vía intratecal y 60 mg/Kg por vía oral al generado por la gabapentina, fármaco antiepiléptico de primera línea ampliamente utilizado en el tratamiento del dolor neuropático (Eisenberg, 2008; Hagen y Rekind, 2015; Kraychete y Sakata, 2011).

Posible mecanismo de acción que subyace al efecto antialodínico de la manguiferina

Hasta el momento, el mecanismo de acción de la manguiferina a nivel central es desconocido pero evidencias previas demuestran que la manguiferina con su alta eficacia antioxidante (Rajendran et al., 2008) es capaz de participar en varias vías de

modulación del dolor como lo son los receptores opioides, los receptores serotoninérgicos aunque estos últimos no demostraron alguna participación en el efecto antinociceptivo de la manguiferina en el modelo de formalina a nivel periférico (Izquierdo et al., 2013), además la manguiferina demostró en el mismo modelo que la vía del óxido nítrico y GMP-cíclico activador de los canales de K^+ participa de manera activa en el efecto antinociceptivo de la manguiferina a nivel periférico (Izquierdo et al., 2013), por otra parte otros antioxidantes han demostrado la posible participación de estas vías en la modulación del dolor en diferentes modelos de neuropatías dolorosas (Amin et al., 2014; Krupkova et al., 2014; Quiñonez-Bastidas et al., 2013; Xifró et al., 2015). Es por eso que con el fin de explorar el posible mecanismo de acción del efecto antialodínico de la manguiferina a nivel central se evaluó la participación del sistema opioidérgico, serotoninérgico, así como la participación de la vía NO-GMPc-canales de K^+ (vía del óxido nítrico y GMP-cíclico activador de los canales de K^+).

Posible participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico de la manguiferina

La naloxona (antagonista no selectivo de los receptores opioides) no revirtió el efecto antialodínico de la manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6. La falta de efecto no podía atribuirse a las dosis de naloxona utilizados ya que esta dosis ha demostrado ser lo suficientemente alta para bloquear los receptores opioides en varios modelos de dolor (Doi y Jurna, 1982). Los resultados pueden respaldarse con estudios que demuestran la poca eficacia que los fármacos opioides han demostrado en el tratamiento del dolor neuropático (Besson et al., 2008; Dickenson, 2014; Przewlocki y Przewlocka, 2005). Es por esto que nuestros datos sugieren que el efecto antialodínico de la manguiferina produce su efecto de forma independiente de los receptores opioides.

Posible participación del sistema serotoninérgico en el efecto antialodínico de la manguiferina

La metiotepina previno el efecto antialodínico inducido por la manguiferina. Dado que la metiotepina muestra una afinidad moderada por los subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2/5/7} (Hoyer et al., 1994), nuestros resultados sugieren que algunos de estos receptores pueden desempeñar un papel en el efecto antialodínico

de la manguiferina en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6. Por otra parte, hay pruebas de que la activación de los receptores 5-HT_{1/5} está vinculada a la antinocicepción (Doly et al., 2004; Granados-Soto et al., 2010; Kayser et al., 2007). Además, la participación de receptores 5-HT_{2/7} es poco probable ya que su activación se asocia con fenómenos pronociceptivos (Meuser et al., 2002; Nakajima et al., 2009; Rahman et al., 2011; Rocha-González et al., 2005). Debido a que la metiotepina también es afín al subtipo de receptores serotoninérgicos 5-HT₂ se decidió utilizar una dosis menor (3 µg/rata) para observar si ésta no generaba una respuesta aumentada al dolor por activación de los receptores 5-HT₂ debido a que estos receptores han sido asociados a fenómenos pronociceptivos (Meuser et al., 2002; Nakajima et al., 2009; Rahman et al., 2011; Rocha-González et al., 2005). Gracias a esto se pudo descartar la posible participación de este tipo de receptor serotoninérgico.

Para poder observar la posible participación de los receptores serotoninérgicos de las familias 5-HT_{1/5} se utilizaron antagonistas selectivos de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{5A}. Donde los antagonistas selectivos de dichos receptores (WAY-100635, SB-224289, BRL-15572 y SB-699551, respectivamente) impidieron el efecto antialodínico inducido por la manguiferina en ratas con la ligadura en los nervios espinales L5-L6. Con base en la afinidad de los antagonistas empleados (Forster et al., 1995; Godínez-Chaparro et al., 2013; Hagan et al., 1997; Laporte et al., 1994; Muñoz-Islas et al., 2014), nuestro estudio sugiere la posible participación de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{5A} en el efecto antialodínico de la manguiferina en ratas neuropáticas.

Posible participación de la vía del óxido nítrico y GMP-cíclico activador de los canales de k⁺ en el efecto antialodínico de la manguiferina

Por otra parte, el efecto antialodínico de la manguiferina también fue bloqueado por el inhibidor de la de óxido nítrico sintetasa (NOS), L-NAME (Gibson et al., 1990) y el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, ODQ (Moro et al., 1996). Los datos sugieren que la activación de la vía de NO-GMPcíclico juega un papel importante en el efecto antialodínico inducido por la manguiferina a nivel espinal. Esto concuerda con estudios que demuestran que la lesión de un nervio periférico induce una sobreexpresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) en las neuronas sensoriales de la médula espinal lo que sugiere una posible implicación del NO en el cambio en la neuroplasticidad como consecuencia de la creación y el mantenimiento de los estados de dolor neuropático

(Luo et al., 1999; Verge et al., 1992; Yonehara et al., 2003; Zhang et al., 1993). Además se ha demostrado que la activación de la vía de señalización NO-GMPcíclico participa en la analgesia producida por diversos fármacos en particular la de aquellos que actúan en sitios periféricos (Chiari et al., 2000; Duarte et al., 1992; Duarte y Ferreira, 1992; Herrero et al., 2003; Jain et al., 2001; Lázaro-Ibáñez et al., 2001). Del mismo modo la administración intratecal de glibenclamida (bloqueador de los canales de K⁺ sensibles a ATP) (Edwards y Weston, 1993; Hernández-Pacheco et al., 2008; Mixcoatl-Zecuatl et al., 2006), también bloqueó el efecto antialodínico de la manguiferina sugiriendo que la apertura de los canales de K⁺ también está involucrado en el efecto antialodínico producido por la manguiferina a nivel central.

En conjunto estos datos sugieren que la manguiferina produce su efecto antialodínico al favorecer la vía NO-GMP cíclico activador de los canales de K⁺ sensibles al ATP.

Posible mecanismo de acción que subyace en el efecto antialodínico de la manguiferina, mediado por los receptores serotoninérgicos y por la vía del NO-GMPc-canales de K⁺ dependientes de ATP

Hasta el momento el mecanismo de acción de la manguiferina a nivel central es desconocido, pero una posible explicación para el efecto antialodínico de la manguiferina, podría involucrar a los receptores a 5-HT y a la vía del NO-GMPc-canales de K⁺ dependientes de ATP. Esto sería posible por la interacción de la manguiferina ya sea con la NOS, sobre la GCs o directamente sobre los canales de K⁺ dependientes de ATP. Además de una probable interacción con los receptores serotoninérgicos. Esto debido a su alta eficacia antioxidante (Rajendran et al., 2008) con lo cual podría ser capaz de participar en varias rutas de modulación del dolor.

La acción de la manguiferina en este mecanismo estaría guiada por la acción directa sobre la NOS lo que permitiría la activación de esta enzima que iniciaría la producción de NO el cual difundiría a través de las membranas desde su neurona productora hasta su neurona efectora en donde se uniría y activaría a la GCs iniciando así la producción de GMPc (Davis et al., 2001). La manguiferina también podría actuar sobre la GCs activandola y aumentando así la concentración de GMPc (Davis et al., 2001), el cual podría cumplir 3 rutas posibles:

- 1) La activación de PKG que permitiría la apertura de canales de K⁺ y cierre de canales de Ca²⁺ (Cury et al., 2011);

- 2) Por acción directa del GMPc sobre los canales de K⁺ promoviendo la apertura de éstos (Cury et al., 2011). Aunque también la manguiferina podría actuar directamente sobre los canales de K⁺ dependientes de ATP provocando la apertura de estos promoviendo así efectos analgésicos por medio de la vía NO-GMPc-canales de K⁺ dependientes de ATP; o,
- 3) Por la participación del GMPc en la liberación de neurotransmisores entre ellos la 5-HT (Guevara-Guzman et al., 1994; Kaehler et al., 1999; Lorrain y Hull, 1993; Prast y Philippu, 2001; Vincent, 2010).

La liberación de 5-HT al espacio sináptico induciría la unión de esta a sus receptores 5-HT_{1A,B,D} y 5A los cuales al estar acoplados a una proteína G_i (Francken et al., 2000, 1998; Rocha-González et al., 2009), activarían canales de K⁺ promoviendo además el cierre de canales de Ca²⁺ lo que provocaría una hiperpolarización de la membrana la cual evitaría el envío de la señal y generaría por lo tanto una disminución en la sensación dolorosa. La liberación de 5-HT aumentaría, además, la concentración de este neurotransmisor en el espacio sináptico, el cual se ha visto tiene efectos analgésicos, dosis-dependientes, cuando es administrada de manera intratecal (Bardin et al., 2000, 1997; Hylden y Wilcox, 1983; Schmauss et al., 1983; Yoshimura y Furue, 2006) (Figura 20). La manguiferina también podría interactuar directamente con los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A,B,D} y 5A promoviendo así la activación de los mismos generando así los fenómenos de analgesia.

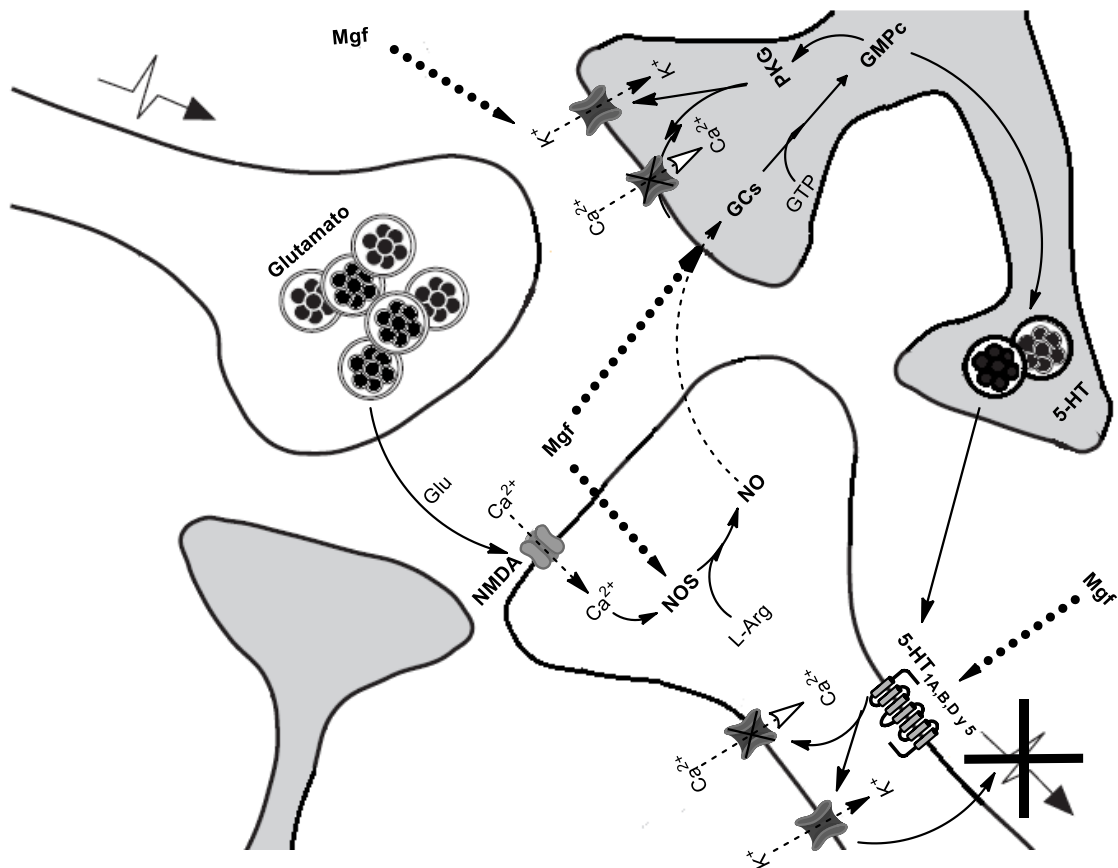


Figura 20. Posible mecanismo de acción de la manguiferina al ser administrada intratecalmente. La entrada de iones de Ca^{2+} (mediada por los receptores NMDA) activaría a la NOS que iniciaría la producción de NO que una vez formado difundiría de la neurona productora a la neurona efectora donde se uniría a su receptor la GCs que al ser activada iniciaría la síntesis de GMPc el cual puede tomar 3 rutas: Por un lado activar la PKG que a su vez permitiría la apertura de canales de K^+ y el cierre de canales de Ca^{2+} ; también por acción directa del GMPc sobre los canales de K^+ o actuando directamente sobre la liberación de 5-HT al medio; la 5-HT una vez liberada se uniría a sus receptores (5-HT_{5A} o 1A, B o D) los cuales promoverían la apertura y cierre de los canales de K^+ y Ca^{2+} respectivamente lo que evitaría el envío de la señal y por lo tanto, una disminución en la sensación dolorosa. La manguiferina podría ser capaz de actuar sobre la NOS, la GCs, los canales de K^+ dependientes de ATP o sobre los receptores serotoninérgicos. Abreviaturas: NMDA: N-Metil-D-aspartato; NOS: óxido nítrico sintasa; NO: óxido nítrico; L-Arg: L-Arginina; GCs: guanilato ciclasa soluble; GTP: guanosín trifosfato; GMPc: guanosín monofosfato cíclico; PKG: Proteína cinasa G; 5-HT: serotonina; Mgf: manguiferina; Glu: glutamato.

CONCLUSIONES

1. Se logró reproducir en el laboratorio el modelo animal de dolor neuropático que consiste en la ligadura de los nervios espinales L5-L6, el cual manifiesta alodinia síntoma clásico del dolor neuropático.
2. Los resultados muestran que la manguiferina administrada por vía oral e intratecal reduce de manera dosis dependiente la alodinia generada por la ligadura de los nervios espinales L5-L6.
3. El efecto antialodínico inducido por la manguiferina está posiblemente mediado por el sistema serotoninérgico implicando la activación de los receptores de serotonina 5-HT_{5A}, 1A, 1B y 1D a nivel central. Además, los datos sugieren la posible participación de la vía del NO-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP, no así la participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico de la manguiferina en la evaluación de la alodinia táctil.
4. Estos resultados sugieren que la manguiferina es capaz de producir un efecto antialodínico similar al de gabapentina (fármaco antiepiléptico de primera línea utilizado en el tratamiento del dolor neuropático).

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlbeck, K., 2011. Opioids: a two-faced Janus. *Curr. Med. Res. Opin.* 27, 439–448.
- Ali, Z., Wu, G., Kozlov, A., Barasi, S., 1994. The actions of 5-HT₁ agonists and antagonists on nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Brain Res.* 661, 83–90.
- Allen, T.G.J., Brown, D.A., 2004. Modulation of the excitability of cholinergic basal forebrain neurones by K_{ATP} channels. *J. Physiol.* 554, 353–370.
- Amaya-Castellanos, E., Pineda-Farias, J.B., Castañeda-Corral, G., Vidal-Cantú, G.C., Murbartián, J., Rocha-González, H.I., Granados-Soto, V., 2011. Blockade of 5-HT₇ receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 591–597.
- Amin, B., Abnous, K., Motamedshariaty, V., Hosseinzadeh, H., 2014. Attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis by ethanolic and aqueous extracts of *Crocus sativus* L. stigma after chronic constriction injury of rats. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 86, 1821–1832.
- Andreu, G.P., Delgado, R., Velho, J.A., Curti, C., Vercesi, A.E., 2005. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur. J. Pharmacol.* 513, 47–55.
- Apkarian, A.V., Hashmi, J.A., Baliki, M.N., 2011. Pain and the brain: Specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* 152, S49–S64.
- Apontes, P., Liu, Z., Su, K., Benard, O., Youn, D.Y., Li, X., Li, W., Mirza, R.H., Bastie, C.C., Jelicks, L.A., Pessin, J.E., Muzumdar, R.H., Sauve, A.A., Chi, Y., 2014. Mangiferin stimulates carbohydrate oxidation and protects against metabolic disorders induced by high-fat diets. *Diabetes* 63, 3626–3636.
- Arozal, W., Suyatna, F.D., Juniantito, V., Rosdiana, D.S., Amurugam, S., Aulia, R., Monayo, E.R., Siswandi, R., 2015. The Effects of Mangiferin (*Mangifera indica* L) in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. *Drug Res.* 65, 574–580.
- Ashcroft, F.M., 2005. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 115, 2047–2058.
- Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M., Price, T.D., 1963. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 330–334.

- Attal, N., 2001. Pharmacologic treatment of neuropathic pain. *Acta Neurol. Belg.* 101, 53–64.
- Attal, N., Cruccu, G., Baron, R., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Nurmikko, T., European Federation of Neurological Societies, 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 17, 1113-e88.
- Attal, N., Cruccu, G., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Nurmikko, T., Sampaio, C., Sindrup, S., Wiffen, P., EFNS Task Force, 2006. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 13, 1153–1169.
- Avila-Rojas, S.H., Velázquez-Lagunas, I., Salinas-Abarca, A.B., Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J.B., Granados-Soto, V., 2015. Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res.* 1622, 377–385.
- Ballantyne, J.C., Cousins, M., Giamberardino, M., Jamison, R., McGrath, P., Rajagopal, M., Smith, M., Sommer, C., Wittink, H., 2010. Pharmacological management of neuropathic pain. *Pain Clin. Updat.*
- Bao, L., Kaldany, C., Holmstrand, E.C., Cox, D.H., 2004. Mapping the BKCa Channel's "Ca²⁺ Bowl." *J. Gen. Physiol.* 123, 475–489.
- Bard, J.A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T.A., Weinshank, R.L., 1993. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 268, 23422–23426.
- Bardin, L., 2011. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav. Pharmacol.* 22, 390–404.
- Bardin, L., Bardin, M., Lavarenne, J., Eschalier, A., 1997. Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp. Brain Res.* 113, 81–87.
- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschalier, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86, 11–18.
- Barnes, N.M., Hales, T.G., Lummis, S.C.R., Peters, J.A., 2009. The 5-HT₃ receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56, 273–284.
- Barnes, N.M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.

- Basbaum, A.I., Fields, H.L., 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 309–338. doi:10.1146/annurev.ne.07.030184.001521
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424-1437.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- Beitz, A.J., Shepard, R.D., Wells, W.E., 1983. The periaqueductal gray-raphé nucleus projection contains somatostatin, neurotensin and serotonin but not cholecystinin. *Brain Res.* 261, 132–137.
- Bennett, M.I., Smith, B.H., Torrance, N., Lee, A.J., 2006. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. *Pain* 122, 289–294.
- Besson, J.M., Chaouch, A., 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.* 67, 67–186.
- Besson, M., Piguet, V., Dayer, P., Desmeules, J., 2008. New approaches to the pharmacotherapy of neuropathic pain. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 1, 683–693.
- Bezannilla, F., 2000. The Voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80, 555–592.
- Bhatia, H.S., Candelario-Jalil, E., de Oliveira, A.C.P., Olajide, O.A., Martínez-Sánchez, G., Fiebich, B.L., 2008. Mangiferin inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in activated rat microglial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 253–258.
- Bhattacharya, S.K., Sanyal, A.K., Ghosal, S., 1972. Monoamine oxidase-inhibiting activity of mangiferin isolated from *Canscora decussata*. *Naturwissenschaften* 59, 651.
- Bichet, D., Haass, F.A., Jan, L.Y., 2003. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 957–967.
- Bittner, S., Budde, T., Wiendl, H., Meuth, S.G., 2010. From the Background to the Spotlight: TASK Channels in Pathological Conditions. *Brain Pathol.* 20, 999–1009.
- Bley, K.R., Hunter, J.C., Eglen, R.M., Smith, J.A., 1998. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 141–147.

- Blondeau, N., Plamondon, H., Richelme, C., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 2000. K_{ATP} channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* 100, 465–474.
- Blondel, O., Vandecasteele, G., Gastineau, M., Leclerc, S., Dahmoune, Y., Langlois, M., Fischmeister, R., 1997. Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. *FEBS Lett.* 412, 465–474.
- Boadle-Biber, M.C., 1993. Regulation of serotonin synthesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60, 1–15.
- Boess, F.G., Martin, I.L., 1994. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33, 275–317.
- Bohlega, S., Alsaadi, T., Amir, A., Hosny, H., Karawagh, A.M., Moulin, D., Riachi, N., Salti, A., Shelbaya, S., 2010. Guidelines for the pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain: expert panel recommendations for the middle East region. *J. Int. Med. Res.* 38, 295–317.
- Bordés, G.R., Martínez, B. M., García, O. E., Guisado, B. R., 1994. Inflamación. *Dep. Enferm. Fisiol.* 1–8.
- Bowker, R.M., Westlund, K.N., Sullivan, M.C., Wilber, J.F., Coulter, J.D., 1983. Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathways from the raphe nuclei: a multiple transmitter complex. *Brain Res.* 288, 33–48.
- Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Pineda-Farias, J.B., Barragán-Iglesias, P., López-Sánchez, P., Granados-Soto, V., 2012. Role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors in development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 246–257.
- Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1992. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8, 3–11.
- Bruchas, M.R., Chavkin, C., 2010. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology (Berl.)* 210, 137–147.
- Bullitt, E., Light, A.R., 1989. Intraspinial course of descending serotonergic pathways innervating the rodent dorsal horn and lamina X. *J. Comp. Neurol.* 286, 231–242.
- Burnstock, G., Wood, J.N., 1996. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 526–532.
- Bushnell, C., Basbaum, A.I., 2009. 5.25 What is a wide-dynamic-range cell?

- Campos-Esparza, M.R., Sánchez-Gómez, M.V., Matute, C., 2009. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium* 45, 358–368.
- Caraceni, A., Zecca, E., Martini, C., De Conno, F., 1999. Gabapentin as an adjuvant to opioid analgesia for neuropathic cancer pain. *J. Pain Symptom Manage.* 17, 441–445.
- Cardenas, C.G., Mar, L.P., Vysokanov, A.V., Arnold, P.B., Cardenas, L.M., Surmeier, D.J., Scroggs, R.S., 1999. Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* 518 (Pt 2), 507–523.
- Carregal, A., 2010. Fisiología de la nocicepción y de sus mecanismos reguladores. *Trat. Dolor* 1–80.
- Carter, G.T., Galer, B.S., 2001. Advances in the management of neuropathic pain. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 12, 447–459.
- Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H.I., Araiza-Saldaña, C.I., Ambriz-Tututi, M., Vidal-Cantú, G.C., Granados-Soto, V., 2009. Role of peripheral and spinal 5-HT₆ receptors according to the rat formalin test. *Neuroscience* 162, 444–452.
- Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H.I., Godínez-Chaparro, B., Jiménez-Andrade, J.M., Granados-Soto, V., 2011. Role of the spinal Na⁺/H⁺ exchanger in formalin-induced nociception. *Neurosci. Lett.* 501, 4–9.
- Cervantes-Durán, C., Rocha-González, H.I., Granados-Soto, V., 2013. Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in the pronociceptive and antinociceptive effects of fluoxetine in rats. *Neuroscience* 252, 396–409.
- Cervantes-Durán, C., Vidal-Cantú, G.C., Godínez-Chaparro, B., Granados-Soto, V., 2016. Role of spinal 5-HT₂ receptors subtypes in formalin-induced long-lasting hypersensitivity. *Pharmacol. Rep.* 68, 434–442.
- Cervero, F., 2009. Spinal cord hyperexcitability and its role in pain and hyperalgesia. *Exp. Brain Res.* 196, 129–137.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.
- Chiari, A., Li, X.H., Xu, Z., Pan, H.L., Eisenach, J.C., 2000. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. *Neuroscience* 101, 189–196.

- Childers, S.R., Creese, I., Snowman, A.M., Snyder, S.H., 1979. Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides. *Eur. J. Pharmacol.* 55, 11–18.
- Childers, S.R., Snyder, S.H., 1978. Guanine nucleotides differentiate agonist and antagonist interactions with opiate receptors. *Life Sci.* 23, 759–761.
- Chiueh, C.C., 1994. Neurobiology of NO· and ·OH: Basic research and clinical Relevance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 738, 279–281.
- Choi, Y., Yoon, Y.W., Na, H.S., Kim, S.H., Chung, J.M., 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59, 369–376.
- Chong, M.S., Bajwa, Z.H., 2003. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J. Pain Symptom Manage.* 25, S4–S11.
- Cingolani, H.E., Houssay, A.B., 2000. *Fisiologia humana de Houssay/ Human Physiology of Houssay*, 7th ed. El Ateneo.
- Clark, A.K., Old, E.A., Malcangio, M., 2013. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J. Pain Res.* 6, 803–814.
- Coggeshall, R.E., Lekan, H.A., Doubell, T.P., Allchorne, A., Woolf, C.J., 1997. Central changes in primary afferent fibers following peripheral nerve lesions. *Neuroscience* 77, 1115–1122.
- Colpaert, F.C., Tarayre, J.P., Koek, W., Pauwels, P.J., Bardin, L., Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Cosi, C., Carilla-Durand, E., Assié, M.B., Vacher, B., 2002. Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology* 43, 945–958.
- Colton, C., Gilbert, D., 2007. *Reactive oxygen species in biological systems: An interdisciplinary approach*. Springer Science & Business Media.
- Costigan, M., Woolf, C.J., 2000. Pain: molecular mechanisms. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 1, 35–44.
- Craven, K.B., Zagotta, W.N., 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 375–401.
- Cury, Y., Picolo, G., Gutierrez, V.P., Ferreira, S.H., 2011. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25, 243–254.
- Dar, A., Faizi, S., Naqvi, S., Roome, T., Zikr-ur-Rehman, S., Ali, M., Firdous, S., Moin, S.T., 2005. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 596–600.

- Das, J., Ghosh, J., Roy, A., Sil, P.C., 2012. Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2-NFκB pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 35–47.
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., Murad, F., 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 203–236. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.203
- Denninger, J.W., Marletta, M.A., 1999. Guanylate cyclase and the ·NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1411, 334–350.
- Deseure, K., Koek, W., Adriaensen, H., Colpaert, F.C., 2003. Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine_{1A} agonist (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone (F 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 505–514.
- Dhawan, B.N., Cesselin, F., Raghupir, R., Reisine, T., Bradley, P.B., Portoghese, P.S., Hamon, M., 1996. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* 48, 567–592.
- Díaz, A., Ruíz, F., Flórez, J., Pazos, A., Hurlé, M.A., 1995. Regulation of dihydropyridine-sensitive Ca⁺⁺ channels during opioid tolerance and supersensitivity in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 1538–1544.
- Dickenson, A.H., 2014. Commentary on: Opioid and noradrenergic contributions of tapentadol in experimental neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* 562, 90.
- Diniz, D.A., Petrocchi, J.A., Navarro, L.C., Souza, T.C., Castor, M.G.M., Perez, A.C., Duarte, I.D.G., Romero, T.R.L., 2015. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 767, 94–97.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462. doi:10.1146/annurev.pa.20.040180.002301
- Dixon, W.J., 1965. The Up-and-Down Method for Small Samples. *J. Am. Stat. Assoc.* 60, 967–978.
- Doi, T., Jurna, I., 1982. Intrathecal pentobarbital prevents naloxone-induced facilitation of the tail-flick response in the rat. *Neurosci. Lett.* 32, 81–84.
- Doly, S., Fischer, J., Brisorgueil, M.-J., Vergé, D., Conrath, M., 2004. 5-HT_{5A} receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J. Comp. Neurol.* 476, 316–329.
- Dray, A., 1995. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* 75, 125–131.

- Duarte, I.D., dos Santos, I.R., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1992. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 217, 225–227.
- Duarte, I.D., Ferreira, S.H., 1992. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 171–174.
- Dworkin, R.H., 2009. Introduction: Recommendations for the diagnosis, assessment, and treatment of neuropathic pain. *Am. J. Med.* 122, S1-2.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., Portenoy, R.K., Rice, A.S.C., Stacey, B.R., Treede, R.-D., Turk, D.C., Wallace, M.S., 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237–251.
- Eckhardt, K., Ammon, S., Hofmann, U., Riebe, A., Gugeler, N., Mikus, G., 2000. Gabapentin enhances the analgesic effect of morphine in healthy volunteers. *Anesth. Analg.* 91, 185–191.
- Edwards, G., Weston, A.H., 1993. Induction of a glibenclamide-sensitive K-current by modification of a delayed rectifier channel in rat portal vein in insulinoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1280–1281.
- Eisenberg, E., 2008. European pain management discussion forum. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* 22, 235–238.
- Enyedi, P., Cziráj, G., 2010. Molecular background of leak K⁺ currents: Two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* 90, 559–605.
- Feil, R., Kleppisch, T., 2008. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb. Exp. Pharmacol.* 529–560. doi:10.1007/978-3-540-74805-2_16
- Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling 10, 248–253.
- Finnerup, N.B., Haroutounian, S., Kamerman, P., Baron, R., Bennett, D.L.H., Bouhassira, D., Cruccu, G., Freeman, R., Hansson, P., Nurmikko, T., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Serra, J., Smith, B.H., Treede, R.-D., Jensen, T.S., 2016. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain*.

- Finnerup, N.B., Otto, M., Jensen, T.S., Sindrup, S.H., 2007. An evidence-based algorithm for the treatment of neuropathic pain. *MedGenMed Medscape Gen. Med.* 9, 36.
- Finnerup, N.B., Otto, M., McQuay, H.J., Jensen, T.S., Sindrup, S.H., 2005. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118, 289–305.
- Fishman, S.M., 2012. *Bonica's Management of Pain*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, Á., 1998. *Farmacología humana*. Masson, Barcelona.
- Forster, E.A., Cliffe, I.A., Bill, D.J., Dover, G.M., Jones, D., Reilly, Y., Fletcher, A., 1995. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 81–88.
- Francken, B.J., Jossen, K., Lijnen, P., Jurzak, M., Luyten, W.H., Leysen, J.E., 2000. Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Mol. Pharmacol.* 57, 1034–1044.
- Francken, B.J., Jurzak, M., Vanhauwe, J.F., Luyten, W.H., Leysen, J.E., 1998. The human 5-HT_{5A} receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 361, 299–309.
- Fujimura, N., Tanaka, E., Yamamoto, S., Shigemori, M., Higashi, H., 1997. Contribution of ATP-Sensitive Potassium Channels to Hypoxic Hyperpolarization in Rat Hippocampal CA1 Neurons In Vitro. *J. Neurophysiol.* 77, 378–385.
- Gálvez, R., Marsal, C., Vidal, J., Ruiz, M., Rejas, J., 2007. Cross-sectional evaluation of patient functioning and health-related quality of life in patients with neuropathic pain under standard care conditions. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 11, 244–255.
- Gao, Y.-J., Ji, R.-R., 2010. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 482–493.
- Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegand, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B., Redfield, M.M., Burnett, J.C., 2006. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 251–258.
- García, D., Leiro, J., Delgado, R., Sanmartín, M.L., Ubeira, F.M., 2003. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother. Res. PTR* 17, 1182–1187.

- García B. P., 2008a. Inflamación. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas Físicas Nat.* 102, 91–159.
- García B. P., 2008b. Inflamación.
- García, D., Delgado, R., Ubeira, F.M., Leiro, J., 2002. Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extracts Vimang and mangiferin. *Int. Immunopharmacol.* 2, 797–806.
- Garraway, S.M., Hochman, S., 2001a. Pharmacological characterization of serotonin receptor subtypes modulating primary afferent input to deep dorsal horn neurons in the neonatal rat. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1789–1798.
- Garraway, S.M., Hochman, S., 2001b. Serotonin increases the incidence of primary afferent-evoked long-term depression in rat deep dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 85, 1864–1872.
- Garraway, S.M., Hochman, S., 2001c. Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 2183–2194.
- Garrido, G., Delgado, R., Lemus, Y., Rodríguez, J., García, D., Núñez-Sellés, A.J., 2004. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG). Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 50, 165–172.
- Garrido, G., González, D., Delporte, C., Backhouse, N., Quintero, G., Núñez-Sellés, A.J., Morales, M.A., 2001. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother. Res. PTR* 15, 18–21.
- Garrido-Suárez, B.B., Garrido, G., Castro-Labrada, M., Merino, N., Valdés, O., Rodeiro, I., Hernández, I., Godoy-Figueiredo, J., Ferreira, S.H., Delgado-Hernández, R., 2014a. Anti-hypernociceptive effect of mangiferin in persistent and neuropathic pain models in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 311–319.
- Garrido-Suárez, B.B., Garrido, G., Delgado, R., Bosch, F., del C Rabí, M., 2010. A *Mangifera indica* L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin. *Mol. Basel Switz.* 15, 9035–9045.
- Garrido-Suárez, B.B., Garrido, G., García, M.E., Delgado-Hernández, R., 2014b. Antihyperalgesic effects of an aqueous stem bark extract of *Mangifera indica* L.:

- role of mangiferin isolated from the extract. *Phytother. Res. PTR* 28, 1646–1653.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385–388.
- Gérard, C., el Mestikawy, S., Lebrand, C., Adrien, J., Ruat, M., Traiffort, E., Hamon, M., Martres, M.P., 1996. Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT₆ receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synap. N. Y. N* 23, 164–173.
- Ghadge, G.D., Lee, J.P., Bindokas, V.P., Jordan, J., Ma, L., Miller, R.J., Roos, R.P., 1997. Mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis: molecular mechanisms of neuronal death and protection. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 8756–8766.
- Gibson, A., Mirzazadeh, S., Hobbs, A.J., Moore, P.K., 1990. L-NG-monomethyl arginine and L-NG-nitro arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Br. J. Pharmacol.* 99, 602–606.
- Godínez-Chaparro, B., Barragán-Iglesias, P., Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H.I., Granados-Soto, V., 2011. Role of peripheral 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 152, 687–697.
- Godínez-Chaparro, B., López-Santillán, F.J., Argüelles, C.F., Villalón, C.M., Granados-Soto, V., 2013. Role of 5-HT_{1B/1D} receptors in the reduction of formalin-induced nociception and secondary allodynia/hyperalgesia produced by antimigraine drugs in rats. *Life Sci.* 92, 1046–1054.
- Godínez-Chaparro, B., López-Santillán, F.J., Orduña, P., Granados-Soto, V., 2012. Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. *Neuroscience* 222, 379–391.
- Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., Rajan, S., 2005. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 527–540.
- Gomezese Ribero, Ó., Ribero, Ó.F.G., Olaya, H.L.G., 2010. Dolor: una mirada introductoria. *MedUNAB* 4.

- Goonetilleke, L., Quayle, J., 2012. TREK-1 K⁺ Channels in the Cardiovascular System: Their Significance and Potential as a Therapeutic Target. *Cardiovasc. Ther.* 30, e23–e29.
- Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos-Esparza, M.R., Sánchez-Gómez, M.V., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado-García, J.M., Gruart, A., Matute, C., 2006. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol. Dis.* 23, 374–386.
- Granados-Soto, V., Argüelles, C.F., Rocha-González, H.I., Godínez-Chaparro, B., Flores-Murrieta, F.J., Villalón, C.M., 2010. The role of peripheral 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience* 165, 561–568.
- Grigg, J.J., Anderson, E.G., 1989. Glucose and sulfonylureas modify different phases of the membrane potential change during hypoxia in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 489, 302–310.
- Guevara-Guzman, R., Emson, P.C., Kendrick, K.M., 1994. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J. Neurochem.* 62, 807–810.
- Guha, S., Ghosal, S., Chattopadhyay, U., 1996. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* 42, 443–451.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., Wang, X., 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 473–508.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1992. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 93–95.
- Hagan, J.J., Slade, P.D., Gaster, L., Jeffrey, P., Hatcher, J.P., Middlemiss, D.N., 1997. Stimulation of 5-HT_{1B} receptors causes hypothermia in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* 331, 169–174.
- Hagen, E.M., Rekan, T., 2015. Management of Neuropathic Pain Associated with Spinal Cord Injury. *Pain Ther.* 4, 51–65.

- Hamon, M., Bourgoin, S., 1999. Serotonin and its receptors in pain controls., in: Novel Aspects of Pain Management: Opioids and Beyond. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 203 – 228.
- Han, D., Chen, C., Zhang, C., Zhang, Y., Tang, X., 2010. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 260–263.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S., Murad, F., 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 7, 801–819.
- Hardman, J.G., Sutherland, E.W., 1969. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 244, 6363–6370.
- Harman, D., 2002. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Sci. SAGE KE* 2002, 14.
- Hazael Ávila-Rojas, S., Velázquez-Lagunas, I., Belen Salinas-Abarca, A., Barragán-Iglesias, P., Baruch Pineda-Farias, J., Granados-Soto, V., 2015. Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res.*
- Hernández-Pacheco, A., Araiza-Saldaña, C.I., Granados-Soto, V., Mixcoatl-Zecuatl, T., 2008. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. *Eur. J. Pharmacol.* 596, 70–76.
- Herrero, J.F., Romero-Sandoval, E.A., Gaitan, G., Mazario, J., 2003. Antinociception and the new COX inhibitors: research approaches and clinical perspectives. *CNS Drug Rev.* 9, 227–252.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y., 2010. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366.
- Hirst, W.D., Cheung, N.Y., Rattray, M., Price, G.W., Wilkin, G.P., 1998. Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 61, 90–99.
- Hirst, W.D., Price, G.W., Rattray, M., Wilkin, G.P., 1997. Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 120, 509–515.

- Hou, S., Wang, F., Li, Y., Li, Y., Wang, M., Sun, D., Sun, C., 2012. Pharmacokinetic study of mangiferin in human plasma after oral administration. *Food Chem.* 132, 289–294.
- Hou, Y., Fan, S., Zhang, H., Gu, Y., Yu, X., Li, B., 2010. Pharmacokinetic study of mangiferin in rat plasma and retina using high-performance liquid chromatography. *Mol. Vis.* 16, 1659–1668.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., Humphrey, P.P., 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46, 157–203.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 533–554.
- Hsia, J.A., Moss, J., Hewlett, E.L., Vaughan, M., 1984. ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J. Biol. Chem.* 259, 1086–1090.
- Hsu, M.-F., Lin, C.-N., Lu, M.-C., Wang, J.-P., 2004. Inhibition of the arachidonic acid cascade by norathyriol via blockade of cyclooxygenase and lipoxygenase activity in neutrophils. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 507–515.
- Huie, C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 23–30.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1983. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. *Life Sci.* 33, 789–795.
- Ichiki, H., Miura, T., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Tanigawa, K., Okada, M., 1998. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 1389–1390.
- Ito, H., Kiso, T., Miyata, K., Kamato, T., Yuki, H., Akuzawa, S., Nagakura, Y., Yamano, M., Suzuki, M., Naitoh, Y., Sakai, H., Iwaoka, K., Yamaguchi, T., 2000. Pharmacological profile of YM-31636, a novel 5-HT₃ receptor agonist, in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 409, 195–201.
- Izquierdo, T., Espinosa de los Monteros-Zuñiga, A., Cervantes-Durán, C., Lozada, M.C., Godínez-Chaparro, B., 2013. Mechanisms underlying the antinociceptive effect of mangiferin in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 718, 393–400.

- Jaggi, A.S., Jain, V., Singh, N., 2011. Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25, 1–28. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x
- Jain, N.K., Patil, C.S., Singh, A., Kulkarni, S.K., 2001. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res.* 909, 170–178.
- Jan, L.Y., Jan, Y.N., 2012. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *J. Physiol.* 590, 2591–2599.
- Jangra, A., Lukhi, M.M., Sulakhiya, K., Baruah, C.C., Lahkar, M., 2014. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 337–345.
- Jayarajan, P., Nirogi, R., Shinde, A., Goura, V., Babu, V.A., Yathavakilla, S., Bhyrapuneni, G., 2015. 5-HT₆ receptor antagonist attenuates the memory deficits associated with neuropathic pain and improves the efficacy of gabapentinoids. *Pharmacol. Rep. PR* 67, 934–942.
- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S.C., Treede, R.-D., 2011. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204–2205.
- Jensen, T.S., Finnerup, N.B., 2009. Neuropathic pain treatment: a further step forward. *Lancet Lond. Engl.* 374, 1218–1219. doi:10.1016/S0140-6736(09)61205-8
- Jensen, T.S., Madsen, C.S., Finnerup, N.B., 2009. Pharmacology and treatment of neuropathic pains. *Curr. Opin. Neurol.* 22, 467–474.
- Ji, R.R., Woolf, C.J., 2001. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.* 8, 1–10.
- Jiang, C., Haddad, G.G., 1991. Effect of anoxia on intracellular and extracellular potassium activity in hypoglossal neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 66, 103–111.
- Jones, S.L., Light, A.R., 1992. Serotonergic medullary raphespinal projection to the lumbar spinal cord in the rat: a retrograde immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 322, 599–610.
- Jordan, L.M., Kenshalo, D.R., Martin, R.F., Haber, L.H., Willis, W.D., 1979. Two populations of spinothalamic tract neurons with opposite responses to 5-hydroxytryptamine. *Brain Res.* 164, 342–346.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.

- Kaehler, S.T., Singewald, N., Sinner, C., Philippu, A., 1999. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 835, 346–349.
- Kayser, V., Aubel, B., Hamon, M., Bourgoin, S., 2002. The antimigraine 5-HT_{1B/1D} receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1287–1297.
- Kayser, V., Elfassi, I.E., Aubel, B., Melfort, M., Julius, D., Gingrich, J.A., Hamon, M., Bourgoin, S., 2007. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT_{1A}^{-/-}, 5-HT_{1B}^{-/-}, 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{3A}^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain* 130, 235–248.
- Kayser, V., Latrémolière, A., Hamon, M., Bourgoin, S., 2011. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated modulations of the anti-allodynic effects of 5-HT_{1B/1D} receptor stimulation in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 15, 451–458.
- Kazakov, V.N., Kravtsov, P.Y., Krakhotkina, E.D., Maiskii, V.A., 1992. Sources of cortical, hypothalamic and spinal serotonergic projections: Topical organization in the dorsal raphe nucleus. *Neurophysiology* 24, 69–76.
- Khasabov, S.G., Lopez-Garcia, J.A., Asghar, A.U.R., King, A.E., 1999. Modulation of afferent-evoked neurotransmission by 5-HT₃ receptors in young rat dorsal horn neurones in vitro: a putative mechanism of 5-HT₃ induced anti-nociception. *Br. J. Pharmacol.* 127, 843–852.
- Khasabov, S.G., Rogers, S.D., Ghilardi, J.R., Peters, C.M., Mantyh, P.W., Simone, D.A., 2002. Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9086–9098.
- Kim, H.K., Kim, J.H., Gao, X., Zhou, J.-L., Lee, I., Chung, K., Chung, J.M., 2006. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* 122, 53–62.
- Kim, H.K., Park, S.K., Zhou, J.-L., Tagliabatella, G., Chung, K., Coggeshall, R.E., Chung, J.M., 2004. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111, 116–124.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355–363.

- Kim, Y., Lounds-Singleton, A.J., Talcott, S.T., 2009. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chem.* 115, 989–993.
- Kimura, H., Mittal, C.K., Murad, F., 1975. Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide. *J. Biol. Chem.* 250, 8016–8022.
- Kinnman, E., Levine, J.D., 1995. Sensory and sympathetic contributions to nerve injury-induced sensory abnormalities in the rat. *Neuroscience* 64, 751–767.
- Kirifides, M.L., Simpson, K.L., Lin, R.C., Waterhouse, B.D., 2001. Topographic organization and neurochemical identity of dorsal raphe neurons that project to the trigeminal somatosensory pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 435, 325–340.
- Kohama, I., Ishikawa, K., Kocsis, J.D., 2000. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 1538–1549.
- Koltzenburg, M., McMahon, S.B., Tracey, I., Turk, D.C., 2013. Wall & Melzack's Textbook of Pain, Expert Consult - Online and Print, 6: Wall & Melzack's Textbook of Pain. Elsevier Health Sciences.
- Komori, N., Takemori, N., Kim, H.K., Singh, A., Hwang, S.-H., Foreman, R.D., Chung, K., Chung, J.M., Matsumoto, H., 2007. Proteomics study of neuropathic and nonneuropathic dorsal root ganglia: altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury. *Physiol. Genomics* 29, 215–230.
- Kraychete, D.C., Sakata, R.K., 2011. Neuropatias periféricas dolorosas. *Rev Bras Anesthesiol* 61, 649–58.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R., Gilman, A.G., 1989. Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244, 1558–1564.
- Krupkova, O., Sekiguchi, M., Klasen, J., Hausmann, O., Konno, S., Ferguson, S.J., Wuertz-Kozak, K., 2014. Epigallocatechin 3-gallate suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory responses in intervertebral disc cells in vitro and reduces radiculopathic pain in rats. *Eur. Cell. Mater.* 28, 372–386.
- Kuang, Q., Purhonen, P., Hebert, H., 2015. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 3677–3693.

- Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., Vandenberg, C.A., 2005. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 509–526.
- Kuo, M.M.-C., Haynes, W.J., Loukin, S.H., Kung, C., Saimi, Y., 2005. Prokaryotic K⁺ channels: From crystal structures to diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 961–985.
- Kwiat, G.C., Basbaum, A.I., 1992. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosens. Mot. Res.* 9, 157–173.
- LaBuda, C.J., Little, P.J., 2005. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J. Neurosci. Methods* 144, 175–181.
- LaMotte, C.C., 1988. Lamina X of primate spinal cord: distribution of five neuropeptides and serotonin. *Neuroscience* 25, 639–658.
- LaMotte, R.H., Shain, C.N., Simone, D.A., Tsai, E.F., 1991. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J. Neurophysiol.* 66, 190–211.
- Laporte, A.M., Lima, L., Gozlan, H., Hamon, M., 1994. Selective in vivo labelling of brain 5-HT_{1A} receptors by [³H]WAY 100635 in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 271, 505–514.
- Larkman, P.M., Kelly, J.S., 1995. The use of brain slices and dissociated neurones to explore the multiplicity of actions of 5-HT in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 59, 31–39.
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 10, 895–926.
- Lázaro-Ibáñez, G.G., Torres-López, J.E., Granados-Soto, V., 2001. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur. J. Pharmacol.* 426, 39–44.
- Lee, B., Trung Trinh, H., Bae, E.-A., Jung, K., Kim, D.-H., 2009. Mangiferin inhibits passive cutaneous anaphylaxis reaction and pruritus in mice. *Planta Med.* 75, 1415–1417.

- Leem, J.W., Willis, W.D., Chung, J.M., 1993. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *J. Neurophysiol.* 69, 1684–1699.
- Leiro, J., Arranz, J.A., Yáñez, M., Ubeira, F.M., Sanmartín, M.L., Orallo, F., 2004. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int. Immunopharmacol.* 4, 763–778.
- Leiro, J., García, D., Arranz, J.A., Delgado, R., Sanmartín, M.L., Orallo, F., 2004. An Anacardiaceae preparation reduces the expression of inflammation-related genes in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 4, 991–1003.
- Leiro, J.M., Alvarez, E., Arranz, J.A., Siso, I.G., Orallo, F., 2003. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta genes. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1361–1371.
- Lemus-Molina, Y., Sánchez-Gómez, M.V., Delgado-Hernández, R., Matute, C., 2009. *Mangifera indica* L. extract attenuates glutamate-induced neurotoxicity on rat cortical neurons. *Neurotoxicology* 30, 1053–1058.
- Li, H., Huang, J., Yang, B., Xiang, T., Yin, X., Peng, W., Cheng, W., Wan, J., Luo, F., Li, H., Ren, G., 2013. Mangiferin exerts antitumor activity in breast cancer cells by regulating matrix metalloproteinases, epithelial to mesenchymal transition, and β -catenin signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 180–190.
- Li, J.L., Kaneko, T., Nomura, S., Li, Y.Q., Mizuno, N., 1997. Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 384, 127–141.
- Li, P., Zhuo, M., 2001. Cholinergic, noradrenergic, and serotonergic inhibition of fast synaptic transmission in spinal lumbar dorsal horn of rat. *Brain Res. Bull.* 54, 639–647.
- Li, Y.Q., Takada, M., Shinonaga, Y., Mizuno, N., 1993. Direct projections from the midbrain periaqueductal gray and the dorsal raphe nucleus to the trigeminal sensory complex in the rat. *Neuroscience* 54, 431–443.
- Lim, J., Liu, Z., Apontes, P., Feng, D., Pessin, J.E., Sauve, A.A., Angeletti, R.H., Chi, Y., 2014. Dual mode action of mangiferin in mouse liver under high fat diet. *PLoS One* 9, e90137.
- Limongi, D., Baldelli, S., 2016. Redox Imbalance and Viral Infections in Neurodegenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 6547248.

- Lin, C.-S., Tsaur, M.-L., Chen, C.-C., Wang, T.-Y., Lin, C.-F., Lai, Y.-L., Hsu, T.-C., Pan, Y.-Y., Yang, C.-H., Cheng, J.-K., 2007. Chronic intrathecal infusion of minocycline prevents the development of spinal-nerve ligation-induced pain in rats. *Reg. Anesth. Pain Med.* 32, 209–216.
- Lin, S.-Y., Chang, W.-J., Lin, C.-S., Huang, C.-Y., Wang, H.-F., Sun, W.-H., 2011. Serotonin receptor 5-HT_{2B} mediates serotonin-induced mechanical hyperalgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 1410–1418.
- Liss, B., Bruns, R., Roeper, J., 1999. Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* 18, 833–846.
- Liu, H., Wu, B., Pan, G., He, L., Li, Z., Fan, M., Jian, L., Chen, M., Wang, K., Huang, C., 2012. Metabolism and pharmacokinetics of mangiferin in conventional rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic rats. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40, 2109–2118.
- Liu, Y., Xu, F., Zeng, X., Yang, L., Deng, Y., Wu, Z., Feng, Y., Li, X., 2010. Application of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to pharmacokinetic study of mangiferin in rats. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878, 3345–3350.
- Liu, Y.-L., Zhou, L.-J., Hu, N.-W., Xu, J.-T., Wu, C.-Y., Zhang, T., Li, Y.-Y., Liu, X.-G., 2007. Tumor necrosis factor- α induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF- κ B, JNK and p38 MAPK. *Neuropharmacology* 52, 708–715.
- Lladó-Pelfort, L., Assié, M.-B., Newman-Tancredi, A., Artigas, F., Celada, P., 2011. In vivo electrophysiological and neurochemical effects of the selective 5-HT_{1A} receptor agonist, F13640, at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 221, 261–272.
- Loeb, G.E., 1983. Brain Stem Control of Spinal Mechanisms. Fernström Foundation Series, Vol. 1. *Trends Neurosci.* 6, 287.
- Long, S.B., Campbell, E.B., MacKinnon, R., 2005. Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* 309, 903–908.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N., Nichols, C.G., 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372, 366–369.

- Lopez-Garcia, J.A., King, A.E., 1996. Pre- and post-synaptic actions of 5-hydroxytryptamine in the rat lumbar dorsal horn in vitro: implications for somatosensory transmission. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2188–2197.
- Lorrain, D.S., Hull, E.M., 1993. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* 5, 87–89.
- Lovkova, M.Y., Buzuk, G.N., Sokolova, S.M., Kliment'eva, N.I., 2001. Chemical features of medicinal plants (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 229–237.
- Luhmann, H.J., Heinemann, U., 1992. Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 67, 798–811.
- Luo, Z.D., Chaplan, S.R., Scott, B.P., Cizkova, D., Calcutt, N.A., Yaksh, T.L., 1999. Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 9201–9208.
- Ma, H., Chen, H., Sun, L., Tong, L., Zhang, T., 2014. Improving permeability and oral absorption of mangiferin by phospholipid complexation. *Fitoterapia* 93, 54–61.
- Mann, E.A., Jump, M.L., Wu, J., Yee, E., Giannella, R.A., 1997. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 463–466.
- Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S.B., 2005. Role of the immune system in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 521–532.
- Márquez, L., García-Bueno, B., Madrigal, J.L.M., Leza, J.C., 2012. Mangiferin decreases inflammation and oxidative damage in rat brain after stress. *Eur. J. Nutr.* 51, 729–739.
- Mas, C.S., Blanch, G.G., 2007. *Fundamentos de neurociencia*. Editorial UOC.
- Masibo, M., He, Q., 2008. Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7, 309–319.
- Mason, P., 1999. Central mechanisms of pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 436–441.
- Masson, J., Emerit, M.B., Hamon, M., Darmon, M., 2012. Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 685–713.
- Matsuda, H., Saigusa, A., Irisawa, H., 1987. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* 325, 156–159.

- Matsumoto, N., Komiyama, S., Akaike, N., 2002. Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *J. Physiol.* 541, 511–520.
- Maxwell, L., Maxwell, D.J., Neilson, M., Kerr, R., 1996. A confocal microscopic survey of serotonergic axons in the lumbar spinal cord of the rat: co-localization with glutamate decarboxylase and neuropeptides. *Neuroscience* 75, 471–480.
- Maylie, J., Bond, C.T., Herson, P.S., Lee, W.-S., Adelman, J.P., 2004. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J. Physiol.* 554, 255–261.
- McCleane, G.J., Suzuki, R., Dickenson, A.H., 2003. Does a Single Intravenous Injection of the 5HT₃ Receptor Antagonist Ondansetron Have an Analgesic Effect in Neuropathic Pain? A Double-Blinded, Placebo-Controlled Cross-Over Study: *Anesth. Analg.* 1474–1478.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652–659.
- McLendon, A.N., Spivey, J., Woodis, C.B., 2013. African Mango (*Irvingia gabonensis*) Extract for Weight Loss: A Systematic Review. *J. Nutr. Ther.* 2, 53–58.
- McNicol, E.D., Midbari, A., Eisenberg, E., 1996. Opioids for neuropathic pain, in: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd.
- McQuay, H.J., Tramèr, M., Nye, B.A., Carroll, D., Wiffen, P.J., Moore, R.A., 1996. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68, 217–227.
- Merskey, H., 1979. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6, 249.
- Merskey, H., Bogduk, N. (Eds.), 1994. *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*, 2. ed. ed. IASP Press, Seattle.
- Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A., 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 32, 197–200.
- Meuser, T., Pietruck, C., Gabriel, A., Xie, G.-X., Lim, K.-J., Pierce Palmer, P., 2002. 5-HT₇ receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sci.* 71, 2279–2289.
- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J., Seino, S., 2001. ATP-sensitive K⁺

- channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat. Neurosci.* 4, 507–512.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.
- Miura, T., Ichiki, H., Hashimoto, I., Iwamoto, N., Kato, M., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Okada, M., Ishida, T., Tanigawa, K., 2001. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 8, 85–87.
- Mixcoatl-Zecuatl, T., Flores-Murrieta, F.J., Granados-Soto, V., 2006. The nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channel pathway participates in the antiallodynic effect of spinal gabapentin. *Eur. J. Pharmacol.* 531, 87–95.
- Mixcoatl-Zecuatl, T., Medina-Santillán, R., Reyes-García, G., Vidal-Cantú, G.C., Granados-Soto, V., 2004. Effect of K⁺ channel modulators on the antiallodynic effect of gabapentin. *Eur. J. Pharmacol.* 484, 201–208.
- Miyamoto, T., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Patapoutian, A., 2009. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* 4, e7596.
- Mogil, J.S., 2009. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 283–294. doi:10.1038/nrn2606
- Monconduit, L., Lopez-Avila, A., Molat, J.-L., Chalus, M., Villanueva, L., 2006. Corticofugal Output from the Primary Somatosensory Cortex Selectively Modulates Innocuous and Noxious Inputs in the Rat Spinothalamic System. *J. Neurosci.* 26, 8441–8450.
- Monsma, F.J., Shen, Y., Ward, R.P., Hamblin, M.W., Sibley, D.R., 1993. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol. Pharmacol.* 43, 320–327.
- Moon, D.E., Lee, D.H., Han, H.C., Xie, J., Coggeshall, R.E., Chung, J.M., 1999. Adrenergic sensitivity of the sensory receptors modulating mechanical allodynia in a rat neuropathic pain model. *Pain* 80, 589–595.
- Morais, T.C., Arruda, B.R., de Sousa Magalhães, H., Trevisan, M.T.S., de Araújo Viana, D., Rao, V.S., Santos, F.A., 2015. Mangiferin ameliorates the intestinal inflammatory response and the impaired gastrointestinal motility in mouse model of postoperative ileus. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 388, 531–538.

- Moro, M.A., Russel, R.J., Cellek, S., Lizasoain, I., Su, Y., Darley-Usmar, V.M., Radomski, M.W., Moncada, S., 1996. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1480–1485.
- Mucio-Ramírez, S., Miller-Pérez, C., Sánchez-Islas, E., León-Olea, M., 2001. El receptor ORL-1 y su péptido endógeno, la nociceptina/orfanina FQ. Nuevos miembros de la familia de los opioides. *Salud Ment.* 24, 43–54.
- Muñoz-Islas, E., Vidal-Cantú, G.C., Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Quiñonez-Bastidas, G.N., Pineda-Farias, J.B., Barragán-Iglesias, P., Granados-Soto, V., 2014. Spinal 5-HT_{5A} receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 120, 25–32.
- Muruganandan, S., Gupta, S., Kataria, M., Lal, J., Gupta, P.K., 2002. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology* 176, 165–173.
- Muruganandan, S., Lal, J., Gupta, P.K., 2005. Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Toxicology* 215, 57–68.
- Nakagawa, T., Kaneko, S., 2010. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J. Pharmacol. Sci.* 114, 347–353.
- Nakai, K., Nakae, A., Oba, S., Mashimo, T., Ueda, K., 2010. 5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 14, 999–1006.
- Nakajima, K., Obata, H., Ito, N., Goto, F., Saito, S., 2009. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 13, 441–447.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 3051–3064.
- Nathan, C., Xie, Q.W., 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915–918.
- Nichols, C.G., 2006. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470–476.
- Niesler, B., Walstab, J., Combrink, S., Möller, D., Kapeller, J., Rietdorf, J., Bönisch, H., Göthert, M., Rappold, G., Brüss, M., 2007. Characterization of the novel human

- serotonin receptor subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, and 5-HT_{3E}. *Mol. Pharmacol.* 72, 8–17.
- Nitanda, A., Yasunami, N., Tokumo, K., Fujii, H., Hirai, T., Nishio, H., 2005. Contribution of the peripheral 5-HT_{2A} receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* 47, 394–400.
- Niu, Y., Li, S., Na, L., Feng, R., Liu, L., Li, Y., Sun, C., 2012. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. *PLoS One* 7, e30782.
- Núñez Sellés, A.J., Vélez Castro, H.T., Agüero-Agüero, J., González-González, J., Naddeo, F., De Simone, F., Rastrelli, L., 2002. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J. Agric. Food Chem.* 50, 762–766.
- Núñez-Sellés, A.J., Delgado-Hernández, R., Garrido-Garrido, G., García-Rivera, D., Guevara-García, M., Pardo-Andreu, G.L., 2007. The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol. Res.* 55, 351–358.
- O'Connor, A.B., Dworkin, R.H., 2009. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am. J. Med.* 122, S22-32. doi:10.1016/j.amjmed.2009.04.007
- Oess, S., Icking, A., Fulton, D., Govers, R., Müller-Esterl, W., 2006. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem. J.* 396, 401–409.
- Ohno-Shosaku, T., Yamamoto, C., 1992. Identification of an ATP-sensitive K⁺ channel in rat cultured cortical neurons. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 422, 260–266.
- Ojewole, J. a. O., 2005. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (*Anacardiaceae*) stem-bark aqueous extract. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27, 547–554.
- Olanow, C.W., 1992. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 32 Suppl, S2-9.
- Pal, P.B., Sinha, K., Sil, P.C., 2014. Mangiferin attenuates diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress mediated signaling cascade, TNF α related and mitochondrial dependent apoptotic pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One* 9, e107220.
- Pappagallo, M., 2003. Newer antiepileptic drugs: possible uses in the treatment of neuropathic pain and migraine. *Clin. Ther.* 25, 2506–2538.

- Pardo Andreu, G., Delgado, R., Velho, J., Inada, N.M., Curti, C., Vercesi, A.E., 2005. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacol. Res.* 51, 427–435.
- Pardo-Andreu, G.L., Barrios, M.F., Curti, C., Hernández, I., Merino, N., Lemus, Y., Martínez, I., Riaño, A., Delgado, R., 2008. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 57, 79–86.
- Pauletti, P.M., Castro-Gamboa, I., Siqueira Silva, D.H., Young, M.C.M., Tomazela, D.M., Eberlin, M.N., da Silva Bolzani, V., 2003. New antioxidant C-glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samydoides*. *J. Nat. Prod.* 66, 1384–1387.
- Pierce, P.A., Xie, G.X., Levine, J.D., Peroutka, S.J., 1996a. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70, 553–559.
- Pierce, P.A., Xie, G.X., Meuser, T., Peroutka, S.J., 1997. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 81, 813–819.
- Pierce, P.A., Xie, G.X., Peroutka, S.J., Levine, J.D., 1996b. Dual effect of the serotonin agonist, sumatriptan, on peripheral neurogenic inflammation. *Reg. Anesth.* 21, 219–225.
- Pinto, M.M.M., Sousa, M.E., Nascimento, M.S.J., 2005. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr. Med. Chem.* 12, 2517–2538.
- Poli, G., 2000. *Free Radicals in Brain Pathophysiology*. CRC Press.
- Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M., Murad, F., 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10480–10484.
- Pongs, O., Schwarz, J.R., 2010. Ancillary Subunits Associated With Voltage-Dependent K⁺ Channels. *Physiol. Rev.* 90, 755–796. doi:10.1152/physrev.00020.2009
- Portenoy, R.K., 2000. Current pharmacotherapy of chronic pain. *J. Pain Symptom Manage.* 19, S16-20.
- Poulos, T.L., 2006. Soluble guanylate cyclase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 736–743.

- Prado, Y., Merino, N., Acosta, J., Herrera, J.A., Luque, Y., Hernández, I., Prado, E., Garrido, G., Delgado, R., Rodeiro, I., 2015. Acute and 28-day subchronic toxicity studies of mangiferin, a glucosyl xanthone isolated from *Mangifera indica* L. stem bark. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 3, 13–23.
- Prast, H., Philippu, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64, 51–68.
- Przewlocki, R., Przewlocka, B., 2005. Opioids in Neuropathic Pain. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3013–3025.
- Quiñonez-Bastidas, G.N., Cervantes-Durán, C., Rocha-González, H.I., Murbartián, J., Granados-Soto, V., 2013. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of epicatechin in diabetic rats. *Life Sci., Cancer, Chemotherapy and Cognition* 93, 637–645.
- Rahman, W., Bannister, K., Bee, L.A., Dickenson, A.H., 2011. A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Brain Res.* 1382, 29–36.
- Raja, S.N., Campbell, J.N., Meyer, R.A., 1984. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. *Brain J. Neurol.* 107 (Pt 4), 1179–1188.
- Rajendran, P., Ekambaram, G., Sakthisekaran, D., 2008. Cytoprotective effect of mangiferin on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in swiss albino mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 137–142.
- Rapoport, R.M., Murad, F., 1983. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* 9, 281–296.
- Rivera, G., Ojeda, E., 2010. Elaboración de un fitopreparado antifúngico de semisólido a partir del extracto fluido de la especie piper ecuatorense (matico). Loja-Ecuador.
- Rocha-González, H.I., Argüelles, C., Granados-Soto, V., 2009. Role of Serotonin Receptors in Inflammatory Pain, in: *Acute Pain: Causes, Effects and Treatment*. S.D.A.y.K.L. Grasso, pp. 1–74.
- Rocha-González, H.I., Blaisdell-López, E., Granados-Soto, V., Navarrete, A., 2010. Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin isolated from *Heterotheca inuloides*: role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 154–160.

- Rocha-González, H.I., Meneses, A., Carlton, S.M., Granados-Soto, V., 2005. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT7 receptors in the formalin test. *Pain* 117, 182–192.
- Rocha-González, H.I., Ramírez-Aguilar, M., Granados-Soto, V., Reyes-García, J.G., Torres-López, J.E., Huerta-Cruz, J.C., Navarrete, A., 2014. Antineuropathic effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin in streptozotocin-induced diabetic rodents. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 129.
- Rowbotham, M., Harden, N., Stacey, B., Bernstein, P., Magnus-Miller, L., 1998. Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *JAMA* 280, 1837–1842.
- Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J.M., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Leurs, R., Schwartz, J.C., 1993. A novel rat serotonin (5-HT6) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 268–276.
- Ruda, M.A., Bennett, G.J., Dubner, R., 1986. Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. *Prog. Brain Res.* 66, 219–268.
- Ruscheweyh, R., Wilder-Smith, O., Drdla, R., Liu, X.-G., Sandkühler, J., 2011. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol. Pain* 7, 20.
- Rusin, K.I., Giovannucci, D.R., Stuenkel, E.L., Moises, H.C., 1997. Kappa-opioid receptor activation modulates Ca²⁺ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 6565–6574.
- Saadé, N.E., Jabbur, S.J., 2008. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: Spinal and supraspinal mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 86, 22–47.
- Sachs, D., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3680–3685.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Zweier, J.L., Samouilov, A., Macarthur, H., Misko, T.P., Currie, M.G., Cuzzocrea, S., Sikorski, J.A., Riley, D.P., 1999. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 286, 304–306.
- Sánchez, G.M., Re, L., Giuliani, A., Núñez-Sellés, A.J., Davison, G.P., León-Fernández, O.S., 2000. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract,

- mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol. Res.* 42, 565–573.
- Sanugul, K., Akao, T., Li, Y., Kakiuchi, N., Nakamura, N., Hattori, M., 2005. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1672–1678.
- Sasaki, M., Obata, H., Kawahara, K., Saito, S., Goto, F., 2006. Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain* 122, 130–136.
- Sato, T., Kawamoto, A., Tamura, A., Tatsumi, Y., Fujii, T., 1992. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 40, 721–724.
- Schmauss, C., Hammond, D.L., Ochi, J.W., Yaksh, T.L., 1983. Pharmacological antagonism of the antinociceptive effects of serotonin in the rat spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* 90, 349–357.
- Schmidt, H.H., Walter, U., 1994. NO at work. *Cell* 78, 919–925.
- Scholz, J., Woolf, C.J., 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* 10, 1361–1368.
- Schulz, S., Lopez, M.J., Kuhn, M., Garbers, D.L., 1997. Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 100, 1590–1595.
- Schwanstecher, C., Panten, U., 1993. Tolbutamide- and diazoxide-sensitive K⁺ channel in neurons of substantia nigra pars reticulata. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348, 113–117.
- Seino, S., 1999. ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS: A Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 337–362.
- Sethiya, N.K., Mishra, S.H., 2014. Investigation of Mangiferin, as a Promising Natural Polyphenol Xanthone on Multiple Targets of Alzheimer's Disease. *J. Biol. Act. Prod. Nat.* 4, 111–119.
- Sethiya, N.K., Nahata, A., Dixit, V.K., 2010. Anxiolytic Activity of *Canscora decussata* in Albino Rats. *J. Complement. Integr. Med.* 7.

- Shang, Y., Filizola, M., 2015. Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *Eur. J. Pharmacol.* 763, 206–213.
- Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 16, 402–413.
- Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 83–106.
- Siñani, 2009. Determinación de la Actividad Antiinflamatoria e Interacción de Extractos de la Planta Kiswara (*Buddleja coriácea* Rémuy) con Dexametasona, mediante los ensayos de Edema plantar y Auricular en modelo murino. Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Smith, H.S., Sang, C.N., 2002. The evolving nature of neuropathic pain: individualizing treatment. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 6 Suppl B, 13–18.
- Sommer, C., 2004. Serotonin in pain and analgesia. *Mol. Neurobiol.* 30, 117–125. doi:10.1385/MN:30:2:117
- Song, Z., Meyerson, B.A., Linderoth, B., 2011. Spinal 5-HT receptors that contribute to the pain-relieving effects of spinal cord stimulation in a rat model of neuropathy. *Pain* 152, 1666–1673.
- Stanford, I.M., Lacey, M.G., 1996. Electrophysiological investigation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 74, 499–509.
- Stewart, W., Maxwell, D.J., 2000. Morphological evidence for selective modulation by serotonin of a subpopulation of dorsal horn cells which possess the neurokinin-1 receptor. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4583–4588.
- Stühmer, W., Alves, F., Hartung, F., Zientkowska, M., Pardo, L.A., 2006. Potassium channels as tumour markers. *FEBS Lett.* 580, 2850–2852.
- Takahashi, T., Berger, A.J., 1990. Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *J. Physiol.* 423, 63–76.
- Takahashi, T., Ward, J.K., Tadjkarimi, S., Yacoub, M.H., Barnes, P.J., Belvisi, M.G., 1995. 5-Hydroxytryptamine facilitates cholinergic bronchoconstriction in human and guinea pig airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 377–380.
- Tal, M., 1996. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport* 7, 1382–1384.

- Tal, M., Bennett, G.J., 1994. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57, 375–382.
- Taussig, R., Iñiguez-Lluhi, J.A., Gilman, A.G., 1993. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* 261, 218–221.
- Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775.
- Terrón, J.A., Bouchelet, I., Hamel, E., 2001. 5-HT7 receptor mRNA expression in human trigeminal ganglia. *Neurosci. Lett.* 302, 9–12.
- Thorpe, D.S., Garbers, D.L., 1989. The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 264, 6545–6549.
- Toll, L., Bruchas, M.R., Calo', G., Cox, B.M., Zaveri, N.T., 2016. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacol. Rev.* 68, 419–457.
- Treede, R.-D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., Serra, J., 2008. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70, 1630–1635.
- Twining, C.M., Sloane, E.M., Milligan, E.D., Chacur, M., Martin, D., Poole, S., Marsh, H., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2004. Peri-sciatic proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, and complement induce mirror-image neuropathic pain in rats. *Pain* 110, 299–309.
- Ueda, H., 2006. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 109, 57–77.
- Verge, V.M., Xu, Z., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., 1992. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11617–11621.
- Vicet Muro, L., 2009. Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L (dcmed). Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.
- Vincent, S.R., 2010. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol.* 90, 246–255.

- Waldmann, R., Lazdunski, M., 1998. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 418–424.
- Wall, P.D., Devor, M., 1983. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17, 321–339.
- Walter, T.L., Chau, T.T., 1995. Antinociceptive activities of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) following intracerebroventricular (i.c.v.) and intrathecal (i.t.) administration in mice. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* 44 Suppl 2, S133-134.
- Walter, U., 1989. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 113, 41–88.
- Walwyn, W.M., Miotto, K.A., Evans, C.J., 2010. Opioid pharmaceuticals and addiction: The issues, and research directions seeking solutions. *Drug Alcohol Depend.* 108, 156–165.
- Wang, H.-L., Li, C.-Y., Zhang, B., Liu, Y.-D., Lu, B.-M., Shi, Z., An, N., Zhao, L.-K., Zhang, J.-J., Bao, J.-K., Wang, Y., 2014. Mangiferin facilitates islet regeneration and β -cell proliferation through upregulation of cell cycle and β -cell regeneration regulators. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9016–9035.
- Wang, Q.P., Nakai, Y., 1994. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res. Bull.* 34, 575–585.
- Wang, R.-R., Gao, Y.-D., Ma, C.-H., Zhang, X.-J., Huang, C.-G., Huang, J.-F., Zheng, Y.-T., 2011. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. *Mol. Basel Switz.* 16, 4264–4277.
- Wang, Z.-Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R., Masini, E., Muscoli, C., Mollace, V., Ndengele, M., Ischiropoulos, H., Salvemini, D., 2004. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 869–878.
- Watkins, L.R., Maier, S.F., 1999. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7710–7713.
- Watkins, L.R., Milligan, E.D., Maier, S.F., 2001. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 24, 450–455.
- Watson, C.P., 2000. The treatment of neuropathic pain: antidepressants and opioids. *Clin. J. Pain* 16, S49-55.

- Watts, A.E., Hicks, G.A., Henderson, G., 1995. Putative pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra in vitro. *J. Neurosci.* 15, 3065–3074.
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., Wulff, H., 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 463–472.
- Wei, X.-H., Zang, Y., Wu, C.-Y., Xu, J.-T., Xin, W.-J., Liu, X.-G., 2007. Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. *Exp. Neurol.* 205, 471–484.
- Wickenden, A.D., 2002. K⁺ channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol. Ther.* 94, 157–182.
- Willcockson, W.S., Chung, J.M., Hori, Y., Lee, K.H., Willis, W.D., 1984. Effects of iontophoretically released amino acids and amines on primate spinothalamic tract cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4, 732–740.
- Woolf, C.J., 2010. What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.* 120, 3742–3744.
- Woolf, C.J., Costigan, M., 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7723–7730.
- Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765–1769.
- Wu, S., Zhu, M., Wang, W., Wang, Y., Li, Y., Yew, D.T., 2001. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci. Lett.* 307, 183–186.
- Wu, W.-P., Hao, J.-X., Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Koek, W., Colpaert, F.C., 2003. The very-high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640, preempts the development of allodynia-like behaviors in rats with spinal cord injury. *Eur. J. Pharmacol.* 478, 131–137.
- Xifró, X., Vidal-Sancho, L., Boadas-Vaello, P., Turrado, C., Alberch, J., Puig, T., Verdú, E., 2015. Novel epigallocatechin-3-gallate (EGCG) derivative as a new therapeutic strategy for reducing neuropathic pain after chronic constriction nerve injury in mice. *PloS One* 10, e0123122.

- Yamada, K., Ji, J.J., Yuan, H., Miki, T., Sato, S., Horimoto, N., Shimizu, T., Seino, S., Inagaki, N., 2001. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* 292, 1543–1546.
- Yonehara, N., Kudo, C., Kamisaki, Y., 2003. Involvement of NMDA-nitric oxide pathways in the development of tactile hypersensitivity evoked by the loose-ligation of inferior alveolar nerves in rats. *Brain Res.* 963, 232–243.
- Yoshimura, M., Furue, H., 2006. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 107–117.
- Zamponi, G.W., Snutch, T.P., 1998. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 351–356.
- Zawar, C., Neumcke, B., 2000. Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 439, 256–262.
- Zawar, C., Plant, T.D., Schirra, C., Konnerth, A., Neumcke, B., 1999. Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 514, 327–341.
- Zhang, J., Yan, J., 2014. Regulation of BK channels by auxiliary γ subunits. *Front. Physiol.* 5.
- Zhang, X., Verge, V., Wiesenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Brecht, D., Synder, S.H., Hökfelt, T., 1993. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* 335, 563–575.
- Zhao, Y., Brandish, P.E., Di Valentin, M., DiValentin, M., Schelvis, J.P., Babcock, G.T., Marletta, M.A., 2000. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 10848–10854.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.