

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de Investigación: Química medicinal

“Posible participación de la vía de NF κ B en el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por pramipexol”

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado
de **maestra en ciencias farmacéuticas**

PRESENTA

Jazmin Santamaria Anzures

Matricula: 2193800192

Comité tutorial

Tutora: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

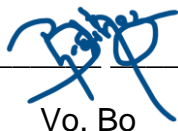
Asesor: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Asesor: Miguel Condes Lara

Mayo, 2022

“Posible participación de la vía de NFκB en el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por pramipexol”

Comité tutorial



Vo. Bo

Dra. Beatriz Godínez Chaparro



Vo. Bo.

Dr. Jaime Pérez Villanueva



Vo. Bo.

Asesor: Dr. Miguel Condes Lara



Vo. Bo.

QFB. Jazmin Santamaria Anzures

2193800192

**“Posible participación de la vía de NFκB en el efecto antialodínico
y antihiperalgésico inducido por pramipexol”**

Orduña Estrada Patricia.

Vo. Bo. Presidente

Dra. Patricia Orduña Estrada



Vo. Bo. Vocal

Dr. Osmar Antonio Jaramillo Morales



Vo. Bo. Secretaria

Dra. Beatriz Godínez Chaparro



Vo. Bo.

QFB. Jazmin Santamaria Anzures

2193800192

Resumen

Palabras clave: Pramipexol, antialodínico y antihiperalgésico, NFkB.

En el presente proyecto se evaluó el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por pramipexol (PPX) en un modelo de dolor inflamatorio en ratas, así como el efecto antinociceptivo de PPX en la prueba aguda de formalina. Para ello, a los animales se les administró formalina al 1% en el dorso de la extremidad trasera derecha de las ratas con la finalidad de generar respuestas nociceptivas a corto plazo (agudo), y generar respuestas de largo plazo como la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundarias. La prueba de la formalina aguda consiste en la cuantificación del número de sacudidas de la extremidad trasera derecha durante 1 min, cada 5 min, hasta completar 60 min de evaluación. En este contexto, el pre-tratamiento intraperitoneal (i.p.) de dosis crecientes de PPX redujo significativamente (1 y 3 mg/Kg) las respuestas de sacudida de la extremidad trasera derecha en la fase II, pero no en la fase I. Posteriormente, a estos mismos animales se les evaluó la alodinia con el filamento de von Frey de 1 g, mientras que la hiperalgesia se evaluó con el filamento de 26 g. El pre-tratamiento con PPX (0.1, 1 y 3 mg/Kg) disminuyó el número de respuestas de retiro de la extremidad trasera tanto con el filamento de von Frey de 1 g como con el de 26 g en la pata ipsilateral y contralateral. Por otra parte, el post-tratamiento i.p. con PPX redujo significativamente la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundarias inducidas por formalina. Estos datos nos indican que PPX disminuye las respuestas nociceptivas inducidas con formalina, además que el pre- y post-tratamiento con PPX previene y/o revierte el desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria.

Asimismo, con la finalidad de identificar el mecanismo responsable que subyace el efecto antinociceptivo inducido por PPX. En el presente trabajo se determinó la posible interacción de PPX con NFkB a través de un Docking molecular, presentando una energía de unión de (-5.1 Kcal/mol, *Vina*), (43.4 CHEMPLP, 35.74 GoldScore, *GOLD*), (-5.6 Kcal/mol, *AutoDock 4.2*), siendo los residuos VAL 91, GLY 117, GLY 44, GLN 119, SER 42, ALA 43, ARG 41, ARG 35 donde se presentan dichas interacciones. Además, el post-tratamiento i.p con PPX disminuyó la expresión de NFkB-p65, en la porción ipsilateral de la zona (L4-L6) de la médula espinal, realizado por Western Blot. En conjunto, estos resultados sugieren que PPX podría estar mediando los efectos antinociceptivos, antialodínicos y antihiperalgésicos a través de su interacción con la vía de NFkB-p65.

Agradecimientos Institucionales

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio de Farmacodinamia de inflamación y dolor en el laboratorio de biología molecular del Departamento de Sistemas Biológicos, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Godínez Chaparro.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 764577 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

Al concluir una etapa importante en mi vida quiero extender un profundo agradecimiento, a quienes hicieron posible este sueño, aquellos que junto a mi caminaron en todo momento y siempre fueron inspiración, apoyo y fortaleza. Esta mención especial es para **mis padres Medardo Santamaria y Yolanda Anzures, y mi hermana Florangeli Anzures**, porque son la motivación de mi vida y pilar fundamental de lo que soy y seré.

A mi tutora Dra. Beatriz Godínez Chaparro, agradezco el tiempo, dedicación, enseñanza y conocimiento que ha compartido conmigo, ya que gracias a su apoyo incondicional esto ha sido posible, y quien además me inspira cada día a seguir en el camino de la ciencia, gracias por su guía durante este arduo camino.

A mis asesores Dr. Miguel Condes Lara, Dr. Jaime Pérez Villanueva y docentes Dra. Julia Pérez Ramos y Dr. Felipe Mendoza Pérez, quienes me han dedicado tiempo y conocimiento.

A mi amiga y compañera de laboratorio, Q.F.B. Cristina Rodríguez gracias por hacer todo este tiempo más ameno, con tu compañía, risas y apoyo incondicional en todo momento.

Abreviaturas

6-OHDA	6-hidroxidopamina
5-HT	Serotonina
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
ASIC	Canales iónotróficos sensibles a ácido
ATF3	Factor de transcripción dependiente de AMPc 3
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Enzima capaz de producir la hidrólisis del ATP
ATV	Área tegmental ventral
B ₁ /B ₂	Receptores a bradicinina 1 y 2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
C	Control
Ca ²⁺	Calcio
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DA	Dopamina
EA	Enfermedades autoinmunes
F	Formalina
g	Gramos
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
H ⁺	Protones
H ₁	Receptor a histamina 1

i.p.	Intraperitoneal
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor
IL	Ipsilateral
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-1-R	Receptor a interleucina
I κ Bs	proteínas inhibitorias de NF κ B
IP ₃	1,4,5-inositol trifosfato
K ⁺	Potasio
Kg	Kilogramos
LIF	Inhibidor de la leucemia
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
mg	Miligramos
Mg ²⁺	Magnesio
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
min	Minutos
mL	Mililitros
mN	Milnewton
Na ⁺	Sodio
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NK ₁	Receptor neurocinina 1 de sustancia P
NK	Células naturales Killer
NF κ B	Factor de transcripción Kappa B
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato

nmol	Nanomoles
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
P ₂ X	receptor purinérgico 2x
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PPX	Pramipexol
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RVM	Médula rostral ventromedial
s.c.	Subcutánea
SPI	Síndrome de piernas inquietas
SSNRIs norepinefrina	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y
SSRIs	antidepresivos selectivos de la recaptura de serotonina
TCAs	Antidepresivos tricíclicos
TrkA	Receptor tirosin cinasa A del factor de crecimiento neuronal
TrkB	Receptor tirosina cinasa B del factor neurotrófico derivado del cerebro
TRPA1	Canales catiónico de potencial transitorio miembro A1
TRPV1	Canal vaniloide de potencial transitorio miembro 1
TTX _r	canales de sodio resistentes a tetrodoxina
TTX _s	canales de sodio sensibles a tetrodoxina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
μL	Microlitros

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEORICO	14
2.1. Definición del dolor	14
2.2. Incidencia.....	14
2.3. Proceso de nocicepción	15
2.4. Sistema nociceptivo	16
2.5. Clasificación del dolor	16
2.6. Dolor nociceptivo	18
2.7. Dolor inflamatorio.....	19
2.8. Dolor disfuncional	20
2.9. Dolor neuropático	21
2.10. Alodinia e hiperalgesia.....	22
2.11. Alodinia e hiperalgesia secundaria	22
2.12. Tratamiento farmacológico para el dolor	24
2.13. Tratamiento farmacológico para la alodinia y la hiperalgesia.....	25
2.14. Dopamina.....	26
2.15. Vías dopaminérgicas.....	27
2.16. La dopamina y la cascada inflamatoria.....	28
2.17. Vía del NFκB	29
2.17.1. Citocinas.....	31
3. ANTECEDENTES.....	33
3.1. Pramipexol.....	34
3.2. Pramipexol y su participación en la nocicepción	34
4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
5. HIPÓTESIS.....	36
6. OBJETIVO GENERAL.....	37
7. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	37
8. MATERIALES Y METODOS.....	37
8.1. Animales	37
8.2. Fármacos.....	38

8.3.	Prueba de formalina aguda.....	38
8.4.	Inducción de alodinia e hiperalgesia secundaria de largo plazo.....	38
8.5.	Prueba de formalina aguda.....	39
8.6.	Evaluación de alodinia e hiperalgesia secundaria inducida por formalina	39
8.7.	Extracción de tejido.....	40
8.8.	Extracción de proteínas.....	40
8.9.	Determinación de NFκB por WB	41
8.10.	Acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	41
9.	DISEÑO EXPERIMENTAL	43
9.1.	Diseño estadístico	44
10.	RESULTADOS	45
10.2.	Desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo inducidas por formalina	46
10.1.	Efecto del pre-tratamiento con PPX sobre la alodinia y la hiperalgesia secundaria de largo plazo inducidas por formalina.....	46
10.2.	Desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo inducida por formalina	48
10.4.	Acoplamiento molecular NFκB-PPX.....	50
11.5.1.	Detección de la proteína NFκB-p65 por Western blot.....	51
11.	DISCUSIÓN	52
12.1.	La administración de formalina al 1% induce alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria	52
12.2.	Efecto del PPX en la nocicepción aguda, y en el desarrollo de la alodinia e hiperalgesia de largo plazo	53
12.3.	Efecto del post-tratamiento sistémico con PPX sobre la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo.....	53
12.4.	Acoplamiento molecular de NFκB-PPX	54
12.5.	Efecto de PPX sobre la expresión de NFκB-p65.....	55
12.	CONCLUSIONES	56
11.	BIBLIOGRAFÍA	56

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Clasificación del dolor según Woolf, 2010.....	17
Figura 2. Dolor nociceptivo.....	18
Figura 3. Dolor inflamatorio.....	19
Figura 4. Dolor neuropático y dolor disfuncional.....	23
Figura 5. Fármacos empleados en el tratamiento de alodinia e hiperalgesia.....	25
Figura 6. Molécula de dopamina.....	27
Figura 7. Vía de señalización de la familia del factor nuclear kappa B (NFκB).....	29
Figura 8. Estructura química de pramipexol.....	34
Figura 9. Cronograma de actividades.....	44
Figura 10. Curso temporal y área bajo de curva pre-tratamiento intraperitoneal con pramipexol sobre las respuestas nociceptivas inducidas por formalina al 1% en ratas administradas con formalina al 1%.....	47
Figura 11. Curso temporal (A y C) y área bajo de curva (B y D) del post-tratamiento intra peritoneal con pramipexol sobre el efecto antialodínico en ratas administradas con formalina al 1%.....	49
Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular de PPX con NFκB por Vina, Gold y AutoDock.....	44
Figura 12. Acoplamiento molecular.....	50
Figura 13. Efecto de PPX sobre NFκB-p65.....	51

1. INTRODUCCIÓN

Las respuestas de dolor, como alodinia e hiperalgesia, ante estímulos térmicos o mecánicos son comunes después del daño tisular o de un proceso inflamatorio. La **hiperalgesia** se define como el incremento en la sensibilidad a los estímulos dolorosos y la **alodinia** se define como una sensación dolorosa provocada por los estímulos inocuos (Woolf, 2011). El tratamiento farmacológico disponible para la alodinia y la hiperalgesia, generalmente, es inadecuado y reduce temporalmente los síntomas; además, de producir efectos secundarios de consideración. Por lo tanto, es importante la búsqueda de tratamientos efectivos que ayuden al manejo terapéutico adecuado de la alodinia y la hiperalgesia, lo que ha llevado a la exploración de nuevas alternativas farmacológicas y al reposicionamiento de fármacos ya existentes como el pramipexol (PPX).

El PPX es un agonista dopaminérgico D2/D3 que ha demostrado tener efecto anti-inflamatorio en modelos animales de inflamación (Sadeghi *et al.*, 2017). Además, el PPX produce actividad antialodínica y antihiperalgésica en animales con la enfermedad de Parkinson (Romero-Sánchez *et al.*, 2020). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos que subyacen el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducidos por éste. En consecuencia, el presente proyecto se enfocó en dilucidar la participación de la vía NFκB en el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por PPX en ratas administradas con formalina. Nuestros resultados sugieren que el pre-tratamiento sistémico agudo con PPX previene el desarrollo de conductas nociceptivas inducidas por formalina, así como el desarrollo de alodinia e hiperalgesia secundarias de largo plazo. Asimismo, el post-tratamiento sistémico con PPX demostró revertir la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo. Posteriormente, exploramos la participación de la vía NFκB en el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por PPX. Nuestros hallazgos aportan información sobre las interacciones de NFκB-p65 con PPX por acoplamiento molecular. Asimismo, se observó que PPX, pero no el vehículo, es capaz de reducir la expresión de NFκB-p65 en ratas administradas con formalina al 1%, sugiriendo que el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducidos por PPX son mediados, al menos en parte, a través de su interacción con NFκB-p65.

2. MARCO TEORICO

2.1. Definición del dolor

El dolor es definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión hística real o potencial, que se describe en términos de dicho daño (Raja *et al.*, 2020). El dolor no solo involucra el proceso fisiológico como lo es la participación de los receptores específicos llamados nociceptores, sino también, involucra una serie de componentes afectivos y emocionales los cuales, en conjunto, crean la experiencia del dolor. Lo que hace al dolor una experiencia compleja y única para cada individuo (García-Andreu & García-Andreu, 2017). El dolor es un proceso importante para la supervivencia del individuo, ya que constituye un sistema de alarma ante daños potenciales para el organismo.

2.2. Incidencia

El dolor es un problema frecuente en la sociedad, estudios recientes sugieren que aproximadamente 20% de los adultos sufren dolor en todo el mundo (Goldberg & McGee, 2011), tan solo el dolor crónico afecta alrededor del 25 al 29% de la población en general a nivel mundial, y cada año cerca de un 10% son diagnosticados con dolor crónico (Covarrubias *et al.*, 2010)

Se estima que individuos con dolor crónico de moderado a severo, suelen perder en promedio 8 días de trabajo cada 6 meses, y 22% pierden al menos 10 días laborables, lo que involucra serias pérdidas en la productividad laboral y económica (Dieleman *et al.*, 2008).

En Estados Unidos de Norte América, el Informe Anual de Costos del 2010 reportó que el costo anual de la atención del dolor es de 560-635 mil millones de dólares, mucho mayor que el costo anual de enfermedades del corazón (309 millones de

dólares), cáncer (243 millones de dólares) y diabetes (188 millones de dólares). En el caso de México, los costos de la atención médica por dolor corresponden al 3% del producto interno bruto, lo cual es mayor que el costo por enfermedades cardiovasculares y cáncer juntas (Covarrubias-Gómez et al., 2010).

2.3. Proceso de nocicepción

El dolor es una experiencia compleja que involucra una serie de factores como la transducción de estímulos ambientales, el procesamiento cognitivo, y el componente emocional, los cuales son resultado de múltiples mecanismos del SNC y SNP (Julius & Basbaum, 2020). La función del sistema de nocicepción es proteger al organismo de daños potenciales del medio ambiente con la finalidad de detectar, localizar e identificar estímulos nocivos que amenacen la integridad del tejido (Zegarra, 2005).

La nocicepción involucra una serie de procesos neuronales fundamentales en el procesamiento del dolor, como lo es la **transducción**; siendo el proceso mediante el cual un estímulo doloroso se convierte en una señal eléctrica a través de las fibras aferentes primarias, para ello se requiere de la activación de nociceptores específicos localizados en los tejidos, y generando potenciales de acción (Rodríguez & Granados, 2020). Los nociceptores son neuronas que se activan frente a estímulos nocivos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del organismo. **La transmisión** es un proceso donde se lleva a cabo la propagación de las señales eléctricas a través de las vías nociceptivas involucradas en el procesamiento del dolor, que van desde la periferia hasta la corteza somatosensorial. **La modulación** es el proceso por el cual se alteran las señales dolorosas, inhibiendo o amplificando el estímulo nocivo, y puede ocurrir en distintos niveles como lo es el ganglio de la raíz dorsal (GRD) y la médula espinal. Finalmente, la **percepción** que es la decodificación de las señales eléctricas, y se presenta cuando la información nociceptiva se integra con factores cognitivos y emocionales creando así la experiencia del dolor (Rodríguez & Granados, 2020).

2.4. Sistema nociceptivo

Después de que se presenta un estímulo nocivo este es detectado por medio de los nociceptores, los cuales presentan umbrales o sensibilidad característica que los distingue de otras fibras aferentes primarias sensoriales.

De manera general, los nociceptores son clasificados en tres grupos funcionales según sus características anatómicas y funcionales (Julius & Basbaum, 2020).

Fibras A α y A β : Son fibras no nociceptivas con cuerpos celulares de diámetro grande, de conducción rápida las cuales detectan estímulos inocuos, por lo cual estas no participan en la generación del dolor.

Fibras A δ : son fibras ligeramente mielinizadas, con un diámetro de 1.5 μ m, con velocidad de conducción rápida de aproximadamente 4-30 m/s, las cuales conducen señales de corta latencia que generan respuestas rápidas.

Fibras C: son fibras amielínicas de diámetro pequeño de 0.3-1.5 μ m, su velocidad de conducción es lenta de aproximadamente 0.4 a 2 m/s, las fibras C son capaces de transmitir estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos y químicos (nociceptores polimodales), que transmiten sensaciones de dolor de tipo quemante y de persistencia más larga (Romera *et al.*, 2000).

2.5. Clasificación del dolor

El dolor puede ser clasificado de distintas maneras, de acuerdo a su duración, intensidad, o por su origen (Puebla, 2005).

Según su duración, el dolor puede dividirse en **dolor agudo** el cual se encuentra limitado en su persistencia a través del tiempo, este tipo de dolor suele persistir durante el proceso de recuperación del tejido; **dolor crónico** es aquel que tiene una duración ilimitada y suele llamarse crónico cuando persiste durante más de tres

meses, este tipo de dolor tiene una duración que va más allá de la reparación tisular. Generalmente, el dolor crónico suele ser secundario a cambios fisiopatológicos que se producen en el sistema nociceptivo, a diferencia del dolor agudo que suele ser un síntoma de una enfermedad, el dolor crónico constituye una enfermedad en sí (Velasco, 2014). Aunado a esto los pacientes con dolor crónico, frecuentemente suelen padecer otras comorbilidades como lo son alteraciones del sueño y ansiedad (Romera *et al.*, 2000).

Por su localización, el dolor puede ser descrito como dolor **somático**; el cual se produce por la excitación anormal de los nociceptores superficiales o profundos; y dolor **visceral** originado por el daño o lesión de los órganos internos (Zegarra, 2007).

Por su intensidad: Puede ser descrito como, leve, moderado y severo, para ello se han creado diversas escalas para medir el dolor, permitiendo su cuantificación de manera cualitativa (Puebla, 2005).

A pesar de las clasificaciones existentes, Woolf en 2010 clasificó el dolor de acuerdo con su origen neurofisiológico, descrito de la siguiente manera; nociceptivo, inflamatorio, neuropático y disfuncional (Figura 1).

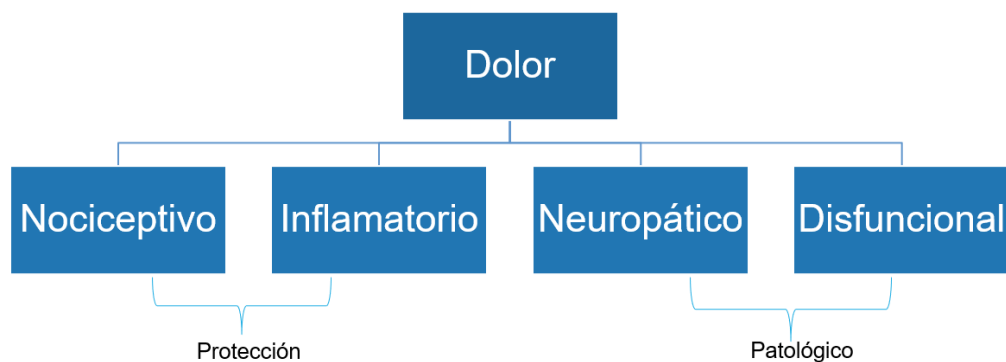


Figura 1. Clasificación del dolor según Woolf, 2010. El dolor fisiológico protector puede dividirse en nociceptivo e inflamatorio. Sin embargo, el dolor patológico puede ser neuropático o disfuncional.

2.6. Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo se presenta a partir de un estímulo ya sea de tipo térmico, químico o mecánico. El dolor nociceptivo evita el daño en el tejido a causa de un estímulo nocivo del medio ambiente (Woolf, 2010). Los mecanismos moleculares incluyen la participación de las neuronas sensoriales primarias que detectan los estímulos, en un proceso denominado nocicepción. Este sistema finalmente lleva a cabo la transmisión de la información desde la periferia hasta llegar a centros supra espinales en donde se lleva a cabo la modulación del dolor (Figura 2) (Gao & Ji, 2010).

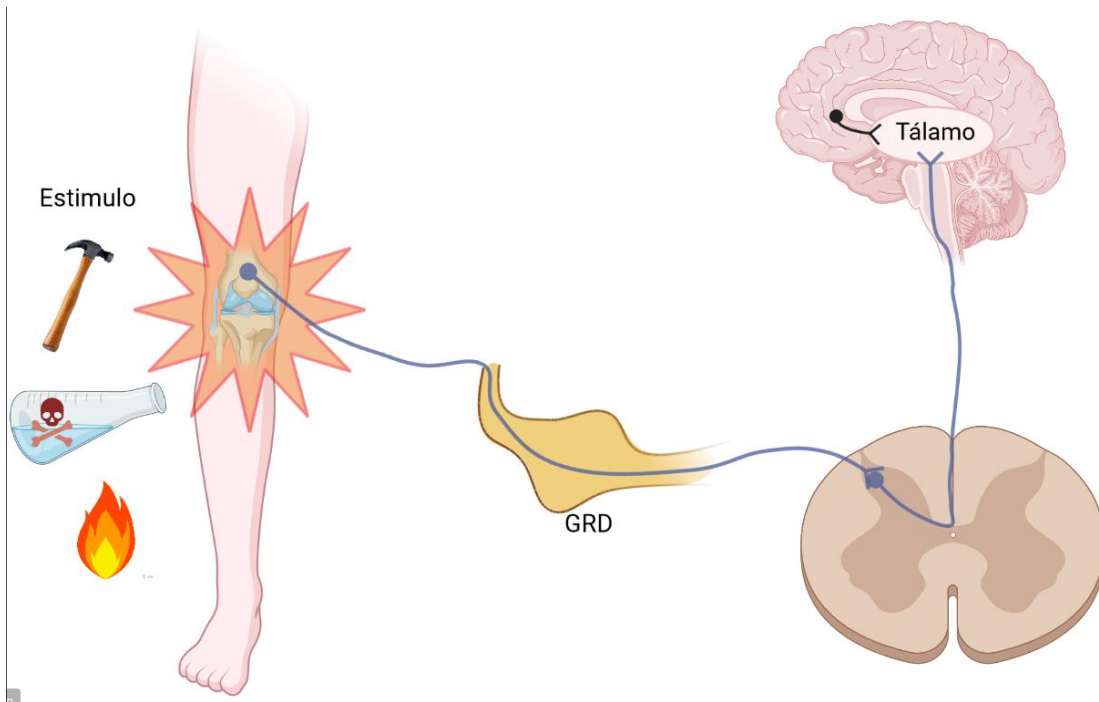


Figura 2. Dolor nociceptivo. El dolor nociceptivo se puede presentar por estímulos térmicos, químicos o mecánicos los cuales, al activar sus receptores específicos producen potenciales de acción transmitiendo la señal a través de las fibras aferentes primarias hasta la asta dorsal de la médula espinal, activando neuronas de segundo orden que hacen conexión con centros supra espinales en donde se lleva a cabo la modulación y percepción del dolor. GRD: Ganglio de la raíz dorsal. Imagen realizada en BioRender.

2.7. Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio es de tipo adaptativo y confiere protección, éste se presenta por la activación del sistema inmune en respuesta a un daño en el tejido o a un proceso infeccioso. El dolor inflamatorio se caracteriza por presentar un aumento en la sensibilidad sensorial así como de promover la recuperación del área lesionada mediante la generación de hipersensibilidad al dolor en la zona lesionada, lo que reduce el riesgo adicional de daño (Woolf, 2010). Después de presentarse algún daño en el tejido se lleva a cabo el reclutamiento de células del sistema inmunológico como macrófagos y células cebadas que liberan moléculas como leucotrienos, bradicininas, serotonina, histamina, acetil colina, tromboxanos, sustancia P en el sitio de la lesión. Estas moléculas son importantes para el desarrollo del dolor, por ejemplo las prostaglandinas son mediadores locales o cofactores que aumentan la sensibilidad de las terminaciones nerviosas (García Fajardo *et al.*, 2001). Dichas sustancias al interactuar con sus receptores específicos generan potenciales de acción los cuales se transmiten a través de las fibras aferentes primarias, pasando por GRD, médula espinal, hasta llegar a centros supra espinales a través de las fibras aferentes secundarias, generando así respuestas características del dolor inflamatorio (Figura 3) (Romera *et al.*, 2000).

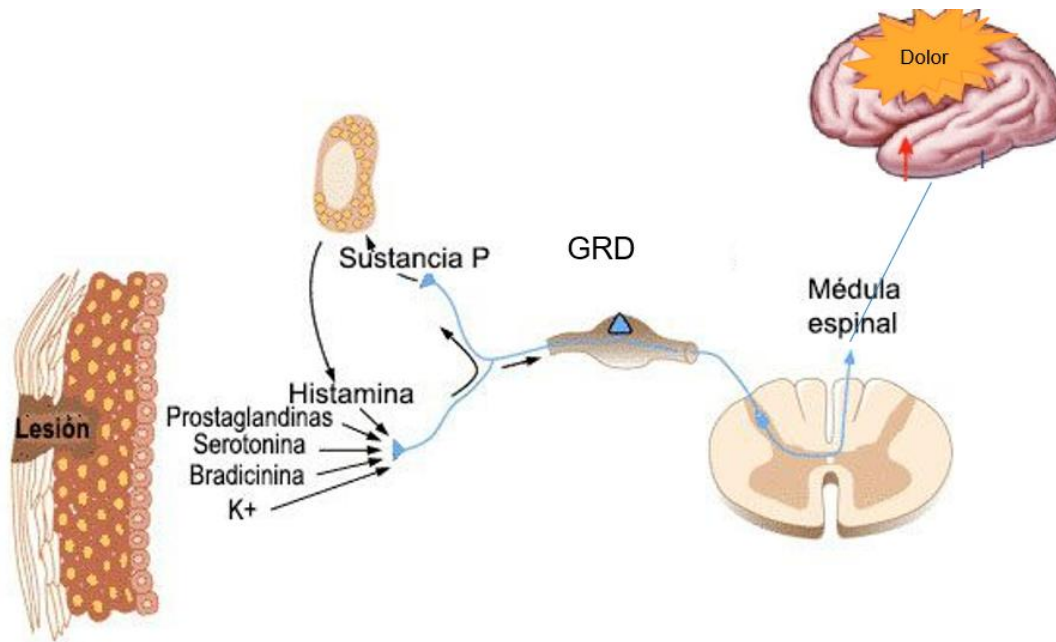


Figura 3. Dolor inflamatorio. Después de que se produce una lesión se liberan mediadores de la inflamación, a partir de células del sistema inmunológico, los cuales se unen a sus receptores específicos generando potenciales de acción, propagándose a través de las fibras aferentes primarias y secundarias, hasta llegar a centros supra espinales donde es percibido el dolor. GRD: Ganglio de la raíz dorsal. Imagen realizada en BioRender.

2.8. Dolor disfuncional

El dolor disfuncional es aquel que surge como consecuencia del funcionamiento anormal del sistema nervioso. El dolor disfuncional puede presentarse en condiciones en donde no hay daño en el SNC, SNP, o un proceso inflamatorio (Costigan & Woolf, 2000). Este tipo de dolor suele generar un aumento en la sensibilidad del sistema sensorial teniendo mayor percepción de dolor, a pesar de no presentarse algún estímulo causal de dolor, los pacientes suelen referir dolor espontáneo e hipersensibilidad (Figura 4). Las afecciones que provocan dolor disfuncional incluyen fibromialgia, síndrome de intestino irritable, cefalea de tipo tensional, cistitis intersticial entre otros síndromes en los que existe dolor sustancial desagradable (Woolf, 2010).

2.9. Dolor neuropático

El dolor neuropático es una afección crónica que surge como consecuencia de una lesión o disfunción del sistema nervioso somatosensorial (Figura 4), el cual puede generar alteraciones cognitivas y emocionales, debido a que los pacientes suelen presentar otras comorbilidades como son depresión, ansiedad y trastornos del sueño (Velasco, 2014).

El dolor neuropático puede tener diversas causas, entre ellas: 1) Daño directo en el sistema nervioso central como lo es la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson (EP), lesión en la médula espinal, entre otras, 2) Daño en el sistema nervioso periférico a causa de un traumatismo o accidente que origine una lesión periférica o después de un procedimiento quirúrgico, 3) A causa de alguna enfermedad metabólica, como la Diabetes Mellitus, 4) A causa de alguna patología viral por ejemplo varicela, herpes, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), o por alguna neurotoxina como el alcohol, la quimioterapia (Velasco, 2014).

El dolor neuropático se caracteriza por presentar áreas consistentes y circunstancias de máximo dolor asociado con signos sensitivos positivos o negativos y/o síntomas espontáneos característicos del dolor neuropático como dolor quemante, lacinizante dolor espontaneo los cuales suelen presentar bajo umbral al dolor (Gómez-Barrios & Tortorici, 2009).

Los síntomas negativos indican un déficit sensorial y los positivos indican respuestas neurosensoriales anormales.

- Síntomas positivos: Surgen como la respuesta a fenómenos neuroplásticos que ocurren al dañarse las fibras aferentes, los cuales pueden ser espontáneos o evocados. Espontáneos como lo es el dolor persistente, quemante, intermitente o lacinante. Las disestesias que son sensaciones anormales desagradables y parestesias que son sensaciones anormales no desagradables como la sensación de hormigueo. Dentro de los síntomas evocados se encuentra la alodinia y la hiperalgesia que son signos sensoriales (Velasco, 2014).

- Sintomas negativos: estos son el primer indicio de daño en el sistema somatosensorial, que se manifiestan con pérdida de la sensibilidad, los cuales pueden variar dependiendo a que nivel fue generado dicho daño, que puede ser en la transducción, la transmisión o la conducción sensorial de una fibra dañada (Velasco, 2014).

Frecuentemente el dolor neuropático se encuentra asociado con signos sensoriales como la alodinia y la hiperalgesia (Colloca *et al.*, 2017).

2.10. Alodinia e hiperalgesia

La alodinia y la hiperalgesia suelen presentarse en varios tipos de dolor como en el inflamatorio, neuropático y disfuncional (Beiske *et al.*, 2009).

La alodinia es cuando se presenta una respuesta dolorosa frente a estímulos que habitualmente no se percibían como nocivos y la hiperalgesia es una respuesta incrementada frente a un estímulo normalmente doloroso, y éstas pueden presentarse como primarias cuando se dan cerca del área lesionada y secundarias cuando se encuentran en un sitio distinto al tejido lesionado (Woolf, 2010).

2.11. Alodinia e hiperalgesia secundaria

Las áreas de hipersensibilidad producidas por una lesión se caracterizan por presentar un aumento en la sensibilidad de las neuronas del SNC y SNP, en donde la hipersensibilidad generada en las fibras aferentes primarias produce sensibilización periférica generando alodinia e hiperalgesia primaria que se presenta en el sitio de la lesión y el aumento en la hipersensibilidad neuronal del SNC produce alodinia e hiperalgesia secundaria, en áreas adyacentes o remotas al sitio de la lesión a causa de la sensibilización central, favoreciendo el desarrollo y/o el mantenimiento de alodinia e hiperalgesia secundarias (Ji & Woolf, 2001).

Se ha sugerido que la hiperalgesia secundaria es la consecuencia de un procesamiento de dolor alterado mediado por el SNC como resultado de la actividad incrementada procedente del sitio del daño. Se han identificado diferentes procesos en la generación y el mantenimiento de los estados hiperalgésicos: 1) la activación y sensibilización de los nociceptores periféricos también llamada sensibilización periférica; 2) la amplificación de la señal nociceptiva a nivel central, conocida como sensibilización central; 3) la activación de los receptores sensoriales de bajo umbral de las áreas periféricas no dañadas que pueden dar origen a los reflejos de raíz dorsal y provocar sensaciones dolorosas y estados de hiperalgesia secundaria y; 4) la modulación descendente facilitadora mediada por la médula rostral ventromedial (RVM) (Godínez-Chaparro *et al.*, 2011).

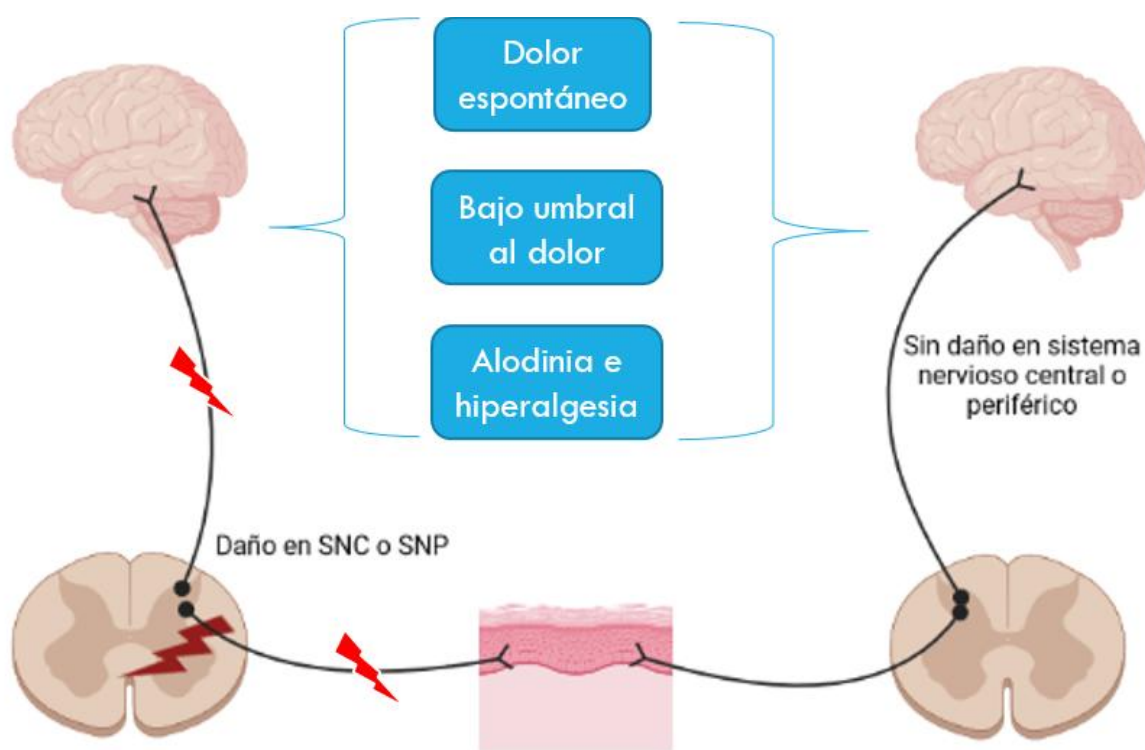


Figura 4. Dolor neuropático y dolor disfuncional. El dolor neuropático se produce por la lesión en el SNC o SNP. El dolor disfuncional se presenta en condiciones en donde no existe algún daño en SNC o SNP. Tanto el dolor neuropático como disfuncional se caracterizan por presentar dolor de tipo espontáneo de bajo umbral al dolor y alodinia e hiperalgesia. Imagen realizada en BioRender.

2.12. Tratamiento farmacológico para el dolor

Es importante una adecuada valoración en cada paciente de la sintomatología que acompañan las sensaciones dolorosas como la alodinia y la hiperalgesia, esto con la finalidad de determinar las causas del dolor y por consiguiente poder brindar un esquema farmacológico adecuado. Por lo tanto, es imperativo contar con tratamientos efectivos que ayuden a mejorar la calidad de vida del paciente.

De manera general el tratamiento y los esquemas para el dolor pueden dividirse en:

Analgésicos no esteroideos: Algunos de los fármacos más empleados para tratar el dolor moderado a leve son:

- Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), en donde se encuentra el ácido acetilsalicílico, que suelen emplearse con mayor frecuencia, el mecanismo principal de los AINES es a través de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas, las cuales son enzimas importantes para que el ácido araquidónico sea transformado en prostaglandinas (PG) (García-Andreu & García-Andreu, 2017). Estos fármacos suelen emplearse para el dolor nociceptivo y el dolor inflamatorio.
- Analgésicos opioides: De manera general los analgésicos opioides suelen ser complementados con AINES cuando no se obtiene suficiente alivio con estos solos, su mecanismo suele ser mediante la interacción con receptores endógenos, principalmente mu, kappa y delta, los cuales se encuentran acoplados a proteínas Gi, disminuyendo así la producción de adenosín mono fosfato cíclico (AMPc); además promueven la apertura de canales de potasio y cierre de canales de sodio (García-Andreu, 2017).

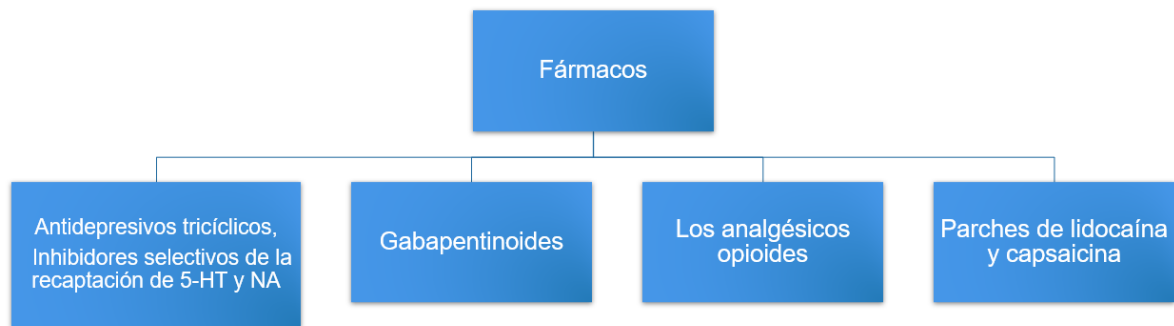


Figura 5. Fármacos empleados en el tratamiento de alodinia e hiperalgesia.

2.13. Tratamiento farmacológico para la alodinia y la hiperalgesia

Actualmente, suelen emplearse diferentes líneas de tratamiento para el manejo de la alodinia y la hiperalgesia, en la primera línea se encuentran los antidepresivos tricíclicos (TCAs) como la desipramina y los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y norepinefrina (SSNRIs) como duloxetina y venfalaxina. Asimismo, suelen emplearse anticonvulsivos como la pregabalina y la gabapentina, los cuales se unen a subunidades de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Finnerup *et al.*, 2015). Dentro de la segunda línea de tratamiento se utilizan los analgésicos opioides débiles como el tramadol, y los opioides fuertes como codeína, morfina, oxicodona, fentanilo, metadona, y estos suelen emplearse solos o en combinación con algún fármaco de la primera línea de tratamiento. Es importante que durante el uso de alguno de estos tratamientos se lleve a cabo un monitoreo adecuado del paciente con la finalidad de evitar la dependencia y el desarrollo de efectos adversos (Dworkin *et al.*, 2007). En la tercera línea suelen emplearse antidepresivos selectivos de la recaptura de serotonina (SSRIs) como citalopram y paroxetina. También suelen utilizarse la metilexina, antagonista de receptores NMDA; parches de lidocaína (Figura 5), los cuales actúan por medio de los canales de sodio dependientes de voltaje; y la capsaicina tópica que se emplea generalmente al 8%, la cual actúa a través de los canales vainilloide de potencial transitorio miembro 1

(TRPV1) (Colloca *et al.*, 2017).

Para poder brindar un tratamiento farmacológico que de mejores resultados para el paciente es importante llevar a cabo una evaluación adecuada y completa considerando la sintomatología, causas, monitoreo constante de la respuesta a los tratamientos, comorbilidades, y basado en estas características establecer un plan de tratamiento personalizado. Asimismo, en el uso de tratamientos para el dolor es importante el manejo adecuado de las dosis empleadas en estos pacientes, esto con la finalidad de tener efectos farmacológicos favorables y evitar reacciones adversas (Tena Blanco, 2014).

Sin embargo, a pesar de los tratamientos y alternativas farmacológicas existentes en la actualidad aún no se cuenta con un tratamiento adecuado. En consecuencia, se tienen grandes retos para el tratamiento efectivo de la alodinia y la hiperalgesia, debido a que el daño en el sistema somatosensorial puede ser causado por una variedad de desórdenes, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus (Jensen *et al.*, 2011), entre otros. Lo que ha llevado a la búsqueda de moléculas ya sea de origen natural o sintético que coadyuven al alivio de los síntomas característicos del dolor.

2.14. Dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor catecolaminérgico del SNC, que se sintetiza en las neuronas dopaminérgicas y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la memoria, la afectividad y la sensación de recompensa, así como en la comunicación neuroendocrina. La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina, y se han identificado cinco tipos de receptores dopaminérgicos, todos estos acoplados a proteínas G y divididos en dos familias de receptores; D1 (subtipos D₁ y D₅) que estimulan la síntesis de AMPc, que es un segundo mensajero intracelular; y D₂ (D₂, D₃ y D₄) que inhiben la síntesis del AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de calcio a través de los canales

dependientes de voltaje. Estos receptores se encuentran distribuidos ampliamente a través del SNC (Bahena *et al*, 2000).

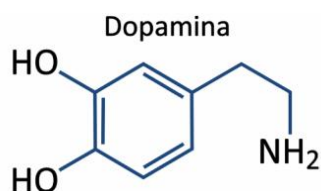


Figura 6. Molécula de dopamina.

La dopamina (Figura 6) tiene un papel importante en la regulación de varios sistemas, así como sobre los efectos inmunomoduladores de las células inmunes periféricas, como lo es la modulación de la fagocitosis, la quimiotaxis y la producción de especies reactivas del oxígeno y las citocinas en leucocitos como granulocitos, macrófagos, células dendríticas, células naturales killer (NK), y linfocitos T (Wenisch *et al*, 1996; Arreola *et al*, 2016).

2.15. Vías dopaminérgicas

Dentro del SNC, el sistema dopaminérgico mesencefálico se subdivide en cuatro áreas, y cada una de ellas posee funciones altamente específicas, estas se dividen en:

- Nigroestriado: se origina en la zona compacta de la sustancia negra y extiende sus fibras al estriado dorsal (núcleo caudado y putamen); el sistema nigroestriado desempeña un papel esencial en el control de los movimientos motores voluntarios (Arriaga *et al.*, 2007).
- Mesolímbico: Sus vías van del área tegmental ventral (ATV) y se proyectan al núcleo accumbens y la amígdala.
- Mesocortical: Esta vía también se origina en el ATV y se proyecta hacia la corteza cerebral, los sistemas dopaminérgicos mesocorticales y mesolímbicos están involucrados en las emociones basadas en el medio ambiente, incluyendo la motivación y el desánimo (Arriaga *et al.*, 2007).

2.16. La dopamina y la cascada inflamatoria

La dopamina tiene un papel importante en la regulación de varios sistemas, así como sobre los efectos inmunomoduladores de las células inmunes periféricas, como lo es la modulación de la fagocitosis, la quimiotaxis y la producción de especies reactivas del oxígeno, y citocinas en leucocitos como granulocitos, macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK), y linfocitos T (Wenisch et al, 1996; Arreola et al, 2016).

Así mismo, se ha determinado la participación de las células gliales en la respuesta inflamatoria en defensa del SNC. La microglía se activa fácilmente frente a estimuladores inmunológicos como la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS), secretando varios factores inflamatorios que incluyen citocinas proinflamatorias que pueden inducir el desarrollo de daño neuronal en diversas condiciones neuropatológicas como lo es la Enfermedad de Parkinson (Yoshioka et al., 2020).

Dentro de estos hallazgos se ha visualizado la importancia funcional de la DA sobre el sistema inmunitario, lo que apoya la teoría de la presencia de sus receptores en las células inmunitarias, por lo que se puede correlacionar su participación en la inflamación (Sadeghi et al., 2017). Estudios recientemente indican que la dopamina es capaz de atenuar la expresión de citocinas inducidas por LPS al inhibir la translocación nuclear de Kappa B (NF-KB) p65, a través de la formación de dopamina quinona en células gliales (Yoshioka et al., 2020).

La presencia de material extraño o de una lesión tisular induce la activación de diversos mecanismos de la respuesta inmunológica con la finalidad de proteger al organismo de un daño. Entre estos procesos se estimula la activación de los macrófagos, los cuales desencadenan una respuesta de reclutamiento de neutrófilos, basófilos y eosinófilos, los que ejercen efectos amplificadores, provocando la activación y la liberación de mediadores químicos como: leucotrienos, bradicininas, serotonina, histamina, iones potasio, interleucina, TNF- α , acetilcolina, tromboxanos, sustancia P y factor activante de plaquetas. Los cuales,

también son importantes en el desarrollo y el mantenimiento del dolor (Guerrero *et al*, 2006).

En la médula espinal, los nociceptores liberan mensajes a través de la liberación de neurotransmisores del dolor como el glutamato, la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC). Algunos mediadores químicos producen activación de nociceptores por medio de potenciales de acción y otros los sensibilizan, por ello la importancia de conocer los mediadores implicados y su participación en la cascada inflamatoria (Latremoliere & Woolf, 2009).

En la actualidad se conocen una serie de mediadores que participan en la señalización de la cascada inflamatoria, entre ellos uno de los más importantes es el factor nuclear Kappa B (NFkB).

2.17. Vía del NFkB

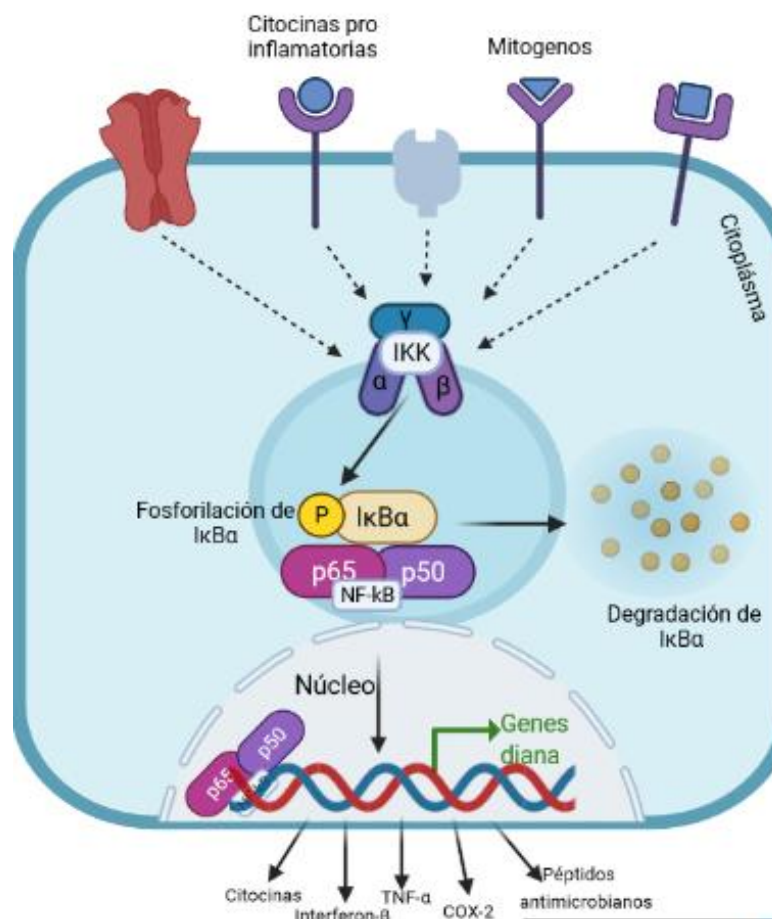


Figura 7. Vía de señalización de la familia del factor nuclear kappa B (NFκB). NFκB es un heterodímero (p50/p65), el cual, es secuestrado en el citoplasma por proteínas inhibitorias de NFκB (IκBs). La estimulación de la cascada activa la señalización de las proteínas cinasas (IKK). La fosforilación de NFκB (IκB-α), una proteína inhibitoria, por IKK es una señal para que IκB-α pueda ser ubiquitinizado y degradado por la proteasoma. Una vez que NFκB se encuentra libre puede translocarse al núcleo, en donde las subunidades de NFκB (p50/p65) pueden unirse a sus genes diana y activar la transcripción de una variedad de genes que codifican para diversas sustancias que regulan la proliferación y la supervivencia de las células, responsables de la de respuesta inflamatoria y la respuesta del sistema inmune. Imagen realizada en BioRender.

La familia del factor nuclear κB (NFκB) es un complejo proteico importante en el control de la inmunidad innata y adaptativa. Las proteínas de NFκB se encuentran presentes en el citoplasma y están asociadas a proteínas inhibitorias que se conocen como inhibidores NFκB (IκB) (Kumar *et al.*, 2004). Después de la activación del factor por medio de inductores, las proteínas IκB se fosforila, ubiquitiza y, posteriormente, son degradadas por el proteosoma (Figura 7). La degradación de IκB permite que las proteínas NFκB se transloquen al núcleo y se unan a sus sitios de unión de ADN para regular la transcripción de un gran número de genes, incluidos péptidos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas, proteínas de respuesta al estrés y proteínas anti-apoptóticas (Li & Verma, 2002). La actividad de este factor es importante para la supervivencia y el desarrollo de la respuesta inmune normal, también, la actividad constitutiva de este complejo se ha asociado con enfermedades inflamatorias.

Las proteínas de NFκB se pueden dividir en diferentes miembros de esta familia que incluye RelA (p65), NFκB1 (p50;p105), NFB2 (p52; p100), c-Rel, y RelB (Kumar *et al.*, 2004).

Estas proteínas están formadas por una región N-Terminal de 300 aminoácidos estructuralmente conservada, que contiene dos dominios de dimerización, localización nuclear y unión al ADN. Las proteínas C-Rel, RelB y RelA tienen un dominio de transactivación no homólogo carboxi terminal, lo que activa la

transcripción de sitios de unión a NFκB en genes diana, mientras que las Rel, tales como el homodímero p50 carecen de este; sin embargo, presentan sitios de consenso de NFκB en el ADN, por lo que funcionan como represores de la transcripción (Li & Verma, 2002)

La principal forma activa de NFκB es un heterodímero de la subunidad p65 asociada con la subunidad p50 o p52. Siendo p65 y p50 quienes se expresan ampliamente en varios tipos celulares.

Asimismo, el NFκB regula una serie de funciones, entre las cuales se encuentra su participación en la transmisión de información sináptica al núcleo, y que influye en un gran número de genes importantes para la acción SNC, como aquellos que codifican para neuropéptidos, proteína precursora β-amieloide, iNOS, COX-2, Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I, citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1β, TNF-α y quimiocinas (Kumar *et al.*, 2004).

2.17.1. Citocinas

Las citocinas son una familia de péptidos producidos en fluidos corporales y por tejidos durante la inflamación. Estas moléculas regulan la función y la comunicación intracelular, estas pueden inducir la diferenciación celular, la quimiotaxis y la secreción de inmunoglobulinas (Malek *et al.*, 2007). Además, las citocinas tienen la capacidad de activar a las fibras sensoriales primarias de tipo C y Aδ. En la síntesis de estas pueden intervenir tres vías, la vía plasmática, la tisular y la plasma/tejido independiente. En donde en la última se observa en mastocitos y basófilos (García Fajardo *et al.*, 2001). Las citocinas pueden dividirse como proinflamatorias y anti-inflamatorias, entre las que tenemos:

- IL-1: es una citocina de acción proinflamatoria, que se sintetiza generalmente en las células mononucleares y macrófagos, la cual actúa como pirógeno y media la activación de células T-helper (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).

- IL-2: Citocina proinflamatoria que se sintetiza en los linfocitos T colaboradores y es activada por la cascada inflamatoria, dicha activación produce la liberación de factores de crecimiento y estimula la síntesis de interferón, liberación de IL-1, TNF- α y β (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).
- IL-4: Es una citocina anti-inflamatoria, producida por los linfocitos T, mastocitos y basófilos, ayuda a la diferenciación celular de los linfocitos B, la cual ayuda a disminuir la síntesis de citocinas (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).
- IL-6: es una citocina que puede ser de tipo proinflamatoria y anti-inflamatoria, producida por los monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblasto, desencadena la producción de IL-1, esta interleucina actúa como pirógeno, activa la síntesis de inmunoglobulinas, así como la activación de proteínas de fase aguda (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).
- IL-8: Esta es una citocina proinflamatoria, producida por mastocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, este es un activador quimiotáctico y activador de neutrófilos (García Fajardo *et al.*, 2001).
- TNF- α : Este factor es una citocina proinflamatoria, no glicosilada, producida principalmente por monocitos, macrófagos, y linfocitos T, se encuentra en el peritoneo, tejido esplénico, neuronas y células gliales, desempeñando funciones importantes tanto en la hiperalgesia inflamatoria como en la neuropática (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).

Las principales citocinas que actúan en la respuesta inflamatoria son: IL-1, TNF- α , IL-8, IL-6 e interferones. En diferentes estudios se ha descrito, el ambiente químico post trauma lleva a la migración de leucocitos asociados a la inflamación y es responsable de la segregación de mediadores químicos que generan dolor. Sin embargo, estudios sugieren que la respuesta inflamatoria en la generación de dolor no se encuentra limitada solo por la migración de leucocitos. Por lo que se cree que

la participación de las citocinas proinflamatorias influye en el proceso nóxico, y pueden originarse en células inmunológicas, neuronales y gliales, tanto en SNC como en SNP, lo cual puede desencadenar efectos a corto y largo plazo. Los efectos a corto y largo plazo se pueden presentar por medio de una eventual hiperexcitabilidad crónica, alteraciones en la expresión de nociceptores, procesamiento anormal de señales nóxicas y exacerbación de los procesos del dolor, tales efectos causados directamente por las citocinas o mediados por estas (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).

3. ANTECEDENTES

La dopamina desempeña un papel importante en la memoria, el movimiento y la sensación de recompensa. También, se ha demostrado que la dopamina juega un papel fundamental en el procesamiento del dolor y la analgesia. Niveles bajos de dopamina contribuyen probablemente a los síntomas dolorosos presentados por pacientes con la enfermedad de Parkinson (Peng *et al.*, 2006). Asimismo, la neurotransmisión dopaminérgica anormal, y juega un papel importante en condiciones dolorosas como fibromialgia y neuropatía diabética (Ferrarini *et al.*, 2022).

Estudios recientes han demostrado la importancia funcional de la dopamina sobre el sistema inmunológico, lo que apoya la presencia de receptores DOPAmínérgicos en las células del sistema inmune, sugiriendo su participación en la inflamación (Sadeghi *et al.*, 2017). Además, estudios recientes indican que la dopamina quinona es capaz de atenuar la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) inducidas por la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS), al inhibir la translocación de NF κ B p65 en cultivo de células microgliales BV-2 de ratón (Yoshioka *et al.*, 2020). Estos datos sugieren la participación de la dopamina en la modulación del dolor, y la posible participación de agonistas de la dopamina en la modulación del dolor.

3.1. Pramipexol

La participación de la DA en distintas patologías ha resultado de gran interés en el campo de las neurociencias. Por lo cual, se han estudiado diversos fármacos agonistas de la DA, como el PPX, un fármaco no ergólico, agonista dopaminérgico de los receptores D2/D3, con mayor selectividad a los receptores D3, que es empleado como tratamiento de varios síntomas de la enfermedad de Parkinson como el temblor, rigidez y bradicinesia (Sadeghi *et al.*, 2017).

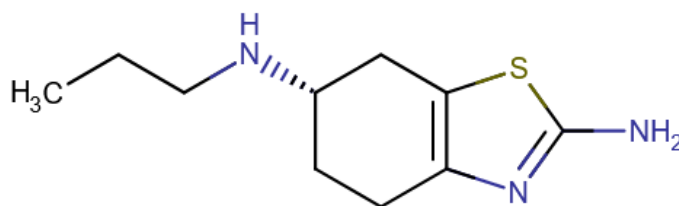


Figura 8. Estructura química de pramipexol

El PPX (Figura 8) fue aprobado por la FDA en 1997 y en 2006 se recomendó su uso para el tratamiento del síndrome de piernas inquietas (SPI). Estudios recientes demuestran que el PPX tiene efectos neuro protectores sobre la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Edwards *et al.*, 2022).

3.2. Pramipexol y su participación en la nocicepción

Estudios realizados por Sadeghi y colaboradores (2017) demuestran propiedades anti-inflamatorias de PPX, un agonista dopaminérgico D2/D3, empleado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. El pretratamiento con PPX (0.1 y 1 mg/Kg) reduce la inflamación inducida por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), carragenina y formalina (Sadeghi *et al.*, 2017). Cabe señalar, que el efecto anti-inflamatorio inducido por PPX es superior al mostrado por indometacina (10 mg/Kg) en estos mismos modelos animales de inflamación (Sadeghi *et al.*, 2017). Asimismo, estudios realizados por Romero-Sánchez y colaboradores (2019) indican

que la administración sistémica de PPX revierte la alodinia y la hiperalgesia inducida por la lesión unilateral de la Sustancia Negra de la pars compacta (SNpc) en ratas (modelo animal de la enfermedad de Parkinson). En conjunto, estas evidencias sugieren que el PPX podría resultar útil para el alivio de la alodinia y la hiperalgesia.

Además, se ha demostrado que PPX reduce la producción de citocinas proinflamatorias como, IL-1 β , IL-6, y TNF- α (Rocha *et al.*, 2018). Los hallazgos antes descritos sugieren que el PPX podría resultar efectivo para mitigar procesos antinociceptivos y antiinflamatorios. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos de acción responsables de inducir estos efectos.

Recientemente, se ha sugerido que el efecto anti-inflamatorio de PPX podría ser mediado a través de los componentes de la cascada inflamatoria de NF κ B, ya que se ha visto que en enfermedades generadas por un daño en el SNC o SNP, se presenta un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias. Un ejemplo de lo anterior es, la adición de PPX (200 ng/mL) en muestras de pacientes con la enfermedad de Parkinson, donde disminuyen los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Rocha *et al.*, 2018). En esta misma línea, se ha demostrado que la inhibición transgénica de NF κ B es capaz de atenuar el dolor y la respuesta inflamatoria después de una lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático (Fu *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, Sakaue y colaboradores (2001) reportan que la activación de NF κ B está implicada en el inicio y el desarrollo del dolor neuropático y demostraron que una sola inyección endoneurial de un señuelo que bloquea a NF κ B en el sitio de lesión nerviosa reduce tanto la activación de NF κ B como la expresión de NTF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , iNOS en el ganglio de la raíz dorsal lesionado. Además, Sakaue y colaboradores (2001) demostraron, que la administración de un señuelo de NF κ B alivia la hiperalgesia térmica por al menos dos semanas posteriores a su administración (Sakaue *et al.*, 2001). En conjunto, estos datos sugieren que los efectos antinociceptivos inducidos por PPX podría ser mediados a través de la vía NF κ B. Sin embargo, hasta el momento, no existe evidencia contundente que sustente esta hipótesis.

4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es un problema frecuente en la sociedad, tan solo el dolor crónico afecta, aproximadamente, del 25 al 29% de la población a nivel mundial (Covarrubias *et al.*, 2010). Asimismo, el dolor de tipo patológico (neuropático, disfuncional, y ocasionalmente, inflamatorio) se encuentra asociado con un aumento en la prescripción de medicamentos y a la búsqueda de atención médica por parte del paciente. Quien padece estos tipos de dolor suelen experimentar un conjunto de síntomas como sensación de ardor, alodinia e hiperalgesia, tales síntomas suelen ser persistentes y tienden a volverse crónicos con el paso del tiempo, y estos síntomas no suelen ser mitigados con los analgésicos comunes (Colloca *et al.*, 2017). Tan solo en México los costos a la atención de los problemas del dolor corresponden al 3% del producto interno bruto, lo cual es mayor que el costo por enfermedades cardiovasculares y cáncer juntas (El universal, 2017). Por ello, es importante la búsqueda de tratamientos efectivos que ayuden al manejo terapéutico adecuado del dolor patológico, lo que ha llevado a la exploración de nuevas alternativas farmacológicas y al reposicionamiento de fármacos ya existentes como el PPX, que ha demostrado tener efectos anti-inflamatorios y con potenciales propiedades antialodínicas y antihiperálgésicas (Romero-Sánchez *et al.*, 2020; Sadeghi *et al.*, 2017). Estos hallazgos sugieren que el PPX podría resultar útil para el tratamiento de la alodinia y la hiperalgesia. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos de acción que subyacen el potencial efecto antialodínico y antihiperálgésico inducido por PPX.

5. HIPÓTESIS

El efecto antialodínico y antihiperálgésico inducido por pramipexol es mediado por la vía NFκB-p65.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la posible participación de la vía de NFκB-p65 en el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por pramipexol.

7. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el efecto antinocepcivo inducido por la administración aguda de pramipexol en la prueba de formalina.
- Elucidar el posible efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por la administración intraperitoneal de pramipexol en los fenómenos de alodinia e hiperalgnesia secundaria inducidas por formalina.
- Identificar la interacción de pramipexol con la vía NFκB-p65 como posible mecanismo de acción responsable de inducir el efecto antialodínico y antihiperalgésico.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de peso aproximado de 180–200 g, utilizando 5 grupos con una n = 6. Los animales se obtuvieron del Bioterio Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la UAM–Xochimilco, los cuales permanecieron bajo condiciones de luz/oscuridad 12:12 h, a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con acceso libre a agua y alimento. Al finalizar los experimentos las ratas fueron sacrificadas en una cámara de CO₂. Se siguió el protocolo previamente aprobado por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de la UAM-Xochimilco y de acuerdo con las Guías para la Experimentación Animal de la Asociación

Internacional para el Estudio del Dolor (IASP). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con el Consejo Mexicano para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.2. Fármacos

El PPX fue obtenido en Sigma Aldrich, St Louis USA, y se prepararon usando como vehículo solución salina al 0.9%. El formaldehído se obtuvo de Fisher Scientific, Madrid España.

8.3. Prueba de formalina aguda

El dolor agudo fue inducido por medio de la administración de 50 μ L de formalina al 1%. Las ratas fueron inmovilizadas brevemente manteniendo visible la extremidad trasera derecha y se llevó a cabo la administración de 50 μ L de solución salina o formalina al 1% subcutánea (s.c) en la superficie del dorso de la extremidad trasera utilizando una aguja de calibre 30 (Fu *et al.*, 2001). Inmediatamente después de administrar la formalina se cuantifico la conducta dolorosa como el número de sacudidas de la extremidad trasera inyectada registradas en un lapso de 60 min, evaluando durante 1 min cada 5 min.

8.4. Inducción de alodinia e hiperalgesia secundaria de largo plazo

La alodinia y la hiperalgesia fueron inducidas con formalina al 1% (50 μ L). Tras la administración de la formalina en el dorso de la exremidad trasera derecha, como se describió anteriormente, y se llevó a cabo la evaluación de la alodinia y la hiperalgesia por el método de retiro de la pata (Wheeler-Aceto & Cowan, 1991), seis días después de la administración de formalina.

8.5. Prueba de formalina aguda

Para la prueba de la formalina aguda (Dubuisson & Dennis, 1977), las ratas se colocaron en cilindros de plexiglás durante 20 min con la finalidad de ambientarse al entorno. Después de este periodo, se administró por vía i.p cada tratamiento según fuera el caso para cada grupo y 30 min después se administró vía subcutánea 50 μ L de formalina al 1% en el dorso de la extremidad posterior derecha.

Posteriormente, las ratas se colocaron en el cilindro y se cuantificó la conducta dolorosa como el número de sacudidas que se presentaron en la extremidad trasera inyectada en intervalos de 1 min cada 5 min, hasta completar un tiempo de evaluación de 60 min (Wheeler-Aceto & Cowan, 1991). La disminución en el número de sacudidas se consideró como antinocicepción. Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Dubuisson & Dennis, 1977).

8.6. Evaluación de alodinia e hiperalgesia secundaria inducida por formalina

La alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria inducida por la formalina se evaluaron mediante el método de retiro de la pata. Las ratas se colocaron en cámaras de observación de plexiglás con fondo de malla de alambre, permitiendo el acceso a las extremidades traseras y se dejaron durante 15 min para que se aclimataran al medio ambiente antes de iniciar la prueba (Fu *et al.*, 2001; Wheeler-Aceto & Cowan, 1991). Inicialmente se registraron mediciones de la línea base, y fueron empleados los filamentos de von Frey (Touch test sensory evaluator), utilizando las fuerzas de flexión de 10 milinewtons (mN) (1 g) para alodinia y 250 mN (26 g) para hiperalgesia (Fu *et al.*, 2001), aplicando 10 veces la prueba en la superficie plantar de ambas extremidades evitando las almohadillas de la extremidades traseras, la cual, es una región con menos sensibilidad y se registró cada vez que se presentó respuesta de retirada de la pata. Se completaron tres ensayos para obtener un número promedio de estas respuestas.

En condiciones normales, los filamentos más finos en este caso 10 mN, estimulan las fibras A β (mecanorreceptores de bajo umbral), por lo tanto, no causa respuesta de retirada de la pata, sin embargo, la presencia de estas respuestas en las ratas indica alodinia. Por otro lado, los filamentos más gruesos podría estimular las fibras nociceptivas A δ o incluso fibras C (mecanorreceptores de alto umbral) en este caso el uso del filamento de 250 nM es considerado como un estímulo nocivo, teniendo respuestas de hiperalgesia (Tena Blanco, 2014). El método de formalina es capaz de generar respuestas al dolor alteradas como la alodinia y la hiperalgesia frente a estímulos mecánicos y térmicos, que son comunes después de una lesión tisular, los cuales pueden desarrollarse como respuestas primarias, así como respuestas secundarias (Colloca *et al.*, 2017), por lo que para fines del experimento se considerará la alodinia y la hiperalgesia secundaria, ya que la evaluación con los filamentos de von Frey serán realizados en sitios diferentes de la administración de la formalina.

8.7. Extracción de tejido

Para la extracción de la médula, las ratas fueron sedadas con isoflurano vía respiratoria (VET One, Pasadena, USA) y una sobredosis de pentobarbital sódico (80 mg/kg, i.p) (PiSA farmacéutica, México) y sacrificadas por decapitación. Posteriormente, se expuso la columna vertebral para extraer la médula. Se conservó la zona lumbar L4-L6, esta se dividió en la porción ipsilateral (IL) y contralateral (CL) y se colocaron en tubos eppendorf y se resguardaron en ultracongelación (-70°C).

8.8. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se colocó la porción medular L4-L6 en tubos cristal para su homogenización. Posteriormente, se colocó 1 mL de buffer de lisis y 40 μ L de inhibidor de proteasas (Complete, Roche), una vez que se homogeneizo el tejido en el homogeneizador de vidrio se colocó la muestra en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó durante 15 min a 15,000 r.p.m. Posteriormente, se recolectó el

sobrenadante y se almacenó en alícuotas de 250 µL a -70°C. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry bajo (Walker, 1996) y se midió la absorbancia de la muestra en espectrofotómetro (Beckman Coulter, USA) a 500 nm.

8.9. Determinación de NFκB por WB

Para realizar el WB se utilizó un gel de acrilamida al 10%, y se emplearon 20 µg de proteína de cada muestra, y un carril con 6 µL de marcador, respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a 150 V (Volts) con una fuente de poder Bio-Rad (California, USA). La transferencia se realizó utilizando una membrana de PDVF (fluoruro de polivildeno) en condiciones húmedas durante 1 h a 100 V, una vez completa la transferencia se realizó el bloqueo de la membrana utilizando albúmina al 5% (Merk, Darmstadt, Alemania) durante 2 h. Al término de este periodo, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno utilizando TBS-Tween 20 al 0.1%, y más tarde se incubaron las membranas con el anticuerpo primario NFκB p65 (Ab16502, Abcam, Cambridge, UK) en una dilución (1:2000) y Actina (Ab1801, Abcam, Cambridge, UK) en una dilución (1:500), en PBS-albumina 3% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 20 al 0.1% de la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG peroxidasa producido en cabra (A0545, Sigma Aldrich, St Louis, USA) en dilución (1:40,000) durante 2 h. Finalmente se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 20 al 0.1% y se reveló la membrana con Immobilon (Merck, Darmstadt, Alemania) a diferentes tiempos de exposición utilizando un fotodocumentador de ChemiDocXR (Bio-Rad, California, USA).

8.10. Acoplamiento molecular (*docking*)

La molécula de PPX se dibujó en 2D mediante *ChemDraw* empleando la paquetería de ChemOffice 2020 (PerkinElmer informatics). Posteriormente, se llevó a cabo una

optimización de geometría para obtener la molécula en 3D con *Chem3D* empleando el método de parametrización semiempírico 3 (PM3) (Persson et al., 2018).

Se obtuvo la molécula diana de NFκB (1nfi) en 3D en formato .pdb de la base de datos *Protein Data Bank* (Berman et al., 2002). Posteriormente, se removieron las moléculas de agua y el ligando, obteniéndose solo las cadenas de interés por medio de *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0* (Schrödinger, LLC), y la molécula de NFκB fue minimizada mediante la plataforma de *Yasara biosciences* (Krieger et al., 2008).

El ligando PPX y la diana NFκB obtenidos y minimizados se transformaron en formato .pdbqt mediante *AutoDockTools 1.5.6* (Morris et al., 2009).

Para determinar las interacciones y los sitios de unión entre PPX y las proteínas diana se llevó a cabo un *docking* ciego con el programa *AutoDock Vina* empleando los parámetros predeterminados con una exhaustividad de 100 (Morris et al., 2009). Los resultados obtenidos se analizaron empleando los programas *Discovery Studio 2019* y *PyMOL* (Schrödinger, LLC). Posteriormente, se empleó *Gold 2020.3.2*, para realizar un *docking* dirigido sobre las coordenadas obtenidas en el paso anterior ($x=-20.4$, $y=84.073$, $z=122.4$), en un radio de esfera de 10 Å (Jones et al., 1997), este *docking* se realizó mediante el uso del algoritmo genético Lamarckiano (LGA), y se utilizaron los parámetros predeterminados a excepción del número de corridas, el cual se aumentó a 100. Asimismo, se realizó un *docking* dirigido empleando *AutoDock 4.2*, con un tamaño de caja de 40 Å x 40 Å x 40 Å, en un espacio de 0.375 Å ($x=-20.32$, $y=85.357$, $z=119.706$) empleando el algoritmo genético, realizando 100 corridas.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar el efecto antinociceptivo inducido por la administración aguda de PPX en la prueba de formalina las ratas fueron administradas con vehículo (solución salina 0.9% i.p.), PPX (0.1, 1 y 3 mg/Kg i.p.) 30 min antes de iniciar la prueba. Posteriormente, las ratas fueron administradas con formalina al 1% en el dorso de la extremidad trasera y se evaluaron las respuestas de retiro de la extremidad trasera inyectada en intervalos de 1 min, cada 5 min, durante 60 min. Al finalizar el experimento, las ratas fueron colocadas en sus cajas y se resguardaron hasta el día de su evaluación. Para determinar si el pre-tratamiento con PPX es capaz de prevenir el desarrollo de la alodinia y la hiperalgesia secundaria, 6 días después de la administración con formalina 1%, a los mismos grupos de ratas utilizados en la prueba aguda de formalina se les evaluó la alodinia y la hiperalgesia secundaria por el método de retiro de la extremidad trasera.

Por otro lado, para determinar si el post-tratamiento con PPX era capaz de revertir las conductas nociceptivas de alodinia e hiperalgesia inducidas por formalina. En primera instancia, a los animales se les evaluó la alodinia y la hiperalgesia inicial, previo al experimento, esto con la finalidad de descartar aquellas ratas que presenten estas características de dolor. Aquellas ratas que no presentaron alodinia o hiperalgesia inicial se distribuyeron en 5 grupos con una n = 6.

Para determinar si el PPX es capaz de revertir la alodinia y la hiperalgesia secundaria inducida por formalina, las ratas fueron administradas con vehículo (solución salina 0.9% i.p.), PPX (0.1, 1, 2 y 3 mg/Kg i.p) 6 días después de la administración de la formalina al 1%. Posteriormente, la alodinia y la hiperalgesia se evaluaron por el método de retiro de la pata durante 0, 1, 2 y 4 horas después de la administración i.p. del vehículo o PPX (Figura 9).

Una vez concluido el tiempo de evaluación las ratas fueron sedadas con isoflurano y decapitadas para extraer la zona lumbar L4-L6 derecha e izquierda y se resguardaron a -70°C para su posterior procesamiento.

Finalmente, para determinar si PPX puede interaccionar con la vía NFκB-p65 como posible mecanismo de acción responsable de inducir el efecto antialodínico y antihiperalgésico. En primera instancia, se exploró la posible interacción entre NFκB con PPX por acoplamiento molecular. Posteriormente, la zona lumbar L4-L6 ipsilateral a la inyección con formalina de animales tratados con PPX (1 y 3 mg/Kg), formalina, naive, previamente resguardada fueron homogenizadas y las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry. Mas tarde, se determinó la expresión de NFκB por western blot (WB).

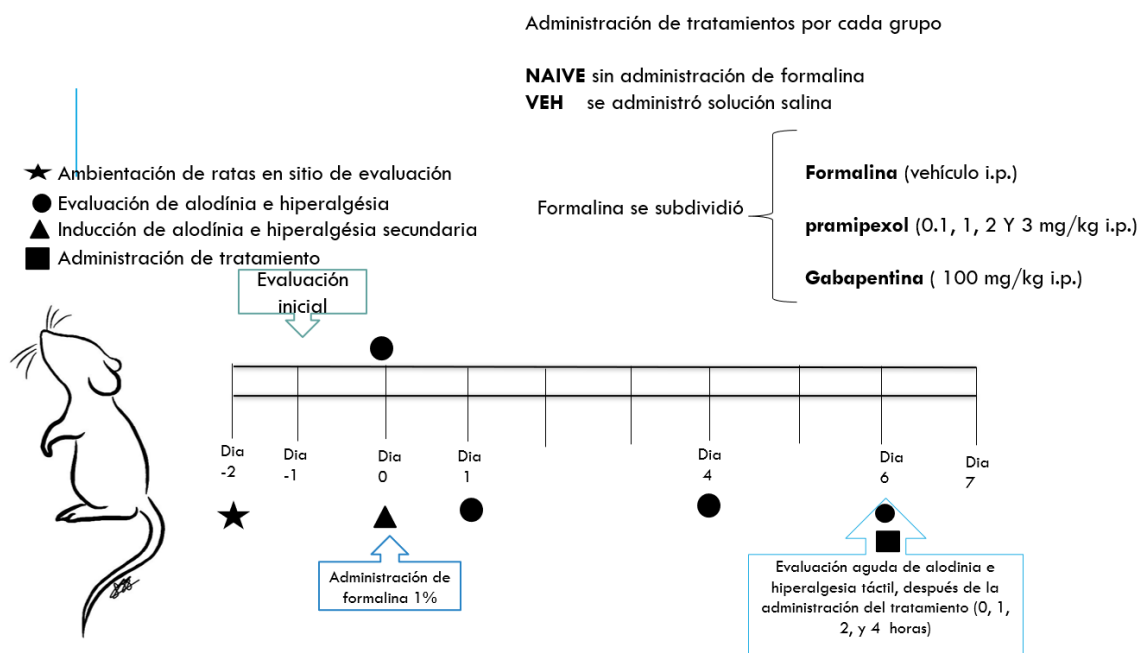


Figura 9. Cronograma de actividades para determinar la capacidad de pramipexol para revertir los fenómenos de alodinia e hiperalgnesia secundaria inducidos por formalina al 1%.

9.1. Diseño estadístico

Los datos de la conducta nociceptiva aguda inducida por formalina se expresaron como el área bajo la curva del número de sacudidas de la pata presentadas en 1 h contra el tiempo. El área bajo la curva se calculó mediante la regla de los trapezoides. Los datos de alodinia e hiperalgnesia mecánicas secundarias de largo

plazo inducidas por formalina están expresados como el promedio del número de respuestas de retiro de la pata de tres ensayos. Cada ensayo consistió en la aplicación de 10 estímulos con los filamentos de von Frey de 1 o 26 g. Cada ensayo se realizó en la pata ipsilateral y contralateral el día 6 después de la inyección de formalina para los grupos con pre-tratamiento, y el día 6 después de la inyección de formalina para las ratas de los grupos post-tratamiento. En todos los casos, los datos son el promedio ($n=6$) \pm error estándar.

Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron por análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey. Una $P < 0.05$ se consideró significativa.

10. RESULTADOS

10.1. Efecto antinociceptivo inducido por la administración aguda de pramipexol en la prueba de formalina

La administración de formalina al 1% en el dorso de la pata trasera derecha con solución salina como pre-tratamiento i.p indujo un patrón típico de respuesta de retiro de la pata (Figura 10A). La fase uno comenzó inmediatamente después de la administración de formalina y se presentó una disminución de las respuestas nociceptivas en los primeros 5 min. Entre los 5–10 min se presentó un período quiescente. La fase dos comenzó a los 15 min y permaneció hasta los 60 min. La administración sistémica de PPX (1 y 3 mg/Kg, i.p.) redujo, significativamente, las respuestas nociceptivas inducidas por formalina durante la fase dos (Figura 10B). En contraste, el PPX no redujo las respuestas de sacudida de la pata inducidas por formalina en la fase uno. El máximo efecto antinociceptivo producido por PPX (3 mg/Kg, i.p.) con la dosis más alta fue de 56%.

10.2. Desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo inducidas por formalina

La aplicación de un filamento de von Frey de 1 g (estímulo inocuo) en animales sin tratar (Naive) no produjo respuesta de retiro de la extremidad trasera. Por otra parte, cuando a estos animales se les aplicó el filamento de von Frey de 26 g (estímulo nocivo) respondieron en una ocasión (Figura 10D). La inyección de formalina al 1%, en el dorso de la pata trasera derecha produjo alodinia e hiperalgesia secundaria tanto en la pata IL como en la pata CL (Figura 10C y 10D). Esto se observó como un aumento en el número de respuestas de retiro de la extremidad trasera tras la aplicación de los filamentos de von Frey 1 y 26 g, respectivamente.

10.1. Efecto del pre-tratamiento con PPX sobre la alodinia y la hiperalgesia secundaria de largo plazo inducidas por formalina

El pre-tratamiento sistémico -30 min antes de la inyección de formalina al 1%, con PPX (0.1, 1 y 3 mg/Kg, i.p.) (Figura 10C) previno significativamente ($P < 0.05$) el desarrollo de la alodinia mecánica secundaria en ambas extremidades traseras. Por otra parte, el pre-tratamiento con PPX en las dosis de 1 y 3 mg/Kg, i.p., pero no la dosis de 0.1 mg/Kg (Figura 10D), disminuyeron significativamente el desarrollo de la hiperalgesia secundaria tanto en la pata IL como en la CL. Cabe resaltar que el efecto antinociceptivo fue similar en la pata ipsilateral y contralateral.

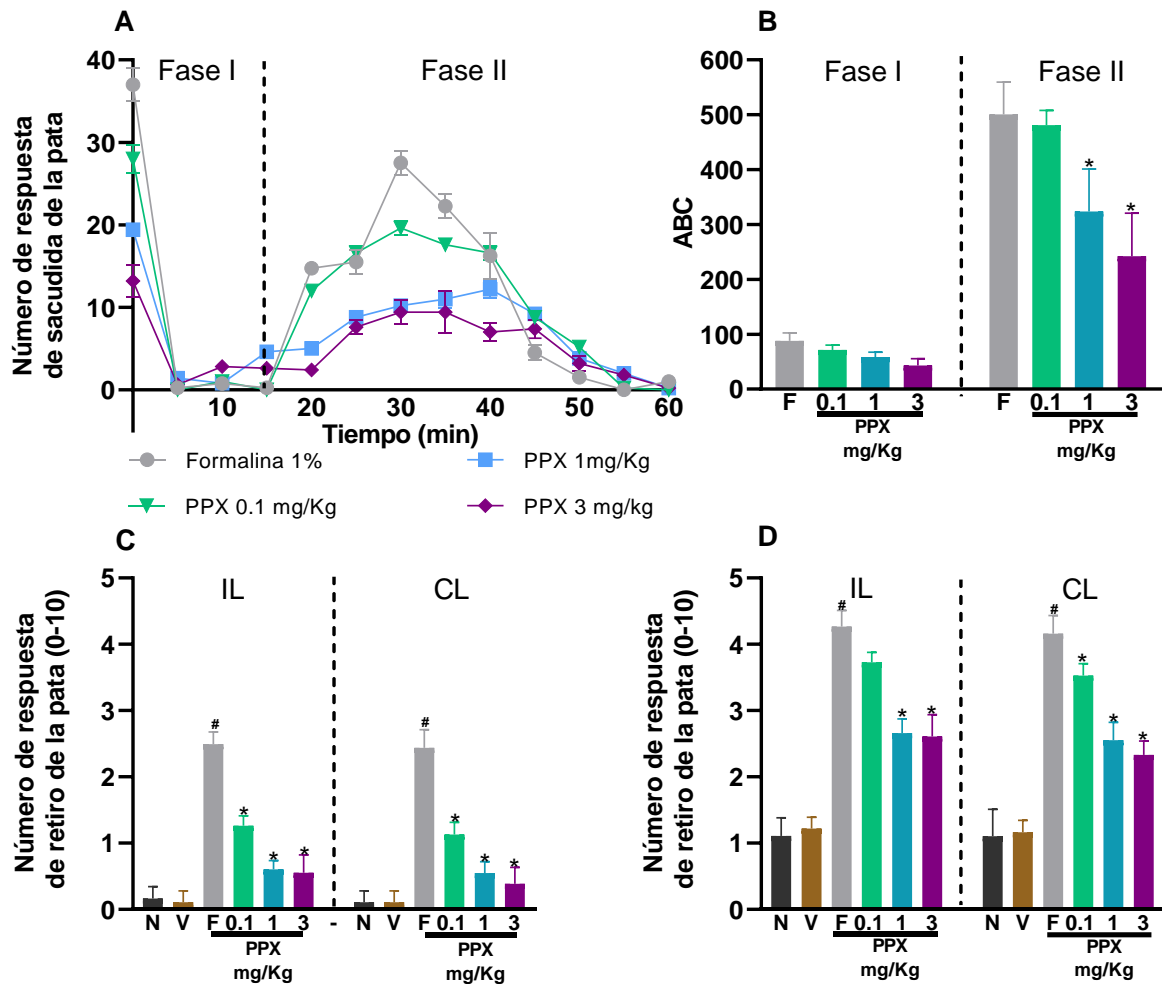


Figura 10. Curso temporal (A) y área bajo de curva (B) pre-tratamiento intraperitoneal con pramipexol sobre las respuestas nociceptivas inducidas por formalina al 1% en ratas administradas con formalina al 1%. Respuesta de retiro de la pata (C y D), alodinia (C) e hiperalgesia (D) fueron determinadas 6 días después de la administración de formalina. Los datos se presentan como la media \pm E.E de 6 animales por grupo. Naive $\#P < 0.05$ vs grupos de formalina. Formalina $*P < 0.05$ vs grupos de PPX, determinado por una ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey. IL: Ipsilateral, CL: Contralateral, N: Naive, F: Formalina, PPX: Pramipexol.

10.2. Desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo inducida por formalina

El día 6 después a la administración de formalina 1%, la aplicación de un filamento de von Frey de 1 g (estímulo inocuo) en animales sin tratar (Naive) no produjo respuesta de retiro de la pata (11A). Por otra parte, cuando a estos animales se les aplico el filamento de von Frey de 26 g (estímulo nocivo) respondieron en aproximadamente dos ocasiones (Figura 11C). La inyección de formalina al 1%, en el dorso de la pata trasera derecha produjo alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria tanto en la pata IL como en la pata CL (Figura 11A y 11C). Esto se observó como un aumento en el número de respuestas de retiro de la pata tras la aplicación de los filamentos de von Frey de 1 y 26 g, respectivamente, manteniéndose a lo largo del curso temporal de 4 h.

10.3. Efecto del post-tratamiento con PPX sobre la alodinia y la hiperalgesia secundaria de largo plazo inducidas por formalina

El post-tratamiento sistémico, 6 días después a la administración de formalina al 1%, con PPX (1, 2 y 3 mg/Kg) revirtió la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria en el curso temporal evaluado durante 4 h (Figura 11A y 11C). El mayor efecto antialodínico y antihiperalgésico se presentó a las 4 h con la administración de PPX 3 mg/Kg i.p. tanto en la pata ipsilateral como la contralateral. Los efectos antinociceptivos se observan de manera más clara en el área bajo la curva (ABC) (Figura 11B y 11D). El PPX revierte de manera significativa ($P < 0.05$) la alodinia mecánica secundaria en las dosis de 1, 2 y 3 mg/Kg i.p., presentando mejor efecto antialodínico la dosis de 3 mg/Kg i.p. (Figura 11B), dichas respuestas se observan de manera similar en ambas patas.

Por otra parte, el post-tratamiento con PPX (2 y 3 mg/Kg) revirtió la hiperalgesia mecánica secundaria de manera significativa ($P < 0.05$), presentando mejores

efectos la dosis de 3 mg/Kg, tanto en la pata ipsilateral como en la contralateral (Figura 11C).

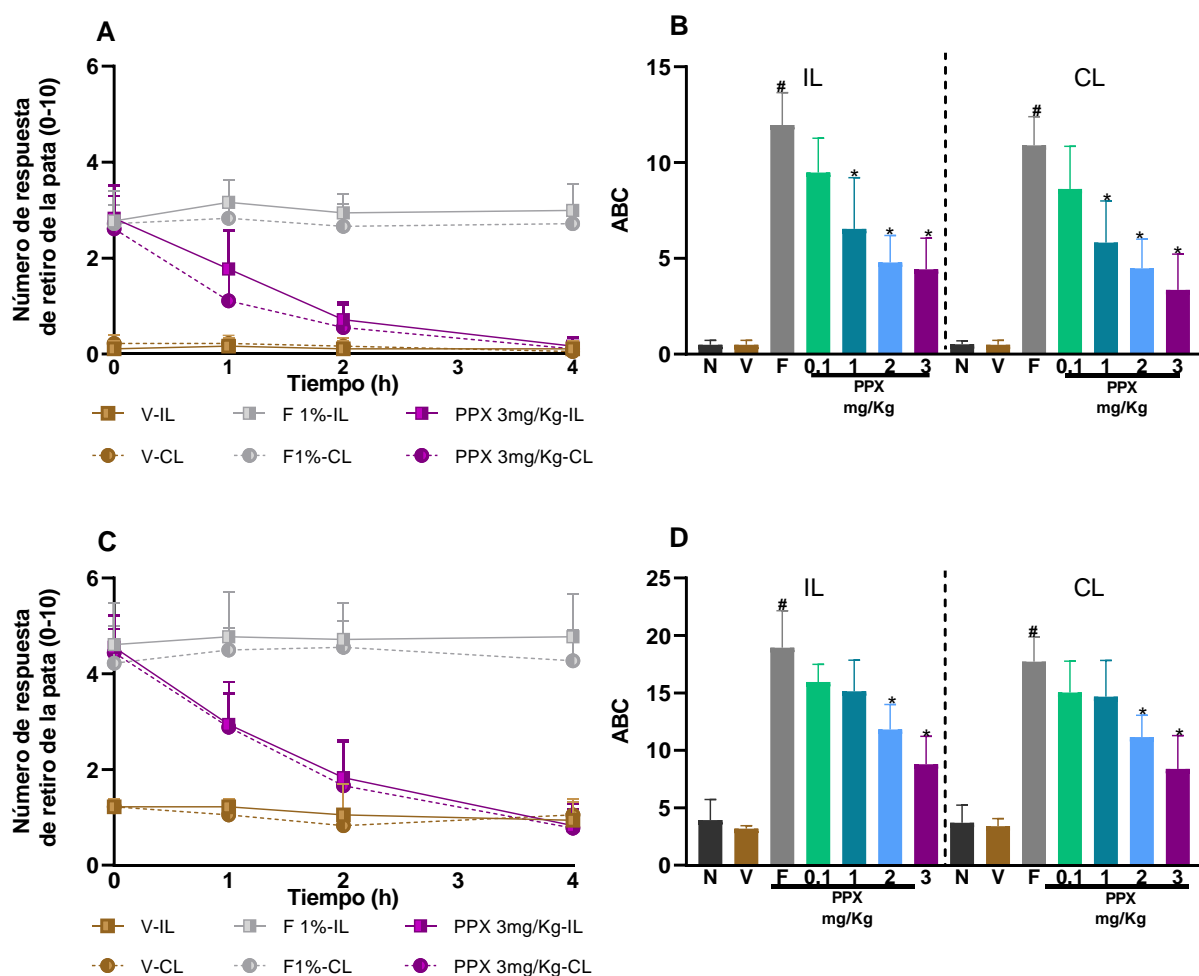


Figura 11. Curso temporal (A y C) y área bajo de curva (B y D) del post-tratamiento intra peritoneal con pramipexol sobre el efecto antialodínico en ratas administradas con formalina al 1%. Los datos se presentan como la media \pm E.E de 6 animales por grupo. La respuesta de retiro de la pata fue determinada 6 días después de la administración de formalina al 1%. Naive $^{\#}P < 0.05$ vs grupos de formalina. Formalina $^*P < 0.05$ vs grupos de PPX, determinado por una ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey. IL: Ipsilateral, CL: Contralateral, N: Naive, F: Formalina, PPX: Pramipexol.

10.4. Acoplamiento molecular NFκB-PPX

En el ensayo de acoplamiento molecular de NFκB-PPX (Tabla 1), en *Vina* se obtuvo un valor de -5.1 Kcal/mol, para el Docking ciego. El acoplamiento arrojó interacciones con los aminoácidos glicina (GLY) 44, y serina (SER) 47 teniendo uniones por medio de puentes de hidrógeno; GLY 117, GLY 92 y arginina (ARG) 41 por fuerzas de Van der Waals; valina (VAL) 91 por medio de enlaces pi-sigma y pi-alquil (Figura 12B). El acoplamiento de NFκB-PPX presentó unión preferente a la cadena C de NFκB, la cual corresponde al dominio de p65.

El acoplamiento molecular de NFκB-PPX en el programa *Gold 2020.3.2* obtuvo un ChemPLP de 43.4 y Goldscore de 35.74, en *AutoDock 4.2* se obtuvo un valor de -5.6 Kcal/mol (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular de PPX con NFκB por Vina, Gold y AutoDock.

	Energía de unión (Kcal/mol)	CHEMPLP	Goldscore	Energía de unión (Kcal/mol)
Diana terapéutica	Vina	Gold		AutoDock 4.2
NFKB-IKB	-5.1	43.4	35.74	-5.6

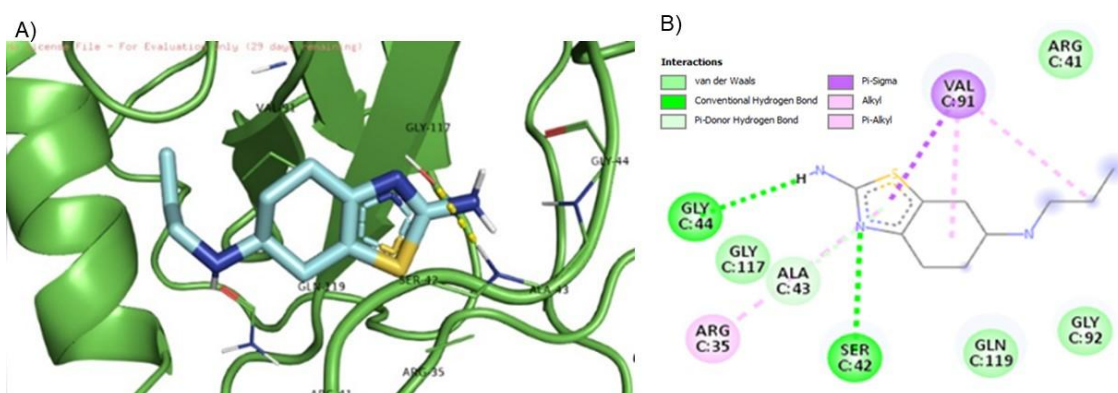


Figura 12. Acoplamiento molecular. A) El Acoplamiento NFκB-PPX muestra interacciones con los residuos de aminoácidos VAL 91, GLY 117, GLY 44, GLN 119, SER 42, ALA 43, ARG 41, ARG 35, resultados obtenidos en PymOL. B) Interacciones de residuos de aminoácidos entre NFκB-PPX

obtenidos en Discovery Studio, se muestran interacciones de puente de hidrógeno, Van der Waals, pi-sigma, alquilo, pi-alquilo.

11.5.1. Detección de la proteína NFκB-p65 por Western blot

La proteína NFκB-p65 fue detectada en muestras de la médula espinal con post-tratamiento sistémico con PPX (1 y 3 mg/Kg), 6 días después a la administración de formalina al 1%. Se observa la expresión de NFκB (Figura 16 A) y Actina (Figura 16 B) realizada por WB. Se observó que la administración de formalina al 1%, pero no en ratas naive, incrementa la expresión de NFκB-p65 (Figura 13 C). En contraste, el PPX inhibió la expresión de la subunidad p65 en la zona lumbar L4-L6 de ratas administradas con formalina (Figura 13 C).

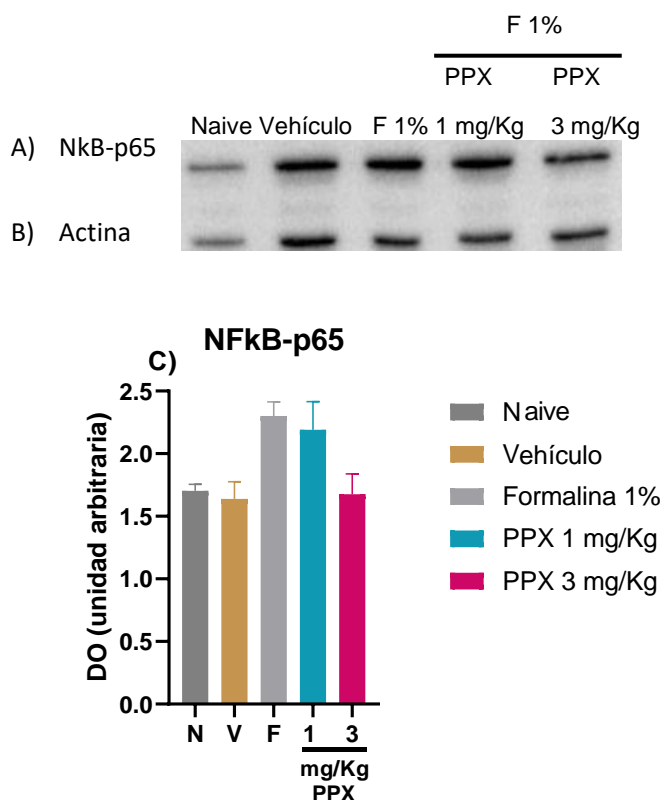


Figura 13. Efecto de PPX sobre NFκB-p65. Detección de NFκB-p65 en los grupos Naive, vehículo, formalina al 1% y con tratamiento con pramipexol (PPX) 1 y 3 mg/Kg (A). Se muestra actina como control de carga (B). Densidad óptica (DO) obtenida por imageJ (National Institutes of Health) (C).

11. DISCUSIÓN

12.1. La administración de formalina al 1% induce alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria

La inyección de formalina al 1% produjo conductas nociceptivas agudas (1 h), así como alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo (6 días) en ambas extremidades traseras. Estudios previos demuestran que la inyección de formalina al 10, 5, 1 y 0.5% produce conductas nociceptivas tanto agudas (Godínez-Chaparro *et al.*, 2011) como de largo plazo (Cadet *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 2001; Godínez-Chaparro *et al.*, 2011; Vierck *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2001). En nuestro trabajo, la alodinia y la hiperalgesia mecánicas secundaria se observaron a partir del día 1 y hasta el día 6, obteniendo valores similares en intensidad y duración a los reportados en la literatura (Ambriz-Tututi *et al.*, 2009; Godínez-Chaparro *et al.*, 2011; Vierck *et al.*, 2008). Por lo tanto, nuestro estudio confirma que la inyección de formalina al 1% desarrolla alodinia e hiperalgesia mecánicas secundarias de largo plazo tanto en la pata ipsilateral como contralateral.

La administración de formalina facilita el desarrollo de alodinia e hiperalgesia secundaria bilateral. Este resultado sugiere que la aplicación de un estímulo nociceptivo en la periferia promueve el desarrollo de conductas nociceptivas contralaterales. Estudios previos, sustentan la evidencia, que la inyección de sustancias químicas como el CFA (Coadyuvante de Freud), la carragenina, la sustancia P, el CGRP y la formalina promueven el desarrollo de nocicepción en sitios contralaterales (Godínez-Chaparro *et al.*, 2011; Shenker *et al.*, 2003). Asimismo, estudios demuestran que la lesión de los nervios periféricos y/o la lesión en el SNC promueven el desarrollo de respuestas nociceptivas contralaterales (Romero-Sánchez *et al.*, 2020; Wall & Devor, 1983). Además, las concentraciones administradas de formalina juegan un papel importante en el desarrollo de respuestas nociceptivas bilaterales. Ejemplo de ello, es la administración s.c. de dosis altas de CGRP (300 pmol), pero no las dosis bajas (75 y 150 pmol), generan edema en la pata contralateral de la rata (Lundeberg, 1993). Así también se ha

demostrado que la formalina al 1% o más, produce respuestas nociceptivas tanto en la pata ipsilateral como contralateral (Ambriz-Tututi *et al.*, 2009; Godínez-Chaparro *et al.*, 2011; Vierck *et al.*, 2008). Estos datos nos indican que la intensidad del estímulo generado juega un papel importante en el desarrollo de las respuestas nociceptivas y bilaterales.

12.2. Efecto del PPX en la nocicepción aguda, y en el desarrollo de la alodinia e hiperalgesia de largo plazo

El pre-tratamiento (-30 min) con PPX, pero no el vehículo, disminuyó el número de respuestas de sacudidas de la pata en la fase II, pero no en la fase I de la prueba de formalina. Además, el pre-tratamiento con PPX redujo las respuestas de retiro de la pata con los filamentos de 1 g y 26 g tanto en la pata IL como en la CL. Estos datos sugieren que el PPX es capaz de prevenir el desarrollo de conductas nociceptivas agudas, así como el desarrollo de alodinia e hiperalgesia secundarias de largo plazo inducidos por formalina. El pre-tratamiento agudo con PPX no ha sido utilizado previamente en estudios de dolor inflamatorio. No obstante, Sadeghi y colaboradores (2017) reportaron que el pre-tratamiento intraperitoneal agudo con PPX (0.5 y 1 mg/Kg) disminuyó la inflamación inducida por TPA, carragenina y formalina (Sadeghi *et al.*, 2017). Además, el pre-tratamiento intraperitoneal crónico (14 días) con PPX (1 y 5 mg/Kg) redujo la hiperalgesia mecánica y térmica inducida por un modelo de fibromialgia (Pereida *et al.*, 2021). En conjunto, estos resultados sugieren que el pre-tratamiento sistémico agudo con PPX previene el desarrollo de conductas nociceptivas.

12.3. Efecto del post-tratamiento sistémico con PPX sobre la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria de largo plazo

El post-tratamiento con PPX (1, 2 y 3 mg/Kg), 6 días después de la administración de formalina, redujo las respuestas de sacudida de la extremidad trasera generadas

con los filamentos de von Frey de 1 g y 26 g en la pata IL y CL. Nuestros datos sugieren que el PPX revierte la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundarias de largo plazo inducidas por formalina. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Edwards y colaboradores (2022) que reportaron que el post-tratamiento subcutáneo agudo y sub-agudo (4 días) con PPX (1 mg/Kg) disminuyó la hiperalgesia mecánica inducida por CFA, en un modelo de dolor inflamatorio (Edwards *et al.*, 2022). Asimismo, el post-tratamiento intraperitoneal con PPX (1 mg/Kg) redujo la hipersensibilidad a un estímulo térmico nocivo en ratas con la enfermedad de Parkinson (Cao et al., 2016). En esta misma línea, Romero-Sánchez y colaboradores (2020), demostraron que el post-tratamiento subcutáneo agudo y sub-agudo (10 días) con PPX (0.3 y 3 mg/Kg) mitigó la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria, en un modelo de la enfermedad de Parkinson (Romero-Sánchez *et al.*, 2020). Por otro lado, el tratamiento oral con PPX (4.5 mg, 14 semanas) disminuyó significativamente el dolor en pacientes con fibromialgia (Holman & Myers, 2005). En conjunto, estos resultados sugieren que el post-tratamiento sistémico con PPX es capaz de revertir la alodinia y la hiperalgesia inducidas en diferentes tipos de dolor (inflamatorio y neuropático) en modelos animales y en pacientes.

12.4. Acoplamiento molecular de NFκB-PPX

El acoplamiento molecular de NFκB-PPX presentó una energía de unión de 5.1 Kcal/mol en *Vina* (evalúa la energía de unión entre fármaco y molécula diana), con una unión preferente a la cadena C, correspondiendo a la subunidad p65 de NFκB. En el acoplamiento dirigido se obtuvo con *Gold* un CHEMPLP (evalúa la unión entre el fármaco con molécula diana) de 43.4, mientras que con *GoldScore* (evalúa que tan optima es la pose en la que se une el fármaco) se obtuvo un 35.74, y en *AutoDock 4.2* (evalúa la energía de unión entre fármaco y molécula diana), se obtuvo un valor de -5.6 Kcal/mol. Estos datos sugieren que PPX puede interaccionar con NFκB, específicamente con la subunidad p65. Además, varias interacciones

fueron observadas (VAL 91, GLY 117, GLY 44, GLN 119, SER 42, ALA 43, ARG 41, ARG 35). Cabe señalar que no se tiene un fármaco co-cristalizado previamente a NFκB, por lo cual no se tiene un valor de referencia, sin embargo, estos resultados sugieren las posibles interacciones entre NFκB y PPX, y a partir de esto podría inhibir la consiguiente cascada de señalización de NFκB. Para respaldar lo anterior, analizamos la expresión de NFκB-p65 en la médula espinal de ratas con alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria inducidas por formalina, tratadas con PPX.

12.5. Efecto de PPX sobre la expresión de NFκB-p65

El post-tratamiento sistémico, 6 días después a la administración de formalina al 1%, con PPX disminuyó la expresión de NFκB-p65. Estos datos sugieren que PPX, un agonista de los receptores D2/D3, revierte la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria inducida por formalina afectando la expresión de NFκB-p65. Estudios han demostrado que NFκB, un factor importante en la señalización de la cascada inflamatoria juega un papel fundamental en el desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica (K. Lee *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2018; Sakaue *et al.*, 2001). Además, la administración de oligodesoxinucleotido (ODN), un señuelo de NFκB, revirtió la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica inducida por la administración de CFA (K. Lee *et al.*, 2004) y, disminuyó la expresión de NFκB, por consiguiente redujo el mRNA de TNF-α, IL-1β, IL6, IFN-γ y iNOS (Sakaue *et al.*, 2001). Es ampliamente conocido que, TNF-α, IL-1β, IL6 e iNOS son mediadores proinflamatorios, que se producen vía NFκB, y estas citocinas han sido implicadas en el desarrollo y mantenimiento del dolor (Koch *et al.*, 2007; Zhu, 2009). Además, los procesos inflamatorios y neuroinflamatorios desencadenados por alguna patología, daño o lesión en SNC y/o SNP, producen una serie de respuestas que conducen al daño neuronal al favorecer la acción y el aumento de mediadores inflamatorios, como el TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 e interferón-γ (IFN-γ) (H. Lee *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018; Sadeghi *et al.*, 2017; Villoslada & Genain, 2004). Finalmente, cabe señalar que, Rocha y colaboradores (2018) reportaron que la adición de PPX (200 ng/mL)

en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la enfermedad de Parkinson, redujo significativamente la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL6, IL-12 e IL-8). En conjunto, estos resultados nos sugieren que los efectos antialodínicos y antihiperalgésicos inducidos por PPX podrían ser mediados, al menos en parte, a través de su interacción con NF κ B-p65.

12. CONCLUSIONES

- En el presente se estudio demostró, por primera vez, que el pre-tratamiento intraperitoneal con PPX reduce las conductas nociceptivas inducidas por formalina en la fase II. Además, el pre y post-tratamiento intraperitoneal de PPX es capaz de disminuir la alodinia y la hiperalgnesia secundaria inducidas por formalina. Estos datos sugieren que el PPX, al poseer efectos antinociceptivos, antialodínicos y antihiperalgésicos, podría ser una herramienta farmacológica útil para el tratamiento del dolor agudo y de largo plazo.
- Además, se estableció la posible interacción de PPX con NF κ B-p65 como posible mecanismo de acción responsable de inducir el efecto antialodínico y antihiperalgésico. Esta evidencia se deriva de: 1) la capacidad de PPX de interaccionar con la subunidad p65 de NF κ B; 2) la habilidad de PPX de inhibir la expresión de NF κ B en la médula espinal de animales administrados con formalina. Esta evidencia sugiere que el PPX podría inhibir a NF κ B y con ello prevenir el desarrollo y el mantenimiento de la alodinia y la hiperalgnesia secundaria de largo plazo inducidas por formalina.

11. BIBLIOGRAFÍA

Ambriz-Tututi, M., Rocha-González, H. I., Castañeda-Corral, G., Araiza-Saldaña, C. I., Caram-Salas, N. L., Cruz, S. L., & Granados-Soto, V. (2009). Role of

- opioid receptors in the reduction of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 619(1–3), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.001>
- Arriaga, E. E., Bautista, O. P., Venegas, A. R., & Sansores, R. H. (2007). Efecto del daño de vías dopaminérgicas mesencefálicas en la conducta adictiva al tabaco. Revisión generadora de una hipótesis. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(1), 56–63.
- Barros de Oliveira, C. M., Sakata, R. K., Manchado, A., Gerola, L. R., & Salomao, R. (2011). Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol ARTÍCULO DE REVISIÓN Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 137–142.
- Beiske, A. G., Loge, J. H., Rønningen, A., & Svensson, E. (2009). Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *Pain*, 141(1–2), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.004>
- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., & Zardecki, C. (2002). The protein data bank. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(6 I), 899–907. <https://doi.org/10.1107/S0907444902003451>
- Cadet, R., Aigouy, L., & Woda, A. (1993). Sustained hyperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. *Neuroscience Letters*, 156(1–2), 43–46. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90435-N](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90435-N)
- Cao, L., Peng, X., Huang, Y., Wang, B., Zhou, F., Cheng, R., Chen, L., Luo, W., & Liu, T. (2016). *Restoring Spinal Noradrenergic Inhibitory Tone Attenuates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Parkinson ' s Disease*. 2016.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature*

- Reviews Disease Primers*, 3, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>
- Costigan, M., & Woolf, C. J. (2000). Pain: Molecular mechanisms. *Journal of Pain*, 1(3 SUPPL.), 35–44. <https://doi.org/10.1054/jpai.2000.9818>
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J. A., & Córdova-Domínguez, J. A. (2010). Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 33(4), 207–213.
- Dieleman, J. P., Kerklaan, J., Huygen, F. J. P. M., Bouma, P. A. D., & Sturkenboom, M. C. J. M. (2008). Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain*, 137(3), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.03.002>
- Dubuisson, D., & Dennis, S. G. (1977). The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(C), 161–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)
- 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(3), 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.033>
- Edwards, S., Callicotatte, C. N., Barattini, A. E., Cucinello-ragland, J. A., Melain, A., Edwards, K. N., Gilpin, N. W., Avegno, E. M., & Pahng, A. R. (2022). Neuropharmacology Pramipexole treatment attenuates mechanical hypersensitivity in male rats experiencing chronic inflammatory pain. *Neuropharmacology*, 208(January), 108976. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.108976>
- Ferrarini, E. G., Scussel, R., & Zaccaron, R. P. (2022). *Pramipexole, a dopamine D3/52 receptor-preferring agonist , attenuates reserpine-induced fibromyalgia-like model in mice*. 17(2), 450–458.

- Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., Mcnicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T. S., Kamerman, P. R., Lund, K., Moore, A., Raja, S. N., Rice, A. S. C., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B. H., & Wallace, M. (2015). *Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults : a systematic review and meta-analysis*. 14(February), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0)
- Fu, K. Y., Light, A. R., & Maixner, W. (2001). Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *Journal of Pain*, 2(1), 2–11. <https://doi.org/10.1054/jpai.2001.9804>
- Gao, Y. J., & Ji, R. R. (2010). Targeting Astrocyte Signaling for Chronic Pain. *Neurotherapeutics*, 7(4), 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.016>
- García-Andreu, J. (2017). Manejo básico del dolor agudo y crónico. *Anestesia En México*, 29(1), 77–85.
- García-Andreu, J., & García-Andreu, J. (2017). Anestesia en México. In *Anestesia en México* (Vol. 29). Federación Mexicana de Colegios de Anestesiología A.C. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-87712017000400077&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- García Fajardo, L. E., Martínez Linares, M. P., & aGonzález Olaya, H. L. (2001). Inflamación y dolor: Cambios en el sistema nervioso periférico y central. *MedUNAB*, 59–72.
- 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(3), 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.020>
- Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11(1), 770. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-770>
- Gómez-Barrios, J. V., & Tortorici, V. (2009). Mecanismos del dolor neuropático:

Del laboratorio a la clínica. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 28(1), 2–11.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642009000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Holman, A. J., & Myers, R. R. (2005). *A Randomized , Double-Blind , Placebo-Controlled Trial of Pramipexole , a Dopamine Agonist , in Patients With Fibromyalgia Receiving Concomitant Medications*. 52(8), 2495–2505.
<https://doi.org/10.1002/art.21191>

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(10), 2204–2205. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>

Ji, R. R., & Woolf, C. J. (2001). Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: Implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiology of Disease*, 8(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0360>

Jones, G., Willett, P., Glen, R., & Leach, A. (1997). Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *JMB*, 267(4), 727–748.
<https://doi.org/10.4000/formationemploi.3853>

Julius, D., & Basbaum, A. (2020). Molecular mechanisms of Nociception. *Caring for People in Pain*, 413(September), 33–47.
<https://doi.org/10.4324/9780203022634-8>

Koch, A., Zacharowski, K., Boehm, O., Stevens, M., Lipfert, P., Giesen, H. Von, Wolf, A., & Freynhagen, R. (2007). *Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients*. 56, 32–37.
<https://doi.org/10.1007/s00011-007-6088-4>

Krieger, E., Joo, K., Lee, J., & Lee, J. (2008). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *National Institute of Health*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>. Improving

- Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *Journal of Pain*, 10(9), 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>
- Lee, H., James, W. S., & Cowley, S. A. (2017). *LRRK2 in peripheral and central nervous system innate immunity: its link to Parkinson ' s disease*. 0, 131–139. <https://doi.org/10.1042/BST20160262>
- Lee, K., Kang, B., Lee, H., Son, S., Hwang, S., Kim, D., Park, J., & Cho, H. (2004). *SHORT COMMUNICATION Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity*. 19(April), 3375–3381. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03441.x>
- Lundeberg, T. (1993). Substance P- , neurokinin A- , calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity (-LI) in ... *Neuroscience*.
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Persson, A., Ellervik, U., & Mani, K. (2018). Fine-tuning the structure of glycosaminoglycans in living cells using xylosides. *Glycobiology*, 28(7), 499–511. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy049>
- Puebla, F. (2005). Dolor Tipos de dolor y escala terapéutica de la O . M . S . Dolor iatrogénico. *Oncologia*, 28(3), 139–143.
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Rocha, N. P., Assis, F., Scalzo, P. L., Vieira, É. L. M., Barbosa, I. G., de Souza, M.

- S., Christo, P. P., Reis, H. J., & Teixeira, A. L. (2018). Reduced Activated T Lymphocytes (CD4+CD25+) and Plasma Levels of Cytokines in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1488–1497.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0404-y>
- Rodríguez, E. J., & Granados, V. (2020). La percepción del dolor. *Milenaria, Ciencia y Arte*, 16, 16–18.
- Romera, E., Perena, M. J., & Rodrigo, M. F. P. M. D. (2000). Neurofisiología del dolor. *Revista Sociedad Española Del Dolor*, 11–17.
- Romero-Sánchez, H. A., Mendieta, L., Austrich-Olivares, A. M., Garza-Mouriño, G., Benitez-Diaz Mirón, M., Coen, A., & Godínez-Chaparro, B. (2020). Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway with 6-OHDA induced allodynia and hyperalgesia reverted by pramipexol in rats. *European Journal of Pharmacology*, 869(June 2019), 172814.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172814>
- Sadeghi, H., Parishani, M., Akbartabar Touri, M., Ghavamzadeh, M., Jafari Barmak, M., Zarezade, V., Delaviz, H., & Sadeghi, H. (2017). Pramipexole reduces inflammation in the experimental animal models of inflammation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39(2), 80–86.
<https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1284230>
- Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Hashimoto, N., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, R., Kiyono, H., Noguchi, K., & Mashimo, T. (2001). NF-κB decoy suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *NeuroReport*, 12(10), 2079–2084. <https://doi.org/10.1097/00001756-200107200-00008>
- Shenker, N., Haigh, R., Roberts, E., Mapp, P., Harris, N., & Blake, D. (2003). A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology*, 42(11), 1279–1286.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg397>
- Tena Blanco, B. (2014). Evaluación y prevención de la cronificación del dolor

- postoperatorio tras toracotomía. *Universitat de Barcelona*, 1 recurs electrònic (182). <http://hdl.handle.net/2445/59243>
- Velasco, M. (2014). *Dolor neuropático*. 25(4), 625–634.
- Vierck, C. J., Yeziński, R. P., & Light, A. R. (2008). Long-lasting hyperalgesia and sympathetic dysregulation after formalin injection into the rat hind paw. *Neuroscience*, 153(2), 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.027>
- Villoslada, P., & Genain, C. P. (2004). *Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation*. 146. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46025-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46025-1)
- Walker, J. M. (1996). Proteins Protocols Handbook. *The Protein Protocols Handbook, Second*.
- 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(4), 321–339. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90164-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90164-1)
- Wheeler-Aceto, H., & Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*, 104(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/BF02244551>
- Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742–3744. <https://doi.org/10.1172/JCI45178>
- Woolf, C. J. (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(SUPPL.3), S2–S15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030>
- Wu, S. X., Zhu, M., Wang, W., Wang, Y. Y., Li, Y. Q., & 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. *Neuroscience Letters*, 307(3), 183–186. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01946-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01946-2)

- Yoshioka, Y., Sugino, Y., Shibagaki, F., Yamamuro, A., Ishimaru, Y., & Maeda, S. (2020). Dopamine attenuates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines by inhibiting the nuclear translocation of NF- κ B p65 through the formation of dopamine quinone in microglia. *European Journal of Pharmacology*, 866(September 2019), 172826. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172826>
- Zegarra, J. (2005). Bases fisiopatológicas del dolor. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 28(SUPPL. 1), 105–108.
- Zegarra, J. (2007). Acta médica peruana. In *Bases fisiopatológicas del dolor* (Vol. 24, Issue 2). Colegio Médico del Perú. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172007000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Zhu, M. (2009). Cytokines, inflammation and pain. *Institute National of Health*, 45(2). <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.Cytokines