



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD COAPA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**Caracterización del efecto anti-nociceptivo de un nuevo antagonista de los  
receptores sigma-1 y análisis de asociaciones de antagonistas sigma-1  
con quercetina en un modelo de dolor neuropático**

Tesis que presenta

**M. en C. Josué Vidal Espinosa Juárez**

**Para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias**

En la especialidad de  
**Neurofarmacología y terapéutica experimental**

Director de tesis:

**Dr. Francisco Javier López Muñoz**

**Ciudad de México**

**Abril, 2018**

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio No. 7 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados - Sede Coapa bajo la dirección de Dr. Francisco Javier López Muñoz.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de doctorado No. 261836 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Una vez concluido este trabajo que me ha brindado grandes satisfacciones, quiero expresar mis agradecimientos al Dr. Francisco Javier López Muñoz, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por los consejos y orientación oportuna que me ayudaron a llevar a cabo este proyecto, por su apoyo y amistad.

A los sinodales, la Dra. Myrna Déciga Campos, Dra. Leticia Gómez Víquez, Dr. Gabriel Navarrete Vázquez y Dr. Alonso Fernández Guasti por aceptar ser parte del comité mi tesis y por sus valiosas aportaciones durante las presentaciones que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

A Luis Alberto Melo-Hernández por contribuir en la síntesis de uno de los compuestos evaluados en este trabajo y por su valiosa colaboración.

Al personal que labora en el Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, tanto del bioterio, vigilancia y administración que con su trabajo ayudaron a hacer posible la realización de este estudio.

Al Sr. José Sabino Ledesma y Sr. Luis Oliva por estar siempre atentos a los requerimientos de cada uno de los experimentos y por considerarme un amigo.

## DEDICATORIAS

---

Dedico esta tesis con mucho cariño y admiración a mis padres, Horacio Espinosa Hernández y Candelaria Juárez García, quienes con su apoyo y ejemplo a seguir me han demostrado que con humildad y sabiduría todo es posible, este logro personal es también de ustedes. Admiro su fortaleza y muchas gracias por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, Wendy y Horacio, quienes son parte importante en mi vida para llegar a esta meta.

De manera especial dedico esta tesis a mi esposa, Natalí que con sus consejos y apoyo incondicional me impulsaron a seguir adelante.

Finalmente a todas aquellas personas que me motivaron a tomar este camino, por sus motivaciones y que de alguna forma han contribuido a mi desarrollo profesional y personal.

# ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIAS .....	ii
ÍNDICE .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Generalidades del dolor .....	1
1.2 Fisiología del dolor .....	2
1.1.1 Nocicepción .....	2
1.3 Tipos de dolor.....	6
1.4 Dolor neuropático.....	9
1.1.2 Fisiología.....	9
1.1.3 Procesos centrales en la señalización del dolor neuropático.....	12
1.1.3 Mediadores Inflamatorios en el dolor neuropático.....	14
1.1.4 Especies reactivas de oxígeno y dolor neuropático .....	15
1.1.5 Papel del receptor $\sigma_1$ en el dolor neuropático .....	17
1.5 Tratamiento farmacológico para el dolor neuropático .....	21
1.1.1 Antidepresivos.....	21
1.1.2 Anticonvulsivos.....	23
1.1.3 Opioides.....	24
1.1.1 Lidocaína tópica.....	24
1.1.2 Antagonistas NMDA .....	25
1.1.3 Antagonistas del receptor $\sigma_1$ .....	25
1.1.4 El uso de quercetina como alternativa para el tratamiento del dolor neuropático .....	27
1.1.5 Combinaciones de fármacos en la terapéutica del dolor neuropático .....	28
2 Justificación .....	30
3 Hipótesis .....	31
4 Objetivos.....	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos Específicos.....	32

5	Materiales y Métodos .....	34
	5.1 Animales .....	34
	5.2 Fármacos.....	34
	5.3 Administración intratecal .....	35
	5.4 Modelo experimental .....	35
	5.5 Evaluación conductual .....	36
	5.6 Diseño experimental.....	37
	5.6.1 Análisis de las asociaciones farmacológicas.....	40
	5.7 Evaluación de la coordinación motora .....	40
	5.8 Análisis estadístico.....	41
6	Resultados .....	42
	6.1 Desarrollo de alodinia e hiperalgesia después de la constricción crónica del nervio ciático 42	
	6.2 Efecto de los vehículos utilizados .....	43
	6.3 Análisis del efecto anti-nociceptivo de NMIN.....	44
	6.3.1 Análisis del mecanismo de acción de NMIN .....	45
	6.3.2 Efecto anti-nociceptivo de NMIN por administración intratecal .....	46
	6.4 Efecto en la nocicepción de PRE-084 y NMIN en ratas intactas .....	47
	6.5 Análisis del efecto anti-nociceptivo de haloperidol.....	49
	6.5.1 Análisis del mecanismo anti-nociceptivo de haloperidol.....	50
	6.5.2 Efecto anti-nociceptivo de haloperidol por administración intratecal .....	52
	6.5.3 Efecto de haloperidol en la nocicepción generada por el agonista $\sigma_1$ en ratas intactas .....	52
	6.6 Comparación de los efectos anti-hiperalgésicos de NMIN, haloperidol y quercetina con un fármaco de referencia para el tratamiento del dolor neuropático. ....	53
	6.7 Efecto de la combinación de NMIN con Quercetina .....	54
	6.8 Asociación de BD-1063 con Quercetina .....	56
	6.9 Asociación de haloperidol y quercetina.....	61
	6.10 Efectos sobre la coordinación motora.....	67
7	Discusión .....	71
8	Conclusión .....	87
9	Perspectivas .....	88
10	Referencias.....	89
11	ANEXOS .....	104

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Vía de transmisión del dolor. ....	3
<b>Figura 2.</b> Fibras aferentes primarias relacionadas con la transducción de la señal y transmisión de la información hacia la médula espinal .....	4
<b>Figura 3.</b> Clasificación del dolor .....	8
<b>Figura 4.</b> Mecanismos involucrados en el dolor neuropático. ....	11
<b>Figura 5.</b> Conexiones normales y anormales de las fibras A- $\beta$ y C .....	14
<b>Figura 6.</b> Mecanismos del óxido nítrico que favorecen un estado hiperexcitabilidad neuronal. ....	16
<b>Figura 7.</b> Ligandos del receptor $\sigma_1$ .....	18
<b>Figura 8.</b> Proteínas que son moduladas por el receptor $\sigma_1$ .....	20
<b>Figura 9.</b> Sitio de acción de los fármacos empleados para el tratamiento de dolor neuropático. ....	22
<b>Figura 10.</b> Modelo farmacofórico de los ligandos $\sigma_1$ .....	26
<b>Figura 11.</b> Estructura molecular de NMIN y S1RA .....	27
<b>Figura 12.</b> Diagrama de los grupos experimentales empleados para obtener las curvas dosis-respuesta y determinar los mecanismos de acción de NMIN y HAL. ....	39
<b>Figura 13.</b> Dosis empleadas para la combinación de HAL + QUER y de BD-1063 + QUER. ....	40
<b>Figura 14.</b> Respuesta al filamento de Von-Fey de 15 g (Panel A) y a la prueba de la acetona (panel B) en ratas con la constricción crónica del nervio ciático (CCI) .....	43
<b>Figura 15.</b> Efectos de los vehículos en ratas SHAM y CCI.....	44
<b>Figura 16.</b> Curso temporal del efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico de NMIN.....	45
<b>Figura 17.</b> Área bajo la curva para los efectos anti-hiperalgésicos y antialodínicos producidos por NMIN sólo y en presencia de (+)-pentazocina .....	46
<b>Figura 18.</b> Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico producido por NMIN y NMIN + PRE-084 (100 $\mu$ g) administrados por vía intratecal .....	47
<b>Figura 19.</b> Área bajo la curva para la hiperalgesia y alodinia producida por PRE-084 en ratas intactas (Naïve) y la hiperalgesia generada por la constricción crónica de nervio ciático. ....	48
<b>Figura 20.</b> Respuesta hiperalgésica y alodínica generada por PRE-084 y PRE-084 + NMIN .....	49
<b>Figura 21.</b> Curso temporal del efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico de haloperidol (HAL) en ratas con constricción crónica del nervio ciático.....	50
<b>Figura 22.</b> Área bajo la curva para los efectos anti-hiperalgésicos y antialodínicos producidos por HAL, PRE-084, HAL + PRE-084 y S-(-)-Sulpirida en ratas con constricción crónica (CCI). ....	51
<b>Figura 23.</b> Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico producido por HAL, PRE-084, HAL + PRE-084 y S-(-)-Sulpirida administrados por vía intratecal. ....	52
<b>Figura 24.</b> Respuesta hiperalgésica y alodínica generada por PRE-084 y PRE-084 + HAL administrados por vía intratecal.....	53

<b>Figura 25.</b> Curva dosis-respuesta para el efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico de BD-1063, HAL, NMIN, Quercetina y gabapentina en ratas con constricción crónica del nervio ciático. ....	54
<b>Figura 26.</b> Curso temporal del efecto anti-hiperalgésico de NMIN, QUER y la combinación de NMIN + QUER .....	55
<b>Figura 27.</b> Curso temporal y área bajo la curva del efecto anti-alodínico de NMIN, QUER y NMIN + QUER .....	56
<b>Figura 28.</b> Efecto anti-hiperalgésico, resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones y superficie de interacción sinérgica de BD-1063 y QUER .....	58
<b>Figura 29.</b> Efecto anti-alodínico, resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones y superficie de interacción sinérgica de BD-1063 y QUER .....	59
<b>Figura 30.</b> Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico de BD-1063, QUER y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de BD-1063, QUER y el fármaco de referencia GBP. ....	60
<b>Figura 31.</b> Área bajo la curva del efecto anti-alodínico de BD-1063, QUER y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de BD-1063, QUER y el fármaco de referencia GBP .....	61
<b>Figura 32.</b> Efecto anti-hiperalgésico, resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones y superficie de interacción sinérgica de HAL y QUER. ....	63
<b>Figura 33.</b> Efecto anti-alodínico, resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones y superficie de interacción sinérgica de HAL y QUER .....	64
<b>Figura 34.</b> Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico de HAL, QUER y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de B, QUER y el fármaco de referencia GBP. ....	65
<b>Figura 35.</b> Área bajo la curva del efecto anti-alodínico de HAL, QUER y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de HAL, QUER y el fármaco de referencia GBP .....	66
<b>Figura 36.</b> Efecto en la coordinación motora del vehículo y las dosis más altas de QUER, BD-1063, HAL, NMIN y GBP. ....	67
<b>Figura 37.</b> Efecto en el número de caídas en ratas tratadas con las combinaciones de QUER + NMIN, QUER + HAL y QUER + BD-1063 .....	68
<b>Figura 38.</b> Frecuencia de respuesta (%) al estímulo táctil con los filamentos de von Frey después en ratas con constricción crónica del nervio ciático unilateral y Naïve .....	69
<b>Figura 39.</b> Curso temporal de la respuesta de retirada de la extremidad frente a un estímulo táctil con el filamento de von Frey de (100 g) en ratas Naïve tratadas con NMIN, BD-1063, GBP, HAL y QUER.....	70



## ABREVIATURAS

---

5-HT <sub>3A</sub>	Receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 3
ABC	Área bajo la curva
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPA	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5 metil-4-isocazolepropionico
ASICs	canales sensibles a ácido
ATC	Antidepresivo tricíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CaM	Calmodulina
CCI	Constricción crónica del nervio ciático
CCK	colecistocinina
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
DAG	Diacilglicerol
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GABA	ácido- $\gamma$ -aminobutírico
GBP	Gabapentina
GC	guanilato ciclasa
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GPRC	receptor acoplado a proteínas G
HAL	Haloperidol
HINT1	proteína de unión a nucleótido codificada por el gen HINT-1
i.t	Intratecal
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina-6
IP <sub>3</sub>	Inositol-trifosfato
MOR	receptor opioide tipo mu
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMIN	N-[2-(morfolin-4-il)etil]-2-(1-naftiloxi)acetamida
NOS	sintetasa del óxido nítrico
ON	óxido nítrico

ONOO <sup>-</sup>	peroxinitrito
ONOOH	ácido peroxinitroso
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol bisfosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
QUER	Quercetina
s.c.	Subcutánea
S1RA	Antagonista $\sigma_1$ (E-52862)
SIS	Superficie de interacción sinérgica
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SULP	(-)-sulpirida
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPV1	Canal de cationes de potencial transitorio de la subfamilia V miembro1
VDCC	canales de calcio dependientes de voltaje
$\sigma_1$	sigma-1

## RESUMEN

---

El dolor neuropático se produce como consecuencia de un daño al sistema somato-sensorial. Dentro de las características de este tipo de dolor está la presencia de hiperalgesia (dolor exacerbado ante un estímulo nocivo) y alodinia (dolor frente a un estímulo inocuo). Los tratamientos farmacológicos para este tipo de dolor se basan en el uso de antiepilépticos como pregabalina o gabapentina así como de antidepresivos; sin embargo, dado el papel del receptor  $\sigma_1$  en la generación y mantenimiento del dolor, se ha sugerido que sus antagonistas puedan resultar efectivos. Asimismo existen otras alternativas que han sido exploradas, proponiendo el uso de flavonoides como quercetina. Otra de las opciones son las asociaciones farmacológicas dado su relevancia en la terapéutica. Para este trabajo se evaluaron los efectos de fármacos ligandos del receptor  $\sigma_1$  como NMIN, haloperidol (HAL) y BD-1063, por otro lado se analizó el efecto de quercetina en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. La evaluación se realizó el día 10 posterior a la cirugía. Todos los fármacos fueron administrados por vía s.c. Para comprobar el efecto antagonista  $\sigma_1$ , fueron evaluados en presencia de agonistas  $\sigma_1$  por vía sistémica e intratecal. Para el análisis de la combinación de BD-1063+QUER y HAL+QUER se utilizó el análisis de “Superficie de interacción sinérgica”, para la combinación de NMIN+ QUER se examinó tomando como referencia la suma teórica. Todos los fármacos presentaron un efecto dosis-dependiente, además se comprobó que los efectos de NMIN y HAL se deben al antagonismo del receptor  $\sigma_1$ , puesto que sus efectos fueron inhibidos con agonistas, o viceversa. En ratas intactas NMIN y HAL bloquearon el efecto pro-nociceptivo de un agonista  $\sigma_1$ . Las combinaciones con los fármacos NMIN+QUER, HAL+QUER y BD-1063+QUER tuvieron resultados preferentemente de adición o supra-adición. Por otro lado NMIN y HAL alteraron la coordinación motora. Sin embargo, estos fármacos en combinación con QUER no generaron esta alteración en los animales. Los resultados obtenidos sugieren que los fármacos antagonistas  $\sigma_1$  solos o en combinación con el flavonoide quercetina pueden ser de utilidad en el tratamiento del dolor de tipo neuropático.

## ABSTRACT

---

Neuropathic pain occurs as a consequence of damage to the somato-sensory system. Characteristics of this type of pain are the presence of hyperalgesia (increases in pain to suprathreshold stimuli) and allodynia (pain due to a stimulus that does not normally elicit pain). The pharmacological treatments for this type of pain are mainly antidepressants or antiepileptics such as pregabalin or gabapentin; however, given the role of the  $\sigma_1$  receptor in the generation and maintenance of pain, it has been suggested that antagonists may be effective, besides, other options have been explored and the use of flavonoids like quercetin have been proposed. An additional alternative given its relevance in therapeutics are pharmacological associations. For this work, the effects of ligands of  $\sigma_1$  receptor such as NMIN, haloperidol (HAL) and BD-1063, as well as quercetin (QUER) were evaluated in the chronic constriction injury model. The evaluation was performed at 10th day after the surgery. Drugs were administered subcutaneously (s.c.). To check its antagonistic effect, HAL y NMIN were evaluated in the presence of  $\sigma_1$  agonists after systemic (s.c.) and local route (intrathecal). For the analysis of the combination of BD-1063 + QUER and HAL + QUER, the surface of synergistic interaction was used. For the combination of NMIN + QUER it was analyzed taking as reference the theoretical sum. All drugs produced a dose-dependent effect and it was also found that the effects of NMIN and HAL were due to the antagonism of the  $\sigma_1$  receptor since their effects were inhibited with agonists. Likewise, in intact rats NMIN and HAL blocked the pro-nociceptive effect of a  $\sigma_1$  agonist. The combinations with the NMIN + QUER, HAL + QUER and BD-1063 + QUER had mainly additive or supra-additive results. On the other hand, NMIN and HAL produced alterations in motor coordination; however doses in combination of these drugs did not show this alteration. These results suggest that  $\sigma_1$  antagonist drugs alone or in combination with the flavonoid, quercetin, may be useful in the treatment of neuropathic pain.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

En este trabajo se estudió el efecto de un nuevo compuesto con afinidad por los receptores sigma-1 ( $\sigma_1$ ), analizando su acción antagonista; de igual forma se examinaron las asociaciones farmacológicas de compuestos antagonistas del receptor  $\sigma_1$  con el flavonoide quercetina (QUER). Los efectos fueron evaluados en un modelo de dolor neuropático inducido por la constricción del nervio ciático. A continuación son revisados los antecedentes en la literatura sobre la percepción del dolor y las estrategias terapéuticas empleadas a nivel clínico y preclínico.

## 1.1 Generalidades del dolor

El dolor es la causa más frecuente de malestar y discapacidad, además, es la razón más común por la que las personas buscan atención médica. Es un síntoma importante en muchas condiciones médicas que interfiere significativamente con la calidad de vida de una persona. El dolor ha acompañado a la humanidad desde sus inicios, han surgido debates sobre su origen y naturaleza; de igual forma, la expresión y el significado del dolor han cambiado a través de la historia. El dolor ha sido visto como desequilibrio de las fuerzas vitales, como un castigo o la vía hacia la recompensa espiritual y más recientemente como un fenómeno biológico (Bial y Cope, 2011).

La asociación internacional para el estudio del dolor (IASP -International Association for the Study of Pain) lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño” (Merskey y Bogduk, 1994).

La presencia de dolor tiene la finalidad biológica de protección (Hunt y Mantyh, 2001; Scholz y Woolf, 2002), siendo muy importante para la

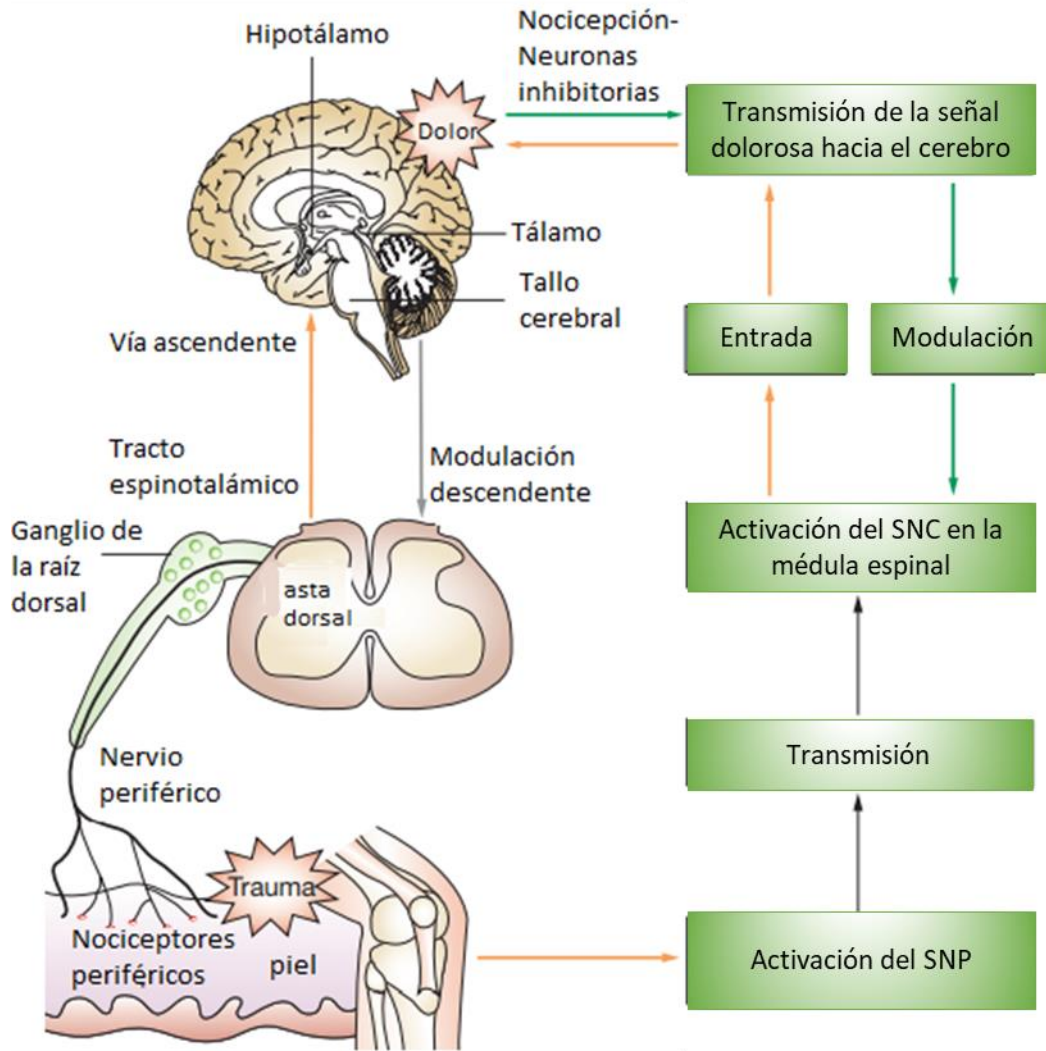
supervivencia y el mantenimiento de la integridad del organismo. Sin embargo, cuando el dolor es sostenido o crónico puede resultar en otras alteraciones psicológicas como la ansiedad y depresión (Woolf y Mannion, 1999; Sadosky y cols., 2013), estas alteraciones consecuentes conllevan a una marcada disminución de la calidad de vida; por lo tanto si el dolor se vuelve crónico deja de poseer una función protectora.

## **1.2 Fisiología del dolor**

### **1.1.1 Nocicepción**

El término nocicepción hace referencia al proceso mediante el cual la información sobre el daño en tejidos es transmitida al sistema nervioso central (SNC), a pesar de ello, puede haber dolor sin nocicepción (por ejemplo, dolor de miembro fantasma) y nocicepción sin dolor. En general se puede hacer una descripción clásica del dolor incluyendo cuatro procesos; Transducción, Transmisión, Percepción y Modulación (Figura 1) (Besson, 1999; Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002; Fu y cols., 2011).

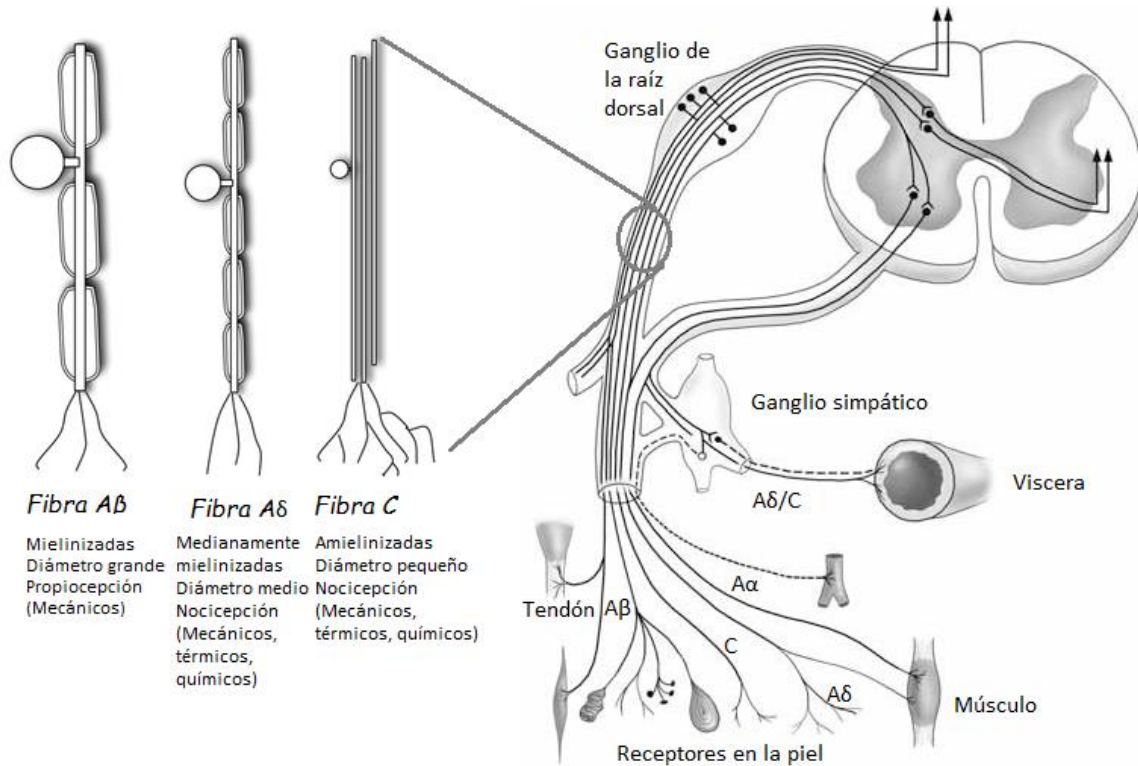
Una parte esencial en la percepción del dolor son los receptores que captan las señales y que son conocidos como nociceptores, los cuales pueden ser sensibles al daño en tejidos. Los nociceptores son receptores sensoriales de alto umbral del sistema nervioso periférico somato-sensorial capaces de traducir y codificar estímulos nocivos. Estos receptores son terminaciones de las fibras nerviosas en diversos tejidos (aferencias) cuyos cuerpos celulares se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal o en el ganglio trigémino del cerebro. Los nociceptores son neuronas con un axón dividido en 2 ramificaciones que proyectan hacia la periferia y el sistema nervioso central, así que los nociceptores pueden enviar y recibir información de y hacia la periferia (Stucky y cols., 2001; Woolf y Ma, 2007).



**Figura 1.** Vía de transmisión del dolor. SNC: Sistema nervioso central, SNP: Sistema nervioso periférico. (Imagen tomada de Bingham y cols., 2009).

Las fibras sensoriales cutáneas están categorizadas en 3 subtipos, de acuerdo a su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción. Las fibras A- $\beta$ , tienen un diámetro de axón mayor que las demás, son altamente mielinizadas y por lo tanto su velocidad de conducción es alta. Las fibras A- $\delta$  son más delgadas que las fibras A- $\beta$ , tienen poca mielina y tienen menor velocidad de conducción que las anteriores. Finalmente, las fibras C son las fibras de menor diámetro y no son mielinizadas, es la fibra de menor velocidad de conducción (Figura 2). La mayoría de las aferencias nociceptivas tienen fibras C y A- $\delta$ . La mayoría de las fibras A- $\beta$  responden a estimulación mecánica inocua. Cuando un

estímulo nociceptivo es aplicado a la piel, los nociceptores A- $\delta$  son responsables de transmitir el dolor inmediato y su localización exacta, el cual genera una reacción de retirada de la fuente de estímulo, posteriormente se presenta un dolor más difuso, causado por la activación de las fibras C (Costigan y Woolf, 2000; Zimmermann, 2001; Woolf y Ma, 2007; Dubin y Patapoutian, 2010).



**Figura 2.** Fibras Aferentes primarias relacionadas con la transducción de la señal y transmisión de la información hacia la médula espinal (Modificado de Berry y cols., 2001).

La conversión de energía de un estímulo nocivo a una señal eléctrica (impulso nervioso) es conocida como transducción. Las señales captadas en los nociceptores viajan a través de las fibras aferentes primarias (Fibras C y fibras A- $\delta$ ) hacia la médula espinal y depende de las propiedades específicas de canales iónicos y receptores presentes en las terminaciones periféricas de los nociceptores (Price y Géranton, 2009; Reichling y Levine, 2009; Dubin y Patapoutian, 2010; Gold y Gebhart, 2010). Proteínas específicas en las terminales aferentes son responsables para la transducción de los estímulos nocivos (calor, frío, estímulos



mecánicos o químicos). La transducción involucra un cambio conformacional en la estructura de proteínas que están ligadas a la apertura o cierre de canales iónicos en la membrana de dichas terminales (Costigan y Woolf, 2000; Hunt y Mantyh, 2001). Además de los estímulos externos que activan a los nociceptores (Calor, frío, estímulos mecánicos y químicos), el daño a los tejidos provoca la liberación de mediadores inflamatorios como prostaglandinas, sustancia P, bradicinina, histamina, serotonina así como citocinas, que también activan y sensibilizan a los nociceptores, es decir, generan impulsos nerviosos, aumentando su excitabilidad y frecuencia de descarga (Woolf y Mannion, 1999; Costigan y Woolf, 2000; Stucky y cols., 2001)

Cuando la señal es captada por los nociceptores, esta es transmitida al sistema nervioso central. Los impulsos nerviosos viajan por los axones de las neuronas aferentes primarias (neuronas de primer orden) hacia el asta dorsal de la médula espinal. Ahí las neuronas aferentes primarias propagan los impulsos a través de la liberación de aminoácidos excitatorios (como glutamato y aspartato) y neuropéptidos (como sustancia P) en los sitios sinápticos, donde otras neuronas envían la señal hacia el cerebro. Esta transmisión de la información hacia el cerebro se proyecta por medio de haces llamados tractos ascendentes. Las neuronas de proyección de algunas regiones del asta dorsal transmiten señales nociceptivas al tálamo a través del tracto espinotalámico, mientras que otros transmiten información nociceptiva a la formación reticular, mesencéfalo e hipotálamo a través de los tractos espinoreticulares, espinomesencefálicas y espinohipotálamicas (Giordano, 2005; Campbell y Meyer, 2006; Fu y cols., 2011).

La percepción se refiere a la apreciación del dolor a partir de las señales que llegan a estructuras superiores, se caracteriza por una sensación claramente desagradable y una emoción negativa mejor descrita como amenaza.

La modulación de la transmisión nociceptiva ocurre a diferentes niveles (periférica, espinal y supraespinal). Las fibras nerviosas de las vías inhibitorias

liberan sustancias como opioides endógenos, serotonina, noradrenalina y como el ácido- $\gamma$ -aminobutírico [GABA]) en las sinapsis con neuronas de la médula espinal. Estas sustancias se unen a los receptores en neuronas aferentes primarias o neuronas de la médula espinal e inhiben la transmisión del dolor (Woolf y Mannion, 1999; Giordano, 2005).

### **1.3 Tipos de dolor**

El dolor se puede clasificar de acuerdo a su duración, patogenia, localización, intensidad, entre otros aspectos. Según su duración, el dolor puede ser agudo y crónico, el primero es de tiempo limitado, se define como una experiencia desagradable y compleja con factores cognitivos y sensoriales que suceden en respuesta a un trauma tisular; por su parte, el dolor crónico se define como aquel que se extiende más de 3 meses desde su aparición, se desarrolla más allá del periodo de la duración de una lesión tisular o bien está asociado a una condición médica crónica (Leung y Cahill, 2010).

En relación a la fisiopatología subyacente, el dolor puede ser nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional. El dolor nociceptivo se produce en respuesta a un estímulo nocivo sobre los tejidos corporales que resulta de la activación de nociceptores A- $\delta$  y C (Hunt y Mantyh, 2001; Price y Géranton, 2009). El dolor que surge de los órganos viscerales se denomina dolor visceral, mientras que el que surge de los tejidos como la piel, los músculos, las cápsulas articulares y el hueso se denomina dolor somático. El dolor somático puede clasificarse como superficial (cutáneo) o profundo. En este tipo de dolor generalmente existe una estrecha correlación entre la percepción y la intensidad del estímulo y el dolor es indicativo de un riesgo de daño al tejido real o potencial (Vardeh y cols., 2016).

El dolor inflamatorio se presenta como respuesta al daño, lesión o cualquier causa que subyace a la activación de la vía dolorosa que produce

inflamación, la función de este tipo de dolor es protectora, aunque por periodos prolongados resulta nocivo. Durante el proceso inflamatorio se genera calor, rubor, edema, pérdida de la función celular y dolor como resultado de la sensibilización de los receptores (Costigan y Woolf, 2000; Bingham y cols., 2009; Cohen y Mao, 2014). El daño celular induce la activación de células cebadas, basófilos macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y la subsecuente liberación de mediadores químicos de la inflamación como plaquetas, iones de hidrógeno ( $H^+$ ), citocinas, factores de crecimiento, neurotransmisores, proteasas extracelulares. Las sustancias liberadas activan y sensibilizan a los nociceptores, provocando que las neuronas del sistema nervioso muestren una mayor descarga espontánea y evocada (Abbadie, 2005; Wang, 2005; Chen y cols., 2013).

En el proceso inflamatorio hay liberación del contenido intracelular de las células dañadas y de moléculas de señalización inflamatoria de células inmunes, dicho contenido incluye péptidos (sustancia P, CGRP, bradicinina), lípidos (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), factores de crecimiento y citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) (Chen y cols., 2013; Vardeh y cols., 2016). Algunos de estos agentes activan a los nociceptores en las terminales nerviosas. Los mediadores inflamatorios también conducen a cambios post-traduccionales y transcripcionales de los transductores; por ejemplo, existe una expresión aumentada del canal TRPV1 que da como resultado un umbral disminuido. Los mediadores inflamatorios pueden cambiar el tráfico, la expresión de la superficie celular y las propiedades de apertura de canales iónicos que tiene como consecuencia mayor excitabilidad.

El otro tipo de dolor de acuerdo a su patogenia y en el cual nos centraremos en este trabajo es el dolor neuropático. Este dolor se produce como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial. El dolor neuropático a veces se denomina dolor "patológico" porque no tiene una función biológica, en lugar de ello evoluciona hacia un estado de

cronicidad, donde ocurren cambios fisiopatológicos que se independizan del evento que dio inicio al dolor. Dentro de las características del dolor neuropático se encuentran la presencia de alodinia (dolor ante un estímulo inocuo) e hiperalgesia (aumento en la percepción del dolor frente a un estímulo doloroso) (Zimmermann, 2001; Vranken, 2012).

Las causas comunes del dolor neuropático incluyen traumatismo, inflamación, enfermedades metabólicas (ej. diabetes), infecciones (ej. herpes zóster), tumores, toxinas y enfermedades neurológicas primarias. Tomando en cuenta el lugar anatómico, el dolor neuropático puede clasificarse como de origen periférico o central (Zimmermann, 2001; Vranken, 2012; Meacham y cols., 2017).

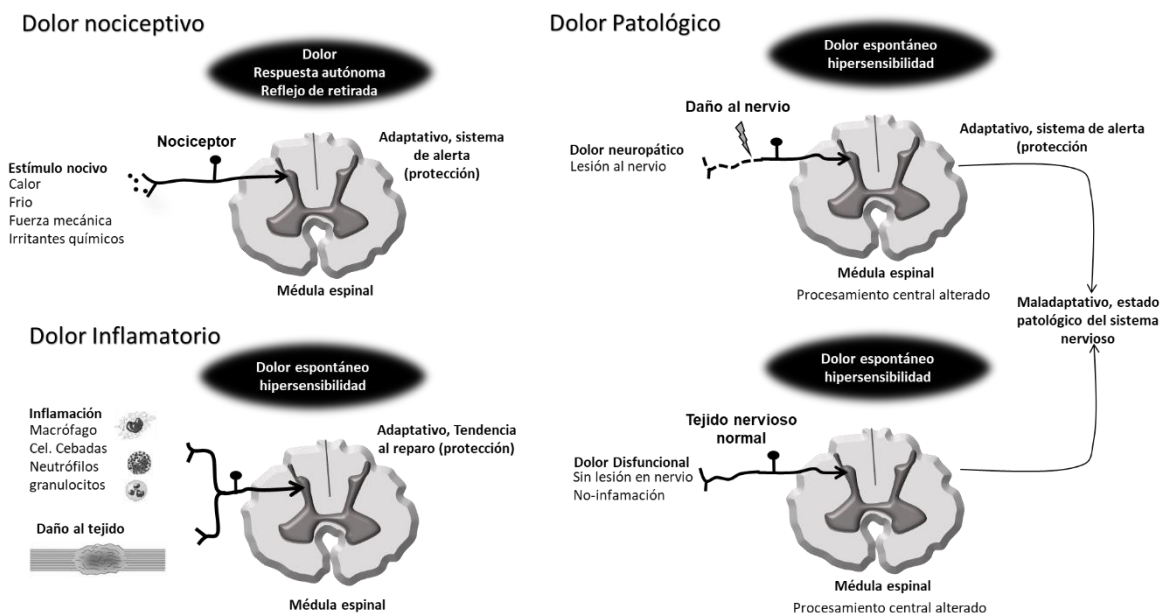


Figura 3. Clasificación del dolor (Modificado de Woolf, 2010).

Finalmente se puede hablar de un tipo de dolor en el que a diferencia de los anteriores, no existe un daño claro al tejido. Sin embargo, hay una percepción dolorosa por una respuesta anormal del sistema nervioso, ejemplo de este tipo

es el dolor de miembro fantasma. Es un dolor espontáneo con imposibilidad de detectar la alteración que lo desencadena, lo que hace difícil su tratamiento (Zimmermann, 2001).

## **1.4 Dolor neuropático**

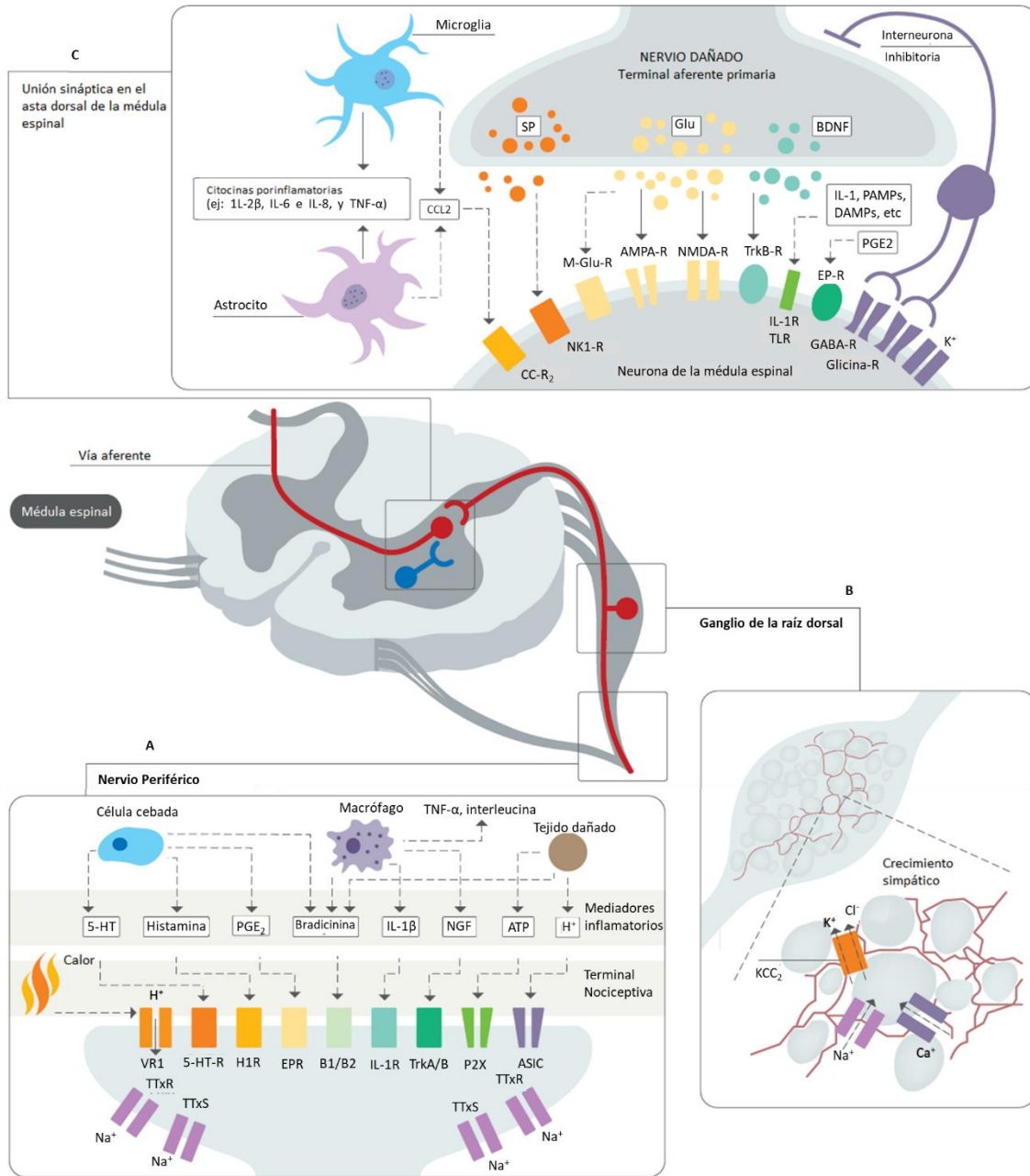
### **1.1.2 Fisiología**

El dolor neuropático deriva de una alteración en el sistema nervioso, generalmente como consecuencia de lesiones en nervios periféricos, es decir en la neurona aferente primaria. En primera instancia, este daño provoca un incremento de la respuesta inflamatoria en el sitio de la lesión, en etapas tempranas ocurre la infiltración de células inflamatorias como células cebadas, macrófagos y otras células inmunocompetentes. Dichos elementos celulares evocan la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, bradicinina, serotonina, adenosin-trifosfato, productos de la vía de las ciclooxigenasas y de las lipooxigenasas (leucotrienos), prostaglandinas y citocinas, adicionalmente las neuronas nociceptivas liberan Sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), provocando vasodilatación, extravasación y liberación de mediadores inflamatorios. Debido a esta inflamación, los nociceptores pueden aumentar la sensibilidad y esto promueve que se activen con umbrales menores de estimulación, adicionalmente se observa una respuesta de estimulación más prolongada (Zimmermann, 2001; Cohen y Mao, 2014).

El daño en las neuronas aferentes primarias también genera una alteración en la densidad y función de canales iónicos, este fenómeno desencadenan patrones de descargas nerviosas anormales hacia la médula espinal. Uno de los canales que tienen una participación importante en la neurotransmisión (control de la liberación de neurotransmisores en las terminales de las neuronas sensoriales) son los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC); se sabe que existe una sobreactividad de estos canales en el dolor neuropático, lo que genera la presencia de descargas ectópicas e

hiperexcitabilidad neuronal (Luo y cols., 2001; Yaksh, 2006; Boroujerdi y cols., 2011). La inestabilidad de la transmisión nerviosa se exagera por un incremento en la señalización de los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (Nav 1.3) así como de canales de sodio resistentes a tetrodotoxina (Nav 1.8) (Figura 4) (Gold y cols., 2003; Devor, 2006; Ueda, 2006). Adicionalmente, también existen interacciones en sitios no-sinápticos (transmisión efáptica) en el ganglio de la raíz dorsal incrementando la hiperexcitabilidad. Estos acoples efápticos pueden ocurrir incluso entre neuronas de diferentes clases (ej. Fibras A- $\delta$  y A- $\beta$ ), provocando alodinia. Adicionalmente las fibras A- $\beta$  expresan SP y CGRP, que normalmente se expresan en fibras C y A- $\delta$ , en consecuencia, se logra que las fibras A- $\beta$  se activen con umbrales bajos, provocando la liberación de SP, CGRP y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el asta dorsal de la médula espinal y con ello contribuyendo a la generación de un estado de hiperexcitabilidad neuronal (Inbal y cols., 1987; Amir y Devor, 1999; Shinder y cols., 1999; Zhang y cols., 2004; Kiguchi y cols., 2012; Vranken, 2012). Aunado a estos cambios, a nivel periférico también se puede llegar a formar crecimiento de fibras adyacentes hacia áreas denervadas y en las terminales nerviosas puede haber formación de neuroma, es decir se generan patrones aberrantes de fibras periféricas con funciones alteradas, contribuyendo a la aparición de descargas ectópicas y espontáneas (Vranken, 2012; Cohen y Mao, 2014; Meacham y cols., 2017).

En el dolor neuropático también puede estar involucrado el sistema nervioso simpático. Las evidencias sugieren que posterior al daño en las fibras aferentes primarias existe un crecimiento aberrante de axones simpáticos hacia los ganglios de la raíz dorsal, favoreciendo así la actividad ectópica de esta zona. Adicionalmente, también se ha demostrado la expresión de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en las fibras aferentes primarias relacionadas con la transmisión del dolor (Shinder y cols., 1999; Cohen y Mao, 2014).



**Figura 4.** Mecanismos involucrados en el dolor neuropático. AMPA: ácido- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico; ASIC: canal iónico sensible a ácido; B1/B2: receptor de bradicinina 1/2; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; CCL: quimiocina ligando (CC-motif); CC-R2: receptor de quimiocina; DAMPs: patrón molecular asociado a daño; EPR: receptor de prostaglandina E2; GABA: ácido- $\gamma$ -aminobutírico; Glu: glutamato; H1R: receptor de histamina; 5-HT: 5-hidroxi-triptamina; IL: Interleucina; KCC: cotransportador de cloro-potasio; m-Glu: glutamato metabotrópico; NGF: factor de crecimiento nervioso; NK: Neurocinina; NMDA: N-metil-D-aspartato; PAMPs: Patrón molecular asociado a patógeno; PG: prostaglandina; TTxR: canal de sodio resistente a tetrodotoxina; TTxs: Canal de sodio sensible a tetrodotoxina; VR: receptor vanilloide (canal de cationes de potencial transitorio de la subfamilia V miembro1 TRPV1) (Tomado de Cohen y Mao, 2014).

### **1.1.3 Procesos centrales en la señalización del dolor neuropático**

En circunstancias normales, un estímulo doloroso provoca la liberación de aminoácidos excitatorios (glutamato, aspartato), neurotrofinas (BDNF) y péptidos (SP, neurocinina A y CGRP) de las terminales nerviosas de fibras nociceptivas (A- $\delta$  y C) en el asta dorsal de la médula espinal. Cada una de estas moléculas interactúa con su receptor y contribuyen a la inducción de la sensibilización en el asta dorsal. El CGRP es responsable del influjo de calcio, el cual retarda el metabolismo de la sustancia P e incrementa su liberación así como de los aminoácidos excitatorios, siendo así el CGRP uno de los participantes que favorecen el establecimiento de sensibilización (Figura 4) (Latremoliere y Woolf, 2009; Vranken, 2012; Meacham y cols., 2017).

Uno de los aminoácidos excitatorios que tienen una participación importante en la sensibilización central es el glutamato, el cual interactúa con diferentes receptores incluyendo al receptor AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5 metil-4-isocazolepropionico) y kainato así como con receptores metabotrópicos de glutamato (Figura 4). Aunque este aminoácido tiene una alta afinidad por el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato); en condiciones normales este receptor se encuentra bloqueado por un ion magnesio. Después de un estímulo nocivo, la liberación de glutamato actúa en los receptores AMPA post-sinápticos y su interacción resulta en la generación de potenciales rápidos; subsecuentemente, los canales de calcio dependientes de voltaje son activados y se produce la despolarización (Larsson y Broman, 2011). La estimulación persistente por parte del glutamato genera un incremento intracelular de calcio (por activación de los canales VDCC) que activa a diversas proteínas cinasas que fosforilan al receptor NMDA y se induce la liberación del magnesio en el receptor NMDA provocando la apertura de este canal, es entonces cuando el glutamato ejerce un efecto excitatorio dual por unirse a los receptores AMPA y NMDA. Adicionalmente se produce la activación del receptor NMDA presináptico en las terminales nerviosas de las fibras aferentes primarias que liberan sustancia P y aminoácidos

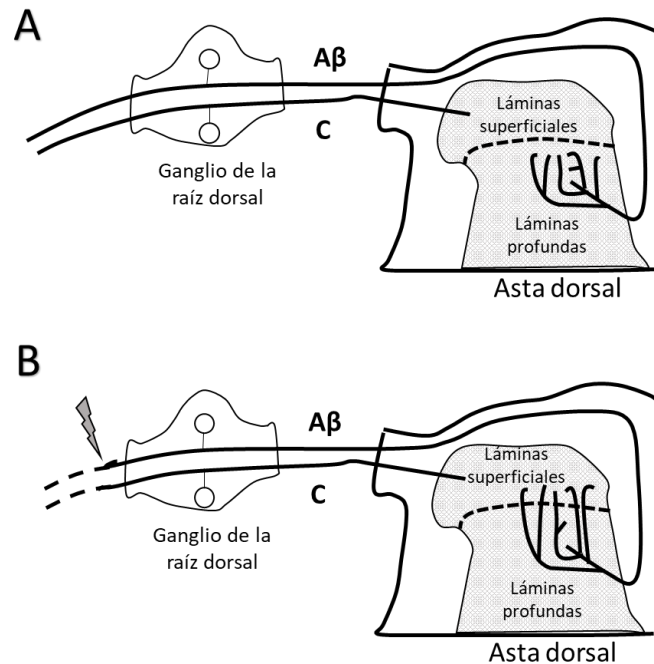


excitatorios aumentando la actividad de las neuronas de segundo orden en el asta dorsal, siendo así el receptor NMDA el responsable de la inducción de hiperalgesia, el subsecuente mantenimiento del dolor neuropático y la sensibilización central, dando como resultado que estímulos nocivos sub-umbrales activen a neuronas de segundo orden. La sensibilización central se manifiesta como una respuesta exacerbada o amplificada frente a un estímulo (hiperalgesia), esto genera la propagación de la sensación dolorosa y una reducción del umbral de activación (Woolf y Mannion, 1999; Latremoliere y Woolf, 2009; Vranken, 2009). Otro fenómeno importante causado por la activación del receptor NMDA es el denominado “windup”, el cual se refiere a un incremento progresivo en la frecuencia y magnitud de disparos de las neuronas del asta dorsal producido por la activación repetitiva de la fibra C (Cohen y Mao, 2014).

Adicionalmente, en el dolor neuropático pueden existir cambios plásticos importantes provocando la formación de nuevas conexiones en el asta dorsal de la médula espinal (Figura 5). Hay un proceso de crecimiento de las fibras A- $\beta$ . Estas fibras normalmente median la sensación al tacto en las láminas III y IV, pero no el dolor; sin embargo, en el dolor neuropático crecen hacia laminas superficiales (lámina II) del asta dorsal de la médula espinal, haciendo contacto con neuronas nociceptivas. Estos cambios en la anatomía neuronal pueden generar la percepción de estímulos inocuos (de bajo umbral) como nocivos (como contactos ligeros con la piel) por la activación de las fibras A- $\beta$  (Woolf y cols., 1992, 1995; Vranken, 2012).

Aunque la actividad excitatoria es considerada clave en la generación de dolor neuropático, también se ha descrito que la pérdida del control inhibitorio es un factor que amplifica la hiperexcitabilidad neuronal. GABA y glicina son moléculas con actividad inhibitoria en el sistema nervioso. Estos neurotransmisores son liberados de las interneuronas que mantienen un tono inhibitorio. En condiciones de dolor inflamatorio, existe evidencia que demuestra un incremento en la inhibición GABAérgica en fibras C del asta dorsal en la

médula espinal, sin embargo en el dolor neuropático hay una disminución en la liberación de GABA, aunado a esto, existe un decremento en la densidad de receptores GABA, el cual es responsable de la reducción funcional de las neuronas aferentes primarias (Janssen y cols., 2011; Vranken, 2012).



**Figura 5 A.** Conexiones normales de las fibras A-β y C. **B.** cuando hay daño en el sistema nervioso puede existir reorganización de las fibras Aβ que normalmente inervan las láminas profundas en el asta dorsal, sin embargo hay crecimiento hacia las láminas superiores encargadas de recibir información nociceptiva (Imagen tomada de Bridge y cols., 2001).

Otra de las vías que modulan la generación del dolor es el sistema opioidérgico, el cual también resulta afectado. En el dolor neuropático hay un aumento en la liberación de colecistocinina (CCK), el cual es responsable de mantener un tono inhibitorio de los opioides endógenos, entonces un aumento en su acción se traduce en una atenuación de la acción de la vía opioidérgica en el control del dolor (Wiesenfeld-Hallin y cols., 2002; Kohno y cols., 2005).

### 1.1.3 Mediadores Inflamatorios en el dolor neuropático.

La microglia, oligodendrocitos y astrocitos en el sistema nerviosos central son activados por TNF-α e IL-6, provocando la liberación de mediadores inflamatorios

que modulan el procesamiento del dolor por afectar la liberación de neurotransmisores. La importancia de las citocinas pro-inflamatorias ha sido ampliamente estudiada en el dolor neuropático. Se sabe que existe una producción periférica y central de interleucinas como la IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en respuesta al daño neuronal. Estas citocinas son parte crucial en la sensibilización del sistema nervioso, contribuyendo así a la generación de alodinia e hiperalgesia y la formación del neuroma. En modelos animales se ha visto que la administración de citocinas inhibitorias, reduce la condición de dolor, sin embargo en estudios clínicos los resultados son controversiales (Kazuhide y Makoto, 2009; Clark y cols., 2013).

#### **1.1.4 Especies reactivas de oxígeno y dolor neuropático**

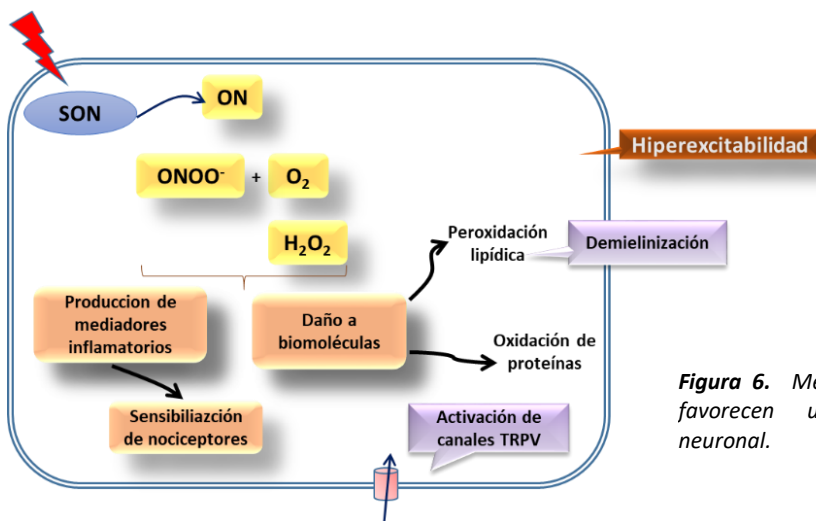
En la fisiopatología del dolor neuropático también se encuentra involucrado el componente del estrés oxidativo. Se menciona que las especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) son en parte responsables del desarrollo de la generación de la sensación dolorosa después de una lesión en el nervio (Kim y cols., 2004; Gao y cols., 2007).

Existe evidencia que menciona que concentraciones nanomolares de óxido nítrico (ON) en el cerebro pueden actuar como neuroprotectores y su formación ocurre después de la estimulación del recetor NMDA; sin embargo, una excesiva estimulación de los receptores NMDA promueve la sobre-activación de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) que genera un incremento en las concentraciones de ON, cambiando su estatus a neurotóxico (Ahlawat y cols., 2014; Mukherjee y cols., 2014).

El ON genera neurotoxicidad por diferentes vías. El exceso de ON por sí mismo puede afectar la producción de energía celular a través de la interacción con los componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por otra parte, el ON también genera la formación de EROs y ERNs; la reacción del

ON con el ión superóxido produce peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) y ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) que a su vez pueden formar otras especies reactivas como radicales hidroxilo y peróxidos. El daño de estos radicales libres, incluye alteraciones al ADN, peroxidación lipídica, daño a las estructuras proteicas, como nitración de tirosina y S-nitrosilación de residuos de cisteína. Adicionalmente, el estrés oxidativo provoca una disminución de los depósitos de glutatión, causando una sobreexpresión de glutatión como una respuesta protectora (Burney y cols., 1999; Brown y Bal-Price, 2003; Moncada y Bolaños, 2006; Steinert y cols., 2010).

Los efectos nociceptivos relacionados con el óxido nítrico están relacionados a concentraciones altas por la acción de la isoforma nNOS (sintetasa del óxido nítrico neural). El ON es una pequeña molécula, altamente soluble y difusible, participa en procesos nociceptivos a nivel espinal por la activación de la guanilato ciclasa (GC) que interviene en la formación del guanosin-monofosfato cíclico (GMPc). Por otra parte, la formación rápida de peroxinitritos promueve la formación de mediadores inflamatorios y la subsecuente activación del receptor TRPV1; adicionalmente, la formación de radicales libres genera daño celular como la demielinización (Figura 6), aunado a esto, el ON favorece la fosforilación del receptor NMDA, desencadenando en conjunto un proceso de hiperexcitabilidad neuronal (Naik y cols., 2006b; Gao y cols., 2007; Freire y cols., 2009; Ahlawat y cols., 2014).



**Figura 6.** Mecanismos del óxido nítrico que favorecen un estado hiperexcitabilidad neuronal.

### 1.1.5 Papel del receptor $\sigma_1$ en el dolor neuropático

El receptor  $\sigma$  fue inicialmente clasificado como un subtipo de receptor opioide, basados en la acción del ligando SKF-10,047. Los efectos observados con este compuesto fueron distintos a los que se obtienen con morfina y ketociclazocina, lo que derivó en proponer a un nuevo subtipo de receptor, para lo cual se nombró tomando como referencia a la primer letra del compuesto en evaluación, siguiendo la nomenclatura de los receptores a opioides. Posteriormente, se demostró que este nuevo receptor no presenta homología con los receptores opioides, ni con alguna otra molécula de mamíferos; en lugar de ello, ahora se sabe que existen dos subtipos de este receptor ( $\sigma_1$  y  $\sigma_2$ ). El receptor  $\sigma_1$  es el que está relacionado con el proceso de nocicepción, es una proteína constituida de 223 aminoácido, con dos dominios transmembranales (Schmidt y cols., 2016). Una de las características ampliamente descritas del receptor  $\sigma_1$  es que actúa como una chaperona, modulando la actividad de diversas proteínas, siendo una de las más estudiadas, la estabilización del receptor de  $IP_3$  en la membrana del retículo endoplásmico modulando la salida de calcio hacia el citosol y mitocondria (Su y cols., 2010). Se ha sugerido que el desbalance en la salida de calcio desencadena diversas vías de señalización, entre ellas la activación del receptor NMDA, el cual está involucrado en la generación y mantenimiento del dolor (Kim y cols., 2008; Pyun y cols., 2014; Choi y cols., 2016). Interesantemente el receptor  $\sigma_1$  está expresado en áreas anatómicas importantes para el control del dolor. En el sistema nervioso está expresado en la médula espinal (láminas superficiales del hasta dorsal de la médula espinal) y en sitios supraespinales (sustancia gris periacueductal, locus coeruleus y médula rostroventral) (Gundlach y cols., 1986; Roh y cols., 2011; Romero y cols., 2016), mientras que en el sistema nervioso periférico se ha demostrado su expresión en el ganglio de la raíz dorsal (Bangaru y cols., 2013; Mavlyutov y cols., 2016).

Se ha señalado previamente que los fármacos opioides no se unen al receptor  $\sigma_1$  (Sánchez-Fernández y cols., 2014), a su vez existen compuestos con

una alta afinidad por el receptor  $\sigma_1$ , sin embargo, estos son de un amplio rango de estructuras e incluso con diferentes aplicaciones terapéuticas, ejemplo de ello son el haloperidol (antipsicótico), carbapentano (antitusivo) y fluvoxamina (antidepresivo). Por otra parte existen compuesto de naturaleza endógena con afinidad por el receptor  $\sigma_1$ , como los neuroesteroides (pregnenoloa, dehidroepiandrosterona, progesterona, alopregnenolona) (Cobos y cols., 2008; Maurice y Su, 2009; Brimson, 2010). Asimismo, se ha destacado que ciertos compuestos tienen una alta especificidad por el receptor  $\sigma_1$  y se han empleado con el objetivo de estudiar su función, dentro de estos fármacos prototipos se encuentran los agonistas como (+)-pentazocina y PRE-084 y los antagonistas como BD-1047, NE-100 y BD-1063 y el compuesto S1RA (Figura 7) (Cobos y cols., 2008; Maurice y Su, 2009; Son y Kwon, 2010).

<b>Agonistas</b>	<b>Antagonistas</b>
Herramientas farmacológicas	Herramientas farmacológicas
<b>PRE-084</b> (ki nM: $\sigma_1 = 2.2$ ; $\sigma_2 = 13091$ ) <b>(+)-Pentazocine</b> (ki nM: $\sigma_1 = 16.7$ ; $\sigma_2 = 6611$ ) <b>DTG</b> (ki nM: $\sigma_1 = 2.2$ ; $\sigma_2 = 13091$ ) <b>(+)-SKF-10,047</b> (ki nM: $\sigma_1 = 597$ ; $\sigma_2 = 39740$ )	<b>BD-1047</b> (ki nM: $\sigma_1 = 2.9$ ; $\sigma_2 = 26.4$ ) <b>BD-1063</b> (ki nM: $\sigma_1 = 6.3$ ; $\sigma_2 = 318.4$ ) Matsumoto y cols., 1995
Su y cols., 1988a Vilner y Bowen, 2000 Brown y cols., 2004	
Ligandos endógenos	Ligandos endógenos
<b>L-Threo-sphingosina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 20$ ; $\sigma_2 = 8300$ ) <b>Sphinganina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 70$ ; $\sigma_2 = 3500$ ) <b>N,N-Dimetilesfingosina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 120$ ; $\sigma_2 = 2800$ ) <b>D-eritro-esfingosina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 140$ ; $\sigma_2 = 13000$ ) <b>PREGS</b> (ki nM: $\sigma_1 = 3200$ ; $\sigma_2 = ND$ ) <b>DMT</b> (ki nM: $\sigma_1 = 14750$ ; $\sigma_2 = 21710$ )	<b>Progesterona</b> (ki nM: $\sigma_1 = 270$ ; $\sigma_2 = ND$ ) Su y cols., 1988b
Ramachandran y cols., 2009 Su y cols., 1988b Fontanilla y cols., 2009	
Fármacos disponibles con afinidad no selectiva por el receptor sigma-1	Fármacos disponibles con afinidad no selectiva por el receptor sigma-1
<b>(+/-)-Pentazocina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 12.1$ ; $\sigma_2 = 1880$ ) <b>Carbapentano</b> (ki nM: $\sigma_1 = 129$ ; $\sigma_2 = 1953$ ) <b>Dextrometofano</b> (ki nM: $\sigma_1 = 205$ ; $\sigma_2 = 11060$ ) <b>Donepezil</b> (ki nM: $\sigma_1 = 14.6$ ; $\sigma_2 = ND$ ) <b>Fluvoxamina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 36$ ; $\sigma_2 = 8439$ ) <b>Sertralina</b> (ki nM: $\sigma_1 = 57$ ; $\sigma_2 = 5297$ )	<b>Haloperidol</b> (ki nM: $\sigma_1 = 2.8$ ; $\sigma_2 = 22$ ) Bowen y cols., 1990
Bowen et al., 1993 Calderon y cols., 1994 Schmidt y cols., 1989 Kato y cols., 1999 Narita y cols., 1996	
Fármacos en desarrollo (investigación clínica)	Fármacos en desarrollo (investigación clínica)
<b>Cutamesina (SA4503)</b> (ki nM: $\sigma_1 = 12.1$ ; $\sigma_2 = 1880$ ) <b>Anavex 2-73</b> (IC50 nM: $\sigma_1 = 860$ ; $\sigma_2 = ND$ )	<b>S1RA (E-52862)</b> (ki nM: $\sigma_1 = 17$ ; $\sigma_2 = 9300$ ) Romero y cols., 2012
Lever y cols., 2006 Lahmy y cols., 2013	

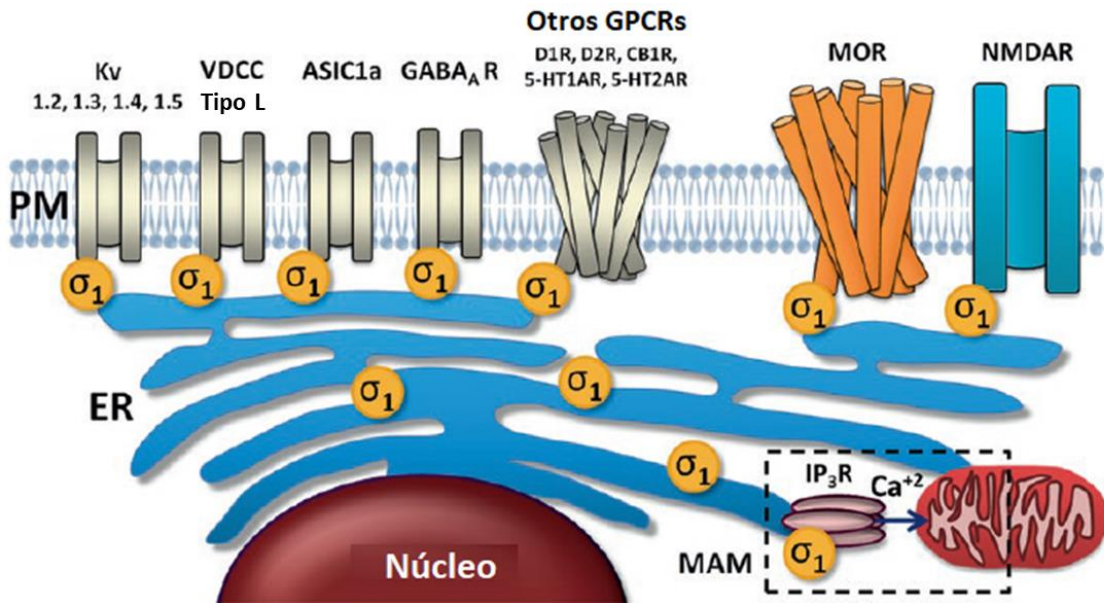
Figura 7. Ligandos del receptor  $\sigma_1$  (Modificado de Merlos y cols., 2017)

Inicialmente se pensó que los antagonistas  $\sigma_1$  no podían generar un efecto anti-nociceptivo al ser administrado individualmente, los estudios indicaban que actuaban como moduladores de los fármacos opioides, al favorecer sus efectos. (Mei y Pasternak, 2002; Vidal-Torres y cols., 2013). Posteriormente se mencionó que no solo favorecían a los fármacos opioides, si no que desempeñaban un papel importante en la modulación del dolor. La participación del receptor  $\sigma_1$  en el dolor aún en ausencia de opioides se demostró al utilizar ratones knock-out para este receptor; se expuso en diversos modelos experimentales que los ratones knock-out exhibían una menor hipersensibilidad, incluso en modelos de dolor neuropático (De la Puente y cols., 2009; Entrena y cols., 2009b; Nieto y cols., 2014).

Hasta este momento, los estudios del receptor  $\sigma_1$  apuntan a que es una proteína chaperona que normalmente se encuentra inactiva; sin embargo, bajo condiciones de estrés celular puede migrar a diferentes sitios celulares. En condiciones de dolor, esta proteína migra a la membrana plasmática modulando la actividad de diversas proteínas relacionadas con la neurotransmisión (Mori y cols., 2013; Hayashi, 2015). Recientemente se ha descubierto que la activación de receptor  $\sigma_1$  está relacionado con su conformación; la administración de un agonista promueve la separación entre el amino y carboxilo terminal, mientras que un antagonista genera lo opuesto, cambiando así su habilidad para interactuar con otras proteínas (Gómez-Soler y cols., 2014). Su capacidad para modular la anti-nocicepción se debe a que interactúa con los canales y receptores metabotrópicos (Figura 8). De los más estudiados, es su interacción con el receptor NMDA. La unión del receptor  $\sigma_1$  con el receptor NMDA se da en competencia con los reguladores de este canal, tal como lo es la proteína HINT1 (proteína de unión a nucleótido codificada por el gen HINT1) y la proteína de unión calcio-calmodulina (CaM), es por ello que, cuando se une el receptor  $\sigma_1$  dificulta la retroalimentación negativa favoreciendo una mayor actividad del canal y con ello también el influjo de calcio (Ehlers y cols., 1996; Rodríguez-Muñoz y cols., 2015; Romero y cols., 2016). Adicional a la interacción directa del receptor

$\sigma_1$  con el receptor NMDA, también incrementa la fosforilación de la subunidad GluN1 del receptor NMDA que es fundamental para su activación (Roh y cols., 2010; Choi y cols., 2016).

Por otra parte, el receptor  $\sigma_1$  también interactúa con otros canales, como los de potasio dependientes de voltaje, los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, y los canales calcio sensibles a ácido (ASICs) (Tchedre y cols., 2008; Kourrich y cols., 2012; Kwon y cols., 2016). Se ha visto que con estos acoplamiento se favorece la despolarización de las células reduciendo el umbral de activación e incrementando la velocidad de los disparos contribuyendo a la generación de alodinia e hiperalgesia. Además de ello, el receptor  $\sigma_1$  interactúa con receptores acoplados a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés), siendo el acople con el receptor a opioides tipo  $\mu$  (MOR) uno de los más estudiados en donde se ha demostrado que los antagonistas aumentan el efecto de los opioides (Sánchez-Fernández y cols., 2014; omero y cols., 2016).



**Figura 8.** Proteínas que son moduladas por el receptor  $\sigma_1$  (Imagen Tomada de Sánchez-Fernandez y cols., 2017)

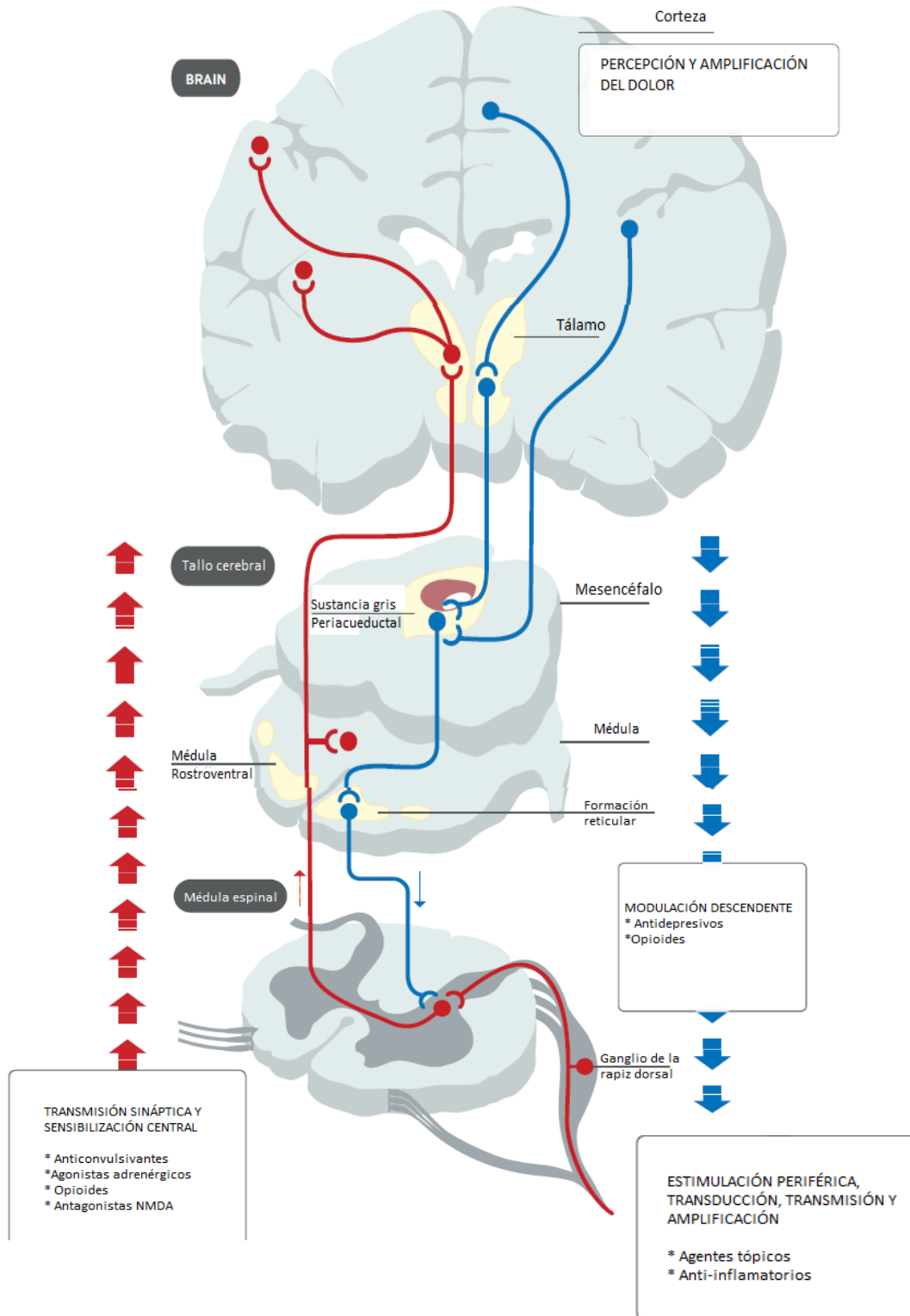


## **1.5 Tratamiento farmacológico para el dolor neuropático**

Clínicamente, el dolor neuropático ha resultado difícil de manejar debido a que generalmente resulta en una condición crónica con efectos negativos en la calidad de vida de las personas que lo padecen. Existen múltiples evidencias de las terapias farmacológicas para el tratamiento de esta condición dolorosa, por ello se sabe que no existe una terapia única o que sea totalmente efectiva, debido a las diversas etiologías (Gilron y cols., 2009; O'Connor y Dworkin, 2009; Finnerup y cols., 2015, 2016); sin embargo, actualmente existe un consenso acerca de los fármacos que pueden resultar más apropiados y se pueden organizar como fármacos de primera línea, como los antidepresivos tricíclicos y antiepilépticos que actúan en los canales de calcio y como de segunda línea, donde se ubican a los opioides haciendo énfasis en las precauciones de uso por su potencial efecto adictivo. En la Figura 9 se indica el lugar de acción de los fármacos empleados en la terapéutica del dolor neuropático y a continuación se describen algunas terapias farmacológicas empleadas para el dolor neuropático.

### **1.1.1 Antidepresivos**

Originalmente, los antidepresivos se emplearon para tratar condiciones de dolor crónico, debido a que algunos pacientes que sufrían de depresión también referían tener dolor por periodos prolongados y los pacientes que eran tratados con estos fármacos además de ayudarlos con la depresión también expresaban una mejoría en la percepción dolorosa. A partir de entonces han surgido estudios que demostraron de forma independiente que algunos antidepresivos presentan un efecto analgésico, ejemplo de ello son los antidepresivos tricíclicos (ATC), (Fornasari, 2017).



**Figura 9.** Sitio de acción de los fármacos empleados para el tratamiento de dolor neuropático. (Tomado de Cohen y Mao 2014).

De los antidepresivos con mayor efectividad para tratar el dolor neuropático son los ATC's, en particular imipramina y amitriptilina y sus metabolitos como desipramina y nortriptilina. Su capacidad analgésica puede ser atribuible a sus efectos pleiotrópicos, es decir a su acción en múltiples blancos farmacológicos, uno de ellos es por la estimulación de las vías descendentes inhibitorias que bloquean la recaptura de noradrenalina y serotonina en las fibras que hacen sinapsis entre los nociceptores (fibras de primer orden) y las neuronas espinotalámicas (Fibras de segundo orden). Aunado a ello, otros estudios también han demostrado que estos compuesto actúan antagonizando al receptor NMDA y bloqueando canales de sodio o calcio (Gilron y cols., 2006; Fornasari, 2017). Sin embargo, su uso analgésico se ha visto comprometido por los efectos adversos como somnolencia, hipotensión ortostática, náuseas, vértigo, cefaleas, etc. Otro perfil de fármacos antidepresivos con actividad analgésica son los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (sertralina, paroxetina, fluoxetina). Estos fármacos presentan un panorama favorable en cuanto a los efectos adversos comparados con los antidepresivos tricíclicos, aunque diversos reportes mencionan que no presentan un buen efecto analgésico (Gilron y cols., 2006; Watson y cols., 2010; Finnerup y cols., 2015).

### **1.1.2 Anticonvulsivos**

La acción analgésica de los fármacos anticonvulsivos está relacionada con la reducción de la hiperexcitabilidad neuronal. De los fármacos anticonvulsivos más empleados son los gabapentinoides como la gabapentina (GBP). Aunque inicialmente se esperaba actuara como un agonista en el receptor GABA, el mecanismo de acción de GBP está ligado a su efecto antagonista del complejo formado las subunidades  $\alpha_2/\delta$  de los canales de calcio dependientes de voltaje y con ello disminuye la liberación de glutamato en el sistema nervioso central. Los canales de calcio dependientes de voltaje están localizados en las terminales presinápticas, donde controlan la liberación de los neurotransmisores (Cheng y Chiou, 2006; Hahm y cols., 2009). Respecto a su acción analgésica, GBP ha

mostrado una adecuada eficacia (Watson y cols., 2010). Otro de los fármacos para el tratamiento del dolor neuropático es pregabalina, un análogo de la GBP, por lo que presenta un mecanismo de acción similar con resultados analgésicos semejantes, su diferencia radica en que tiene una mayor afinidad por el sitio de unión del canal de calcio, exhibiendo entonces una mayor potencia farmacológica. Esta es una de las justificaciones cuando se decide cambiar a la GBP por pregabalina, cuando el primero no es lo suficientemente efectivo. Otras diferencias radican en su farmacocinética, específicamente en su absorción, siendo favorecida la absorción de pregabalina, lo que permite que se emplee una menor dosis de este fármaco. En términos generales, se considera que GBP y pregabalina son bien tolerados, sin embargo se han reportado algunos efectos adversos como mareo, somnolencia, edema, visión borrosa, siendo más común los reportes con el uso de GBP (Athanasakis y cols., 2013; Irving y cols., 2014).

### **1.1.3 Opioides**

A pesar de la controversia en cuanto al uso de los opioides en el tratamiento del dolor neuropático, la evidencia general apunta a una disminución de la percepción del dolor. Los opioides fuertes como morfina, oxicodona e hidromorfina y opioides débiles como tramadol son tan como los ATCs y gabapentinoides en el tratamiento del dolor neuropático. Sin embargo, la elección de estos fármacos se ha desplazado hasta considerarse como fármacos de segunda línea por sus potenciales efectos adversos. El efecto analgésico de los opioides se debe a su acción en el cerebro, el tronco del encéfalo, la médula espinal y en determinadas circunstancias, en las terminales periféricas de las neuronas aferentes primarias (O'Connor y Dworkin, 2009; Finnerup y cols., 2015).

### **1.1.1 Lidocaína tópica**

Una de las terapias recientes incluye a la lidocaína tópica. La lidocaína actúa bloqueando los canales de sodio dependientes de voltaje que están

expresados en las fibras nerviosas y son las responsables de la propagación de los impulsos nerviosos. Se ha reportado que la lidocaína presenta un buen efecto farmacológico y ha resultado tolerable en diversos estudios clínicos, sin embargo su uso se limita a las condiciones específicas de dolor neuropático localizado (Vranken, 2009; Watson y cols., 2010).

### **1.1.2 Antagonistas NMDA**

Debido al papel que desempeña la actividad del receptor NMDA en la generación y mantenimiento del dolor neuropático, el uso de los antagonistas NMDA resulta prometedor. Sin embargo la disponibilidad de agentes con esta actividad es limitada y producen efectos adversos intolerables. De los fármacos de este tipo con efectos moderados se encuentra el dextrometorfano (Sang y cols., 2002).

### **1.1.3 Antagonistas del receptor $\sigma_1$**

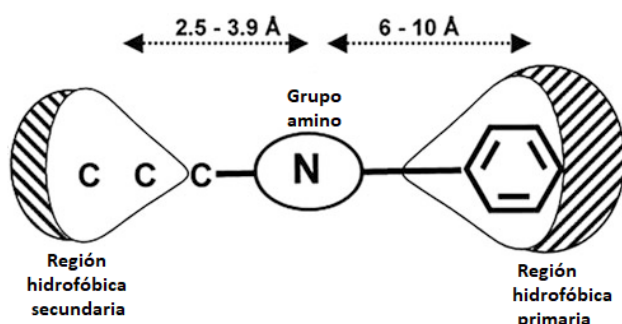
A pesar de los tratamientos actuales, sigue existiendo cierto número de pacientes que no responden adecuadamente (Finnerup y cols., 2015), esto ha provocado que se extienda la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas empleando diferentes mecanismos de acción. Conociendo el papel que desempeña el receptor sigma y una vez demostrado el aumento de su expresión en el dolor, subsecuentemente, se ha sugerido que el antagonismo del receptor  $\sigma_1$  puede ser útil para contrarrestar el dolor neuropático (Bangaru y cols., 2013; Almansa y Vela, 2014; Gris y cols., 2016).

Actualmente hay una amplia evidencia que demuestra que al antagonizar al receptor  $\sigma_1$  se promueve la anti-nocicepción y que fármacos que actúan como agonistas son capaces de generar un estado de pro-nocicepción (Roh y cols., 2008a; Romero y cols., 2016). Existe una gama de compuestos con afinidad por

los receptores  $\sigma_1$  que actúan como antagonistas, uno de los compuestos que presenta una alta afinidad por el receptor  $\sigma_1$  es haloperidol, se sabe que actúa como un antagonista, se ha descrito su utilidad en modelos experimentales de sensibilización con capsaicina y formalina (Cendán y cols., 2005; Entrena y cols., 2009b), sin embargo, se desconoce su participación en la neuropatía.

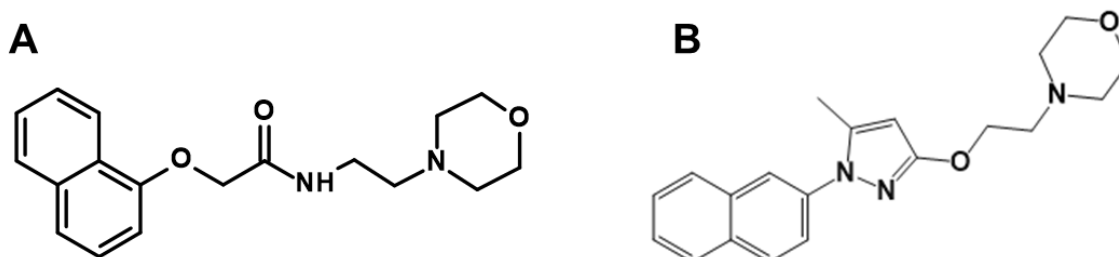
Por otro lado, existen compuestos diseñados específicamente como antagonistas del receptor  $\sigma_1$ , un ejemplo de ello es el compuesto BD-1063, que presenta una alta afinidad por el receptor  $\sigma_1$  y a nivel experimental ha mostrado disminuir la nocicepción en modelos de dolor neuropático (Kim y cols., 2006, 2008; Roh y cols., 2008a).

Algunos ligandos comparten cierta homología estructural. De acuerdo a modelos farmacofóricos de ligandos para el receptor  $\sigma_1$  (Glennon y cols., 1994; Utech y cols., 2011) se mencionan como características la presencia de dos regiones hidrofóbicas unidas a un grupo amino que le dan la afinidad por el receptor  $\sigma_1$  (Figura 10). En ese sentido, existen diversas moléculas que comparten estas particularidades, tal como N-[2-(morfolin-4-il)etil]-2-(1-naftiloxi)acetamida, nombrado como NMIN para fines de este trabajo (Figura 11, panel A), sintetizado por Melo-Hernández (Melo-Hernández, 2015), en la facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, esta molécula presenta una afinidad por el receptor  $\sigma_1$  ( $K_i = 324$  nM), sin embargo, aún se desconoce su acción ya sea como agonista o antagonista y por ende su participación en el dolor neuropático.



**Figura 10.** Características estructurales encontradas óptimas para la unión con el receptor  $\sigma_1$  de acuerdo con el modelo de Glennon (Imagen tomada de Glennon y cols., 1994).

Por otra parte existe un fármaco que ha sido ampliamente estudiado en modelos experimentales de dolor neuropático de diversas etiologías, el fármaco S1RA (E-52862) (Nieto y cols., 2012, 2014; Wunsch, 2012; Gris y cols., 2016). A pesar de que la evidencia de la utilidad de los antagonistas del receptor  $\sigma_1$  para la disminución del dolor se ha demostrado a nivel preclínico, el compuesto S1RA (Figura 11, panel B) ha probado en las primeras fases de la evaluación clínica y se han observado resultados prometedores, exhibiendo buena seguridad, tolerabilidad después de dosis únicas y múltiples dosificaciones (Abadias y cols., 2013; Täubel y cols., 2015), lo que resulta alentador en el diseño de fármacos con características estructurales similares.



*Figura 11. Estructura molecular de NMIN (panel A) y S1RA (panel B)*

#### 1.1.4 El uso de quercetina como alternativa para el tratamiento del dolor neuropático

Además de los fármacos tradicionales para el alivio del dolor, se han buscado alternativas con perfiles distintos. Tomando como referencia que en la fisiopatología del dolor neuropático participan las especies reactivas de oxígeno (Naik y cols., 2006a; Goecks y cols., 2012; Gao y cols., 2016) y que los flavonoides pueden actuar como agentes antioxidantes, estos son compuestos que se han evaluado a nivel experimental (Al-Enazi, 2013; Azevedo y cols., 2013). Los flavonoides son un grupo de compuestos que se encuentran en las plantas y son componentes importantes en la dieta de los humanos. En este trabajo se decidió emplear quercetina (QUER), puesto que a pesar de ser un

flavonoide con la capacidad de disminuir a las EROs, existían pocos reportes de su papel en la modulación del dolor (Anjaneyulu y Chopra, 2003, 2004; Narenjkar y cols., 2011) y no había evidencia de su actividad anti-alodínica y anti-hiperalgésica en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. Sin embargo, durante la realización de este trabajo surgió un estudio donde se demuestra su efecto anti-nociceptivo en estas condiciones experimentales de neuropatía (Çivi y cols., 2016).

QUER es uno de los flavonoides más abundantes y es de los compuestos cuyos efectos biológicos ha sido ampliamente estudiado. Diversos estudios en animales han demostrado un efecto anti-nociceptivo (Filho y cols., 2008; Valério y cols., 2009; Chirumbolo, 2010), cuyo mecanismo está relacionado con su capacidad antioxidante y antiinflamatoria al inhibir la producción de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Valério y cols., 2009), también se ha demostrado que pueden estar relacionados otros mecanismos de acción como la reducción de la actividad del receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT<sub>3A</sub>), regulación a la baja de la proteína cinasa C (PKC), de la expresión y activación del receptor TRPV1 y la modulación del sistema GABAérgico (Filho y cols., 2008; Martínez y cols., 2009; Çivi y cols., 2016; Gao y cols., 2016; Ji y cols., 2017).

### **1.1.5 Combinaciones de fármacos en la terapéutica del dolor neuropático**

En otro enfoque para el alivio del dolor se han empleado las combinaciones de fármacos. El uso de la administración de más de un fármaco tiene la ventaja de poder llegar a más de un blanco terapéutico. La acción sinérgica de fármacos con diferentes mecanismos de acción busca 3 aspectos importantes en la terapéutica. 1) Incrementar el efecto terapéutico, 2) disminuir la dosis empleada cuando se administran de forma individual y 3) minimizar el desarrollo de los efectos no deseados.



Con base en la idea de obtener estos beneficios, las combinaciones de fármacos se han empleado para distintas alteraciones, incluyendo el alivio del dolor. A nivel preclínico existen múltiples formas de analizar los efectos obtenidos cuando se evalúan las asociaciones farmacológicas. De los métodos más empleados se encuentran el uso de los isobogramas (Tallarida, 2001), que han resultado muy útiles y permiten analizar una proporción fija de la combinación. Otro de los métodos empleados es el uso de la superficie de interacción sinérgica, en este método es posible analizar diversas proporciones de combinación, teniendo un amplio panorama del comportamiento de la combinación de 2 fármacos (López-Muñoz, 1995); en ese sentido es posible determinar si en la combinación se obtiene un efecto sub-aditivo (a veces llamado antagonismo) cuando es menor al de la suma teórica, es decir, la suma de los efectos que ejerce cada fármaco de forma individual; aditivo, si es igual a la suma de los efectos de los fármacos cuando se administran individualmente, o bien, el resultado de la combinación puede considerarse supra-aditivo (o de potenciación) si es mayor a la suma de los efectos individuales.

En la evaluación de tratamientos para el dolor neuropático existen evidencias que el uso de fármacos en combinación puede promover mejores efectos anti-nociceptivos, la mayoría de estos trabajos se enfocan en analizar las combinaciones de fármacos anti-depresivos con anticonvulsivantes, o bien cualquiera de estos con fármacos opioides (Chaparro y cols., 2012; Hama y Sagen, 2012; Gilron y cols., 2015), obteniendo efectos aditivos o supra-aditivos.

## 2 JUSTIFICACIÓN

---

Las evidencias sugieren que es importante contar con nuevas herramientas farmacológicas para la terapéutica del dolor neuropático. En ese sentido, se ha reportado la importancia de nuevos blancos terapéuticos, como el receptor  $\sigma_1$ , cuyo antagonismo puede resultar en una disminución de la sensibilidad nociceptiva; es por ello de la necesidad de caracterizar al compuesto de nueva síntesis NMIN, un ligando de estos receptores. Por otra parte, se conoce la importancia de las asociaciones farmacológicas, así como el prometedor uso que tiene el flavonoide quercetina en condiciones de dolor neuropático, por lo que resulta interesante evaluar el sinergismo de un compuesto antagonista del receptor  $\sigma_1$  asociado con el flavonoide quercetina y con ello proponer una alternativa eficaz en el tratamiento de este padecimiento a nivel preclínico.

### 3 HIPÓTESIS

---

- I. El nuevo compuesto NMIN, con afinidad por los receptores  $\sigma_1$ , generará efectos anti-nociceptivos en un modelo de dolor neuropático
  
- II. La asociación farmacológica de un antagonista del receptor  $\sigma_1$  y el flavonoide QUER potenciará los efectos anti-nociceptivos de los fármacos, en el modelo de constricción crónica del nervio ciático.

## 4 OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar la actividad anti-nociceptiva del nuevo compuesto con afinidad por los receptores  $\sigma_1$  (NMIN) y evaluar la actividad así como el sinergismo de antagonistas  $\sigma_1$  y el flavonoide QUER en un modelo de dolor neuropático inducido por constricción crónica del nervio ciático.

### 4.2 Objetivos Específicos

- I. Analizar el efecto anti-nociceptivo de un nuevo compuesto con afinidad por los receptores  $\sigma_1$ , *N*-[2-(morfolin-4-il)etil]-2-(1-naftiloxi)acetamida (NMIN), en un modelo de dolor neuropático y evaluar si su efecto se debe al antagonismo de los receptores  $\sigma_1$ .
- II. Evaluar el efecto anti-nociceptivo de HAL, BD-1063 (antagonistas de los receptores  $\sigma_1$ ) y de QUER (Flavonoide) en el modelo de constricción crónica del nervio ciático en ratas Wistar macho.
- III. Comparar el efecto anti-nociceptivo del nuevo compuesto NMIN y HAL con respecto al antagonista  $\sigma_1$  selectivo BD-1063 (prototipo), así como de todos ellos con el fármaco de referencia gabapentina en el modelo de constricción crónica del nervio ciático en ratas Wistar macho.
- IV. Determinar los efectos anti-hiperalgésico y anti-alodínicos de una combinación de NMIN con QUER en el modelo de constricción crónica del nervio ciático en ratas Wistar macho.
- V. Analizar las interacciones farmacológicas de BD-1063 así como de HAL en asociación con QUER por medio de la superficie de interacción sinérgica del efecto anti-nociceptivo en ratas con constricción crónica del nervio ciático.

- VI. Determinar si la monoterapia y/o la combinación afectan la coordinación motora de los animales de experimentación.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho [CrI(WI)fBR], con un peso entre 90-100 g al momento de la cirugía (constricción crónica del nervio ciático). Los animales fueron obtenidos del bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-Sede Coapa) y mantenidos en cajas de policarbonato bajo condiciones ambientales controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) y luz (ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) e ingesta de agua y alimento *ad libitum* antes del tratamiento. El empleo y manejo de animales se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos en las guías éticas para la investigación del dolor experimental de la Asociación Internacional para el estudio del Dolor (Zimmermann, 1983) y todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité local de ética para manejo de animales de laboratorio del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav-Sede Coapa, que se ajustan a las regulaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-2001). Todas las pruebas experimentales se llevaron a cabo durante la fase de luz. El número de animales de experimentación fue llevado al mínimo y al final de las determinaciones experimentales los animales fueron sacrificados utilizando una sobredosis de dióxido de carbono.

### 5.2 Fármacos

Se utilizó ketamina (PROBIOMED, México) y Xilacina (Bayer, México) para inducir la anestesia en los animales. Los fármacos que se emplearon fueron, Gabapentina (Laboratorios RIMSA, México), Haloperidol (MP biomedical, Francia), BD-1063 (Diclorhidrato de 1-[2-(3,4-diclorofenil) etil]-4-metilpiperazina) y Quercetina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), PRE-084 (Cayman Chemical Company, USA), (+)-Pentazocina (Winthrop

Products, México), S-(-)-sulpirida (Toronto Research chemicals Inc, Canadá), y el compuesto *N*-2-morfolin-4-il-etil-2-(1-naftiloxi)acetamida (NMIN), sintetizado en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Gabapentina, BD-1063, PRE-084, (+)-Pentazocina y S-(-)-sulpirida fueron disueltos en solución salina isotónica (0.9 % NaCl). NMIN y haloperidol fueron disueltos en un buffer de citratos, pH4 y quercetina en una disolución con carboximetilcelulosa al 5%. Todos los fármacos fueron preparados el día de la realización del experimento y se administraron por vía subcutánea (s.c.) en un volumen de 2 ml/kg de peso corporal o por vía intratecal (i.t.) en un volumen de 20 µl, según fuera el protocolo. Los animales control recibieron la misma cantidad de vehículo.

### **5.3 Administración intratecal**

Para la administración intratecal de los fármacos, se siguió la metodología descrita por Mestre y cols. (1994), la cual consiste en sujetar a la rata firmemente en una mano por la cintura pélvica e insertar una aguja entre las vértebras L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub>, este sitio se seleccionó para que la inyección se limitara a la región donde termina la médula espinal y comienza la cauda equina. En este trabajo se utilizó una aguja de 27-Gauge x 1/2", conectada a una jeringa de 1 ml. La inyección se realizó perpendicular a la columna vertebral. Cuando la aguja penetra al espacio subaracnoideo se observa un movimiento de la cola. Este reflejo sirve como un indicador de una punción exitosa. Se inyectó un volumen total de 20 µl.

### **5.4 Modelo experimental**

El modelo que se empleó en este trabajo para inducir la condición de dolor neuropático fue el descrito por Bennet y Xie (Bennet y Xie, 1999), denominado modelo de constricción crónica del nervio ciático (CCI, por sus siglas en inglés). Para la realización de la cirugía, las ratas fueron previamente anestesiadas con

una inyección intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg) y xilacina (75 mg/kg) Una vez anestesiadas, el procedimiento consistió en exponer el nervio ciático común en la mitad del muslo, por el músculo bíceps femoral. Próximo a la trifurcación el nervio, el nervio ciático se liberó del tejido adyacente y se realizaron 4 ligaduras con un espacio aproximado de 1 mm, la ligadura en el nervio ciático fue hecha con hilo de seda 3-0, posterior a ello, el músculo se suturó empleando catgut crómico 4-0 absorbible, mientras que la piel se suturó con hilo de seda 3-0. El grupo SHAM consistió en someter a los animales al mismo procedimiento con excepción de la ligación del nervio.

## 5.5 Evaluación conductual

Se realizó un monitoreo de la conducta de alodinia e hiperalgesia en los animales por un periodo de 15 días, tomando la respuesta basal antes de la cirugía y siguiendo las evaluaciones 1 día después de la cirugía para determinar el día que presentan un efecto máximo de dichas conductas. De acuerdo a estos resultados se determinó que en el día 7 los animales presentan los niveles máximos de hiperalgesia y alodinia además de que se mantiene constante en los días posteriores, por lo que se tomó el día 10 para la evaluación de los efectos anti-nociceptivos de los fármacos.

Para la determinación de estas pruebas los animales fueron colocados en una superficie elevada en contenedores de acrílico. Los animales tuvieron un periodo de habituación de 30 minutos antes de iniciar las pruebas. La determinación de hiperalgesia consistió en realizar 10 estimulaciones continuas con el filamento de 15 g en la superficie plantar de la extremidad lesionada, tomando como referencia el trabajo realizado por de la O-Arciniega (De la O-Arciniega y cols., 2009). Las respuestas fueron convertidas a porcentaje de respuesta de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{\text{No. de retiradas de la extremidad}}{10} (100)$$



Para la obtención del efecto anti-hiperalgésico se utiliza la fórmula que se describe a continuación

$$\textit{Efecto anti – hiperalgésico} = 100 - \frac{\textit{No. de retiradas de la extremidad}}{10} (100)$$

Para la determinación de alodinia, se utilizó la prueba de la acetona, la cual consiste en aplicar 100 µl de acetona en la superficie dorsal de la extremidad lesionada. Se cuantifica el tiempo que el animal pasa con sacudidas o lamidas de la extremidad durante un lapso de 1 minuto. Las respuestas obtenidas se convirtieron a porcentaje de respuesta.

$$\% = \frac{\textit{respuesta al tiempo X}}{\textit{respuesta basal}} (100)$$

Respecto a la obtención del efecto anti-alodínico la fórmula empleada fue:

$$\textit{Efecto anti – alodínico} = 100 - \frac{\textit{respuesta al tiempo X}}{\textit{respuesta basal}} (100)$$

## 5.6 Diseño experimental

Para el análisis del curso temporal del desarrollo del modelo, se evaluaron 2 grupos, uno de ellos con la constricción crónica y el grupo SHAM, se determinaron las conductas nociceptivas (alodinia e hiperalgesia) por un periodo de 15 días (Figura 12, set 1).

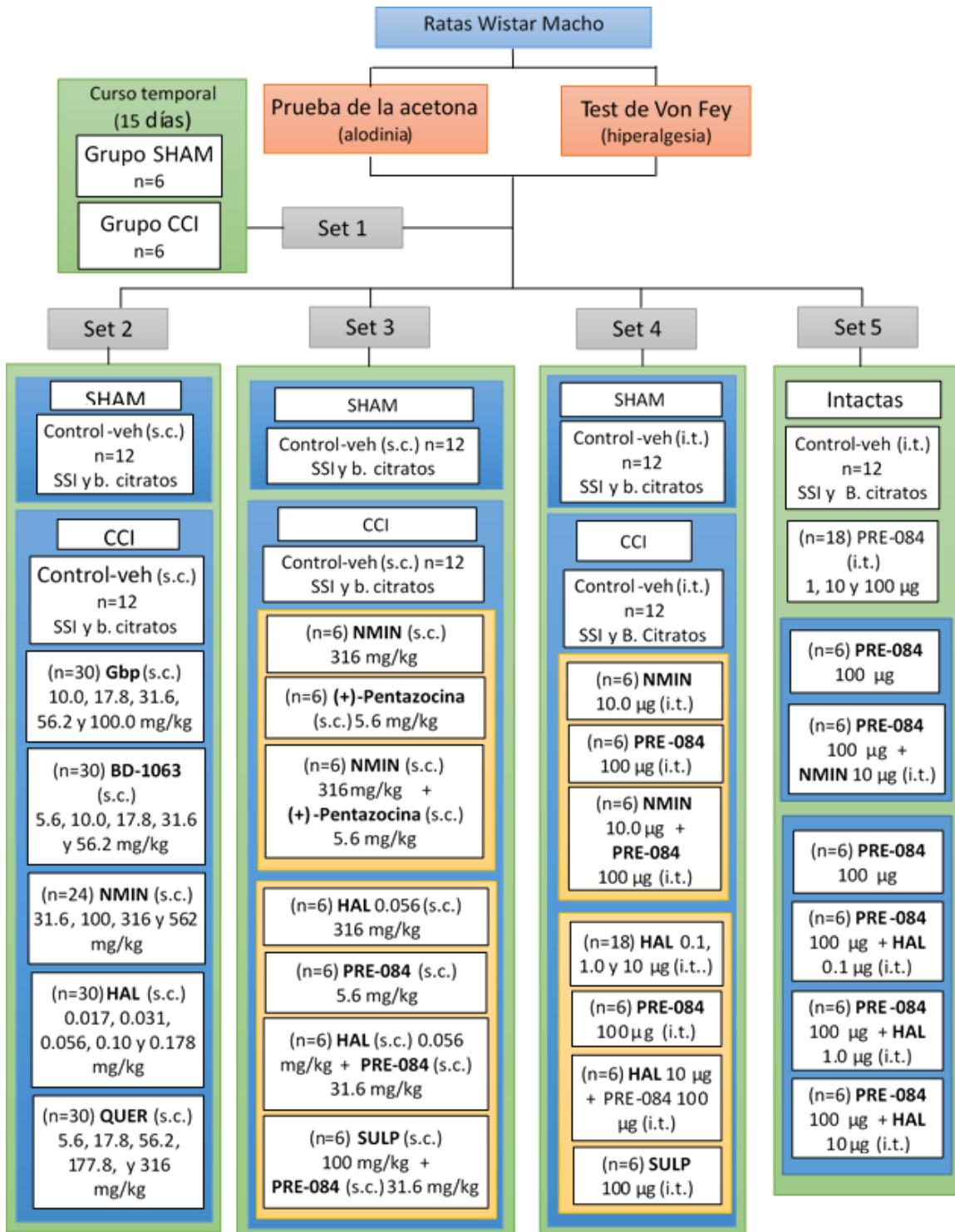
En cuanto a la determinación de los efectos de los fármacos y obtención de las respectivas curva dosis-respuesta, se realizaron las evaluaciones en el día 10 post-cirugía, se registró la respuesta basal y posteriormente fueron administrados los compuestos gabapentina (GBP), BD-1063, NMIN, Haloperidol (HAL) y quercetina (QUER) por vía subcutánea. Las determinaciones se realizaron cada 30 minutos por un periodo de 3 horas para obtener el curso temporal. Se analizaron dosis con incremento logarítmicos. Posteriormente se

calculó el área bajo la curva del curso temporal para obtener el efecto anti-nociceptivo global y construir la curva dosis-respuesta. En el diagrama de la Figura 12 se detalla el rango de dosis empleado para cada compuesto (set 2).

Con el objetivo de determinar el posible mecanismo anti-nociceptivo de HAL y de NMIN, se analizaron sus efectos en coadministración con agonistas  $\sigma_1$ , PRE-084 31.6 mg/kg (con haloperidol 0.056 mg/kg) y (+)-pentazocina 5.6 mg/kg (para NMIN 316 mg/kg) por vía subcutánea, los cuales se administraron 15 minutos antes de HAL o NMIN (Figura 12, set 3).

Con el propósito de determinar el posible papel de HAL y NMIN en la modulación del dolor a nivel de la médula espinal y confirmar su mecanismo de acción, haloperidol y NMIN fueron administrados por vía intratecal, tomando como referencia la metodología descrita por Mestre y colaboradores (Mestre y cols., 1994). Adicionalmente también fueron administrados en presencia de agonistas  $\sigma_1$  (PRE-084, 100  $\mu$ g vía i.t.) (Figura 12, Set 4). Con la finalidad de descartar alguna posible relación del efecto de haloperidol con los receptores dopaminérgicos se administró S-(-)-Sulpirida (SULP) por vía sistémica (100 mg//kg) (Figura 12, set 3) y por vía local en la médula espinal (100  $\mu$ g, vía i.t.) (Figura 12, set 4).

En otro protocolo, con la finalidad de ampliar la evidencia de los mecanismos anti-nociceptivos de NMIN y HAL en esta condición experimental, se emplearon ratas intactas (Naïve); a las cuales se les administró el agonista  $\sigma_1$  (PRE-084) y se registró el efecto hiperalgésico y alodínico de las dosis de 1, 10 y 100  $\mu$ g administrados por vía i.t. Posteriormente, se administró el agonista  $\sigma_1$ , PRE-084, (100  $\mu$ g, i.t) en presencia de NMIN (10  $\mu$ g, i.t.) y HAL (10  $\mu$ g, i.t.), los cuales fueron administrados 15 minutos antes del agonista (Figura 12, set 5)



**Figura 12.** Diagrama de los grupos experimentales empleados para obtener las curvas dosis-respuesta y determinar los mecanismos de acción de NMIN y HAL.

### 5.6.1 Análisis de las asociaciones farmacológicas

Una vez obtenidas las curvas dosis-respuesta de cada fármaco se procedió a la evaluación de las combinaciones. El tipo de interacción entre NMIN y Quercetina se analizó con una única combinación, se analizó por medio de la comparación del efecto obtenido experimentalmente con el esperado. Para la combinación se utilizaron dosis que no excedieran la DE<sub>30</sub>, con la finalidad de poder detectar el tipo de interacción. Por ello se empleó la dosis 100 mg/kg de NMIN y 17.8 mg/kg de QUER.

Para el análisis de la asociación de HAL + QUER y de BD-1063 + QUER, se utilizó el método de superficie de interacción sinérgica (SIS). Se plantearon en total 12 combinaciones para cada asociación, las dosis empleadas se muestran en la Figura 13.

BD-1063 (mg/kg)	Quercetina (mg/kg)	Haloperidol (mg/kg)	Quercetina (mg/kg)
5.6	5.62	0.018	5.62
5.6	17.80	0.018	17.80
5.6	56.20	0.018	56.20
5.6	177.80	0.018	177.80
10	5.62	0.0316	5.62
10	17.80	0.0316	17.80
10	56.20	0.0316	56.20
10	177.80	0.0316	177.80
17.8	5.62	0.0562	5.62
17.8	17.80	0.0562	17.80
17.8	56.20	0.0562	56.20
17.8	177.80	0.0562	177.80

**Figura 13.** Dosis empleadas para la combinación de HAL + QUER y de BD-1063 + QUER.

### 5.7 Evaluación de la coordinación motora

En la valoración de la coordinación motora se utilizó la prueba de rota-rod, siguiendo la metodología descrita por López-Ruvalcaba y Fernández-Guasti (1994). Este método consiste en colocar a los animales en un cilindro rotatorio (7 cm de diámetro) a una velocidad de 11 rpm. Se evaluaron los efectos de NMIN (31.6, 100, 316 y 562 mg/kg, s.c.), BD-1063 (5.6, 10, 17.8 31.6 y 56.2 mg/kg s.c.),

HAL (0.018, 0.032, 0.056 y 0.1 mg/kg, s.c.) y de QUER (5.6, 17.8, 56.2, 177.8 y 316 mg/kg, s.c.) y GBP (31.6, 56.2 y 100 mg/kg). Por otra parte también fueron analizados los efectos en la coordinación motora de la combinación de QUER (17.8 mg/kg, s.c.) + NMIN (100 mg/kg, s.c.) y de una combinación con efecto supra-aditivo de HAL + QUER (0.056 + 177.8 mg/kg, s.c.)

Con la finalidad de determinar si las alteraciones en la coordinación motora modifican la respuesta de retirada de la extremidad durante la evaluación de los fármacos, se decidió analizar el efecto de retirada de la extremidad en ratas intactas con un estímulo que presentara una respuesta similar a la observada en las ratas CCI cuando se estimulan con el filamento de 15 g. Para conocer el estímulo que evoca esta respuesta en las ratas intactas, se realizaron determinaciones con los filamentos de 10, 15, 26, 60, 100 y 180 g. Una vez encontrado el estímulo se evaluó la conducta después de administrar los fármacos GBP (100 mg/kg), NMIN (562 mg/kg, s.c.), HAL (0.1 mg/kg, s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.) y QUER (316 mg/kg).

## **5.8 Análisis estadístico**

Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. El área bajo la curva (ABC) se calculó del respectivo curso-temporal. El ABC de cada dosis se calculó por el método de los trapecoides (Gibaldi, 1991). Para el análisis del efecto anti-nociceptivo de los diferentes puntos del tratamiento experimental se empleó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de doble vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Los análisis de los gráficos de barras del ABC se compararon por una ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey. En todos los análisis estadísticos se consideró al valor de  $p < 0.05$  como diferencia estadísticamente significativa. Los análisis se llevaron a cabo empleando el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos).

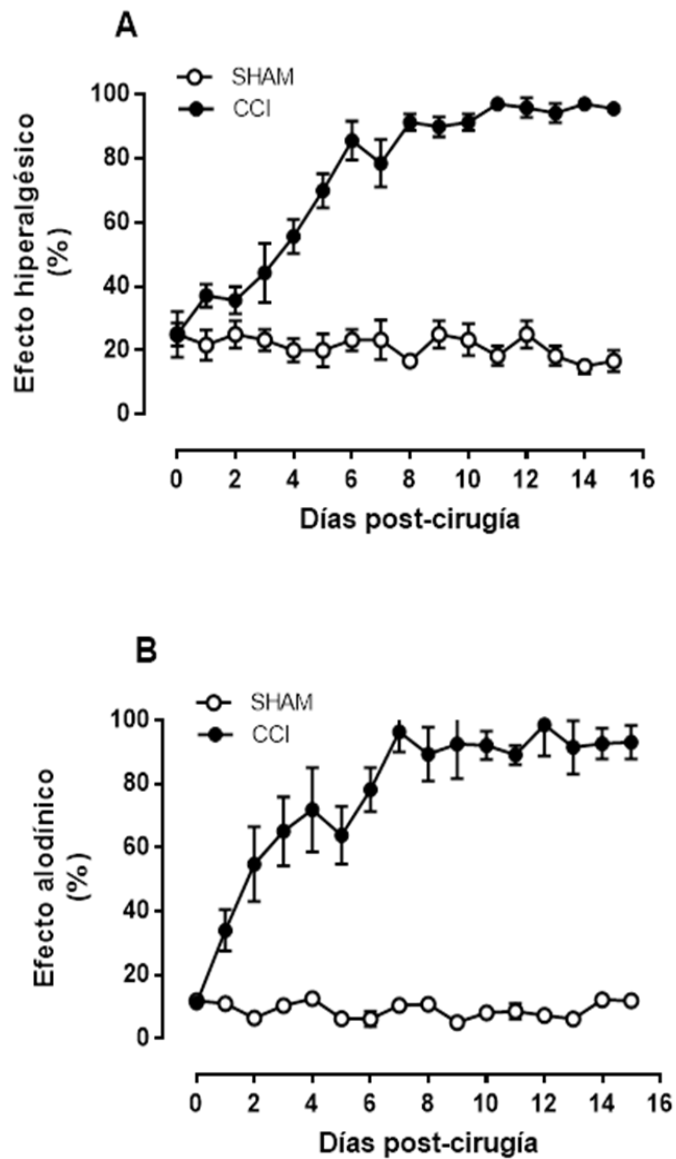
## 6 RESULTADOS

---

Este trabajo se centró en estudiar la participación de un nuevo compuesto con afinidad por receptores  $\sigma_1$  (NMIN) y de Haloperidol en una condición experimental de dolor neuropático, para lo cual BD-1063 fue utilizado como compuesto control de los antagonistas  $\sigma_1$ , y como punto de comparación para el tratamiento farmacológico de esta condición se utilizó GBP. Adicionalmente fue analizado el efecto de quercetina y su combinación con los diferentes antagonistas  $\sigma_1$ , considerando la importancia que tienen los flavonoides en las alteraciones dentro del sistema nervioso y de la utilidad de las asociaciones farmacológicas. A continuación son mostrados los resultados obtenidos.

### 6.1 Desarrollo de alodinia e hiperalgnesia después de la constricción crónica del nervio ciático

La Figura 14, paneles A y B, muestran el desarrollo de las conductas hiperalgésicas y alodínicas después de la ligación del nervio ciático. Se observa un aumento gradual de dichas conductas, este efecto se traduce como presencia de dolor, se puede observar que en el día 6 hay una respuesta máxima en el efecto hiperalgésico ( $85.7 \pm 16.5 \%$ ) y en el día 7 para la alodinia ( $96.4 \pm 15.3 \%$ ), aunado a esto, se observa que las conductas permanecen constantes durante el periodo en que fueron evaluados (15 días) mientras que los animales con la falsa cirugía (SHAM) no presentan las conductas nociceptivas. De acuerdo a estos resultados, se decidió analizar el efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico de los fármacos en el día 10 post-cirugía.

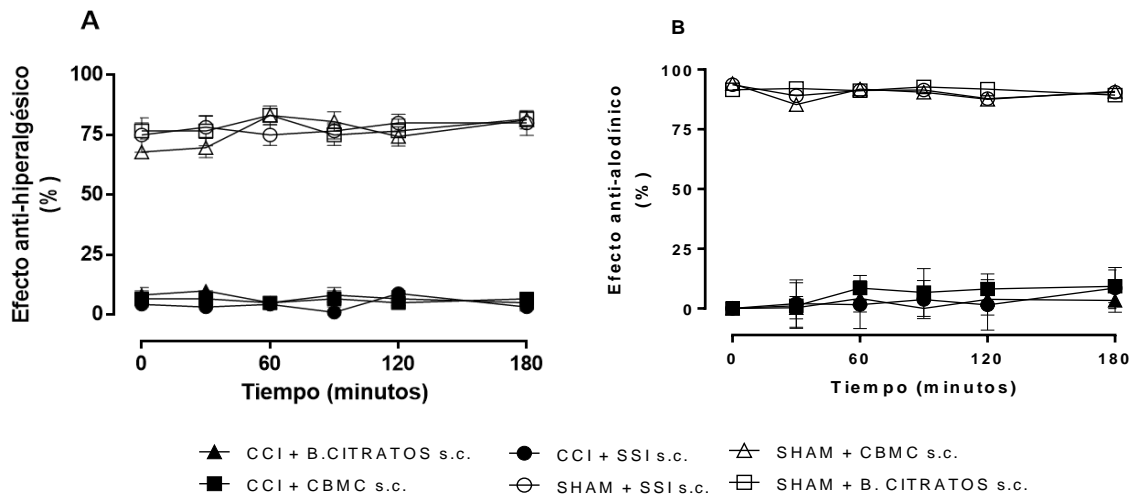


**Figura 14.** Respuesta al filamento de Von-Fey de 15 g (Panel A) y a la prueba de la acetona (panel B) en ratas con la constricción crónica del nervio ciático (CCI) y el grupo SHAM durante los 15 días posteriores a la cirugía. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar  $n=6$  por grupo.

## 6.2 Efecto de los vehículos utilizados

Con la finalidad de descartar algún efecto *per se* de los vehículos utilizados en este trabajo, se determinaron sus efectos en el día 10 post-cirugía. Los resultados se muestran como porcentaje de efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico (Figura 15, panel A y B respectivamente). Se puede observar que para ambas conductas ninguno de los vehículos (solución salina isotónica,

carboximetilcelulosa y buffer de citratos) mostraron algún efecto anti-nociceptivo (círculos rellenos) o pronociceptivo (círculos vacíos), lo que los hace adecuados para este trabajo, adicionalmente se puede notar que no hay diferencias entre ellos, por lo que de aquí en adelante en las gráficas se denotará como vehículo de forma general.



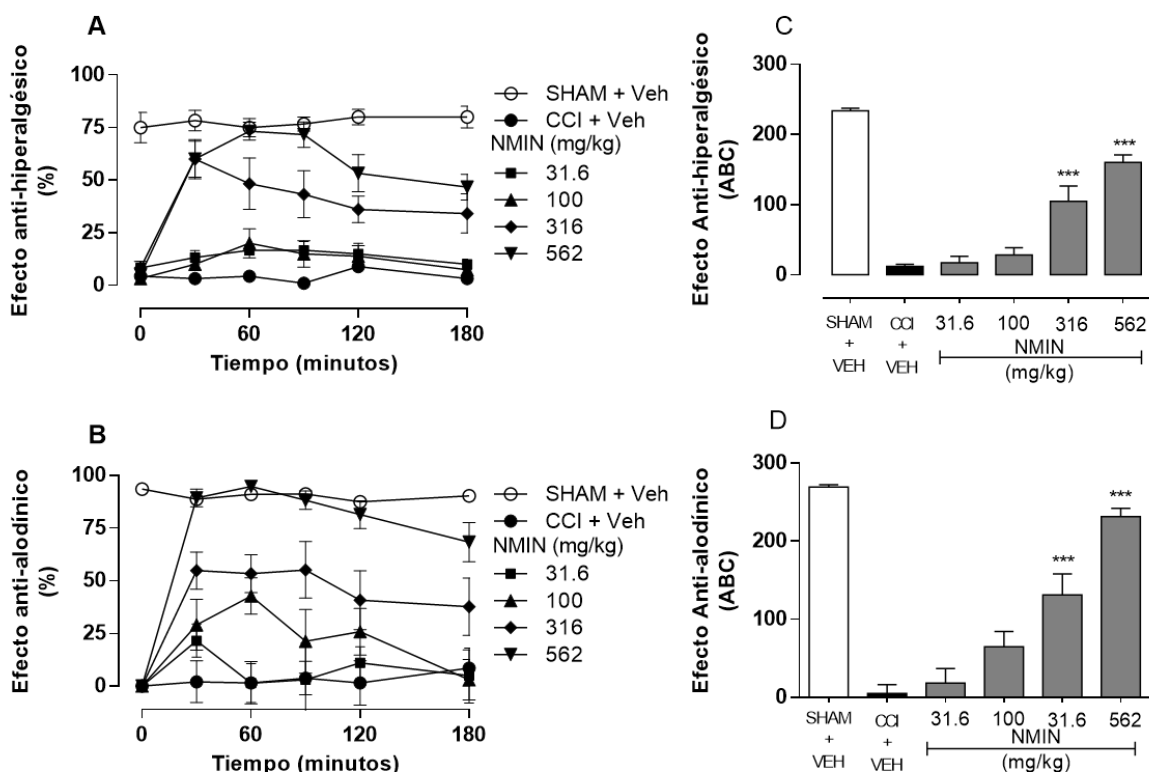
**Figura 15.** Efectos obtenidos por la administración subcutánea de los vehículos solución salina isotónica (SSI), carboximetilcelulosa (CBMC) y buffer de citratos en ratas SHAM (símbolos vacíos) y ratas con la neuropatía (CCI, símbolos rellenos). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.

### 6.3 Análisis del efecto anti-nociceptivo de NMIN

En la Figura 16 se detalla el efecto obtenido por NMIN. En el panel A se muestra el curso temporal del efecto anti-hiperalgésico, se puede observar el mayor efecto con la dosis de 562 mg/kg, notándose el máximo efecto a los 60 minutos post-administración ( $73.3 \pm 4.2\%$ ). En el panel C se muestra el ABC del curso temporal del efecto anti-hiperalgésico. Se puede observar que NMIN presenta un efecto dosis dependiente y tiene un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de la dosis de 316 mg/kg, cuando se compara con el grupo CCI. El máximo efecto de NMIN (expresado como área bajo la curva) fue de  $167.8 \pm 11.2$  u.a. En el panel B se muestra curso-temporal del efecto anti-alodínico de NMIN. Si se analiza el efecto obtenido con la dosis de 562 mg/kg se observa que presenta su máximo efecto a los 30 minutos post-administración, con un porcentaje de efecto de  $94.7 \pm 1.8$ . El ABC del efecto anti-alodínico



correspondiente al curso-temporal de cada dosis se muestra en el panel D. Los resultados muestran un efecto dosis-dependiente, siendo estadísticamente diferentes al del grupo control (CCI) a partir de la dosis de 316 mg/kg. El máximo efecto se observó con la dosis de 562 mg/kg y este fue de  $230 \pm 127$  u.a.

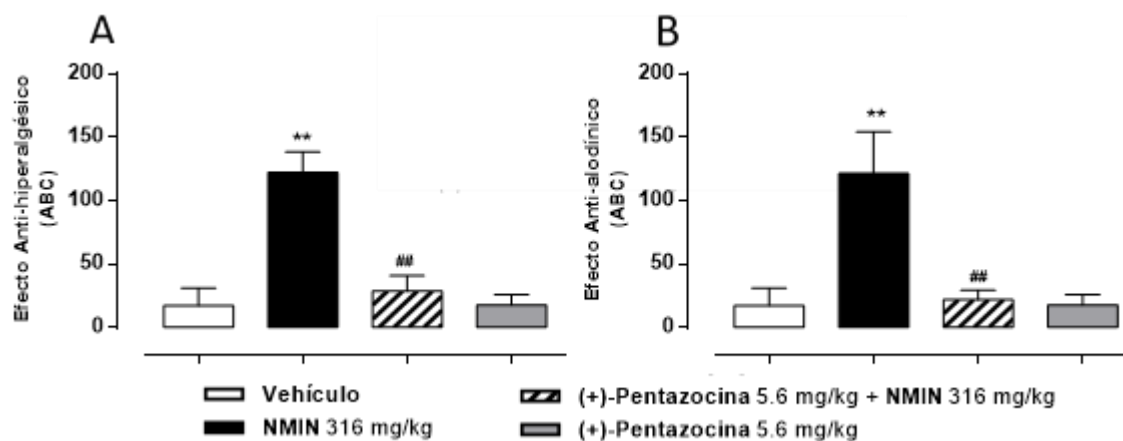


**Figura 16.** Curso temporal del efecto anti-hiperalgésico (panel A) y anti-alodínico (Panel C) de las dosis de 31.6, 100, 316 y 562 mg/kg de NMIN en ratas con constricción crónica del nervio ciático. Los grupos control (SHAM y CCI) recibieron un volumen equivalente de vehículo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media,  $n=6$  por grupo. Panel B y D muestran el área bajo la curva de los efectos anti-hiperalgésicos y anti-alodínicos, respectivamente. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ /grupo. \*\*\*  $p < 0.001$  vs CCI + Veh.

### 6.3.1 Análisis del mecanismo de acción de NMIN

Una vez determinado que NMIN presentaba efectos anti-nociceptivos, la siguiente etapa consistió en determinar si su efecto se debía al antagonismo de los receptores  $\sigma_1$ , para ello se evaluó su efecto en presencia de un agonista  $\sigma_1$  por vía sistémica. En la Figura 17 se muestran los efectos anti-hiperalgésicos (panel A) y anti-alodínicos (panel B) de la administración s.c. de la dosis de 316 mg/kg de NMIN, la dosis más alta empleada en este trabajo (la dosis de 562

mg/kg causó alteración severa en la coordinación motriz) y de NMIN (316 mg/kg) administrado simultáneamente con (+)-pentazocina (5.6 mg/kg), un agonista  $\sigma_1$  selectivo, los datos se muestran como área bajo la curva (ABC). NMIN (316 mg/kg) mostró un efecto anti-hiperalgésico ( $122.1 \pm 16.2$  u.a.) con respecto al vehículo ( $p < 0.01$ ), sin embargo cuando se administró con (+)-pentazocina, el efecto fue de  $28.8 \pm 12.0$  u.a. El área bajo la curva de NMIN (316 mg/kg) obtenida individualmente en el efecto anti-alodínico fue de  $121 \pm 32.8$  u.a. el cual fue reducido a  $21.8 \pm 19.0$  u.a. cuando se empleó la misma dosis de NMIN y (+)-pentazocina (5.6 mg/kg) ( $p < 0.01$ ). La administración del vehículo y (+)-pentazocina individualmente no produjo ningún efecto.

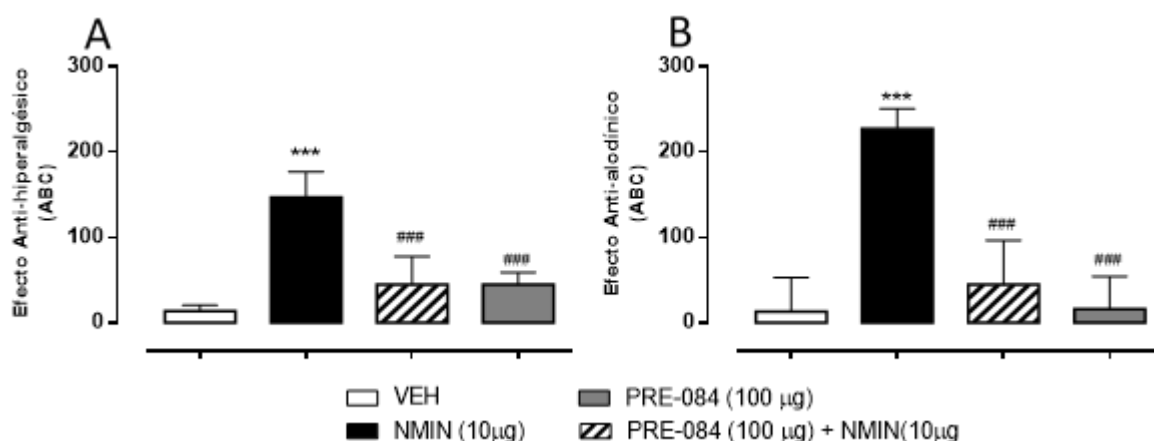


**Figura 17.** Área bajo la curva para los efectos anti-hiperalgésicos (panel A) y antialodínicos (panel B) producidos por el vehículo, NMIN (316 mg/kg, s.c.) y la combinación de NMIN (316 mg/kg, s.c.) con (+)-pentazocina (5.6 mg/kg, s.c.) en ratas con constricción crónica (CCI). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=6$  p/grupo. \*\* $p < 0.01$  vs grupo control, ## $p < 0.01$  vs NMIN 316 mg/kg.

### 6.3.2 Efecto anti-nociceptivo de NMIN por administración intratecal

En otro grupo de animales se analizó la participación de NMIN por vía intratecal. La administración de  $10 \mu\text{g}$  vía i.t. de NMIN en ratas CCI presentó efectos anti-hiperalgésicos ( $146.8 \pm 29.9$  u.a.) (Figura 18, panel A) y anti-alodínicos ( $227.4 \pm 23.5$  u.a.) (Figura 18, panel B). Para demostrar que su efecto se debía al antagonismo de los receptores  $\sigma_1$ , NMIN fue administrado con PRE-

084, un agonista selectivo de estos receptores (Debido a que no contamos con la cantidad suficiente de (+)-pentazocina y a la dificultad para su obtención, para este set de experimentos, se decidió utilizar PRE-084, un agonista sigma-1 selectivo al igual que el anterior). El efecto anti-hiperalgésico global de la coadministración de NMIN (10  $\mu$ g, i.t.) + PRE-084 (100  $\mu$ g, i.t.) fue de  $55.8 \pm 12.3$  u.a. y anti-alodínico de  $44.9 \pm 29.9$  u.a., lo que reafirma la modulación del dolor a nivel espinal como antagonista de los receptores  $\sigma_1$  por parte de NMIN.



**Figura 18.** Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico (Panel A) y anti-alodínico (panel B) producido por el grupo control, NMIN (10  $\mu$ g), PRE-084 (100  $\mu$ g) y NMIN (10  $\mu$ g) + PRE-084 (100  $\mu$ g). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo y ### $p < 0.0001$  vs NMIN (10  $\mu$ g).

#### 6.4 Efecto en la nocicepción de PRE-084 y NMIN en ratas intactas

Con la finalidad de reforzar las evidencias obtenidas hasta este momento en cuanto a la acción de NMIN como antagonista  $\sigma_1$ , se evaluó su comportamiento cuando se administra en presencia de PRE-084, un agonista  $\sigma_1$ , en ratas intactas. Para ello, primero fue determinado el efecto pronociceptivo de PRE-084. Los resultados de esta determinación experimental demostraron un efecto dependiente de la cantidad administrada, obteniendo el mayor efecto con la administración de 100  $\mu$ g, con un valor de  $166.1 \pm 11.7$  u.a. para la hiperalgesia el cual fue mayor que el grupo control ( $p < 0.001$ ) (Figura 19, panel A). A pesar de observar la conducta nociceptiva con el agonista, si se compara con el nivel de

respuesta causado por la constricción crónica del nervio ciático ( $286 \pm 24.1$  u.a.), el efecto del primero es menor; sin embargo, estos resultados fueron importantes ya que con ello fue posible determinar el efecto de NMIN bajo estas condiciones experimentales. La misma tendencia se observó en la evaluación de alodinia; el agonista  $\sigma_1$  (PRE-084) mostró un efecto de  $180.7 \pm 24.1$  u.a. que comparada con el grupo CCI ( $284.2 \pm 41.0$ ) presenta una menor respuesta (Figura 19, panel B).

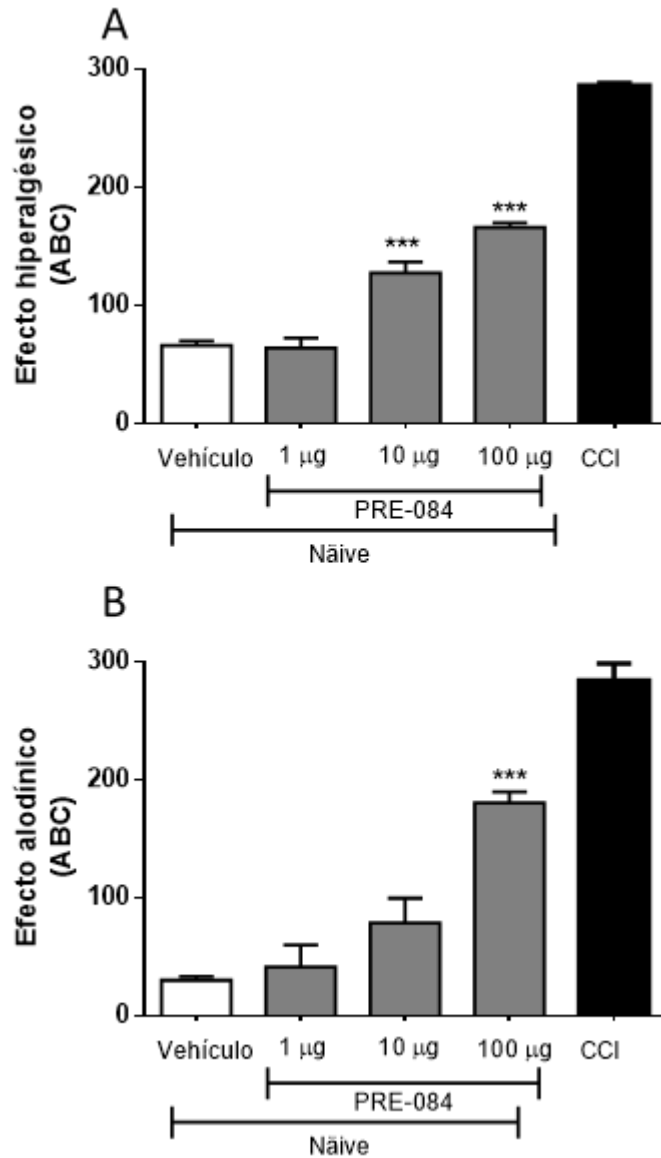
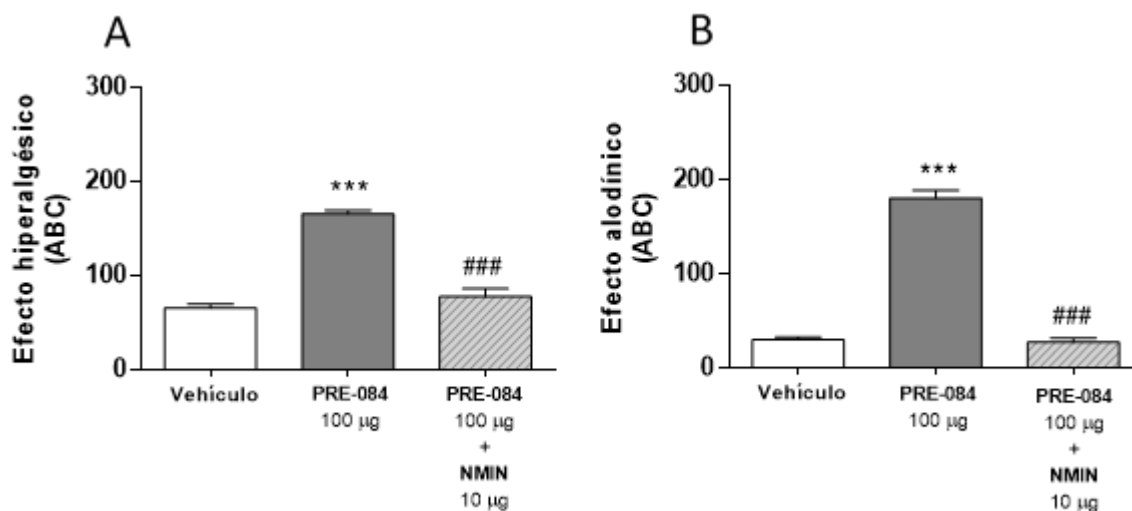


Figura 19. Área bajo la curva para la hiperalgesia producida por el vehículo (grupo control), PRE-084 (1, 10 y 100 µg, i.t.) en ratas intactas (Naïve) y la hiperalgesia producida por el grupo con la constricción crónica del nervio ciático (CCI) (Panel A). Área bajo la curva para la alodinia producida por el vehículo (grupo control), PRE-084 (1, 10 y 100 µg, i.t.) en ratas intactas (Naïve) y la alodinia que presenta el grupo con la constricción crónica del nervio ciático (CCI) (Panel B). Los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$  vs vehículo)..

Una vez determinado el efecto pronociceptivo del compuesto PRE-084 en ratas intactas, se procedió a determinar si NMIN era capaz de evitarlo. Para esto se administró PRE-084 (100 µg) y 15 minutos después NMIN 10 µg). Los resultados son mostrados en la figura 20, paneles A y B. Se muestra que el efecto de la coadministración fueron menores ( $p < 0.001$ ), tanto para hiperalgesia ( $78.2 \pm 21.1$  u.a.) como para alodinia ( $27.7 \pm 11.3$  u.a.).

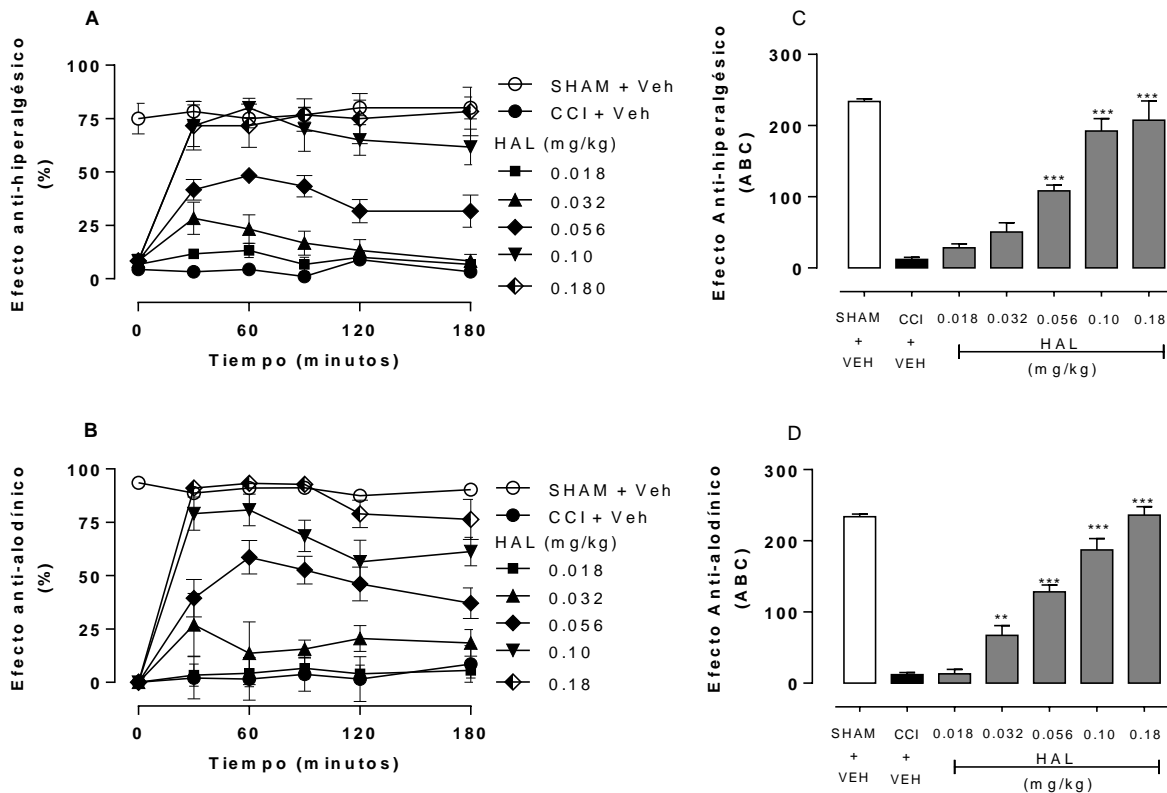


**Figura 20.** Respuesta hiperalgésica (panel A) y alodínica (panel B) generada por el vehículo, el agonista sigma-1 PRE-084 (100 µg) y de PRE-084 (100 µg) + NMIN (10 µg). Los datos se expresan como área bajo la curva y cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo, ### $p < 0.001$  vs PRE-084 (100 µg).

## 6.5 Análisis del efecto anti-nociceptivo de haloperidol

En la Figura 21 se detalla el efecto obtenido por haloperidol. En el panel A se muestra el curso temporal del efecto anti-hiperalgésico, se puede observar un efecto mayor con la dosis de 0.18 mg/kg, y se puede decir que prácticamente logra su máximo efecto desde los 30 minutos post-administración ( $71.7 \pm 11.3$  %). En el panel C se muestran el ABC del curso temporal del efecto anti-hiperalgésico. Se puede observar que HAL presenta un efecto dependiente de la dosis con un efecto mayor que el vehículo ( $p < 0.05$ ) a partir de la dosis de 0.056 mg/kg. El máximo efecto anti-hiperalgésico de HAL (expresado como área bajo la curva) fue de  $207.5 \pm 27.1$  u.a. En el panel B se muestra el curso-temporal del efecto anti-alodínico de HAL, si se observa el efecto obtenido con la dosis de 0.18

mg/kg, presenta su máximo efecto a los 30 minutos post-administración, con un porcentaje de efecto de  $91.1 \pm 2.3\%$ . El ABC del efecto anti-alodínico correspondiente al curso-temporal de cada dosis se muestra en el panel D. Los resultados muestran un efecto dosis-dependiente, siendo estadísticamente diferentes al del grupo control (CCI) a partir de la dosis de 0.032 mg/kg. El máximo efecto se observó con la dosis de 0.18 mg/kg y este fue de  $236.1 \pm 1.9$  u.a.

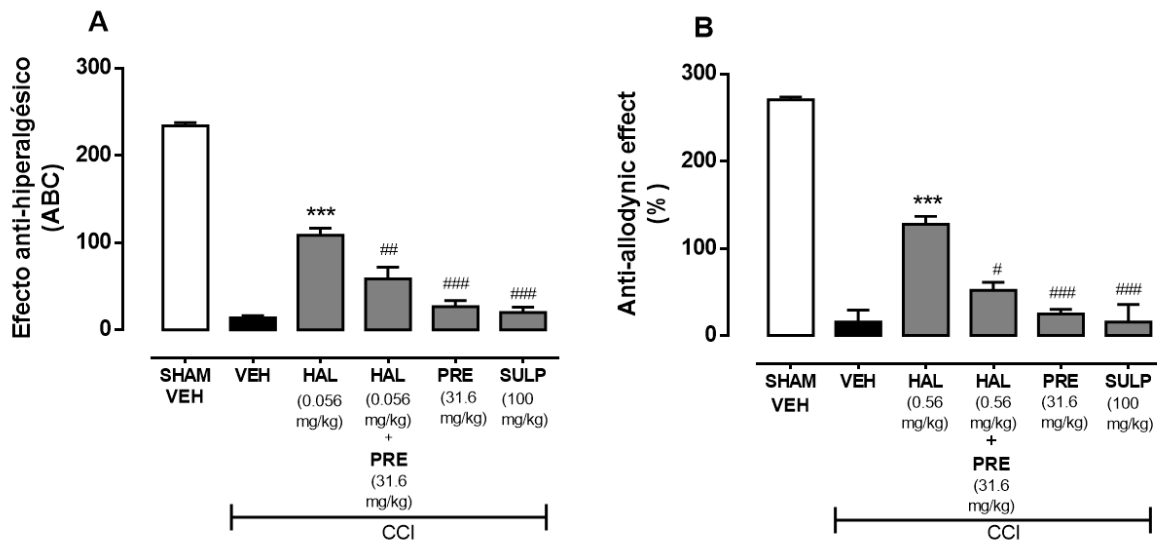


**Figura 21.** Curso temporal del efecto anti-hiperalgésico (panel A) y anti-alodínico (Panel C) de las dosis de 0.018, 0.032, 0.056, 0.1 y 0.18 mg/kg de haloperidol (HAL) en ratas con constricción crónica del nervio ciático. Los grupos control (SHAM y CCI) recibieron un volumen equivalente de vehículo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media,  $n=6$  por grupo. Panel B y D muestran el área bajo la curva de los efectos anti-hiperalgésicos y anti-alodínicos, respectivamente. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  p/grupo. \*\* $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  vs CCI + VEH.

### 6.5.1 Análisis del mecanismo anti-nociceptivo de haloperidol

Para determinar si los efectos anti-hiperalgésicos y anti-alodínicos de HAL se deben a su actividad como antagonista del receptor  $\sigma_1$  se evaluó su efecto en presencia de un agonista  $\sigma_1$  (PRE-084) por vía sistémica. En la Figura 22 se

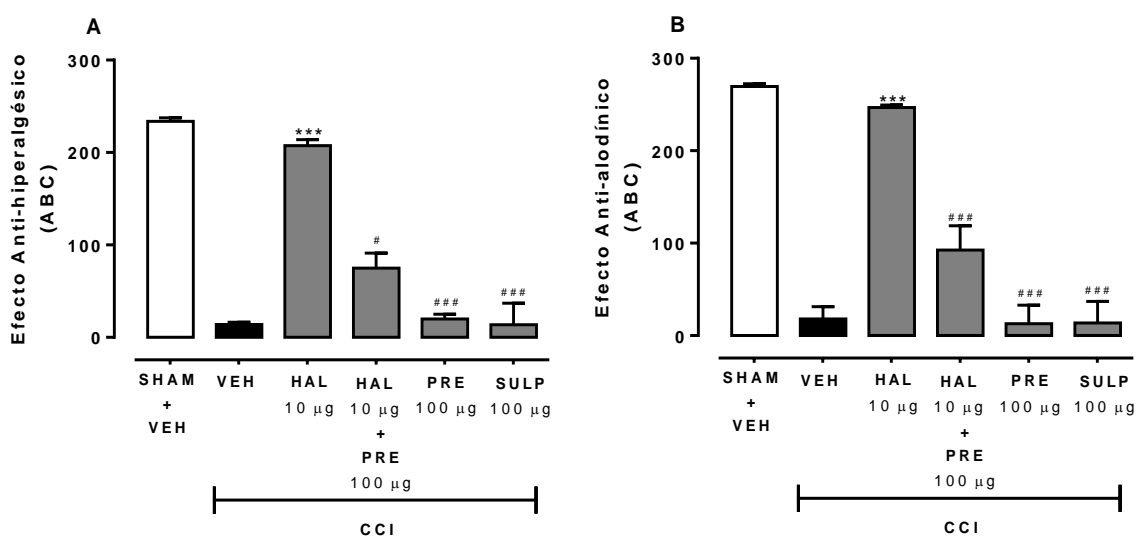
muestran los efectos anti-hiperalgésicos (panel A) y anti-alodínicos (panel B) de la administración s.c. de la dosis de 0.056 mg/kg de HAL y de HAL (0.056 mg/kg) + PRE-084 (31.6 mg/kg), un agonista  $\sigma_1$  selectivo. Los datos se muestran como ABC. HAL (0.056 mg/kg) mostró un efecto anti-hiperalgésico ( $108.3 \pm 8.2$  u.a.) con respecto al vehículo ( $p < 0.01$ ), sin embargo cuando se administró con PRE-084, el efecto fue de  $58.3 \pm 10.4$  u.a. El área bajo la curva de HAL (0.056 mg/kg) obtenido individualmente en el efecto anti-alodínico fue de  $128 \pm 9.8$  u.a. el cual fue reducido a  $53.7 \pm 3.8$  u.a. cuando se utilizó la misma dosis de HAL y PRE-084 (31.6 mg/kg) ( $p < 0.01$ ). La administración del vehículo y (+)-PRE-084 individualmente no produjo ningún efecto. Por otra parte, es conocido que HAL presenta una alta afinidad por los receptores dopaminérgicos, es por ello que se evaluó el efecto de S-(-)-sulpirida (SULP), un fármaco antagonista de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  y  $D_3$  y con ello poder determinar si los efectos de HAL se pudieran deber también a su actividad antagonista en estos receptores. El resultado demostró SULP no muestra ninguna actividad antinociceptiva (anti-hiperalgésica o anti-alodínica), con lo que se puede suponer que en los efectos anti-nociceptivos de haloperidol no interviene su actividad dopaminérgica (Figura 22, panel A y B).



**Figura 22.** Área bajo la cura para los efectos anti-hiperalgésicos (panel A) y antialodínicos (panel B) producidos por el vehículo, HAL (0.056 mg/kg, s.c.), PRE-084 (31.6 mg/kg), la combinación de HAL (0.056 mg/kg, s.c.) con PRE-084 (31.6 mg/kg, s.c.) y S-(-)-Sulpirida (100 mg/kg) en ratas con constricción crónica (CCI). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=6$  p/grupo. \*\*\* $p < 0.01$  vs VEH, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs HAL 0.056 mg/kg.

### 6.5.2 Efecto anti-nociceptivo de haloperidol por administración intratecal

En el análisis de los efectos de HAL (10  $\mu\text{g}$ , i.t.) administrado por vía intratecal, se observó que en ratas CCI presentó efectos anti-hiperalgésicos ( $207.7 \pm 6.4$  u.a) (Figura 23, panel A) y anti-alodínicos ( $247.7 \pm 2.7$  u.a.) (Figura 23, panel B). Para demostrar que su efecto se debía al antagonismo de los receptores  $\sigma_1$ , HAL fue administrado con PRE-084, un agonista selectivo de estos receptores. El efecto anti-hiperalgésico global de la coadministración de HAL (10  $\mu\text{g}$ , i.t.) + PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ , i.t.) fue de  $75.0 \pm 14.6$  u.a. y anti-alodínico de  $92.4 \pm 26.3$  u.a. Lo que reafirma la modulación del dolor a nivel espinal como antagonista de los receptores  $\sigma_1$  por parte de HAL.



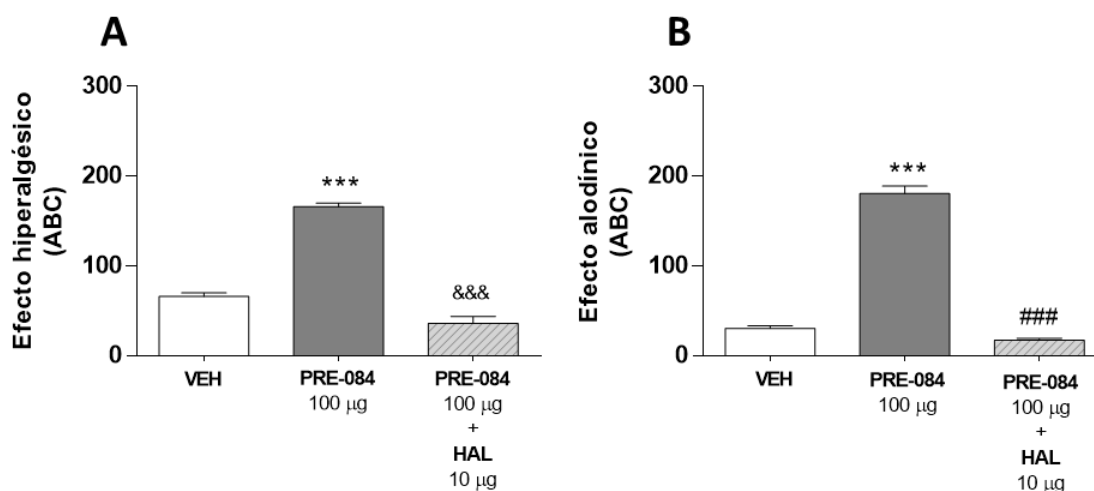
**Figura 23.** Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico (Panel A) y anti-alodínico (panel B) producido por los grupos controles (SHAM + VEH y CCI + VEH), HAL (10  $\mu\text{g}$ ), PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ), HAL (10  $\mu\text{g}$ ) + PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ) y S-(-)-Sulpiridasigma (SULP 100  $\mu\text{g}$ ) administrados por vía intratecal. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo y ### $p < 0.0001$  vs HAL (10  $\mu\text{g}$ ).

### 6.5.3 Efecto de haloperidol en la nocicepción generada por el agonista $\sigma_1$ en ratas intactas

Con la finalidad de consolidar las evidencias obtenidas hasta este momento en cuanto a la acción de HAL como antagonista  $\sigma_1$  en la modulación del dolor



neuropático, se evaluó su efecto en ratas intactas cuando se administra en presencia de PRE-084. PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ) generó una respuesta hiperalgésica de  $166.1 \pm 11.7$  u.a. la cuál fue menor cuando se administró con HAL (36.25  $\pm$  7.0 u.a.) (Figura 24, panel A). Al analizar el efecto alodínico, la respuesta fue similar. PRE-084 generó una respuesta de  $180.7 \pm 24.1$  u.a. y en presencia de HAL la respuesta obtenida fue de  $17.4 \pm 5.1$  u.a (Figura 24, panel B).



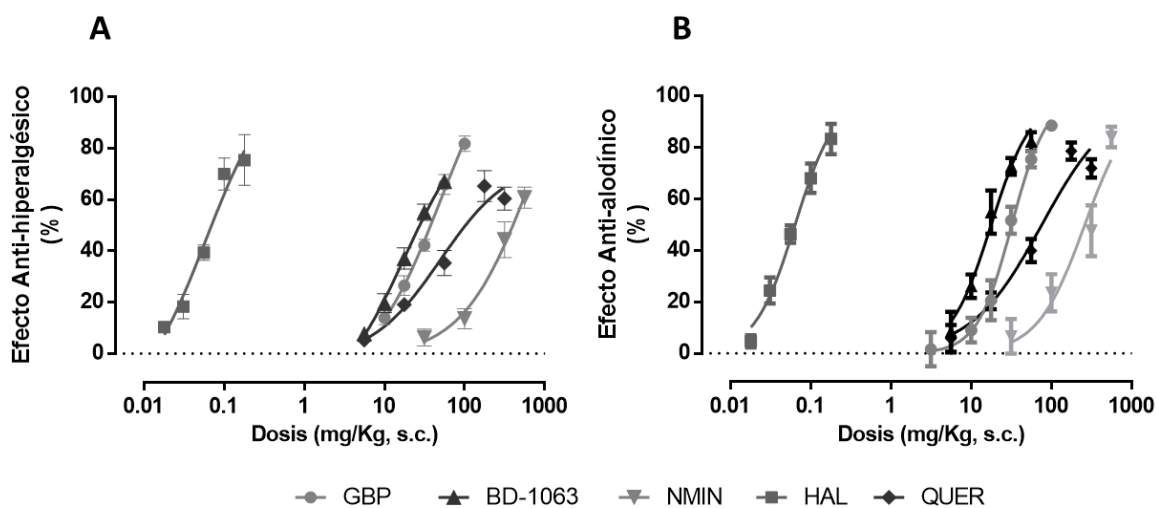
**Figura 24.** Respuesta hiperalgésica (panel A) y alodínica (panel B) generada por el vehículo, el agonista  $\sigma_1$  PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ) y PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ) + HAL (10  $\mu\text{g}$ ) administrados por vía intratecal. Los datos se expresan como área bajo la curva y cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$  vs vehículo, &&& $p<0.001$  vs PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ).

## 6.6 Comparación de los efectos anti-hiperalgésicos de NMIN, haloperidol y quercetina con un fármaco de referencia para el tratamiento del dolor neuropático.

Se puede observar que NMIN, BD-1063, HAL, QUER y GBP incrementaron su efecto anti-hiperalgésico al aumentar la dosis administrada (Figura 25, panel A), analizando la eficacia anti-hiperalgésica mostrada por cada fármaco en esta condición experimental, se observó que BD-1063, NMIN y QUER presentaron una menor eficacia al compararla con GBP ( $p<0.05$ ), mientras que HAL presentó la misma eficacia que el fármaco de referencia GBP. La dosis

efectiva media ( $DE_{50}$ ) para haloperidol fue de 0.07 mg/kg, de GBP 37.5 mg/kg, de BD-1063 30.9 mg/kg de QUER 116 mg/kg y para NMIN de 411 mg/kg. Tomando en cuenta esto, se puede decir de los fármacos antagonistas del receptor  $\sigma_1$ , que HAL es el fármaco más potente y NMIN el que requiere de mayor cantidad de fármaco para lograr el mismo nivel de efecto. Si se comparan con GBP, HAL es más potente, BD-1063 es equipotente, mientras que NMIN y QUER son menos potentes que GBP.

Al examinar el efecto anti-alodínico, es posible observar un efecto dependiente de la dosis con cada fármaco empleado, aquí se puede determinar que todos los fármacos presentan la misma eficacia y el orden de potencia al considerar las  $DE_{50}$  de cada compuesto es muy similar al observado en el efecto anti-hiperalgésico (Figura 25, panel B).

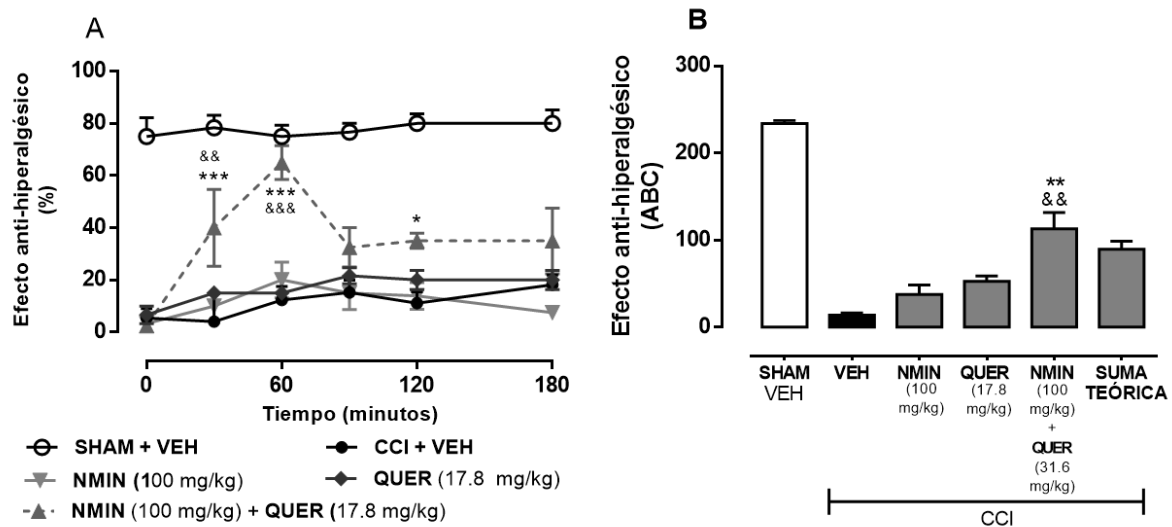


**Figura 25.** Curva dosis-respuesta para el efecto anti-hiperalgésico (panel A) y anti-alodínico (panel B) de BD-1063 (5.6, 10, 17.8, 31.6 y 56.2 mg/kg, s.c.), haloperidol (HAL) (0.018, 0.032, 0.056, 0.1 y 0.18 mg/kg, s.c.), NMIN (31.6, 100, 316 y 562 mg/kg, s.c.), Quercetina (QUER) y gabapentina (GBP) (10, 17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg, s.c.) en ratas con constricción crónica del nervio ciático. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo.

## 6.7 Efecto de la combinación de NMIN con Quercetina

Se realizó una combinación de NMIN con QUER, la dosis elegida de cada fármaco para la combinación fue la de 100 mg/kg de NMIN con 17.8 mg/kg de QUER, considerando que ninguna de ellas era mayor a la  $DE_{30}$ , esto con la

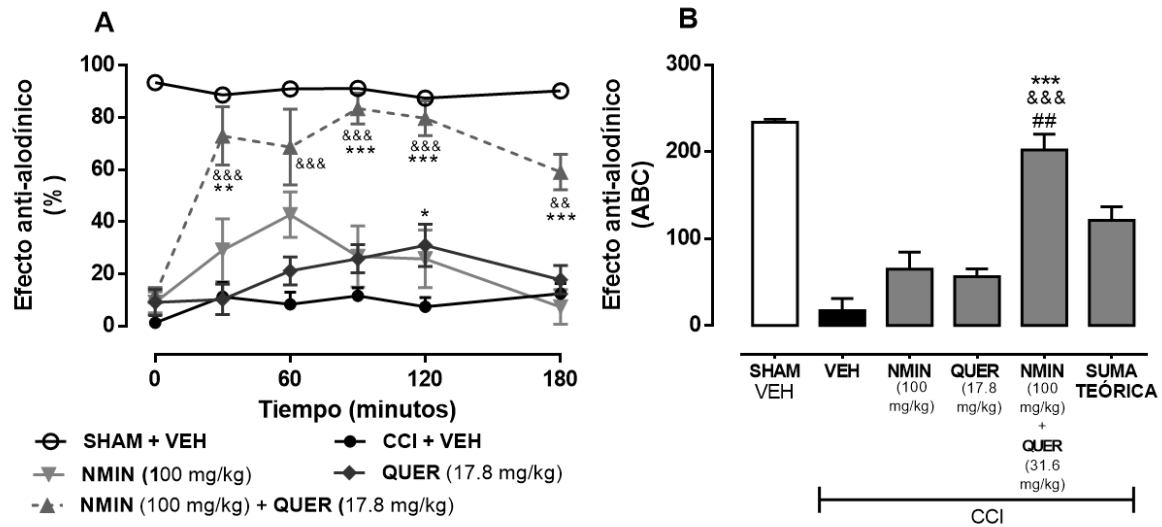
finalidad de determinar el tipo de interacción. En el curso temporal del efecto anti-hiperalgésico se puede observar un mayor efecto con respecto a las administraciones individuales de cada fármaco a los 30 y 60 minutos posterior a la administración, después de ello su efecto decae siendo diferente a los 120 minutos ( $p < 0.05$ ) únicamente con respecto a NMIN (Figura 26, panel A), al analizar el área bajo la curva se puede observar que la combinación resulta mayor que los efectos de NMIN y QUER, sin embargo no es diferente de la suma teórica, esto permite deducir que la combinación específica de NMIN (100 mg/kg) y QUER (17.8 mg/kg) genera un efecto aditivo (Figura 26, panel B).



**Figura 26.** Curso temporal (panel A) del efecto anti-hiperalgésico de NMIN (100 mg/kg, s.c.), QUER (17.8 mg/kg, s.c.) y la combinación de NMIN (100 mg/kg, s.c.) + QUER (17.8 mg/kg, s.c.). Los grupos controles (SHAM y CCI) fueron tratados con un volumen equivalente de vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs NMIN (100 mg/kg), && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.01$  vs QUER (17.8 mg/kg).  $n = 6$  por grupo. Área bajo la curva (panel B) del efecto anti-hiperalgésico generado por los grupos control (SHAM y CCI), NMIN (100 mg/kg, s.c.), QUER (17.8 mg/kg, s.c.), y la combinación de NMIN (100 mg/kg, s.c.) + QUER (17.8 mg/kg, s.c.). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n = 6$  por grupo. \*\* $p < 0.01$  vs NMIN (100 mg/kg), && $p < 0.01$  vs QUER (17.8 mg/kg).

Con respecto a los efectos anti-alodínicos, el curso-temporal muestra un efecto mayor de la combinación con respecto a NMIN y QUER a los 30, 90, 120 y 180 minutos post-administración, a los 30 minutos únicamente se observa una diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) cuando se compara con QUER (Figura 27, panel A). El área bajo la curva obtenida del curso-temporal muestra que la combinación genera un efecto anti-alodínico mayor que la de los efectos individuales de cada fármaco ( $p < 0.001$ ) y que la suma teórica ( $p < 0.01$ ), por lo que esta combinación

específica de NMIN y QUER genera un efecto anti-alodínico supra-aditivo (Figura, 27 panel B).



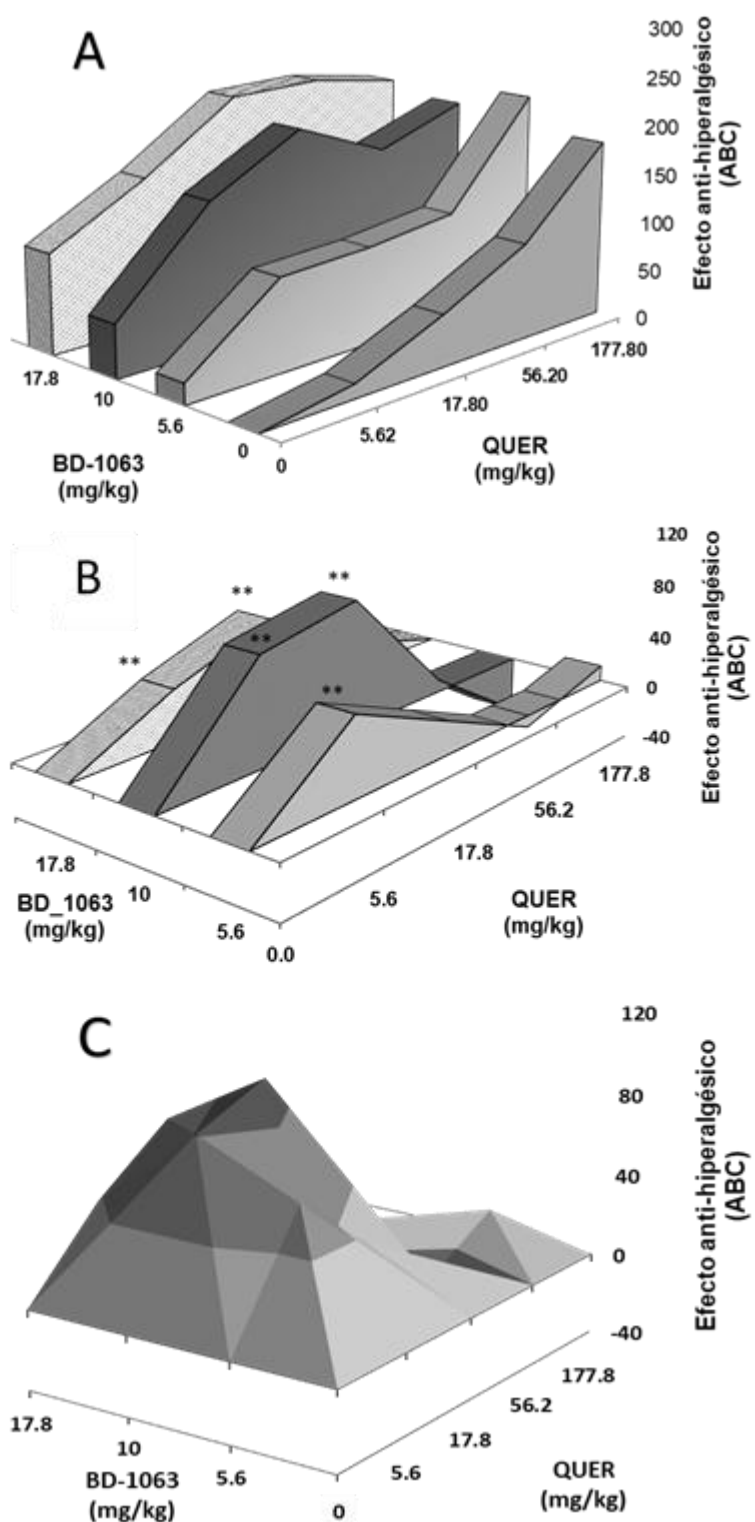
**Figura 27.** Curso temporal (panel A) del efecto anti-alodínico de NMIN (100 mg/kg, s.c.), QUER (17.8 mg/kg, s.c.) y la combinación de NMIN (100 mg/kg, s.c.) + QUER (17.8 mg/kg, s.c.). Los grupos controles (SHAM y CCI) fueron tratado con un volumen equivalente de vehículo. Los datos represental la media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  vs QUER (17.8 mg/kg), && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$  vs NMIN (100 mg/kg)  $n = 6$  por grupo. Área bajo la curva (panel B) del efecto anti-alodínico generado por los grupos control (SHAM y CCI), NMIN (100 mg/kg, s.c.), QUER (17.8 mg/kg, s.c.), y la combinación de NMIN (100 mg/kg, s.c.) + QUER (17.8 mg/kg, s.c.). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n = 6$  por grupo. &&& $p < 0.001$  vs QUER (17.8 mg/kg), \*\*\* $p < 0.001$  vs NMIN (100 mg/kg), ### $p < 0.001$  vs SUMA TEÓRICA.

## 6.8 Asociación de BD-1063 con Quercetina

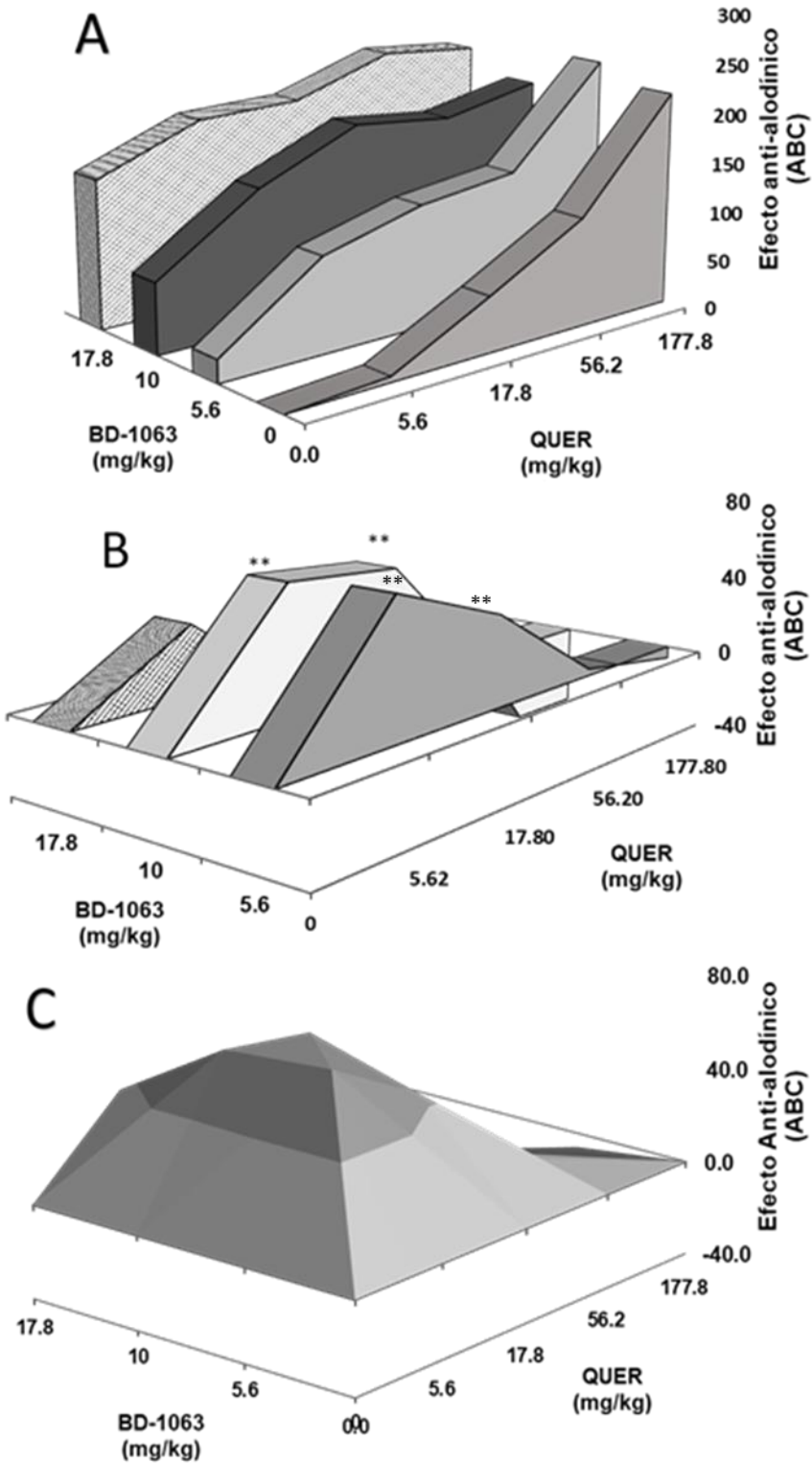
El análisis de la combinación de BD-1063 con QUER se realizó por medio de la superficie de interacción sinérgica (SIS), para ello en el eje “x” se construye la curva dosis-respuesta de BD-1063 de forma individual y en el “z” la curva dosis respuesta de QUER, cada punto intermedio representa una combinación específica que corresponde a las dosis indicadas en cada intersección. El eje “y” muestra los efectos expresados como ABC del efecto anti-hiperalgésico (Figura 28 panel A). En este gráfico podemos observar que algunas combinaciones alcanzan efectos más grandes que los efectos de los fármacos cuando se administran individualmente o similares a las dosis más grandes de cada fármaco, un ejemplo de ello es la combinación de BD-1063 (10 mg/kg, s.c.) + QUER (17.8 mg/kg, s.c.) En el panel B de la Figura 28 se muestra la resta de los

efectos individuales a cada una de las combinaciones, con lo que se obtiene el gráfico que se muestra, esto permite detectar aquellas combinaciones que resultan en un efecto supra-aditivo, cuando los efectos están por arriba del eje horizontal, si los datos se encuentran por debajo del mismo eje, se considera como un efecto infra-aditivo y si el resultado se encuentra sobre el eje, el efecto es de aditividad. De acuerdo a esto es posible detectar 5 combinaciones que resultaron en un efecto supra-aditivo o de potenciación (combinaciones marcadas con asteriscos) y el resto al no mostrar diferencias estadísticas se consideran como efectos aditivos (o suma). La Figura 29, panel C, muestra el gráfico de la superficie de interacción sinérgica de la combinación de BD-1063 y QUER en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. Este gráfico indica el grado de potenciación con las diferentes proporciones de combinación, aquellas en color más oscuro muestran las combinaciones con mayor efecto de supra-aditividad.

La Figura 29, panel A muestra las curvas dosis-respuestas del efecto anti-alodínico de QUER y BD-1063 así como de las combinaciones entre ellos. De igual forma es posible detectar combinaciones con una eficacia similar a la de los fármacos administrados individualmente. En el panel B de la Figura 29, se muestra la resta de los efectos individuales a cada una de las combinaciones, con lo que se obtiene el gráfico que se muestra, esto permite detectar aquellas combinaciones que resultan en un efecto supra-aditivo, infra-aditivo y de suma. En ese sentido, es posible detectar 4 combinaciones que resultaron en un efecto de supra-aditividad (combinaciones marcadas con asteriscos). El resto se considera como efectos suma. El panel C muestra el gráfico de la superficie de interacción sinérgica correspondiente al efecto anti-alodínico de la combinación de BD-1063 y QUER en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. Este gráfico indica el grado de potenciación con las diferentes proporciones de combinación, aquellas en color más oscuro muestran las combinaciones con mayor efecto de supra-aditividad.

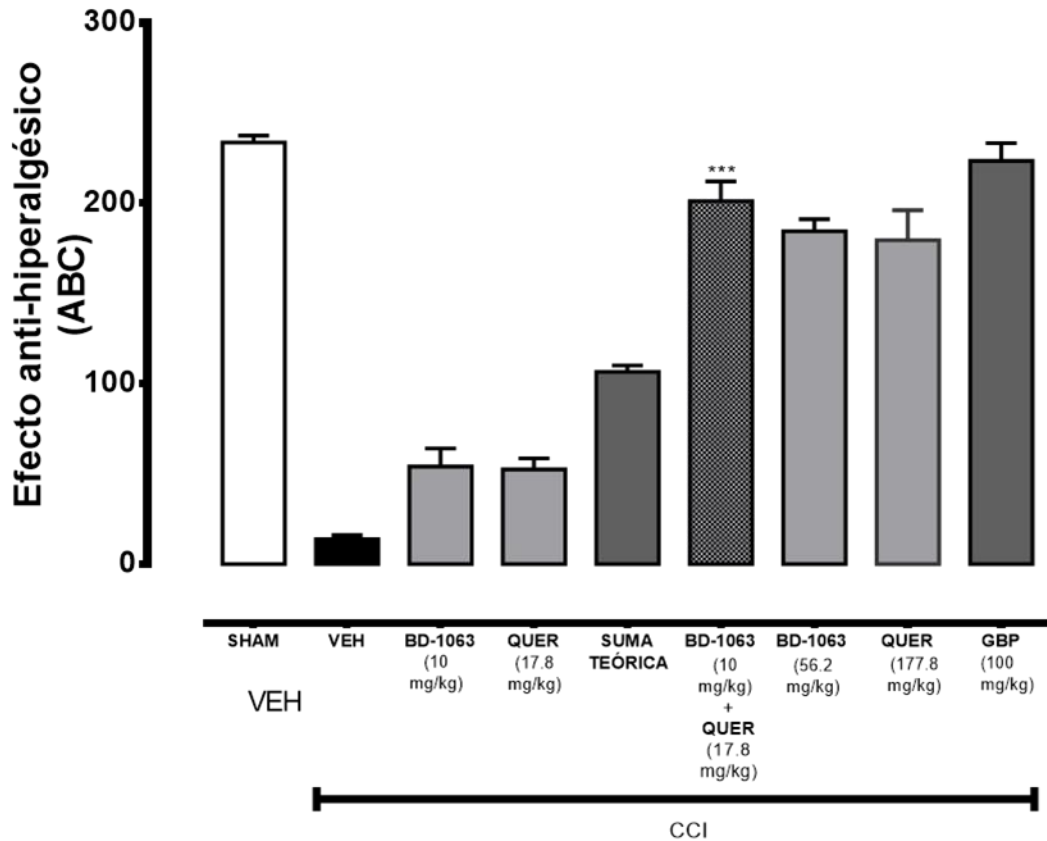


**Figura 28** (Panel A) Efecto anti-hiperalgésico producido por BD-1063 (5.6- 17.8 mg/kg) y QUER (5.6-177.8 mg/kg) administrados de manera individual o en combinación. Cada punto representa el promedio de seis animales. (Panel B) Resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones, cada punto está representado por el promedio, n=6 por grupo; \*\*p<0.05 vs efecto esperado. (Panel C). Superficie de interacción sinérgica del efecto anti-hiperalgésico producido por las diferentes combinaciones de BD-1063 + QUER, construida después de restar al efecto de la combinación los efectos individuales producidos por cada fármaco. Las barras del E.E.M. se omiten para mayor claridad de la gráfica.



**Figura 29.** (Panel A) Efecto anti-alodínico producido por BD-1063 (5.6- 17.8 mg/kg) y QUER (5.6-177.8 mg/kg) administrados de manera individual o en combinación. Cada punto representa el promedio de seis animales. (Panel B) Resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones, cada punto está representado por el promedio, n=6 por grupo; \*\*p<0.01 vs efecto esperado. (Panel C). Superficie de interacción sinérgica del efecto anti-alodínico producido por las diferentes combinaciones de BD-1063 + QUER, construida después de restar al efecto de la combinación los efectos individuales producidos por cada fármaco. Las barras del E.E.M. se omiten para mayor claridad de la gráfica.

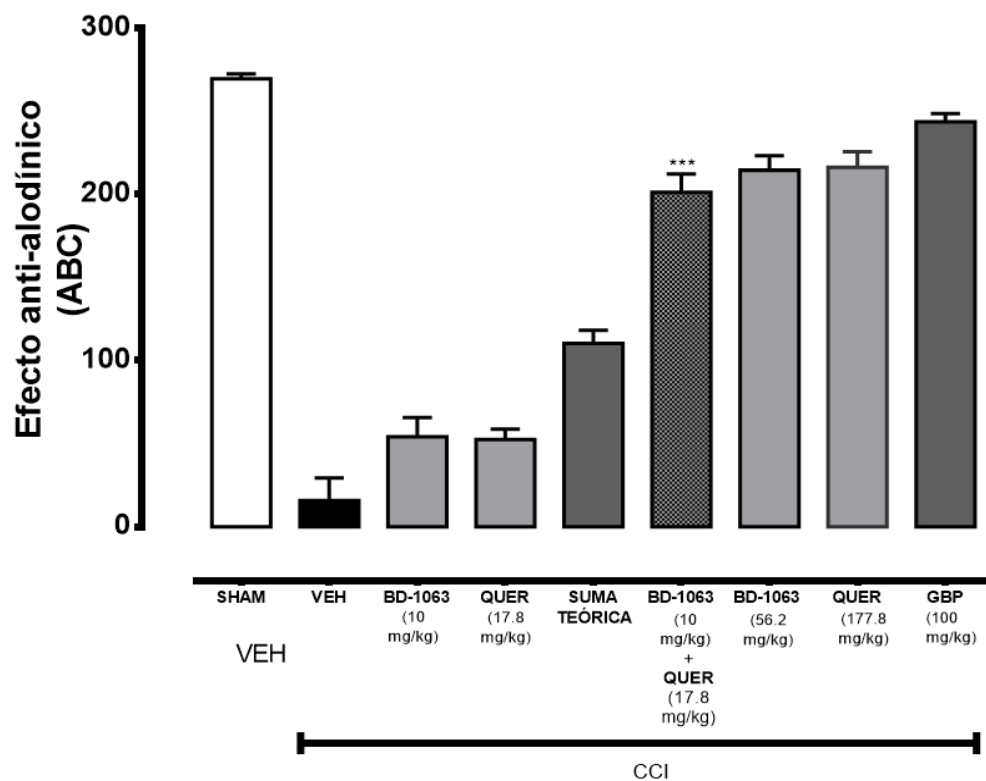
Con la finalidad de detallar el efecto obtenido de la combinación de BD-1063 y QUER, se procedió a analizar una combinación con buena eficacia y que haya resultado en potenciación, por ello se examina a continuación la interacción de BD-1063 (10.0 mg/kg) y QUER (17.3 mg/kg) (Figura 30). El cálculo de la suma teórica (lo que se esperaría obtener si se suman los efectos obtenidos de la administración individual) fue de  $106.7 \pm 8.3$  u.a., cuando se compara con el efecto experimental, es de destacar que se obtuvo un efecto supra aditivo ( $201.25 \pm 11.0$  u.a) ( $p < 0.001$ ). Si se analiza este mismo efecto con los efectos de las dosis más altas empleadas de cada fármaco no se observa una diferencia. De esto resalta que con 10 veces menos cantidad de QUER y 5 veces menos BD-1063 es posible obtener los mismos efectos anti-hiperalgésicos. Al mismo tiempo se enfatiza que el efecto fue similar al de la dosis más alta de GBP.



**Figura 30.** Área bajo la curva del efecto anti-hiperalgésico de BD-1063 (10 mg/kg), QUER (17.8 mg/kg) y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de BD-1063 (56.2 mg/kg), QUER (177.8 mg/kg) y el fármaco de referencia GBP (100 mg/kg). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  vs Suma teórica.



Los efectos anti-alodínicos fueron muy similares (Figura 31), se obtuvo un mayor efecto con la combinación ( $198.4 \pm 9.8$  u.a) que la suma teórica ( $110.3 \pm 10.3$  u.a). La asociación de BD-1063 (10 mg/kg) y QUER (17.8 mg/kg) genera el mismo efecto que las dosis más altas de cada uno de los fármacos administrados individualmente y que el fármaco de referencia GBP (100 mg/kg).



**Figura 31.** Área bajo la curva del efecto ant-alodínico de BD-1063 (10 mg/kg), QUER (17.8 mg/kg) y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de BD-1063 (56.2 mg/kg), QUER (177.8 mg/kg) y el fármaco de referencia GBP (100 mg/kg). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$  vs Suma teórica.

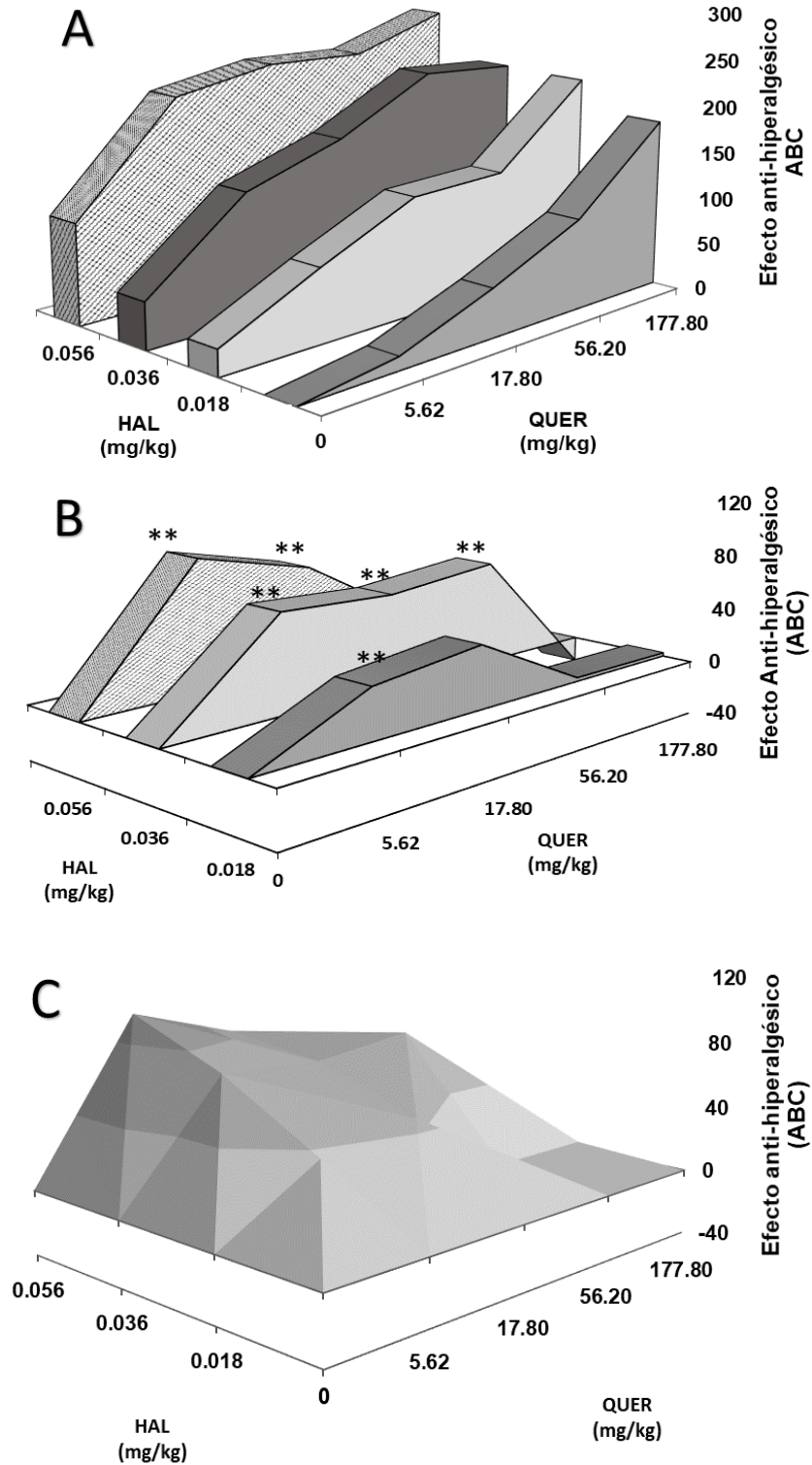
## 6.9 Asociación de haloperidol y quercetina

En el análisis de la superficie de interacción sinérgica del efecto anti-hiperalgésico de HAL y QUER se observan las curvas dosis respuesta individual y las diferentes combinaciones empleadas (Figura 32, panel A). Es de notar que existen combinaciones como la de HAL (0.056 mg/kg) y QUER (17.8 mg/kg) que alcanza un efecto farmacológico similar a las dosis más altas de cada fármaco.

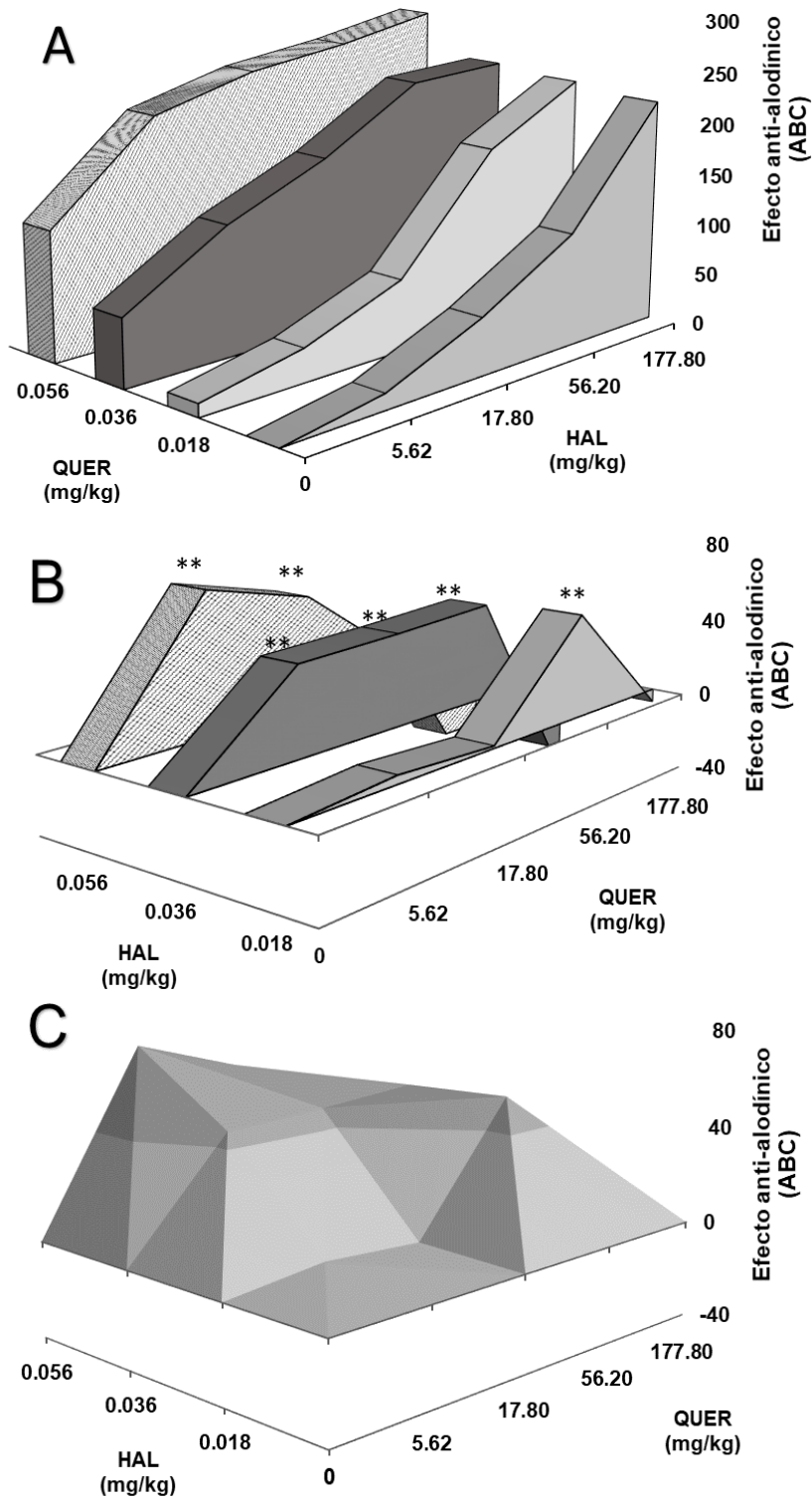
En el panel B de la Figura 32 se muestra la resta de los efectos individuales a cada una de las combinaciones. Con ello se detectaron 6 combinaciones que resultaron en un efecto supra-aditivo (combinaciones marcadas con asteriscos) y el resto de asociaciones al no mostrar diferencias estadísticas se establece como efectos de aditividad. El panel C muestra el gráfico de la superficie de interacción sinérgica de la combinación de HAL y QUER en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. Este gráfico indica el grado de potenciación con las diferentes proporciones de combinación, aquellas en color más oscuro muestran las combinaciones con mayor efecto de potenciación.

En el análisis del efecto anti-alodínico de la combinación de HAL y QUER (Figura 33) es posible detectar combinaciones que presentaron un buen grado de efecto empleando dosis pequeñas de los fármacos, ejemplo de ello es la combinación de HAL 0.056 mg/kg con QUER 17.8 mg/kg o la de 0.036 mg/kg de HAL y 56.2 mg/kg de QUER, por mencionar algunas. El gráfico de la figura 33, panel B muestra que se obtuvieron 6 combinaciones que generaron un efecto supra-aditivo. Mientras que el panel C corresponde al gráfico de superficie para la asociación de estos fármacos en el efecto anti-alodínico, el cual muestra en áreas oscuras las proporciones de combinaciones con una mayor grado de potenciación.

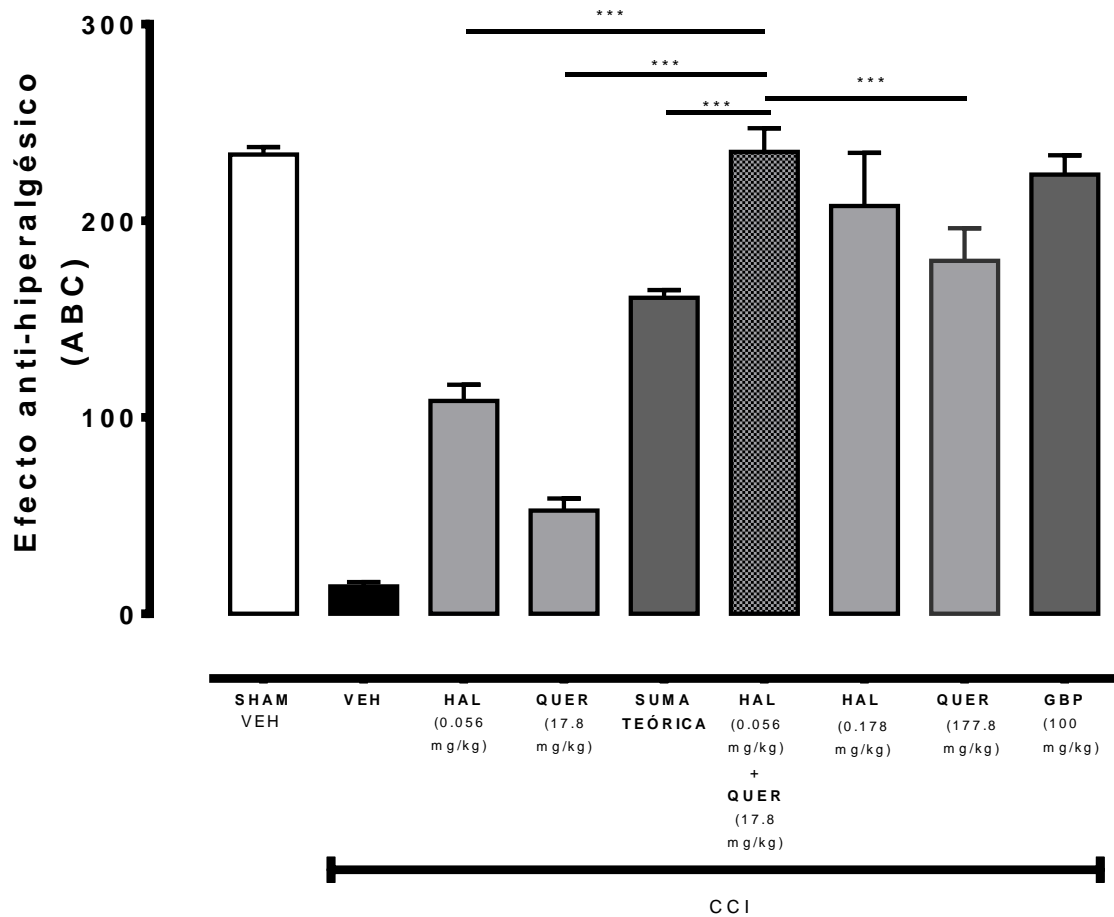
Para analizar con mayor detalle una combinación específica que haya resultado en un buen efecto anti-nociceptivo y además haya generado potenciación, se eligió a la asociación de HAL (0.032 mg/kg) con QUER (56.2 mg/kg). El efecto anti-hiperalgésico (Figura 34) y anti-alodínico (Figura 35) global de la combinación fue mayor que HAL (0.032 mg/kg) y QUER (56.2 mg/kg) administrados individualmente ( $p < 0.001$ ), así como de la suma teórica, tanto para el efecto anti-hiperalgésico (Figura 34) ( $p < 0.001$ ), como para el análisis del efecto anti-alodínico ( $p < 0.01$ ) (Figura 35).



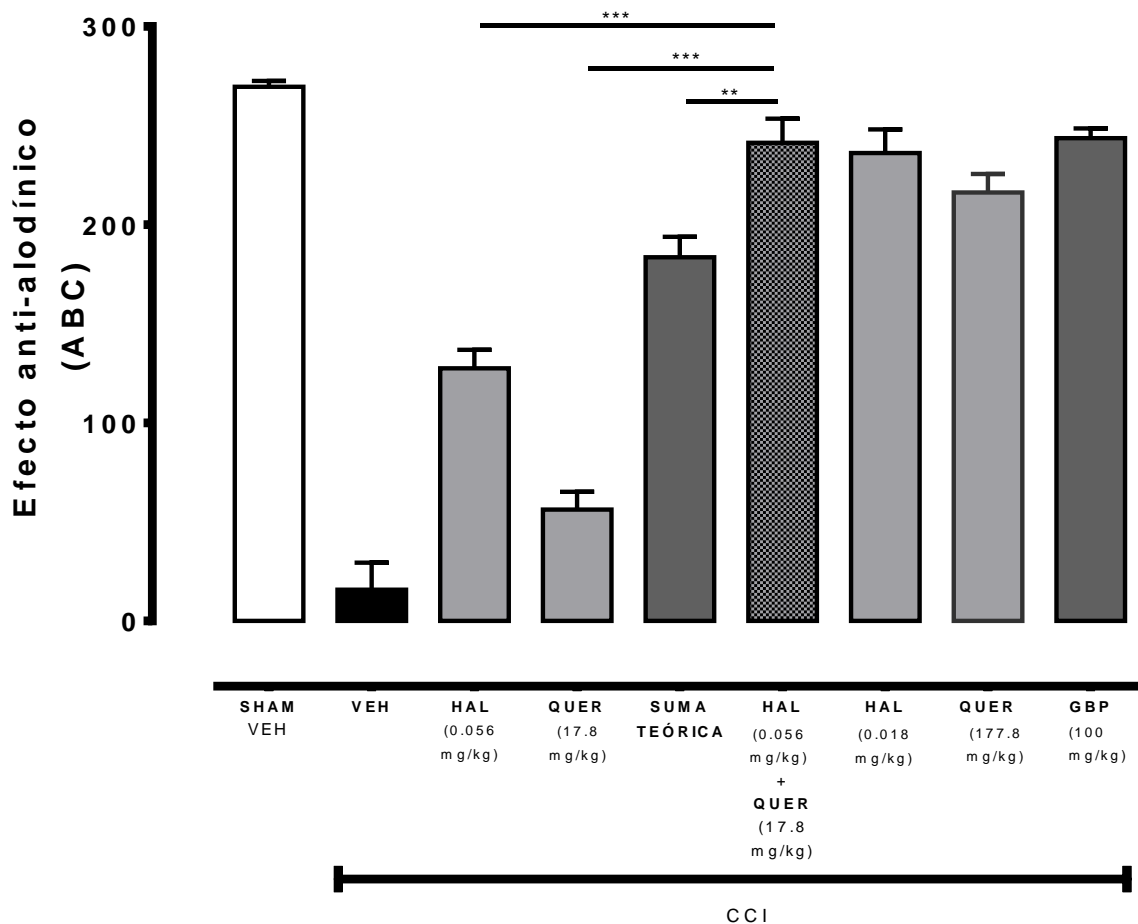
**Figura 32.** (Panel A) Efecto anti-hiperalgésico producido por HAL (0.018- 0.056 mg/kg) y QUER (5.6-177.8 mg/kg) administrados de manera individual o en combinación. Cada punto representa el promedio de seis animales. (Panel B) Resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones, cada punto está representado por el promedio, n=6 por grupo; \*\*p<0.01 vs efecto esperado. (Panel C). Superficie de interacción sinérgica del efecto anti-hiperalgésico producido por las diferentes combinaciones de BD-1063 + QUER, construida después de restar al efecto de la combinación los efectos individuales producidos por cada fármaco. Las barras del E.E.M. se omiten para mayor claridad de la gráfica.



**Figura 33.** (Panel A) Efecto anti-aldodínico producido por HAL (0.018- 0.056 mg/kg) y QUER (5.6-177.8 mg/kg) administrados de manera individual o en combinación. Cada punto representa el promedio de seis animales. (Panel B) Resta del efecto esperado al ABC experimental a cada una de las combinaciones, cada punto está representado por el promedio,  $n=6$  por grupo;  $**p<0.01$  vs efecto esperado. (Panel C). Superficie de interacción sinérgica del efecto anti-aldodínico producido por las diferentes combinaciones de BD-1063 + QUER, construida después de restar al efecto de la combinación los efectos individuales producidos por cada fármaco. Las barras del E.E.M. se omiten para mayor claridad de la gráfica.



**Figura 34.** Área bajo la curva del efecto ant-hiperalgésico de HAL (0.056 mg/kg), QUER (17.8 mg/kg y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de HAL (0.18 mg/kg), QUER (177.8 mg/kg) y el fármaco de referencia GBP (100 mg/kg). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$ .

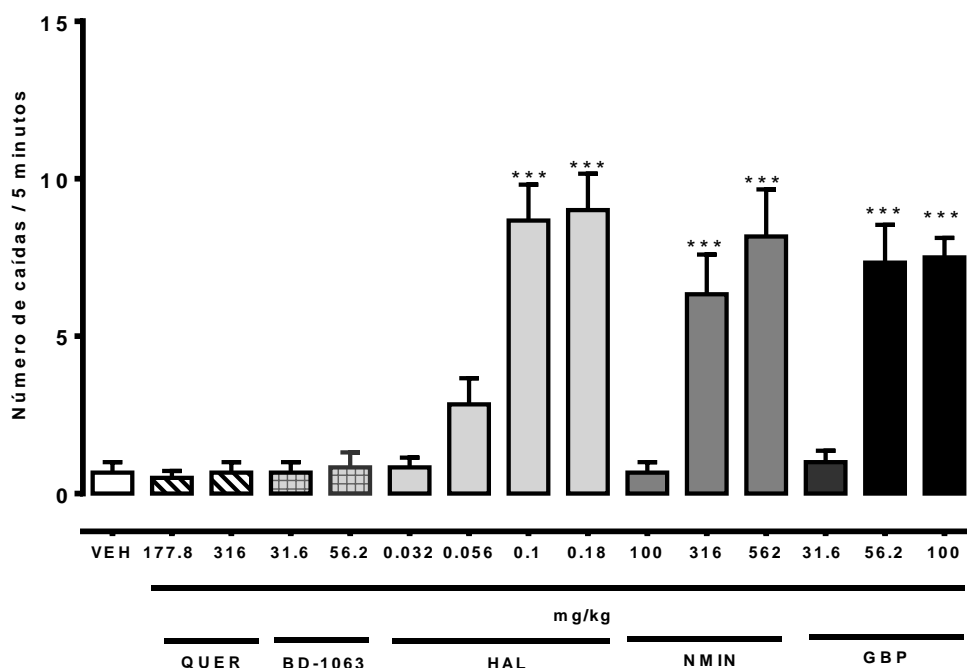


**Figura 35.** Área bajo la curva del efecto ant-aldodínico de HAL (0.056 mg/kg), QUER (17.8 mg/kg y su combinación, así como de la suma teórica y las dosis que generaron el máximo efecto de HAL (0.18 mg/kg), QUER (177.8 mg/kg) y el fármaco de referencia GBP (100 mg/kg). Cada barra representa la media ± error estándar, n=6 por grupo. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs Suma teórica

## 6.10 Efectos sobre la coordinación motora

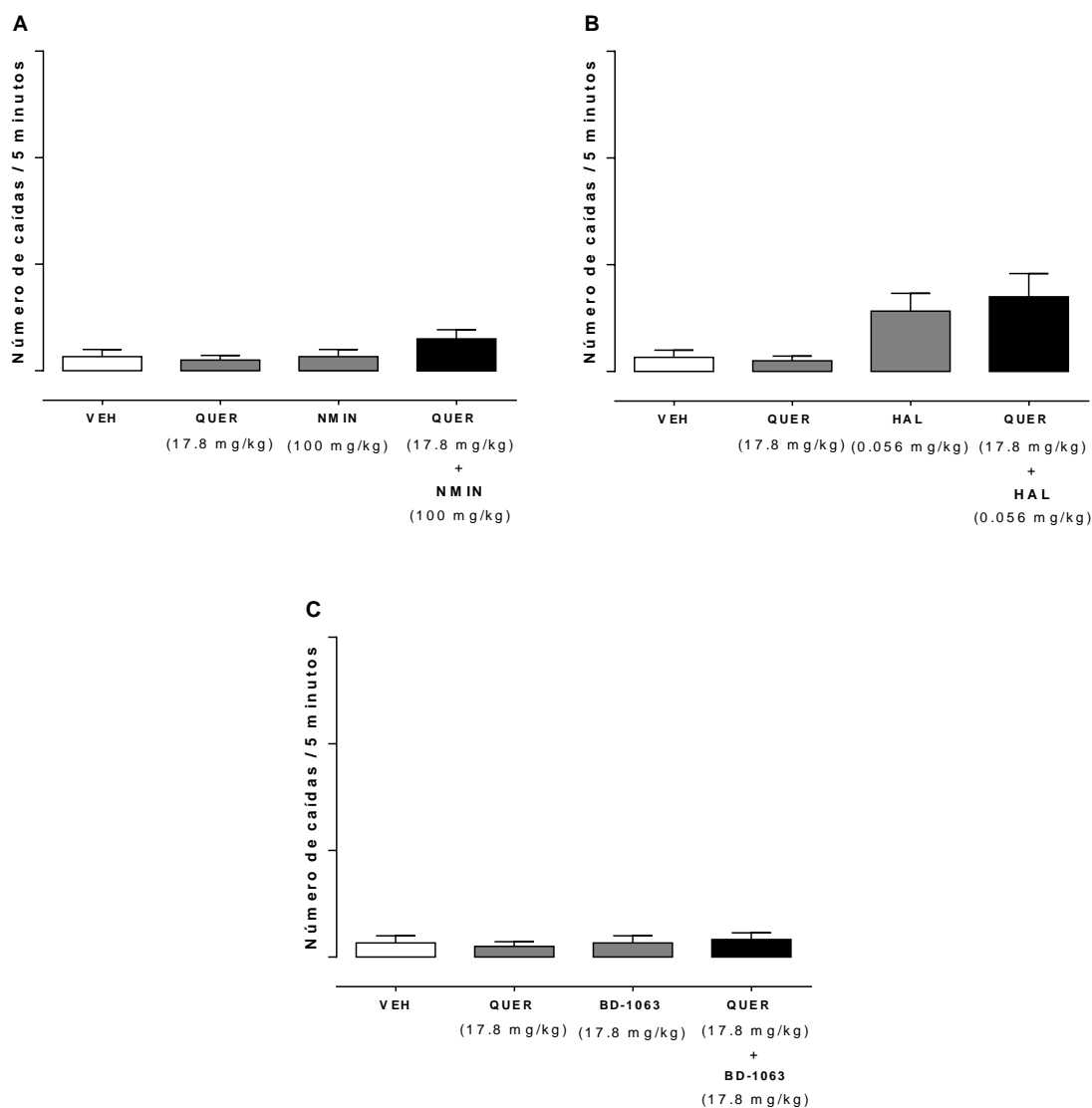
La Figura 36 muestra el efecto de los fármacos en la coordinación motora. Se compararon tomando como referencia el efecto obtenido en las ratas administradas con vehículo, debido a que éste no modificó el número de caídas. Las dosis más altas de BD-1063 y QUER empleadas para evaluar la eficacia en las curvas dosis-respuesta en el dolor neuropático, no afectaron la coordinación motora; sin embargo, NMIN presentó un incremento en el número de caídas a partir de la dosis de 316 mg/kg, HAL a partir de la administración de 0.1 mg/kg. Un efecto similar se observó a partir de la dosis de 56.2 mg/kg de GBP.

Adicionalmente, fueron analizados los efectos en la coordinación motora de las combinaciones con mejores efectos anti-alodínicos y anti-hiperalgésicos para establecer si también se exacerbaban estos efectos. Los resultados mostraron que no se afecta el número de caídas con estas combinaciones (Figura 37, paneles A, B y C).



**Figura 36.** Efecto en la coordinación motora del vehículo y las dosis más altas empleadas en este trabajo de QUER, BD\_1063, HAL, NMIN y GBP. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$  vs VEH.

## Resultados

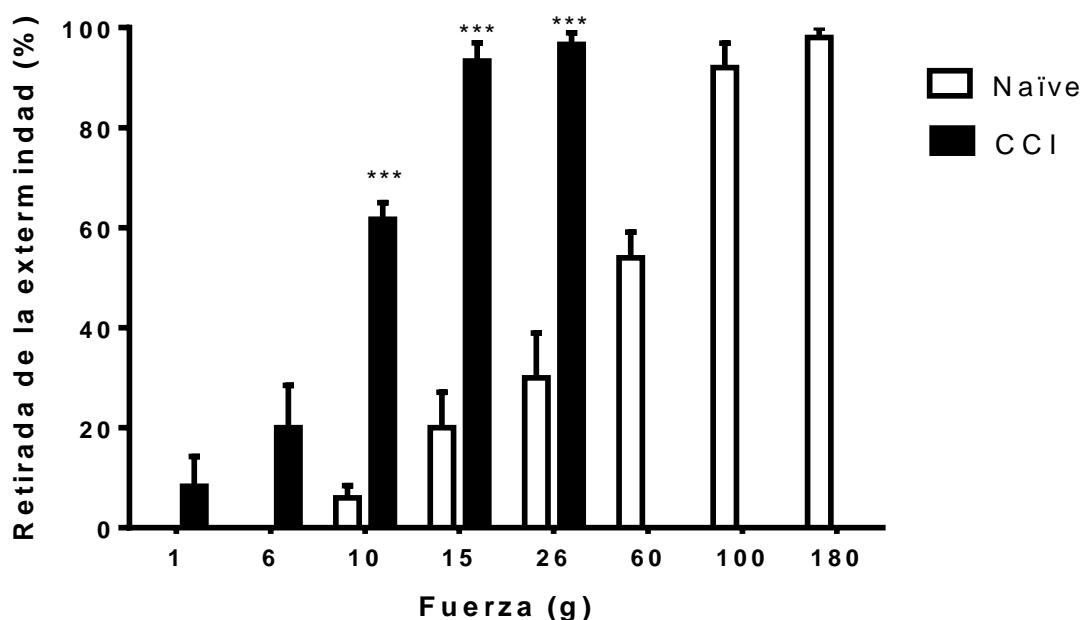


**Figura 37.** Efecto en el número de caídas en ratas tratadas con las combinaciones de QUER (17.8 mg/kg) + NMIN (100 mg/kg) (panel A), QUER (17.8 mg/kg) + HAL (0.046 mg/kg) (Panel B) y QUER (17.8 mg/kg) + BD-1063 (17.8 mg/kg) (panel C). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$ .

Con la finalidad de aclarar si las alteraciones en la coordinación motora podrían modificar las respuestas nociceptivas mostradas por los fármacos, se analizó en ratas intactas la respuesta de retirada con un estímulo que evocará una respuesta similar mostrada en ratas con constricción crónica del nervio ciático. En ese sentido la Figura 38 muestra la respuesta de retirada con



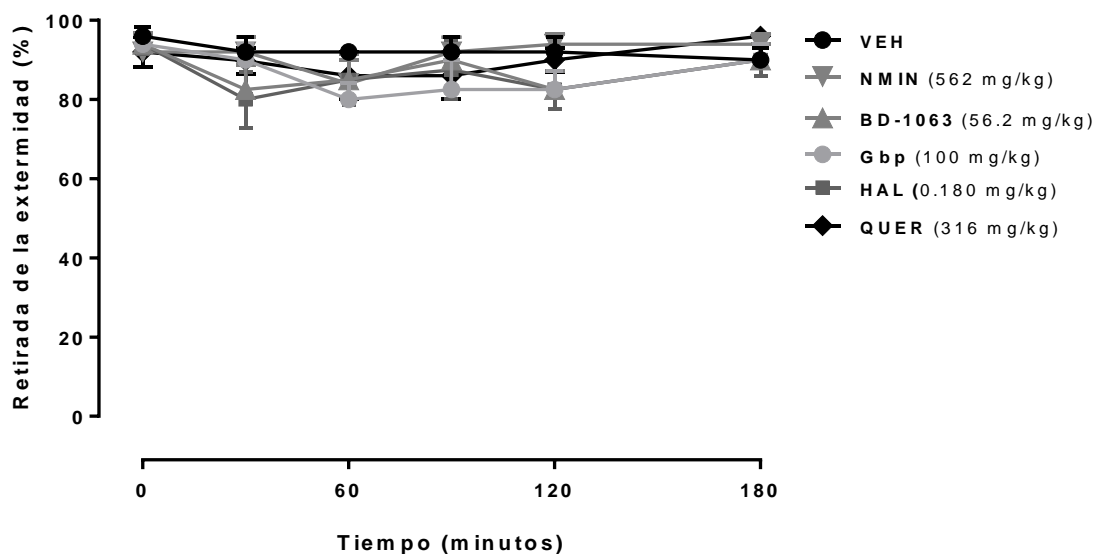
diferentes estímulos (Filamentos de von Frey). Las ratas naïve no respondieron a los estímulos de 1 y 6 g de fuerza. Por otra parte, se observó una respuesta significativa con el filamento de 10 g ( $6.0 \pm 2.4$  %) y 15 g ( $20.0 \pm 7.1$  %). Estos mismos estímulos en ratas CCI son de  $61.7 \pm 3.5$  y  $93.3 \pm 3.7$  %, respectivamente, por lo que son indicativos de hiperalgesia mecánica. Una respuesta similar en ratas naïve se observó cuando se utilizó el filamento de 100 g ( $92.0 \pm 3.7$  %).



**Figura 38.** Frecuencia de respuesta (%) al estímulo táctil con los filamentos de von Frey después en ratas con constricción crónica del nervio ciático unilateral (barras oscuras) o Naïve (barras blancas). Los estímulos se aplicaron 10 veces en la superficie plantar y se registró el número de respuestas positivas. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. \*\*\* $p<0.001$  vs Naïve.

Posteriormente se evaluó la misma respuesta (retirada de la extremidad) con el filamento de 100 g pero en ratas que fueron administradas con las dosis más altas de los fármacos. El curso temporal de 3 horas no mostró alguna alteración en las respuesta con NMIN (562 mg/kg, s.c.), HAL (0.18 mg/kg, s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.), QUER (316 mg/kg, s.c.) y GBP (100 mg/kg, s.c.),

manteniéndose constantes y no fueron diferentes de la respuesta observada en ratas tratadas con el vehículo (Figura 39).



**Figura 39.** Curso temporal de la respuesta de retirada de la extremidad frente a un estímulo táctil con el filamento de von Frey de (100 g) en ratas Naïve tratadas con NMIN (562 mg/kg), BD-1063 (56.2 mg/kg), GBP (100 mg/kg), HAL (0.18 mg/kg) y QUER (316 mg/kg). Se muestra la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  por grupo. No se observaron diferencias estadísticas.

## 7 DISCUSIÓN

---

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar el efecto anti-hiperalgésico de compuestos con afinidad por el receptor  $\sigma_1$  y su asociación con QUER en condiciones experimentales de dolor neuropático.

El modelo de dolor empleado para este trabajo fue el de constricción crónica del nervio ciático (CCI). Es un modelo ampliamente utilizado para el estudio del dolor neuropático y para la evaluación de tratamientos farmacológicos. El modelo fue elegido debido a que se ha demostrado que bajo estas condiciones experimentales es posible desarrollar varias conductas relacionadas con el dolor, tales como la alodinia y la hiperalgesia (Bennett y Xie, 1988; De Vry y cols., 2004; Dowdall y cols., 2005; De la O-Arciniega y cols., 2009). Este modelo simula la compresión del nervio y expresa propiedades fisiopatológicas del dolor neuropático similares a las que se presentan en los humanos, asemejándose al proceso de la tensión del nervio causada por una hernia de disco lumbar (Bennett y Xie, 1988). Se ha demostrado previamente que la ligación del nervio ciático en este modelo desencadena la sensibilización por alteración en las fibras A y C, esto podría explicar las conductas nociceptivas observadas en este modelo, debido a que se ha sugerido que el daño en estas fibras son parte importante para la iniciación y el mantenimiento del dolor en este modelo experimental (Gabay y Tal, 2004). En el presente trabajo se realizó un curso temporal del modelo experimental con la finalidad de dar seguimiento al proceso de sensibilización y la aparición de alodinia e hiperalgesia. En ese sentido, se observó un claro desarrollo de ambas conductas que concuerdan con diversos reportes (Zanjani y cols., 2006; De la O-Arciniega y cols., 2009; Choi y cols., 2013). En nuestro caso el aumento de la sensibilidad fue gradual teniendo el efecto máximo aproximadamente en el día 7 y se mantuvo hasta el día 15 en que se evaluaron, aunque ha sido reportado que esto se puede prolongar hasta un periodo de 60 días post-operación (Bennett y Xie, 1988). Estos resultados obtenidos permitieron determinar si los tratamientos administrados disminuían la

sensibilidad a los estímulos aplicados en las ratas CCI. Así mismo, se decidió emplear el día 10 post-cirugía ya que en el curso temporal se observó la presencia de alodinia e hiperalgesia en las ratas con la constricción del nervio en días previos y ya no se detectaron cambios en este tiempo.

Una sección del presente trabajo se programó para la evaluación de fármacos antagonistas  $\sigma_1$  como alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor neuropático, debido a que se ha demostrado que los antagonistas del receptor  $\sigma_1$  han resultado eficaces en condiciones experimentales para este tipo de dolor (Kim y cols., 2008; Son y Kwon, 2010; Nieto y cols., 2012; Romero y cols., 2012; Bangaru y cols., 2013), es por ello el interés de evaluar compuestos de este tipo. Dentro de los objetivos específicos se planteó la evaluación de una nueva molécula denominada para este trabajo como NMIN. La molécula fue sintetizada por Melo-Hernández (Melo-Hernández, 2015), se diseñó tomando en cuenta las características establecidas en el modelo farmacofórico de los ligandos  $\sigma_1$  (Glennon y cols., 1994; Glennon, 2005). Previo a este trabajo se conocía por evaluaciones *in vitro*, la afinidad de NMIN por el receptor  $\sigma_1$  (Melo-Hernández, 2015), y a pesar de diseñarse para fungir como antagonista, se desconocía farmacológicamente su efecto al unirse con el receptor y por ende su participación en la modulación del dolor, es entonces que este trabajo representa una aproximación del posible uso de esta molécula en la terapéutica experimental del dolor neuropático.

En el presente estudio, NMIN mostró efectos dosis dependientes, observándose los efectos más grandes con la dosis de 562 mg/kg en ambas conductas, estos hallazgos son importantes ya que se planteaban indicios de la importancia de esta molécula. Una vez establecido, en la siguiente etapa se demostró que su actividad anti-nociceptiva se debe al antagonismo  $\sigma_1$ . Es posible entonces que su actividad esté estrechamente relacionada con su diseño, ya que si se compara con uno de los modelos farmacofóricos del receptor  $\sigma_1$  (Glennon y cols., 1994), cumple con las características necesarias de sus ligandos. Dichas

rasgos estructurales consisten en 2 grupos hidrofóbicos y un grupo amino central y pareciera ser que las distancias entre ambos residuos hidrofóbicos sería la adecuada para proveerlo de afinidad por el receptor  $\sigma_1$  (Navarrete-Vázquez y cols., 2016). Aunado a esto, es importante mencionar las similitudes estructurales de NMIN con S1RA (E-52862), uno de los fármacos antagonistas  $\sigma_1$  más estudiados para la terapéutica del dolor, incluido el dolor neuropático (Nieto y cols., 2012; Gris y cols., 2016). Ambas moléculas tienen una analogía estructural, sin embargo S1RA tiene una alta densidad electrónica en el anillo pirazol, mientras que en NMIN esta densidad electrónica está disminuida, lo que probablemente esté relacionado con las diferencias en las características de interacción con el receptor (Laurini y cols., 2013) y esto le provea de una mayor afinidad a S1RA. Desafortunadamente en este trabajo no fue posible utilizar S1RA como control positivo, debido a que en el momento en que se inició el estudio no se encontraba disponible para su comercialización; sin embargo, se empleó DB-1063, un antagonista  $\sigma_1$  ampliamente empleado como herramienta farmacológica, y cuya afinidad por el receptor ha sido demostrada (Matsumoto et al., 1995; Nieto et al., 2012) .

Un hallazgo importante de este trabajo es que se evidenció por diversas metodologías la acción antagonista de NMIN. De acuerdo con los resultados del presente estudio, un agonista  $\sigma_1$  administrado previo a la administración de NMIN, evita que este desencadene su efecto anti-nociceptivo en ratas con dolor neuropático; posteriormente, se administró el agonista  $\sigma_1$  en ratas intactas generando alodinia e hiperalgesia, efecto que fue bloqueado por la administración de NMIN. Con respecto al resultado hiperalgésico obtenido por la administración del agonista del receptor  $\sigma_1$ , los reportes de la literatura son contradictorios, los informes iniciales habían indicado que el receptor  $\sigma_1$  únicamente se activaba en condiciones de estrés celular, tal como ocurre en la generación del dolor, mencionando que un agonista por sí mismo no podría generar conductas nociceptivas (Entrena y cols., 2009b; Sánchez-Fernández y cols., 2014); sin embargo, otros estudios mencionan que la sola administración

del agonista  $\sigma_1$  es capaz de producir las conductas dolorosas (Roh y cols., 2008a, 2010; Choi y cols., 2013). El presente reporte se asemejó a estos últimos trabajos. El compuesto PRE-084, un agonista  $\sigma_1$ , generó hiperalgesia y alodinia, aunque es importante mencionar que el nivel de nocicepción es menor al desencadenado por la constricción crónica. Estos resultados concuerdan un reporte previo (Navarrete-Vázquez y cols., 2016), en el cual se demuestra que este agonista es capaz de generar un efecto pronociceptivo en el modelo de formalina. Se ha propuesto que el mecanismo proalgésico generado por la administración de un agonista  $\sigma_1$  podría deberse a que se prepara al sistema de transmisión nociceptivo por medio de la fosforilación de la subunidad NR1 del receptor a NMDA y ello facilita el efecto de sensibilización (Kim y cols., 2008; Sánchez-Fernández y cols., 2013; Choi y cols., 2016), sin embargo, aún se desconoce el mecanismo concreto para este proceso, lo que sí está claro es que la mayoría de la evidencia apunta a una participación y expresión importante del receptor en diversas alteraciones patológicas incluido el dolor neuropático (De la Puente y cols., 2009; Nieto y cols., 2012; Mavlyutov y cols., 2016).

En otra parte de este trabajo se determinó por primera ocasión el papel de HAL en condiciones de dolor neuropático. HAL es una molécula cuyo mecanismo ampliamente descrito es como un antagonista dopaminérgico de diferentes subtipos ( $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$ ); sin embargo, hay estudios que han demostrado que HAL también es un ligando de los receptores  $\sigma_1$ , con una acción antagonista (Bowen y cols., 1990; Entrena y cols., 2009a). HAL presenta una alta afinidad por los receptores  $\sigma_1$  ( $k_i = 2.8 \pm 0.6$  nM), incluso su afinidad es comparable con la que presenta por el receptor dopaminérgico  $D_2$  ( $K_i = 2.7 \pm 1.4$  nM) (Bowen y cols., 1990). En cuanto a su actividad como agente analgésico, se ha reportado que a nivel clínico HAL puede disminuir la migraña (Honkaniemi y cols., 2006), aunque sus efectos son atribuidos a su actividad en los receptores dopaminérgicos. A nivel preclínico existe evidencia de su papel en la modulación del dolor en modelos experimentales como la generación de hipersensibilidad generada por capsaicina (Entrena y cols., 2009a) o formalina (Cendán y cols., 2005); por el

contrario, no existe evidencia de su actividad en condiciones de dolor de tipo neuropático, por lo que esta es una de las aportaciones del presente trabajo, En ese sentido este estudio muestra que HAL tiene un efecto dosis-dependiente en la disminución tanto de la alodinia como de la hiperalgesia, aunado a esto se demostró que estos efectos se deben a su actividad como antagonista de los receptores  $\sigma_1$ , puesto que, agonistas  $\sigma_1$  evitaron la acción anti-nociceptiva de HAL y el antagonista dopaminérgico, S-(-)-sulpirida, no generó alguna respuesta. Asimismo, debe considerarse que es la activación de la vía dopaminérgica la que genera el efecto de anti-nocicepción (Honkaniemi y cols., 2006; Wood, 2008; Cobacho y cols., 2014) y no su inhibición que es cómo actúa HAL. Una característica importante de HAL es que cuando se metaboliza se produce haloperidol reducido y oxidado que también presentan una alta afinidad por el receptor  $\sigma_1$  (Bowen y cols., 1990; Cendán y cols., 2005) y también podría ser un factor importante en la generación de los efectos anti-hiperalgésicos y anti-alodínicos observados.

Una vez que se construyeron las curvas dosis-respuesta de estos compuestos (NMIN y HAL), se procedió a su comparación con los fármacos de referencia. En la práctica clínica es conocido que el uso de los anti-inflamatorios no esteroides (AINES) es limitado debido a su pobre nivel de eficacia en el dolor neuropático, es por ello que se emplean fármacos que estabilizan la membrana neuronal, como los antagonistas de los canales de calcio. Los lineamientos clínicos para el tratamiento del dolor neuropático instauran claramente la necesidad de establecer el origen que lo desencadena, se ha planteado que si el diagnóstico del dolor neuropático muestra que el origen de la sensibilización es por neuralgia post-herpética, se debe proceder con tratamientos tópicos como lidocaína (Gilron y cols., 2006; Finnerup y cols., 2015). Si el origen es distinto se ha demostrado que fármacos antidepresivos o antiepilépticos son los que mejor funcionan (Woolf y Mannion, 1999; Gilron y cols., 2006; Finnerup y cols., 2015; Fornasari, 2017). De acuerdo a lo anterior, la evidencia describe que GBP y pregabalina son los más empleados. Estos compuestos tienen una alta afinidad

por la subunidad  $\alpha_2\text{-}\delta$  de los canales de calcio, esto permite disminuir la entrada de calcio a la terminal nerviosa y con ello se disminuye la hiperexcitabilidad neuronal (Hahm y cols., 2009; Athanasakis y cols., 2013). En el presente trabajo se empleó a GBP como control positivo, debido a que es utilizado en la práctica clínica y los resultados muestran efectos anti-nociceptivos adecuados, la diferencia con pregabalina radica en su mayor afinidad por el complejo  $\alpha_2/\delta$  de los canales de calcio y en su farmacocinética, lo que ha hecho que en algunas personas no sea bien tolerada y genere efectos no deseados relacionados con la dosificación (Rose y Kam, 2002; Quilici y cols., 2009; Vranken, 2012; Athanasakis y cols., 2013; Kukkar y cols., 2013; Irving y cols., 2014). Como control positivo de los antagonistas  $\sigma_1$  se empleó al compuesto BD-1063, una molécula que ha sido ampliamente utilizada en investigación como una herramienta farmacológica (Sabino y cols., 2009; Nieto y cols., 2012, 2014). BD-1063 mostró un efecto dosis-dependiente en el modelo de constricción crónica del nervio ciático, este dato representa la primera evidencia del uso de BD-1063 en este modelo experimental, anteriormente se había descrito su uso en modelos experimentales de dolor neuropático inducido por citotoxicidad con paclitaxel (Nieto y cols., 2012), en la cual también se muestran resultados anti-nociceptivos.

En los resultados, NMIN disminuyó la alodinia y la hiperalgia generada por la constricción crónica del nervio ciático. NMIN mostro similar eficacia anti-alodínica que GBP y que BD-1063, mientras que en el efecto anti-hiperalgésico, NMIN presentó similar eficacia que BD-1063 pero menor que GBP. En cuanto al análisis de las  $DE_{50}$ , se puede observar el orden de ubicación de cada una de las curvas dosis-respuestas de los fármacos analizados. NMIN fue el fármaco que más dosis requirió para lograr este nivel de efecto y si se compara con BD-1063, es posible determinar que es menos potente, esta diferencia de potencias se correlaciona con la afinidad por el receptor  $\sigma_1$ , debido a que la constante de inhibición de BD-1063 ( $K_i = 9.15$  nM) es menor que la presenta NMIN ( $K_i = 324$  nM) (Matsumoto y cols., 1995; Melo-Hernández, 2015).



Con respecto a la comparación de HAL, otro antagonista  $\sigma_1$  es posible observar que alcanza una eficacia similar a la observada por el fármaco de referencia GBP y que BD-63 y su curva dosis respuesta se encuentra más hacia la izquierda con respecto a todos los fármaco evaluados en este trabajo y tomando como referencia la  $DE_{50}$  se puede decir que es el fármaco más potente al requerir una menor cantidad de este compuesto para obtener este nivel de efecto, este último dato concuerda con su afinidad por el receptor  $\sigma_1$  cuando se compara con NMIN y BD-1063 (Bowen y cols., 1990; Matsumoto y cols., 1995; Melo-Hernández, 2015).

Las evidencias de la evaluación de compuestos antagonistas  $\sigma_1$  en el tratamiento del dolor en un inicio estaban dirigidas hacia la modulación de opioides, puesto que se observó que compuestos agonistas del receptor  $\sigma_1$  disminuían el efecto de los opioides, mientras que el de los antagonistas favorecían sus efectos. El mismo efecto que el obtenido por los antagonistas se observó en ratones knock-out del receptor  $\sigma_1$ , aunque el mecanismo de este proceso no está completamente dilucidado, se ha establecido que el receptor  $\sigma_1$  estaría generando una especie de efecto basal en la modulación los receptores opioides; por lo que al eliminar la acción de los receptores  $\sigma_1$  se estaría facilitando la activación de los receptores opioides (Tseng y cols., 2011; Sánchez-Fernández y cols., 2013; Vidal-Torres y cols., 2013). Al mismo tiempo estos trabajos mostraban que los antagonistas  $\sigma_1$  por sí solos no generaban un efecto anti-nociceptivo (Tseng et al., 2011; Vidal-Torres et al., 2014). Sin embargo, y tal como se ha establecido, después de un daño, como ocurre en el dolor neuropático, se ha visto un incremento en la expresión del receptor  $\sigma_1$  (De la Puente y cols., 2009; Bangaru y cols., 2013) favoreciendo los mecanismos de nocicepción, asimismo esto permite observar un efecto con los antagonistas  $\sigma_1$  de forma individual.

Desde que se determinó la importancia de los receptores  $\sigma_1$  en la modulación de dolor, los antagonistas  $\sigma_1$  han sido empleados en diversos

modelos experimentales para disminuir la sensibilidad (Cendán y cols., 2005; Nieto y cols., 2012; Vidal-Torres y cols., 2014). Estos trabajos llevaron a evaluar la funcionalidad de compuestos antagonistas  $\sigma$  en el dolor neuropático (Nieto y cols., 2012; Romero y cols., 2012; Zhu y cols., 2015; Gris y cols., 2016). Estas investigaciones han demostrado que el dolor causado por una alteración en el sistema nervioso puede ser prevenido con antagonistas  $\sigma_1$ , tal como el compuesto S1RA que previno la alodinia e hiperalgesia ocasionado por un antineoplásico (Romero y cols., 2012); estos datos concuerdan con el presente trabajo, puesto que NMIN, HAL y BD-163, todos antagonistas  $\sigma_1$ , fueron capaces de disminuir las conductas de alodinia e hiperalgesia ocasionadas por la constricción crónica del nervio ciático. Estos mismos resultados son comparables con los obtenidos en un estudio que utilizó ratones knock-out (De la Puente y cols., 2009) en donde se demuestra que los animales no desarrollaron signos de alodinia y con ello se ratifica la importancia del receptor como blanco terapéutico en el dolor neuropático. En conjunto estos resultados reafirman la eficacia de los compuestos antagonistas del receptor  $\sigma_1$ .

En este trabajo además de la administración sistémica, también se realizaron evaluaciones con la administración local (médula espinal), entre las vértebras L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub>. Esta última vía de administración se realizó debido a que algunos estudios han demostrado que esta área anatómica es un punto importante en la transmisión del dolor (Woolf y Mannion, 1999; Costigan y Woolf, 2000; Meacham y cols., 2017). Los efectos obtenidos con HAL, NMIN y BD-1063 por vía intratecal sugieren un papel del receptor  $\sigma_1$  en la modulación del dolor a nivel espinal, lo cual también coincide con los datos de Roh (Roh y cols., 2008b) y de Kwon (Kwon y cols., 2016), quienes demostraron que hay una sobre expresión de este receptor en la médula espinal en los días posteriores al daño en el nervio.

Respecto a los efectos anti-nociceptivos obtenidos con NMIN, HAL y BD-1063, pueden ser explicados por las alteraciones que se han demostrado en la

expresión y activación del receptor  $\sigma_1$  en condiciones fisiopatológicas. De los receptores  $\sigma$ , el subtipo 1 es el mejor caracterizado hasta este momento, se ha descrito su estructura y función en diversas patologías (Cobos y cols., 2008; Maurice y Su, 2009; Hayashi, 2015). Ahora se conoce que actúa como una chaperona, es decir modula la acción de diversas proteínas (Su y cols., 2010; Pyun y cols., 2014; Hayashi, 2015), incluidas las que se relacionan con la transmisión del dolor (Su y cols., 2010; Hayashi, 2015). Además, se ha demostrado que la activación del receptor  $\sigma_1$  favorece la señalización intracelular de calcio (Roh y cols., 2008a, 2010; Pyun y cols., 2014; Choi y cols., 2016); entonces, es probable que la administración de antagonistas  $\sigma_1$  como NMIN, DB-1063 y HAL estén inhibiendo dicho proceso que favorece a la activación del receptor NMDA, importante en la fisiopatología del dolor neuropático .

Por otro lado también existen evidencias de la modulación directa de otros receptores por parte del receptor  $\sigma_1$ , entre ellos, se ubica al receptor glutamatérgico NMDA, este proceso es importante ya que se conoce la relevancia de este receptor (NMDA) en la sensibilización central y la contribución en la señalización dolorosa (Costigan y Woolf, 2000; Vranken, 2012; Cohen y Mao, 2014). El desbloqueo del ion magnesio que se ubica dentro del receptor NMDA es importante para favorecer el incremento en la entrada de cationes hacia las neuronas, la entrada de calcio a través del receptor a NMDA activa a las proteínas cinasas, que fosforilan a diversos blancos y esto genera un aumento en las sinapsis, generando la hipersensibilidad (Vranken, 2012; Cohen y Mao, 2014). Se ha descrito que este proceso es favorecido por la interacción del receptor  $\sigma_1$  con la subunidad 1 del receptor NMDA (GluN1). De acuerdo a esto, entonces, es posible que los antagonistas empleados en el presente trabajo impidan este proceso al inhibir la actividad del receptor  $\sigma_1$ , puesto que se ha sugerido que la acción de antagonizarlo evita la interacción física entre receptor  $\sigma_1$  y el receptor a NMDA y con ello disminuye la actividad de la señalización del calcio en las neuronas (Roh y cols., 2008a; Pyun y cols., 2014; Choi y cols., 2016). En ese sentido se ha argumentado que los agonistas  $\sigma_1$  aumentan las

corrientes de calcio a través del receptor NMDA, mientras que los antagonistas la disminuyen y se ha documentado que en ratones knock-out del receptor  $\sigma_1$  la señalización de calcio generada por el receptor NMDA se encuentra disminuida (Tchedre y cols., 2008; Sha y cols., 2013).

Adicionalmente, tampoco se descarta que existan otros mecanismos relacionados con la inactivación de los receptores  $\sigma_1$  en esta condición patológica que contribuyan al efecto de NMIN, HAL y BD-1063, debido a que también se ha reportado la capacidad del receptor  $\sigma_1$  de modular otras proteínas como los canales de potasio, los canales de calcio y los canales calcio sensibles a ácido (ASICs) (Tchedre y cols., 2008; Kourrich y cols., 2012; Kwon y cols., 2016) y que son mediadores importantes en la señalización de las vías de la generación del dolor.

Con todo esto, el uso de los antagonistas  $\sigma_1$  resulta interesante como alternativa para el tratamiento del dolor neuropático, debido a que además de que se ha dilucidado su papel como modulador directo e indirecto de moléculas clave en el proceso fisiopatológico del dolor, también se ha establecido su expresión en áreas del sistema nervioso especializado en la señalización de la transmisión dolorosa, tal como lo es el asta dorsal de la médula espinal y ganglios de la raíz dorsal (Gundlach et al., 1986; Bangaru et al., 2013). Por otra parte, aunque en este trabajo no se demostró el papel de los antagonistas  $\sigma_1$  a nivel supraespinal, existe evidencia que en el tálamo y la sustancia gris periacueductal, hay una alta expresión del receptor (Gundlach y cols., 1986; Bangaru y cols., 2013; Mavlyutov y cols., 2016). Entonces, la distribución anatómica del receptor  $\sigma_1$  en áreas relacionadas con el dolor así como su papel en la modulación de moléculas importantes apoya el uso de los antagonistas  $\sigma_1$ .

Parte principal este trabajo es la evaluación de antagonistas  $\sigma_1$  combinados con QUER, para ello, primero fue importante determinar la curva dosis-respuesta de QUER. Se decidió utilizar QUER debido a la intención de

emplear blancos terapéuticos distintos a los convencionales, por ello se planteó el uso de antagonistas  $\sigma_1$  y conociendo que en el dolor neuropático hay una participación importante de los radicales libres (Naik y cols., 2006a; Goecks y cols., 2012; Al-Enazi, 2013) se planteó el uso de un antioxidante. Tomando en cuenta lo anterior se analizó el posible uso de QUER, ya que además de tener un papel antioxidante, también se ha demostrado que es capaz de disminuir la hipersensibilidad en modelos experimentales por mecanismos distintos tal como la modulación dopaminérgica, adrenérgica y serotoninérgica (Filho y cols., 2008; Martínez y cols., 2009; Kandhare y cols., 2012), todos ellos involucrados en menor o mayor medida en la fisiopatología del dolor neuropático (White y cols., 2007; Nickel y cols., 2012; Cohen y Mao, 2014), aunado a que se demostró actividad anti-inflamatoria en evaluaciones clínicas (Shoskes y cols., 1999; Katske y cols., 2001).

QUER es un flavonoide considerado como un metabolito bioactivo presente en diversas plantas medicinales, se ha demostrado su efecto anti-nociceptivo en modelos experimentales de dolor (Anjaneyulu y Chopra, 2003; Filho y cols., 2008; Martínez y cols., 2009), incluyendo el dolor neuropático de diversas etiologías (Anjaneyulu y Chopra, 2003, 2004; Çivi y cols., 2016; Gao y cols., 2016; Ji y cols., 2017). En el presente trabajo se observó un efecto dependiente de la dosis en los animales tratados con QUER, lo que confirma su efecto anti-nociceptivo en el dolor patológico, como lo es el dolor neuropático.

Diversos mecanismos se han dilucidado en la contribución de la actividad anti-nociceptiva de QUER, uno de los más estudiados es su actividad antioxidante, ya que se sabe que QUER es capaz de disminuir los radicales libres y con ello contribuye a la estabilidad neuronal (Azevedo y cols., 2013; Ji y cols., 2017). La capacidad antioxidante es atribuida a la eliminación directa de los radicales libres, esto por la presencia del grupo catecol en el anillo B, el cual tiene propiedades de donador de electrones y por lo tanto es un blanco de los radicales libres (Valério y cols., 2009), probablemente estos mecanismos estén

relacionados con la inhibición de la peroxidación lipídica así como de la disminución de los radicales superóxido y con ello se contribuye a la generación de la anti-nocicepción. Sin embargo, también se han demostrado otros mecanismos como la inhibición de la liberación de histamina de los mastocitos bloqueando la activación de cinasas que a su vez activan al canal TRPV (Gao y cols., 2016). Adicionalmente también se conoce que el flavonoide QUER puede inhibir la producción de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  así como reducir la expresión de CCL-2 contribuyendo con ello a la disminución de la inflamación, un proceso importante en la patogénesis del dolor neuropático; asimismo, se ha mencionado que el flavonoide QUER podría regular la nocicepción por actuar en la vía serotoninérgica, gabaérgica, dopaminérgica y adrenérgica (Kandhare y cols., 2012; Çivi y cols., 2016). En conjunto estos mecanismos descritos previamente estarían favoreciendo a la generación de la disminución de la hipersensibilidad mostrada en las ratas CCI cuando son tratadas con QUER.

Posterior a la obtención de las curvas-dosis respuestas de cada fármaco, se procedió a determinar los efectos de las asociaciones farmacológicas de los diferentes antagonistas  $\sigma_1$  con el flavonoide QUER. Es importante mencionar que la intención inicial era realizar un análisis por medio de la superficie de interacción sinérgica para cada combinación; sin embargo, debido a que contaba con una cantidad insuficiente de NMIN, únicamente se evaluó un punto de comparación. Para las otras dos interacciones (HAL + QUER y BD-1063 + QUER) si fue posible determinar los efectos por medio de la SIS.

La utilidad de las asociaciones farmacológicas para el tratamiento del dolor está ampliamente evidenciada a nivel clínico y preclínico. Existen múltiples metodologías para la evaluación de las interacciones farmacológicas. Dentro de las más empleadas se encuentran los isobogramas, que representan una herramienta adecuada para detectar los efectos de potenciación, suma o antagonismo (Tallarida, 2001). Sin embargo, uno de los inconvenientes de este

método es que únicamente permite hacer comparaciones de generación de efectos iguales tanto de los fármacos solos como combinados, generalmente comparando  $DE_{50}$ , aunque se pueden emplear otros niveles de comparación. Es decir compara dosis equiefectivas. Mientras que otra metodología de análisis como la “Superficie de Interacción Sinérgica” no compara dosis equiefectivas, sino que analizando varias proporciones de combinación, detecta las combinaciones que generan la más alta eficacia analgésica de dicha combinación y en caso de que varias combinaciones generen potenciación, permite detectar la combinación que genera el mayor grado de potenciación (López-Muñoz, 1994).

El análisis de SIS se ha empleado sobre todo en modelos experimentales de dolor artrítico (Lopez-Muñoz, 1994; Díaz-Reval y cols., 2010), con lo cual ha sido posible determinar el tipo de interacción de las asociaciones y las combinaciones óptimas. En el caso de su uso para el análisis en el tratamiento del dolor neuropático ha sido muy poco empleado. Para este trabajo se utilizó con la finalidad de evaluar las combinaciones de BD-1063 con QUER y de HAL con QUER; ambos casos representan la primera evidencia de las evaluaciones de este tipo de compuestos en el dolor neuropático. Las dosis utilizadas para las combinaciones fueron seleccionadas de las respectivas curvas dosis-respuesta.

El uso de las asociaciones farmacológicas está sustentado en que en algunos casos es posible obtener grandes efectos con dosis pequeñas de cada fármaco y con ello es posible disminuir la presencia de los efectos adversos, es decir aumentar los beneficios contra los riesgos (López-Muñoz y cols., 1993; García-Hernández y cols., 2007). Asimismo, existen evidencias del uso de las combinaciones como estrategias terapéuticas en el dolor neuropático (De la O-Arciniega y cols., 2009; Gilron y cols., 2009; Chaparro y cols., 2012; Corona-Ramos y cols., 2016), la mayoría de ellos relacionados con el uso de compuestos tradicionales en el tratamiento de este tipo de dolor como son los gabapentinoides tales GBP y pregabalina, en combinación con fármacos opioides, como morfina,

oxicodona y tapentadol o con antidepresivos como duloxetina o bien la combinación de antidepresivos con fármacos opioides (De la O-Arciniega y cols., 2009; Christoph y cols., 2011; Tanenberg y cols., 2011; Chaparro y cols., 2012; Miyazaki y Yamamoto, 2012; Gilron y cols., 2015; Corona-Ramos y cols., 2016). Algunos otros han empleado fármacos AINES con antiepilépticos u opioides que a nivel preclínico muestran resultados prometedores (Abass y cols., 2014; Espinosa-Juárez y cols., 2016). Todas estas combinaciones generalmente obtienen efectos aditivos o supra-aditivos; sin embargo, en el análisis empleado para estos trabajos no es posible determinar cuáles son las proporciones en combinación con mejores efectos, que es lo que se pretendió realizar en esta investigación, asociado a que se planteó el uso de blancos terapéuticos distintos.

En este estudio se encontró que todas las asociaciones farmacológicas (NMIN + QUER, HAL + QUER y BD-1063 + QUER) generan resultados preferentemente de adición o supra-adición, estos datos son alentadores, debido a que se muestra evidencia que con la asociación de fármacos no tradicionales para el tratamiento del dolor neuropático es posible obtener efectos similares a los que se consiguen con un fármaco de referencia como GBP; además, con este trabajo, se aporta un espectro de combinaciones que permite detectar las proporciones los efectos más grandes y que resultan en potenciación, distinto a lo que normalmente se había reportado.

Los efectos obtenidos cuando se asocian dos o más fármacos pueden ser entendidos principalmente desde dos puntos de vista, uno es por la interacción farmacodinámica o por su interacción farmacocinética. A pesar de que el objetivo del presente trabajo no fue analizar los mecanismos involucrados en los efectos anti-nociceptivos de las interacciones producidas por las combinaciones de los fármacos empleados, es posible hacer algunas suposiciones que nos permitan entender los efectos obtenidos. Una de las explicaciones puede ser que se den interacciones farmacodinámicas debido a que los mecanismos de los compuestos utilizados son distintos, mientras que con los antagonistas  $\sigma_1$  sus



efectos se deben al evitar los mecanismos descritos por la activación de este receptor (Tchedre y cols., 2008; Roh y cols., 2011; Romero y cols., 2016), el efecto del flavonoide QUER puede atribuirse a su capacidad antioxidante y a su modulación en las distintas vías de la señalización del dolor (Filho y cols., 2008; Valério y cols., 2009; Raygude y cols., 2012). Por otra parte, no pueden descartarse interacciones farmacocinéticas; algunos estudios han mostrado que el flavonoide QUER puede inhibir al citocromo CYP3A4 y esta característica puede provocar que se alteren los niveles séricos de fármacos que se metabolizan por esta enzima (Pal y Mitra, 2006; Choi y cols., 2011). En ese sentido, se sabe que una de las vías por las cuales se metaboliza HAL es precisamente por este citocromo (Kudo y Ishizaki, 1999), entonces pudiera deducirse que en la combinación de QUER + HAL, HAL permanezca por más tiempo en suero al estar inhibida la enzima que lo metaboliza, o bien, favorecer las concentraciones de haloperidol reducido (uno de los metabolitos activos de HAL) y con ello contribuir a sus efectos anti-nociceptivos. Por otra parte, aunque no existen reportes del metabolismo de BD-1063 y NMIN, no se pueden descartar interacciones farmacocinéticas de las combinaciones con estos fármacos.

El objetivo principal de las asociaciones farmacológicas es buscar aumentar los efectos empleando dosis pequeñas, lo cual fue obtenido en este trabajo, sin embargo, también es posible potenciar los efectos no deseados, es por ello que en este estudio se determinaron las posibles alteraciones motoras, una con la finalidad de determinar si esto podría enmascarar los efectos anti-nociceptivos y la otra para verificar si en las combinaciones estos se exacerbaban. Nuestros resultados mostraron que NMIN, HAL y GBP presentan alteraciones en el número de caídas en el rota-rod con las dosis más altas, claramente se puede decir que hay alteraciones motoras, a pesar de ello se puede considerar que estas alteraciones no necesariamente provocan una disminución de las respuestas con los estímulos empleados para la evaluación de alodinia o hiperalgesia. Un trabajo previo por Entrena y cols., (2009) encontró un efecto similar con HAL, ellos suponen algo similar, puesto que una dosis previa

de HAL que no mostró alteraciones motoras se obtienen un efecto anti-nociceptivo de aproximadamente 70%. En el caso del presente reporte, es posible descartar que estas alteraciones estén relacionadas con la anti-nocicepción, debido a que estas mismas dosis no mostraron alteración en la respuesta de sensibilidad en ratas intactas. Adicionalmente se realizó la evaluación de la coordinación motora tras las combinaciones con los mejores efectos. Aquí se pudo demostrar que es posible mejorar los efectos anti-nociceptivos con dosis menores sin necesariamente incrementar efectos adversos sobre la coordinación motora.

## 8 CONCLUSIÓN

---

Este trabajo demuestra que los compuestos con las características descritas para el modelo farmacofórico del receptor  $\sigma_1$ , como en el caso de NMIN, resultan interesantes para evaluarlos como ligandos nuevos y representan una alternativa para las patologías como el dolor neuropático donde el receptor  $\sigma_1$  desempeña un papel importante.

Asimismo, en este estudio se comprueba la importancia de los compuestos con actividad antagonista sobre el receptor  $\sigma_1$  en la terapéutica del dolor neuropático ya que en algunos casos pueden resultar tan eficaces como los que ejercen compuestos como GBP que son utilizados en la práctica clínica, incluso se demostró que fármacos que tienen afinidad por el receptor  $\sigma_1$  como en el caso de haloperidol y que es ampliamente utilizado en la práctica clínica como anti-psicótico puede ser además una alternativa para las condiciones de neuropatía.

Adicionalmente este trabajo muestra la primera evidencia de la asociación farmacológica de antagonistas  $\sigma_1$  con el flavonoide quercetina, con lo que se demuestra que utilizando fármacos con un mecanismo distinto, pero relacionados con la fisiopatología de este tipo de dolor, es posible obtener resultados alentadores que con dosis pequeñas permitan disminuir el riesgo de efectos no deseados y favorecer los efectos terapéuticos, además de que con la metodología de la superficie de interacción sinérgica es posible detectar las dosis óptimas que en combinación puedan sugerir un potencial uso de estos compuestos.

## 9 PERSPECTIVAS

---

- Determinar si las administraciones individuales o las combinaciones cambian la expresión de mediadores inflamatorios y de marcadores de estrés oxidativo relacionados con la fisiopatología del dolor neuropático
- Realizar la cuantificación sérica de los fármacos cuando se administran simultáneamente con la finalidad de comprobar si en la combinación se está generando algún tipo de interacción farmacocinética
- Analizar un curso temporal de administraciones crónicas de cada uno de los fármacos y de las combinaciones que en el efecto agudo generaron los mejores efectos
- Determinar el efecto de la combinación de antagonistas  $\sigma_1$  con diversos opioides en un modelo de dolor neuropático

---

## 10 REFERENCIAS

---

- Abadias, M., Escriche, M., Vaqué, A., Sust, M., Encina, G., 2013. Safety, tolerability and pharmacokinetics of single and multiple doses of a novel  $\sigma$ -1 receptor antagonist in three randomized phase I studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 103–117.
- Abass, M., Mosbah, E., Rizk, A., Karrouf, G., Zaghloul, A., 2014. Synergistic efficacy of tramadol and meloxicam on alleviation of pain and selected immunological variables after sciatic nerve ligation in rats. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2, 14–20.
- Abbadie, C., 2005. Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol.* 26, 529–534.
- Ahlawat, A., Rana, A., Goyal, N., Sharma, S., 2014. Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain. *Inflammopharmacology* 5, 269-278.
- Al-Enazi, M., 2013. Ameliorative potential of rutin on streptozotocin-induced neuropathic pain in rat. *African J. Pharm. Pharmacol.* 7, 2743–2754.
- Almansa, C., Vela, J.M., 2014. Selective sigma-1 receptor antagonists for the treatment of pain. *Futur. Med Chem* 6, 1179–1199.
- Amir, R., Devor, M., 1999. Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 95, 189–195.
- Anjaneyulu, M., Chopra, K., 2004. Quercetin attenuates thermal hyperalgesia and cold allodynia in STZ-induced diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 42, 766–769.
- Anjaneyulu, M., Chopra, K., 2003. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 1001–5.
- Athanasakis, K., Petrakis, I., Karampli, E., Vitsou, E., Lyras, L., Kyriopoulos, J., 2013. Pregabalin versus gabapentin in the management of peripheral neuropathic pain associated with post-herpetic neuralgia and diabetic neuropathy: a cost effectiveness analysis for the Greek healthcare setting. *BMC Neurol.* 13, 56.
- Azevedo, M.I., Pereira, A.F., Nogueira, R.B., Rolim, F.E., Brito, G.A., Wong, D.V., Lima-Júnior, R.C., de Albuquerque Ribeiro, R., Vale, M.L., 2013. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol. Pain* 9, 53.
- Bangaru, M.L., Weihrauch, D., Tang, Q.-B., Zoga, V., Hogan, Q., Wu, H.-E., 2013. Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Mol. Pain* 9, 1–13.
- Bennett, G.J., Xie, Y.-K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Berry, P., Katz, J., Covington, E., Miaskowski, C., 2001. Pain: Current Understanding of Assessment, Management, and Treatments, *National Pharmaceutical Council, Incorporated*, 2001, pp. 3–18.

- Besson, J.M., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610–1615.
- Bial, E., Cope, D.K., 2011. Introduction to pain management, historical perspectives, and careers in pain management, in: Vadivelu N., Urman R., Hines R. (eds) *Essentials of Pain Management*. Springer, New York, NY. pp. 3-16.
- Bingham, B., Ajit, S.K., Blake, D.R., Samad, T.A., 2009. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 1, 28-37.
- Boroujerdi, A., Zeng, J., Sharp, K., Kim, D., Steward, O., Luo, Z.D., 2011. Calcium channel alpha-2-delta-1 protein upregulation in dorsal spinal cord mediates spinal cord injury-induced neuropathic pain states. *Pain* 152, 649–655.
- Bowen, W.D., Moses, E.L., Tolentino, P.J., Michael Walker, J., 1990. Metabolites of haloperidol display preferential activity at sigma receptors compared to dopamine D-2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 177, 111–118.
- Bowen, W.D., de la costa, B.R., Hellewell, S.B., Walker, J.M., Rice, K.C., 1993. [3H](+)-pentazocine: A potent and highly selective benzomorphan-based probe for sigma-1 receptors. *Mol Neuropharmacol* 3: 117-126.
- Brimson, J.M., 2011. The Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Br J Pharmacol.* 2011 164, 772-80.
- Bridges, D., Thompson, S., Rice A., 2001. Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth.* 87, 12-26.
- Brown, G.C., Bal-Price, A., 2003. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide, Glutamate, and Mitochondria. *Mol. Neurobiol.* 27, 325–355.
- Brown, C., Fezoui, M., Seling, W.S., Schwartz, C.E., Ellis, J.L., 2004. Antitussive activity of sigma-1 receptor agonists in the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 141, 233-240.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* 1, 37-49.
- Calderon, S.N., Izenwasser, S., Heler, B., Gutkind, J.S., Mattson. M.V., Su, T.P., Newman, A.H., 1994. Novel 1-phenylcycloalkanecarboxylic acid derivatives are potent and selective sigma-1 ligands. *J Med Chem* 37: 2285-2291.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A., 2006. Review Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron* 52, 77–92.
- Cendán, C.M., Pujalte, J.M., Portillo-Salido, E., Baeyens, J.M., 2005. Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. *Psychopharmacology.* 182, 485–493.
- Chaparro, L.E., Wiffen, P.J., Moore, R.A., Gilron, I., 2012. Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults. *Cochrane database Syst. Rev.* 7, CD008943.

- Chen, L., Yang, G., Grosser, T., 2013. Prostanoids and inflammatory pain. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 104, 58–66.
- Cheng, J.-K., Chiou, L.-C., 2006. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 471–486.
- Chirumbolo, S., 2010. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 9, 263–285.
- Choi, J.S., Piao, Y.J., Kang, K.W., 2011. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: Role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch. Pharm. Res.* 34, 607–613.
- Choi, S.-R., Moon, J.-Y., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kwon, S.-G., Choi, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Beitz, A.J., Lee, J.-H., 2016. Spinal D-serine increases PKC-dependent GluN1 phosphorylation contributing to the sigma-1 receptor-induced development of mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J. Pain*. 8, 415-427
- Choi, S.R., Roh, D.H., Yoon, S.Y., Kang, S.Y., Moon, J.Y., Kwon, S.G., Choi, H.S., Han, H.J., Beitz, A.J., Oh, S.B., Lee, J.H., 2013. Spinal sigma-1 receptors activate NADPH oxidase 2 leading to the induction of pain hypersensitivity in mice and mechanical allodynia in neuropathic rats. *Pharmacol. Res.* 74, 56–67.
- Christoph, T., De Vry, J., Schiene, K., Tallarida, R.J., Tzschentke, T.M., 2011. Synergistic antihypersensitive effects of pregabalin and tapentadol in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 666, 72–79.
- Çivi, S., Emmez, G., Dere, Ü.A., Börcek, A.Ö., Emmez, H., 2016. Effects of quercetin on chronic constriction nerve injury in an experimental rat model. *Acta Neurochir.* 158, 959–965.
- Clark, A.K., Old, E.A., Malcangio, M., 2013. Neuropathic pain and cytokines: Current perspectives. *J. Pain Res.* 6, 803–814.
- Cobacho, N., de la Calle, J.L., Paíno, C.L., 2014. Dopaminergic modulation of neuropathic pain: Analgesia in rats by a D2-type receptor agonist. *Brain Res. Bull.* 106, 62–71.
- Cobos, E.J., Entrena, J.M., Nieto, F.R., Cendán, C.M., Pozo, E. Del, 2008. Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma 1 Receptor Ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 344–366.
- Cohen, S.P., Mao, J., 2014. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 348, f7656.
- Corona-Ramos, J.N., M, D. la O.-A., Déciga-Campos, M., Medina-López, J.R., Domínguez-Ramírez, A.M., Jaramillo-Morales, O.A., Espinosa-Juárez, J. V, López-Muñoz, F.J., 2016. The Antinociceptive Effects of Tramadol and/or Gabapentin on Rat Neuropathic Pain Induced by a Chronic Constriction Injury. *Drug Dev Res.* 77, 217–226.
- Costigan, M., Woolf, C.J., 2000. Pain: molecular mechanisms. *J Pain* 1, 35–44.

- De la O-Arciniega, M., Díaz-Reval, M.I., Cortés-Arroyo, A.R., Domínguez-Ramírez, A.M., López-Muñoz, F.J., 2009. Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 457–64.
- De la Puente, B. de la, Nadal, X., Portillo-Salido, E., Sánchez-Arroyos, R., Ovalle, S., Palacios, G., Muro, A., Romero, L., Entrena, J.M., Baeyens, J.M., López-García, J.A., Maldonado, R., Zamanillo, D., Vela, J.M., 2009. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* 145, 294–303.
- De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P., Eckel, G., 2004. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 491, 137–148.
- Devor, M., 2006. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J. Pain* 7(1 Suppl 1), S3-S12.
- Diario Oficial de la Federación, 2001. Norma Oficial Mexicana, NOM -062- ZOO- 1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Diario Oficial de la Federación.
- Díaz-Reval, M.I., Carrillo-Munguía, N., Martínez-Casas, M., González-Trujano, M.E., 2010. Tramadol and caffeine produce synergistic interactions on antinociception measured in a formalin model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 357–362.
- Dowdall, T., Robinson, I., Meert, T.F.T.F., 2005. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 93–108.
- Dubin, A., Patapoutian, A., 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760-3772
- Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P., Huganir, R.L., 1996. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84, 745–755.
- Entrena, J.M., Cobos, E.J., Nieto, F.R., Cendán, C.M., Baeyens, J.M., Del Pozo, E., 2009a. Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: Role of sigma-1 receptors. *Psychopharmacology.* 205, 21–33.
- Entrena, J.M., Cobos, E.J., Nieto, F.R., Cendán, C.M., Gris, G., Del Pozo, E., Zamanillo, D., Baeyens, J.M., 2009b. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain* 143, 252–261.
- Espinosa-Juárez, J. V, Jaramillo-Morales, O.A., Corona-Ramos, J.N., Medina-López, J.R., López-Muñoz, F.J., 2016. Antinociceptive Interactions Between Meloxicam and Gabapentin in Neuropathic Pain Depend on the Ratio used in Combination in Rats. *Drug. Dev. Res.* 77 : 134–142.



- Filho, A.W., Filho, V.C., Olinger, L., De Souza, M.M., 2008. Quercetin: Further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch. Pharm. Res.* 31, 713–721.
- 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. *Lancet Neurol.* 14, 162–173.
- Finnerup, N.B., Haroutounian, S., Kamerman, P., Baron, R., Bennett, D.L.H., Bouhassira, D., Cruccu, G., Freeman, R., Hansson, P., Nurmikko, T., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Serra, J., Smith, B.H., Treede, R.-D., Jensen, T.S., 2016. Neuropathic pain: An updated grading system for research and clinical practice. *Pain* 157, 1.
- Fontanilla, D., Johannessen, M., Hajipour, A.R., Cozzi, N.V., Jackson, M.B., Ruoho, A.E., 2009. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science* 323, 934–937.
- Fornasari, D., 2017. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain Ther.* 6, 25–33.
- Freire, M.A.M., Guimarães, J.S., Leal, W.G., Pereira, A., 2009. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front. Neurosci.* 15; 175-81.
- Fu, X., Froicu, D., Sinatra, R., 2011. Anatomic and physiologic principles of pain, In: Vadivelu N., Urman R., Hines R. (eds) *Essentials of Pain Management*. Springer, New York, NY. pp. 31–44.
- Gabay, E., Tal, M., 2004. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 110, 354–360.
- Gao, W., Zan, Y., Wang, Z.J.J., Hu, X.Y., Huang, F., 2016. Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKC $\epsilon$ -dependent activation of TRPV1. *Acta Pharmacol. Sin.* 37, 1166–1177.
- Gao, X., Kim, H.K., Chung, J.M., Chung, K., 2007. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131, 262–271.
- García-Hernández, L., Déciga-Campos, M., Guevara-López, U., López-Muñoz, F.J., 2007. Co-administration of rofecoxib and tramadol results in additive or sub-additive interaction during arthritic nociception in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 331–340.
- Gibaldi, M., 1991. Estimation of area under the curve, in: Philadelphia (Ed.), *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. 377–378.
- Gilron, I., Bailey, J.M., Tu, D., Holden, R.R., Jackson, A.C., Houlden, R.L., 2009. Nortriptyline and gabapentin, alone and in combination for neuropathic pain: a double-blind, randomised controlled crossover trial. *Lancet* 374, 1252–1261.

- Gilron, I., Tu, D., Holden, R., Jackson, A., DuMerton-Shore, D., 2015. Combination of morphine with nortriptyline for neuropathic pain. *Pain*. 156, 1440-1448.
- Gilron, I., Watson, C.P.N., Cahill, C.M., Moulin, D.E., 2006. Neuropathic pain: A practical guide for the clinician. *CMAJ* 175, 265–275.
- Giordano, J., 2005. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician* 8, 277–290.
- Glennon, R. A., 2005. Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the “deconstruction-reconstruction-elaboration” approach. *Mini Rev. Med. Chem.* 5, 927–40.
- Glennon, R. A., Ablordeppey, S.Y., Ismaiel, A.M., El-Ashmawy, M.B., Fischer, J.B., Howie, K.B., 1994. Structural Features Important for Sigma-1 Receptor Binding. *J. Med. Chem.* 37, 1214–1219.
- Goecks, C.S.B., Horst, A., Moraes, M.S., Scheid, T., Kolberg, C., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2012. Assessment of Oxidative Parameters in Rat Spinal Cord After Chronic Constriction of the Sciatic Nerve. *Neurochem. Res.* 37, 1952–1958.
- Gold, M.S., Gebhart, G.F., 2010. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.* 16, 1248-1257.
- Gold, M.S., Weinreich, D., Kim, C.S., Wang, R., Treanor, J., Porreca, F., Lai, J., 2003. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J. Neurosci.* 23, 158–166.
- Gómez-Soler, M., Fernández-Dueñas, V., Portillo-Salido, E., Pérez, P., Zamanillo, D., Vela, J.M., Burgueño, J., Ciruela, F., 2014. Predicting the antinociceptive efficacy of  $\sigma_1$  receptor ligands by a novel receptor fluorescence resonance energy transfer (FRET) based biosensor. *J. Med. Chem.* 57, 238–242.
- Gris, G., Portillo-Salido, E., Aubel, B., Darbaky, Y., Deseure, K., Vela, J.M., Merlos, M., Zamanillo, D., 2016. The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats. *Sci. Rep.* 6, 1-11.
- Gundlach, A.L., Largent, B.L., Snyder, S.H., 1986. Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+)3H-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *J. Neurosci.* 6, 1757–1770.
- Hahm, T.S., Ahn, H.J., Bae, C.D., Kim, H.S., Lim, S.W., Cho, H.S., Lee, S.M., Sim, W.S., Kim, J.A., Gwak, M.S., Choi, S.J., 2009. Protective effects of gabapentin on allodynia and alpha 2 delta 1-subunit of voltage-dependent calcium channel in spinal nerve-ligated rats. *J Korean Med Sci* 24, 146–151.
- Hama, A., Sagen, J., 2012. Combination drug therapy for pain following chronic spinal cord injury. *Pain Res. Treat.* 2012, 840486.
- Hayashi, T., 2015. Conversion of psychological stress into cellular stress response: Roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 4, 179.191.

- Honkaniemi, J., Liimatainen, S., Rainesalo, S., Sulavuori, S., 2006. Haloperidol in the acute treatment of migraine: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Headache* 46, 781–787.
- Hunt, S.P., Mantyh, P.W., 2001. The molecular dynamics of pain control. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 83–91.
- Inbal, R., Rousso, M., Ashur, H., Wall, P.D., Devor, M., 1987. Collateral sprouting in skin and sensory recovery after nerve injury in man. *Pain* 28, 141–154.
- Irving, G., Tanenberg, R.J., Raskin, J., Risser, R.C., Malcolm, S., 2014. Comparative safety and tolerability of duloxetine vs. pregabalin vs. duloxetine plus gabapentin in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Int. J. Clin. Pract.* 68, 1130–1140.
- Janssen, S.P., Truin, M., Van Kleef, M., Joosten, E.A., 2011. Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* 184, 183–194.
- Ji, C., Xu, Y., Han, F., Sun, D., Zhang, H., Li, X., Yao, X., Wang, H., 2017. Quercetin alleviates thermal and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model by inhibiting Toll-like receptor signaling. *Biomed. Pharmacother.* 94, 652–658.
- Kandhare, A.D., Raygude, K.S., Shiva Kumar, V., Rajmane, A.R., Visnagri, A., Ghule, A.E., Ghosh, P., Badole, S.L., Bodhankar, S.L., 2012. Ameliorative effects quercetin against impaired motor nerve function, inflammatory mediators and apoptosis in neonatal streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Biomed. Aging Pathol.* 2, 173–186.
- Kato, K., Hayako, H., Ishihar, Y., Marui, S., Iwane, M., Miyamoto, M., 1999. TAK-147, an acetylcholinesterase activity in cultures rat septal cholinergic neurons. *Neurosci. Lett.* 260, 5-8.
- Katske, F., Shoskes, D.A., Sender, M., Poliakin, R., Gagliano, K., Rajfer, J., 2001. Treatment of interstitial cystitis with a quercetin supplement. *Tech. Urol.* 7, 44–6.
- Kazuhide, I., Makoto, T., 2009. Microglia and neuropathic pain. *Glia* 57, 1469–1479.
- Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Kishioka, S., 2012. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 55-61.
- Kim, H.-W., Kwon, Y.-B., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Han, H.-J., Kim, K.-W., Beitz, A.J., Lee, J.-H., 2006. Intrathecal treatment with sigma1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br. J. Pharmacol.* 148, 490–8.
- Kim, H.-W., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kwon, Y.-B., Han, H.-J., Kim, K.-W., Beitz, a J., Lee, J.-H., 2008. Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1125–34.
- Kim, H.K., Park, S.K., Zhou, J.-L., Tagliatalata, G., Chung, K., Coggeshall, R.E., Chung, J.M., 2004. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111, 116–124.

- Kohno, T., Ji, R.-R., Ito, N., Allchorne, A.J., Befort, K., Karchewski, L. a, Woolf, C.J., 2005. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 117, 77–87.
- Kourrich, S., Su, T.P., Fujimoto, M., Bonci, A., 2012. The sigma-1 receptor: Roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 35, 762–771.
- Kudo, S., Ishizaki, T., 1999. Pharmacokinetics of haloperidol - An update. *Clin. Pharmacokinet.* 37, 435–456.
- Kukkar, A., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A.S., 2013. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Arch. Pharm. Res.* 36, 237-251
- Kwon, S.G., Roh, D.H., Yoon, S.Y., Choi, S.R., Choi, H.S., Moon, J.Y., Kang, S.Y., Kim, H.W., Han, H.J., Beitz, A.J., Oh, S.B., Lee, J.H., 2016. Role of peripheral sigma-1 receptors in ischaemic pain: Potential interactions with ASIC and P2X receptors. *Eur. J. Pain* 20, 594–606.
- Lahmy, V., Meunier, J., Malmström, S., Naert, G., Givalois, L., Kim, SH., Villard, V., Vamvakides, A., Maurice, T., 2013. Blockade of Tau Hyperphosphorylation and A $\beta$ 1–42 Generation by the Aminotetrahydrofuran Derivative ANAVEX2-73, a Mixed Muscarinic and  $\sigma$ 1 Receptor Agonist, in a Nontransgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* 38. 1706–1723
- Larsson, M., Broman, J., 2011. Synaptic plasticity and pain: role of ionotropic glutamate receptors. *Neuroscientist* 17, 256–273.
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J. Pain* 10, 895–926.
- Laurini, E., Da Col, V., Wünsch, B., Pricl, S., Wünsch, B., Pricl, S., 2013. Analysis of the molecular interactions of the potent analgesic S1RA with the  $\sigma$ 1 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 2868–2871.
- Leung, L., Cahill, C.M., 2010. TNF- $\alpha$  and neuropathic pain, a review. *J. Neuroinflammation* 7, 1–11.
- Lever, J.R., Gustafson, J.L., Xu, R., Allmon, R.L., Lever, S.Z., 2006.  $\sigma$ 1 and  $\sigma$ 2 receptor binding affinity and selectivity of SA4503 and fluoroethyl SA4503. *Synapse* 59, 350–358.
- Lopez-Muñoz, F.J., 1994. Surface of synergistic interaction between dipyron and morphine in the PIFIR model. *Drug Dev. Res.* 26–32.
- López-Muñoz, F.J., 1995. Profile of analgesic interaction between aspirin and d-propoxyphene obtained by means of the surface of synergistic interaction. *Drug Dev. Res.* 35, 13–19.
- López-Muñoz, F.J., Castañeda-Hernández, G., Villalón, C.M., Terrón, J.A., Salazar, L.A., 1993. Analgesic effects of combinations containing opioid drugs with either aspirin or acetaminophen in the rat. *Drug Dev. Res.* 29, 299–304.

- López-Ruvalcaba, C., Fernández-Guasti, A., 1994. Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> agonists. *Behav. Pharmacol.* 5, 42–51.
- Luo, Z.D., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Sorkin, L.S., Stauderman, K.A., Williams, M.E., Yaksh, T.L., 2001. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci.* 21, 1868–1875.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., Gilbert, P.E., 1976. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517–532.
- Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Aguirre-Hernández, E., Moreno, J., Soto-Hernández, M., López-Muñoz, F.J., 2009. Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. mexicana inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology* 56, 564–571.
- Matsumoto, R.R., Bowen, W.D., Tom, M.A., Vo, V.N., Truong, D.D., Costa, B.R. De, De Costa, B.R., 1995. Characterization of two novel o- receptor ligands" antidystonic effects in rats suggest o- receptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* 280, 301–310.
- Maurice, T., Su, T.-P., 2009. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* 124, 195–206.
- Mavlyutov, T.A., Duellman, T., Kim, H.T., Epstein, M.L., Leese, C., Davletov, B.A., Yang, J., 2016. Sigma-1 receptor expression in the dorsal root ganglion: Reexamination using a highly specific antibody. *Neuroscience* 331, 148–157.
- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D.P., Haroutounian, S., 2017. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr. Pain Headache Rep.* 27, 1-11
- Mei, J., Pasternak, G.W., 2002. sigma-1 Receptor Modulation of Opioid Analgesia in the Mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 1070–1074.
- Melo-Hernández, L.A., 2015. Síntesis de N-[2-(morfolin-4-il)etil]-2-(naftalen-1(2)-iloxi)acetamida y predicción de su afinidad sobre el receptor sigma 1 mediante anclaje molecular automatizado. Tesis de Licenciatura en Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Merlos, M., Burgueño, J. Portillo-Salido, E., Plata-Salaman, C.R., Vela, J.M., 2017. Pharmacological modulation of the sigma-1 receptor and the treatment of pain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 964, 85-107
- Merskey, H., Bogduk, N., 1994. Classification of Chronic Pain, descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP Pain Terminology. 2da. Edición, IASP press.
- Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A., 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 32, 197–200.

- Miyazaki, R., Yamamoto, T., 2012. The efficacy of morphine, pregabalin, gabapentin, and duloxetine on mechanical allodynia is different from that on neuroma pain in the rat neuropathic pain model. *Anesth. Analg.* 115, 182–188.
- Moncada, S., Bolaños, J.P., 2006. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 97, 1676-1689.
- Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., Su, T.P., 2013. Sigma-1 Receptor Chaperone at the ER-Mitochondrion Interface Mediates the Mitochondrion-ER-Nucleus Signaling for Cellular Survival. *PLoS One.* 8, e76941
- Morin-Surun, M.P., Collin, T., Denavit-Saubié, M., Baulieu, E.E., Monnet, F.P., 1999. Intracellular sigma1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96, 8196–8199.
- Mukherjee, P., Cinelli, M.A., Kang, S., Silverman, R.B., 2014. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem Soc Rev* 43, 6814–6838.
- Naik, A.K., Tandan, S.K., Dudhgaonkar, S.P., Jadhav, S.H., Kataria, M., Prakash, V.R., Kumar, D., 2006a. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur. J. Pain* 10, 573–579.
- Naik, A.K., Tandan, S.K., Kumar, D., Dudhgaonkar, S.P., 2006b. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 530, 59–69.
- Narenjkar, J., Roghani, M., Alambeygi, H., Sedaghati, F., 2011. The effect of the flavonoid quercetin on pain sensation in diabetic rats. *Basic Clin. Neurosci.* 2, 51–57.
- Narita, N., Hashimoto, K., Tomitaka, S., Minabe, Y., 1996. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 307, 117-9.
- Navarrete-Vázquez, G., Austrich-Olivares, A., Godínez-Chaparro, B., Hidalgo-Figueroa, S., Estrada-Soto, S., Hernández-Núñez, E., Torres-Gómez, H., Schepmann, D., Wünsch, B., 2016. Discovery of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-N-(2-morpholin-4-ylethyl)acetamide: A selective  $\sigma_1$  receptor ligand with antinociceptive effect. *Biomed. Pharmacother.* 79, 284–293.
- Nickel, F.T., Seifert, F., Lanz, S., Maihöfner, C., 2012. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22, 81-91
- Nieto, F.R., Cendán, C.M., Cañizares, F.J., Cubero, M. a, Vela, J.M., Fernández-Segura, E., Baeyens, J.M., 2014. Genetic inactivation and pharmacological blockade of sigma-1 receptors prevent paclitaxel-induced sensory-nerve mitochondrial abnormalities and neuropathic pain in mice. *Mol. Pain* 10, 11.
- Nieto, F.R., Cendán, C.M., Sánchez-Fernández, C., Cobos, E.J., Entrena, J.M., Tejada, M.A., Zamanillo, D., Vela, J.M., Baeyens, J.M., 2012. Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *J. Pain* 13, 1107–1121.

- O'Connor, A.B., Dworkin, R.H., 2009. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am. J. Med.* 122, S22-32.
- Pal, D., Mitra, A.K., 2006. MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions. *Life Sci.* 78, 2131–2145.
- Price, T.J., Géranton, S.M., 2009. Translating nociceptor sensitivity: The role of axonal protein synthesis in nociceptor physiology. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2253-2263
- Pyun, K., Son, J.S., Kwon, Y.B., 2014. Chronic activation of sigma-1 receptor evokes nociceptive activation of trigeminal nucleus caudalis in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 278–283.
- Quilici, S., Chancellor, J., Löthgren, M., Simon, D., Said, G., Le, T.K., Garcia-Cebrian, A., Monz, B., 2009. Meta-analysis of duloxetine vs. pregabalin and gabapentin in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. *BMC Neurol.* 9, 6.
- Ramachandran, S., 2009 The sigma1 receptor interacts with N-alkyl amines and endogenous sphingolipids. *Eur J Pharmacol.* 609, 19–26.
- Raygude, K.S., Kandhare, A.D., Ghosh, P., Ghule, A.E., Bodhankar, S.L., 2012. Evaluation of ameliorative effect of quercetin in experimental model of alcoholic neuropathy in rats. *Inflammopharmacology* 20, 331–341.
- Reichling, D.B., Levine, J.D., 2009. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci.* 12, 611-618.
- Rodríguez-Muñoz, M., Cortés-Montero, E., Pozo-Rodrigálvarez, A., Sánchez-Blázquez, P., Garzón-Niño, J., 2015. The ON:OFF switch,  $\sigma$ 1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: Implications in neurological disorders. *Oncotarget* 6, 35458-35477.
- Roh, D.-H., Kim, H.-W., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kwon, Y.-B., Kim, K.-W., Han, H.-J., Beitz, A.J., Lee, J.-H., 2008a. Intrathecal administration of sigma-1 receptor agonists facilitates nociception: involvement of a protein kinase C-dependent pathway. *J. Neurosci. Res.* 86, 3644–3654.
- Roh, D.-H., Kim, H.-W., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kwon, Y.-B., Kim, K.-W., Han, H.-J., Beitz, A.J., Na, H.-S., Lee, J.-H., 2008b. Intrathecal injection of the sigma-1 receptor antagonist BD1047 blocks both mechanical allodynia and increases in spinal NR1 expression during the induction phase of rodent neuropathic pain. *Anesthesiology* 109, 879–889.
- Roh, D.H., Choi, S.R., Yoon, S.Y., Kang, S.Y., Moon, J.Y., Kwon, S.G., Han, H.J., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2011. Spinal neuronal NOS activation mediates sigma-1 receptor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in mice: Involvement of PKC-dependent GluN1 phosphorylation. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1707–1720.
- Roh, D.H., Yoon, S.Y., Seo, H.S., Kang, S.Y., Moon, J.Y., Song, S., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2010. Sigma-1 receptor-induced increase in murine spinal NR1 phosphorylation is mediated by the PKCalpha and epsilon, but not the PKCzeta, isoforms. *Neurosci. Lett.* 477, 95–99.

- Romero, L., Merlos, M., Vela, J.M., 2016. Antinociception by Sigma-1 Receptor Antagonists. Central and Peripheral Effects, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier. 1st. ED. pp. 181–215.
- Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., Montero, A., Muro, A., Bura, A., Segalés, C., Laloya, M., Hernández, E., Portillo-Salido, E., Escriche, M., Codony, X., Encina, G., Burgueño, J., Merlos, M., Baeyens, J.J., Giraldo, J., López-García, J., Maldonado, R., Plata-Salamán, C., Vela, J.M.J., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., Montero, A., Muro, A., Bura, A., Segalés, C., Laloya, M., Hernández, E., Portillo-Salido, E., Escriche, M., Codony, X., Encina, G., Burgueño, J., Merlos, M., Baeyens, J.J., Giraldo, J., López-García, J. a., Maldonado, R., Plata-Salamán, C.R., Vela, J.M.J., 2012. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2289–2306.
- Rose, M.A., Kam, P.C.A., 2002. Gabapentin: pharmacology and its use in pain management. *Anaesthesia* 57, 451–462.
- Sabino, V., Cottone, P., Zhao, Y., Iyer, M.R., Steardo, L., Rice, K.C., Conti, B., Koob, G.F., Zorrilla, E.P., 2009. The sigma-receptor antagonist BD-1063 decreases ethanol intake and reinforcement in animal models of excessive drinking. *Neuropsychopharmacology* 34, 1482–1493.
- Sadosky, A., Schaefer, C., Mann, R., Bergstrom, F., Baik, R., Parsons, B., Nalamachu, S., Nieshoff, E., Stacey, B.R., Ansel, A., Tuchman, M., 2013. Burden of illness associated with painful diabetic peripheral neuropathy among adults seeking treatment in the US: Results from a retrospective chart review and cross-sectional survey. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 6, 79–92.
- Sánchez-Fernández, C., Entrena J.-M., Baeyens, J.-M., Cobos, E.-J., 2017. Sigma-1 Receptor Antagonists: A New Class of Neuromodulatory Analgesics. *Adv Exp Med Biol* 964, 109-132.
- Sánchez-Fernández, C., Montilla-García, Á., González-Cano, R., Nieto, F.R., Romero, L., Artacho-Cordón, A., Montes, R., Fernández-Pastor, B., Merlos, M., Baeyens, J.M., Entrena, J.M., Cobos, E.J., 2014. Modulation of peripheral  $\mu$ -opioid analgesia by  $\sigma_1$  receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 348, 32–45.
- Sánchez-Fernández, C., Nieto, F.R., González-Cano, R., Artacho-Cordón, A., Romero, L., Montilla-García, Á., Zamanillo, D., Baeyens, J.M., Entrena, J.M., Cobos, E.J., 2013. Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by  $\sigma_1$  receptor inhibition: role of peripheral  $\sigma_1$  receptors. *Neuropharmacology* 70, 348–58.
- Sang, C.N., Booher, S., Gilron, I., Parada, S., Max, M.B., 2002. Dextromethorphan and memantine in painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: efficacy and dose-response trials. *Anesthesiology* 96, 1053–1061.
- Schmidt, A., Lebel, L., Koe, B.K., Seeger, T., Heym, J., 1989. Sertraline potently displaces (+)-[3H]3-PPP binding to sigma sites in rat brain. *Eur J Pharmacol* 165, 335–336



- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., Kruse, A.C., 2016. Crystal structure of the human  $\sigma_1$  receptor. *Nature* 532, 527–530.
- Scholz, J., Woolf, C.J., 2002. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 5 suppl., 1062-1067
- Sha, S., Qu, W.J., Li, L., Lu, Z.H., Chen, L., Yu, W.F., Chen, L. 2013. Impairs neurogenesis in dentate gyrus of adult hippocampus via down-regulation of nmda receptors. *CNS Neurosci. Ther.* 19, 705–713.
- Shinder, V., Govrin-Lippmann, R., Cohen, S., Belenky, M., Ilin, P., Fried, K., Wilkinson, H.A., Devor, M., 1999. Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J. Neurocytol.* 28, 743–761.
- Shoskes, D.A., Zeitlin, S., Shahed, A., Rajfer, J., 1999. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *Urology* 54, 960–963.
- Son, J.S., Kwon, Y.B., 2010. Sigma-1 receptor antagonist BD1047 reduces allodynia and spinal ERK phosphorylation following chronic compression of dorsal root ganglion in rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 14, 359–364.
- Steinert, J.R., Chernova, T., Forsythe, I.D., 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16, 435–452.
- Stucky, C.L., Gold, M.S., Zhang, X., 2001. Mechanisms of pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11845–11846.
- Su, T.P., Schell, S.E., Ford-Rice, F.Y., London, E.D., 1988a. Correlation of inhibitory potencies of putative antagonist for sigma receptors in brain and spleen. *Eur J Pharmacol* 148: 467-470.
- Su, T.P., London, E.D., Jaffe, J.H., 1988b. Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240:219–221
- Su, T.P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., Ruoho, A.E., 2010. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 557–566.
- Tallarida, R.J., 2001. Drug synergism: its detection and applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 865–872.
- Tanenberg, R.J., Irving, G.A., Risser, R.C., Ahl, J., Robinson, M.J., Skljarevski, V., Malcolm, S.K., 2011. Duloxetine, pregabalin, and duloxetine plus gabapentin for diabetic peripheral neuropathic pain management in patients with inadequate pain response to gabapentin: An open-label, randomized, noninferiority comparison. *Clin. Proc.* 86, 615–624.
- Täubel, J., Ferber, G., Lorch, U., Wang, D., Sust, M., Camm, A.J., 2015. Single doses up to 800 mg of E-52862 do not prolong the QTc interval - A retrospective validation by pharmacokinetic- pharmacodynamic modelling of electrocardiography data utilising the effects of a meal on QTc to demonstrate ECG assay sensitivity. *PLoS One.* 10, e0136369.

- Tchedre, K.T., Huang, R.Q., Dibas, A., Krishnamoorthy, R.R., Dillon, G.H., Yorio, T., 2008. Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4993–5002.
- Tseng, L.F., Hogan, Q.H., Wu, H.E., 2011. (+)-Morphine attenuates the (-)-morphine-produced tail-flick inhibition via the sigma-1 receptor in the mouse spinal cord. *Life Sci.* 89, 875–877.
- Ueda, H., 2006. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 109, 57–77.
- Utech, T., Köhler, J., Buschmann, H., Holenz, J., Vela, J.M., Wünsch, B., 2011. Synthesis and pharmacological evaluation of a potent and selective  $\sigma$ -1 receptor antagonist with high antiallodynic activity. *Arch. Pharm.* 344, 415–421.
- Valério, D. a., Georgetti, S.R., Magro, D. a., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.T.M.C., Vieira, S.M., Fonseca, M.J. V, Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W. a., 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: Inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod* 72, 1975–1979.
- Vardeh, D., Mannion, R.J., Woolf, C.J., 2016. Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. *J Pain* 17, T50–T69.
- Vidal-Torres, A., De La Puente, B., Rocasalbas, M., Touriño, C., Andreea Bura, S., Fernández-Pastor, B., Romero, L., Codony, X., Zamanillo, D., Buschmann, H., Merlos, M., Manuel Baeyens, J., Maldonado, R., Vela, J.M., 2013. Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: Enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *Eur J Pharmacol* 711, 63–72.
- Vidal-Torres, A., Fernández-Pastor, B., Carceller, A., Vela, J.M.J.M., Merlos, M., Zamanillo, D., 2014. Effects of the selective sigma-1 receptor antagonist S1RA on formalin-induced pain behavior and neurotransmitter release in the spinal cord in rats. *J. Neurochem.* 129, 484–494.
- Vilner, B.J., Bowen, W.D., 2000. Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 3, 900–911
- Vranken, J., 2009. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 9;71-78
- Vranken, J.H., 2012. Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 12, 304–314.
- Wang, H., 2005. Bradykinin Produces Pain Hypersensitivity by Potentiating Spinal Cord Glutamatergic Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* 25, 7986–7992.
- Watson, C.P., Gilron, I., Sawynok, J., 2010. A qualitative systematic review of head-to-head randomized controlled trials of oral analgesics in neuropathic pain. *Pain Res. Manag.* 15, 147–157.
- White, F.A., Jung, H., Miller, R.J., 2007. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20151–20158.

- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.-J., Hökfelt, T., 2002. The role of spinal cholecystinin in chronic pain states. *Pharmacol. Toxicol.* 91, 398–403.
- Wood, P.B., 2008. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev. Neurother.* 8, 781–797.
- Woolf, C.J., Ma, Q., 2007. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* 55, 353–364.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353, 1959–64.
- Woolf, C.J., Shortland, P., Coggeshall, R.E., 1992. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355, 75–78.
- Woolf, C.J., Shortland, P., Reynolds, M., Ridings, J., Doubell, T., Coggeshall, R.E., 1995. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* 360, 121–134.
- Wünsch, B., 2012. The  $\sigma_1$  receptor antagonist S1RA is a promising candidate for the treatment of neurogenic pain. *J. Med. Chem.* 19, 8209-8210.
- Yaksh, T.L., 2006. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J. Pain* 7, S13-S30.
- Zanjani, T.M., Sabetkasaei, M., Mosaffa, N., Manaheji, H., Labibi, F., Farokhi, B., 2006. Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 538, 66–72.
- Zhang, J.M., Li, H., Munir, M.A., 2004. Decreasing sympathetic sprouting in pathologic sensory ganglia: A new mechanism for treating neuropathic pain using lidocaine. *Pain* 109, 143–149.
- Zhu, S., Wang, C., Han, Y., Song, C., Hu, X., Liu, Y., 2015. Sigma-1 receptor antagonist BD1047 reduces mechanical allodynia in a rat model of bone cancer pain through the inhibition of spinal nr1 phosphorylation and microglia activation. *Mediators Inflamm.* 2015, 1-11
- Zimmermann, M., 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 23–37.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

## 11 ANEXOS

---

Los resultados de este trabajo se presentaron en forma de cartel en los siguientes congresos:

“Análisis del Efecto Anti-alodínico de quercetina en un modelo de dolor neuropático en ratas”. XXXVII congreso nacional de farmacología 2015, México, D.F.

“Efecto anti-alodínico de haloperidol en rata con constricción crónica del nervio ciático”. XXXVIII congreso nacional de farmacología. 2016. Cancún, Quintana Roo.

“Análisis del efecto anti-hiperalgésico del compuesto N(2-morfolin-4-iletil)-2-(1naftiloxi) acetamida con afinidad por los receptores sigma-1 en el modelo de constricción crónica del nervio ciático”. Biocinves, Cinvestav-IPN; 2016. México D.F.

“Haloperidol reduce la hiperalgesia en el dolor neuropático por el antagonismo sigma-1 a nivel central”. Congreso nacional de ciencias farmacéuticas, 2017. Tequila, Jalisco, México.

“Anti-hyperalgesic effect of gabapentin, quercetin and a sigma-1 antagonist in a model of neuropathic pain in rats”. 9th Congress of the European Pain Federation EFIC. Viena, Austria 2015.

“Antiallodynic effect of a sigma-1 antagonist in a model of neuropathic pain in rats”. 45th Annual meeting of the society for Neuroscience, Chicago, IL., 2015.

“Haloperidol decreases the hyperalgesia in rats with chronic constriction of the sciatic nerve”. 46th Annual meeting of the society for Neuroscience, San Diego, CA. USA. 2016.

Finalmente, se adjuntan las publicaciones que se obtuvieron con los resultados del presente trabajo, cuyas referencias son las siguientes.

**Espinosa-Juárez JV**, Jaramillo-Morales OA, Navarrete-Vázquez G, Melo-Hernández LA, Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ. N-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1naphthyloxy)acetamide inhibits the chronic constriction injury-generated hyperalgesia via the antagonism of sigma-1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 2017; 812:1-8

**Espinosa-Juárez JV**, Jaramillo-Morales OA, López-Muñoz FJ. Haloperidol Decreases Hyperalgesia and Allodynia Induced by Chronic Constriction Injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; 6:471-479.



Full length article

## N-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1-naphthoxy)acetamide inhibits the chronic constriction injury-generated hyperalgesia via the antagonism of sigma-1 receptors



Josué Vidal Espinosa-Juárez<sup>a</sup>, Osmar Antonio Jaramillo-Morales<sup>a</sup>, Gabriel Navarrete-Vázquez<sup>b</sup>, Luis Alberto Melo-Hernández<sup>b</sup>, Myrna Déciga-Campos<sup>c</sup>, Francisco Javier López-Muñoz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, Ciudad de México 14330, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

<sup>c</sup> Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina, IPN, Ciudad de México, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Neuropathic pain  
Sigma-receptor  
BD-1063  
(+)-pentazocine  
PRE-084  
NMIN

## ABSTRACT

The most used therapeutic treatment to relieve neuropathic pain is that of neuromodulators such as anti-epileptics or anti-depressants; however, there are alternatives that may be potentially useful. The sigma-1 receptor is a therapeutic target that has shown favorable results at preclinical levels. The aim of this study was to evaluate the anti-hyperalgesic effect of N-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1-naphthoxy) acetamide (NMIN) in a chronic constriction injury model (CCI) and compare it both a sigma-1 antagonist (BD-1063) and also Gabapentin, as well as determine its possible role as an antagonist of sigma-1 receptors. The anti-hyperalgesic effects of Gabapentin (10.0, 17.8, 31.6, 56.2 and 100 mg/kg, s.c.), BD-1063 (5.6, 10.0, 17.8, 31.6 and 56.2 mg/kg, s.c.) and NMIN (31.6, 10.0, 316 mg/kg and 562 mg/kg, s.c.) were determined after single-doses, using the von Frey test in the CCI model. NMIN had the same efficacy as BD-1063, but both show less efficacy than Gabapentin. In an analysis of pharmacological potency, the ED<sub>50</sub> were compared with it being found that BD-1063 is the most potent drug, followed by Gabapentin and NMIN. The anti-hyperalgesic effect of NMIN on CCI rats was reversed by (+)-pentazocine (s.c. route) and by PRE-084 (i.t. route), both sigma-1 agonists. Furthermore, NMIN reversed the hyperalgesic effect of PRE-084 in naïve rats. These results suggest that NMIN has an anti-hyperalgesic effect on the CCI model, and that one of its mechanisms of action is as a sigma-1 antagonist, being a significant role the blocking of these receptors at the spinal level.

## 1. Introduction

Neuropathic pain is defined as, “pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system”. This pain has been difficult to treat, current treatments have had limited success rates, and these therapies are based on antidepressants (such as amitriptyline or nortriptyline), antiepileptics (Gabapentin and pregabalin), and topical lidocaine. They are considered the first-line of treatment. If there is a failure, opioids are used as second-line drugs (O’Connor and Dworkin, 2009; Watson et al., 2010).

In neuropathic pain, changes in sensitization process are developed, which causes spontaneous pain and involves maladaptive changes in the normal physiology of neurons that make up the route of nociceptive transmission, operating at both a peripheral and central level (Ueda,

2006; Gómez-Barrios and Tortorici, 2009).

It has been found that the sigma-1 receptor plays an important role in the pathophysiology of neuropathic pain (Cobos et al., 2008; Almansa and Vela, 2014). Some studies have even demonstrated expression of these receptors in areas related to processing and pain control (Wolfe et al., 1989; Alonso et al., 2000; Bangaru et al., 2013). Similarly, it has been observed that animals knocked by this receptor have an attenuated pain response (Cendán et al., 2005; Entrena et al., 2009a, 2009b; Puente et al., 2009; Nieto et al., 2014). Therefore, the use of sigma-1 receptor antagonists has been suggested for the treatment of neuropathic pain (Nieto et al., 2012; García-Martínez et al., 2016; Gris et al., 2016). It has also been proposed that the way in which the sigma-1 receptor is involved in nociceptive processes is by promoting the activation of the NMDA receptor (N-methyl-D-aspar-

\* Correspondence to: Lab. No. 7 "Dolor y Analgesia" del Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, Calz. de los Tenorios No. 235 Col. Granjas Coapa, Deleg. Tlálpán, México D.F. C.P. 14330, Mexico.

E-mail addresses: [jvidalespinosa@gmail.com](mailto:jvidalespinosa@gmail.com) (J.V. Espinosa-Juárez), [oajmorales@gmail.com](mailto:oajmorales@gmail.com) (O.A. Jaramillo-Morales), [gabriel\\_navarrete@uaem.mx](mailto:gabriel_navarrete@uaem.mx) (G. Navarrete-Vázquez), [mhla\\_ff@uaem.mx](mailto:mhla_ff@uaem.mx) (L.A. Melo-Hernández), [myrnadeciga@hotmail.com](mailto:myrnadeciga@hotmail.com) (M. Déciga-Campos), [flopez@cinvestav.mx](mailto:flopez@cinvestav.mx), [flopezm@prodigy.net.mx](mailto:flopezm@prodigy.net.mx) (F.J. López-Muñoz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.026>

Received 1 February 2017; Received in revised form 14 June 2017; Accepted 21 June 2017

Available online 23 June 2017

0014-2999/ © 2017 Published by Elsevier B.V.

tate) and facilitating sensitization in the nervous system (Kim et al., 2006, 2008; Roh et al., 2008).

Sigma-1 receptor ligands have heterogeneous structures (Collina et al., 2007; Cobos et al., 2008; Rossi et al., 2011); however, emphasis has been placed on those ligands whose structure contains a basic amino group and at least two hydrophobic substituents, being the antagonist SIRA the prototype (Díaz et al., 2012; Laurini et al., 2013). This has proven useful in neuropathic pain models of different etiologies (Gris et al., 2016). Our working group designed and synthesized the compound *N*-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1-naphthoxy)acetamide (named for practical purposes as NMIN) in order to create an alternative to the treatment of neuropathic pain, with the antagonism of the sigma-1 receptor being the therapeutic target. We previously demonstrated that the compound NMIN has been effective in reducing allodynia (pain to a stimulus that is normally not painful) after a sciatic nerve injury (García-Martínez et al., 2016). However, another condition of clinical interest in neuropathic pain is the presence of hyperalgesia (increased pain perception with a painful stimulus). Accordingly, the aim of this study has been to evaluate the effect of the NMIN compound on hyperalgesia, and to determine its role at the level of the central nervous system in the modulation of pain caused by chronic constriction of the sciatic nerve.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats [CrI(WI)FBR] (180–200 g at the time of the tests) were used in this study which were obtained from the Centre of Investigation and Advanced Studies (Cinvestav-Sede Sur). Animals were housed in a room on a 12 h light/dark cycle with food and water available ad libitum. All experimental procedures were approved by the Local Ethics Committee for the Management of Laboratory Animals of Department of Pharmacobiology of Cinvestav-Sede Sur, followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigations of Experimental Pain in Animals (Zimmermann, 1983) and the Official Mexican Norm (NOM-062-ZOO-1999). All tests were performed during the light phase. The number of experimental animals was kept to a minimum, and following the end of the study, the rats were killed immediately after the experiment by CO<sub>2</sub> overdose.

### 2.2. Compounds

NMIN was designed and synthesized in the pharmaceutical chemistry laboratory of the Faculty of Pharmacy at the Universidad Autónoma del Estado de Morelos. NMIN was dissolved in citrate buffer, pH 4. BD-1063 a Sigma-1 antagonist (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), PRE-084 a Sigma-1 agonist (Cayman chemical company, Ann Arbor, Michigan, USA) and (+)-pentazocine (a Sigma-1 agonist) were dissolved in saline solution (s.s.; 0.9% NaCl). The drugs were freshly prepared on the day of the experiments and administered subcutaneously (s.c.) in a volume of 2 ml/kg body weight or intrathecal (i.t.) route in a volume of 20 µl. Control animals received the same volume of vehicle.

### 2.3. Chronic constriction injury model

The model of neuropathic pain described by Bennett and Xie was used to generate hyperalgesia in rats, (Bennett and Xie, 1988; De Vry et al., 2004) which consists of four ligatures around the right common sciatic with a spacing of approximately 1 mm, in order to generate the chronic constriction injury (CCI). The sham group underwent the same procedure except ligatures.

### 2.4. Behavioral testing

Tests of hyperalgesia were conducted 10 days after surgery. Rats were habituated 30 min before the test, placed on an elevated wire mesh floor enclosed in acrylic containers during testing and were not removed until the completion of mechanical sensory testing. Baseline values for each type of stimulation were obtained prior to drug administration. The number of stimuli applied to the rats was determined as the minimum number. Stimuli were applied with increasing forces on the plantar surface of the right extremity in the CCI (1, 6, 10 and 15 g) and Naïve rats (6, 10, 15, 26, 60, 100 g). 10 stimuli were applied consecutively with a space of approximately 1–2 s, the responses were converted into a percent frequency (% = number of responses/10 × 100) (Xiao et al., 2007). According to the results obtained, the 15 g filament was used for the evaluation of the anti-hyperalgesic effect of the drugs.

### 2.5. Experimental design

#### 2.5.1. Systemic effect

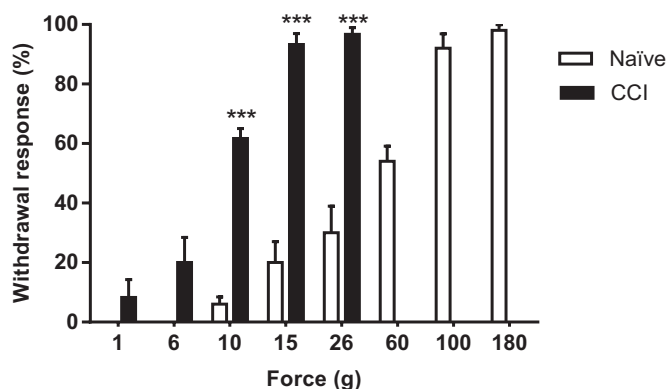
The protocol consists of recording the percentage of baseline response and, subsequently, assessing the anti-hyperalgesic effects produced by each dose of BD-1063 (5.6, 10.0, 17.8, 31.6 and 56.2 mg/kg), NMIN (31.6, 100.0, 316.0 and 562.3 mg/kg) and Gabapentin, given as a positive control (10.0, 17.8, 31.6, 56.2 and 100 mg/kg). Drugs were given individually in a volume of 2 ml/kg via subcutaneous injection to six neuropathic rats per dose. Doses with logarithmic increments were used to obtain the corresponding dose-response curve according to our laboratory pilot studies. Control rats were administered with a vehicle, in both, the CCI and sham groups. To rule out that the effect was due to motor interaction that could mask the results, the maximum dosage of each drug was evaluated in Naïve rats, and the percentage of limb withdrawal was evaluated when they were stimulated with 100 g of force. In order to determine the possible mechanism of action in the anti-hyperalgesic effect of NMIN (316 mg/kg), it was administered by systemic route (s.c.) 15 min before the selective sigma-1 agonist, (+)-pentazocine (5.6 mg/kg, s.c.). In all protocols, the rats were tested every 30 min for 180 min (3 h) post-administration.

#### 2.5.2. Intrathecal drug administration

With the purpose of determining its possible role in modulating pain at the spinal level, NMIN (10 µg) was administered individually by intrathecal route in both the CCI and sham groups, according to the methodology described by Mestre et al. (1994). Furthermore, its effect was compared to that of intrathecal doses of BD-1063 (10 µg) and Gabapentin (10 µg). In addition, NMIN (10 µg) was also administered in combination with the sigma-1 agonist PRE-084 (100 µg) in CCI rats. In order to confirm the mechanism shown by NMIN in systemic administration, unsensitized (Naïve) rats were administered with a sigma-1 agonist (PRE-084) to determine the pro-nociceptive effect. In another group, NMIN was injected 15 min before the sigma-1 agonist. Drugs were dissolved in 20 µl of vehicle and injected intrathecally. In all protocols the effect of the drugs was first evaluated 30 min after administration, with evaluations every 30 min for a total of 180 min.

### 2.6. Statistical analysis

The data are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M.). The area under the curve (AUC) values was calculated from the respective temporal course. The AUC for each dose of the assayed drug was calculated by the trapezoidal method (Gibaldi, 1991). For analysis of nociceptive sensitivity to mechanical stimulation at the different time points and under different treatment, a two-way ANOVA followed by a *post hoc* Tukey analysis was used. In the analysis of the AUC, data were compared by an one-way ANOVA test followed by a



**Fig. 1.** Response frequency (%) to tactile stimulus with von Frey filaments after unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve (black bars) or Naïve (white bars) rats. von Frey filaments were applied 10 times to the plantar hind paw, and the number of positive responses was recorded. Data were obtained 10 days after surgery, and the mean ± S.E.M. are shown, n = 6/group. \*\*\*P < 0.01 vs Naïve rats as determined by two-way ANOVA followed by Tukey test.

Tukey tests. In all of the statistical analyses, a P < 0.05 was considered statistically significant. The analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3. Results

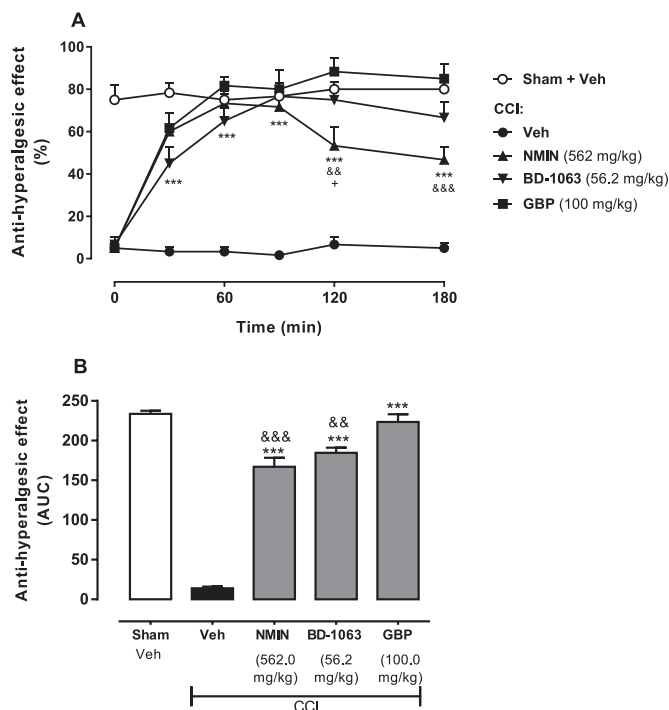
Fig. 1 shows that withdrawal responses increases forces on the plantar surface of von Frey filaments in Naïve rats and in CCI animals. Naïve rats did not respond to the stimuli of 1 and 6 g. However, a response can be observed with the filaments of 10 and 15 g (6.0 ± 2.4 and 20.0 ± 7.1% respectively). It should be added that a greater response with these same stimuli has been found in the CCI rats (61.7 ± 3.5 and 93.3 ± 3.7% respectively); therefore, they are indicative of mechanical hyperalgesia. Due to these results, we decided to use the von Frey filament of 15 g to determinate the anti-hyperalgesic effect of the drugs; moreover, a similar percentage of response is observed in the Naïve rats when stimulated with the filament of 100 g (92.0 ± 3.7%).

#### 3.1. Antinociceptive effects of drugs

The 3-h time course of the anti-hyperalgesic effects of NMIN (562.3 mg/kg), BD-1063 (56.2 mg/kg), and Gabapentin (100 mg/Kg) after a single s.c. administration was determined (Fig. 2). Vehicle administration (saline solution and citrate buffer) did not show any anti-nociceptive or pro-nociceptive effect, and no statistical differences were observed between both vehicles. In both groups (CCI and sham), the percentage baseline was remained throughout the experiment. When analyzing the time course of the dosage showing the greatest effect, the highest anti-hyperalgesic percentage for NMIN (562 mg/kg) was observed at 60 min post-administration (73.3 ± 4.2%) (Fig. 2A).

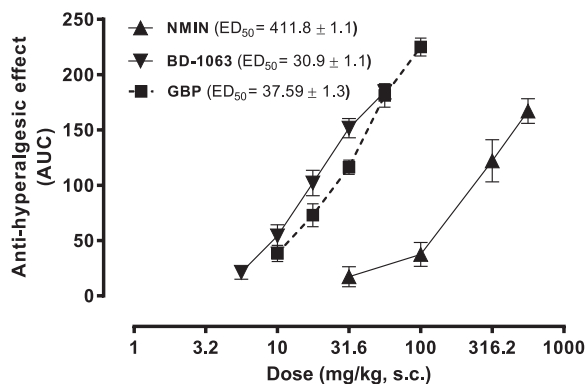
BD-1063 (56.2 mg/kg) achieved its maximum effect at 90 min post-administration, showing an anti-hyperalgesic values increase of 76.8 ± 6.1%. BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.) had a greater effect with respect to NMIN (562 mg/kg, s.c.) at 120 min (P < 0.05). Gabapentin showed maximum anti-hyperalgesic effect at 60 min post-administration with the 100.0 mg/kg s.c. dose, achieving an anti-hyperalgesic percentage increase of 81.7 ± 5.1% (Fig. 2A). NMIN had a lower effect compared to that of Gabapentin at 120 and 180 min, post-administration (P < 0.01).

The maximum value of the AUC obtained under these experimental conditions was 275 a.u., whereas an AUC of 233.8 ± 3.8 a.u. was observed in the sham group. The sham group did not show any hyperalgesic effects. NMIN (562 mg/kg, s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.), and Gabapentin (100 mg/kg, s.c.) administered individually



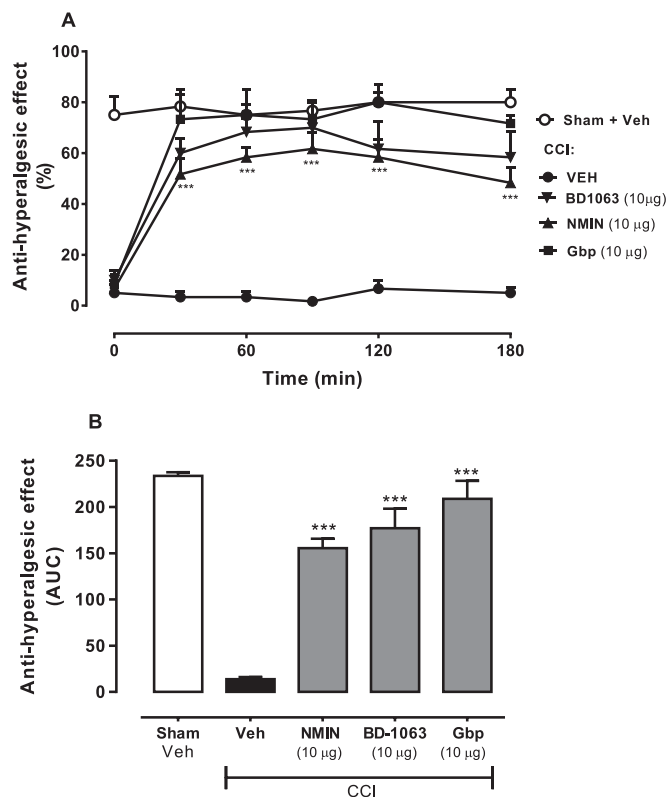
**Fig. 2.** (A) Time course of the anti-hyperalgesic effects NMIN (562 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.) after CCI. The control groups (Sham and CCI) were treated with the equivalent volumes of vehicle. Data are means ± S.E.M., n = 6/group. \*\*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.001 vs Veh; & P < 0.01, && P < 0.001 vs GBP; \*P < 0.05 vs BD-1063, as determined by two-way ANOVA followed by Tukey test. (B) Area under the curve (AUC) for the anti-hyperalgesic effect produced by control groups (Sham and CCI), NMIN (562 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.). Bars are the mean ± S.E.M., n = 6/group. \*\*\*P < 0.001 vs Veh; & P < 0.01, && P < 0.001 vs GBP as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

showed values of 167.08 ± 11.2 a.u., 184.6 ± 6.6 a.u. and 223.5 ± 8.9 a.u., respectively. They had significant differences (P < 0.001) compared to that of the CCI control group not receiving treatment (13.9 ± 1.5 a.u.), as assessed by the one-way ANOVA test followed Tukey test *post-hoc* (Fig. 2B). BD-1063 and Gabapentin showed an anti-hyperalgesic effect that increased in a dose-dependent manner, while NMIN showed significant effects from a dose of 316.2 mg/kg (Fig. 3). There was no difference in efficacy between NMIN and BD-1063; however, Gabapentin showed greater efficacy in the anti-hyperalgesic effect when compared with NMIN and BD-1063 (P < 0.01). To determine the dosage required to produce 50% of the



**Fig. 3.** Dose-response curves for the anti-hyperalgesic effects of NMIN, BD-1063 and gabapentin in CCI rats. Rats were treated with vehicle (saline solution or citrate buffer), NMIN (31.6, 100.0, 316.0 and 562.0 mg/kg, s.c.), BD-1063 (5.6, 10.0, 17.8, 31.6 and 56.2 mg/kg, s.c.) or gabapentin (10.0, 17.8, 31.6, 56.2 and 100.0 mg/kg, s.c.) Data are means ± S.E.M., n = 6/group.





**Fig. 4.** (A) Time course of the anti-hyperalgesic effects of NMIN (10 µg, i.t.), BD-1063 (10 µg, i.t.) and gabapentin (10 µg, i.t.) after CCI. The control groups (Sham and CCI) were treated with the equivalent volumes of vehicle. Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $P < 0.001$  vs Veh as determined by two-way ANOVA followed by Tukey test. (B) Area under the curve (AUC) for the anti-hyperalgesic effect produced by control groups (Sham and CCI), NMIN (10 µg, i.t.), BD-1063 (10 µg, i.t.) and gabapentin (10 µg, i.t.). Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $P < 0.001$  vs Veh as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

maximum effect ( $ED_{50}$ ), a linear logarithmic method was used. The  $ED_{50}$  values of the drugs indicated that there was a difference in anti-hyperalgesic potency: Gabapentin ( $37.59 \pm 1.3$  mg/kg, s.c.) was more potent than NMIN ( $411.8 \pm 1.1$  mg/kg, s.c.), but BD-1063 ( $30.9 \pm 1.1$  mg/kg, s.c.) was the most potent of all (Fig. 3).

### 3.2. Anti-hyperalgesic effect by intrathecal route

The NMIN compound (10 µg), when administered intrathecally, showed a decrease in hyperalgesia (anti-hyperalgesic effect) in rats with chronic constriction of the sciatic nerve. NMIN (10 µg), BD-1063 (10 µg), and Gabapentin (10 µg) showed an anti-hyperalgesic effect in the temporal course (Fig. 4A) when compared to that of the vehicle ( $P < 0.001$ ). Analyzing the effects between these drugs, no statistical differences were found during the three h of evaluation. The same tendency can be observed in the global anti-hyperalgesic effect, expressed as an area under the curve (Fig. 4B), where NMIN (10 µg) had an effect of  $155.4 \pm 11.2$  a.u., the effect of BD-1063 (10 µg) was  $177.1 \pm 21.14$  a.u., and that of Gabapentin (10 µg) was  $208.8 \pm 19.5$  a.u.

### 3.3. Inhibition of the anti-hyperalgesic effect of NMIN in the presence of the selective agonist sigma-1

In order to determine if the anti-hyperalgesic effect of NMIN could be due to sigma-1 receptor antagonism, its effect was analyzed in the presence of (+)-pentazocine, a selective agonist of such receptors. (+)-pentazocine administered subcutaneously, when stimulated with the 15 g Frey filament, did not modify the nociceptive threshold in

sensitized rats (CCI). NMIN (316 mg/kg, s.c.) had a significant anti-hyperalgesic effect in the time course with respect to the vehicle, with its greatest effect being at 30 min post-administration ( $60.0 \pm 10.2\%$ ,  $P < 0.001$ ). However, when NMIN was administered in the presence of the selective sigma-1 agonist [(+)-pentazocine] its effect was inhibited; thus, the effect was  $16.67 \pm 6.1\%$  at 30 min, and was maintained for 3 h after administration (Fig. 5A). The AUC of the anti-hyperalgesic effect of NMIN (316 mg/kg) was  $122.09 \pm 16.2$  a.u., while the combination of NMIN (316 mg/kg) plus (+)-pentazocine (5.6 mg/kg) the effect was  $28.75 \pm 12.0$  a.u. (Fig. 5B).

The anti-hyperalgesic effect of NMIN (10 µg) via intrathecal administration in CCI rats was reversed when co-administered with the agonist sigma-1 PRE-084 (100 µg, i.t.). This effect is demonstrated in the temporal course (Fig. 5C). In addition, Fig. 5D shows that the effect of NMIN (10 µg, i.t.) when expressed as an area under the curve, was  $146.8 \pm 12.2$  a.u. When the overall effect of administration of NMIN (10 µg, i.t.) + PRE-084 (100 µg, i.t.) was analyzed, it showed an effect of  $55.8 \pm 12.34$  a.u. When administered individually in sensitized rats, the Sigma-1 agonist PRE-084 (100 µg, i.t.) showed no effect on CCI.

In order to confirm if one of the mechanisms of the anti-hyperalgesic effect of NMIN is due to the antagonism of the sigma-1 receptors, we decided to employ non-sensitized (Naïve), determining first the effect of the sigma-1 agonist (PRE-084) (Fig. 6A). It should be noted that the hyperalgesic effect was dependent on the concentration being administered intrathecally. In the time course, it is shown that the concentration of 100 µg in Naïve rats was the one that triggered the greatest hyperalgesic effect, being observed at 30 min post-administration ( $68.57 \pm 14.64\%$ ). The effect decreased over of the time to  $37.14 \pm 11.13\%$  at 180 min post-administration.

Analyzing the AUC (Fig. 6B), there is a statistical difference ( $P < 0.01$ ) between the concentration of 10 µg of PRE-084 ( $127.5 \pm 8.0$  a.u.) compared with that of the vehicle. The hyperalgesic effect increased with the administration of 100 µg ( $166.1 \pm 7.5$  a.u.). Likewise, this fig. shows the result of the administration of NMIN, the hyperalgesic effect of the agonist PRE-084 is decreased to  $78.21 \pm 7.5$  a.u. in Naïve animals.

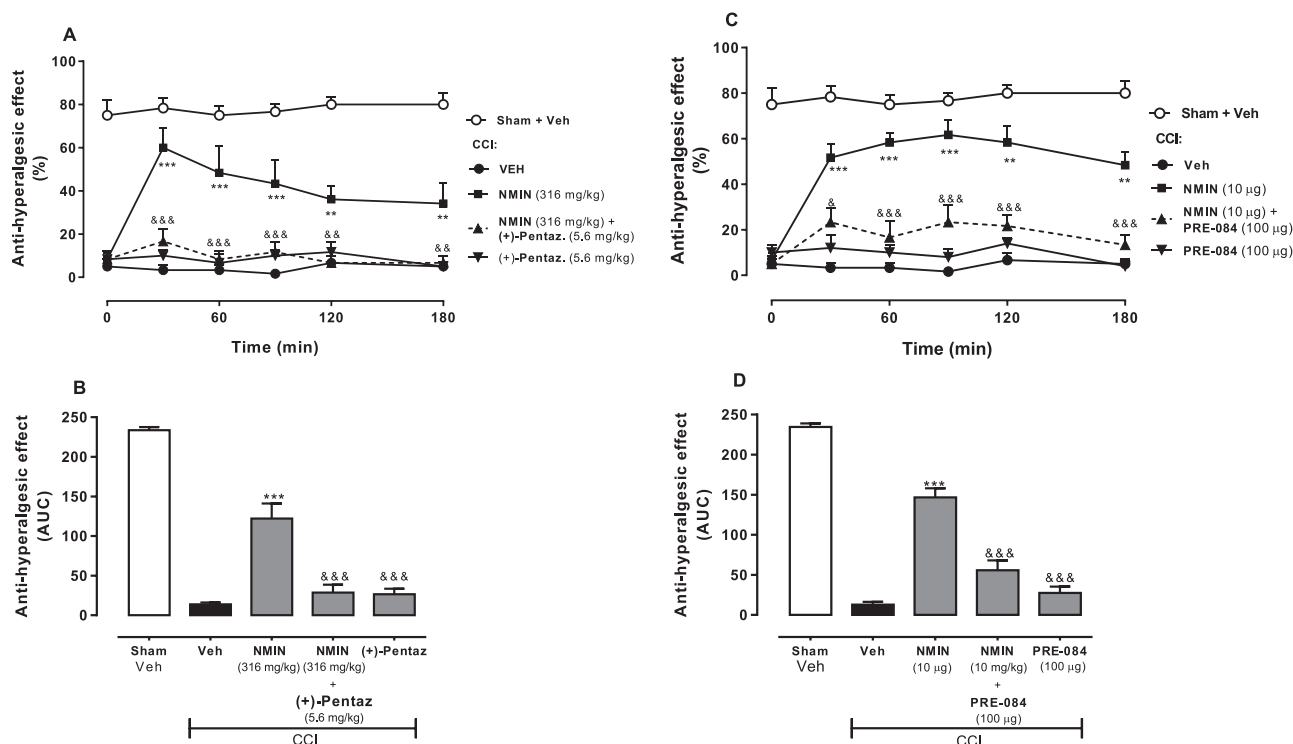
It is important to note that although intrathecal administration of the PRE-084 agonist causes an increase in sensitivity in intact rats ( $166.1 \pm 7.5$  a.u.), this is lower than that observed in CCI animals ( $286.1 \pm 2.2$  a.u.).

### 3.4. Withdrawal response in Naïve rats

The effect of limb withdrawal was evaluated in Naïve rats for 3 h after drug administration. A force of 100 g was used, which induces a response similar to that observed in the CCI rats with the 15 g filament. The results showed that there was no alteration in the response during the experiment period, and that the responses remained constant (Fig. 7) because the administration of NMIN (562 mg/kg, s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.), and Gabapentin (100 mg/kg, s.c.) was not different from the effect shown by administration of the vehicle.

### 3.5. Molecular docking

With the aim of determining the interaction form of the NMIN compound with the sigma-1 receptor, it was docked into the receptor-binding site obtained from Protein Data Bank (PDB ID: 5HK2) as reported by Schmidt et al. (2016). The docked complex with lowest binding energy was selected ( $-10.99$  kcal/mol). The three-dimensional structure of the protein was. Figs. 8A and B show a two and three-dimensional graph of the binding of the NMIN compound to the receptor. Interaction of the amide proton with the residue Glu172 was observed, a double interaction of the ionizable amine of the heterocycle with Glu172 was further observed, as was an interaction of  $\pi$ - $\pi$  with Tyr103. Although no binding to the amino acid Asp126 was observed,



**Fig. 5.** (A) Time course of the anti-hyperalgesic effects NMIN (316 mg/kg, s.c.), (+)-pentazocine (5.6 mg/kg, s.c.) and NMIN (316 mg/kg s.c.) + (+)-pentazocine (5.6 mg/kg) after CCI. The control groups (Sham and CCI) were treated with the equivalent volumes of vehicle. Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$  vs Veh; & &  $P < 0.01$ , & &  $P < 0.001$  vs NMIN (316 mg/kg) as determined by two-way ANOVA followed by Tukey test. (B) Area under the curve (AUC) for the anti-hyperalgesic effect produced by control groups (Sham and CCI), NMIN (316 mg/kg s.c.), (+)-pentazocine (5.6 mg/kg, s.c.) and NMIN (316 mg/kg s.c.) + (+)-pentazocine (5.6 mg/kg). Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $P < 0.001$  vs Veh; & &  $P < 0.001$  vs NMIN (316 mg/kg) as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test. (C) Time course of the anti-hyperalgesic effects NMIN (10  $\mu$ g, i.t.), PRE-084 (100  $\mu$ g, i.t.) and NMIN (10  $\mu$ g, i.t.) + Pre-084 (100  $\mu$ g, i.t.) after CCI. The control groups (Sham and CCI) were treated with 20  $\mu$ l of vehicle. Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Veh; &  $P < 0.05$ , & &  $P < 0.001$  vs NMIN (10  $\mu$ g, i.t.) as determined by two-way ANOVA followed by Tukey test. (D) Area under the curve (AUC) for the anti-hyperalgesic effect produced by control groups (Sham and CCI), NMIN (10  $\mu$ g, i.t.), Pre-084 (100  $\mu$ g, i.t.) and NMIN (10  $\mu$ g, i.t.) + Pre-084 (100  $\mu$ g, i.t.). Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $P < 0.001$  vs Veh; & &  $P < 0.001$  vs NMIN (10  $\mu$ g, i.t.) as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

it should be noted that it is close to the interaction of NMIN with the receptor.

#### 4. Discussion

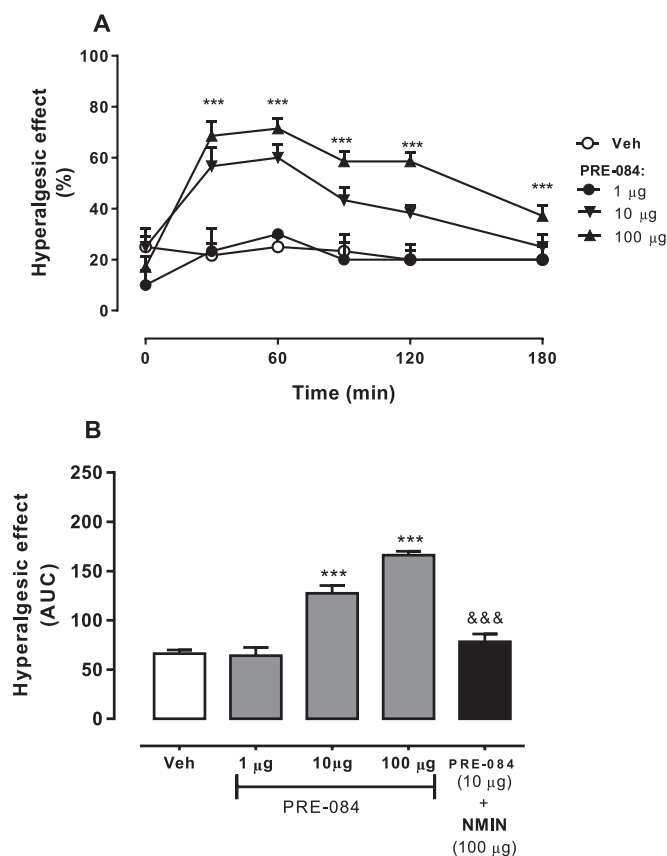
In the present work, the effect of NMIN in a specific neuropathic pain condition it was evaluated, such as hyperalgesia in the chronic constriction injury. This model simulates chronic nerve compression and expresses pathological properties (hyperalgesia included) of neuropathic pain in humans, occurring in nerve entrapment neuropathy or spinal root irritation caused by lumbar disk herniation (Bennett and Xie, 1988). Ten days post-injury, the animals showed an increase in responses to the hyperalgesic stimulus (15 g von Frey filament), data similar to that of previous studies (De la O-Arciniega et al., 2009).

Current therapy proposes the use of such drugs as topical lidocaine, anticonvulsants, and/or tricyclic antidepressants for the treatment of pain (O'Connor and Dworkin, 2009). However, preclinical level evidence suggests the possible usefulness of sigma-1 receptor antagonist drugs. In this sense, various receptor-antagonizing compounds have shown an anti-nociceptive effect in animal models (Kim et al., 2008; Son and Kwon, 2010; Nieto et al., 2012; Romero et al., 2012; Bangaru et al., 2013). Consequently, our working group synthesized the NMIN [N-2-morpholin-4-ylethyl-2-(1-naphthyl)oxy] acetamide, in order to find an alternative to counter this pathological condition. Although NMIN is a relatively simple chemical structure, the distance between the lipophilic aromatic residue and the basic nitrogen atom of the morpholine ring is probably sufficient to address the second hydrophobic binding site of the sigma-1 receptor as proposed by the pharmacophoric model of Glennon (Glennon et al., 1994). The size of the morpholine ring is just enough to interact with the first hydro-

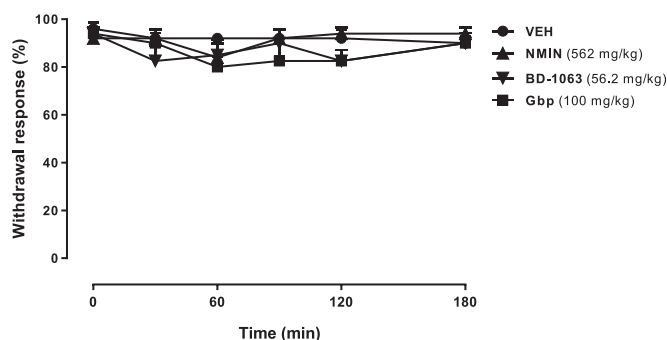
phobic binding pocket (Navarrete-Vázquez et al., 2016).

In our results, NMIN reversed the hyperalgesic behavior provoked by stimulation with the von Frey filament (15 g). In the analysis of the area under the curve, NMIN shows the same efficacy as that of BD-1063. However, according to our results, it did not present the same  $DE_{50}$ , and showed less potency than BD-1063. This phenomenon could be explained by affinity, because the  $K_i$  for NMIN is 324 nM and 9.15 nM for BD-1063 (García-Martínez et al., 2016; Matsumoto et al., 1995). Therefore, a greater amount is required to obtain the same level of effect as when NMIN is used. On the other hand, Gabapentin was considered as a reference, a compound whose mechanism of action is due to its binding to the  $\alpha_2\text{-}\delta$  subunit of the calcium channels, thus regulating the entry of calcium and consequently releasing excitatory neurotransmitters into the pain-signaling pathway (Costigan and Woolf, 2000; Rose and Kam, 2002; Ueda, 2006; Cheng and Chiou, 2006). At its highest dose, NMIN did not reach the efficacy shown by Gabapentin, besides its  $ED_{50}$  was higher. Having been observed in other studies however, it has not been ruled out that using other therapeutic strategies, such as the use of combinations, can achieve better results. Furthermore, is also possible to decrease the dosage of those compounds that may have adverse effects (López-Muñoz et al., 1994; De la O-Arciniega et al., 2009). In our study, the maximum dosage of each drug administered subcutaneously in Naïve rats were evaluated. It was observed that there were no changes in the response to the mechanical stimulus, suggesting that there is no alteration in perception or that some motor alteration could be responsible for the anti-hyperalgesic effects.

As previously mentioned, the dorsal spinal cord is an important site in the regulation of pain modulation (Kim et al., 2006, 2008), which is why we decided to establish its anti-hyperalgesic participation at the



**Fig. 6.** (A) Time course of the hyperalgesic effects of PRE-084 (1.0, 10.0 and 100.0 µg, i.t.) in naïve rats. The control groups were treated with the equivalent volumes of vehicle (i.t.). Data are means ± S.E.M., n = 6/group\*\*\*P < 0.001 vs Veh as determined by two-way ANOVA followed by Tukey test. (B) Area under the curve (AUC) for the hyperalgesic effect produced by control groups (vehicle), PRE-084 (1.0, 10.0 and 100.0 µg, i.t.) in naïve rats and PRE-084 (10 µg, i.t.) + NMIN (100.0 µg, i.t). Bars are the mean ± S.E.M., n = 6/group. \*\*\*P < 0.001 vs Veh; &&&P < 0.001 vs PRE-084 (100 µg, i.t) as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.



**Fig. 7.** Time course of withdrawal response to tactile stimulus with von Frey filaments (100 g) in naïve rats administered with NMIN (562 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.). von Frey filaments were applied 10 times to the plantar hind paw, and the number of positive responses were recorded. The mean ± S.E.M. is shown, n = 6/group. There is no statistical difference determined by two-way ANOVA.

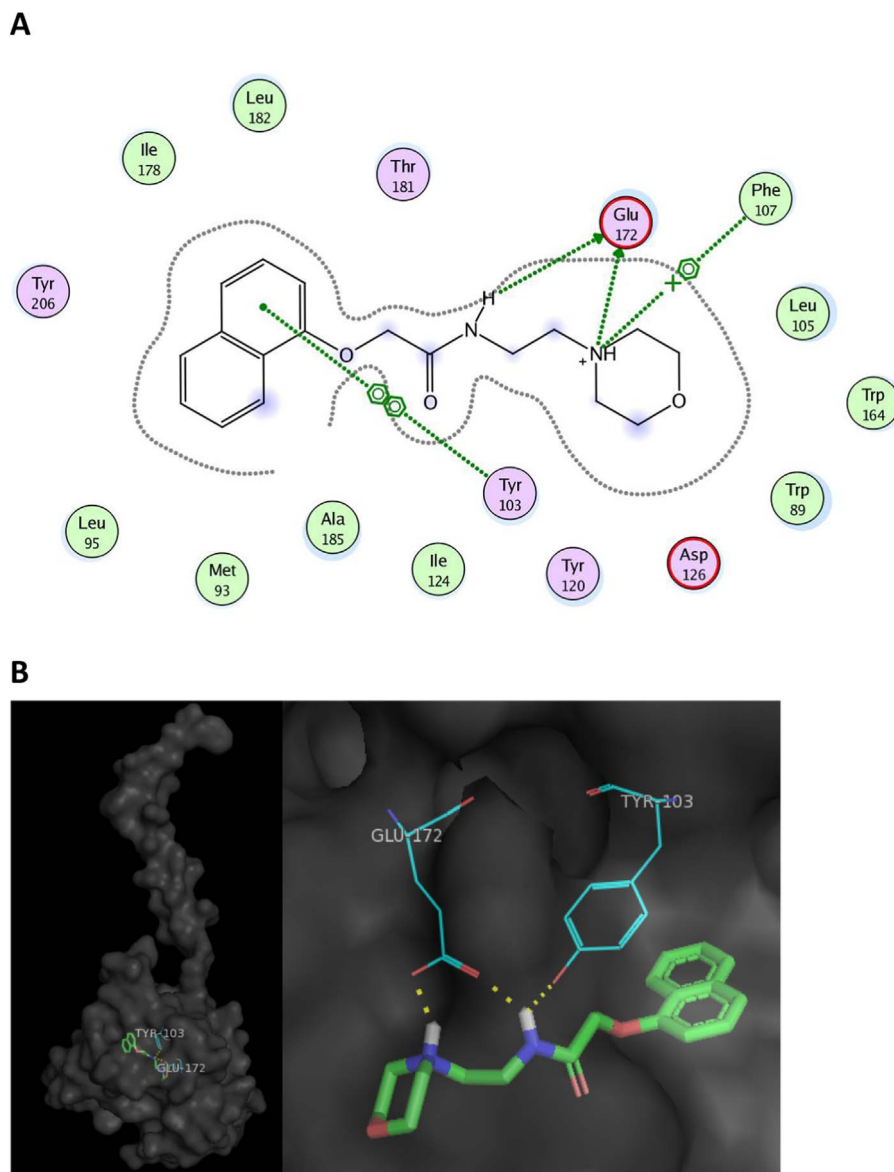
level of the spinal cord in addition to its systemic effect. In that sense, it was shown that one of the sites where NMIN acts is at the spinal level; in addition, NMIN had a similar effect to that of Gabapentin and BD-1063 at the same drug concentrations.

Another interesting finding in our work was determining the role of NMIN as a sigma-1 antagonist in the anti-hyperalgesic effect. Several methodologies were performed, one of which was the systemic administration of NMIN in the presence of the selective agonist, (+)-penta-

zocine. In addition, the PRE-084 agonist also reversed the effect shown by NMIN via intrathecal. With the objective of confirming these findings, the sigma-1 agonist was used to generate a hyperalgesic effect; this was inhibited when administered in conjunction with NMIN by the same route. Furthermore, our results show that NMIN can interact with critical ligand-binding sites present at the sigma-1 receptor such as Tir103 and Glu172 (Seth et al., 2001; Schmidt et al., 2016). Although there is no interaction with other important binding sites such as ASP126, this was shown to be close to the interaction. Together, these results help to elucidate that NMIN provokes an anti-hyperalgesic effect by acting as an antagonist of the sigma-1 receptors. Moreover, the results allows us to deduce the importance of sigma-1 receptors and their activation in the pathophysiology of neuropathic pain, as has been demonstrated in other studies. Hence, the antagonism of sigma-1 receptors is an important therapeutic target in the broad list of treatment that exists for this painful condition (Entrena et al., 2009a, 2009b; Maurice and Su, 2009; Nieto et al., 2012; Choi et al., 2013).

It is important to mention that there are contradictory studies regarding the modulation of pain of sigma-1 receptors under non-sensitization conditions. Initially, reports indicated that the administration of an agonist could not generate nociceptive behavior (Entrena et al., 2009a, 2009b; Sánchez-Fernández et al., 2014). However, recent evidence indicates, that, it is possible to generate nociception with the administration of sigma-1 agonists (Roh et al., 2008; Yoon et al., 2010; Choi et al., 2013). This data is consistent with our results, since the administration of the compound PRE-084 was able to generate hyperalgesia evoked by stimulation with the 15 g von Frey filament. The discrepancies in the evidence could be due to experimental conditions; in our results, systemic or intrathecal administration of two sigma-1 agonists ((+)-pentazocine and PRE-084) in CCI showed no effect. In this case, these data can be explained because when there is a lesion, there is a maximum response threshold when the animals are stimulated, which makes it impossible to observe a superior effect. On the other hand, it is possible to observe the pro-nociceptive effect when activating sigma-1 receptors in lesion-free rats, as previously has been reported (Roh et al., 2008).

The anti-hyperalgesic effect of NMIN can be supported by those who have reported that, in neuropathic pain, there is an increase in the expression of the sigma-1 receptor in areas that control pain, especially in the spinal cord, which is known to be the key to the control of pain (Puente et al., 2009; Bangaru et al., 2013; Choi et al., 2016). Under normal conditions there is a basal level of the protein, but once the lesion occurs there is an increase in its expression, thus activation is likely a consequence of the initial injury and subsequently the sigma-1 receptor plays an important role in the establishment of neuropathic pain (Roh et al., 2008; Choi et al., 2016). Accordingly, It has been determined that the activation of sigma-1 receptors evoke an interaction within the NR1 subunit of the NMDA receptor, causing an increase in glutamatergic signaling of painful pathways (Choi et al., 2016; Roh et al., 2008; Yoon et al., 2010). Otherwise, there is little evidence of a regulation of the GABAergic system by the sigma-1 receptors, there is a report suggesting that the activation of the sigma-1 receptors generates a decrease in this neurotransmission system that could be contributing to deregulation in sensitization (Mtchedlishvili and Kapur, 2003). Thus, it is possible that by the antagonism of the sigma-1 receptor, the GABAergic neurotransmission can be reestablished, although future experiments are necessary to clarify it. Besides, it has also been suggested that sigma-1 receptors play an important role in the modulation of the opioidergic pathway in the transmission of pain. It has been proposed that this promotes a kind of braking action for the activation of opioid receptors, and the activation of the sigma-1 receptor may even increase the inhibitory tone of the analgesic effect of opioids (Sánchez-Fernandez et al., 2013). It has not been ruled out that, in these conditions, a similar effect could be generated, one which favors the activation of the GABAergic and the opioid systems, as well



**Fig. 8.** (A) Two-dimensional interaction diagram of the predicted binding mode of NMIN with sigma-1 receptor. (B) Three-dimensional bonding model into the active site of sigma-1 receptor.

as inhibiting the activation of the NMDA receptor by the sigma-1 antagonism.

In summary, the present work shows evidence of anti-hyperalgesic activity in the NMIN compound, and suggests that the mechanism by which it acts is as a sigma-1 antagonist, thereby having an important participation at the spinal level. It has not been ruled out that other mechanisms could be involved. These results are intended to broaden the range of compounds that are specifically designed to act as a sigma-1 antagonist and to propose alternatives in the treatment of neuropathic pain at the preclinical level.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. dissertation of Josué Vidal Espinosa-Juárez. We wish to thank L. Oliva and S. Ledezma for technical assistance. Espinosa-Juárez (No. 261836) and Jaramillo-Morales (No.

24335) thank fellowship by Council for Science and Technology (CONACYT).

#### References

- Almansa, C., Vela, J.M., 2014. Selective sigma-1 receptor antagonists for the treatment of pain. *Futur. Med. Chem.* 6, 1179–1199.
- Alonso, G., Phan, V.-L., Guillemain, I., Saunier, M., Legrand, A., Anoa, M., Maurice, T., 2000. Immunocytochemical localization of the sigma1 receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97, 155–170.
- Bangaru, M.L., Weihrauch, D., Tang, Q.-B., Zoga, V., Hogan, Q., Wu, H., 2013. Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Mol. Pain* 9, 47.
- Bennett, G.J., Xie, Y.-K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Cendán, C.M., Pujalte, J.M., Portillo-Salido, E., Montoliu, L., Baeyens, J.M., 2005. Formalin-induced pain is reduced in  $\sigma_1$  receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 511, 73–74.
- Cheng, J.-K., Chiou, L.-C., 2006. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 471–486.
- Choi, S.-R., Moon, J.-Y., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kwon, S.-G., Choi, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Beitz, A.J., Lee, J.-H., 2016. Spinal D-serine increases PKC-dependent GluN1 phosphorylation contributing to the sigma-1 receptor-induced development of mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J. Pain* 18, 415–427.
- Choi, S.R., Roh, D.H., Yoon, S.Y., Kang, S.Y., Moon, J.Y., Kwon, S.G., Choi, H.S., Han,

- H.J., Beitz, A.J., Oh, S.B., Lee, J.H., 2013. Spinal sigma-1 receptors activate NADPH oxidase 2 leading to the induction of pain hypersensitivity in mice and mechanical allodynia in neuropathic rats. *Pharmacol. Res.* 74, 56–67.
- Cobos, E.J., Entrena, J.M., Nieto, F.R., Cendán, C.M., Pozo, E. Del, 2008. Pharmacology and therapeutic potential of sigma 1 receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 344–366.
- Collina, S., Loddó, G., Urbano, M., Linati, L., Callegari, A., Ortuso, F., Alcaro, S., Laggner, C., Langer, T., Prezzavento, O., Ronsisvalle, G., Azzolina, O., 2007. Design, synthesis, and SAR analysis of novel selective sigma1 ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 771–783.
- Costigan, M., Woolf, C.J., 2000. Pain: molecular mechanisms. *J. Pain* 1, 35–44.
- De la O-Arciniegua, M., Díaz-Reval, M.I., Cortés-Arroyo, A.R., Domínguez-Ramírez, A.M., López-Muñoz, F.J., 2009. Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 457–464.
- De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P., Eckel, G., 2004. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 491, 137–148.
- Díaz, J.L., Cuberes, R., Berrocal, J., Contijoch, M., Christmann, U., Fernández, A., Port, A., Holenz, J., Buschmann, H., Laggner, C., Serafini, M.T., Burgueño, J., Zamanillo, D., Merlos, M., Vela, J.M., Almansa, C., 2012. Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of  $\sigma_1$  receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). *J. Med. Chem.* 55, 8211–8224.
- Entrena, J.M., Cobos, E.J., Nieto, F.R., Cendán, C.M., Baeyens, J.M., Del Pozo, E., 2009a. Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. *Psychopharmacology* 205, 21–33.
- Entrena, J.M., Cobos, E.J., Nieto, F.R., Cendán, C.M., Gris, G., Del Pozo, E., Zamanillo, D., Baeyens, J.M., 2009b. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain* 143, 252–261.
- García-Martínez, B.A., Jaramillo-Morales, O.A., Espinosa-Juárez, J.V., Navarrete-Vázquez, G., Melo-Hernández, L.A., Medina-López, J.R., Domínguez-Ramírez, A.M., Schepmann, D., Wunsch, B., López-Muñoz, F.J., 2016. Antinociceptive effects of a new sigma-1 receptor antagonist (N-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1-naphthyloxy)acetamide) in two types of nociception. *Eur. J. Pharmacol.* 771, 10–17.
- Gibaldi, M., 1991. Estimation of area under the curve. In: Philadelphia (Ed.), *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, pp. 377–378.
- Glennon, R.A., Ablordepey, S.Y., Ismaiel, A.M., el-Ashmawy, M.B., Fischer, J.B., H.K., 1994. Structural features important for sigma 1 receptor binding. *J. Med. Chem.* 15, 1214–1219.
- Gómez-Barríos, J.V., Tortorici, V., 2009. Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica. *Arch. Venez. Farmacol. Ter.* 28, 2–11.
- Gris, G., Portillo-Salido, E., Aubel, B., Darbaky, Y., Deseure, K., Vela, J.M., Merlos, M., Zamanillo, D., 2016. The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats. *Sci. Rep.* 6, 24591.
- Kim, H.-W., Kwon, Y.-B., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Han, H.-J., Kim, K.-W., Beitz, A.J., Lee, J.-H., 2006. Intrathecal treatment with sigma1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br. J. Pharmacol.* 148, 490–498.
- Kim, H.-W., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kwon, Y.-B., Han, H.-J., Kim, K.-W., Beitz, a.J., Lee, J.-H., 2008. Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1125–1134.
- Laurini, E., Da Col, V., Wunsch, B., Pricl, S., 2013. Analysis of the molecular interactions of the potent analgesic S1RA with the  $\sigma_1$  receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 2868–2871.
- López-Muñoz, F.J., Villalón, C.M., Terrón, J.A., Salazar, L.A., 1994. Analgesic interactions produced by dipyrone and either morphine or D-propoxyphene in the pain-induced functional impairment model in rat. *Drug Dev. Res.* 32, 50–57.
- Matsumoto, R.R., Bowen, W.D., Tom, M.A., Vo, V.N., Truong, D.D., Costa, B.R. De, 1995. Characterization of two novel  $\sigma$ -receptor ligands "antidystonic effects in rats suggest sigma-1 receptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* 280, 301–310.
- Maurice, T., Su, T.-P., 2009. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* 124, 195–206.
- Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A., 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 32, 197–200.
- Mtchedlishvili, Z., Kapur, J., 2003. A presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on GABAergic synaptic transmission. *Mol. Pharmacol.* 64, 857–864.
- Navarrete-Vázquez, G., Austrich-Olivares, A., Godínez-Chaparro, B., Hidalgo-Figueroa, S., Estrada-Soto, S., Hernández-Núñez, E., Torres-Gómez, H., Schepmann, D., Wunsch, B., 2016. Discovery of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-N-(2-morpholin-4-ylethyl)acetamide: a selective  $\sigma_1$  receptor ligand with antinociceptive effect. *Biomed. Pharmacother.* 79, 284–293.
- Nieto, F.R., Cendán, C.M., Sánchez-Fernández, C., Cobos, E.J., Entrena, J.M., Tejada, M.A., Zamanillo, D., Vela, J.M., Baeyens, J.M., 2012. Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *J. Pain* 13, 1107–1121.
- Nieto, F.R., Cendán, C.M., Cañizares, F.J., Cubero, M.A., Vela, J.M., Fernández-Segura, E., Baeyens, J.M., 2014. Genetic inactivation and pharmacological blockade of sigma-1 receptors prevent paclitaxel-induced sensory-nerve mitochondrial abnormalities and neuropathic pain in mice. *Mol. Pain* 10, 11.
- O'Connor, A.B., Dworkin, R.H., 2009. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am. J. Med.* 122, S22–S32.
- Puente, B., de la, Nadal, X., Portillo-Salido, E., Sánchez-Arroyos, R., Ovalle, S., Palacios, G., Muro, A., Romero, L., Entrena, J.M., Baeyens, J.M., López-García, J.A., Maldonado, R., Zamanillo, D., Vela, J.M., 2009. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* 145, 294–303.
- Roh, D.-H., Kim, H.-W., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kwon, Y.-B., Kim, K.-W., Han, H.-J., Beitz, A.J., Lee, J.-H., 2008. Intrathecal administration of sigma-1 receptor agonists facilitates nociception: involvement of a protein kinase C-dependent pathway. *J. Neurosci. Res.* 86, 3644–3654.
- Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., Montero, A., Muro, A., Bura, A., Segalés, C., Laloya, M., Hernández, E., Portillo-Salido, E., Escriche, M., Codony, X., Encina, G., Burgueño, J., Merlos, M., Baeyens, J., Giraldo, J., López-García, J.A., Maldonado, R., Plata-Salamán, C.R., Vela, J.M., 2012. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2289–2306.
- Rose, M.A., Kam, P.C.A., 2002. Gabapentin: pharmacology and its use in pain management. *Anaesthesia* 57, 451–462.
- Rossi, D., Pedrali, A., Urbano, M., Gaggeri, R., Serra, M., Fernández, L., Fernández, M., Caballero, J., Ronsisvalle, S., Prezzavento, O., Schepmann, D., Wuensch, B., Peviani, M., Curti, D., Azzolina, O., Collina, S., 2011. Identification of a potent and selective  $\sigma_1$  receptor agonist potentiating NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6210–6224.
- Sánchez-Fernández, C., Montilla-García, Á., González-Cano, R., Nieto, F.R., Romero, L., Artacho-Cordón, A., Montes, R., Fernández-Pastor, B., Merlos, M., Baeyens, J.M., Entrena, J.M., Cobos, E.J., 2014. Modulation of peripheral  $\mu$ -opioid analgesia by  $\sigma_1$  receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 348, 32–45.
- Seth, P., Ganapathy, M.E., Conway, S.J., Bridges, C.D., Smith, S.B., Casellas, P., Ganapathy, V., 2001. Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1540, 59–67.
- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., Kruse, A.C., 2016. Crystal structure of the human  $\sigma_1$  receptor. *Nature* 28, 527–530.
- Son, J.S., Kwon, Y.B., 2010. Sigma-1 receptor antagonist BD1047 reduces allodynia and spinal ERK phosphorylation following chronic compression of dorsal root ganglion in rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 14, 359–364.
- Ueda, H., 2006. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 109, 57–77.
- Watson, C.P., Gilron, I., Sawynok, J., 2010. A qualitative systematic review of head-to-head randomized controlled trials of oral analgesics in neuropathic pain. *Pain Res. Manag.* 15, 147–157.
- Wolfe, S.A.J., Culp, S.G., de Souza, E.B., 1989. Sigma-receptors in endocrine organs: identification, characterization, and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary. *Endocrinology* 124, 1160–1172.
- Xiao, W., Boroujerdi, A., Bennett, G.J., Luo, Z.D., 2007. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. *Neuroscience* 144, 714–720.
- Yoon, S.Y., Roh, D.H., Seo, H.S., Kang, S.Y., Moon, J.Y., Song, S., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2010. An increase in spinal dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances NMDA-induced pain via phosphorylation of the NR1 subunit in mice: involvement of the sigma-1 receptor. *Neuropharmacology* 59, 460–467.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

# Haloperidol Decreases Hyperalgesia and Allodynia Induced by Chronic Constriction Injury

Josué Vidal Espinosa-Juárez, Osmar Antonio Jaramillo-Morales and Francisco Javier López-Muñoz

Department of Pharmacobiology, Cinvestav-Coapa, Mexico city, Mexico

(Received 21 April 2017; Accepted 21 June 2017)

**Abstract:** Neuropathic pain has proven to be a difficult condition to treat, so investigational therapy has been sought that may prove useful, such as the use of sigma-1 antagonists. Haloperidol (HAL) is a compound that shows a high affinity with these receptors, acting as an antagonist. Therefore, the objective of this study was to demonstrate its effect in an experimental model of neuropathic pain and corroborate its antagonistic action of the sigma-1 receptors under these conditions. BD-1063 was used as a sigma-1 antagonist control, and gabapentin (Gbp) was used as a positive control. The antihyperalgesic and anti-allodynic effects of the drugs were determined after single-dose trials. In every case, the effects increased in a dose-dependent manner. HAL had the same efficacy as both BD-1063 and Gbp. In the analysis of pharmacological potency, in which the ED<sub>50</sub> were compared, HAL was the most potent drug of all. The effect of HAL on chronic constriction injury (CCI) rats was reversed by the sigma-1 agonist (PRE-084). HAL reversed the hyperalgesic and allodynic effects of PRE-084 in naïve rats. The dopamine antagonist, (-)-sulpiride, showed no effect in CCI rats. These results suggest that HAL presents an antinociceptive effect via sigma-1 receptor antagonism at the spinal level in the CCI model.

Neuropathic pain is characterized by an alteration in the nervous system and is a condition which significantly affects people's quality of life [1,2]. Pharmacological therapy mainly consists of the use of antiepileptic drugs such as gabapentin (Gbp) or pregabalin, tricyclic antidepressants or topical treatments such as capsaicin and lidocaine [3–5]. However, the fact that not all patients respond adequately to current treatments makes it necessary to extend the search for therapies by exploring new strategies using different mechanisms of action. In this sense, it has been suggested that sigma-1 antagonists play an important role in the modulation of pain [6–8].

It is known that when neuropathic pain exists, there is an activation of the sigma-1 receptor, which acts as a chaperone in the modulation of various proteins; being the effect most studied, the stabilization of the receptor to IP<sub>3</sub> in the membrane of the mitochondria promotes an output of calcium to the cytosol, thereby triggering multiple signalling pathways, one of them being the activation of the NMDA receptor, which is involved in the generation and maintenance of pain [9–11]. Subsequently, a sigma-1 antagonist has been proposed as an investigational therapy to counter this painful condition.

Previous reports have shown that the sigma-1 receptor, in spite of being a chaperone, has activity that can be modulated by diverse ligands that act as agonists or antagonists [12,13]. One of the compounds having a high affinity with sigma-1 receptors is haloperidol or 'HAL' [14–16], a butyrophenone first synthesized in 1958 by Janssen, a Belgian pharmaceutical

company, describing its activity as a dopaminergic antagonist [17]. HAL was synthesized with the idea of treating psychosis present in schizophrenia, but in some studies, it has been mentioned that HAL has analgesic activity and that this response is mediated mainly by the sigma-1 receptor antagonism [14–16,18]. Nevertheless, when regarding its use specifically for the treatment of neuropathic pain, there is no evidence to prove its effectiveness in treating this condition. Therefore, the aim of this work has been to pharmacologically characterize the effect of HAL in an experimental condition of neuropathic pain.

## Materials and Methods

**Animals.** A total of 270 male Wistar rats [Cri(WI)fBR] (100–120 g at the time of the surgery) were used in this work which were obtained from the Centre of Investigation and Advanced Studies (Cinvestav-Sede Coapa). The animals were housed in a room in a 12-hr light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Local Ethics Committee for the Management of Laboratory Animals of Department of Pharmacobiology of Cinvestav-Sede Coapa, followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigations of Experimental Pain in Animals [19] and the Official Mexican Norm (NOM-062-ZOO-1999). All tests were performed during the light phase. The number of experimental animals was kept to a minimum, and after the end of the study, the rats were killed immediately after the experiment by CO<sub>2</sub> overdose.

**Compounds.** Haloperidol (MP Biomedicals, Illkirch, France), Gbp (RIMSA laboratories, Mexico City, Mexico), BD-1063 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) and PRE-084 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) were used. HAL was dissolved in citrate buffer, pH 4; Gbp, BD-1063 and PRE-084 were dissolved in saline solution (s.s.; 0.9% NaCl). The drugs were prepared on the day of the experiments and administered

Author for correspondence: Francisco Javier López-Muñoz, Lab. No. 7 "Pain & Analgesia" of the Department of Pharmacobiology, Cinvestav-Coapa, Calz. de los Tenorios No. 235 Col. Granjas Coapa, Deleg. Tlálpán, Ciudad de México, C.P. 14330, México (e-mails flopezm2@gmail.com, flopez@cinvestav.mx).

subcutaneously (s.c.) in a volume of 2 mL/kg body-weight or intrathecal (i.t.) route in a volume of 20  $\mu$ L. Control animals received the same volume of vehicle.

**Chronic constriction injury model.** The model of neuropathic pain described by Bennett and Xie was used to generate hyperalgesia and allodynia in the rats [20,21]. The rats were anaesthetized by an intraperitoneal (i.p.) injection of a ketamine/xylazine mixture (50:7.5 mg/kg). Later, the right common sciatic nerve was exposed and four ligatures were placed with a spacing of approximately 1 mm, in order to generate the chronic constriction injury (CCI). The sham group underwent the same procedure except ligatures.

**Behavioural testing.** Ten days after surgery, the behaviour such as allodynia and hyperalgesia in the rats was determined. The rats had an adaptation period of 30 min. on the day of the test. They were placed on a raised surface in acrylic containers. The determination of hyperalgesia consisted of stimulations with the Von Frey filament of 15 g, because previous reports have shown that this stimulus is considered as hyperalgesic [22]. Ten stimuli were applied with a space of approximately 1–2 sec., and the responses were converted into a per cent frequency ( $\% = \text{number of responses}/10 \times 100$ ) [23]. Five minutes after the last Von Frey filament test, the acetone test was performed (cold allodynia). With the animals inside acrylic cages on the elevated grid, 100  $\mu$ L of acetone was applied to the surface of the hind paw, without touching the skin, using a blunt plastic needle connected to a syringe. The duration of lifting of the hind paw after acetone stimuli during 1 min. was recorded [24]. Subsequently, the response obtained was converted into a per cent ( $\% = \text{response to time}/\text{response basal} \times 100$ ).

**Experimental design.** Figure 1 shows the complete sets of experiments performed. Set 1 corresponds to development of allodynia and hyperalgesia evaluated for 15 days after sciatic nerve ligation. Sets 2 and 3 represent the protocols of systemic drug administrations, while sets 4 and 5 correspond to the effects of the drugs when given intrathecally.

**Systemic effect.** The assessment of acute effect on baseline hyperalgesia and allodynia was recorded prior to the administration of the drugs. Doses with logarithmic increments were used. The experimental protocol consisted of assessing the antinociceptive effects produced by each dose of HAL (0.017, 0.032, 0.056, 0.100, 0.178 mg/kg), BD-1063 (5.6, 10.0, 17.8, 31.6 and 56.2 mg/kg) and Gbp (positive control) (10.0, 17.8, 31.6, 56.2 and 100 mg/kg). They were given individually in a volume of 2 mL/kg by subcutaneous route to six neuropathic rats per dose to obtain the corresponding dose–response curves. Control rats were administered with a vehicle in both the CCI and sham groups. The rats were tested every 30 min. for 180 min. (3 hr), after administration. To clarify the possible mechanism of action in the antihyperalgesic and anti-allodynic effects of HAL, it was administered by systemic route (s.c.) 15 min. before the selective sigma-1 agonist PRE-084 (31.6 mg/kg).

**Intrathecal drug administration.** For the purpose of determining the possible role of HAL at the spinal level in the modulation of pain, as well as to confirm the mechanism action, HAL (0.1, 1.0, 10  $\mu$ g) was administered individually through the intrathecal route according to the methodology described by Mestre *et al.* [25], in both the CCI and sham groups. (-)-Sulpiride (Sulp) (100  $\mu$ g) was administered to rule out the dopaminergic role of haloperidol (HAL) in its antinociceptive mechanism of action and HAL (10  $\mu$ g) + Pre-084 (100  $\mu$ g) was given to determine the possible role as a sigma-1 antagonist under these conditions. Drugs were dissolved in 20  $\mu$ L of vehicle and intrathecally injected. In addition, to confirm the mechanism shown by HAL,

unsensitized (Naive) rats were administered with a sigma-1 agonist (PRE-084) with a pro-nociceptive effect being determined. In another group, HAL was injected 15 min. before the sigma-1 agonist. In all protocols, the effect of the drugs was evaluated every 30 min. after the administration for a duration of 180 min.

**Statistical analysis.** The data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). The area under the curve (AUC) value was calculated from the respective temporal course. The AUC for each dose of the assayed drug was calculated by the trapezoidal method [26]. For analysis of nociceptive sensitivity to mechanical stimulation at the different time-points and under different treatment, a two-way ANOVA followed by a *post hoc* Tukey analysis was used. In the analysis of the AUC, data were compared by a one-way ANOVA test followed by a Tukey test. In all of the statistical analyses, a  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

## Results

Figure 2 shows the time course of the development of hyperalgesia (panel A) and allodynia (panel B) after CCI. At 8 days after surgery, the maximum hyperalgesic response was observed with  $91.5 \pm 2.3\%$ . The maximum allodynic response was observed on the seventh day with  $96.4 \pm 5.8\%$ . In addition, we observed that these nociceptive responses remained constant during our evaluation period (15 days), which is the reason why we decided to use day 10 for the evaluation of the effect of the drugs. The sham-operated group did not exhibit any nociceptive reactions ( $21.7 \pm 4.8\%$ ).

### Antinociceptive effects of drugs.

The effect of the drugs (HAL, BD-1063 and Gbp) was evaluated for a period of 3 hr after a single subcutaneous administration. Fig. 3 shows that the administration of the vehicle (saline solution or citrate buffer) has no effect *per se*. The percentages of hyperalgesia or allodynia were maintained in the CCI group throughout the 3 hr of experimentation. In the analysis of fig. 3, panel A, the antihyperalgesic effect is shown. It was observed that the administration of HAL (0.178 mg/kg, s.c.) obtained a maximum effect of  $76.7 \pm 11.4\%$  at 90 min. and that of BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.) at 90 min. after administration ( $76.8 \pm 6.1\%$ ), while Gbp showed a maximal antihyperalgesic effect at 60 min. after administration ( $86.0 \pm 3.6\%$ ). HAL (0.178 mg/kg, s.c.) showed a greater antihyperalgesic effect ( $p < 0.05$ ) when compared to BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.) at 30 min. after administration. The maximum value of the AUC in the antihyperalgesic effect obtained under these experimental conditions was 275 a.u., whereas an AUC of  $233.8 \pm 3.8$  a.u. was observed in the sham group, which did not show any hyperalgesic effect. Administered individually, HAL (0.178 mg/kg, s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.) and Gbp (100 mg/kg, s.c.) showed values of  $207.5 \pm 26.1$  a.u.,  $184.6 \pm 6.6$  a.u. and  $223.5 \pm 8.9$  a.u., respectively. This shows significant differences ( $p < 0.001$ ) when compared to the CCI control group not receiving treatment ( $13.9 \pm 1.5$  a.u.), as assessed by the ANOVA test followed by Tukey *post*

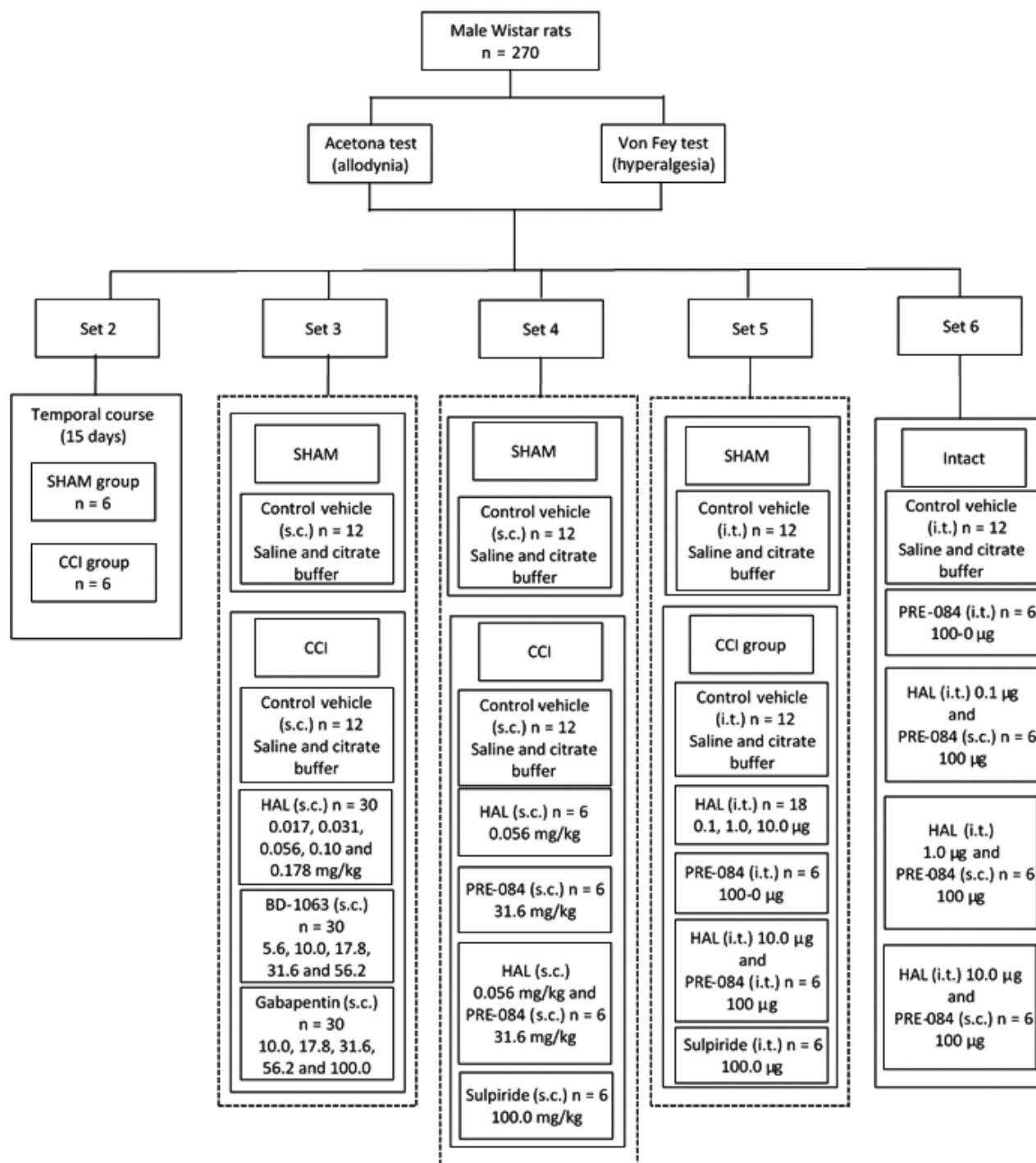


Fig. 1. Experimental protocols showing the number of animals used in each set of this study.

*hoc* test (fig. 3, panel B). HAL, BD-1063 and Gbp showed an antihyperalgesic effect that increased in a dose-dependent manner. There was no difference in their antihyperalgesic efficacy. The estimated doses required to produce 50% of the maximum effect ( $ED_{50}$ ) varied for HAL ( $0.6 \pm 1.1$  mg/kg), BD-1063 ( $25.7 \pm 1.2$  mg/kg) and Gbp ( $40.1 \pm 1.3$  mg/kg). The  $ED_{50}$  values of the drugs indicated that there was a difference in their antihyperalgesic potencies: HAL was more potent than both BD-1063 and Gbp (fig. 4, panel A).

Regarding the anti-allodynic results obtained by this work, HAL did not show a significant difference during the temporal course when compared to Gbp. However, HAL obtained a greater effect ( $p < 0.05$ ) with respect to BD-1063 at 60 min., after administration. The maximum anti-allodynic effect of BD-1063 ( $86.7 \pm 1.41\%$ ) was obtained at 30 min., whereas Gbp ( $86.7 \pm 1.41\%$ ) and HAL ( $93.3 \pm 5.7\%$ ) obtained a maximum response in the temporal course at 60 min. Subsequently, HAL showed a greater anti-allodynic effect



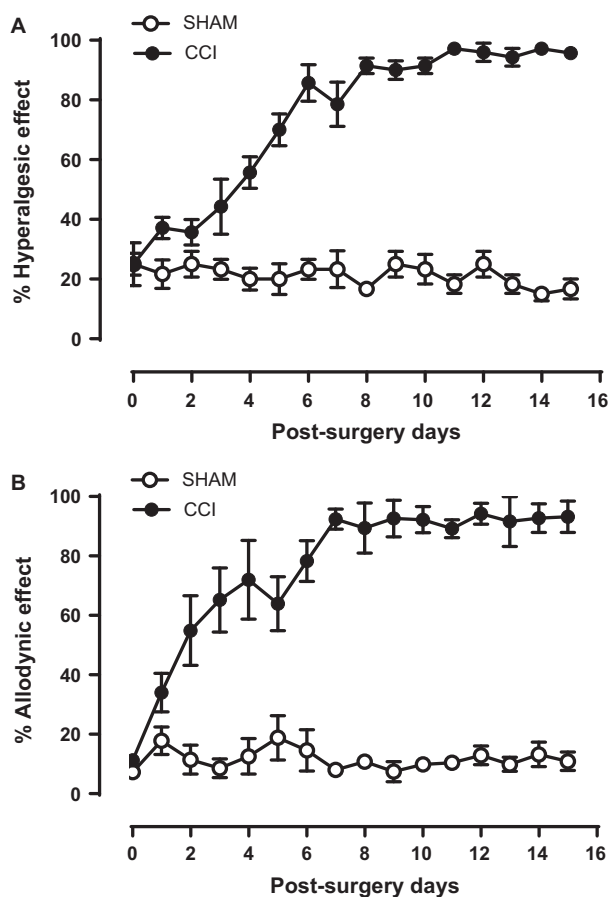


Fig. 2. Responses to Von Frey test (panel A) and acetone test (panel B) in chronic constriction injury and sham rats at time zero and after 15 days. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M.  $n = 8/\text{group}$ .

( $p < 0.05$ ) with respect to BD-1063 at 60 min. after administration (fig. 3, panel C).

The maximum value of the AUC in the anti-allodynic effect obtained under these experimental conditions was 275 a.u., while an AUC of  $270.7 \pm 3.0$  a.u. was observed in the sham group. HAL (0.178 mg/kg, s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg, s.c.), and Gbp (100 mg/kg, s.c.) administered individually showed values of  $236.1 \pm 11.9$  a.u.,  $214.5 \pm 8.8$  a.u. and  $243.6 \pm 4.9$  a.u., respectively. They showed significant differences ( $p < 0.001$ ) when compared with the CCI control group not receiving treatment ( $13.9 \pm 15.5$  a.u.), as assessed by the ANOVA test followed by Tukey *post hoc* test (fig. 3, panel D). HAL, BD-1063 and Gbp showed similar anti-allodynic efficacy. The estimated dose required to produce 50% of the maximum effect ( $ED_{50}$ ) varied between HAL ( $0.4 \pm 2.4$  mg/kg), BD-1063 ( $13.7 \pm 1.2$  mg/kg) and Gbp ( $30.9 \pm 1.1$  mg/kg). The  $ED_{50}$  values of the drugs indicated that there was a difference in their anti-allodynic potencies: BD-1063 was more potent than Gbp, but HAL was the most potent of all (fig. 4, panel B).

#### Antinociceptive mechanism of haloperidol.

Panels A and B in fig. 5 show the antihyperalgesic and anti-allodynic effects of HAL (0.056 mg/kg), both individually and

in combination with the sigma-1 agonist, PRE-084 (31.6 mg/kg), given by subcutaneous route. Subcutaneous administration of PRE-084 did not modify the nociceptive threshold in sensitized rats (CCI). HAL (0.056 mg/kg, s.c.) had a significant antihyperalgesic ( $103.3 \pm 8.7$  a.u.,  $p < 0.01$ ) and anti-allodynic effect ( $127.5 \pm 9.3$  a.u.,  $p < 0.05$ ) with respect to the vehicle, but there was a decrease when HAL was given in the presence of the selective sigma-1 agonist (PRE-084); that is to say, an antihyperalgesic ( $58.3 \pm 10.4$  a.u.,  $p < 0.001$ ) and anti-allodynic effect ( $52.0 \pm 9.3$  a.u.,  $p < 0.001$ ) had less effect, respectively. Likewise, the dopaminergic antagonist, (-)-sulpiride (100 mg/kg), showed no antinociceptive effects.

To determine the role of HAL at the central level, it was administered intrathecally. HAL showed an antinociceptive, concentration-dependent effect (fig. 6, panels A and B). Greater antihyperalgesic ( $207.5 \pm 6.3$  a.u.) and anti-allodynic ( $246.7 \pm 2.7$  a.u.) effects were observed when 10  $\mu\text{g}$  was administered at the spinal level. The administration of PRE-084 (100  $\mu\text{g}$ ) decreased the antihyperalgesic and anti-allodynic responses of HAL (10  $\mu\text{g}$ ). Otherwise, the intrathecal administration of 100  $\mu\text{g}$  of (-)-sulpiride did not show antinociceptive effects (fig. 6, panels A and B).

#### Inhibition of the antihyperalgesic and anti-allodynic effects of haloperidol in the presence of the selective agonist sigma-1 PRE-084.

With the purpose of confirming whether one of the antinociceptive mechanisms of HAL was due to the antagonism of the sigma-1 receptors, it was decided to employ non-sensitized (naive) rats. The pro-nociceptive effect of the sigma-1 agonist compound (PRE-084 100  $\mu\text{g}$  via i.t.) was determined. The hyperalgesic effect was  $166.1 \pm 4.7$  a.u., but in the presence of HAL (10  $\mu\text{g}$  via i.t.) it practically abolished the effect ( $36.3 \pm 7.5$  a.u.) ( $p < 0.001$ ). For the allodynic effect, the agonist effect was  $180.7 \pm 9.7$  a.u. Individually, and in the presence of HAL, the effect decreased significantly to  $17.4 \pm 5.0$  a.u. ( $p < 0.001$ ; fig. 7, panels A and B).

## Discussion

In the present study, the CCI model was used to establish a model of peripheral neuropathy. It has been shown that in these conditions, it is possible to develop various painful behaviours such as allodynia and hyperalgesia [20,21,24], thus supporting its use in the evaluation of afore mentioned drugs. It is known that after nerve damage in the CCI, a process of sensitization occurs in fibres A and C, suggesting that they are an important part in both initiating and maintaining pain in this model [27]. In our study, we performed a time course of the development of hyperalgesia and allodynia, and a progressive increase in both conducts was clearly observed, therefore confirming previous reports [22,28]. This allowed us to evaluate the effect of HAL, BD-1063 and Gbp once neuropathy had been established.

Neuropathic pain is a pathological condition in which the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs is limited, so strategies such as the use of topical lidocaine, tricyclic

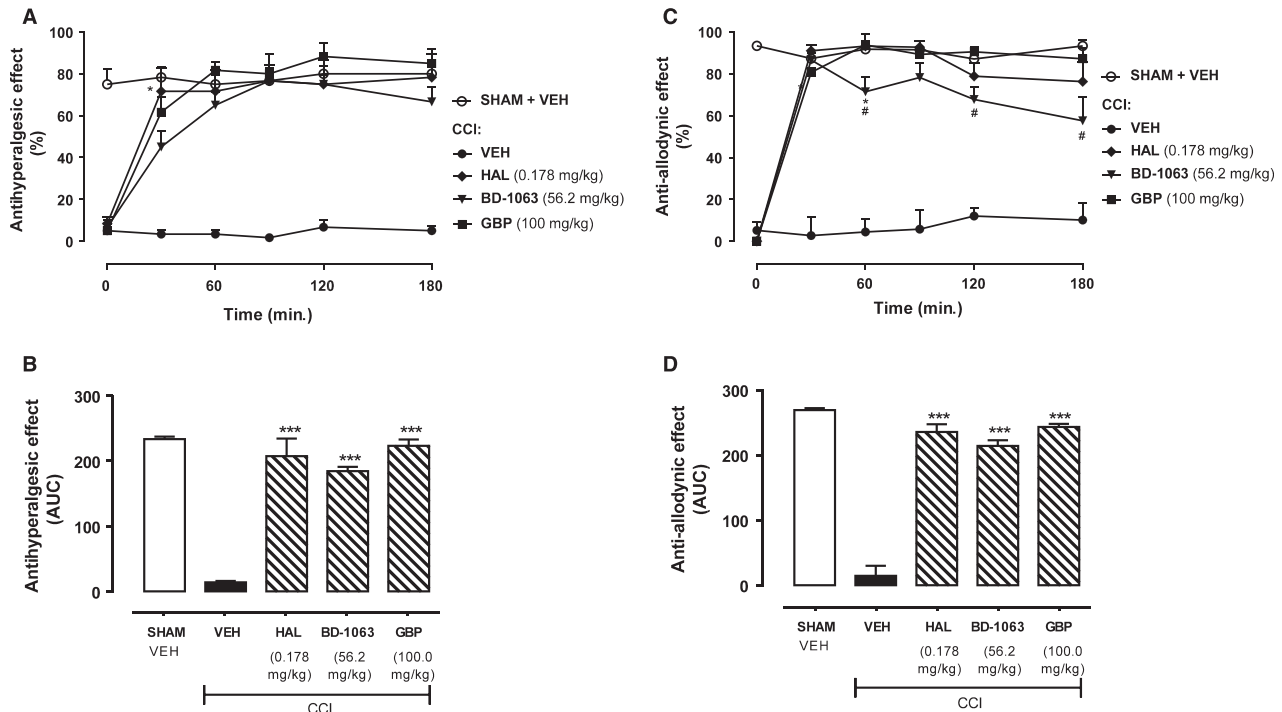


Fig. 3. (Panel A) Time course of the antihyperalgesic effects of HAL (0.178 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.) after CCI. The control groups (sham and CCI) were treated with the equivalent volumes of vehicle. Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6/\text{group}$ . \* $p < 0.05$  versus BD-1063. (Panel B) Area under the curve (AUC) for the antihyperalgesic effect produced by control groups (sham and CCI), HAL (0.178 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.). Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6/\text{group}$ . \*\*\* $p < 0.001$  versus VEH. (Panel C) Time course of the anti-allodynic effects of HAL (0.178 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.) after CCI. The control groups (sham and CCI) were treated with the equivalent volumes of vehicle. Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6/\text{group}$ . \* $p < 0.05$  versus HAL, # $p < 0.05$  versus Gbp. (Panel D) Area under the curve (AUC) for the anti-allodynic effect produced by control groups (sham and CCI), HAL (0.178 mg/kg s.c.), BD-1063 (56.2 mg/kg s.c.) and gabapentin (100 mg/kg s.c.). Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6/\text{group}$ . \*\*\* $p < 0.001$  versus VEH.

antidepressants or antiepileptics are used [4,5]; therefore, we used Gbp, as positive control. Gbp is an antagonist of the  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of calcium channels, which thereby prevents the entry of calcium into the neuronal terminal and consequently decreases hyperexcitability [29]. On the other hand, there are previous studies that propose the use of a sigma-1 antagonist as a therapeutic alternative for this type of pain [30–32].

Haloperidol is a compound a dopaminergic ligand, with antagonistic activity. However, it has been shown to have a high affinity with sigma-1 receptors [14,15]. In addition, HAL is able to occupy a high percentage of sigma-1 receptors in areas related to pain, and its preference for sigma-1 receptors is very similar to that presented by dopamine receptors (table 1) [14]. Additionally, a clinical study has revealed that administration of HAL decreases migraines [33], while several preclinical studies show that administration of HAL decreases hypersensitivity by antagonizing the sigma-1 receptors [15,18]. However, specifically referring to its use in the treatment of neuropathic pain, there is no systematic evidence to prove its effectiveness in this condition. Therefore, this study presents the first experimental work that proposes its usefulness under neuropathic conditions. In our study, HAL presented a dose-dependent effect. Although it has been shown to act as a sigma-1 antagonist, we wanted to

find out whether its effect on this type of pain was due to this mechanism. We suggest that when antagonizing dopaminergic receptors, which is another main mechanism for HAL, this one did not generate antinociception, which was captured in this work and agrees with previous reports, where it is proposed to have no effect [15,18], as dopaminergic agonists are those that generate antinociception by activating downstream mechanisms [34,35]. In addition, by reducing its effect in the presence of PRE-084, it is shown that the mechanism by which HAL generates both antihyperalgesia and anti-allodynia is due to antagonism of the sigma-1 receptor. This result agrees with other studies where it has been reported that HAL decreases painful behaviours by being a ligand of the sigma-1 receptor, not by the antagonism of dopaminergic receptors [15,18]. Besides, it was found that HAL plays an important role in the modulation of pain at a spinal level because it avoids the pro-nociceptive effect obtained when administering PRE-084. This is possible because the spinal cord is an area where expression of the sigma-1 receptor is found, not to mention being known to mediate the modulation and generation of neuropathic pain [11,36,37].

Analysing the dose–response curve of HAL and comparing it with the prototype compound, sigma-1 antagonist (BD-1063), its dose–response curve is more to the left, which

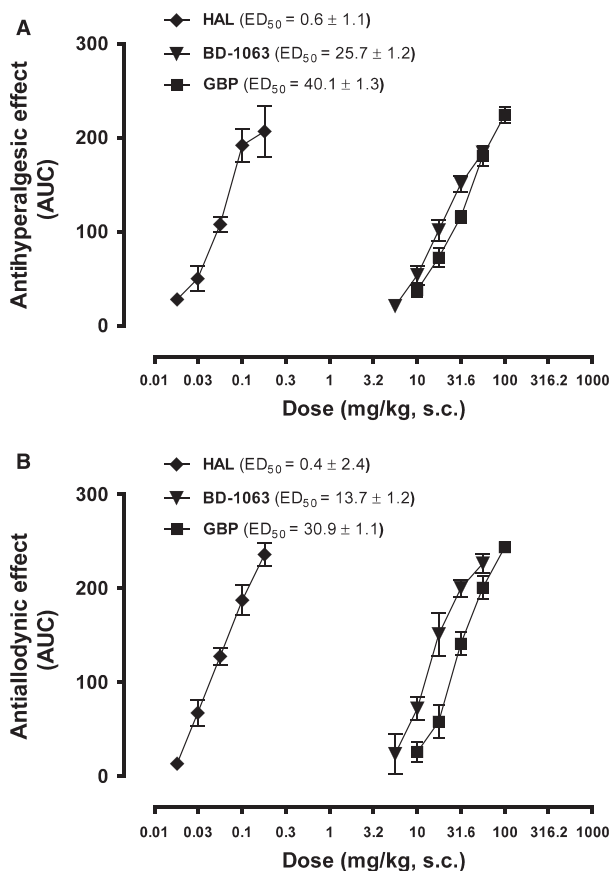


Fig. 4. Dose–response curves for the antihyperalgesic (panel A) and anti-allodynic effects (panel B) of haloperidol, BD-1063 and gabapentin in CCI rats. Rats were treated with vehicle (saline solution or citrate buffer), HAL (0.017, 0.031, 0.056, 0.10 and 0.178 mg/kg, s.c.), BD-1064 (5.6, 10.0, 17.8, 31.6 and 56.2 mg/kg, s.c.) or gabapentin (10.0, 17.8, 31.6, 56.2 and 100.0 mg/kg, s.c.). Data are means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group.

represents that HAL presents greater potency at any point of comparison. This could be explained by the fact that its affinity with sigma-1 receptors is greater (table 1) [14,38]. On the other hand, comparing its antihyperalgesic and anti-allodynic effects to that of the reference drug Gbp, HAL showed a similar efficacy in both cases, suggesting that the use of HAL could be a useful alternative for the treatment of neuropathic pain. Our results are supported by previous data that, especially when dealing with neuropathic pain, expression of the sigma-1 receptor in areas that control pain is found, particularly in the spinal cord [37,39,40], and this may also explain the effect of HAL when was given intrathecally.

There is still a lack of evidence about the activation of sigma-1 receptors in the generation of pain, but several studies suggest that calcium output in the cytosol of the endoplasmic reticulum could be related to activation of the NMDA receptor, thus promoting the output of the ion magnesium, and thereby facilitating glutamatergic signalling related to sensitization [37,40,41]. Another possible explanation for the action of sigma-1 antagonists is their role in the

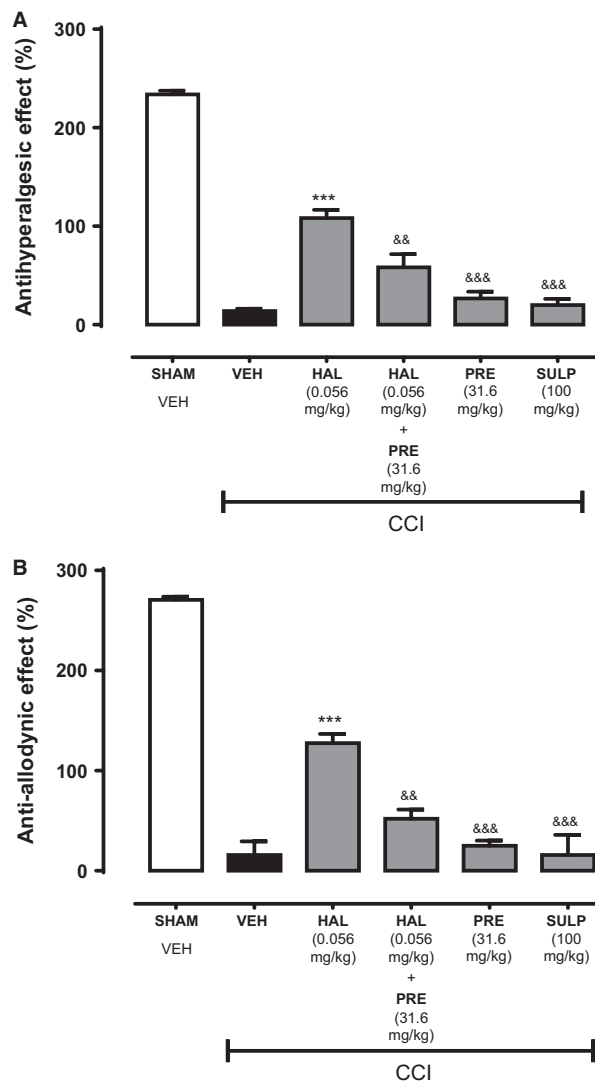


Fig. 5. Area under the curve (AUC) for antihyperalgesia (panel A) and anti-allodynia (panel B) produced by control groups (sham and CCI) treated with vehicle, HAL (0.056 mg/kg s.c.), PRE-084 (PRE) (31.6 mg/kg, s.c.), HAL (0.056 mg/kg s.c.) + PRE-084 (31.6 mg/kg) and (-)-sulpiride (Sulp) (100 mg/kg). Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $p < 0.001$  versus VEH; && $p < 0.01$  and &&& $p < 0.001$  versus HAL (0.056 mg/kg).

modulation of opioid receptors. Due to the fact that previous reports suggest that the sigma-1 receptor exerts an inhibitory tonic effect on peripheral opioid receptors [42,43], it has not been ruled out that antagonizing the sigma-1 receptor prevents this physiological break and favours the action of endogenous opioids. It seems logical then that by antagonizing the sigma-1 receptor as demonstrated by HAL, it could decrease this painful signalling and promote some degree of relief. Besides, another important feature of HAL is that when metabolized, it generates some metabolites such as reduced HAL, which have high affinity with sigma-1 receptors and may be a contributing factor in the observed antinociceptive effects [14,15,18].

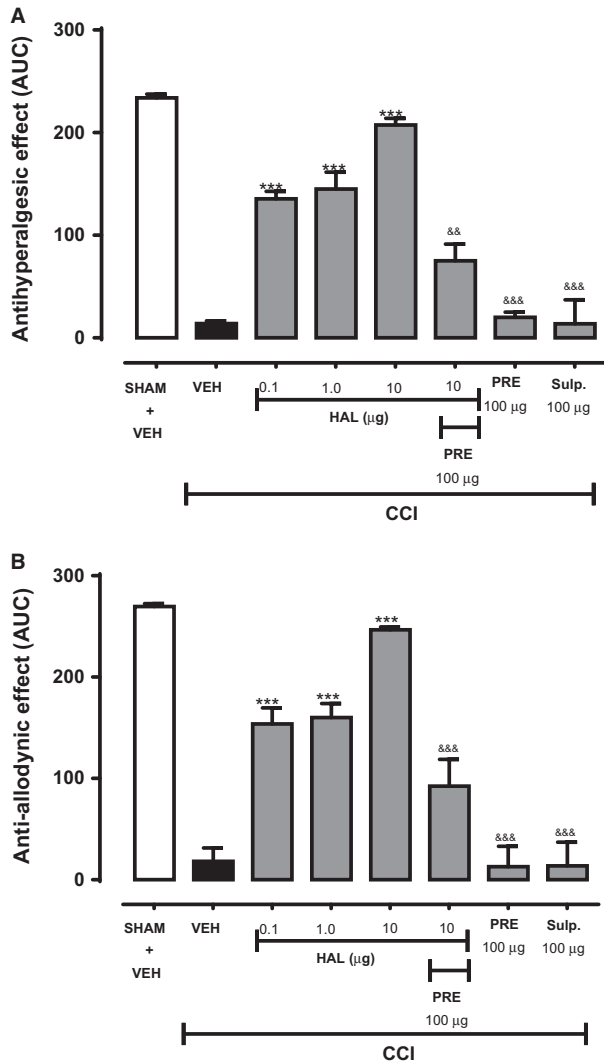


Fig. 6. Area under the curve (AUC) for antihyperalgesia (panel A) and anti-allodynia (panel B) produced by control groups (sham and CCI) treated with vehicle, HAL (0.1, 1.0 and 10 µg), PRE-084 (PRE) (100 µg), HAL (10 µg) + PRE-084 (100 µg) and (-)-sulpiride (Sulp) (100 µg) by intrathecal route. Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $p < 0.001$  versus VEH; && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$  versus HAL (10 µg).

In another order of ideas, it is well known that dopaminergic antagonists, including HAL, can produce extrapyramidal symptoms such dystonia. In this study, the rats did not show any presence of involuntary muscle contraction and abnormal postures indicative of dystonia at the doses used; however, it has been reported that higher doses may cause twisting of the axial musculature, hyperflexion of the trunk related to these drugs [44,45].

In summary, this study demonstrated that HAL presents antihyperalgesic and anti-allodynic effects in a model of neuropathic pain, suggesting its action through the antagonism of the sigma-1 receptors. Hence, it will be important to consider these results when looking for new therapeutic alternatives for this type of pain.

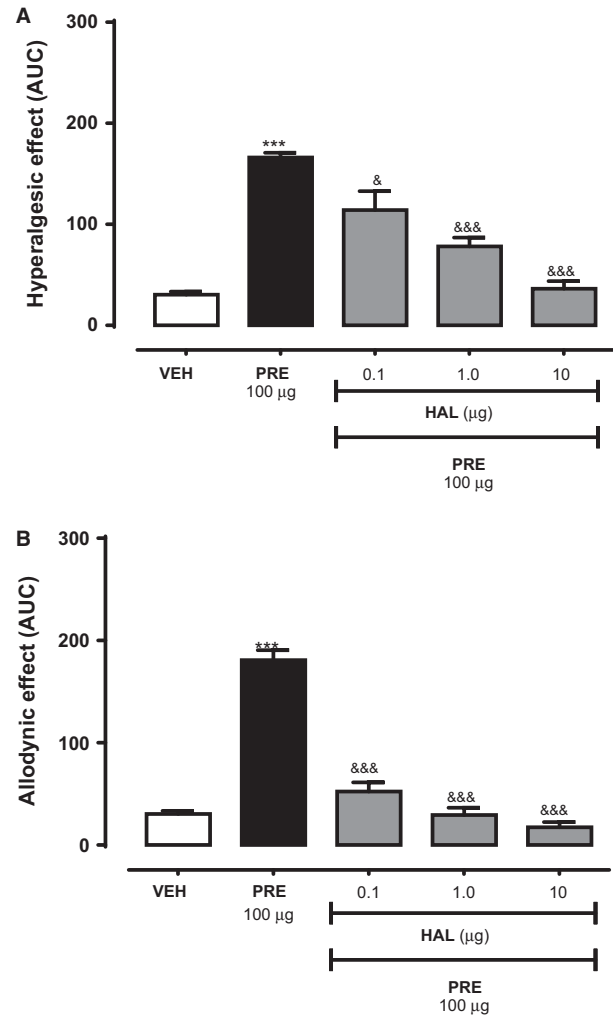


Fig. 7. Area under the curve (AUC) for the hyperalgesic effect (panel A) and allodynic effect (panel B) produced by control groups (vehicle), PRE-084 (PRE) (100.0 µg, i.t) and PRE-084 (100 µg, i.t) + HAL (0.1, 1.0 or 10.0 µg, i.t) in naive rats. Bars are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ /group. \*\*\* $p < 0.001$  versus VEH; & $p < 0.01$ , && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$  versus PRE (100 µg, i.t)

Table 1.

Affinity of ligands used in this study.

Ligand	Activity	Ki (nM)	
		$\sigma$ -1	Dopamine D-2
Haloperidol	Antagonist	$2.8 \pm 0.6^{14}$	$2.7 \pm 1.4^{14}$
BD-1063	Antagonist	$9.15 \pm 1.28^{46}$	–
PRE-084	Agonist	$9.0 \pm 1.25^{47}$	–
(-)-Sulpiride	Antagonist	–	$6.0 \pm 09^{48}$

Data from: <sup>14</sup>Bowen *et al.*, 1990; <sup>46</sup>Matsumoto *et al.*, 1995; <sup>47</sup>Brown, *et al.*, 2004; <sup>48</sup>Freedman *et al.*, 1994

#### Acknowledgements

We wish to thank L. Oliva and S. Ledesma for technical assistance. Espinosa-Juárez (No. 261836) and Jaramillo-

Morales (No. 24335) thank the fellowship provided by National Council for Science and Technology (CONACyT, Mexico city, Mexico).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

#### References

- Jensen MP, Chodroff MJ, Dworking R. The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. *Neurology* 2007;**68**:1178–82.
- de Vos CC, Meier K, Zaalberg PB, Nijhuis HJ, Duyvendak W, Vesper J *et al*. Spinal cord stimulation in patients with painful diabetic neuropathy: a multicentre randomized clinical trial. *Pain* 2014;**155**:2426–31.
- Gilron I, Watson CPN, Cahill CM, Moulin DE. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ* 2006;**175**:265–75.
- O'Connor AB, Dworkin RH. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am J Med* 2009;**122**(10 Suppl): S22–32.
- Vranken J. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2009;**9**:71–8.
- Kim H-W, Kwon Y-B, Roh D-H, Yoon S-Y, Han H-J, Kim K-W *et al*. Intrathecal treatment with sigma-1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br J Pharmacol* 2006;**148**:490–8.
- Son JS, Kwon YB. Sigma-1 receptor antagonist BD1047 reduces allodynia and spinal ERK phosphorylation following chronic compression of dorsal root ganglion in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2010;**14**:359–64.
- Romero L, Zamanillo D, Nadal X, Sánchez-Arroyos R, Rivera-Arconada I, Dordal A *et al*. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization: antagonism of the  $\sigma$ 1R inhibits pain sensitization. *Br J Pharmacol* 2012;**166**:2289–306.
- Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci* 2010;**31**:557–66.
- Kim H-W, Roh D-H, Yoon S-Y, Seo H-S, Kwon Y-B, Han H-J *et al*. Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:1125–34.
- Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kang SY, Moon JY, Song S *et al*. Sigma-1 receptor-induced increase in murine spinal NR1 phosphorylation is mediated by the PKC $\alpha$  and epsilon, but not the PKC $\zeta$ , isoforms. *Neurosci Lett* 2010;**477**:95–9.
- Zamanillo D, Romero L, Merlos M, Vela JM. Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *Eur J Pharmacol* 2013;**716**:78–93.
- Maurice T, Su T-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther* 2009;**124**:195–206.
- Bowen WD, Moses EL, Tolentino PJ, Michael Walker J. Metabolites of haloperidol display preferential activity at sigma receptors compared to dopamine D-2 receptors. *Eur J Pharmacol* 1990;**177**:111–8.
- Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Baeyens JM, Del Pozo E. Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. *Psychopharmacol (Berl)* 2009;**205**:21–33.
- Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, De Costa B, Rice K. Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol Rev* 1990;**42**:355–402.
- Marder S. Facilitating compliance with antipsychotic medication. *J Clin Psychiatry* 1998;**59**:21–5.
- Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM. Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. *Psychopharmacol (Berl)* 2005;**182**:485–93.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;**16**:109–10.
- Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;**33**:87–107.
- De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2004;**491**:137–48.
- De la O-Arciniega M, Díaz-Reval MI, Cortés-Arroyo AR, Domínguez-Ramírez AM, López-Muñoz FJ. Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;**92**:457–64.
- Xiao W, Boroujerdi A, Bennett GJ, Luo ZD. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. *Neuroscience* 2007;**144**:714–20.
- Dowdall T, Robinson I, Meert TF. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;**80**:93–108.
- Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994;**32**:197–200.
- Gibaldi M. Estimation of area under the curve. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. In: Philadelphia, 4th edition. 1991; 377–8.
- Gabay E, Tal M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 2004;**110**:354–60.
- Zanjani TM, Sabetkasaei M, Mosaffa N, Manaheji H, Labibi F, Farokhi B. Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2006;**538**:66–72.
- Cheng J-K, Chiou L-C. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *J Pharmacol Sci* 2006;**100**:471–86.
- Roh D-H, Kim H-W, Yoon S-Y, Seo H-S, Kwon Y-B, Kim K-W *et al*. Intrathecal injection of the sigma(1) receptor antagonist BD1047 blocks both mechanical allodynia and increases in spinal NR1 expression during the induction phase of rodent neuropathic pain. *Anesthesiology* 2008;**109**:879–89.
- Nieto FR, Cendán CM, Sánchez-Fernández C, Cobos EJ, Entrena JM, Tejada MA *et al*. Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *J Pain* 2012;**13**:1107–21.
- Gris G, Portillo-Salido E, Aubel B, Darbaky Y, Deseure K, Vela JM *et al*. The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different etiology in rats. *Sci Rep* 2016;**6**:24591.
- Honkaniemi J, Liimatainen S, Rainesalo S, Sulavuori S. Haloperidol in the acute treatment of migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Headache* 2006;**46**:781–7.
- Wood PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev Neurother* 2008;**8**:781–97.
- Cobacho N, de la Calle JL, Paíno CL. Dopaminergic modulation of neuropathic pain: analgesia in rats by a D2-type receptor agonist. *Brain Res Bull* 2014;**106**:62–71.
- Bangaru ML, Weihrauch D, Tang Q-B, Zoga V, Hogan Q, Wu H. Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2013;**9**:47.
- Roh D-H, Kim H-W, Yoon S-Y, Seo H-S, Kwon Y-B, Kim K-W *et al*. Intrathecal administration of sigma-1 receptor agonists facilitates nociception: involvement of a protein kinase C-dependent pathway. *J Neurosci Res* 2008;**86**:3644–54.
- Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Pozo ED. Pharmacology and therapeutic potential of sigma 1 receptor. *Ligands* 2008;**6**:344–66.

- 39 Yoon SY, Roh DH, Seo HS, Kang SY, Moon JY, Song S *et al.* An increase in spinal dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances NMDA-induced pain via phosphorylation of the NR1 subunit in mice: involvement of the sigma-1 receptor. *Neuropharmacology* 2010;**59**:460–7.
- 40 Choi S-R, Moon J-Y, Roh D-H, Yoon S-Y, Kwon S-G, Choi H-S *et al.* Spinal D-serine increases PKC-dependent GluN1 phosphorylation contributing to the sigma-1 receptor-induced development of mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J Pain* 2016;**16**:30354–6.
- 41 Yoon SY, Roh DH, Seo HS, Kang SY, Moon JY, Song S *et al.* An increase in spinal dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances NMDA-induced pain via phosphorylation of the NR1 subunit in mice: involvement of the sigma-1 receptor. *Neuropharmacology* 2010;**59**:460–7.
- 42 Sánchez-Fernández C, Montilla-García Á, González-Cano R, Nieto FR, Romero L, Artacho-Cordón A *et al.* Modulation of peripheral  $\mu$ -opioid analgesia by  $\sigma$ 1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;**348**:32–45.
- 43 Sánchez-Fernández C, Nieto FR, González-Cano R, Artacho-Cordón A, Romero L, Montilla-García Á *et al.* Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by  $\sigma$ 1 receptor inhibition: role of peripheral  $\sigma$ 1 receptors. *Neuropharmacology* 2013;**70**:348–58.
- 44 Lorden JF, McKeon TW, Baker HJ, Cox N, Walkley SU. Characterization of the rat mutant dystonic (dt): a new animal model of dystonia musculorum deformans. *J Neurosci* 1984;**4**:1925–32.
- 45 Thaakur SR, Jyothi B. Effect of spirulina maxima on the haloperidol induced tardive dyskinesia and oxidative stress in rats. *J Neural Transm* 2007;**114**:1217–25.
- 46 Matsumoto RR, Bowen WD, Tom MA, Vo VN, Truong DD, De Costa BR. Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur J Pharmacol* 1995;**280**:301–10.
- 47 Brown C, Fezoui M, Selig WM, Schwartz CE, Ellis JL. Antitussive activity of sigma-1 receptor agonists in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 2004;**141**:233–40.
- 48 Freedman SB, Patel S, Marwood R, Emms F, Seabrook GR, Knowles MR *et al.* Expression and pharmacological characterization of the human D3 dopamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;**268**:417–26.