UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias de la Salud

“Efecto antinociceptivo y antialodínico de la eritropoyetina: asociada a la participación de NF-κB, vía de ON-GMPc-K_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico”

TESIS
Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta:
Samuel Suarez Mendez

Director (a):
Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña

Villahermosa, Tabasco. **Julio 2019**

Of. No. 0473/DACS/JAEP
05 de julio de 2019

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

C. Samuel Suárez Méndez
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dr. Jorge Luis Blé Castillo, Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Dr. Manuel Alfonso Baños González, Dra. Leova Pacheco Gil, Dra. Claudia Ivonne Araiza Saldaña, Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla y la Dra. Ángela Ávila Fernández, impresión de la tesis titulada: **"Efecto antinociceptivo y antialodínico de eritropoyetina: asociada a la participación de NF-κB, vía de ON-GMPc-K^+_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico"**, para sustento de su trabajo recepcional del Doctorado en Ciencias Biomédicas, donde funge como Directora de Tesis la Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña.

Atentamente

Dra. Mirian Carolina Martínez López
Directora

UJAT
DACS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña.- Directora de Tesis
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- sinodal
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop.- Sinodal
C.c.p.- Dr. Manuel Alfonso Baños González.- Sinodal
C.c.p.- Dra. Leova Pacheco Gil.- Sinodal
Cc.p.- Dra. Claudia Ivonne Araiza Saldaña.- Sinodal
C.c.p.- Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla.- Sinodal
C.cp.- Dra. Angela Avila Fernández.- Sinodal

C.c.p.- Archivo
DC'MCML/MO'MACA/lkrd*

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de **Villahermosa Tabasco**, siendo las **12:30** horas del día **20** del mes de **junio** de **2019** se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la **División Académica de Ciencias de la Salud** para examinar la tesis de grado titulada:

"Efecto antinociceptivo y antialodínico de eritropoyetina: asociada a la participación de NF-κB, vía de ON-GMPc-K^+_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico"

Presentada por el alumno (a):

Suárez	Méndez	Samuel
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)

Con Matricula

1	6	1	E	6	2	0	0	4

Aspirante al Grado de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron ***SU APROBACIÓN DE LA TESIS*** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

COMITÉ SINODAL

Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña
Directora de Tesis

Dr. Jorge Luis Blé Castillo

Dra. Isela Esther Juárez Rojop

Dr. Manuel Alfonso Baños González

Dra. Leova Pacheco Gil

Dra. Claudia Ivonne Araiza Saldaña

Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla

Dra. Ángela Ávila Fernández

DC'MCML/MO'MACA/lkrd*

Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 06 del mes de mayo del año 2019, el que suscribe, Samuel Suarez Mendez, alumno del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 161E62004 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: **"Efecto antinociceptivo y antialodínico de eritropoyetina: asociada a la participación de NF-κB, vía de ON-GMPc-K^{+}_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico"**, bajo la Dirección de la Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña, Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Articulo 31. El alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: samuelsuarezmendez@hotmail.com, Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Samuel Suarez Mendez

Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS DE LA SALUD

JEFATURA DEL ÁREA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Sello

ÍNDICE

Pág.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS……..... i
ABREVIATURAS…… ii
RESUMEN…… v
ABSTRACT…….. vi
1. INTRODUCCIÓN…….. 1
1.1. Dolor…….. 1
1.1.1. Clasificación del dolor…….. 1
1.1.2. Nocicepción…..……. 2
1.1.3. Nociceptores…...…….. 2
1.1.4 Transmisión nociceptiva……...…….. 5
1.1.4.1. Sensibilización periférica…… 5
1.1.4.2. Sensibilización central…… 6
1.2. Factor nuclear kappa B……...…….. 8
1.3. Vía ON-GMPc-K_{ATP}……..…….. 9
1.4. Serotonina……..... 10
1.5. Opioide…….. 10
1.6. Dolor inflamatorio…… 11
1.6.1. Tratamiento para el dolor inflamatorio…….. 12
1.7. Dolor neuropático…… 13
1.7.1. Neuropatía diabética dolorosa……... 13
1.7.2. Tratamiento de la neuropatía diabética dolorosa…… 16
1.8. Función biológica de la eritropoyetina…… 18
1.8.1. Vías de señalización intracelular inducida por la interacción EPO-EPOR……... 20
1.8.2. Eritropoyetina y neuropatía diabética dolorosa…….... 21
2. JUSTIFICACIÓN…….. 24
3. HIPÓTESIS…… 25
4. OBJETIVOS……..... 26
4.1. Objetivo general…….. 26

4.1.1. Objetivos particulares…….. 26
5. MATERIAL Y MÉTODOS…… 27
5.1. Animales……... 27
5.2. Fármacos…….. 27
5.3. Evaluación de la conducta nociceptiva inducida por formalina... 27
5.4. Inducción de la diabetes…… 28
5.5. Evaluación de la conducta alodínica…… 29
5.6. Diseño experimental……... 30
5.7. Análisis de datos…… 33
6. RESULTADOS…….. 34
6.1 Efecto antinociceptivo de EPO en ratas no diabéticas……. 34
6.2. Determinación de la glucosa……. 34
6.3. Efecto antialodínico de EPO en ratas diabéticas……..... 34
6.4. Cuantificación de las concentraciones séricas de NF-κB en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas……. 36
6.5. EPO revierte la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y alodinia en ratas diabéticas por activación de la vía ON-GMPc-K_{ATP}……..……... 36
6.6. EPO revierte la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y alodinia en ratas diabéticas por activación de receptores para 5-HT y opioide…… 36
7. DISCUSIÓN…….. 40
7.1. Conducta nociceptiva inducida por formalina en ratas no diabéticas……. 40
7.2. Inducción de diabetes con STZ……..……. 40
7.3. Conducta alodínica en ratas diabéticas……..…. 41
7.4. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas..…….... 41
7.5 Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la participación de NF-κB en ratas…….…….. 43
7.6. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la participación de la vía ON-GMPc-K_{ATP}…….……... 44

7.7. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la participación del sistema serotoninérgico y opioidérgico……. 45
7.8. Otros mecanismos que podrían estar implicados en el efecto analgésico de EPO……. 46
8. CONCLUSIONES……. 49
9. PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES……. 50
10. REFERENCIAS……..……. 52

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		Pág.
Tabla 1.	Causas y subtipos de dolor neuropático..…….....	14
Tabla 2.	Recomendaciones de guías seleccionadas para el uso de medicamentos utilizados en la neuropatía diabética dolorosa……	17
Figura 1.	Clasificación del dolor……...	3
Figura 2.	Procesos fisiológicos que integran la nocicepción……...	4
Figura 3.	Sensibilización periférica……..	6
Figura 4.	Tratamiento del dolor inflamatorio de acuerdo a la OMS….....	13
Figura 5.	Estructura de la eritropoyetina…….…….....	20
Figura 6.	Curso temporal de la conducta nociceptiva inducida con formalina.....	28
Figura 7.	Curso temporal de la conducta alodínica……	30
Figura 8.	Diagrama de los grupos experimentales empleados para elaborar la CDR del efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO.....……..	31
Figura 9.	Diagrama para la medición de las concentraciones sérica de NF-κB durante el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO……	32
Figura 10.	Diagrama para la exploración del mecanismo antinociceptivo y antialodínico de EPO después del pretratamiento con inhibidores……..……	32
Figura 11.	ABC del efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO……..…….....	35
Figura 12.	Curso temporal de las concentraciones séricas de NF-κB durante el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO……....	37
Figura 13.	Efecto de L-NAME, D-NAME y GLB en la actividad antinociceptiva y antialodínica de EPO…….….	38
Figura 14.	Efecto de MTP y NLX en la actividad antinociceptiva y antialodínica de EPO…….....	39
Figura 15.	Mecanismo de la neuropatía diabética…….	47
Figura 16.	Sensibilización central…..…….....	48
Figura 17.	Modulación del dolor por la vía serotoninérgica descendente…...	48
Figura 18.	Mecanismos propuesto para el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO……	49

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGEs	Productos de glicación avanzada
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Apaf-1	factor 1 activador de la proteasa apoptótica
ATCs	Antidepresivos tricíclicos
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAM	Molécula de adhesión celular
CDR	Curva dosis respuesta
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAG	Diacilglicerol
D-NAME	NG-nitro-D-arginina metil ester
EP	Receptor para prostaglandina
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Receptor para eritropoyetina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FoxO3a	Caja de horquilla O3a
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GLB	Glibenclamida
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GSK-3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta

HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor
IFN-γ	Interferón gamma
IκB	Inhibidor de kappa B
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol 1, 4,5 trifosfato
IRSNs	Inhibidores de la recaptura de serotonina noradrenalina
JAK2	Janus quinasa 2
K_{ATP}	Canales de potasio sensible a ATP
KCC	Cotransportador K^+-Cl^-
kg	Kilogramo
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil ester
MAPK	Proteína quinasa activado por mitógeno p42/44
mg/dL	Miligramo por decilitro
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mGluRs	Receptores metabotrópicos específicos para glutamato
min	Minutos
mTOR	Diana de rapomicina en células de mamíferos
MTP	Metiotepina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NK-1	Neurokinina 1
NLX	Naloxona
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Óxido nítrico
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PI3K	Fosfatidilinositol cinasa 3
PAG	Sustancia gris periacueductal

p70S6K	Proteína ribosomal S6 quinasa
rhEPO	Eritropoyetina recombinante humana
RVM	Médula rostroventromedial
SON	Sintasa de óxido nítrico
SONn	Sintasa de óxido nítrico neuronal
SONe	Sintasa de óxido nítrico endotelial
SONi	Sintasa de óxido nítrico inducible
SP	Sustancia P
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
STZ	Estreptozotocina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TrkA	Receptor tirosina cinasa A del factor de crecimiento neuronal
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
TTXr	Resistente a tetrodotoxina
UFC-E	Unidad formadora de colonias eritroides
UI/kg	Unidad internacional por kilogramo
VEH	Vehículo
XIAP	Inhibidor de la proteína de la apoptosis ligado a X
µl	Microlitros
5-HT	Serotonina
5-HT_1	Receptor 1 de serotonina
5-HT_2	Receptor 2 de serotonina
5-HT_3	Receptor 3 de serotonina
5-HT_5	Receptor 5 de serotonina
5-HT_7	Receptor 7 de serotonina

RESUMEN

La eritropoyetina (EPO) es una citocina requerida para promover la proliferación y diferenciación de células eritroides, pero se ha reportado que actúa como una citocina pleiotrópica más allá de su acción hematopoyética. Se sabe que la EPO induce antihiperalgesia y antialodinia en modelos de dolor neuropático inducido por lesión crónica de constricción del nervio ciático, transección del nervio espinal L5 y aplastamiento del nervio espinal L5. Sin embargo, este papel en el dolor nociceptivo inducido por formalina en ratas no diabéticas y alodinia en ratas diabéticas, así como los posibles mecanismos de acción no están todavía establecidos. La propuesta de este estudio fue determinar el efecto antinociceptivo en ratas no diabéticas y el efecto antialodínico en ratas diabéticas de EPO. Además, determinar la posible participación de NF-κB, vía ON-GMPc-K_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico en estos efectos. El comportamiento nociceptivo se midió utilizando la prueba de formalina en ratas no diabéticas, mientras que para la alodinia mecánica se utilizaron los filamentos de von Frey por el método de arriba-abajo en ratas diabéticas. Para evaluar el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO este fue administrado intraperitonealmente en dosis crecientes (500, 1000, 2000, 4000 UI/kg). Mientras que, para determinar los mecanismos de acción involucrados en los efectos analgésicos de EPO, se midieron las concentraciones séricas de NF-κB después de la administración de la dosis más efectiva de EPO implementando la técnica de ELISA. Además, esta dosis fue administrada junto con L-NAME (0.1, 1 mg/kg, inhibidor de la síntesis de óxido nítrico), D-NAME (1 mg/kg, isoforma inactiva de L-NAME), glibenclamida (1, 10 mg/kg, bloqueador de canales de K^+ sensible a ATP), metiotepina (0.01, 0.1 mg/kg, antagonista no selectivo del receptor para 5-HT) o naloxona (1 mg/kg, antagonista no selectivo para el receptor opioide). La administración sistémica de EPO previno la nocicepción en la fase II del modelo de formalina en ratas no diabética y la alodinia táctil en ratas diabéticas de manera dosis dependiente. Asimismo, la inyección intraperitoneal de EPO disminuyó significativamente los niveles séricos de NF-κB durante la prueba de formalina y alodinia táctil en ratas no diabéticas y diabéticas, respectivamente. La antinocicepción y antialodinia mostrada por EPO fue revertida por administración intraperitoneal de L-NAME (1 mg/kg) y glibenclamida (1, 10 mg/kg). También, metiotepina (0.1 mg/kg), pero no naloxona (1 mg/kg) revirtió el efecto antinociceptivo y antialodínico inducido por EPO. Estos datos sugieren que la administración de EPO produce antinocicepción en ratas no diabéticas y antialodinia en ratas diabéticas. Además, el efecto antinociceptivo y antialodínico de la EPO podría estar mediado en parte por la disminución de la expresión de NF-κB, la activación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} y la activación de los receptores 5-$HT_{1/5}$ del sistema serotoninergico.

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a cytokine required to promote the proliferation and differentiation of erythroid cells, but it has been reported to act as a pleiotropic cytokine beyond its hematopoietic function. EPO is known to induce antihiperalgesia and antialodinia in models of neuropathic pain induced by chronic sciatic nerve constriction injury, L5 spinal nerve transection and L5 spinal nerve crush. However, this role in nociceptive pain induced by formalin in non-diabetic rats and allodynia in diabetic rats, as well as the possible mechanisms of action are not yet established. The purpose of this study was to determine the antinociceptive effect in non-diabetic rats and the antiallodynic effect in diabetic rats of EPO. In addition, to determine the possible participation of NF-κB, NO-GMPc-K_{ATP} pathway, serotoninergic system and opioidergic system in these effects. The nociceptive behavior was measured using the formalin test in non-diabetic rats, whereas for the mechanical allodynia were used the von Frey filaments by the up-down method in diabetic rats. To evaluate the antinociceptive and antiallodynic effect of EPO, this was administered intraperitoneally in increasing doses (500, 1000, 2000, 4000 IU/kg). Meanwhile, to determine the mechanisms of action involved in the analgesic effects of EPO, serum concentrations of NF-κB were measured after the most effective dose administration of EPO through the implementation of the ELISA technique. Furthermore, this dose of EPO was coadministered with L-NAME (0.1, 1 mg/kg, inhibitor of nitric oxide synthesis), D-NAME (1 mg/kg, inactive isoform of L-NAME), glibenclamide (1, 10 mg/kg, ATP-sensitive K^+ channel blocker), methiothepin (0.01, 0.1 mg/kg, non-selective 5-HT receptor antagonist) or naloxone (1 mg/kg, non-selective antagonist for the opioid receptor). Systemic administration of EPO prevented nociception in phase II of the formalin test in non-diabetic rats and tactile allodynia in diabetic rats in a dose-dependent manner. Likewise, intraperitoneal injection of EPO significantly decreased serum levels of NF-κB during the formalin test and tactile allodynia in non-diabetic and diabetic rats, respectively. The antinociception and antiallodynia exhibited by EPO were reversed with the intraperitoneal administration of L-NAME (1 mg/kg) and glibenclamide (1.0 mg/kg). Moreover, methiothepine (0.1 mg/kg), but not naloxone (1 mg/kg) reversed the antinociceptive and antiallodynic effect induced by EPO. These data suggest that the administration of EPO produces antinociception in non-diabetic rats and antiallodynia in diabetic rats. Also, the antinociceptive and antiallodynic effect of EPO could be mediated in part by the decrease in the expression of NF-κB, activation of NO-GMPc-K_{ATP} pathway and activation of 5-$HT_{1/5}$ receptors of serotoninergic system.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Dolor

El dolor es una sensación fisiológica de alerta que ayuda a prevenir un daño que amenaza a nuestra sobrevivencia y/o bienestar, permitiendo al individuo reaccionar apropiadamente y minimizar sus efectos. Además, como una sensación desagradable resulta en una estrategia conductual compleja para evitar futuro contacto con un estímulo semejante. Sin embargo, en algunos síndromes clínicos, puede incrementar espontáneamente en ausencia aparente de un daño al nervio periférico o una respuesta exagerada y prolongada a una lesión. En este sentido, la asociación internacional para el estudio del dolor (IASP) lo define como una "experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial que se relaciona de manera directa con la intensidad de dicho daño" (IASP, 1986).

1.1.1. Clasificación del dolor

El dolor no es una entidad sensorial homogénea y por lo tanto se ha clasificado en dos categorías: adaptativo y mal adaptativo. El adaptativo contribuye a la supervivencia del organismo, protegiéndolo contra daño o promoviendo su recuperación. En contraste, el mal adaptativo es una expresión de la acción patológica del sistema nervioso; éste como una enfermedad. También, la clasificación puede variar de acuerdo a su intensidad (leve, moderada o severa), cualidad (punzante, quemante o lancinante), duración (transitorio, intermitente o persistente) y referencia (superficial o profunda, localizada o difusa). Sin embargo, la clasificación más aceptada es de acuerdo a su mecanismo neurobiológico; nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional (figura 1).

El nociceptivo se presenta en respuesta a un estímulo nocivo; el inflamatorio, es espontáneo con hipersensibilidad en respuesta al daño tisular e inflamación; el neuropático, es espontáneo con hipersensibilidad en asociación con daño o lesión del sistema nervioso; y el funcional, es una hipersensibilidad como resultado del procesamiento central anormal (Woolf, 2004).

1.1.2. Nocicepción

La nocicepción es el mecanismo sensorial del dolor, el cual está constituido por cuatro procesos fisiológicos: transducción, transmisión, modulación y percepción (Woolf, 2004) (figura 2).

1) Transducción. Describe la conversión de un estímulo nocivo térmico, mecánico o químico en señales eléctricas en las terminales nerviosas periféricas.
2) Transmisión: Es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas hasta la asta dorsal de la médula espinal.
3) Modulación. En la asta dorsal de la médula espinal se entrecruzan diversos tipos de terminaciones nerviosas que liberan neurotransmisores que alteran la señal nociceptiva, inhibiendo o amplificando dicha señal.
4) Percepción. Proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva del dolor.

1.1.3. Nociceptores

Los nociceptores son ramificaciones especializadas de fibras nerviosas sensitivas que al responder a estímulos térmicos, mecánicos o químicos (Raja y cols., 1988) se sensibilizan e inducen la aparición de la conducta dolorosa. La capacidad esencial de un nociceptor es diferenciar entre un estímulo inocuo de otro nocivo. Anatómicamente, los cuerpos celulares de los nociceptores se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal donde emergen dos proyecciones, una se dirige hacia la periferia donde se ramifican en piel y otras estructuras (terminación periférica) y la otra proyecta con sus ramas centrales a la médula espinal a través de las raíces dorsales terminando en la sustancia gris de la asta dorsal (terminación central).

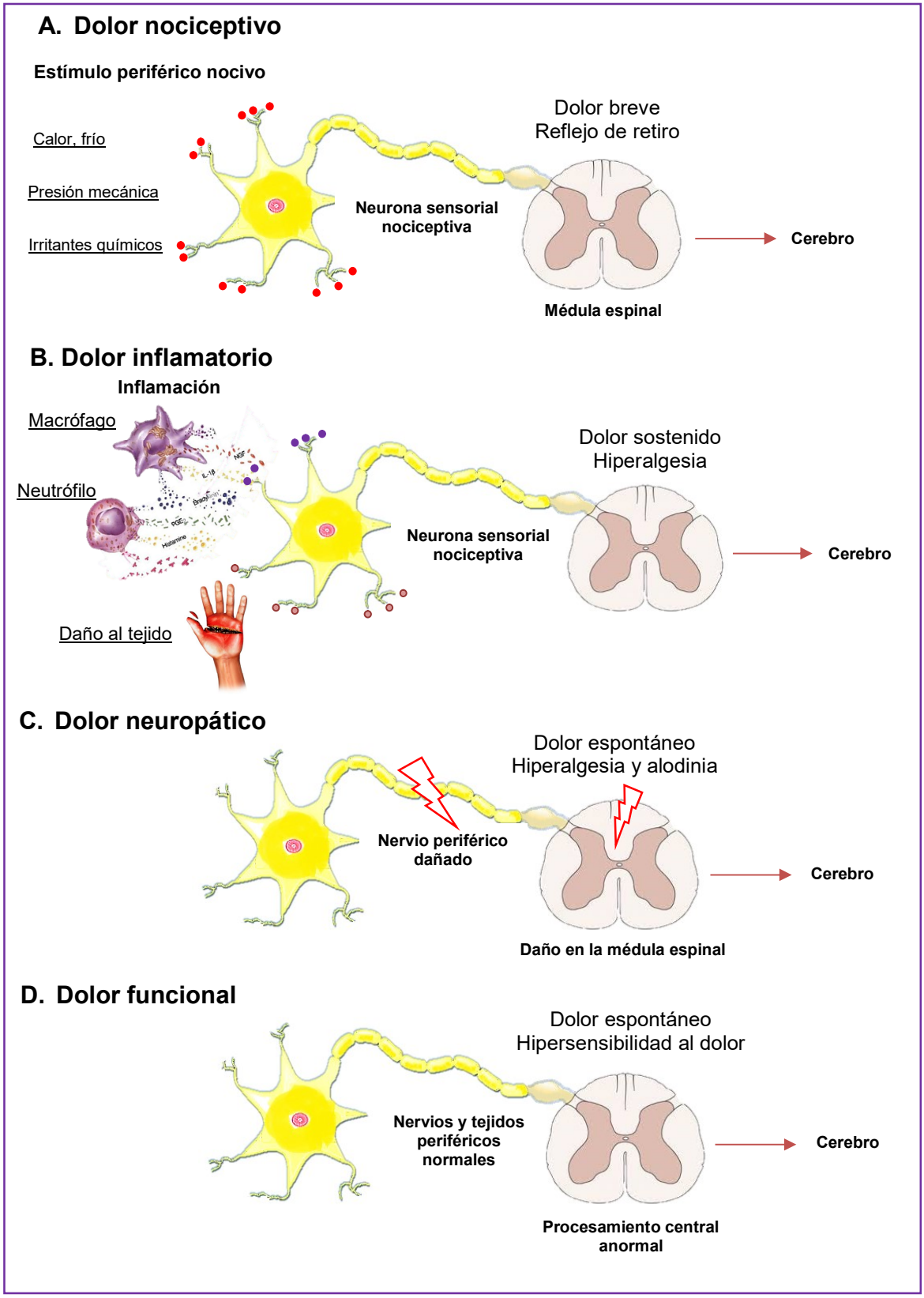

Figura 1. Clasificación del dolor (Modificado de Woolf, 2004).

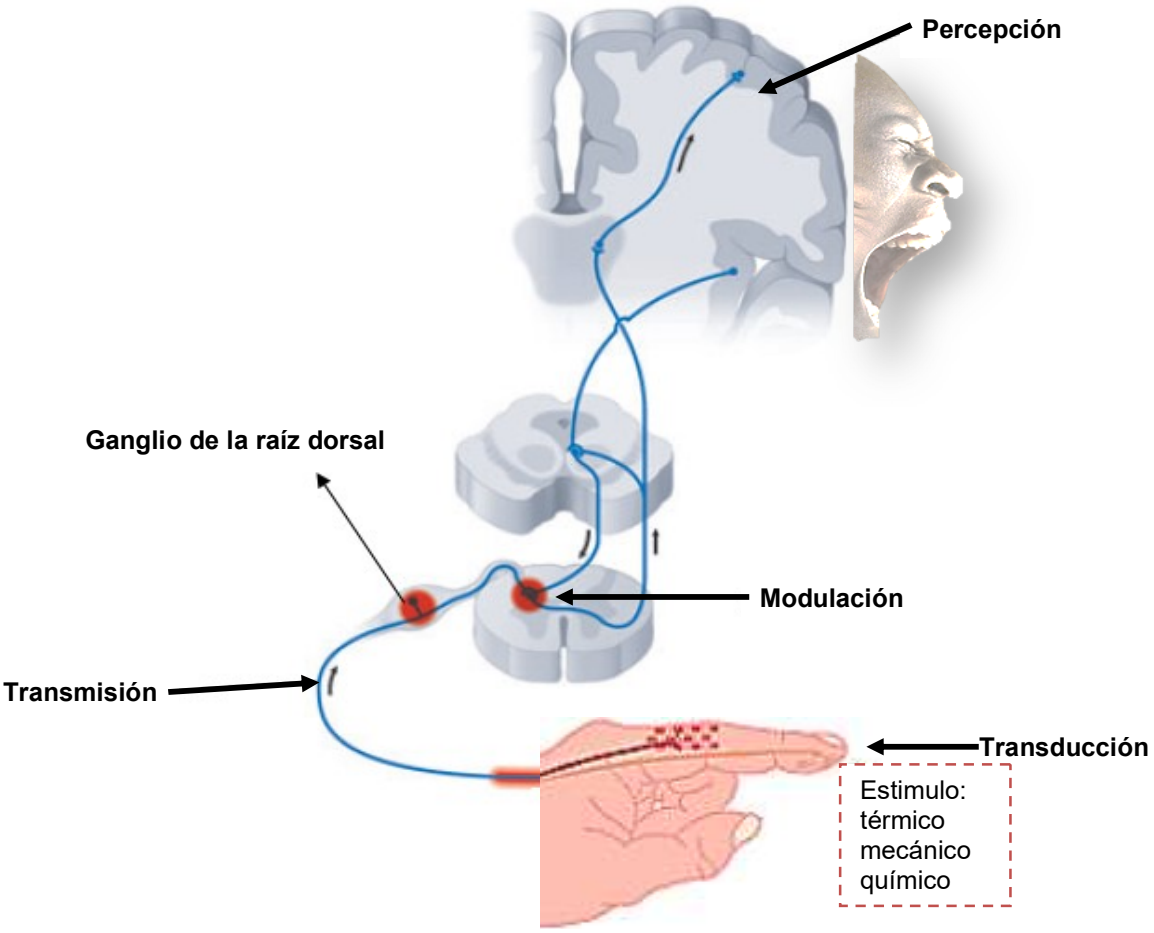

Figura 2. Los cuatro procesos fisiológicos que integran la nocicepción (Modificado de Costigan y cols., 2009).

Las terminales centrales hacen sinapsis con neuronas de segundo orden localizadas en el asta dorsal de la médula espinal (Sorkin, 1997). En función de sus características fisiológicas se distinguen tres grupos de nociceptores: fibras Aβ son gruesas, mecanosensibles, mielinizadas y de conducción rápida (30-100 m/s); fibras Aδ son delgadas, mecanotérmicas, mielinizadas y de conducción intermedia (12-30 m/s); fibras C son delgadas, polimodales (responden a estímulos térmico, mecánico o químico), no mielinizadas y de conducción lenta (0.5-2 m/s) (Julius y Basbaum, 2001).

En condiciones fisiológicas normales las fibras C y Aδ transmiten la información nociceptiva, mientras que las fibras Aβ detectan estímulos inocuos y no están involucradas en el procesamiento del dolor. Las fibras Aβ terminan en las láminas III, IV, V y VI, las fibras Aδ finalizan en las láminas I y V, mientras que las fibras C concluyen principalmente en la lámina II (Sorkin, 1997).

1.1.4. Transmisión nociceptiva

1.1.4.1. Sensibilización periférica

En condiciones fisiológicas el daño celular o inflamación induce la liberación de contenidos intracelulares de las células dañadas, como adenosín trifosfato (ATP), iones hidrógeno (H^+) y potasio (K^+). Además, células inmunitarias (macrófagos, mastocitos, neutrófilos, etc.) reclutadas en el sitio del daño producen y liberan aminas (serotonina, noradrenalina, histamina), citocinas (interleucina 1 beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6)), eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), cininas (bradicinina) y factor de crecimiento neuronal (NGF). Algunos de estos factores activan receptores específicos localizados en la terminal del nociceptor promoviendo la activación de proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina, fosfoinositida 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y otras cascadas de señalización. Estas cinasas fosforilan canales de Ca^{2+}, Na^+ y disminuyen las corrientes de K^+. Por otra parte, NGF se une a receptores tirosina cinasa A del factor de crecimiento neuronal (TrkA) e incrementa la síntesis y liberación de sustancias sensibilizantes (sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)) desde la terminal periférica manteniendo estimulada a las células inmunitarias e induciendo la extravasación plasmática y la vasodilatación (Yaksh y cols., 2015).

Asimismo, el complejo NGF/TrkA incrementa la regulación de receptores de potencial transitorio V1 (TRPV1) que se activan por calor nocivo (42^{o}C), pero una vez que las terminales periféricas de los nociceptores se sensibiliza se activan a temperatura ambiente (Costigan y Woolf, 2000). La sumatoria de todos estos efectos provoca la sensibilización periférica (figura 3).

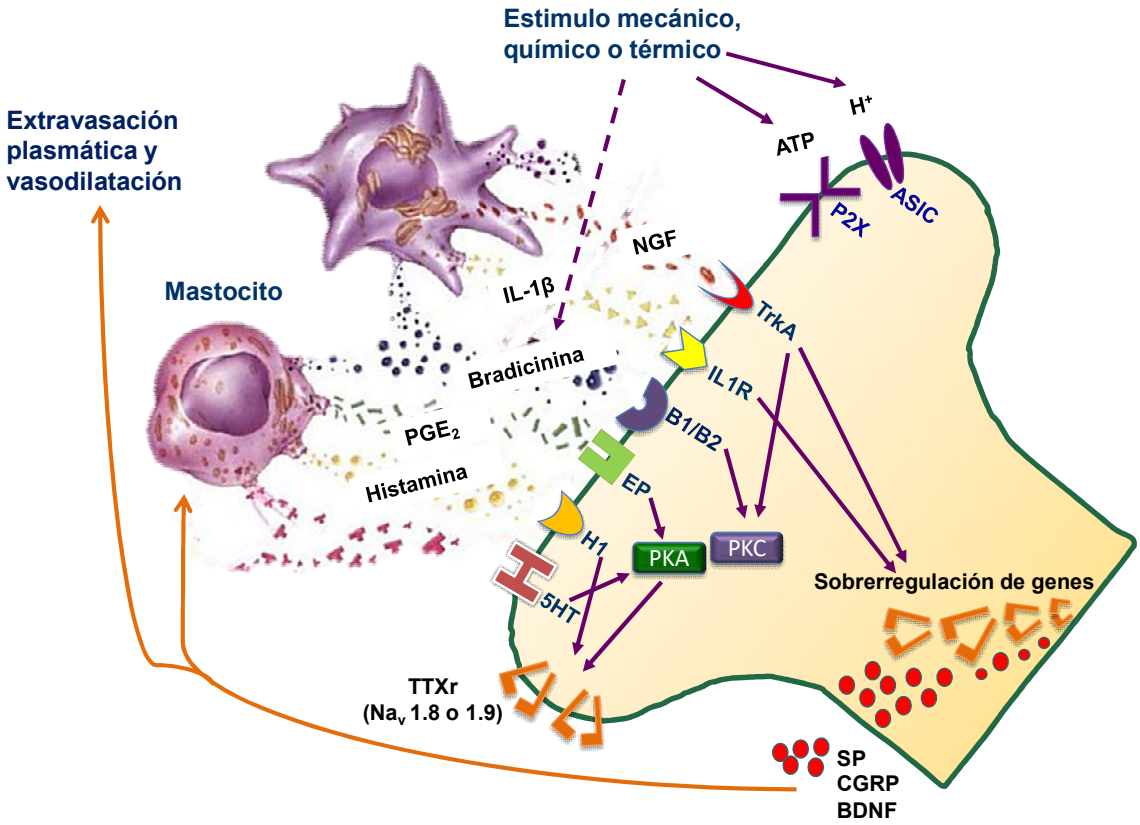

Figura 3. Sensibilización periférica. Cuando existe un estímulo nocivo en el tejido hay liberación de mediadores químicos por parte de células inmunitarias que activan receptores específicos ubicados en la terminal periférica del nociceptor. La activación de estos receptores induce la activación de segundos mensajeros (PKA, PKC), abertura de canales iónicos (Na^+, Ca^{2+}) e incremento en la regulación de algunos genes (SP, CGRP, BDNF) que contribuyen al aumento de la excitabilidad.

1.1.4.2. Sensibilización central

Evidencias experimentales sugieren que el estímulo periférico conduce en la terminal central del nociceptor la liberación glutamato que actúa sobre receptores localizados en la membrana de las neuronas postsinápticas de segundo orden. El glutamato ya sea liberado por las fibras Aδ o C se une a receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propiónico) permitiendo la entrada de Ca^{2+} y Na^+. También, activa receptores metabotrópicos específicos para glutamato (mGluRs) induciendo la activación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la vía inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3)-diacilglicerol (DAG) incrementando la actividad de PKA y PKC, respectivamente.

Además, puede actuar de manera retrógrada en mGluRs localizados en la membrana de la neurona presináptica llevando a la liberación de sustancia P que activa receptores de neurokinina 1 (NK-1) en la neurona postsináptica contribuyendo a la activación de PKA (Latremoliere y Woolf, 2009; Osikowicz y cols., 2013). La actividad de PKA y PKC a través de la activación de los receptores metabotrópicos conduce a un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en la neurona postsináptica que contribuye a la formación de potenciales de acción que abren canales de Ca^{2+} y Na^{+} sensibles a voltaje. También, el incremento de Ca^{2+} intracelular activa la sintasa de óxido nítrico (SON) y la posterior producción de óxido nítrico (ON) (Kanwar y cols., 2009). Todos estos factores actúan de manera sinérgica para generar la sensibilización central durante la hiperalgesia y alodinia (figura 16).

Una vez que la información nociceptiva se transmite de las fibras aferentes a las neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal, los axones de estas neuronas cruzan el cuadrante anterolateral contralateral para formar los tractos ascendentes: espinoreticular, espinoencefálico y espinomesenfálico. Posteriormente, los tractos ascendentes proyectan la información nociceptiva hacia las áreas límbicas y talámicas, que finalmente transmiten la información nociceptiva a diversas regiones corticales como la corteza somatosensorial, la corteza del cíngulo anterior y la corteza insular que influyen en diferentes aspectos de la experiencia del dolor (Scholz y Woolf, 2002).

También, la información nociceptiva viaja de centros superiores del cerebro y activa las vías descendentes inhibitorias y facilitadoras del dolor, que consisten en la activación de las neuronas de la sustancia gris periacueductal (PAG) que a su vez induce la excitación de las neuronas de la médula rostroventromedial (RVM). Las poblaciones neuronales de la RVM incluyen neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas, gabaérgica y glicinérgica que proyectan haciendo sinapsis con neuronas del asta dorsal de la médula espinal donde liberan sus respectivos neurotransmisores que se han asociado con la inhibición de la información nociceptiva (Hossaini y cols., 2012; Wei y cols., 2010).

1.2. Factor nuclear kappa B (NF-κB)

NF-kB pertenece a la familia de proteínas REL; esta proteína puede estar presente como homodímero o heterodímero y contiene las subunidades p65, p50, p52, RelB y c-Rel (Hayden y Ghosh, 2011). En su estado inactivo, NF-κB está unido en el citoplasma a los inhibidores de κB (IκB). NF-κB se activa por fosforilación de IκB. Como resultado, IκB libera el complejo p65/p50, el cual posteriormente se trasloca al núcleo para regular la transcripción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1β, IL-6, TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa)), moléculas de adhesión celular (CAM) y enzimas como SON y COX-2 (ciclooxigenasa-2) (He y King, 2004).

De manera interesante se ha sugerido que el incremento de TNF-α puede ser responsable de la sobrerregulación de $Na_{v1.7}$ en el ganglio de la raíz dorsal de ratas con neuropatía diabética a través de la activación de NF-κB (Huang y cols., 2014), por lo que la regulación génica de estos canales podrían estar participando en el dolor inflamatorio y en la neuropatía diabética dolorosa. La activación de NF-κB está regulada por diversos estímulos como son citocinas proinflamatorias, ON, radicales libres, estrés oxidativo y otros (lipopolisacárido bacteriano y virus) (Lawrence, 2009) (figura 15-16).

NF-κB en humanos está implicada en una variedad de condiciones de dolor como la artritis reumatoide, la migraña y la lesión nerviosa (Niederberger y Geisslinger, 2008). En modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático se ha observado una sobreexpresión de NF-κB en los ganglios de la raíz dorsal y la médula espinal (Ledeboer y cols., 2005; Lee y cols., 2011). El dolor provocado por la inflamación se atenúa con la desactivación de p50 (Niederberger y cols., 2007), el silenciamiento génico de p65 (Luo y cols., 2014) o la administración de un inhibidor del proteosoma que evita la disociación de IκB y la posterior liberación de p50 y p65 (Ahmed y cols., 2017). De manera similar, después de una lesión nerviosa el dolor se revierte mediante la administración de un señuelo de NF-κB que evita que NF-κB activada se una a un fragmento de ADN consenso e inicie la transcripción (Inoue y cols., 2006).

1.3. Vía ON-GMPc-K_{ATP}

Intracelularmente la SON genera ON por el catabolismo de L-arginina o L-citrulina. Existen 3 diferentes isoformas de SON: la isoforma neuronal (SONn) y endotelial (SONe), son reguladas por las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, mientras que la forma inducible (SONi), depende de otros factores como el NF-κB (Cury y cols., 2011; Forstermann y Sessa, 2012). Se ha reportado, que el ON es importante en la regulación de la actividad de COX-2 y la posterior producción de prostaglandina E2 (PGE2). El ON puede estar regulando indirectamente a COX-2, ya que se sabe que COX-2 es sobreregulada por NF-κB, el cual es inducido por ON (Hosseini y Abdollahi, 2013) (figura 15-16). También, el ON puede aumentar la liberación de sustancia P desde la terminal central del nociceptor y contribuir de esta manera a la hiperalgesia por incremento de Ca^{2+} intracelular en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Luo y Cizkova, 2000). Sin embargo, se ha sugerido que el ON puede tener efecto dual sobre procesamiento nociceptivo en la medula espinal (pro-nociceptivo o antinociceptivo) (Cury y cols., 2011). Los niveles altos de ON pueden estar asociados a la antinocicepción, mientras que niveles bajos de ON a la nocicepción.

En este sentido, el efecto antinociceptivo de algunas sustancias como el péptido sintético PnPP-19 y ketamina, es dependiente de la actividad de SON. Como consecuencia, los niveles de ON incrementaron después de la administración del péptido sintético PnPP-19 y ketamina, mientras que la inhibición de SON antagonizó el efecto antinociceptivo de estas sustancias (Freitas y cols., 2017; Romero y cols., 2011). El ON formado por SON estimula al guanilato ciclasa soluble induciendo un incremento en la síntesis de guanosin monofosfato cíclico (GMPc). El GMPc podría fosforilar y activar a la proteína cinasa G (PKG) provocando la abertura de canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), incrementando la permeabilidad al K^+ y la hiperpolarización (Han y cols., 2002). Por lo tanto, la vía ON-GMPc estimula la antinocicepción abriendo canales de K_{ATP} y algunas sustancias con actividad analgésica como las antes mencionadas podrían estar actuando a través de este mecanismo de acción.

1.4. Serotonina

Diversas evidencias indican que la activación de la vía descendente del dolor, a través de RVM libera serotonina (5-HT) en el asta dorsal de la médula espinal. Sin embargo, 5-HT puede participar de forma pronociceptiva o antinociceptivo, dependiendo del subtipo de receptor activado. La activación de los receptores para serotonina 5-$HT_{1A,}$ 5-HT $_{1B,}$ 5-HT $_{1D}$ y 5-HT_5 tiende a ser antinociceptivos, mientras que los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_3 y 5-HT_7 promueven la nocicepción (Amaya-Castellanos y cols., 2011; Ossipov y cols., 2014). La activación de receptores 5-HT_3 integra en su estructura un canal de Na^+, que aumenta las corrientes entrantes de Na^+ y la despolarización de las neuronas del asta dorsal (Bhargava y Saha, 2001; Millan, 1999). Los subtipos de receptores 5-$HT_{2/7}$ están acoplados a proteínas G_s, su activación activa adenilato ciclasa (AC), el cual estimula la activación de PKA dependiente de AMPc que fosforila canales de Ca^{2+}, Na^+ y disminuyen las corrientes de K^+, contribuyendo a la sensibilización central (Ponimaskin y cols., 2002; Sasaki y cols., 2003). Por otra parte, los receptores 5-HT_1 están acoplados a proteínas $G_{i/o}$, su activación inhibe AC, lo que disminuye los niveles de AMPc y por lo tanto la actividad de PKA. Además, la activación de este receptor puede inducir la abertura de canales de K^+ hiperpolarizando la neurona y disminuyendo el dolor (Bardin y cols., 2000; Del Mar y cols., 1994). Los receptores 5-HT_5 presentan una gran homología con receptores 5-HT_1, pero su mecanismo antinociceptivo no es claro, ya que no inhibe a la adenilato ciclasa (Plassat y cols., 1992) (figura 17).

1.5. Opioide

Los opioides endógenos son sustancias que se liberan en el encéfalo y actúan a través de receptores a opioides. Se han identificado diferentes tipos de opioides endógenos: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Además, está bien documentada la existencia de 3 clases de receptores opioides (μ, δ y κ). Los receptores μ, δ y κ están acoplados a proteínas $G_{i/o}$ y sus activaciones están involucradas en la regulación del proceso nociceptivo induciendo analgesia (D'Amato y Pavone, 2012). Por esta razón, en la clínica se ha hecho uso de opioides exógenos como morfina o fármacos similares para aprovechar sus propiedades analgésicas.

Se sabe que el efecto analgésico de morfina es por activación de receptores μ y su efecto puede deberse a mecanismos de acción en la periferia, médula espinal y supraespinal. El efecto morfina en la periferia podría estar relacionada a la activación de la vía ON-GMPc-PKG-K_{ATP}. En la médula espinal morfina puede estar actuando en la neurona presináptica y postsináptica. En las neuronas presináptica puede estar previniendo la abertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, con consecuente liberación de sustancia P y glutamato, mientras que, en la neurona postsináptica podría inhibir AC e inducir la abertura de canales de K^{+} (Yaksh, 1997; Yaksh y cols., 1980). Por otro lado, a nivel supraespinal puede estar bloqueando la liberación del neurotransmisor GABA de los sistemas de PAG con actividad tónica que regulan la actividad en las proyecciones hacia el bulbo raquídeo. Las proyecciones al bulbo raquídeo activan la liberación raquideoespinal de noradrenalina y 5-HT en el asta dorsal de la médula espinal por lo que disminuye la excitabilidad en esa región (Karavelis y cols., 1996; Yaksh, 1997).

1.6. Dolor inflamatorio

En el dolor inflamatorio periférico están involucrados diversos mecanismos que generan excitabilidad de la membrana e indirectamente induce a un incremento de la sensibilización central a través de la liberación de sustancias excitatorias en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, como fue descrito anteriormente en el apartado de “sensibilización periférica”. Sin embargo, la hipersensibilidad del dolor inflamatorio involucra la COX-2 en neuronas del asta dorsal de la médula espinal y la posterior producción de PGE2 (Vardeh y cols., 2009). PGE2 ligado a su receptor EP2 potencializa la corrientes de Ca^{2+} y Na^{+} a través de los receptores NMDA y AMPA (Kohno y cols., 2008), reduce la neurotransmisión glycinérgica inhibitoria por bloqueo de los receptores para glicina (Harvey y cols., 2004) y actúa sobre receptores para prostaglandinas EP4 ubicados en la membrana de las neuronas presináptica incrementando la liberación de neurotransmisores excitatorios (Vasko y cols., 1994).

Asimismo, la inflamación periférica promueve al incremento de la expresión de mGluR (Pitcher y cols., 2007). Además, el proceso inflamatorio puede inducir la activación de MAPK p38 en algunas células microgliales de la médula espinal induciendo a la síntesis y liberación de IL-1β, IL-6 y TNF-α que contribuyen a la sensibilización central por incremento de corrientes excitatorias y decremento de corriente inhibitorias (Svensson y cols., 2003) (figura 16). También, estas citocinas proinflamatorias pueden regular a NF-κB contribuyendo aún más a la sensibilización central (Hartung y cols., 2015).

El dolor inflamatorio puede considerarse una sensación fisiológica protectora ya que nos alerta para minimizar los efectos de un estímulo nocivo y así retornar a la normalidad una vez reparado el tejido. Sin embargo, en condiciones de dolor inflamatorio crónico se pierde la función protectora y puede producirse dolor espontáneo, lo que hace menos claro el procesamiento periférico y central de este tipo de dolor en condiciones crónicas.

1.6.1. Tratamiento del Dolor inflamatorio

En la clínica el tratamiento del dolor inflamatorio está basado en un modelo conocido como “escalera del dolor” y es implementado en todo el mundo. Este modelo consiste en emplear como tratamiento para el dolor inflamatorio leve acetomifén, aspirina y otros anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs). Si el dolor es de moderado a grave se deben incluir como tratamiento el uso de opioides leves como codeína e hidrocodona. Sin embargo, si el dolor inflamatorio es crónico debe implementarse el uso de opioides potentes como la morfina. Los fármacos adyuvantes como amitriptilina, gabapentina y otros pueden emplearse en todo momento para incrementar el efecto analgésico (De Lima y Bruera, 2000; WHO, 1990) (figura 4).

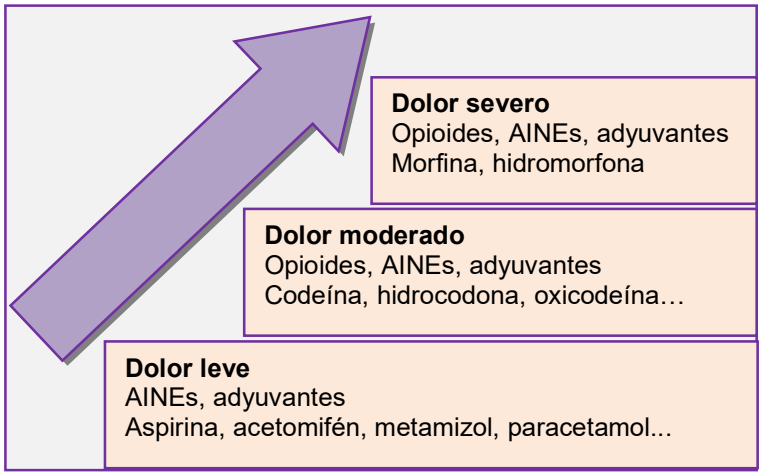

Figura 4. Tratamiento del dolor inflamatorio de acuerdo a la OMS (Modificado de Lima, 2000).

1.7. Dolor Neuropático

El dolor neuropático es causado por una lesión o enfermedad del sistema nerviosos somatosensorial. El síntoma más llamativo del dolor neuropático y hasta cierto punto su característica patognomónica, es la existencia de la alodinia, una sensación dolorosa frente a estímulos que habitualmente no son dolorosos, existiendo una falta total de relación causal entre lesión tisular y dolor. Además, la aparición de hiperalgesia una respuesta exagerada de dolor ante un estímulo nocivo (IASP, 1986). Algunas causas de dolor neuropático pueden ser clasificadas como se muestra en la tabla 1 (Zimmermann, 2001) (tabla 1).

1.7.1. Neuropatía diabética dolorosa

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglicemia) resultado de un defecto en la secreción y/o acción de la insulina. La gran mayoría de los casos de diabetes se dividen en dos categorías etiopatogénicas. Tipo 1, caracterizada por una deficiencia absoluta de secreción de insulina, que se desarrolla por una patología autoinmune que ocurre en los islotes del páncreas o por marcadores genéticos. Tipo 2 generada por una combinación de la resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta compensatoria en la secreción de la insulina (ADA, 2013). Se sabe que la diabetes provoca daños macrovasculares y microvasculares.

Tabla 1. Causas y subtipos de dolor neuropático.

CLASE	*SUBTIPO*
Lesión mecánica traumática	Transección del nervio Causalgía Daño de la médula espinal Dolor post-quirúrgico Dolor de miembro fantasma Formación de una cicatriz
Nutricional o metabólico	Neuropatía alcohólica Beriberi Síndrome del pie quemante
Neurotoxicidad	Vincristina Cisplatino Taxol Talio Arsénico Terapia con radiación
Viral	Neuralgia post-herpética Dolor por SIDA/VIH
Enfermedad (no viral)	Diabetes Esclerosis múltiple Neuralgia trigéminal Síndrome de Guillan-Barre Enfermedad de Fabrí Enfermedad Tangier Amiloide/Idiopático
Isquemia	Síndrome talámico Dolor post-infarto
Función de los neurotransmisores	Dolor por síndrome regional complejo

Los daños macrovasculares conducen a infarto al miocardio, accidentes cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas. Por otra parte, las afectaciones microvasculares se asocia a grupos celulares específicos como las células del endotelio vascular en la retina (retinopatía), las células mesangiales en el glomérulo renal (nefropatía) y los axones y células de Schwann en los nervios periféricos (neuropatía). La neuropatía diabética es la complicación más común de la diabetes, afecta cerca de 50% de pacientes diabéticos tipo y tipo 2. Aproximadamente de 10%-20% de pacientes con neuropatía diabética demuestran sensaciones dolorosas, por ejemplo, dolor espontáneo, parestesia, disestesia, hiperalgesia y alodinia (Brownlee, 2005; Naziroglu y cols., 2012). Se han propuestos diversos mecanismos que describen como la hiperglicemia puede contribuir al desarrollo de la neuropatía diabética dolorosa.

Entre los mecanismos planteados en la sensibilización periférica están las vías patogénicas de la diabetes, como poliol, productos de glicación avanzada (AGEs), activación de proteína cinasa C (PKC) y hexosamina que contribuyen a un decremento en la producción de piruvato axonal. En consecuencia, se origina una disfunción mitocondrial que está asociada a una disminución de ATP y un incremento del estrés oxidativo a través de especies reactivas de oxígeno (EROs; O^{2-}, H_2O_2, OH^-, $ONOO^-$). Además, la vía del poliol colabora al aumento del estrés oxidativo por agotamiento de NADPH, un cofactor necesario para generar la enzima antioxidante glutatión peroxidasa a partir de glutatión reducido.

La depleción de ATP puede reducir la actividad de la bomba Na^+/K^+-ATPasa e incrementar las concentraciones de Na^+ intracelular, lo cual activaría la bomba Na^+/Ca^{2+} y aumentaría las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Akude y cols., 2011; Lirk y cols., 2008). El gradiente iónico alterado generaría potenciales de acción en el axón, abriendo diversos tipos de canales sensibles a voltaje y activando el complejo SON-ON, que estimularía el dolor durante la neuropatía diabética (figura 15). Reportes actuales han descrito un aumento general de canales de $Na_{v1.6\text{-}1.8}$ y Ca_V (tipo L, T, N) con disminución en la expresión y función de los canales de K_v 1.2 en el ganglio de la raíz dorsal, sugiriendo que estos pueden contribuir a la hiperexcitabilidad del nervio periférico en modelos de diabetes mellitus tipo 1 (Khomula y cols., 2013; Zenker y cols., 2013).

Por su parte, el estrés oxidativo, ON y otras vías de la diabetes (AGEs, PKC) regulan el proceso inflamatorio a través de la activación de NF-κB (Hosseini y Abdollahi, 2013) (figura 15). Además, se ha reportado que en el ganglio de la raíz dorsal y nervios periféricos de ratas de 8 semanas de diabetes existe disminución en la expresión de la sintasa de óxido nítrico neuronal y por consecuencia una disminución de la activación y expresión de la vía ON-GMPc-K_{ATP} (Araiza-Saldaña y cols., 2010; Zochodne y cols., 2000).

La patogénesis del dolor en la neuropatía diabética también afecta el sistema nervioso central. EROs, ON y citocinas proinflamatorias pueden difundir al espacio extracelular activando los oligodendrocitos, astrocitos y microglia de la médula espinal induciendo la liberación de IL-1β, IL-6, TNF-α y COX-2 que acompaña al estado de dolor neuropático en la neuropatía diabética (Svensson y Brodin, 2010) (figura 16). Asimismo, el procesamiento sensorial en la médula espinal sufre una inhibición tónica a través de los sistemas descendente serotoninérgico y gabaérgico. Sin embargo, en condiciones de dolor neuropático los sistemas inhibitorios puede conducir a un proceso de desinhibición en la medula espinal (D'Mello y Dickenson, 2008).

En animales diabéticos se ha sugerido un incremento en la liberación de GABA y una disminución en el receptor $GABA_A$ en la médula espinal, que lo convierte en un receptor excitatorio debido al cambio en el potencial de equilibrio del cloro mediado por el agotamiento del cotransportador de K^+-Cl^- (KCC2) que puede contribuir al estado de dolor neuropático (Jolivalt y cols., 2008; Morgado y cols., 2008). El sistema serotoninérgico parece operar normalmente en ratas diabéticas, pero la modulación del dolor por 5-HT en la médula espinal puede inhibir o facilitar la transmisión nociceptiva dependiendo de la naturaleza del subtipo de receptor expresado a nivel central (Ossipov y cols., 2014) (figura 17).

1.7.2. Tratamiento de la neuropatía diabética dolorosa

El tratamiento para el dolor es importante en la neuropatía diabética porque afecta severamente el sueño, el rendimiento laboral y se ha encontrado una correlación entre depresión y nivel de dolor, lo que contribuye a un decremento en la calidad de vida de los pacientes diabéticos (Ogawa y cols., 2015). La neuropatía diabética dolorosa no tiene un tratamiento efectivo, ya que los fármacos comúnmente prescritos como AINEs y opioides por sí solos o combinados no son eficaces (Verdu y cols., 2008). En contraste, estudios en ratas con neuropatía diabética sugiere que opioides y AINEs (inhibidores selectivos de COX-2) inducen efecto antinociceptivo, pero las dosis empleadas fueron elevadas.

Por lo tanto, debido a sus efectos adversos el uso de dosis mayores de opioides (sedación, constipación, hiperalgesia, reducción de la inmunidad, supresión hormonal y dependencia) o AINEs (frecuencia de infarto al miocardio, apoplejía, trombosis) sigue siendo limitado (Courteix y cols., 1994). Por lo anterior, se ha optado por recurrir al uso de otros tipos de fármacos con relativo efecto en la disminución de dolor y alta incidencia de efectos adversos. Sin embargo, el uso de estos tratamientos puede justificarse, ya que mejoran otras condiciones como el sueño, la depresión y el mejoramiento en general de la calidad de vida de los pacientes diabéticos. Varias guías publicadas recomiendan antidepresivos tricíclicos (ATCs), inhibidores de la recaptura de serotonina noradrenalina (IRSNs) y anticonvulsivantes como tratamientos de primera línea para el tratamiento de neuropatía diabética dolorosa seguido por opioides y tratamiento tópico (tabla 2) (Javed y cols., 2015).

Tabla 2. Comparación de recomendaciones de guías seleccionadas para medicamentos utilizados para el dolor en la neuropatía diabética.

Tratamiento	AAN (2011)	NICE (2013)	EFNS (2010)	NeuPSIG IASP (2010)
ATCs			1ª línea	
Amitriptilina	2ª línea	1ª línea		
Desipramina				1ª línea
Imipramina				
IRSN	2ª línea		1ª línea	1ª línea
Duloxetina		1ª línea		
Velanfaxina				
Anticonvulsivantes			1ª línea	1ª línea
Gabapentina		1ª línea		
Pregabalina	1ª línea	1ª línea		
Opioides	1ª línea		2ª línea	2ª línea
Tramadol		2ª línea		
Topical Capsaicina (Crema 0.075%)				

AAN, American Academy of Neurology; EFNS, European Federation of Neurological Societies; NeuPSIG, Neuropathic Pain Special Interest Group of the International Association for the Study of Pain; NICE, National Institute for Health and Care Excellence. ATCc: Antidepresivos tricíclicos; IRSN: inhibidores de la recaptura de noradrenalina.

1.8. Función biológica de la eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una proteína activa constituida por 165 aminoácidos y un peso molecular de 30.4 kDa. La EPO tiene un alto contenido de carbohidratos distribuidos en 4 loci diferentes: tres N-glicosilaciones unidas a residuos de asparagina en las posiciones 24, 38 y 83, y una O-glicosilación unida a un residuo de serina en la posición 126. La O-glicosilación consta de Gal-GalNAc y ácido siálico, mientras que las N-glicosilación está formado por una estructura tetra-antenaria con N-GlcNAc y ácido siálico adherido a un grupo de manosa (Maiese y cols., 2008) (figura 5). Las cadenas de oligosacáridos son responsables de la producción, secreción, longevidad y funcionamiento de EPO; el ácido siálico al final de algunas cadenas de carbohidratos de EPO interviene en su metabolismo y vida media plasmática. La actividad biológica de la EPO depende de dos enlaces disulfuro, uno formado entre la cisteína7 y la cisteína160, y el otro entre la cisteína29 y la cisteína33 (Maiese y cols., 2009).

HIF-1 (factor inducible por hipoxia 1) es un factor de transcripción activado en condiciones de hipoxia. Este factor aumenta la transcripción y la expresión de EPO, así como las del receptor de la EPO (EPOR) para compensar la disminución de oxígeno (Zhang y cols., 2011). La EPO se produce y secreta en el hígado durante el desarrollo fetal; en la edad adulta es producida y secretada por las células intersticiales peritubulares del riñón. Esta proteína actúa uniéndose a EPOR expresada en la unidad formadora de colonias eritroides (UFC-E) y las etapas pro-eritroblastos, como protección contra la apoptosis (Bunn, 2013). La actividad de protección induce la proliferación celular y la maduración de normoblastos a reticulocitos, que a su vez se liberan de la médula ósea a la circulación sanguínea en forma de eritrocitos. Esta acción ayuda a aumentar el oxígeno en condiciones de hipoxia (Maiese y cols., 2012).

Además de los riñones, otros órganos (cerebro, retina, tracto reproductivo, mioblastos del músculo esquelético y células productoras de insulina) se han identificado como productores y secretores de EPO (Noguchi y cols., 2008).

Por ejemplo, la producción de EPO en el útero es estimulada por los estrógenos (17β-estradiol), que aumentan la proliferación del endometrio uterino durante la hipoxia (Mukundan y cols., 2002). Se sabe que el hipocampo, la cápsula interna, la corteza, el cerebro medio, las células endoteliales y los astrocitos también sintetizan EPO en condiciones hipóxicas (Marti, 2004). Como se mencionó anteriormente la secreción de EPO está relacionada con el grado de oxigenación tisular, por lo tanto, sus valores de referencia son muy variados y depende de la población que se estudia y la altitud en la que se localiza su hábitat.

Por otro lado, EPOR se expresa en tejidos no hematopoyéticos (endotelial, retinal, pulmonar, hepático, miocardio, adipocitos, macrófagos y células pancreáticas); también, en el sistema nervioso central (hipotálamo, hipocampo, neocorteza y médula espinal) y periférico (ganglios de la raíz dorsal, axones nerviosos y células de Schwann) (Maiese y cols., 2012; Wang y cols., 2014). Varios estudios sugieren que otros estímulos (hipoglucemia, aumento de Ca^{2+} intracelular, despolarización neuronal y especies reactivas de oxígeno) mejoran la expresión de EPO a través de la activación de HIF-1. Alternativamente, el estrés anémico, la liberación de insulina, TNF-α, IL-1β y IL-6 también estimulan la expresión de EPO y EPOR por vías independientes de HIF-1 (Maiese y cols., 2004, 2005). En tejidos no hematopoyéticos, la expresión de EPO y EPOR es una función biológica pleiotrópica (proliferación, actividad protectora / supervivencia, mantenimiento o reparación).

En pacientes con insuficiencia renal crónica (traumatismo, quimioterapia, trasplantes de riñón) las concentraciones de EPO disminuyen y se induce la anemia. Para tratar esta afección, una alternativa farmacológica es administrar EPO recombinante humana (rhEPO). Sin embargo, diversos informes han demostrado que los tratamientos a largo plazo con rhEPO inducen efectos adversos (hipertensión, convulsiones, eventos trombóticos, policitemia y aplasia de los glóbulos rojos); También es posible desarrollar la progresión celular y, en consecuencia, la generación de tumores (McPherson y Juul, 2008).

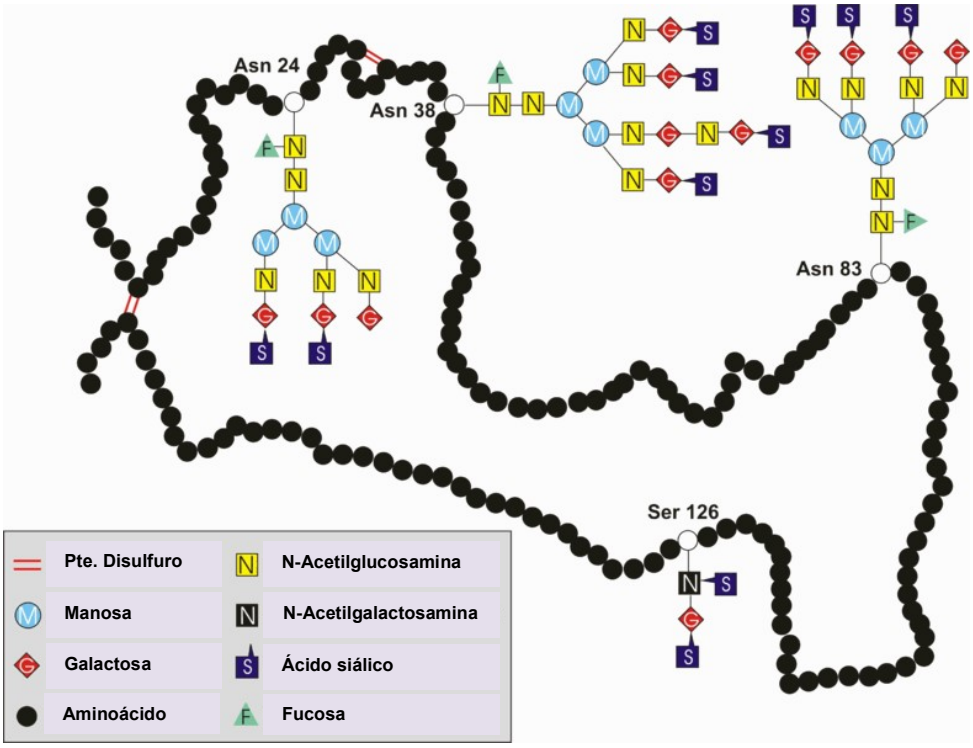

Figura 5. Estructura de la eritropoyetina.

1.8.1. Vías de señalización intracelular inducida por la interacción EPO-EPOR

EPOR, un receptor transmembrana, es miembro de la superfamilia de citoquinas tipo I. Este receptor tiene dos subunidades y su peso molecular es de 66 kDa. EPOR en tejidos no hematopoyéticos está asociado con la subunidad del receptor EPOR-βcR. Curiosamente, EPOR-βcR está involucrado en la actividad neuroprotectora inducida por EPO (Hernandez y cols., 2017; Yu y cols., 2016). La interacción EPO/EPOR también tiene vías de señalización en los sistemas neuronales y no neuronales por la fosforilación de la proteína Janus quinasa 2 (JAK2), que está unida a EPOR en el dominio transmembrana. La activación de JAK2 induce múltiples vías de señalización, incluidos el transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5), la fosfatidilinositol quinasa 3 (PI3K / Akt), MAPK p42/44 y NF-κB (Digicaylioglu y Lipton, 2001; Kwon y cols., 2014).

JAK2 inducido por la fosforilación de EPOR, permite la fosforilación y dimerización de STAT5. Posteriormente, STAT5 se traslada al núcleo y conduce a la transcripción de proteínas antiapoptótica como Bcl-xL y Bcl-2 (Silva y cols., 1996). La PI3K/Akt mediada por EPO conduce a la fosforilación de Akt (serina473). La activación de PI3K/Akt desactiva Bad, una proteína pro-apoptótica (Chong y cols., 2003). EPO-Akt previene la apoptosis celular por la fosforilación de la caja de horquilla O3a (FoxO3a), previniendo así la translocación nuclear y la transcripción de genes pro-apoptótico (Chong y Maiese, 2007). Además, EPO-Akt activa la diana de rapomicina en células de mamíferos (mTOR) y junto con la fosforilación de la proteína ribosomal S6 quinasa (p70S6K), provoca la expresión de Bcl-2/Bcl-xL e inactivación Bad.

Otros informes indican que las vías Wingless (Wnt) están asociadas con Akt, FoxOa3 y mTOR. En particular, EPO-Wnt1 induce la fosforilación de Akt y la glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β) que promueve la translocación de β-catenina al núcleo, empezando la transcripción de genes antiapoptóticos e inhibiendo la transcripción de genes pro-apoptóticos. Además, Wnt1 regula al inhibidor de la proteína de la apoptosis ligado a X (XIAP) y al factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) evitando la activación de caspasas (Maiese, 2015; Shang y cols., 2011). Por otra parte, la activación de NF-κB induce la liberación de la subunidad p50 y se traslada al núcleo e inicia la transcripción de proteínas antiapoptóticas (Schwartz y cols., 2015).

1.8.2. Eritropoyetina y neuropatía diabética dolorosa

La coexistencia de anemia y diabetes tiene una prevalencia que varía de 14% a 45% en diferentes poblaciones étnicas en todo el mundo (Cawood y cols., 2006; Ezenwaka y cols., 2008). Evidencias indican que los niveles de EPO endógeno en pacientes diabéticos (tipo 1 y tipo 2) con anemia son muy bajos y suele estar asociado a la presencia de enfermedad renal en estos pacientes (Loutradis y cols., 2016).

Sin embargo, se ha encontrado una disminución en las concentraciones de EPO en pacientes sin insuficiencia renal que junto con otras causas como deficiencia de hierro y mala absorción de vitamina B12 inducen a la aparición de anemia (Thomas y cols., 2003). La desregulación de los niveles y respuesta de EPO podría tener origen multifactorial. El estado de hipotiroidismo en pacientes diabéticos con anemia tiene una prevalencia estimada de 20 a 30% y puede ser responsable de la disminución en la síntesis de eritropoyetina debido a la reducción en la necesidad de oxígeno, que posteriormente puede conducir a la represión de la médula ósea (Sahay y cols., 2017). También, en la diabetes el flujo sanguíneo renal incrementa induciendo hiperfiltración, que resulta en un incremento de oxígeno renal que puede actuar suprimiendo la producción de EPO en el riñón diabético (Thomas y cols., 2005). La proteinuria en pacientes diabéticos es otro factor que sustancialmente promueve a la pérdida urinaria de EPO, lo cual resulta en la reducción de los niveles plasmático de EPO (Thomas y cols., 2005).

Se ha encontrado una correlación fuerte entre polineuropatía y el desarrollo de la anemia en diabetes (Bosman y cols., 2002). Además, la polineuropatía diabética puede estar estrechamente relacionada con la nefropatía diabética, lo que dificulta la separación entre la causa y el efecto. En este sentido, se ha sugerido que la deficiencia de EPO en pacientes con diabetes puede resultar en la denervación simpática del riñón debido a una neuropatía autonómica que podría crear un ambiente hipóxico en el intersticio renal, lo que causaría un deterioro en la producción de eritropoyetina por las células intersticiales peritubulares (Bosman y cols., 2001). La hiperglucemia crónica también podría conducir potencialmente a un aumento de la apoptosis de las células tubulares renales y la isquemia tubular a través de las vías patológicas de la diabetes (Singh y cols., 2009).

Por otro parte, la anemia crónica en diabetes predice la progresión de complicaciones macromoleculares como es la enfermedad cardiovascular.

La anemia empeora la hipoxia tisular, disminuye la viscosidad de la sangre y libera óxido nitroso, lo que provoca una vasodilatación periférica con un descenso de la presión arterial induciendo la activación del sistema nervioso simpático que reduce la función renal. Esto a su vez conduce a la activación del sistema renina angiotensina aldosterona vasopresina, provocando aumento en la retención de líquido y la expansión del volumen plasmático, lo que conlleva a la hipertrofia y dilatación del ventrículo izquierdo, así como el estrés en el miocardio. Además, la deficiencia de EPO puede causar defecto en la remodelación cardíaca, contribuyendo a la disfunción cardíaca (Gunawardena y Dunlap, 2012; Lapice y cols., 2013).

Algunos estudios en pacientes diabéticos con insuficiencia renal moderada demostraron una mejor función cardíaca con regresión de la hipertrofia ventricular izquierda después del tratamiento con eritropoyetina (Hayashi y cols., 2000; Silverberg y cols., 2001). Se sabe, que las células tubulares proximales del riñón también expresan EPOR, cuya activación puede ser importante en el desarrollo y crecimiento tubular. Sin embargo, la deficiencia de EPO en condiciones de diabetes puede acelerar la progresión de la insuficiencia renal (Thomas y cols., 2005). En este sentido, la administración de EPO tuvo efecto renoprotector en un modelo de nefropatía diabética en ratas (Eren y cols., 2016). La anemia asociada a insuficiencia renal crónica es más común en pacientes con neuropatía diabética severa (Bosman y cols., 2002; Bosman y cols., 2001). EPO es el fármaco de elección para tratar la anemia en pacientes diabéticos (Symeonidis y cols., 2006).

Interesantemente, en un modelo de neuropatía diabética dolorosa, el tratamiento con EPO revirtió la nocicepción mecánica, térmica y mejoró la actividad de la bomba Na^+/K^+-ATPasa. Además, EPO restauró las velocidades de conducción del nervio de la cola y la pérdida de fibras intraepidérmicas de la piel de la almohadilla de la pata (Bianchi y cols., 2004). Por lo tanto, se podría hipotetizar que EPO es una droga que se debe considerar como una opción terapéutica potencial en pacientes diabéticos ya que su administración podría tener múltiples beneficios y pocos efectos adversos en estos pacientes.

2. JUSTIFICACIÓN

El dolor inflamatorio crónico así como la neuropatía diabética dolorosa afectan la calidad de vida de los pacientes que lo padecen, y estos son refractarios a los tratamientos comúnmente prescritos como los AINEs. En ausencia de un mecanismo patogénico bien establecido para estos tipos de dolor se ha optado por el uso de ATCs, IRSNs, anticonvulsivantes y opioides, que tienen una eficacia limitada acompañada de numerosos efectos adversos. Por lo tanto, ambos tipos de dolor se consideran un problema de salud pública que requieren tratamientos más eficaces con menos efectos adversos, por esta razón el área de la investigación se debe comprometer con la constante búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas. Actualmente, se desconoce si EPO disminuye la nocicepción inducida por formalina, además no se ha reportado mecanismos involucrados en los posibles efectos antinociceptivos en ratas no diabéticas y antialodínicos en ratas diabéticas de EPO. Sin embargo, considerando que EPO tiene efecto protector en diversos modelos patológicos a través de la regulación de NF-κB, vía ON-GMPc-K_{ATP}, sistema serotoninérgico, sistema opioidérgico; y que estos blancos moleculares intervienen en el mecanismo fisiopatológico del dolor, se debe analizar la participación estas vías en los posibles efectos analgésicos de EPO.

3. HIPÓTESIS

EPO tiene efecto antinociceptivo y antialodínico en ratas, regulando la participación de NF-κB, vía ON-GMPc-K_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO y la posible participación de NF-κB, vía ON-GMPc-K_{ATP}, sistema serotoninérgico y sistema opioidérgico en estos efectos.

4.1.1. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas no diabéticas y diabéticas, respectivamente.
2. Cuantificar las concentraciones séricas de NF-κB en ratas no diabéticas a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos durante el efecto antinociceptivo de la dosis más efectiva de EPO.
3. Cuantificar las concentraciones séricas de NF-κB en ratas diabéticas a los 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos durante el efecto antialodínico de la dosis más efectiva de EPO.
4. Evaluar el efecto de L-NAME, glibenclamida, metiotepina y naloxona en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 280-300 g, los animales permanecieron en condiciones ambientales estándares de laboratorio con temperatura entre 22-24 ˚C, con ciclo de 12 horas luz/oscuridad, con acceso libre a comida y agua. Las ratas se utilizaron una sola vez y al término del experimento se sacrificaron en una cámara saturada de CO_2. Los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos para el cuidado de los animales de laboratorio y las guías éticas para la investigación del dolor experimental en animales conscientes (Zimmermann, 1983).

5.2. Fármacos

La estreptozotocina (STZ), eritropoyetina (EPO), NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME; inhibidor de la síntesis de óxido nítrico), NG-nitro-D-arginina metil ester (D-NAME; isoforma inactiva de L-NAME), glibenclamida (GLB; bloqueador de K_{ATP}), metiotepina (MTP; antagonista no selectivo del receptor para serotonina (5-HT)) y naloxona (NLX; antagonista no selectivo para el receptor opioide) se adquirieron en Sigma® (St. Louis, MO, USA). STZ, EPO, L-NAME, D-NAME y NLX fueron disueltos en solución salina, mientras que GLB fue disuelto en dimetilsulfóxido al 50%.

5.3. Evaluación de la conducta nociceptiva inducida por formalina

El modelo de formalina consistió en ambientar a las ratas durante 1h en cilindros de acrílico transparente (20 cm de diámetro por 40 cm de altura), previamente en la parte trasera se colocaron dos espejos de 40 x 40 cm, formando un ángulo de 45° para facilitar su observación. Posteriormente, se inyectó por vía subcutánea 50 µl de formalina diluida al 1% (aguja No. 30½) en la región dorsal de la pata derecha y se observó la conducta nociceptiva en forma de sacudidas de la pata inyectada.

La conducta nociceptiva fue cuantificada durante un periodo de 1 minuto cada 5 minutos, durante 60 minutos. Este comportamiento fue bifásico (Dubuisson y Dennis, 1977; Wheeler-Aceto y Cowan, 1991); la fase aguda inicial, denominada fase I (0-10 min) fue seguida por un periodo inactivo relativamente corto, el cual fue seguido por una respuesta tónica prolongada, denominada fase II (15-60 min) (figura 6). En este modelo la disminución en el número de sacudidas se interpretó como efecto antinociceptivo.

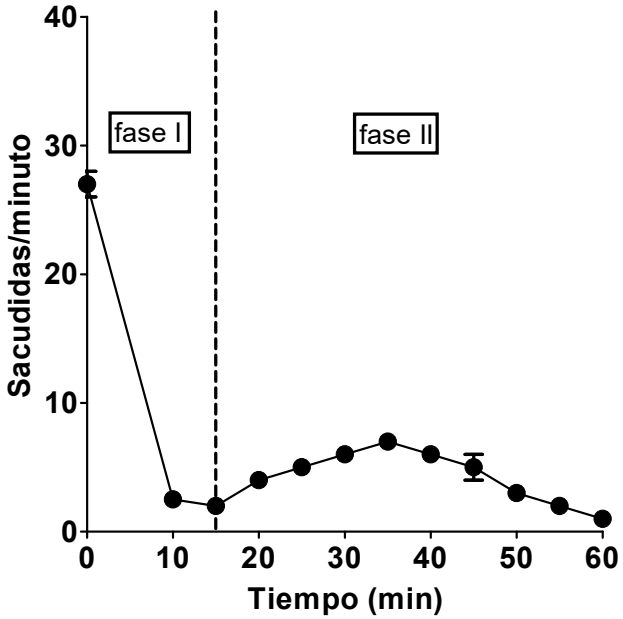

Figura 6. Curso temporal de la conducta nociceptiva inducida con formalina.

5.4. Inducción de la diabetes

La diabetes experimental fue inducida por una sola administración intraperitoneal (i.p.) de STZ (60 mg/kg). Cuatro días después de la inducción de la diabetes se midieron los niveles de glucosa en sangre con ayuda de un glucómetro ACCU-CHEK® Performa (Roche, México). Las ratas que presentaron niveles de glucosa ≥ 250 mg/dL se consideraron para el estudio.

5.5. Evaluación de la conducta alodínica

La alodinia táctil se midió en ratas diabéticas (4 semanas) como se describió anteriormente (Dixon, 1980). Para esta evaluación, las ratas diabéticas fueron transferidas a cajas de acrílico transparente (15cm x 25cm x 35cm) con fondo de malla metálica, y se dejaron aclimatar durante 60 minutos. Al transcurrir este tiempo, se procedió a evaluar la conducta alodínica utilizando los filamentos de von Frey (0,008 a 300 g de presión). Estos se aplicaron en la superficie plantar media de la pata trasera izquierda de la rata hasta formar un ángulo de 45º, iniciando con el de 2.0 g de presión. El levantamiento de la pata indicó una respuesta positiva y se procedió a utilizar el siguiente filamento de menor calibre, mientras que la ausencia del retiro de la pata después de 20 s de estimulación indicó una respuesta negativa y el uso del siguiente filamento de mayor grosor. Este paradigma continuó hasta que se realizaron cuatro mediciones más después del cambio inicial de la respuesta de comportamiento o hasta que ocurrieron 5 respuestas consecutivas negativas (asignadas una puntuación de 15 g) o cuatro respuestas positivas consecutivas (asignadas una puntuación de 0.25 g). Las puntuaciones resultantes se usaron para calcular el 50% de umbral de retiro (Chaplan y cols., 1994) usando la siguiente fórmula (figura 7):

$$\textbf{50\% umbral de retiro de la pata (g)} = (10[X_f + k\delta]/10.000)$$

X_f: valor del último filamento de Von Frey usado (unidades logarítmicas).
k: valor tabulado con base en el patrón de respuestas positivas y negativas.
δ: diferencias de promedios entre estímulos (unidades logarítmicas).

Las mediciones se realizaron antes y cada media hora durante 3.5 horas después de la administración de EPO. Valores de 4 g o menos indicaron alodinia táctil.

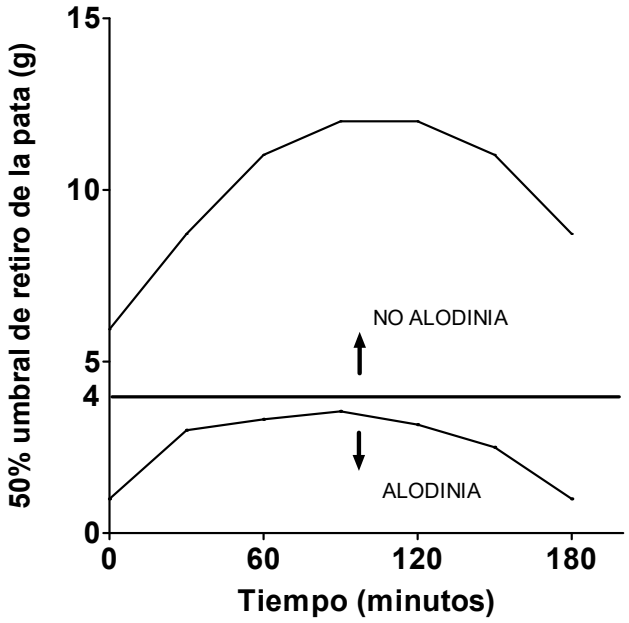

Figura 7. Curso temporal de la conducta alodínica.

5.6. Diseño experimental

En este estudio se evaluaron dos tipos de conductas dolorosas, nocicepción inducida por formalina al 1% utilizando ratas no diabéticas y alodinia utilizando filamentos de Von Frey en ratas diabéticas. Para medir el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO se administró por vía i.p. el vehículo o las dosis crecientes de EPO (500, 1000, 2000, 4000 IU/kg) (figura 8). El mejor efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO se obtuvo con la dosis de 4000 UI/kg, por lo tanto, esta dosis fue empleada para dilucidar los posibles mecanismos analgésicos de EPO. Para la medición de las concentraciones séricas de NF-κB en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO, las ratas se sacrificaron por decapitación y seis animales fueron sacrificados por cada tiempo. Diferentes grupos de ratas no diabéticas fueron usadas y sacrificadas a los tiempos 0, 15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración de EPO en el modelo de formalina. Otros grupos de ratas diabéticas se sacrificaron a los 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos después de la administración de EPO en la alodinia táctil. La sangre fue recolectada y el suero fue inmediatamente almacenado a -70 °C hasta que se midieron las concentraciones de NF-κB utilizando el kit ELISA para NF-κB (figura 9).

Para investigar la posible participación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO, L-NAME (0.1-1 mg/kg i.p.), D-NAME (1 mg/kg) y GLB (1-10 mg/kg) se administraron por vía intraperitoneal. Además, para investigar la participación de los receptores 5-HT y opioide se administró MTP (0.01-0.1 mg/kg, i.p.) y NLX (1 mg/kg s.c.), respectivamente. La pre-administración de los antagonistas se realizó (-40 minutos) previamente a EPO que se inyectó 30 minutos antes del inicio de la evaluación (figura 10). La dosis y la vía de administración de los fármacos se eligieron de acuerdo a previos reportes (Campana y Myers, 2003; Huang y cols., 2018; Quiñonez-Bastidas y cols., 2013).

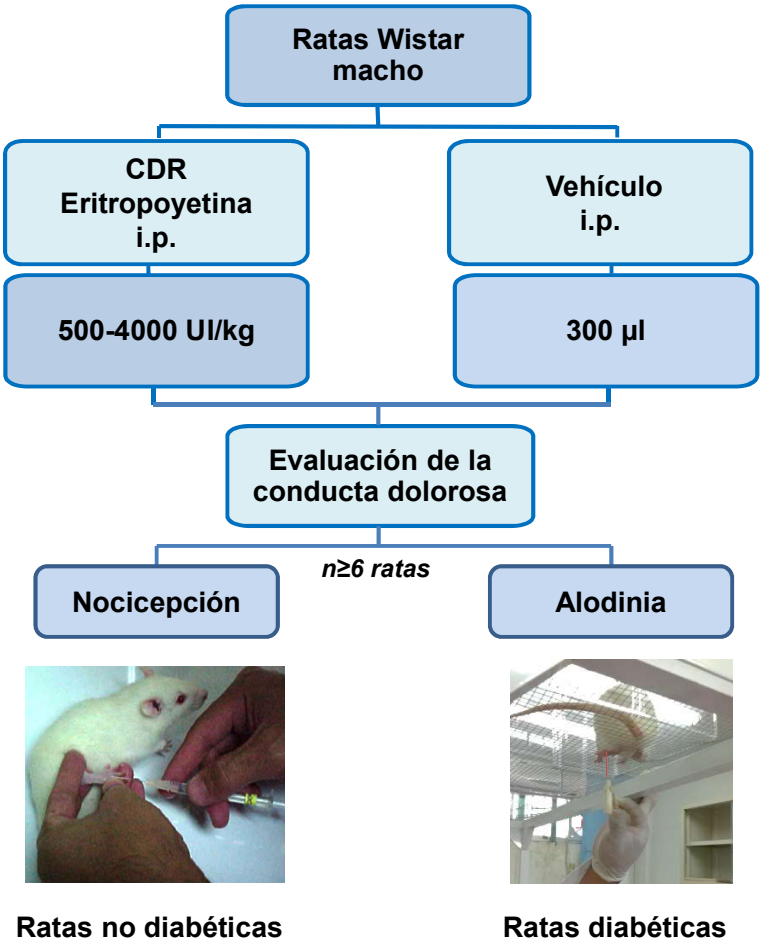

Figura 8. Diagrama de los grupos experimentales empleados para elaborar la curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y la alodinia en ratas diabéticas.

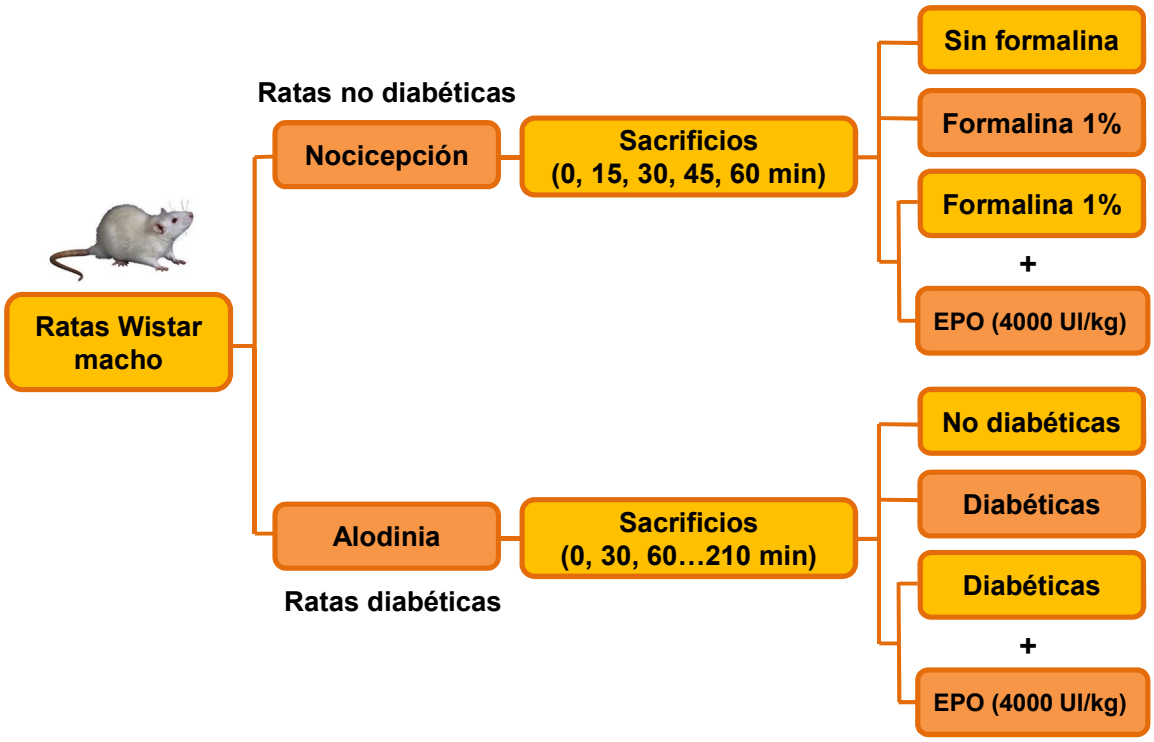

Figura 9. Diagrama para la medición de las concentraciones sérica de NF-kB durante el efecto antinociceptivo y antialodínico de la dosis mayor EPO.

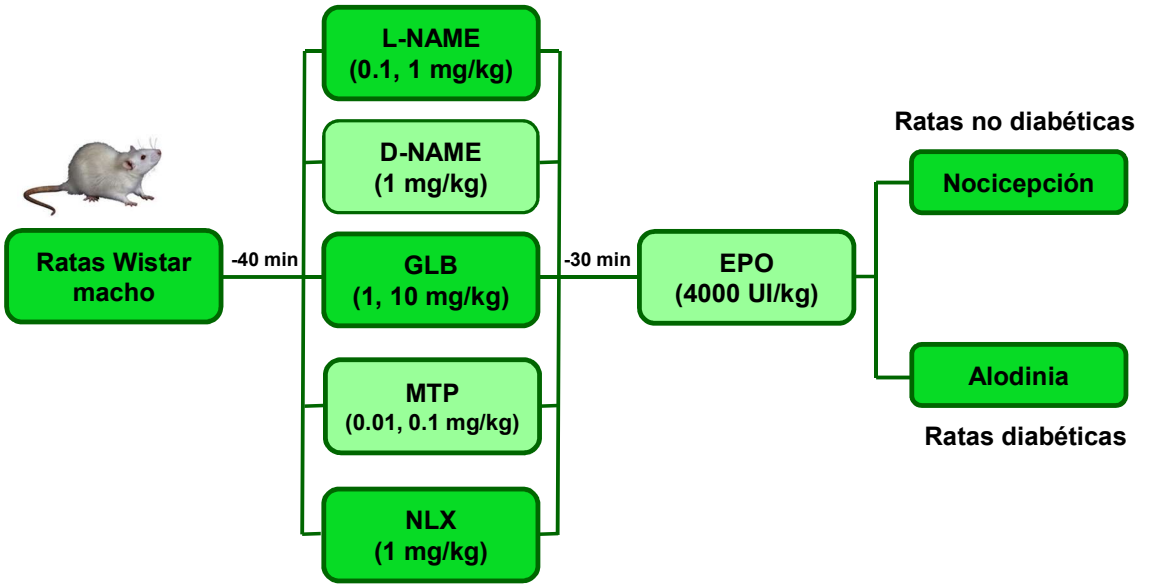

Figura 10. Diagrama para la exploración del mecanismo antinociceptivo y antialodínico de EPO, después del pretratamiento con los inhibidores, L-NAME, D-NAME, GLB, MTP y NLX.

5.7. Análisis de datos

Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar de una muestra de 6 o más animales por grupo. Se construyeron cursos temporales de la respuesta farmacológica y se calculó el área bajo la curva (ABC) mediante el método de los trapezoides. Todos los datos se compararon con sus respectivos controles por un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Tukey (comparaciones múltiples entre los tratamientos). Las concentraciones séricas de NF-κB se compararon con sus controles y se utilizó la prueba t de student´s. En todos los casos una $p<0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto antinociceptivo de EPO en ratas no diabéticas

Las ratas no diabéticas expuestas a la administración periférica local de formalina al 1% exhibieron el patrón bifásico de la prueba de formalina. La primera fase comenzó inmediatamente después de la administración de formalina y luego disminuyó gradualmente en aproximadamente 10 minutos. La segunda fase comenzó a los 15 min y duró hasta 1 hora. La inyección i.p. de eritropoyetina en ratas no diabéticas disminuyó el número de sacudidas/minuto en la fase II pero no en la fase I (datos no mostrados) del modelo de formalina al 1% (figura 11A). El efecto antinociceptivo mostrado por EPO (2000 y 4000 UI/kg) fue significativamente diferente con respecto al vehículo (figura 11A).

6.2. Determinación de la glucosa

La inyección de STZ en ratas produjo hiperglicemia. Los niveles de glucosa en sangre fueron de 326.7±11.41 mg/dL al cuarto día y 585±9.27 mg/dL a los 30 días.

6.3. Efecto antialodínico de EPO en ratas diabéticas

La alodinia se presentó a las cuatro semanas posterior a la administración de STZ en las ratas diabéticas (D). En estas ratas la inyección i.p. de EPO disminuyó la alodinia táctil incrementando el 50% umbral de retiro de la pata, efecto que se mantuvo durante 3 h (figura 11B). El efecto antialodínico que produjo eritropoyetina fue estadísticamente significativo y dosis dependiente (1000, 2000, 4000 UI/kg) respecto a las ratas diabéticas tratadas con el vehículo (figura 11B).

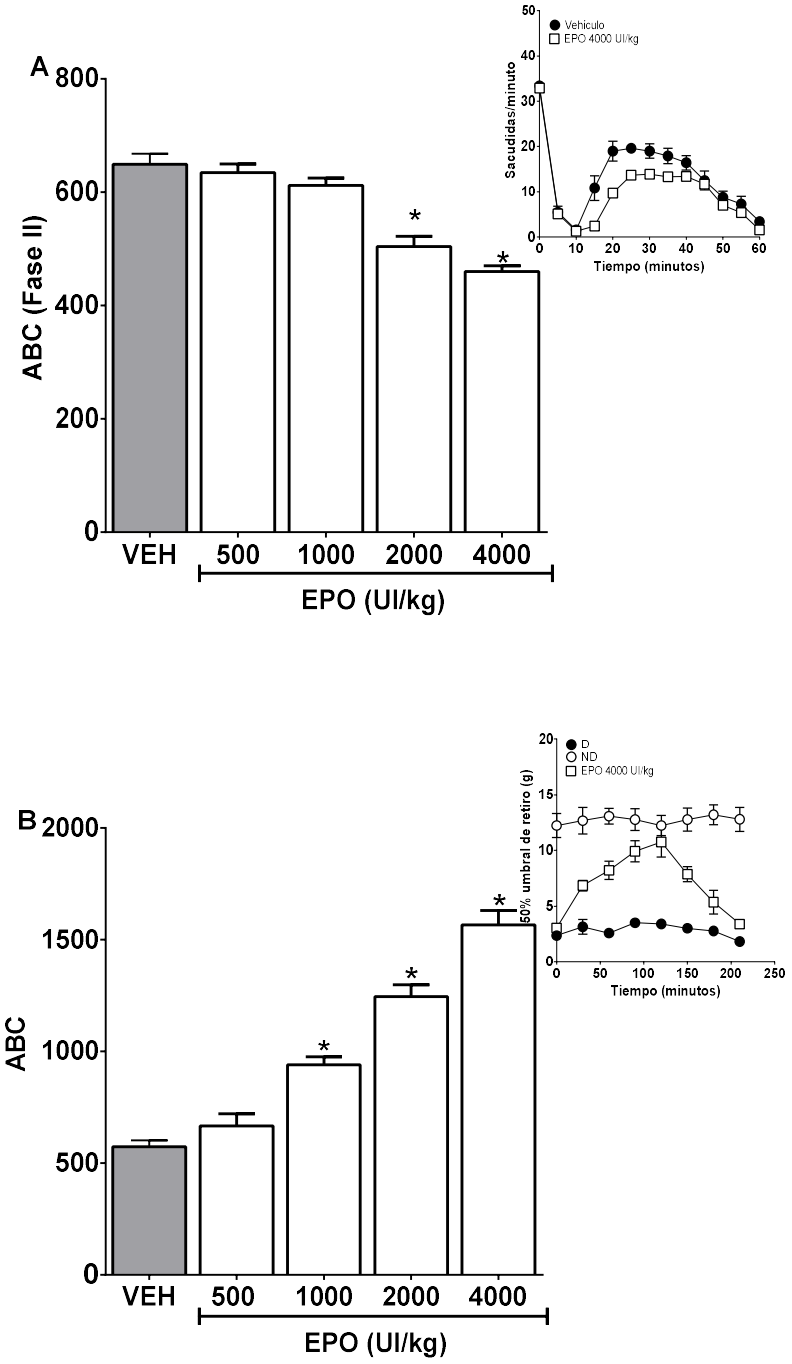

Figura 11. A. Área bajo la curva (ABC) del efecto antinociceptivo de eritropoyetina (EPO) en ratas no diabéticas. **B**. ABC del efecto antialodínico de EPO en ratas diabéticas. Las inserciones en la parte superior de cada gráfica muestra el curso temporal del efecto antinociceptivo y antialodínico de la dosis mayor de EPO (4000 UI/kg). Las barras muestran el promedio ± error estándar de al menos 6 ratas por cada columna. (*$p<0.05$) significativamente diferente con respecto al grupo vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

6.4. Cuantificación de las concentraciones séricas de NF-κB en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas

La inyección intraperitoneal de la dosis más efectiva de EPO disminuyó significativamente los niveles de NF-κB en suero comparado con el vehículo de ratas no diabéticas en la prueba de formalina a los 15, 30 y 45 minutos. De forma similar, la EPO disminuyó los niveles de NF-κB en suero de ratas diabéticas en alodinia táctil desde los 30 hasta los 180 minutos (Fig. 12A-C). Además, se observó una disminución del comportamiento nociceptivo y alodínico por la EPO en los mismos tiempos en que se redujeron los niveles séricos de NF-κB (Fig. 12A-C).

6.5. EPO revierte la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y la alodinia en ratas diabéticas por activación de la vía ON-GMPc-K_{ATP}

La administración intraperitoneal de L-NAME (1 mg/kg, figura 13A-B) y GLB (1-10 mg/kg, figura 13E-F) revirtieron de manera significativa el efecto antinociceptivo y antialodínico inducido por EPO (4000 UI/kg), pero no así D-NAME (1mg/kg, figura 13C-D) la isoforma inactiva de L-NAME. La administración de L-NAME, D-NAME y GLB por sí solos no afectaron la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y la alodinia táctil en ratas diabéticas.

6.6. EPO revierte la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y la alodinia en ratas diabéticas por activación de receptores para 5-HT y opioide

La administración sistemica de MTP (0.1 mg/kg, figura 14A-B) revirtió de manera significativa el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO (4000 UI/kg). Sin embargo, la inyección i.p. de NLX (1 mg/kg, figura 14C-D) no modificó estos efectos, por lo tanto se excluyó la posible participación del sistema opioidérgico en los efectos de EPO. También, la administración de MTP y NLX por sí solos no afectaron las conductas nociceptiva y alodínica en ratas no diabéticas y diabéticas, repectivamente.

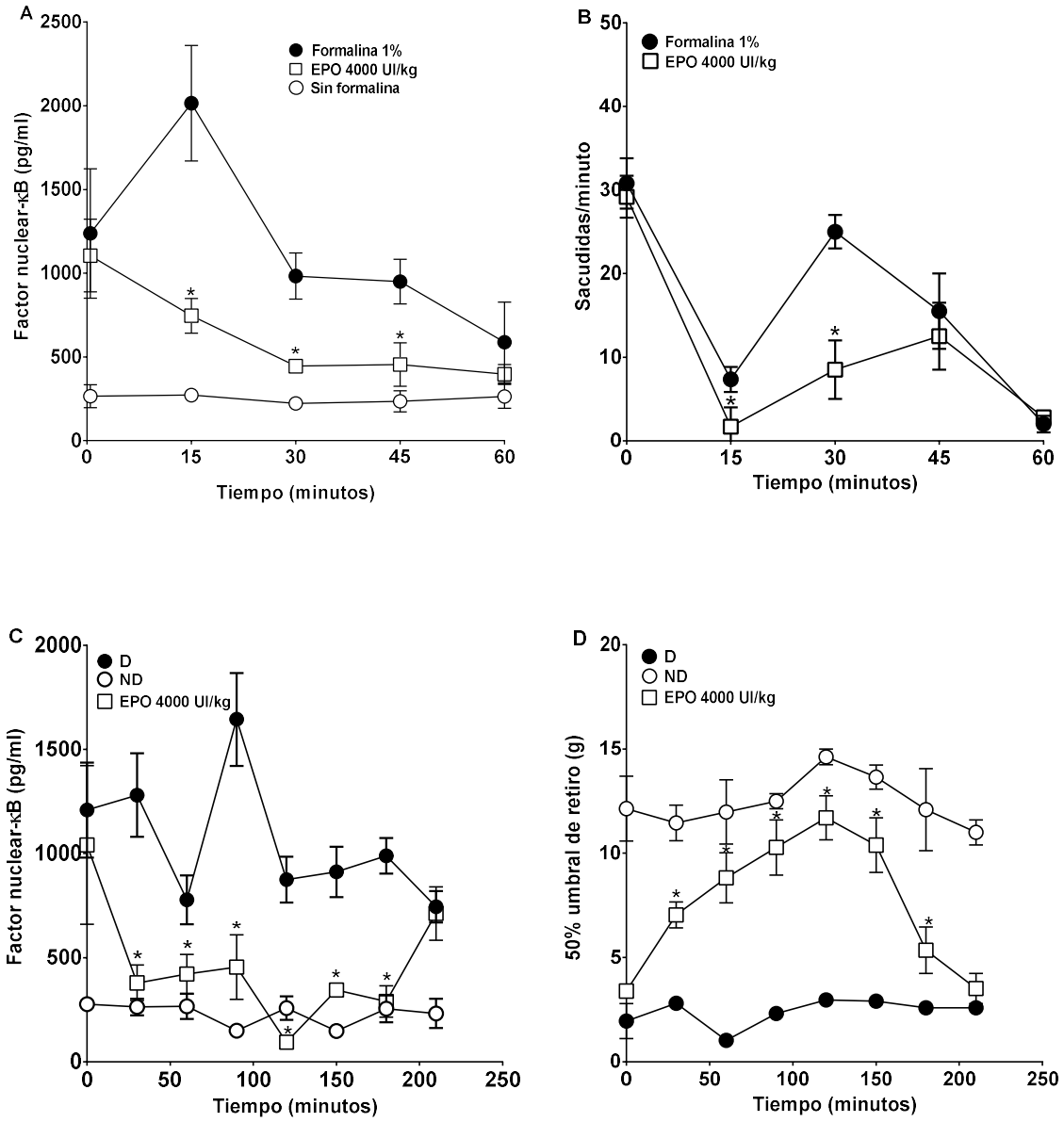

Figura 12. Curso temporal de las concentraciones séricas de NF-κB durante el efecto antinociceptivo (**A-B**) y antialodínico (**C-D**) de EPO. Las ratas tratadas con eritropoyetina (4000 UI/kg) se representan en cuadros vacíos y los grupos control en círculos negros y vacíos. Los datos representan el promedio ± SEM de 6 animales. * ($p<0.05$) significativamente diferente con respecto a los grupos controles que no recibieron tratamiento (formalina 1%, grupo diabético (D)), determinado por la prueba t de Student's.

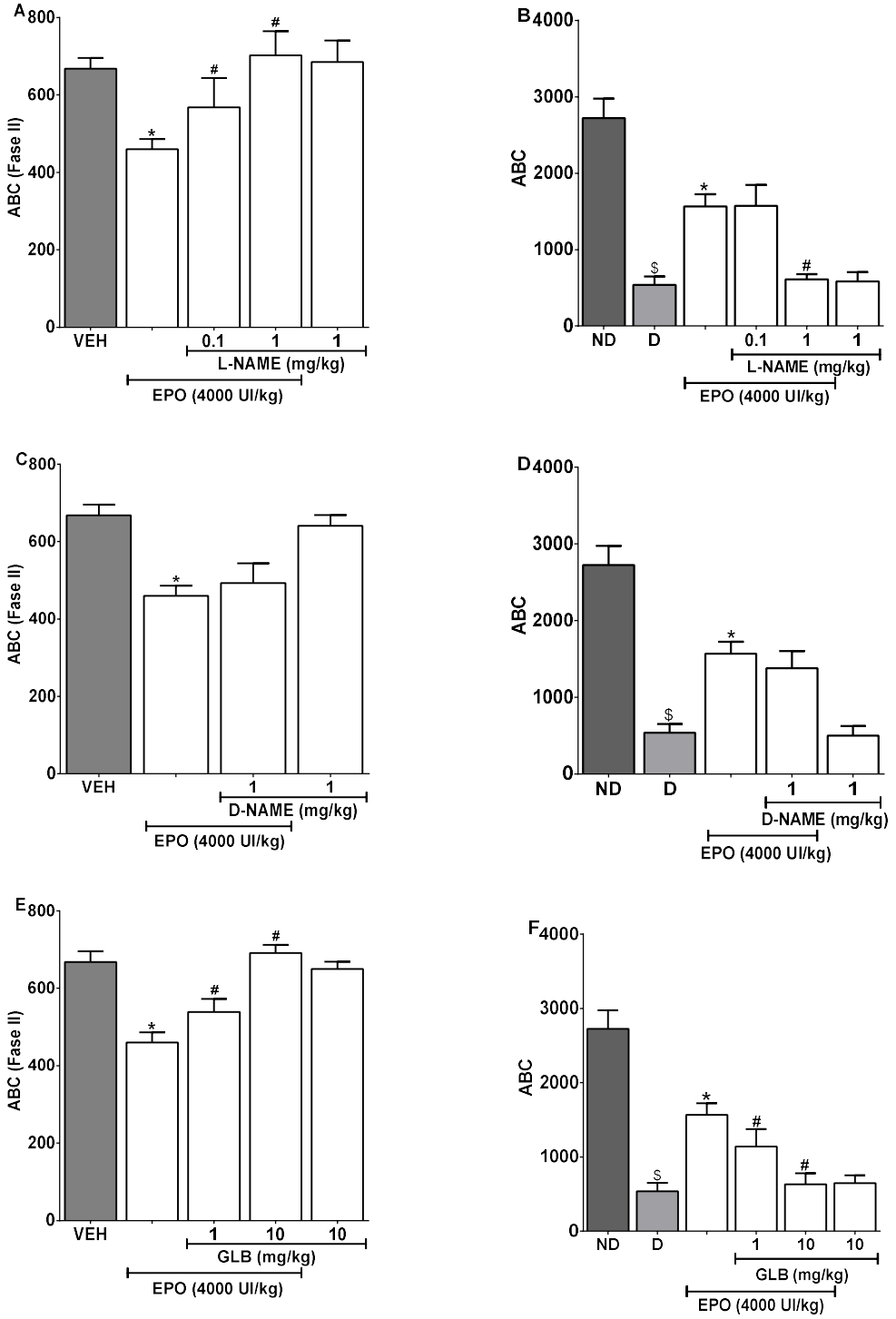

Figura 13. Efecto de L-NAME (**A**), D-NAME (**C**) y GLB (glibenclamida; **E**) en la actividad antinociceptiva de EPO en la segunda fase del modelo de formalina en ratas no diabéticas. Efecto de L-NAME (**B**), D-NAME (**D**) y GLB (glibenclamida; **F**) en la actividad antialodínica de EPO en ratas diabéticas. Las barras muestran el promedio ± error estándar de al menos 6 ratas por cada columna. $^{*}p<0.05$ contra grupo vehículo (VEH) o diabético (D); $^{\$}p<0.05$ contra el grupo no diabético (ND); $^{\#}p<0.05$ contra EPO, determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

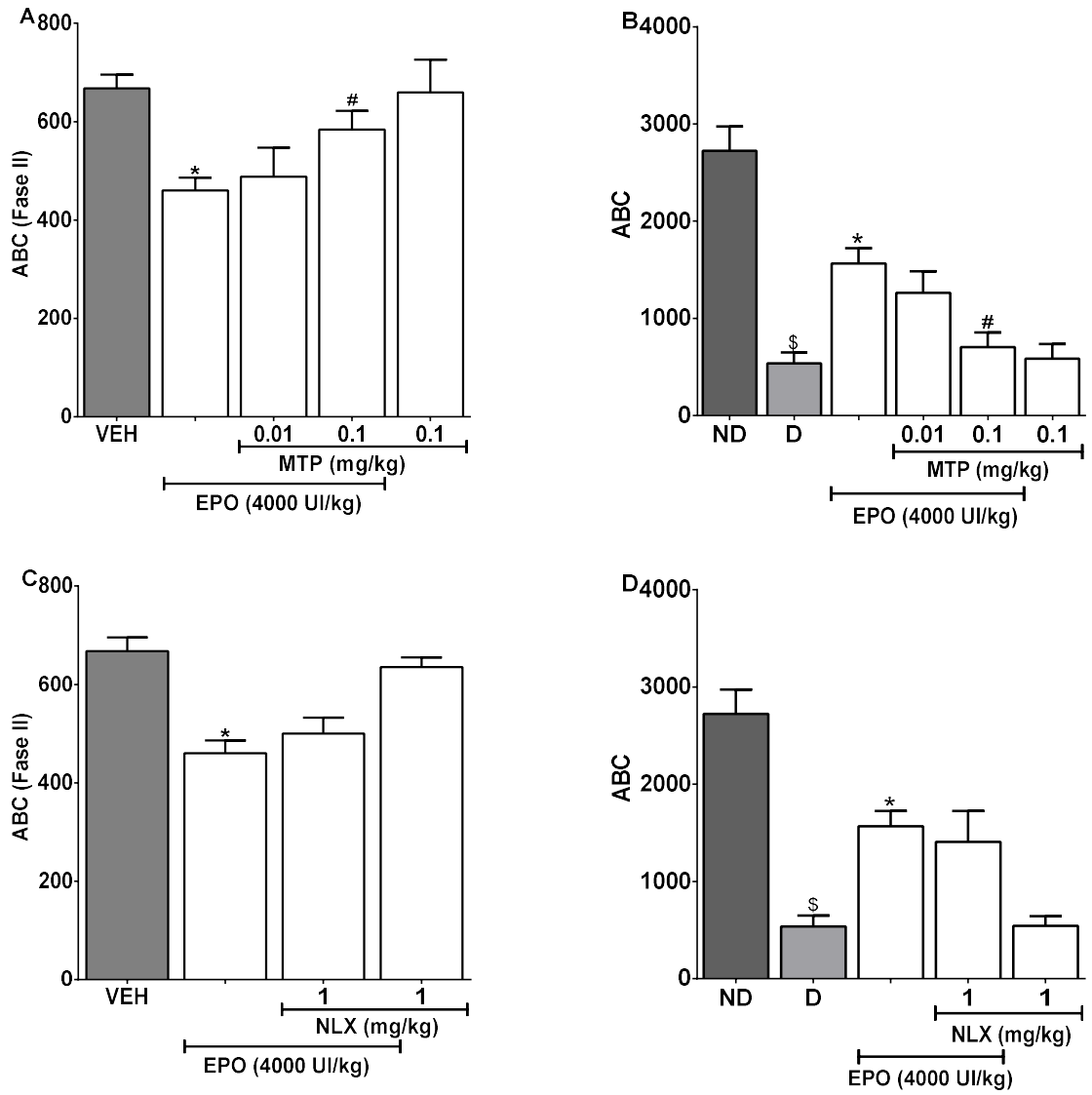

Figura 14. Efecto de MTP (metiotepina; **A**), NLX (naloxona; **C**) en la actividad antinociceptiva de EPO en la segunda fase del modelo de formalina en ratas no diabéticas. Efecto de MTP (metiotepina; **B**), NLX (naloxona; **D**) en la actividad antialodínica de EPO en ratas diabéticas. Las barras muestran el promedio ± error estándar de al menos 6 ratas por cada columna. $^{*}p<0.05$ contra grupo vehículo (VEH) o diabético (D); $^{\$}p<0.05$ contra el grupo no diabético (ND); $^{\#}p<0.05$ contra EPO, determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

7. DISCUSIÓN

7.1. Conducta nociceptiva inducida por formalina en ratas no diabéticas

La inyección de formalina al 1% produjo el comportamiento bifásico de sacudidas de la pata derecha en ratas no diabéticas. Estos resultados son similares a lo reportado por otros autores (Calcutt y Backonja, 2007; Juarez-Rojop y cols., 2006; Torres-Lopez y cols., 2007). Se sabe que la conducta dolorosa varía de acuerdo a la concentración de formalina (0.1%-10%) y en este sentido la respuesta nociceptiva dependen de la sensibilización central (muy diluido) o de la inflamación periférica (poco diluido) (Yashpal y Coderre, 1998). También, se sugirió que el aumento en el número de sacudidas de la fase II en ratas se relaciona con la expresión de COX-2 (Matsunaga y cols., 2007) y liberación de glutamato en la médula espinal (Vidal-Torres y cols., 2012).

7.2. Inducción de diabetes con STZ

La administración intraperitoneal de STZ (60mg/Kg) en ratas Wistar, produjo hiperglicemia crónica, acompañada por incremento en la ingesta de agua (polidipsia), alimento (polifagia) y constante excreción de orina (poliuria), síntomas característicos de la diabetes tipo I. Estos resultados son similares a otros reportes donde utilizan STZ para el desarrollo de diabetes tipo I en ratas (Courteix y cols., 1993; Fox y cols., 1999; Juarez-Rojop y cols., 2015; Suarez-Mendez y cols., 2017). Diversos reportes sugieren que el modelo de diabetes tipo I inducido con STZ es el más aceptado para evaluar diferentes conductas dolorosas (Bermudez-Ocana y cols., 2011; Calcutt, 2002; Jolivalt y cols., 2016). Datos en la literatura y el presente estudio, sugieren que las ratas diabéticas presentan alodinia e hiperalgesia a las 4 semanas después de la administración de STZ y persiste por lo menos durante 12 (Calcutt y Chaplan, 1997; Courteix y cols., 1993; Lee-Kubli y cols., 2014; Tsuda y cols., 2008).

7.3. Conducta alodínica en ratas diabéticas

La medida de umbral de retiro con filamentos de Von Frey representa una herramienta para analizar manipulaciones en el estado de dolor neuropático (Chaplan y cols., 1994). En las ratas diabéticas se encontró una disminución en el umbral de retiro de la pata con un valor aproximado de 2,5 g mostrando una conducta alodínica. Estos resultados son similares a lo reportado por otros autores que utilizaron ratas diabéticas (Araiza-Saldaña y cols., 2010; Calcutt y Chaplan, 1997); neuropatía con ligadura de los nervios espinales izquierdos L5 y L6 (modelo de Chung) (Mixcoatl-Zecuatl y cols., 2008; Ortega-Varela y cols., 2009) y neuropatía con ligadura parcial del nervio ciático (modelo de Seltzer) (Kim y cols., 2009).

7.4. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas

En el presente estudio la administración sistémica de eritropoyetina redujo la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas no diabéticas y la alodinia táctil en ratas diabéticas. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer reporte acerca del efecto antinociceptivo de EPO en ratas no neuropáticas. Sin embargo, nuestro estudio concuerda con lo reportado por Bianchi y colaboradores (2004) quienes mostraron que la administración intraperitoneal de EPO (40 µg/kg, tres veces por semana) previene y revierte la nocicepción mecánica y térmica en ratas diabéticas. Las diferencias con respecto a nuestro estudio podrían deberse a la concentración empleada y al periodo del tratamiento con EPO. Además, EPO redujo la alodinia mecánica en un modelo de aplastamiento del nervio espinal L5 en ratas(Campana y Myers, 2003). Asimismo, EPO disminuyó la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica en los modelos de constricción crónica del nervio ciático y transección del nervio espinal L5 (Campana y cols., 2006; Huang y cols., 2018; Jia y cols., 2009). En conjunto, estos datos sugieren que la EPO ejerce efectos antinociceptivo y antialodínico en ratas no diabéticas y diabéticas, respectivamente.

El efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO se obtuvo a partir de dosis altas (1000, 2000, 4000 UI/kg). Estos datos son soportados con un estudio farmacocinético donde sugieren que solamente dosis altas de EPO (2000-5000 UI/kg) pueden atravesar la barrera hematoencefálica y ser detectada en cerebro (Statler y cols., 2007). Sin embargo, dosis altas de EPO podría asociarse a efectos adversos (hipertensión, convulsiones, eventos trombóticos, policitemia y aplasia de los glóbulos rojos) (McPherson y Juul, 2008). En condiciones de diabetes los efectos adversos podrían no presentarse ya que las concentraciones de EPO endógeno son muy bajas, además, EPO exógeno reduce la progresión de la nefropatía diabética (Eren y cols., 2016). Por lo tanto, se podría suponer que EPO no solo ejerce su efecto analgésico, sino que además contribuiría al desarrollo y crecimiento tubular renal, restableciendo las concentraciones de EPO endógeno lo que permitiría disminuir las dosis de EPO exógeno empleadas para la neuropatía diabética dolorosa. En contraste, la administración de dosis altas de EPO en condiciones no diabéticas podrían presentar efectos adversos, con mayor riesgo en presencia de alguna enfermedad cardiovascular. Sin embargo, para descartar las posibles complicaciones hematopoyéticas de EPO se deben realizar investigaciones futuras con derivados de EPO (eritropoyetina carbamilada, asialo-EPO y ARA-290) que carecen de función hematopoyética y corroborar su eficacia analgésica (Brines y cols., 2015; Chen y cols., 2015).

Por otra parte, se sabe que el efecto antialodínico de un fármaco puede varia de 3 a 5 horas aproximadamente. En nuestro estudio el efecto antialodínico de EPO se mantuvo durante 3 horas en ratas diabéticas, su explicación podría basarse en el hecho que EPO tiene efecto pleiotrópico en condiciones de diabetes, por lo tanto, la concentración de EPO administrada en ratas diabéticas se distribuiría no solo para ejercer el efecto antialodínico, sino para ejercer su efecto hematopoyético original y otros efectos antes mencionados. También, en condiciones de diabetes los animales presentan poliuria por lo que durante la evaluación se podría estar presentado un aclaramiento más rápido de EPO.

7.5. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la participación de NF-κB en ratas

Diversos estudios indican que la segunda fase de la prueba de formalina se caracteriza por elevación de IL-1β, IL-6 y TNF-α, eicosanoides y óxido nítrico, citocinas relacionados con la activación de NF-κB (Chichorro y cols., 2004; Hunskaar y Hole, 1987; Watkins y cols., 1997). Del mismo modo, la neuropatía diabética sufre un proceso inflamatorio por activación de NF-κB a través de vías inducidas por la glucosa, como PKC, AGE y el aumento del estrés oxidativo (Hosseini y Abdollahi, 2013; Yagihashi y cols., 2011). Además, han sugerido que el incremento de TNF-α puede ser responsable de la sobrerregulación de $Na_{v1.7}$ en el ganglio de la raíz dorsal de ratas con neuropatía diabética a través de la activación de NF-κB (Huang y cols., 2014). En este sentido, la inhibición de NF-κB disminuyó la alodinia e hiperalgesia en ratas con neuropatía diabética y en otros modelos de dolor neuropático (Fu y cols., 2010; Huang y cols., 2014; Meunier y cols., 2007; Tegeder y cols., 2004). Los resultados de este trabajo indican que los efectos antinociceptivo y antialodínico de EPO pueden estar asociados a la disminución de la expresión de NF-κB después de su administración.

A la fecha no se ha reportado el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la disminución de la expresión de NF-kB en el suero de ratas no diabéticas y diabéticas, respectivamente. Sin embargo, en un modelo de transección del nervio L5, EPO redujo la alodinia mecánica por inhibición de la activación de la microglia y NF-κB, suprimiendo la sobreexpresión de TNF-α, IL-1β e IL-6 e incrementando la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Jia y cols., 2009). Asimismo, en un modelo por constricción crónica del nervio medio, la unión de EPO a sus receptores en las células de Schwann mantuvo la integridad de la mielina y bloqueó las descargas ectópicas en el nervio medio lesionado, que al final contribuyó a la atenuación del dolor neuropático mediante la reducción de la liberación de glutamato de las aferentes primarias e inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias por la microglia (Huang y cols., 2018).

Además, en un modelo de nefropatía diabética, el efecto renoprotector de EPO fue atribuible a un incremento de enzimas antioxidantes y una disminución en los niveles séricos de IL-4, IL-1β, interferón gamma (IFN-ɣ) y TNF-α que podría estar asociado con la inactivación de NF-κB (Eren y cols., 2016). También, otros reportes asociados al efecto protector de EPO sugirieron una disminución de IL-1β, TNF-α e IFN-γ en el cerebro lesionado de rata y en un modelo de isquemia/reperfusión intestinal asociado con la supresión de la activación de NF-κB (Chen y cols., 2007; Kai-lan y Si, 2015). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto antinociceptivo de EPO en ratas no diabéticas y la antialodinia en ratas diabéticas, podría deberse a la inhibición de la activación de NF-κB (figura 15-16). En este sentido, la activación de la subunidad p50 de NF-κB por EPO está implicada en la eritropoyesis, así como en el desarrollo neuronal y la supervivencia (Gutierrez y Davies, 2011). Por el contrario, el efecto antiinflamatorio de EPO es debido a la inhibición de la activación de la subunidad p65 de NF-κB (Nairz y cols., 2011).

7.6. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la participación de la vía ON-GMPc-K_{ATP}

Se sabe que EPO incrementa la expresión de SONn, SONe y SONi con un posterior aumento en la producción de ON en la cicatrización de heridas (Sorg y cols., 2013) y en lesión renal por isquemia/reperfusión (Elshiekh y cols., 2017) o shock hemorrágico (Ranjbaran y cols., 2017). También, EPO fue asociado con la abertura de canales de K_{ATP} en condiciones de hipoxia en cultivo de células tubulares renales (Yilmaz y cols., 2015) y en un modelo de isquemia/reperfusión renal (Yazihan y cols., 2008). Lo anterior nos permitió explorar la posible participación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO. En el presente estudio se observó que un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME) y un bloqueador de canales de K_{ATP} (glibenclamida) revirtieron el efecto antinociceptivo en ratas no diabéticas y el efecto antialodínico en ratas diabéticas.

La participación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO es consistente con el hecho que el ON abre indirectamente canales de K_{ATP} en neuronas del ganglio de la raíz dorsal en ratas con ligadura del nervio espinal, induciendo hiperpolarización y antinocicepción (Kawano y cols., 2009). Además, se reportó que en el ganglio de la raíz dorsal y nervios periféricos de ratas con neuropatía diabética dolorosa existe disminución en la expresión de la SONn y por consecuencia una disminución de la activación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} (Araiza-Saldaña y cols., 2005; Zochodne y cols., 2000). Nuestros datos son congruentes con otros estudios donde algunos fármacos presentan efectos antinociceptivos y antialodínicos a través de la vía ON-GMPc-K_{ATP} (de los Monteros-Zuñiga y cols., 2016; Quiñonez-Bastidas y cols., 2013). Nuestros datos sugieren la participación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} en el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO en ratas no diabética y diabéticas, respectivamente (Figura 15-16).

7.7. Efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO asociado a la participación de sistema serotoninérgico y opioidérgico.

La administración sistémica de metiotepina, un antagonista no selectivo del receptor para 5-HT, inhibió el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO observado en este estudio. Se sabe que metiotepina tiene afinidad por los subtipos de receptores 5-$HT_{1/2/5/7}$ (Hoyer y cols., 1994). En este sentido, la 5-HT espinal puede ser pro-nociceptivo o antinociceptivo dependiendo el subtipo de receptor activado. Los receptores 5-$HT_{1/5}$ (Granados-Soto y cols., 2010) tienden a ser antinociceptivo y los receptores 5-$HT_{2/7}$ pro-nocicepción (Amaya-Castellanos y cols., 2011; Pineda-Farias y cols., 2015). En contraste, un agonista del receptor 5-HT_7 bloqueó la hiperalgesia, mientras que un antagonistas de 5-HT_7 indujo a un aumento del dolor en ratones (Brenchat y cols., 2009), lo que pone a discusión si la activación del receptor 5-HT_7 induce antinocicepción o nocicepción. Todos estos datos juntos podrían sugerir que EPO reduce la nocicepción inducida por formalina en ratas no diabéticas y la alodinia táctil en ratas diabéticas por activación de los receptores 5-$HT_{1//5}$ (figura 17).

Finalmente, la administración de NLX, un antagonista no selectivo de los receptores opioide, no inhibió el efecto antinociceptivo en ratas no diabéticas y el efecto antialodínico en ratas diabéticas. La dosis de NLX utilizada en este estudio ha demostrado ser lo suficientemente alta como para bloquear la antinocicepción inducida por morfina en varios modelos de dolor (Zahn y cols., 1997), por lo que nuestros datos sugieren que los efectos antinociceptivo y antialodínico de EPO son independientes de los receptores opioides. Además, estudios previos han sugerido que hay una reducción de la capacidad de respuesta de los opioides en el dolor neuropático debido a una disminución de la regulación o desensibilización de los receptores de opioides (Porreca y cols., 1998). En la actualidad, no se ha reportado el efecto antinociceptivo, antialodínico o neuroprotector de EPO asociado a la participación del sistema serotoninérgico u opioidérgico.

7.8. Otros mecanismos que podrían estar implicados en el efecto analgésico de EPO

Los mecanismo neuroprotectores sugeridos para EPO en otro modelos experimentales muestran similitud con vías fisiopatológicas involucradas en el dolor inflamatorio y neuropático, es por esta razón que EPO podría ser una terapia efectiva para el dolor a partir de sus efectos neuroprotectores (Landowski y cols., 2016). Línea de evidencia *In vitro* sugirieron que EPO incrementó los niveles de glutatión, disminuyó los niveles de EROs, redujo el estrés oxidativo y por lo tanto la apoptosis de las células Schwann aisladas a partir del nervio ciático de ratas diabéticas (Yu y cols., 2014). Asimismo, la administración de EPO *In vitro* disminuyó la degeneración de las células del ganglio retinal expuestas a glucosa elevada, mediante el incremento de la capacidad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa que neutralizan a las EROs (Wang y cols., 2015). En un estudio no asociado a diabetes EPO ejerció efecto protector contra la lesión por reperfusión isquémica cerebral incrementando la expresión de GLT-1 y GLAST que promueven el transporte de glutamato al interior de los astrocitos, reduciendo la concentración de glutamato extracelular y neurotoxicidad del glutamato excitatorio (Yu y cols., 2016).

Debido a la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos del dolor inflamatorio, neuropático y la actividad pleiotrópica de EPO, la antinocicepción y antialodinia de EPO falta por seguir siendo esclarecida.

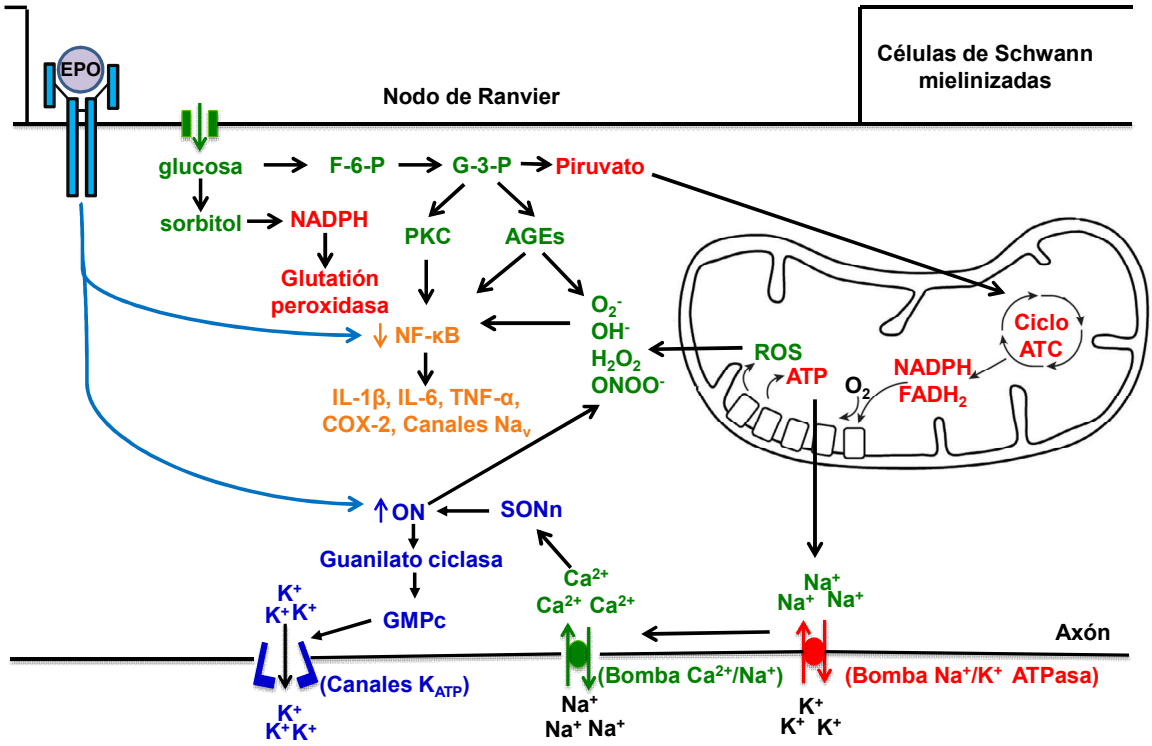

Figura 15. Mecanismo de la neuropatía diabética. Varios componentes se resaltan en verde para indicar que su nivel de actividad se incrementó en condiciones de diabetes, o en rojo si esta disminuida. EPO como un fármaco antialodínico bajo condiciones de diabetes podría regular de manera negativa a NF-κB (letra naranja) y positivamente la vía ON-K_{ATP} (letras azules) en el nervio periférico.

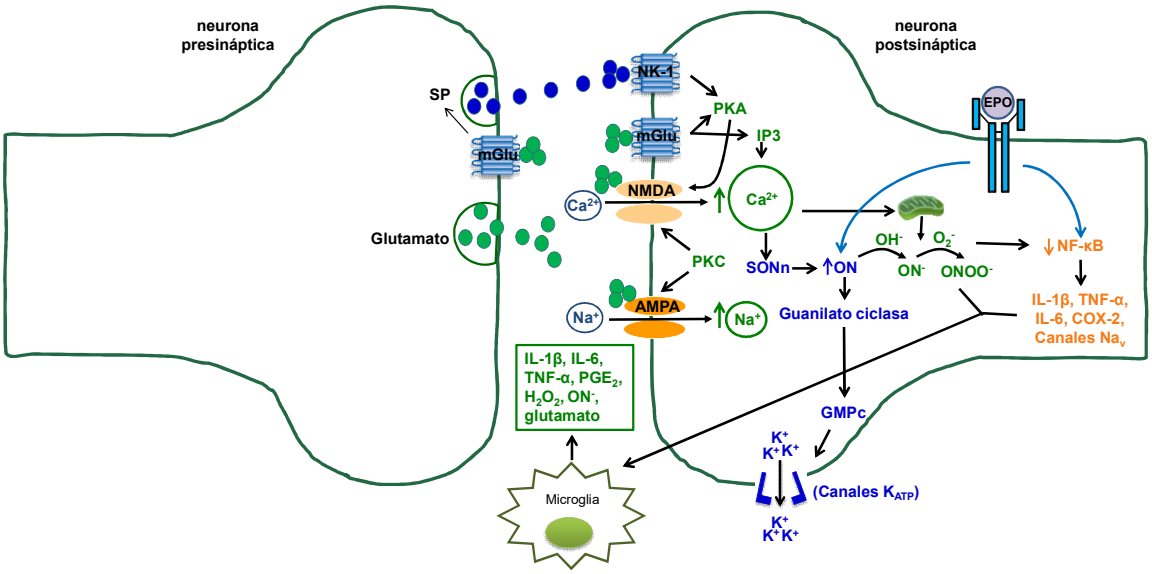

Figura 16. Sensibilización central. Varios componentes se resaltan en verde para indicar que durante la sensibilización central su nivel de actividad se incrementó en la neurona postsináptica de la médula espinal. EPO como un fármaco antinociceptivo y antialodínico podría regular de manera negativa a NF-κB (letra naranja) y positivamente la vía ON-K_{ATP} (letras azules) a nivel espinal.

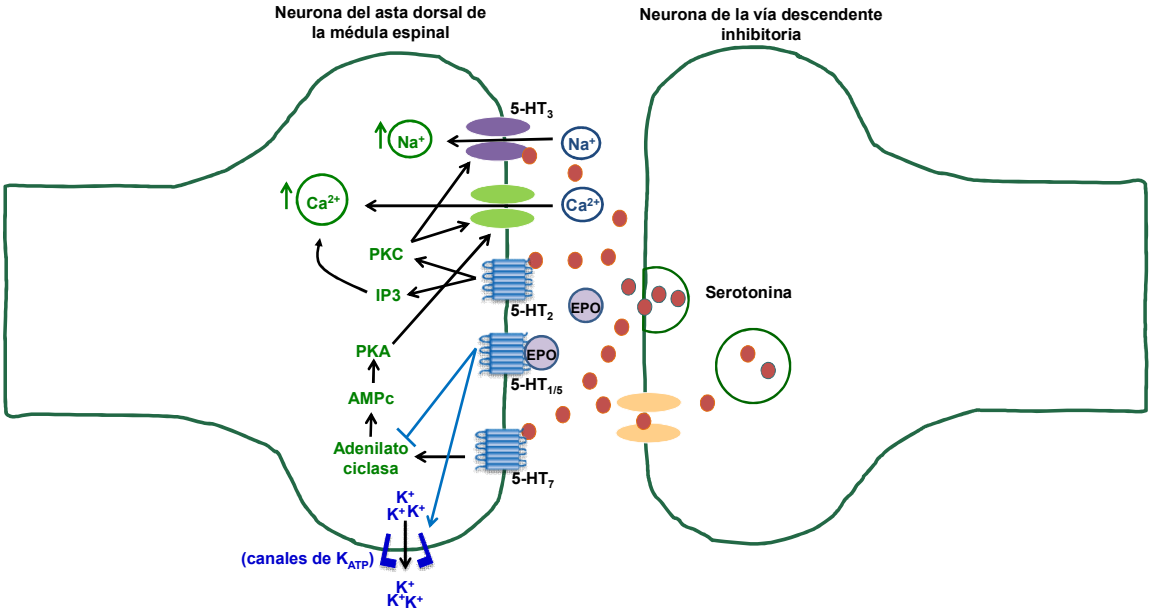

Figura 17. Modulación del dolor por la vía serotoninérgica descendente del dolor. Varios componentes se resaltan en verde para indicar que su nivel de actividad se incrementó al activarse receptores serotoninérgico nociceptivos (5-$HT_{3/2/7}$) ubicados en neuronas del asta dorsal de la médula espinal. EPO como un fármaco antinociceptivo y antialodínico podría inhibir el adenilato ciclasa y regular positivamente la abertura de canales de K^+ (letras azules) a través de la activación de receptores serotoninérgico antinociceptivos ($5HT_{1/5}$).

8. CONCLUSIONES

1. La administración sistémica de EPO disminuyó significativamente la nocicepción en la fase II del modelo de formalina al 1% de manera dependiente de la dosis en ratas no diabéticas.

2. La administración intraperitoneal de EPO tuvo efecto antialodínico estadísticamente significativo y dependiente de la dosis en ratas diabéticas.

3. La administración de EPO disminuyó las concentraciones séricas de NF-κB en el modelo de formalina y la alodinia táctil en ratas no diabéticas y diabéticas, respectivamente (Figura 18).

4. El efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO es regulado por la activación de la vía ON-GMPc-K_{ATP} y por activación de los receptores 5-$HT_{1/5}$ del sistema serotoninérgico (Figura 18).

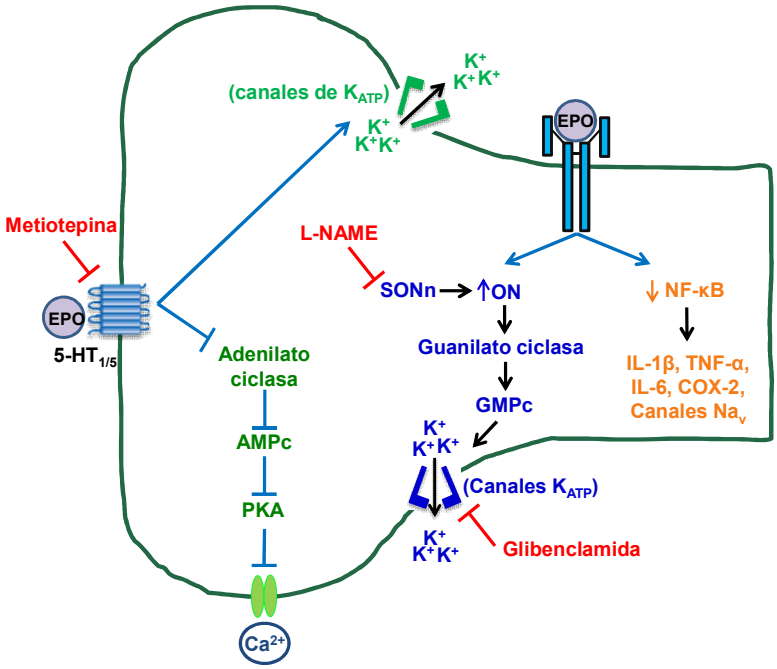

Figura 18. Mecanismos propuestos para el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO. Estos podrían estar mediado por disminución de la expresión de NF-κB, activación de la vía ON-K_{ATP} y activación de los receptores 5-$HT_{1/5}$ del sistema serotoninérgico.

9. PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

A partir de los estudios y discusiones presentadas, las perspectivas futuras del trabajo se orientan en dos direcciones. En primer lugar realizar trabajos preclínicos para continuar dilucidando los mecanismos involucrados en el efecto analgésico de EPO en condiciones de diabetes. En concreto, se podría estudiar la participación de las enzimas antioxidantes y transportadores de glutamato (GLT-1, GLAST) en el efecto antihiperalgésico y antialodínico de EPO en ratas diabéticas. La opción más plausible sería determinar en médula espinal la presencia y los niveles de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa mediante inmunohistoquímica. Asimismo, determinar en médula espinal la expresión de los niveles de ARNm de GLT-1 y GLAST mediante el análisis de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR). También sería interesante evaluar en ratas con neuropatía diabética el efecto y mecanismos antihiperalgésico y antialodínico de la eritropoyetina carbamilada, asialo-EPO y ARA-290, sustancias derivadas de EPO que carecen de función hematopoyética, por lo tanto, podrían ser más eficaces y con menos efectos adversos.

En segundo lugar, la relevancia del incremento de NF-κB en la neuropatía diabética experimental no es clara para la neuropatía diabética en humanos. Sin embargo, el hecho de que durante la neuropatía diabética dolorosa experimental se observó un incremento de NF-κB en suero sugiere que este factor de transcripción podría ser usado como un biomarcador de pronóstico, prevención y progresión de la neuropatía diabética en pacientes. Es por ello, que sería necesario realizar estudios longitudinales y determinación plasmática de NF-κB entre las diferentes etapas de la diabetes y su correlación con los síntomas de la neuropatía diabética como la parestesia, disestesia, hiperalgesia y alodinia en pacientes.

Dentro de nuestras limitaciones, no se midieron los niveles séricos de IL-1β, IL-6, TNF-ɣ y por lo tanto, no se determinó una participación concluyente de la inflamación durante el efecto antihiperalgésico y antialodínico de EPO en ratas con neuropatía diabética. Sin embargo, NF-κB es un factor de transcripción que regula la transcripción de estas citocinas pro-inflamatorias. Además, no se utilizó un inhibidor de guanilato ciclasa (ODQ), para dilucidar la vía completa ON-GMPc-K_{ATP}. No obstante, la única vía por la que ON abre canales de K_{ATP} e induce analgesia es la antes mencionada. El emplear antagonistas específicos del receptor $5HT_{1A}$ (WAY-100635), $5HT_{1B}$ (SB-224289), $5HT_{1D}$ (BRL-15572) y $5HT_{5A}$ (SB-659551) podrían haber sido más determinante para sugerir que el efecto antinociceptivo y antialodínico de EPO podría ser a través de la activación de los receptores 5-$HT_{1/5}$.

10. REERENCIAS

ADA. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care, 36*, S67-S74.

Ahmed, A. S., Ahmed, M., Li, J., Gu, H. F., Bakalkin, G., Stark, A., y Harris, H. E. (2017). Proteasome inhibitor MG132 modulates inflammatory pain by central mechanisms in adjuvant arthritis. *Int J Rheum Dis, 20*(1), 25-32. doi:10.1111/1756-185x.12353

Akude, E., Zherebitskaya, E., Chowdhury, S. K., Smith, D. R., Dobrowsky, R. T., y Fernyhough, P. (2011). Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats. *Diabetes, 60*(1), 288-297. doi:10.2337/db10-0818

Amaya-Castellanos, E., Pineda-Farias, J. B., Castaneda-Corral, G., Vidal-Cantu, G. C., Murbartian, J., Rocha-Gonzalez, H. I., y Granados-Soto, V. (2011). Blockade of 5-HT7 receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav, 99*(4), 591-597. doi:10.1016/j.pbb.2011.06.005

Araiza-Saldaña, C. I., Reyes-Garcia, G., Bermudez-Ocana, D. Y., Perez-Severiano, F., y Granados-Soto, V. (2005). Effect of diabetes on the mechanisms of intrathecal antinociception of sildenafil in rats. *Eur J Pharmacol, 527*(1-3), 60-70. doi:10.1016/j.ejphar.2005.10.016

Araiza-Saldaña, C. I., Rocha-Gonzalez, H. I., Ambriz-Tututi, M., Castaneda-Corral, G., Caram-Salas, N. L., Hong, E., y Granados-Soto, V. (2010). Sildenafil and glyceryl trinitrate reduce tactile allodynia in streptozotocin-injected rats. *Eur J Pharmacol, 631*(1-3), 17-23. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.001

Bardin, L., Lavarenne, J., y Eschalier, A. (2000). Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain, 86*(1-2), 11-18.

Bermudez-Ocana, D. Y., Aguilar-Mariscal, H., Frias, T. R., Ble-Castillo, J. L., Flores-Murrieta, F. J., Diaz-Zagoya, J. C., ... Juarez-Rojop, I. E. (2011). Proglumide enhances the antinociceptive effect of cyclooxygenase inhibitors in diabetic rats in the formalin test. *Eur J Pharmacol, 664*(1-3), 8-13. doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.044

Bhargava, V. K., y Saha, L. (2001). Serotonergic mechanism in imipramine induced antinociception in rat tail flick test. *Indian J Physiol Pharmacol, 45*(1), 107-110.

Bianchi, R., Buyukakilli, B., Brines, M., Savino, C., Cavaletti, G., Oggioni, N., ... Ghezzi, P. (2004). Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*, 823-828. doi:10.1073/pnas.0307823100

Bosman, D. R., Osborne, C. A., Marsden, J. T., Macdougall, I. C., Gardner, W. N., y Watkins, P. J. (2002). Erythropoietin response to hypoxia in patients with diabetic autonomic neuropathy and non-diabetic chronic renal failure. *Diabet Med, 19*(1), 65-69.

Bosman, D. R., Winkler, A. S., Marsden, J. T., Macdougall, I. C., y Watkins, P. J. (2001). Anemia with erythropoietin deficiency occurs early in diabetic nephropathy. *Diabetes Care, 24*(3), 495-499.

Brenchat, A., Romero, L., Garcia, M., Pujol, M., Burgueno, J., Torrens, A., ... Vela, J. M. (2009). 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain, 141*(3), 239-247. doi:10.1016/j.pain.2008.11.009

Brines, M., Dunne, A. N., van Velzen, M., Proto, P. L., Ostenson, C. G., Kirk, R. I., ... Dahan, A. (2015). ARA 290, a nonerythropoietic peptide engineered from erythropoietin, improves

metabolic control and neuropathic symptoms in patients with type 2 diabetes. *Mol Med, 20*, 658-666. doi:10.2119/molmed.2014.00215

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes, 54*(6), 1615-1625.

Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med, 3*(3), a011619. doi:10.1101/cshperspect.a011619

Calcutt, N. A. (2002). Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol, 50*, 205-228.

Calcutt, N. A., y Backonja, M. M. (2007). Pathogenesis of pain in peripheral diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep, 7*(6), 429-434.

Calcutt, N. A., y Chaplan, S. R. (1997). Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol, 122*(7), 1478-1482. doi:10.1038/sj.bjp.0701538

Campana, W. M., Li, X., Shubayev, V. I., Angert, M., Cai, K., y Myers, R. R. (2006). Erythropoietin reduces Schwann cell TNF-alpha, Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci, 23*(3), 617-626. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04606.x

Campana, W. M., y Myers, R. R. (2003). Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci, 18*(6), 1497-1506.

Cawood, T. J., Buckley, U., Murray, A., Corbett, M., Dillon, D., Goodwin, B., y Sreenan, S. (2006). Prevalence of anaemia in patients with diabetes mellitus. *Ir J Med Sci, 175*(2), 25-27.

Costigan, M., y Woolf, C. J. (2000). Pain: molecular mechanisms. *J Pain, 1*(3 Suppl), 35-44.

Courteix, C., Bardin, M., Chantelauze, C., Lavarenne, J., y Eschalier, A. (1994). Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain, 57*(2), 153-160.

Courteix, C., Eschalier, A., y Lavarenne, J. (1993). Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain, 53*(1), 81-88.

Cury, Y., Picolo, G., Gutierrez, V. P., y Ferreira, S. H. (2011). Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide, 25*(3), 243-254. doi:10.1016/j.niox.2011.06.004

Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., y Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods, 53*(1), 55-63.

Chen, G., Shi, J. X., Hang, C. H., Xie, W., Liu, J., y Liu, X. (2007). Inhibitory effect on cerebral inflammatory agents that accompany traumatic brain injury in a rat model: a potential neuroprotective mechanism of recombinant human erythropoietin (rhEPO). *Neurosci Lett, 425*(3), 177-182. doi:10.1016/j.neulet.2007.08.022

Chen, J., Yang, Z., y Zhang, X. (2015). Carbamylated Erythropoietin: A Prospective Drug Candidate for Neuroprotection. *Biochem Insights, 8*(Suppl 1), 25-29. doi:10.4137/bci.s30753

Chichorro, J. G., Lorenzetti, B. B., y Zampronio, A. R. (2004). Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol, 141*(7), 1175-1184. doi:10.1038/sj.bjp.0705724

Chong, Z. Z., Kang, J. Q., y Maiese, K. (2003). Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol, 138*(6), 1107-1118. doi:10.1038/sj.bjp.0705161

Chong, Z. Z., y Maiese, K. (2007). Erythropoietin involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, 14-3-3 protein and FOXO3a nuclear trafficking to preserve endothelial cell integrity. *Br J Pharmacol, 150*(7), 839-850. doi:10.1038/sj.bjp.0707161

D'Amato, F. R., y Pavone, F. (2012). Modulation of nociception by social factors in rodents: contribution of the opioid system. *Psychopharmacology (Berl), 224*(1), 189-200. doi:10.1007/s00213-012-2863-1

D'Mello, R., y Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth, 101*(1), 8-16. doi:10.1093/bja/aen088

De Lima, L., y Bruera, E. (2000). The Role of International Treaties in the Opioid Availability Process: Relationship between INCB, National Governments, the Pharmaceutical Industry and Physicians. *Progress in Palliative Care, 8*(3), 128-132.

de los Monteros-Zuñiga, A. E., Izquierdo, T., Quinonez-Bastidas, G. N., Rocha-Gonzalez, H. I., y Godinez-Chaparro, B. (2016). Anti-allodynic effect of mangiferin in neuropathic rats: Involvement of nitric oxide-cyclic GMP-ATP sensitive K(+) channels pathway and serotoninergic system. *Pharmacol Biochem Behav, 150-151*, 190-197. doi:10.1016/j.pbb.2016.10.007

Del Mar, L. P., Cardenas, C. G., y Scroggs, R. S. (1994). Serotonin inhibits high-threshold Ca2+ channel currents in capsaicin-sensitive acutely isolated adult rat DRG neurons. *J Neurophysiol, 72*(5), 2551-2554. doi:10.1152/jn.1994.72.5.2551

Digicaylioglu, M., y Lipton, S. A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature, 412*(6847), 641-647. doi:10.1038/35088074

Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol, 20*, 441-462. doi:10.1146/annurev.pa.20.040180.002301

Dubuisson, D., y Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain, 4*(2), 161-174.

Elshiekh, M., Kadkhodaee, M., Seifi, B., Ranjbaran, M., y Askari, H. (2017). Up-regulation of nitric oxide synthases by erythropoietin alone or in conjunction with ischemic preconditioning in ischemia reperfusion injury of rat kidneys. *Gen Physiol Biophys, 36*(3), 281-288. doi:10.4149/gpb_2016058

Eren, Z., Gunal, M. Y., Ari, E., Coban, J., Cakalagaoglu, F., Caglayan, B., ... Kantarci, G. (2016). Pleiotropic and Renoprotective Effects of Erythropoietin Beta on Experimental Diabetic Nephropathy Model. *Nephron, 132*(4), 292-300. doi:10.1159/000444649

Ezenwaka, C. E., Jones-Lecointe, A., Nwagbara, E., Seales, D., y Okali, F. (2008). Anaemia and kidney dysfunction in Caribbean type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol, 7*, 25. doi:10.1186/1475-2840-7-25

Forstermann, U., y Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J, 33*(7), 829-837, 837a-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304

Fox, A., Eastwood, C., Gentry, C., Manning, D., y Urban, L. (1999). Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain, 81*(3), 307-316.

Freitas, A. C., Silva, G. C., Pacheco, D. F., Pimenta, A. M., Lemos, V. S., Duarte, I. D., y de Lima, M. E. (2017). The synthetic peptide PnPP-19 induces peripheral antinociception via activation of NO/cGMP/KATP pathway: Role of eNOS and nNOS. *Nitric Oxide, 64*, 31-38. doi:10.1016/j.niox.2017.01.004

Fu, E. S., Zhang, Y. P., Sagen, J., Candiotti, K. A., Morton, P. D., Liebl, D. J., ... Brambilla, R. (2010). Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain, 148*(3), 509-518. doi:10.1016/j.pain.2010.01.001

Granados-Soto, V., Arguelles, C. F., Rocha-Gonzalez, H. I., Godinez-Chaparro, B., Flores-Murrieta, F. J., y Villalon, C. M. (2010). The role of peripheral 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience, 165*(2), 561-568. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.020

Gunawardena, S., y Dunlap, M. E. (2012). Anemia and iron deficiency in heart failure. *Curr Heart Fail Rep, 9*(4), 319-327. doi:10.1007/s11897-012-0112-x

Gutierrez, H., y Davies, A. M. (2011). Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappaB. *Trends Neurosci, 34*(6), 316-325. doi:10.1016/j.tins.2011.03.001

Han, J., Kim, N., Joo, H., Kim, E., y Earm, Y. E. (2002). ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 283*(4), H1545-1554. doi:10.1152/ajpheart.01052.2001

Hartung, J. E., Eskew, O., Wong, T., Tchivileva, I. E., Oladosu, F. A., O'Buckley, S. C., y Nackley, A. G. (2015). Nuclear factor-kappa B regulates pain and COMT expression in a rodent model of inflammation. *Brain Behav Immun, 50*, 196-202. doi:10.1016/j.bbi.2015.07.014

Harvey, R. J., Depner, U. B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., ... Muller, U. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science, 304*(5672), 884-887. doi:10.1126/science.1094925

Hayashi, T., Suzuki, A., Shoji, T., Togawa, M., Okada, N., Tsubakihara, Y., ... Hori, M. (2000). Cardiovascular effect of normalizing the hematocrit level during erythropoietin therapy in predialysis patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis, 35*(2), 250-256.

Hayden, M. S., y Ghosh, S. (2011). NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res, 21*(2), 223-244. doi:10.1038/cr.2011.13

He, Z., y King, G. L. (2004). Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am, 33*(1), 215-238, xi-xii. doi:10.1016/j.ecl.2003.12.003

Hernandez, C. C., Burgos, C. F., Gajardo, A. H., Silva-Grecchi, T., Gavilan, J., Toledo, J. R., y Fuentealba, J. (2017). Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: the role of erythropoietin receptor. *Neural Regen Res, 12*(9), 1381-1389. doi:10.4103/1673-5374.215240

Hossaini, M., Goos, J. A., Kohli, S. K., y Holstege, J. C. (2012). Distribution of glycine/GABA neurons in the ventromedial medulla with descending spinal projections and evidence for an ascending glycine/GABA projection. *PLoS One, 7*(4), e35293. doi:10.1371/journal.pone.0035293

Hosseini, A., y Abdollahi, M. (2013). Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev, 2013*, 168039. doi:10.1155/2013/168039

Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., ... Humphrey, P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev, 46*(2), 157-203.

Huang, C. T., Chen, S. H., Lin, S. C., Chen, W. T., Lue, J. H., y Tsai, Y. J. (2018). Erythropoietin reduces nerve demyelination, neuropathic pain behavior and microglial MAPKs activation through erythropoietin receptors on Schwann cells in a rat model of peripheral neuropathy. *Glia, 66*(11), 2299-2315. doi:10.1002/glia.23461

Huang, Y., Zang, Y., Zhou, L., Gui, W., Liu, X., y Zhong, Y. (2014). The role of TNF-alpha/NF-kappa B pathway on the up-regulation of voltage-gated sodium channel Nav1.7 in DRG neurons of rats with diabetic neuropathy. *Neurochem Int, 75*, 112-119. doi:10.1016/j.neuint.2014.05.012

Hunskaar, S., y Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain, 30*(1), 103-114.

IASP. (1986). Pain terms: a current list with definitions and notes on usage. *Pain, Suppl 3*, S215-S221.

Inoue, G., Ochiai, N., Ohtori, S., Nakagawa, K., Gemba, T., Doya, H., ... Takahashi, K. (2006). Injection of nuclear factor-kappa B decoy into the sciatic nerve suppresses mechanical

allodynia and thermal hyperalgesia in a rat inflammatory pain model. *Spine (Phila Pa 1976), 31*(25), 2904-2908. doi:10.1097/01.brs.0000248424.46652.67

Javed, S., Alam, U., y Malik, R. A. (2015). Treating Diabetic Neuropathy: Present Strategies and Emerging Solutions. *Rev Diabet Stud, 12*(1-2), 63-83. doi:10.1900/rds.2015.12.63

Jia, H., Feng, X., Li, W., Hu, Y., Zeng, Q., Liu, J., y Xu, J. (2009). Recombinant human erythropoietin attenuates spinal neuroimmune activation of neuropathic pain in rats. *Ann Clin Lab Sci, 39*(1), 84-91.

Jolivalt, C. G., Frizzi, K. E., Guernsey, L., Marquez, A., Ochoa, J., Rodriguez, M., y Calcutt, N. A. (2016). Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol, 6*(3), 223-255. doi:10.1002/cpmo.11

Jolivalt, C. G., Lee, C. A., Ramos, K. M., y Calcutt, N. A. (2008). Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain, 140*(1), 48-57. doi:10.1016/j.pain.2008.07.005

Juarez-Rojop, I. E., Granados-Soto, V., Diaz-Zagoya, J. C., Flores-Murrieta, F. J., y Torres-Lopez, J. E. (2006). Involvement of cholecystokinin in peripheral nociceptive sensitization during diabetes in rats as revealed by the formalin response. *Pain, 122*(1-2), 118-125. doi:10.1016/j.pain.2006.01.018

Juarez-Rojop, I. E., Morales-Hernandez, P. E., Tovilla-Zarate, C. A., Bermudez-Ocana, D. Y., Torres-Lopez, J. E., Ble-Castillo, J. L., ... Granados-Soto, V. (2015). Celecoxib reduces hyperalgesia and tactile allodynia in diabetic rats. *Pharmacol Rep, 67*(3), 545-552. doi:10.1016/j.pharep.2014.12.006

Julius, D., y Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature, 413*(6852), 203-210. doi:10.1038/35093019

Kai-lan, W., y Si, Z. (2015). Pretreatment With Erythropoietin Attenuates Intestinal Ischemia Reperfusion Injury by Further Promoting PI3K/Akt Signaling Activation. *Transplant Proc, 47*(6), 1639-1645. doi:10.1016/j.transproceed.2015.02.023

Kanwar, J. R., Kanwar, R. K., Burrow, H., y Baratchi, S. (2009). Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem, 16*(19), 2373-2394.

Karavelis, A., Foroglou, G., Selviaridis, P., y Fountzilas, G. (1996). Intraventricular administration of morphine for control of intractable cancer pain in 90 patients. *Neurosurgery, 39*(1), 57-61; discussion 61-52.

Kawano, T., Zoga, V., Kimura, M., Liang, M. Y., Wu, H. E., Gemes, G., ... Sarantopoulos, C. D. (2009). Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain, 5*, 12. doi:10.1186/1744-8069-5-12

Khomula, E. V., Viatchenko-Karpinski, V. Y., Borisyuk, A. L., Duzhyy, D. E., Belan, P. V., y Voitenko, N. V. (2013). Specific functioning of Cav3.2 T-type calcium and TRPV1 channels under different types of STZ-diabetic neuropathy. *Biochim Biophys Acta, 1832*(5), 636-649. doi:10.1016/j.bbadis.2013.01.017

Kim, J., Kim, J. H., Kim, Y., Cho, H. Y., Hong, S. K., y Yoon, Y. W. (2009). Role of spinal cholecystokinin in neuropathic pain after spinal cord hemisection in rats. *Neurosci Lett, 462*(3), 303-307. doi:10.1016/j.neulet.2009.07.042

Kohno, T., Wang, H., Amaya, F., Brenner, G. J., Cheng, J. K., Ji, R. R., y Woolf, C. J. (2008). Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci, 28*(17), 4533-4540. doi:10.1523/jneurosci.5349-07.2008

Kwon, M. S., Kim, M. H., Kim, S. H., Park, K. D., Yoo, S. H., Oh, I. U., ... Seo, Y. J. (2014). Erythropoietin exerts cell protective effect by activating PI3K/Akt and MAPK pathways in C6 Cells. *Neurol Res, 36*(3), 215-223. doi:10.1179/1743132813y.0000000284

Landowski, L. M., Dyck, P. J., Engelstad, J., y Taylor, B. V. (2016). Axonopathy in peripheral neuropathies: Mechanisms and therapeutic approaches for regeneration. *J Chem Neuroanat, 76*(Pt A), 19-27. doi:10.1016/j.jchemneu.2016.04.006

Lapice, E., Masulli, M., y Vaccaro, O. (2013). Iron deficiency and cardiovascular disease: an updated review of the evidence. *Curr Atheroscler Rep, 15*(10), 358. doi:10.1007/s11883-013-0358-0

Latremoliere, A., y Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain, 10*(9), 895-926. doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 1*(6), a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651

Ledeboer, A., Gamanos, M., Lai, W., Martin, D., Maier, S. F., Watkins, L. R., y Quan, N. (2005). Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur J Neurosci, 22*(8), 1977-1986. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04379.x

Lee-Kubli, C. A., Mixcoatl-Zecuatl, T., Jolivalt, C. G., y Calcutt, N. A. (2014). Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. *Curr Top Behav Neurosci, 20*, 147-170. doi:10.1007/7854_2014_280

Lee, M. K., Han, S. R., Park, M. K., Kim, M. J., Bae, Y. C., Kim, S. K., ... Ahn, D. K. (2011). Behavioral evidence for the differential regulation of p-p38 MAPK and p-NF-κB in rats with trigeminal neuropathic pain. *Molecular pain, 7*(1), 57.

Lirk, P., Poroli, M., Rigaud, M., Fuchs, A., Fillip, P., Huang, C. Y., ... Hogan, Q. (2008). Modulators of calcium influx regulate membrane excitability in rat dorsal root ganglion neurons. *Anesth Analg, 107*(2), 673-685. doi:10.1213/ane.0b013e31817b7a73

Loutradis, C., Skodra, A., Georgianos, P., Tolika, P., Alexandrou, D., Avdelidou, A., y Sarafidis, P. A. (2016). Diabetes mellitus increases the prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease: A nested case-control study. *World J Nephrol, 5*(4), 358-366. doi:10.5527/wjn.v5.i4.358

Luo, J. G., Zhao, X. L., Xu, W. C., Zhao, X. J., Wang, J. N., Lin, X. W., ... Fu, Z. J. (2014). Activation of spinal NF-kappaB/p65 contributes to peripheral inflammation and hyperalgesia in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol, 66*(4), 896-906. doi:10.1002/art.38328

Luo, Z. D., y Cizkova, D. (2000). The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain, 4*(6), 459-466.

Maiese, K. (2015). Erythropoietin and diabetes mellitus. *World J Diabetes, 6*(14), 1259-1273. doi:10.4239/wjd.v6.i14.1259

Maiese, K., Chong, Z. Z., y Shang, Y. C. (2008). Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine Growth Factor Rev, 19*(2), 145-155. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.01.004

Maiese, K., Chong, Z. Z., Shang, Y. C., y Wang, S. (2012). Erythropoietin: new directions for the nervous system. *Int J Mol Sci, 13*(9), 11102-11129. doi:10.3390/ijms130911102

Maiese, K., Hou, J., Chong, Z. Z., y Shang, Y. C. (2009). Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *ScientificWorldJournal, 9*, 1072-1104. doi:10.1100/tsw.2009.121

Maiese, K., Li, F., y Chong, Z. Z. (2004). Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci, 25*(11), 577-583. doi:10.1016/j.tips.2004.09.006

Maiese, K., Li, F., y Chong, Z. Z. (2005). New avenues of exploration for erythropoietin. *Jama, 293*(1), 90-95. doi:10.1001/jama.293.1.90

Marti, H. H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol, 207*(Pt 18), 3233-3242. doi:10.1242/jeb.01049

Matsunaga, A., Kawamoto, M., Shiraishi, S., Yasuda, T., Kajiyama, S., Kurita, S., y Yuge, O. (2007). Intrathecally administered COX-2 but not COX-1 or COX-3 inhibitors attenuate streptozotocin-induced mechanical hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol, 554*(1), 12-17. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.072

McPherson, R. J., y Juul, S. E. (2008). Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int J Dev Neurosci, 26*(1), 103-111. doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.08.012

Meunier, A., Latremoliere, A., Dominguez, E., Mauborgne, A., Philippe, S., Hamon, M., ... Pohl, M. (2007). Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Ther, 15*(4), 687-697. doi:10.1038/sj.mt.6300107

Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol, 57*(1), 1-164.

Mixcoatl-Zecuatl, T., Quinonez-Bastidas, G. N., Caram-Salas, N. L., Ambriz-Tututi, M., Araiza-Saldana, C. I., Rocha-Gonzalez, H. I., ... Granados-Soto, V. (2008). Synergistic antiallodynic interaction between gabapentin or carbamazepine and either benfotiamine or cyanocobalamin in neuropathic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol, 30*(6), 431-441. doi:10.1358/mf.2008.30.6.1232963

Morgado, C., Pinto-Ribeiro, F., y Tavares, I. (2008). Diabetes affects the expression of GABA and potassium chloride cotransporter in the spinal cord: a study in streptozotocin diabetic rats. *Neurosci Lett, 438*(1), 102-106. doi:10.1016/j.neulet.2008.04.032

Mukundan, H., Resta, T. C., y Kanagy, N. L. (2002). 17Beta-estradiol decreases hypoxic induction of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 283*(2), R496-504. doi:10.1152/ajpregu.00573.2001

Nairz, M., Schroll, A., Moschen, A. R., Sonnweber, T., Theurl, M., Theurl, I., ... Weiss, G. (2011). Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways. *Immunity, 34*(1), 61-74. doi:10.1016/j.immuni.2011.01.002

Naziroglu, M., Dikici, D. M., y Dursun, S. (2012). Role of oxidative stress and Ca(2)(+) signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochem Res, 37*(10), 2065-2075. doi:10.1007/s11064-012-0850-x

Niederberger, E., y Geisslinger, G. (2008). The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *Faseb j, 22*(10), 3432-3442. doi:10.1096/fj.08-109355

Niederberger, E., Schmidtko, A., Gao, W., Kuhlein, H., Ehnert, C., y Geisslinger, G. (2007). Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NF-kappaB. *Eur J Pharmacol, 559*(1), 55-60. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.074

Noguchi, C. T., Wang, L., Rogers, H. M., Teng, R., y Jia, Y. (2008). Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med, 10*, e36. doi:10.1017/s1462399408000860

Ogawa, K., Fujikoshi, S., Montgomery, W., y Alev, L. (2015). Correlation between pain response and improvements in patient-reported outcomes and health-related quality of life in duloxetine-treated patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Neuropsychiatr Dis Treat, 11*, 2101-2107. doi:10.2147/ndt.s87665

Ortega-Varela, L. F., Herrera, J. E., Caram-Salas, N. L., Rocha-Gonzalez, H. I., Torres-López, J. E., y Granados-Soto, V. (2009). Synergistic antiallodynic interaction of the metamizol-gabapentin combination. *Drug Dev Res, 70*(5), 386-394.

Osikowicz, M., Mika, J., y Przewlocka, B. (2013). The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. *Exp Physiol, 98*(2), 372-384. doi:10.1113/expphysiol.2012.069922

Ossipov, M. H., Morimura, K., y Porreca, F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care, 8*(2), 143-151. doi:10.1097/spc.0000000000000055

Pineda-Farias, J. B., Velazquez-Lagunas, I., Barragan-Iglesias, P., Cervantes-Duran, C., y Granados-Soto, V. (2015). 5-HT2B Receptor Antagonists Reduce Nerve Injury-Induced Tactile Allodynia and Expression of 5-HT2B Receptors. *Drug Dev Res, 76*(1), 31-39. doi:10.1002/ddr.21238

Pitcher, M. H., Ribeiro-da-Silva, A., y Coderre, T. J. (2007). Effects of inflammation on the ultrastructural localization of spinal cord dorsal horn group I metabotropic glutamate receptors. *J Comp Neurol, 505*(4), 412-423. doi:10.1002/cne.21506

Plassat, J. L., Boschert, U., Amlaiky, N., y Hen, R. (1992). The mouse 5HT5 receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT1D receptor family. *Embo j, 11*(13), 4779-4786.

Ponimaskin, E. G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D. W., y Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J Biol Chem, 277*(23), 20812-20819. doi:10.1074/jbc.M112216200

Porreca, F., Tang, Q. B., Bian, D., Riedl, M., Elde, R., y Lai, J. (1998). Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. *Brain Res, 795*(1-2), 197-203.

Quiñonez-Bastidas, G. N., Cervantes-Duran, C., Rocha-Gonzalez, H. I., Murbartian, J., y Granados-Soto, V. (2013). Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of epicatechin in diabetic rats. *Life Sci, 93*(17), 637-645. doi:10.1016/j.lfs.2013.08.022

Raja, S. N., Meyer, R. A., y Campbell, J. N. (1988). Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology, 68*(4), 571-590.

Ranjbaran, M., Kadkhodaee, M., Seifi, B., Adelipour, M., y Azarian, B. (2017). Erythropoietin attenuates experimental haemorrhagic shock-induced renal damage through an iNOS-dependent mechanism in male Wistar rats. *Injury, 48*(2), 262-269. doi:10.1016/j.injury.2017.01.010

Romero, T. R., Galdino, G. S., Silva, G. C., Resende, L. C., Perez, A. C., Cortes, S. F., y Duarte, I. D. (2011). Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth Analg, 113*(5), 1254-1259. doi:10.1213/ANE.0b013e3182285dda

Sahay, M., Kalra, S., Badani, R., Bantwal, G., Bhoraskar, A., Das, A. K., ... Unnikrishnan, A. G. (2017). Diabetes and Anemia: International Diabetes Federation (IDF) - Southeast Asian Region (SEAR) position statement. *Diabetes Metab Syndr, 11 Suppl 2*, S685-s695. doi:10.1016/j.dsx.2017.04.026

Sasaki, M., Obata, H., Saito, S., y Goto, F. (2003). Antinociception with intrathecal alpha-methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine 2A/2C receptor agonist, in two rat models of sustained pain. *Anesth Analg, 96*(4), 1072-1078, table of contents.

Scholz, J., y Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci, 5 Suppl*, 1062-1067. doi:10.1038/nn942

Schwartz, C., Willebrand, R., Huber, S., Rupec, R. A., Wu, D., Locksley, R., y Voehringer, D. (2015). Eosinophil-specific deletion of IkappaBalpha in mice reveals a critical role of NF-kappaB-induced Bcl-xL for inhibition of apoptosis. *Blood, 125*(25), 3896-3904. doi:10.1182/blood-2014-10-607788

Shang, Y. C., Chong, Z. Z., Wang, S., y Maiese, K. (2011). Erythropoietin and Wnt1 govern pathways of mTOR, Apaf-1, and XIAP in inflammatory microglia. *Curr Neurovasc Res, 8*(4), 270-285.

Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., y Fernandez-Luna, J. L. (1996). Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood, 88*(5), 1576-1582.

Silverberg, D. S., Wexler, D., Sheps, D., Blum, M., Keren, G., Baruch, R., ... Iaina, A. (2001). The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. *J Am Coll Cardiol, 37*(7), 1775-1780.

Singh, D. K., Winocour, P., y Farrington, K. (2009). Erythropoietic stress and anemia in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol, 5*(4), 204-210. doi:10.1038/nrendo.2009.17

Sorg, H., Harder, Y., Krueger, C., Reimers, K., y Vogt, P. M. (2013). The nonhematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use. *Med Res Rev, 33*(3), 637-664. doi:10.1002/med.21259

Sorkin, L. S. (1997). Basic pharmacology and physiology of acute pain processing. *Anesthesiology Clinics of North America, 15*(2), 235-249.

Statler, P. A., McPherson, R. J., Bauer, L. A., Kellert, B. A., y Juul, S. E. (2007). Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res, 61*(6), 671-675. doi:10.1203/pdr.0b013e31805341dc

Suarez-Mendez, S., Tovilla-Zarate, C. A., Ortega-Varela, L. F., Bermudez-Ocana, D. Y., Ble-Castillo, J. L., Gonzalez-Castro, T. B., ... Esther Juarez-Rojop, I. (2017). Isobolographic Analyses of Proglumide-Celecoxib Interaction in Rats with Painful Diabetic Neuropathy. *Drug Dev Res, 78*(2), 116-123. doi:10.1002/ddr.21382

Svensson, C. I., y Brodin, E. (2010). Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Mol Interv, 10*(1), 25-38. doi:10.1124/mi.10.1.6

Svensson, C. I., Marsala, M., Westerlund, A., Calcutt, N. A., Campana, W. M., Freshwater, J. D., ... Yaksh, T. L. (2003). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. *J Neurochem, 86*(6), 1534-1544.

Symeonidis, A., Kouraklis-Symeonidis, A., Psiroyiannis, A., Leotsinidis, M., Kyriazopoulou, V., Vassilakos, P., ... Zoumbos, N. (2006). Inappropriately low erythropoietin response for the degree of anemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Hematol, 85*(2), 79-85. doi:10.1007/s00277-005-1102-9

Tegeder, I., Niederberger, E., Schmidt, R., Kunz, S., Guhring, H., Ritzeler, O., ... Geisslinger, G. (2004). Specific Inhibition of IkappaB kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J Neurosci, 24*(7), 1637-1645. doi:10.1523/jneurosci.3118-03.2004

Thomas, M., Tsalamandris, C., MacIsaac, R., y Jerums, G. (2005). Anaemia in diabetes: an emerging complication of microvascular disease. *Curr Diabetes Rev, 1*(1), 107-126.

Thomas, M. C., MacIsaac, R. J., Tsalamandris, C., Power, D., y Jerums, G. (2003). Unrecognized anemia in patients with diabetes: a cross-sectional survey. *Diabetes Care, 26*(4), 1164-1169.

Torres-Lopez, J. E., Juarez-Rojop, I. E., Granados-Soto, V., Diaz-Zagoya, J. C., Flores-Murrieta, F. J., Ortiz-Lopez, J. U., y Cruz-Vera, J. (2007). Peripheral participation of cholecystokinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats. *Neuropharmacology, 52*(3), 788-795. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.09.015

Tsuda, M., Ueno, H., Kataoka, A., Tozaki-Saitoh, H., y Inoue, K. (2008). Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia, 56*(4), 378-386. doi:10.1002/glia.20623

Vardeh, D., Wang, D., Costigan, M., Lazarus, M., Saper, C. B., Woolf, C. J., ... Samad, T. A. (2009). COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest, 119*(2), 287-294. doi:10.1172/jci37098

Vasko, M. R., Campbell, W. B., y Waite, K. J. (1994). Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci, 14*(8), 4987-4997.

Verdu, B., Decosterd, I., Buclin, T., Stiefel, F., y Berney, A. (2008). Antidepressants for the treatment of chronic pain. *Drugs, 68*(18), 2611-2632. doi:10.2165/0003495-200868180-00007

Vidal-Torres, A., Carceller, A., Zamanillo, D., Merlos, M., Vela, J. M., y Fernandez-Pastor, B. (2012). Evaluation of formalin-induced pain behavior and glutamate release in the spinal dorsal horn using in vivo microdialysis in conscious rats. *J Pharmacol Sci, 120*(2), 129-132.

Wang, L., Di, L., y Noguchi, C. T. (2014). Erythropoietin, a novel versatile player regulating energy metabolism beyond the erythroid system. *Int J Biol Sci, 10*(8), 921-939. doi:10.7150/ijbs.9518

Wang, Y., Zhang, H., Liu, Y., Li, P., Cao, Z., y Cao, Y. (2015). Erythropoietin (EPO) protects against high glucose-induced apoptosis in retinal ganglional cells. *Cell Biochem Biophys, 71*(2), 749-755. doi:10.1007/s12013-014-0259-z

Watkins, L. R., Martin, D., Ulrich, P., Tracey, K. J., y Maier, S. F. (1997). Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain, 71*(3), 225-235.

Wei, F., Dubner, R., Zou, S., Ren, K., Bai, G., Wei, D., y Guo, W. (2010). Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *J Neurosci, 30*(25), 8624-8636. doi:10.1523/jneurosci.5389-09.2010

Wheeler-Aceto, H., y Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl), 104*(1), 35-44.

WHO. (1990). Cancer pain relief and palliative care: Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser, 804*, 1-75.

Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med, 140*(6), 441-451.

Yagihashi, S., Mizukami, H., y Sugimoto, K. (2011). Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Investig, 2*(1), 18-32. doi:10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x

Yaksh, T. L. (1997). Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand, 41*(1 Pt 2), 94-111.

Yaksh, T. L., Jessell, T. M., Gamse, R., Mudge, A. W., y Leeman, S. E. (1980). Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. *Nature, 286*(5769), 155-157.

Yaksh, T. L., Woller, S. A., Ramachandran, R., y Sorkin, L. S. (2015). The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000Prime Rep, 7*, 56. doi:10.12703/p7-56

Yashpal, K., y Coderre, T. J. (1998). Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *Eur J Pain, 2*(1), 63-68.

Yazihan, N., Ataoglu, H., Kavas, G. O., Akyurek, N., Yener, B., y Aydm, C. (2008). The effect of K-ATP channel blockage during erythropoietin treatment in renal ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg, 21*(6), 340-347. doi:10.1080/08941930802438906

Yilmaz, T. U., Yazihan, N., Dalgic, A., Kaya, E. E., Salman, B., Kocak, M., y Akcil, E. (2015). Role of ATP-dependent K channels in the effects of erythropoietin in renal ischaemia injury. *Indian J Med Res, 141*(6), 807-815. doi:10.4103/0971-5916.160713

Yu, D., Fan, Y., Sun, X., Yao, L., y Chai, W. (2016). Effects of erythropoietin preconditioning on rat cerebral ischemia-reperfusion injury and the GLT-1/GLAST pathway. *Exp Ther Med, 11*(2), 513-518. doi:10.3892/etm.2015.2919

Yu, T., Li, L., Bi, Y., Liu, Z., Liu, H., y Li, Z. (2014). Erythropoietin attenuates oxidative stress and apoptosis in Schwann cells isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol, 66*(8), 1150-1160. doi:10.1111/jphp.12244

Zahn, P. K., Gysbers, D., y Brennan, T. J. (1997). Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology, 86*(5), 1066-1077.

Zenker, J., Ziegler, D., y Chrast, R. (2013). Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. *Trends Neurosci, 36*(8), 439-449. doi:10.1016/j.tins.2013.04.008

Zhang, Z., Yan, J., Chang, Y., ShiDu Yan, S., y Shi, H. (2011). Hypoxia inducible factor-1 as a target for neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem, 18*(28), 4335-4343.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain, 16*(2), 109-110.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol, 429*(1-3), 23-37.

Zochodne, D. W., Verge, V. M., Cheng, C., Hoke, A., Jolley, C., Thomsen, K., ... Lauritzen, M. (2000). Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol, 59*(9), 798-807.