

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN: QUÍMICA MEDICINAL

**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN QUE PARTICIPAN EN EL
EFECTO ANTI-ALODÍNICO DEL [6]-GINGEROL EN RATAS NEUROPÁTICAS”**

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

PRESENTA

ALFONSO MATA BERMUDEZ
MATRÍCULA: 2152800294

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: DRA. BEATRIZ GODÍNEZ CHAPARRO
ASESOR: DR. VINICIO GRANADOS SOTO
ASESOR: DR. HÉCTOR ISAAC ROCHA GONZÁLEZ

Marzo 2017

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN QUE PARTICIPAN EN EL
EFECTO ANTI-ALODÍNICO DEL [6]-GINGEROL EN RATAS NEUROPÁTICAS**

Comité tutorial

Vo.Bo

Dra. Beatriz Godínez Chaparro

Vo.Bo

Dr. Vinicio Granados Soto

Vo.Bo

Dr. Héctor Isaac Rocha González

QFB. Alfonso Mata Bermudez

2152800294

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN QUE PARTICIPAN EN EL
EFECTO ANTI-ALODÍNICO DEL [6]-GINGEROL EN RATAS NEUROPÁTICAS**

Jurado del examen de grado

Vo.Bo Presidente

Dr. Francisco Javier López Muñoz

Vo.Bo Vocal

Dra. Francisca Pérez Severiano

Vo.Bo Secretario

Dra. Beatriz Godínez Chaparro

QFB. Alfonso Mata Bermudez

2152800294

Resumen

El dolor neuropático se caracteriza por ser una condición crónica que surge como consecuencia de una lesión o disfunción en el sistema nervioso somatosensorial y puede producir alteraciones complejas en las funciones cognitivas y emocionales. La causalidad del dolor neuropático comúnmente incluye una variedad de condiciones, como infecciones virales, tumores, desórdenes metabólicos, daño en el sistema nervioso central o periférico. El tratamiento del dolor neuropático incluye una gran variedad de fármacos por ejemplo, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina, antiepilépticos y algunos agentes tópicos como la capsaicina al 8%. El manejo del dolor neuropático, lamentablemente, es resistente al tratamiento farmacológico y su alivio por lo general es parcial. Para hacer frente a este problema es necesario proponer nuevas estrategias terapéuticas con un enfoque alternativo y/o complementario para el tratamiento de este tipo de dolor. Por lo que resulta relevante, la búsqueda, la evaluación y la caracterización de nuevas moléculas de origen natural y/o sintético que sean eficaces para un tratamiento adecuado de este tipo de dolor. El [6]-gingerol es el componente principal del jengibre (*Zingiber officinale*), el cual posee propiedades anti-oxidantes, anti-piréticas, anti-nociceptivas y anti-inflamatorias. El presente proyecto evaluó los posibles mecanismos de acción que subyacen en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol. Para ello, a los animales se les ligan los nervios espinales L5-L6 mediante el método descrito por Kim y Chung en 1992 con la finalidad de generar alodinia mecánica, la cual es una conducta característica del dolor neuropático. La alodinia se evaluó a través del método de "up-down", mediante el uso de los filamentos de von Frey. La administración intratecal (i.t) de dosis crecientes de [6]-gingerol fue capaz de revertir la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales. Además, el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol fue prevenido por la administración i.t del inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME 100 µg/rata, i.t), el inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ 10 µg/rata, i.t) y el bloqueador selectivo de los canales de K⁺ sensibles a ATP (glibenclamida 50 µg/rata, i.t). Asimismo, la administración i.t

del antagonista no selectivo de los receptores serotoninérgicos (metiotepina 30 µg/rata, i.t), el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{5A} (SB-699551 0.6 µg/rata, i.t), el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B} (SB-224289 0.5 µg/rata, i.t), el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D} (BRL-15572 0.4 µg/rata, i.t) y el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A} (WAY-100635 0.6 µg/rata, i.t) bloquearon el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol. Por otra parte, la administración i.t de los antagonistas selectivos del canal TRPV1, el AMG 9810 (30 µg/rata, i.t) y el BCTC (100 µg/rata, i.t) bloquearon el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol. En contra parte, la administración i.t del antagonista no selectivo de los receptores opioides (naloxona 50 µg/rata, i.t) no fue capaz de revertir el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol. En conjunto, estos datos sugieren que el efecto anti-alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol es modulado, mediante la activación, de la vía del óxido nítrico-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP, el sistema serotoninérgico mediante la activación de los receptores 5-HT_{1A/1B/1D} y 5A, así como por la activación de los receptores TRPV1, pero no por el sistema opioidérgico en animales con la cirugía de los nervios espinales L5-L6.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco que me permitio el uso de sus instalaciones para cursar la Maestria en Ciencias Farmaceuticas. La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio No. 004 del Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Godínez Chaparro.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestria No.578487 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Agradecimientos

- A la Dra. Beatriz Godínez Chaparro por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y en especial por brindarme su apoyo y su confianza.

A mis asesores por las aportaciones realizadas durante las exposiciones y redacción de esta tesis de maestría: Dr. Vinicio Granados Soto y Dr. Héctor Isaac Rocha González.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Antonio, Amaya, Tracy, Valeria, Ana, Antonio, Gustavo, Rogelio, Rosa, Pedro y Mariana por haberme brindado su apoyo en toda mi estancia en la maestría.

A mi familia: Juan Israel Mata Bermúdez, Aldahir Ortiz Mata, Damián González, Antonio Robles Vargas, Francisca Fuentes y en especial a María Maura Bermúdez Lome e Ivette López Reyes por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

Abreviaturas

IASP: Asociación internacional para el Estudio del Dolor	NK1: Receptor de neurocinina 1 de sustancia P
EROS: Especies reactivas de oxígeno	COX-2: Ciclooxigenasa 2
PBN: Fenil-N-t-butilnitrona	IP₃: 1,4,5-inositol trifosfato
DMPO: 5,5-dimetilpirolina-N-óxido	GABA: Ácido gamma-aminobutírico
TEMPOL: 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidina-N-óxido	MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos
FAP: Fibras aferentes primarias	H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
GRD: Ganglios de la raíz dorsal	O^{2·}: Superóxido
NS: Neuronas nociceptivas específicas	OH: Radical hidroxilo
SG: Sustancia gris	AA: Ácido araquidónico
WDR: Neuronas de amplio rango dinámico	LOX: Lipooxigenasa
N-NOC: Neuronas no nociceptivas	PLA₂: Fosfolipasa A ₂
SP: Sustancia P	GP_x: Glutatión peroxidasa
CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	SOD: Superóxido dismutasa
TET: Tracto espino-talámico	GC: Guanilato ciclasa
TER: Tracto espino-reticular	GCS: Guanilato ciclasa soluble
TEM: Tracto espino-mesencefálico	nNOS: Sintasa de óxido nítrico neuronal
THT: Tracto hipotalámico	iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible
SGPA: Sustancia gris periacueductal	eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial
MRV: Médula rostroventromedial	NADPH⁺: Nicotinamida adenina fosfato dinucleótido en su forma reducida
CCA: Corteza del cíngulo anterior	ERN: Especies reactivas de nitrógeno
T: Tálamo	BH: Tetrahidrobiopterina
H: Hipotálamo	FMN: Flavin mononucleótido
TNFα: Factor de necrosis tumoral	FAD: Flavin adenin dinucleótido
LIF: Inhibidor de la leucemia	L-Name: N-omega-nitro-L-arginina
IL-6: Interleucina 6	Ca²⁺/CaM: Complejo calcio-calmodulina
5-HT: Serotonina	GMPc: Guanosin monofosfato cíclico
PGE₂: Prostaglandina E ₂	K⁺: Potasio
IL1β: Interleucina 1 β	K_{ir}: Canales de potasio
NGF: Factor de crecimiento neural	H₂N: Grupo amino
ATP: Adenosin trifosfato	COOH: Grupo carboxilo
H⁺: Protones	KATP: Canales de potasio sensibles a ATP
TRPV1: Canal vaniloide de potencial transitorio	SUR: Receptores de sulfonilureas
H₁: Receptor de histamina 1	NRD: Núcleo del rafe dorsal
EP: Receptor a prostaglandina E ₂	NMR: Núcleo mediano del rafe
B1: Receptor a bradicinina 1	ATV: Área tegmental ventral
B2: Receptor a bradicinina 2	SN: Sustancia negra
IL-1-R: Receptor a interleucina 1	MRV: Médula rostroventral
SNC: Sistema nervioso central	GTG: Ganglios del trigémino
SNP: Sistema nervioso periférico	PIP₂: Inositol 4,5 bifosfato
TrkA: Receptor tirocin cinasa A del factor de crecimiento neuronal	PLC: Fosfolipasa C
P₂X: Receptor purinérgico 2x	DAG: Diacilglicerol
ASIC: Canales iónotróficos sensibles a ácido	NeuPSIG: Grupo de Interés especial sobre el dolor neuropático
PKA: Proteína cinasa A	DMSO: Dimetil sulfoxido
PKC: Proteína cinasa C	5-GNT: 5-Guanidilnaltrindol
TTXr: Canales de sodio resistentes a tetrodotoxina	SNL: Ratas con ligadura de nervios espinales L5-L6
TTXs: Canales de sodio sensibles a tetrodotoxina	Sham: Ratas falsamente operadas
AMPA: Receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico	Naive: Ratas sin tratamiento ni intervención quirúrgica
BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro	i.t: Administración intratecal
NMDA: Canales N-metil-D-aspartato	i.p: Administración intraperitoneal
NOS: Sintasa de óxido nítrico	RTX: Resiniferatoxina
COX: Ciclooxigenasa	
MAPK: Proteína cinasa activada por mitoqueno	
NO: Óxido nítrico	
TrkB: Receptor de tirosina cinasa B del factor neutrófico derivado del cerebro	
mGlu_r: Receptores metabotrópicos de glutamato	

Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Definición del dolor	4
2.2. Nocicepción	4
2.3. Sistema nociceptivo	5
2.4. Clasificación del dolor	8
2.4.1. Dolor nociceptivo	8
2.4.2. Dolor inflamatorio	9
2.4.3. Dolor patológico	10
2.5. Sensibilización periférica	12
2.6. Sensibilización central	13
2.7. Vías ascendentes del dolor	15
2.8. Contribución facilitadora descendente del dolor mediada por la médula rostral ventromedial	17
2.9. Dolor neuropático	19
2.9.1. Fisiopatología del dolor neuropático	21
2.9.2. Tratamiento del dolor neuropático	21
2.10. Plantas medicinales	24
2.11. Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	25
2.11.1. Principales entidades químicas del jengibre	26
2.11.2. [6]-gingerol	27
2.11.3. Actividad anti-inflamatoria del [6]-gingerol	28
2.11.4. El [6]-gingerol y dolor neuropático	28
2.12. Especies reactivas de oxígeno	29
2.12.1. Especies reactivas de oxígeno y dolor	30
2.12.2. Estrés oxidativo y dolor neuropático	30
2.12.3. Actividad anti-oxidante del [6]-gingerol	31
2.13. Vías clásicas de modulación del dolor de los agentes anti-oxidantes	32
2.13.1.1. Óxido nítrico (NO)	32
2.13.1.2. Efecto dual del NO	35

2.13.2 Canales de potasio.....	36
2.13.3. Vía del óxido nítrico-GMP cíclico-Canales de potasio sensibles a ATP y el dolor.....	37
2.13.4. Vía opioidérgica.....	38
2.13.4.1. Señalización de los receptores opioides	39
2.13.5. Vía Serotoninérgica	40
2.13.5.1. Acciones de la 5-HT sobre el SNP	41
2.13.5.2. Acciones de la 5-HT sobre el SNC.....	42
2.13.5.3. Receptores serotoninérgicos.....	43
2.13.6. Canales iónicos TRP	46
2.13.6.1. Canal TRPV1	46
2.13.6.2. Canales TRPV1 y su implicación en el dolor inflamatorio	47
2.13.6.3. Canales TRPV1 y su implicación en el dolor neuropático.....	48
3. Hipótesis.....	50
4. Objetivos	50
4.1. Objetivo general	50
4.2. Objetivos particulares	50
5. Metodología.....	53
5.1. Animales.....	53
5.2. Fármacos	53
5.3. Modelos experimentales	54
5.3.1. Cirugía de nervios espinales	54
5.3.2. Inyección intratecal.....	55
5.3.3. Determinación del 50% del umbral de retiro de la pata	56
5.4. Diseño experimental.....	58
5.4.1. Participación de la vía óxido nítrico-GMP cíclico-canales de K ⁺ sensibles a ATP.....	59
5.4.2. Participación del sistema opioidérgico	59
5.4.3. Participación del sistema serotoninérgico	59
5.4.4. Participación del canal TRPV1	60
5.5. Análisis de datos y estadística	60
6. Resultados	62
6.1. Estandarización de la cirugía de nervios espinales L5-L6, así como el modelo conductual de up-down.....	62

6.2. Efecto de la administración intratecal de [6]-gingerol sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6	63
6.3. Efecto del L-NAME, ODQ y glibenclamida sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas.....	64
6.4. Efecto de la naloxona sobre el efecto anti-alódico inducido el [6]-gingerol en ratas neuropáticas	66
6.5. Efecto de AMG 9810 y BCTC sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas	67
6.6. Efecto de la metiotepina, WAY-100635, SB-224289, BRL-15572 y SB-699551 sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas	69
7. Discusión	71
7.1. Posible participación de la vía del NO-GMP-cíclico canales de K ⁺ sensibles a ATP en el efecto antialodínico inducido por el [6]-gingerol.....	72
7.2. Posible participación de la vía opioidérgica en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol	73
7.3. Posible participación de la vía serotoninérgica en el efecto anti-alodínico del [6]-gingerol.....	74
7.4. Posible participación del canal TRPV1 en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol.....	75
8. Conclusiones	78
9. Bibliografía	79

Índice de tablas

Tabla 1. Fármacos, modelos experimentales y efectos farmacológicos implicados en el efecto pronociceptivo y anti-nociceptivo de los receptores 5HT.....	45
--	----

Índice de figuras

Figura 1. Neuronas nociceptivas.....	7
Figura 2. Dolor nociceptivo.....	9
Figura 3. Dolor inflamatorio.....	10
Figura 4. Dolor patológico.....	11
Figura 5. Sensibilización periférica.....	13
Figura 6. Sensibilización central.....	15
Figura 7. Vías ascendentes que participan en la transmisión nociceptiva.....	17
Figura 8. Vías descendentes que participan en la transmisión nociceptiva.....	19
Figura 9. Principales entidades químicas con actividad biológica presentes en el jengibre.....	27
Figura 10. Similitudes estructurales entre el [6]-gingerol y la capsaicina.....	28
Figura 11. Síntesis del óxido nítrico (NO).....	34
Figura 12. Ligadura de los nervios espinales.....	55
Figura 13. Administración intratecal.....	56
Figura 14. Diseño experimental para la evaluación del efecto anti-alodínico del [6]-gingerol en ratas neuropáticas.....	61
Figura 15. Representación gráfica del curso temporal (días), de los grupos SNL, Sham y Naive.....	62
Figura 16. Curso temporal del efecto anti-alodínico de la administración intratecal de [6]-gingerol en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.....	63
Figura 17. Curso temporal del pre-tratamiento con L-NAME, ODQ y Gibenclamida sobre el efecto anti-alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.....	65
Figura 18. Curso temporal del pre-tratamiento con naloxona sobre el efecto anti-	

alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.....	66
Figura 19. Curso temporal del pre-tratamiento con AMG 9810 y BCTC sobre el efecto anti-alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático	68
Figura 20. Curso temporal del pre-tratamiento con metiotepina sobre el efecto anti-alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.....	69
Figura 21. Curso temporal del pre-tratamiento con WAY-100635, BRL-15572, SB-699551 y SB-224289 sobre el efecto anti-alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.....	70

1. Introducción

La asociación internacional para el estudio del dolor (IASP, por sus siglas en inglés), define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979). El dolor se puede clasificar en dos categorías, dependiendo de su duración: dolor fisiológico (agudo) y dolor patológico (crónico). El dolor fisiológico o nociceptivo es transitorio y ayuda a proteger al organismo de un daño tisular, mientras que el dolor patológico es persistente e innecesario para la supervivencia del individuo (Nakagawa y Kaneko, 2010). El dolor patológico es la consecuencia de un daño y/o disfunción del sistema nervioso periférico o central (dolor neuropático), de un daño al tejido periférico o inflamación (dolor inflamatorio) (Gao y Ji, 2010). Además, el dolor patológico se caracteriza por generar respuestas de dolor espontáneo como alodinia e hiperalgesia.

El dolor neuropático surge como consecuencia de una lesión o disfunción del sistema nervioso somatosensorial y por lo general resulta incómodo para las personas que lo padecen disminuyendo drásticamente su calidad de vida. Por este motivo y con la introducción de modelos animales que facilitan el estudio de este tipo de dolor, es de suma importancia el estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados en el desarrollo y el mantenimiento del dolor neuropático. Por lo que resulta relevante, la búsqueda, la evaluación y la caracterización de nuevas moléculas de origen natural y/o sintético que sean eficaces para el tratamiento adecuado de este tipo de dolor.

Un mecanismo relevante en la generación de dolor neuropático, involucra la participación directa de especies reactivas de oxígeno (EROS) a nivel celular y subcelular (Twining et al., 2004). Se ha demostrado que los agentes anti-oxidantes producen efecto anti-hiperalgésico y anti-alodínico en modelos animales (Kim et al., 2004). Por ejemplo, la vitamina E produce anti-nocicepción en ratas neuropáticas reduciendo la sensibilización central inducida por daño en los nervios periféricos (Kim et al., 2006). En otro estudio, los agentes anti-oxidantes como la fenil-N-t-butilnitrona (PBN), el 5,5-dimetilpirolina-N-óxido (DMPO) y el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-N-óxido (TEMPOL) (Kim et al., 2004; Gao et al., 2007) disminuyen las

conductas nociceptivas de largo plazo, predominantemente, por mecanismos espinales, sugiriendo que las EROS pueden estar involucradas en la sensibilización central. Apoyando lo anterior, estudios electrofisiológicos y conductuales indican que los anti-oxidantes revierten la sensibilización central (Kim et al., 2006). En conjunto, las evidencias aquí expuestas sugieren que las EROS pueden jugar un papel importante en la sensibilización central y así contribuir en el desarrollo y/o el mantenimiento del dolor neuropático. Por otra parte, estudios recientes sugieren que agentes anti-oxidantes como la manguiferina, la epicatequina, el resveratrol y la curcumina son capaces de revertir la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 y la constricción crónica del nervio ciático (Yu et al. 2014; de Los Monteros-Zuñiga et al., 2016; Lei et al. 2016), así como, la nocicepción inducida por formalina (Izquierdo et al., 2013; Quiñonez-Bastidas et al., 2013). Además, se ha propuesto que el efecto anti-nociceptivo inducido por la mangiferina y la epicatequina se produce a través de la vía óxido nítrico-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP (Izquierdo et al., 2013; Quiñonez-Bastidas et al., 2013; de Los Monteros-Zuñiga et al., 2016), el sistema serotoninérgico (Quiñonez-Bastidas et al., 2013; de Los Monteros-Zuñiga et al., 2016) y el sistema opioidérgico (Izquierdo et al., 2013; Lopez et al., 2013).

La búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de origen natural ha conducido a la evaluación de componentes de especies vegetales medicinales, con fines terapéuticos. El valor terapéutico, de algunas especies de plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos activos que interaccionan de manera específica a nivel molecular en el organismo. Entre los componentes bioactivos de las plantas se han aislado: flavonoides, alcaloides, fenoles y xantonas (Pal et al., 2013). Estas moléculas son usualmente reconocidas por su efecto anti-oxidante. En relación con las plantas medicinales con potencial efecto anti-oxidante, llama nuestra atención, el Jengibre (*Zingiber officinale*) el cual es considerado una planta medicinal ampliamente utilizada en la medicina tradicional de varias culturas alrededor del mundo incluyendo México. Entre las propiedades medicinales más relevantes del extracto de jengibre se pueden mencionar el alivio de las náuseas, la artritis y el dolor (Grant y Lutz, 2000). Las principales entidades químicas que

presentan la actividad biológica del jengibre son el [6]-gingerol, el [8]-gingerol, el [10]-gingerol y el [6]-shogaol (Shukla y Singh, 2007). El [6]-gingerol es el componente principal del jengibre, el cual posee propiedades antioxidantes (Aeschbach et al., 1994), anti-piréticas, anti-nociceptivas y anti-inflamatorias (Young et al., 2005). En apoyo a lo anterior, el [6]-gingerol inhibe las conductas nociceptivas inducidas por ácido acético y/o formalina (Young et al., 2005). Asimismo, se sabe que el extracto de jengibre reduce el edema de la pata inducido por carragenina (Mascolo et al., 1989) debido a la supresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α) en ratones (Kim et al., 2005). Además, el [6]-gingerol atenúa la producción de PGE₂ (Dugasani et al., 2010), COX-2 vía NF- κ B (Kim et al., 2005, 2007), así como la formación de radicales libres (Kim et al., 2007; Dugasani et al., 2010), y la formación de NO en modelos *in vitro* e *in vivo* (Kim et al., 2007). Es ampliamente conocido que, el [6]-gingerol es un análogo estructural de la capsaicina, la cual es un ligando natural del canal iónico TRPV1. Cabe señalar, que el receptor TRPV1 juega un papel importante en la nocicepción térmica aguda, inflamación e hiperalgesia térmica y mecánica (Szallasi y Blumberg, 1999). En consecuencia, la similitud estructural del [6]-gingerol con capsaicina sugiere que podría ser un ligando del receptor TRPV1 y potencialmente ser utilizado para el tratamiento del dolor neuropático (Gauthier et al., 2013). Finalmente, estudios recientes demuestran que el [6]-gingerol disminuye la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica inducida por la ligadura del nervio ciático (Gauthier et al., 2013). Por lo tanto, en el presente proyecto se evaluaron los posibles mecanismos de acción que subyacen en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas.

2. Marco teórico

2.1. Definición del dolor

La asociación internacional para el estudio del dolor, define el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979). El dolor, aunque indeseable, representa una estrategia adaptativa que nos permite protegernos de las agresiones del medio exterior; sin embargo, cuando se pierde la homeostasis de los procesos que lo integran y que lo regulan, éste sobrepasa su papel benéfico para el organismo para convertirse en una patología que por sí misma debe ser suprimida, para permitirle al organismo sobrevivir (Gomezese Ribero et al., 2001). Aunque el dolor se trata, esencialmente, de una sensación, éste tiene fuertes componentes cognitivos y emocionales que están vinculados o descritos en términos de sufrimiento, además de estar asociados con reflejos motores en respuesta al daño tisular (Woolf, 2004). La mayor parte de los órganos y los sistemas del cuerpo poseen un grupo especial de receptores sensoriales que tienen la capacidad de diferenciar entre un estímulo inocuo de uno potencialmente dañino. A ésta capacidad de detectar estímulos nocivos se le denomina nocicepción.

2.2. Nocicepción

El principal acercamiento en neurofisiología no ha sido el estudio del dolor del todo, más bien el estudio de la nocicepción (Hoffer, 1989). La nocicepción no es sinónimo de dolor; dicho proceso puede ser necesario para que ocurra el dolor, pero no es suficiente para que el dolor se presente clínicamente (Turck y Okifuji, 1999). Hay una diferencia entre el termino nocicepción y dolor; el primero se refiere a las manifestaciones neurofisiológicas generadas por estímulos nocivos mientras que el segundo involucra la percepción de un estímulo aversivo, que requiere la capacidad de abstracción y la elaboración de impulsos sensoriales (Almeida y col., 2004).

El término nocicepción se refiere a un proceso fisiológico que engloba distintos mecanismos neurales que detectan estímulos nocivos (térmicos, mecánicos o químicos). Estos estímulos son detectados por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, llamadas nociceptores, los cuales son excitados cuando la intensidad del estímulo sobrepasa el umbral que lo caracteriza. Por lo tanto, los nociceptores poseen propiedades biofísicas y moleculares que les permiten detectar y responder selectivamente a estímulos potencialmente perjudiciales (Basbaum et al., 2009), permitiendo la supervivencia del individuo. La nocicepción comprende 4 procesos: transducción, transmisión, percepción y modulación (D'Amours, 1996). **La transducción** es el proceso por el que los estímulos nocivos son convertidos en una señal eléctrica a nivel de las terminales aferentes primarias, generando un potencial de acción. **La transmisión** es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas que participan en el procesamiento del dolor. **La percepción** se presenta cuando la información nociceptiva se integra con factores cognoscitivos y emocionales para la generación del dolor. Por último, **la modulación** es el proceso por el que la transducción y la transmisión es modificado a través de diversas influencias naturales, a distintos niveles: ganglio de la raíz dorsal y médula espinal (D'Amours, 1996).

2.3. Sistema nociceptivo

Tras una estimulación periférica nociva, la información dolorosa se transmite a través de los nociceptores o fibras aferentes primarias (FAP), a través de las fibras A β mielinizadas, las fibras A δ ligeramente mielinizadas y las fibras C no mielinizadas (Fig. 1). El estímulo nociceptivo viaja hasta llegar al asta dorsal de la médula espinal donde las neuronas nociceptivas de segundo orden son activadas por neurotransmisores, tales como glutamato y neuropéptidos que se liberan de las neuronas aferentes primarias (Ji y Woolf, 2001). Una FAP es una neurona sensorial primaria que se activa por la presencia de estímulos nocivos, que ponen en peligro la integridad del individuo, caracterizándose por la presencia de umbrales de activación que los distinguen entre otros nervios. Por otra parte los cuerpos celulares de los nociceptores se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (GRD)

para el cuerpo y en el ganglio trigémino para la inervación de la cara, además de presentar una rama axonal periférica y una central, que inerva su órgano diana y la médula espinal a través de la raíz dorsal, respectivamente (Julius y Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009). Además, estos forman conexiones con neuronas de segundo orden a través de interneuronas espinales.

Las neuronas nociceptivas se pueden clasificar en tres grupos principales, en base a criterios anatómicos y funcionales:

- Neuronas nociceptivas específicas (NS): Se activan de forma exclusiva mediante estímulos nocivos de alta intensidad, mediados por fibras C y A δ . Se encuentran localizadas en las láminas I (zona marginal), II sustancia gris (SG), V y VI. Están involucradas en la codificación y en la localización del dolor (Le Bars D, 2009).
- Neuronas multireceptoras o neuronas de amplio rango dinámico (WDR): Responden ante estímulos mecánicos, térmicos y químicos transferidos por las fibras A δ , C y A β . Las neuronas WDR están localizadas en las láminas I, II, IV, V, VI y X del asta dorsal de la médula espinal (Le Bars D, 2009).
- Neuronas No Nociceptivas (N-NOC): Son activadas mediante la presencia de estímulos inocuos, ya sea mecánicos o térmicos de baja intensidad. También, pueden responder a estímulos propioceptivos transmitidos por las fibras A δ y A β . Están localizadas principalmente en las láminas I, II y IV (Schmidt et al., 1995).



Figura 1. Neuronas nociceptivas. Tipos de fibras sensoriales dependiendo de su grado de mielinización, tipo de estímulo que la activan, umbral térmico, diámetro y tipo de receptor al que se asocia. Modificado de Julius y Basbaum, 2001.

Las fibras A α y A β (propionociceptores y mecanorreceptores, respectivamente) son conocidas como fibras sensoriales no nociceptivas, estas responden a la estimulación mecánica inocua, es decir, a un ligero toque, por lo que son capaces de responder a una gran variedad de estímulos, tanto inocuos como nocivos, ya sean de tipo químico, térmico o mecánico, integrando así estímulos viscerales y somáticos (Le Bars D, 2009). Además, son fibras de gran tamaño (>10 μm) y presentan una conducción rápida (30-100 m/s) (Millan, 1999). Las fibras (A δ) mielinizadas de diámetro medio (1-5 μm) y conducción rápida (5-30 m/s) se encuentran principalmente en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal, son activados mediante la percepción de estímulos mecánicos y térmicos, también conocidas como neuronas nociceptivas polimodales (Basbaum et al., 2009). Estudios electrofisiológicos han subdividido los nociceptores A δ en dos clases principales:

- Las fibras A δ tipo I (nociceptores mecánicos de alto umbral) respondenn a estímulos tanto mecánicos como químicos, además de poseer umbrales de activación por calor de alrededor de los 50 °C.

- Las fibras A δ tipo I poseen un umbral de activación por estímulos térmicos mucho más bajo en comparación con el tipo II, sin embargo, éste presenta un umbral más alto para estímulos mecánicos.

Las fibras C de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm) y conducción lenta (5-30 m/s) son fibras no mielinizadas, y al igual, que las fibras aferentes mielinizadas, la mayoría de las fibras C son de tipo polimodales, es decir, que incluyen una población que es capaz de activarse mediante la presencia de estímulos térmicos y mecánicos (Schmidt et al., 1995). Además, estas pueden activarse mediante la presencia de estímulos químicos como la histamina o capsaicina (Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009; Le Bars D, 2009).

2.4. Clasificación del dolor

El dolor se ha clasificado en función de su intensidad (leve, moderada o severo), de acuerdo a su cualidad (por la presencia de sensaciones urentes, lancinantes o quemantes) y de acuerdo a su duración (transitoria, intermitente o persistente) (Woolf, 2004). Sin embargo, una clasificación ampliamente utilizada en la actualidad es la propuesta por Clifford J. Woolf en el 2010, la cual establece que el dolor puede ser clasificado según el mecanismo molecular que lo genera, ya sea dolor nociceptivo, inflamatorio o patológico (Woolf, 2000).

2.4.1. Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo (Fig. 2) se produce por la activación de los nociceptores mediante estímulos térmicos, mecánicos o químicos; se presenta como un sistema de protección fisiológico de alerta temprana, esencial para detectar y minimizar el contacto con los estímulos perjudiciales o nocivos (Woolf, 2010), actuando sobre un sistema sensorial de alto umbral llamado sistema nociceptivo (Scholz y Woolf, 2002). Este sistema transmite la información desde la periferia hasta llegar al tálamo y finalmente llega al lóbulo parietal de la corteza cerebral en donde la sensación dolorosa es percibida (Gao y Ji, 2010). Una vez que se genera el daño exige una atención inmediata, generando una respuesta de retiro ante el estímulo doloroso,

antes de que se genere un daño tisular. Por otra parte, el dolor nociceptivo se presenta como un daño a evitar, y cuando se activa, el sistema anula la mayor parte de otras funciones neuronales (Scholz y Woolf, 2002).

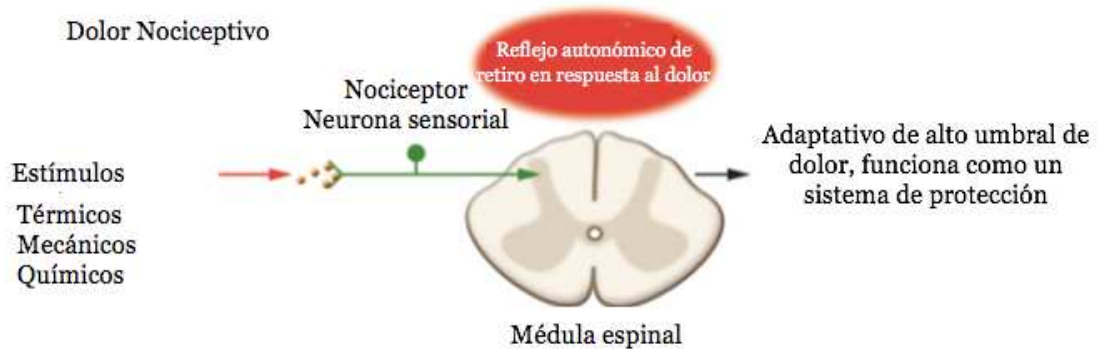


Figura 2. Dolor nociceptivo. Se caracteriza por poseer un reflejo autonómico de retiro en respuesta al dolor, es de tipo adaptativo, de alto umbral de dolor, además defuncionar como un sistema de protección y supervivencia. Modificado de Woolf, 2010.

2.4.2. Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio (Fig.3) se presenta como respuesta a un daño o a un proceso de tipo inflamatorio en el tejido lesionado, presentandose un aumento de la sensibilidad alrededor de la zona inflamada (primario) y en las zonas aledañas no inflamadas (secundario), esto se genera como resultado de la plasticidad en los nociceptores periféricos y las vías nociceptivas centrales produciendo una estimulación de los nociceptores y la subsecuente activación del sistema inmune, liberando múltiples mediadores químicos como serotonina, bredicininina, TNF α , factor de crecimiento nervioso, interleucinas, ATP entre otros (sopa inflamatoria) y reclutando células del sistema inmunológico como mastocitos, granulocitos, neutrófilos y macrófagos (Huang et al., 2006). Algunos mediadores inflamatorios, activan directamente los nociceptores generando dolor (Woolf, 2004). El dolor inflamatorio se caracteriza por ser de tipo adaptativo y funcional, actuando como un sistema de protección, al generar un aumento de la sensibilidad en el sitio del daño y en el tejido normal adyacente (Woolf y Salter, 2000), favoreciendo la curación de la parte lesionada mediante la creación de una situación que desalienta el contacto

físico y el movimiento (Woolf, 2010). Por lo general, el dolor inflamatorio desaparece después de la resolución de la lesión tisular inicial.

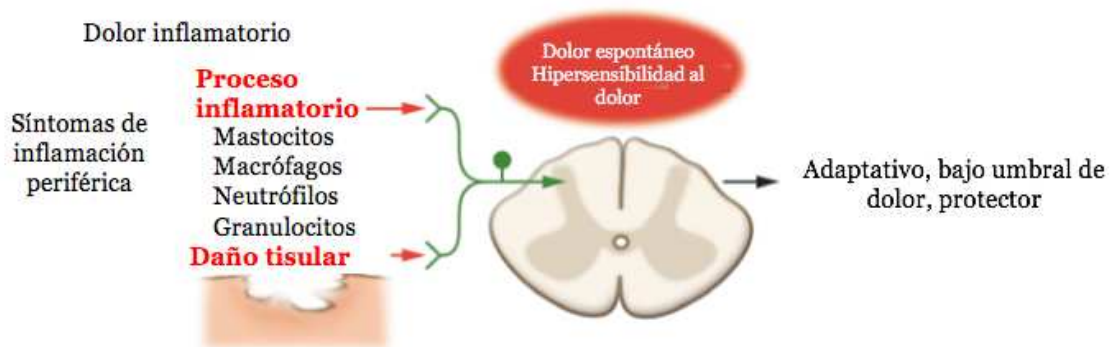


Figura 3. Dolor inflamatorio. Se presenta mediante la generación de un daño tisular o un proceso inflamatorio, después de haberse generado la lesión se genera un reclutamiento de células del sistema inmune liberando neurotransmisores y neuromoduladores como serotonina, bradicnina, $TNF\alpha$, factor de crecimiento nervioso, endotelinas, interleucinas, prostaglandinas entre otros, los cuales van a actuar sobre sus receptores correspondientes, generando potenciales de acción que viajan a través de las vías nociceptivas hacia el asta dorsal de la médula espinal, haciendo sinapsis con neuronas de segundo orden, que llevan la información nociceptiva hacia los centros supraespinales. Modificado de Woolf, 2010.

2.4.3. Dolor patológico

El dolor patológico (Fig.4) se divide en dos grandes ramas, la primera comprende al dolor neuropático, el cual se define como el dolor que surge en consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial (Jensen et al., 2011), caracterizándose por ser una afección fisiopatológica generalmente crónica, que se manifiesta mediante la presencia de signos positivos y negativos característicos de este tipo de dolor. Los síntomas positivos incluyen; dolor espontáneo, sensibilización anormal (hiperalgesia), dolor producido por una estimulación inocua (alodinia) (Huang et al., 2016), sensaciones anormales caracterizadas por la presencia de dolor punzante, quemante o lancinante (parestias) y sensaciones de hormigueo, generalmente en un pie o en una mano (disestesias) (Vranken, 2009). En contraste, los signos negativos implican; déficits sensorial (hipoestesia e hipoalgesia) y debilidad en la zona afectada (Vranken, 2009). Por otra parte, el dolor disfuncional se presenta como resultado de un procesamiento central anormal, en donde no existe la presencia de un estímulo

nocivo identificable, inflamación o daño en el sistema nervioso, manifestándose mediante una respuesta anormal o disfunción del sistema nervioso, en donde se genera un aumento de la sensibilidad del sistema sensorial, amplificando los síntomas y por lo tanto, aumenta la percepción del dolor (Woolf, 2004). Sin embargo, los pacientes refieren sentir dolor de tipo espontáneo e hipersensibilidad (Woolf, 2010). La causalidad del dolor disfuncional, comúnmente, incluye una diversa variedad de condiciones y patologías, por ejemplo, fibromialgia, síndrome del intestino irritable, cistitis intersticial, entre otros (Costigan et al., 2009).

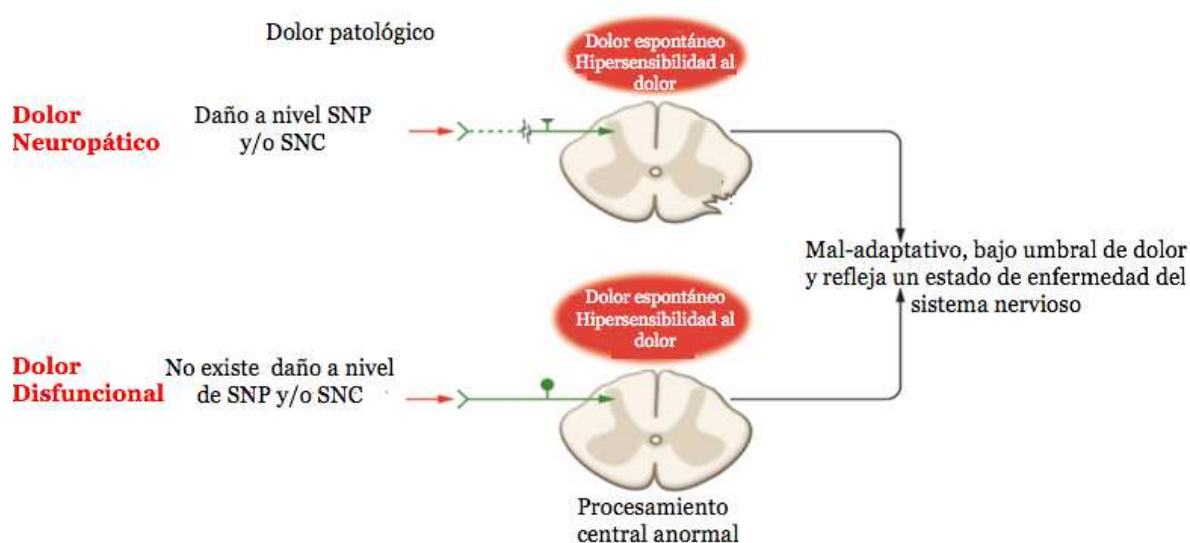


Figura 4. Dolor patológico. El dolor neuropático, se presenta como una condición crónica causada por una lesión o disfunción en el sistema nervioso periférico y central. Por otra parte, el dolor disfuncional surge como resultado de un procesamiento central anormal, en donde no existen daños aparentes. Ambos tipos de dolor son de tipo mal adaptativo, de bajo umbral de dolor y reflejan un estado de enfermedad del sistema nervioso. Modificado de Woolf, 2010.

Hasta el momento, se sugiere que el dolor patológico surge como consecuencia de un procesamiento de dolor alterado generado por una lesión o enfermedad que afecta directamente al SNC y al SNP (Jensen et al., 2011). Se han identificado diferentes procesos que participan en la generación y el mantenimiento de los estados dolorosos: (1) la activación y la sensibilización de los nociceptores periféricos, también llamada sensibilización periférica; (2) la amplificación de la señal nociceptiva a nivel central, conocida como sensibilización central; (3) la activación de los nociceptores periféricos, que una vez activados transmiten la

información nociceptiva hasta los centros supraespinales, conocida como vías ascendentes del dolor y; (4) la modulación descendente facilitadora mediada por la médula rostral ventromedial (MRV). A continuación, se describen brevemente cada uno de estos mecanismos.

2.5. Sensibilización periférica

Cuando un estímulo nociceptivo produce daño al tejido se generan cambios profundos en el ambiente químico de la fibra aferente primaria (Fig. 5). En primer lugar, las células dañadas liberan su contenido intracelular, hay una disminución del pH, se reclutan células inflamatorias al sitio del daño y hay producción y liberación de agentes neuroactivos por parte de las células inflamatorias y no inflamatorias, entre los que se incluyen iones (K^+ y H^+) (Waldmann y Lazdunski, 1998), aminas (serotonina, histamina) (Dray, 1995), bradicinina (Walter y Chau, 1995), prostaglandina E_2 (PGE_2) (Bley et al., 1998), purinas (ATP) (Burnstock y Wood, 1996), citocinas (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$) y factores de crecimiento. Estos mediadores químicos actúan sobre sus receptores específicos o canales iónicos en la terminal nociceptiva periférica. Los receptores activados inician cascadas de transducción que generan la modulación postraduccional de las moléculas efectoras y cambios en la transcripción de genes (Costigan y Woolf, 2000). Por otra parte, la activación de los nociceptores (fibras C y $A\delta$) genera potenciales antidromicos y ortodromicos que liberan neuropéptidos como la SP y el CGRP (Wall y Devor, 1983). A su vez, estos péptidos despolarizan las terminales nerviosas vecinas y son responsables de la vasodilatación y extravasación plasmática, así como la regulación y la secreción de diversos mediadores inflamatorios de varias células (Costigan y Woolf, 2000). Todos estos cambios disminuyen el umbral de activación de la terminal nociceptiva lo que provoca una frecuencia de descarga aumentada con cada estímulo periférico (Costigan y Woolf, 2000).

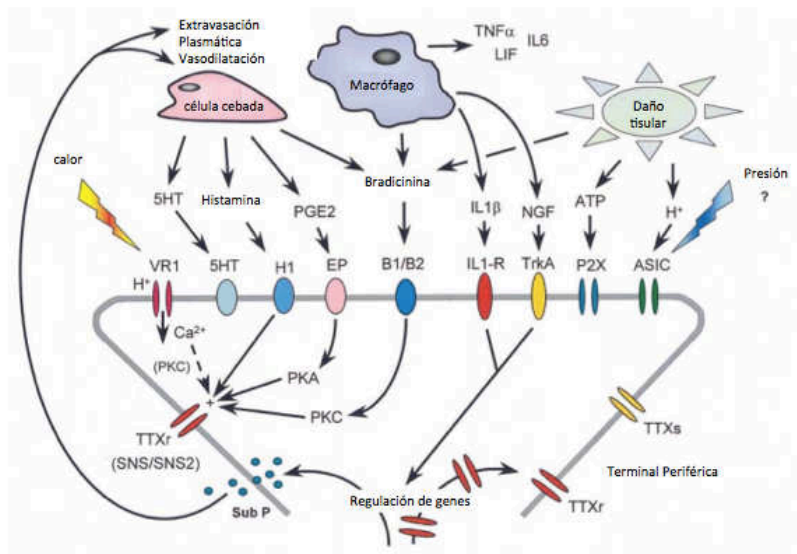


Figura 5. Sensibilización periférica. El daño al nervio libera múltiples mediadores inflamatorios de las células inflamatorias y no inflamatorias. Los receptores activados inician cascadas de transducción que generan la modulación post-traduccional de las moléculas efectoras y cambios en la transcripción de genes. Como resultado, el umbral de activación de los receptores y la excitabilidad de la terminal periférica aumentan, produciendo estados de hipersensibilidad. Abreviaturas: Factor de necrosis tumoral α (TNF α), inhibidor de la leucemia (LIF), interleucina 6 (IL-6), serotonina (5-HT), prostaglandina E₂ (PGE₂), interleucina 1 β (IL-1 β), factor de crecimiento neural (NGF), adenosintrifosfato (ATP), iones hidrogeno o protones (H $^+$), canal vaniloide de potencial transitorio 1 (TRPV1), receptor a histamina 1 (H₁), receptor a prostaglandinas E₂ (EP), receptores a bradicinina 1 y 2 (B₁ y B₂), receptor a interleucina 1 (IL-1-R), receptor tirocin cinasa A del factor de crecimiento neural (TrkA), receptor purinérgico 2x (P₂X), canales iónotróficos sensibles a ácido (ASIC), proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), canales de sodio resistentes (TTXr) y sensibles a tetrodotoxina (TTXs). Modificado de Scholz y Woolf, 2002.

2.6. Sensibilización central

La sensibilización central (fig. 6) toma en cuenta los eventos postsinápticos en el asta dorsal de la médula espinal, considera las propiedades de las neuronas de segundo orden y las propiedades funcionales de los neurotransmisores involucrados para explicar el mantenimiento de la hiperalgesia (Dubner y Ruda, 1992). Un estímulo nociceptivo que no produce daño al tejido, libera glutamato de las terminales centrales de las fibras aferentes primarias. El glutamato transmite el impulso nociceptivo a través de los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), que genera potenciales postsinápticos excitadores rápidos que señalan la duración, la intensidad y la localización del estímulo periférico nociceptivo y, por ende, sirve como un sistema de advertencia al

organismo (Woolf y Costigan, 1999). Cuando el estímulo nociceptivo daña al tejido, los potenciales generados son más intensos o sostenidos liberando glutamato, sustancia P y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), los cuales a su vez activan receptores postsinápticos desencadenando una cascada de transducción de señales (Costigan y Woolf, 2000; Khasabov et al., 2002). En primer lugar, el glutamato activa a los receptores AMPA que despolarizan las neuronas postsinápticas. Dicha despolarización remueve al ion de magnesio (Mg^{2+}) que bloquea los canales de N-metil-D-aspartato (NMDA), permitiendo al glutamato activar a estos receptores y como consecuencia, se incrementa el Ca^{2+} intracelular (Woolf y Salter, 2000). El incremento de Ca^{2+} y la activación de múltiples receptores estimulan la participación de diversas enzimas como la sintasa de óxido nítrico (NOS) o la ciclooxigenasa (COX) y múltiples cinasas como la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC) o las proteínas cinasas activadas por mitocuano (MAPK) (Woolf y Costigan, 1999). Las proteínas cinasas fosforilan a los receptores de membrana y los canales iónicos, haciendo más excitable a la neurona. Por otra parte, la NOS y la COX sintetizan óxido nítrico (NO) y prostaglandinas, respectivamente (Costigan y Woolf, 2000). Ambas sustancias son capaces de difundir hacia la neurona presináptica donde producen un incremento de la señal nociceptiva. Todos estos cambios incrementan la frecuencia de descarga espontánea de las neuronas postsinápticas, disminuyen su umbral de activación por estímulos periféricos, incrementan la respuesta a los estímulos nociceptivos y amplifican los campos receptivos (Latremoliere y Woolf, 2009). Por lo tanto, la sensibilización central produce hipersensibilidad al dolor favoreciendo el mantenimiento de la alodinia y la hiperalgesia.

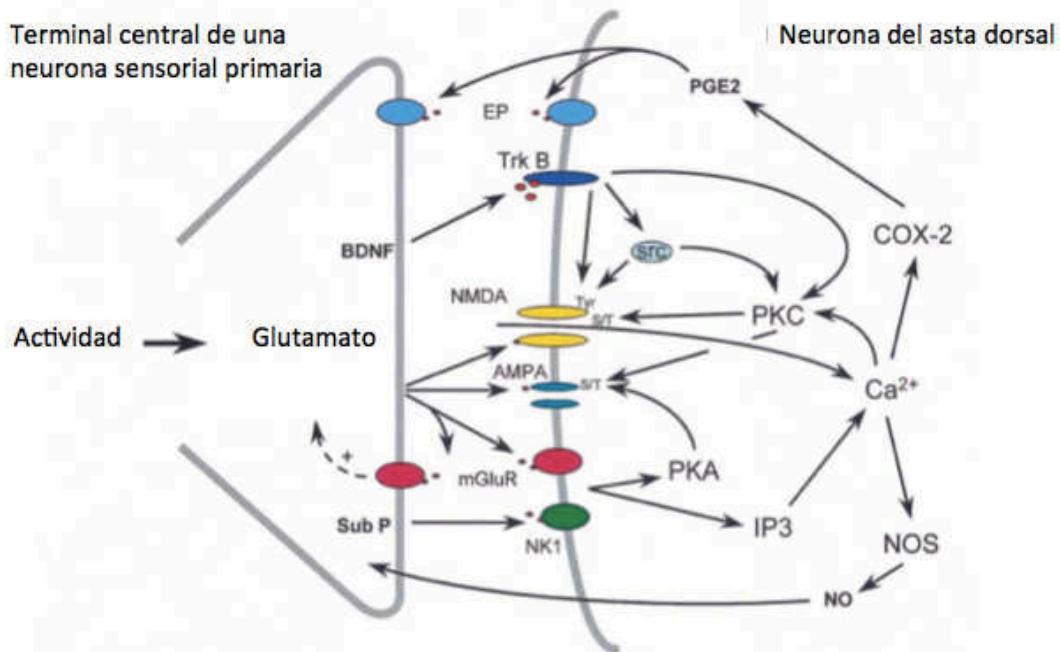


Figura 6. Sensibilización central. La liberación de SP, glutamato y el BDNF promueve la activación de múltiples receptores (NK1, mGlu-R, AMPA-R, NMDA-R y TrkB), produciendo un incremento de Ca²⁺ intracelular y la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares. El incremento de Ca²⁺ y la activación de los múltiples receptores estimulan la participación de diversas enzimas como la sintasa del NOS o la COX y múltiples cinasas (PKA, PKC, MAPK). Las proteínas cinasas fosforilan los receptores de la membrana y canales iónicos haciendo más excitable a la neurona. Por otra parte, la NOS y la COX sintetizan metabolitos como NO y PGE₂, respectivamente. Ambas sustancias son capaces de difundir hacia la neurona presináptica donde se produce un incremento de la señal nociceptiva. Todos estos cambios incrementan la frecuencia de descarga espontánea y disminuyen el umbral de respuesta permitiendo que las neuronas de segundo orden puedan ser activadas por potenciales excitatorios postsinápticos que eran inefectivos (sub-umbrales) previamente. Abreviaturas: Factor neutrótico derivado de cerebro (BDNF), sustancia P (SP), receptor a prostaglandina E₂ (EP), receptor de tirosina cinasa B del factor neutrótico derivado del cerebro (TrkB), receptor N-metil-D-aspartato de glutamato (NMDA), receptor α-amino-3-hidrox-5-metil-4-isoxazolpropionato de glutamato (AMPA), receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), receptor de neurocinina 1 de sustancia P (NK₁), prostaglandina E₂ (PGE₂), proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA), 1,4,5-inositol trifosfato (IP₃), óxido nítrico (NO), sintasa de óxido nítrico (NOS), ciclooxygenasa 2 (COX-2). Modificado de Scholz y Woolf, 2002.

2.7. Vías ascendentes del dolor

Los procesos involucrados en la percepción del dolor son activados mediante receptores periféricos que detectan los estímulos nocivos perjudiciales para el organismo (Julius and Basbaum, 2001) (Fig.7). Una vez que se genera el daño, los nociceptores, son activados y estos van a transformar el estímulo nocivo en potenciales de acción (McCleskey y Gold, 1999). Estos potenciales de acción generan una apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (N⁺, P/Q⁻ y T)

permitiendo la entrada de Ca^{2+} (Mas y Blanch, 2007). Un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducen la liberación de neurotransmisores desde las neuronas aferentes primarias (McCleskey y Gold, 1999). El principal neurotransmisor excitatorio que se libera es el glutamato, aunque también pueden liberarse otros péptidos como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la somatostatina entre otros. Estos neurotransmisores liberados interaccionan con sus respectivos receptores postsinápticos, situados en las neuronas de segundo orden, que transmiten la información nociceptiva (Ren et al., 1992; Ma y Woolf, 1995). Los axones de las neuronas de segundo orden que están participando en la transmisión de la señal dolorosa están ubicados en distintas laminas del asta dorsal de la médula espinal, las cuales cruzan y ascienden contralateralmente hasta alcanzar los centros superiores para formar un tracto ascendente, aunque también puede realizarse la transmisión nociceptiva de forma ipsilateral. A nivel supraespinal, se encuentran las neuronas de tercer orden que envían la información a las áreas somatosensoriales de la corteza cerebral, incluyendo el tallo cerebral y varias regiones del tálamo. Esas regiones que median los diferentes aspectos de la experiencia del dolor incluyen a la corteza somatosensorial, la corteza del cíngulo anterior y la corteza insular (Fields, 2004).

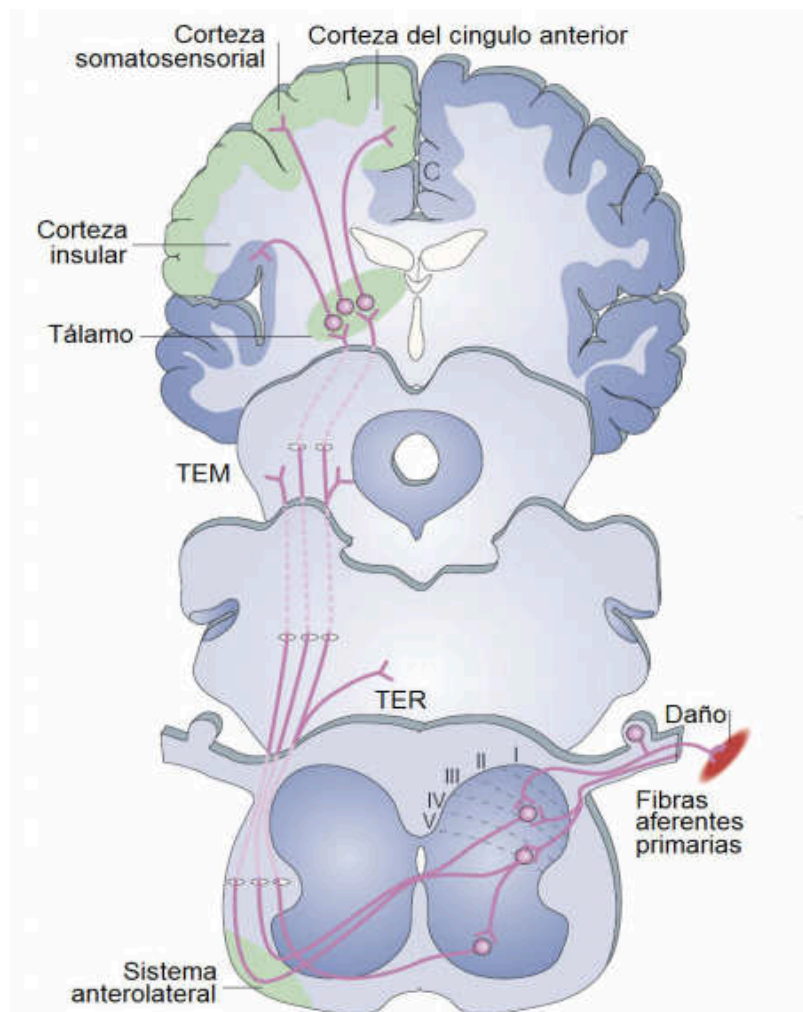


Figura 7. Vías ascendentes que participan en la transmisión nociceptiva. Una vez que la información nociceptiva llega a los axones de las neuronas de segundo orden, la información cruza y asciende de forma contralateral a la médula espinal, formando tractos ascendentes que la proyectan al tálamo, a la formación reticular y al mesencéfalo. Las neuronas del tálamo proyectan al córtex cerebral, región implicada en la percepción del dolor. Abreviaturas: tracto espino-talámico (TET), tracto espino-reticular (TER), tracto espino-mesencefálico (TEM), tracto hipotalámico (THT) y sustancia gris periacueductal (SGPA). Modificado de Fields, 2004.

2.8. Contribución facilitadora descendente del dolor mediada por la médula rostral ventromedial

El dolor puede modularse a través de un complejo sistema de neuronas que se originan en áreas límbicas del cerebro anterior, como la corteza del cíngulo anterior, el hipotálamo y el núcleo central de la amígdala que proyectan la información a la SGPA, la cual se cree es la principal vía de salida del sistema límbico (Fig. 8). La SGPA (controla la transmisión del dolor, indirectamente en el asta dorsal de la

médula espinal a través de la médula rostroventromedial (MRV), contribuyendo de esta forma a la modulación de la transmisión nociceptiva. Estas vías descendentes, envían mensajes a la médula espinal donde se modula la transmisión de las señales de daño al tejido, desde los centros supraespinales. Las vías descendentes tienen un papel fundamental en la integración de la señal nociceptiva a nivel espinal, ejerciendo una modulación inhibitoria o excitatoria (Millan, 2002; Fields, 2004). La principal vía de modulación descendente de la información nociceptiva es la formada por el sistema SGPA- MRV. En la MRV se han identificado tres tipos de neuronas que participan en la modulación de la información nociceptiva, las cuales incluyen a las células denominadas OFF, células ON y neutrales. Las dos primeras se activan o se inhiben de manera secuencial por impulsos que provienen de la SGPA y mandan fibras descendentes que terminan en el asta dorsal de la médula espinal (Mason y Fields, 1989). Las células ON proyectan la información desde la MRV al asta dorsal de la médula espinal y responden ante un estímulo nocivo, éstas ejercen una acción facilitadora (pronocicepción) y participan en el reflejo de retirada (Almeida et al., 2004). Por otra parte, las células OFF, también, proyectan información al asta dorsal de la médula espinal, pero de forma contraria a las células ON, estas ejercen una acción inhibitoria de la transmisión nociceptiva (antinocicepción) (Fields, 2004). Las células neutrales, aparentemente no están relacionadas con el comportamiento nociceptivo, ya que no se activan por estímulos dolorosos y por lo tanto en condiciones fisiológicas de dolor agudo. Se ha propuesto que estas células podrían ser reclutadas para convertirse en células ON y OFF durante el desarrollo de dolor crónico (Miki et al., 2002). Algunas de estas células son serotoninérgicas, y dada la relevancia de este neurotransmisor en la modulación nociceptiva, se ha postulado su posible implicación en la modulación del dolor (Winkler et al., 2006).

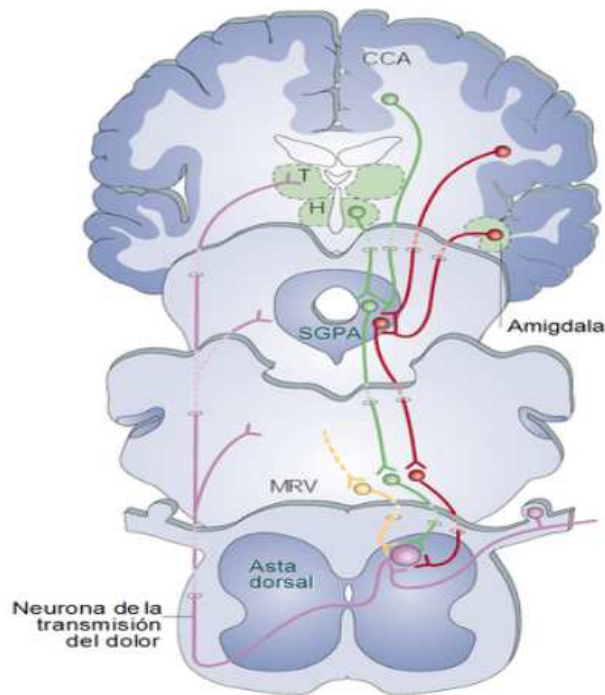


Figura 8. Vías descendentes que participan en la transmisión nociceptiva. Este sistema, envía la información a la MRV, SGPA y/o directamente al asta dorsal de la médula espinal, donde puede ejercer una modulación inhibitoria (verde) o excitatoria (rojo). Abreviaturas: corteza de cíngulo anterior (CCA), tálamo (T), hipotálamo (H), sustancia gris periacueductal (SGPA), y médula rostral ventromedial (MRV). Modificado de Fields, 2004.

El presente proyecto evaluará los posibles mecanismos de acción, que subyacen en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas.

2.9. Dolor Neuropático

El dolor neuropático es una afección crónica que surge después de la lesión o disfunción del sistema nervioso somatosensorial y puede resultar en alteraciones complejas en las funciones cerebrales, cognitivas y emocionales (Treede et al., 2008; Jensen et al., 2011; Finnerup et al., 2016). La causalidad del dolor Neuropático, comúnmente, incluye una diversa variedad de condiciones: 1) Lesiones en el sistema nervioso periférico (SNP) (trauma mecánico, productos químicos, productos neurotóxicos y dolor postquirúrgico) (Costigan et al., 2009) y/o lesiones en el sistema nervioso central (SNC) (esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, entre otros); 2) En respuesta a infecciones virales (neuralgia post-herpética); 3) Tumores; 4) Trastornos metabólicos (diabetes mellitus). El dolor

neuropático es un problema clínico importante que frecuentemente presenta refractariedad al tratamiento farmacológico, en parte debido, al hecho de que los mecanismos de acción son pobremente entendidos (Clark et al., 2013). Este dolor, es de tipo mal adaptativo, comprende la combinación de síntomas negativos o déficits sensoriales, tales como la pérdida parcial o total de la sensibilidad y síntomas positivos incluyendo disestesias y parestesias (Woolf y Mannion, 1999).

El dolor neuropático se caracteriza por un aumento de la sensibilidad de las neuronas en el SNP y el SNC (McMahon et al., 2006). La hipersensibilidad de las neuronas aferentes primarias produce sensibilización periférica generando hiperalgesia primaria, es decir (aumento de la sensibilidad en la región lesionada). El aumento de la hipersensibilidad neuronal en el SNC produce sensibilización central (Sandkühler, 2007), generando hiperalgesia secundaria.

El dolor neuropático es el resultado de la combinación de diversos procesos relacionados con la capacidad de reparación ineficiente y la adaptación a una lesión o enfermedad del sistema nervioso. Los mecanismos más relevantes en el desarrollo del dolor neuropático pueden dividirse al menos en tres grupos. El primero comprende de los cambios en las propiedades electrofisiológicas de la membrana celular de las neuronas aferentes primarias, que incluyen tanto cambios en la excitabilidad del nociceptor como cambios en la liberación de los neurotransmisores. Asimismo, en éste grupo se presentan cambios en la expresión génica en el cuerpo celular neuronal (Basbaum et al., 2009). El segundo grupo de mecanismos que subyacen al dolor neuropático está relacionado con los cambios en el procesamiento de impulsos en el asta dorsal de la médula espinal. Muchos investigadores destacan el papel especial de la intensificación de la transmisión glutamatérgica, la disfunción de los sistemas inhibidores descendentes en la médula espinal, la activación de la microglia y los cambios en la morfología neuronal, que consisten, en el reordenamiento de las uniones sinápticas (Wordliczek et al., 2011). El tercer grupo incluye trastornos en los niveles más altos del SNC, tales como el equilibrio modificado entre la actividad de los sistemas excitatorios ascendentes y los sistemas inhibitorios descendentes (Attal et al., 2011; Szczudlik et al., 2014).

2.9.1. Fisiopatología del dolor neuropático

Los pacientes con dolor neuropático refieren la presencia de dolor persistente o crónico, éste puede manifestarse mediante sensaciones dolorosas estímulo-dependiente (dolor espontáneo) (Zhuo, 2007) o estímulo-independiente (dolor lancinante, quemante, ardor o punzante), el cual puede depender de la actividad del sistema nervioso simpático (Woolf y Mannion, 1999). Se cree que la actividad espontánea de las fibras C son las responsables del dolor quemante y la sensibilización de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Del mismo modo, la actividad espontánea en las fibras A se encuentran directamente relacionadas con la presencia de parestesias, disestesias y dolor después de generarse el fenómeno de sensibilización central (Zhuo, 2007). Una de las principales características que acompañan el desarrollo del dolor neuropático es la presencia de dolor espontáneo denominado alodinia y puede producirse de dos maneras: 1) Por la acción de las fibras A β mielinizadas en un sistema nervioso central alterado, 2) Por una reducción en el umbral de terminales nociceptivas en la periferia (Woolf y Mannion, 1999). Otro mecanismo que acompaña el dolor neuropático es la hiperalgesia (Woolf y Mannion, 1999).

2.9.2. Tratamiento del dolor neuropático

El tratamiento del dolor neuropático sigue siendo un gran reto a pesar de los avances en los nuevos tratamientos farmacológicos, debido a que aún no existe un solo tratamiento que funcione para todas las condiciones y sus mecanismos subyacentes (Finnerup et al., 2005). Dada la creciente evidencia de tratamientos efectivos para el tratamiento del dolor neuropático, es importante que los productos utilizados, ya sean sintéticos, semisintéticos o naturales, sean eficaces y estén asociados con una disminución de los efectos adversos. Lo anterior conduce a la necesidad de proponer nuevas alternativas terapéuticas basadas en un algoritmo que aporte pruebas científicas para tratar las condiciones que subyacen en el dolor neuropático.

Las primeras recomendaciones basadas en la evidencia para el manejo farmacológico del dolor neuropático en forma de algoritmo fueron publicadas por

expertos de la IASP en el 2005 (Finnerup et al., 2005). Ellos analizaron 105 estudios controlados y evaluaron la eficacia del tratamiento usando medidas tales como el NNT (número necesario para tratar) que se traduce como el número de pacientes que necesitan ser tratados para alcanzar un alivio del dolor de al menos 50% en comparación con un control en un ensayo clínico. Para lograr un acercamiento hacia una terapia farmacológica exitosa es necesario generar un diagnóstico definido, aunque en la mayoría de los casos no es posible. Con la finalidad de proponer un tratamiento adecuado se deben de seguir los siguientes criterios: 1) Demostrar la presencia de dolor con una distribución neuro-anatómicamente plausible. 2) Contar con una historia clínica que sugiera una lesión o enfermedad relevante que afecte al sistema somatosensorial periférico o central. 3) Contar con la presencia de signos neurológicos negativos o positivos concordantes con la distribución del dolor en el examen neurológico o en las pruebas de confirmación objetivas (pruebas sensoriales cuantitativas, pruebas de laboratorio). 4) Demostrar una lesión o enfermedad relevante, por lo menos con una prueba confirmatoria (Szczudlik et al., 2014). Utilizando estos criterios, el dolor neuropático puede clasificarse como; definido (todos los criterios presentes), probable (1 y 2, más 3 o 4) o posible (1 y 2, sin pruebas confirmatorias de examen neurológico y pruebas de confirmación) (Treede et al., 2008; Szczudlik et al., 2014).

Basándose en los criterios anteriormente descritos y en las pruebas clínicas que deben realizarse para el diagnóstico del dolor neuropático, el tratamiento primario debe realizarse de manera inmediata, enfocándose en los síntomas sensoriales específicos (Zin et al., 2008; Attal et al., 2010). El grupo de interés especial sobre el dolor neuropático (NeuPSIG) de la IASP propone las siguientes líneas de tratamiento para el manejo del dolor neuropático.

Como *primera línea de tratamiento* se encuentran los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina NNT= 1.6), incluyendo a los inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina como la duloxetina (NNT= 6.4) y la velafaxina (NNT= 6.4), respectivamente. Asimismo, los antiepilépticos actúan uniéndose a las subunidades proteicas α -2- δ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, por ejemplo la

gabapentina (NNT=5.04) y la pregabalina (NNT= 5.63) (Hempenstall et al., 2005; Finnerup et al., 2015). La eficacia de los fármacos utilizados para el tratamiento del dolor neuropático es a menudo dependiente de la dosis. Se debe de tener especial cuidado en las dosis iniciales recomendadas, su valoración para el aumento o disminución de la dosis, las dosis máximas que se pueden emplear, y las precauciones para evitar la aparición de reacciones adversas (Szcudlik et al., 2014). Como *segunda línea de tratamiento* se proponen a los opioides débiles como el tramadol (NNT= 4.76) (Hempenstall et al., 2005), los parches de capsaicina al 8% (NNT= 4.22) (Hayman y Kam, 2008) y la lidocaína (NNT= 4.4) (Baron et al., 2009; Hans et al., 2009; Attal, 2012; Chaparro et al., 2012). Los opioides débiles se utilizan menos frecuentemente, son utilizados en pacientes con dolor neuropático moderado o en pacientes de edad avanzada que presentan mayor riesgo de desarrollar reacciones adversas a los opioides fuertes (Mercadante et al., 2012; Szcudlik et al., 2014). Por otra parte, la lidocaína tópica actúa principalmente en los canales de sodio controlados por voltaje en el nervio dañado, que inician repetidas excitaciones ectópicas. Por último, los parches de capsaicina al 8% abren los canales iónicos TRPV1, lo que a su vez, provoca la desfuncionalización (atrofia) de las terminaciones nerviosas primarias tras el daño mitocondrial reversible (Szcudlik et al., 2014). Como *tercera línea de tratamiento*, encontramos a los opioides fuertes y a la toxina botulínica A (NNT= 1.9) (Finnerup et al., 2015). Los opioides fuertes recomendados para el tratamiento de dolor neuropático de moderado a severo incluyen: morfina, oxicodona (NNT= 4.3), fentanilo, buprenorfina y metadona (Finnerup et al., 2015). Típicamente, un opioide se utiliza sólo o en combinación con fármacos de la primera línea de tratamiento (Attal, 2013). Durante el tratamiento con opiáceos, los posibles efectos adversos (por ejemplo, constipación) deben tenerse en cuenta y evitarse. Además, el consumo de estos medicamentos debe ser monitoreado para prevenir la dependencia, cuyo riesgo es insignificante si se cumple un adecuado régimen de tratamiento (Szcudlik et al., 2014). La elección final del tratamiento farmacológico debe basarse en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, los efectos inmediatos y de largo plazo, el costo del tratamiento propuesto, la presencia de comorbilidad y los medicamentos

concomitantes. Sobre la base de estos elementos, el médico debe establecer un plan de tratamiento personalizado.

El dolor neuropático, lamentablemente, es resistente al tratamiento farmacológico y su alivio por lo general es parcial, esto podría ser explicado en parte por un diagnóstico inexacto en la práctica clínica y por el uso de tratamientos poco eficaces para este padecimiento (Finnerup et al., 2015). Para hacer frente a este problema, es necesario proponer nuevas estrategias terapéuticas con un enfoque alternativo y/o complementario para el tratamiento del dolor neuropático. Por lo que resulta relevante la búsqueda, la caracterización y la evaluación de nuevas moléculas de tipo natural y sintéticos que sean eficaces para este tipo de dolor. La búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de origen natural ha conducido a la evaluación de especies vegetales medicinales con fines terapéuticos (Pal et al., 2013).

2.10. Plantas medicinales

Desde hace muchos años, el empleo de plantas medicinales o extractos ha sido de gran interés por muchas culturas alrededor del mundo, debido en parte, a su fácil acceso y a los efectos benéficos que producen en el cuerpo humano. El libro chino sobre las raíces y las gramíneas "Pen T'Sao", escrito por el emperador Shen Nung Circa en el año 2,500 a.C. relata el empleo de 365 plantas medicinales (partes secas), muchos de los cuales se utilizan hoy en día, por ejemplo la Rhei rhisoma, el alcanfor, el Theae folium, el Podophyllum, la gran genciana amarilla, el ginseng, la hierba jimson, la corteza de canela y la efedra, entre otros (Houghton, 2007; Arora et al., 2013). Durante mucho tiempo, las plantas medicinales y sus preparados fueron el principal recurso disponible para el tratamiento de diversas enfermedades (Huie, 2002).

Se estima que en México existen 23,400 plantas vasculares, de las cuales 3,000 tienen efectos medicinales (Alonso-Castro et al., 2016). Las plantas medicinales son todas aquellas especies de origen vegetal que contienen en alguno de sus órganos, principios activos o metabolitos activos, los cuales, al ser administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos o paliativos en las enfermedades que sufren los humanos o los animales (Silva and Fernandes Júnior, 2010). A diferencia de

otras plantas, las plantas medicinales acumulan y sintetizan sustancias activas de gran importancia fisiológica, entre las que destacan: alcaloides, terpenoides, saponinas, compuestos fenólicos, glucósidos, triterpenos y polisacáridos que son de alto interés terapéutico (Lovkova et al., 1989).

Las plantas medicinales presentan diversas actividades biológicas, por ejemplo: anti-microbianas, estimulantes, cardiotónicas, analgésicas, diuréticas, anti-parasitarias, antieméticos, hipotensores, antiulcerosas, anti-colinérgicas, anti-cancerígenas entre otras (Lovkova et al., 2001).

2.11. Jengibre (*Zingiber officinale*)

El jengibre (*Zingiber officinale*) pertenece a la familia *Zingiberaceae*, es originario del sureste de Asia y se ha cultivado durante miles de años para agregar sabor a los alimentos. Además, el jengibre es utilizado en gran medida como un remedio herbolario en la medicina tradicional de diversas culturas al rededor del mundo (Park y Pezzuto, 2002). La planta de jengibre tiene una raíz en forma de rizoma, los tallos son erectos, oblicuos y puede crecer entre 30 y 60 cm de altura. El rizoma de jengibre se consume típicamente como una pasta fresca, polvo seco, caramelo (jengibre cristalizado) o para condimentar el té. En muchos países, especialmente en India y China, el jengibre fresco se utiliza para preparar platos de verduras, carne y como agente aromatizante en bebidas y muchas otras preparaciones alimenticias (Shukla y Singh, 2007). Asimismo, el tallo o rizoma subterráneo de esta planta se utiliza en la medicina tradicional de Asia e India (Altman y Marcussen, 2001). Además, el jengibre es empleado en la medicina tradicional China para dolores de cabeza, náuseas, resfriados (Grant y Lutz, 2000), artritis, condiciones reumatológicas, malestar muscular (Bordia et al., 1997; Langner et al., 1998), aterosclerosis, migrañas, colesterol alto, úlceras, depresión, propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Liang, 1992).

2.11.1. Principales entidades químicas del jengibre

Las principales entidades químicas que se pueden encontrar en el jengibre se pueden dividir en compuestos volátiles y no volátiles (Fig. 9). Los componentes volátiles del aceite de jengibre consisten principalmente en hidrocarburos sesquiterpénicos, predominantemente zingibereno (35%), curcuteó (18%) y farneseno (10%), con cantidades menores de bisaboleno y β -sesquifelandreno. Un porcentaje menor de al menos 40 hidrocarburos monoterpénicos diferentes están presentes en el jengibre, por ejemplo se encuentra el 1,8-cineol, el linalol, el borneol, el neral y el geraniol como los compuestos más abundantes (Govindarajan, 1982). Muchos de estos constituyentes volátiles del aceite contribuyen al aroma y al gusto distintivo del jengibre (Shukla y Singh, 2007). Por otra parte, los compuestos no volátiles consisten, principalmente, en gingeroles y shogaoles, siendo los responsables de generar una sensación picante en la boca (Shukla y Singh, 2007). Los gingeroles se presentan como una serie homóloga, en donde la única diferencia química se presenta en la longitud de sus cadenas alquílicas no ramificadas, estos fueron identificados como los principales componentes activos en el rizoma fresco del jengibre (Govindarajan, 1982). Por otra parte, los shogaoles se presentan como la forma deshidratada de los gingeroles, son los constituyentes predominantes en el jengibre seco (Connell et al., 1969).

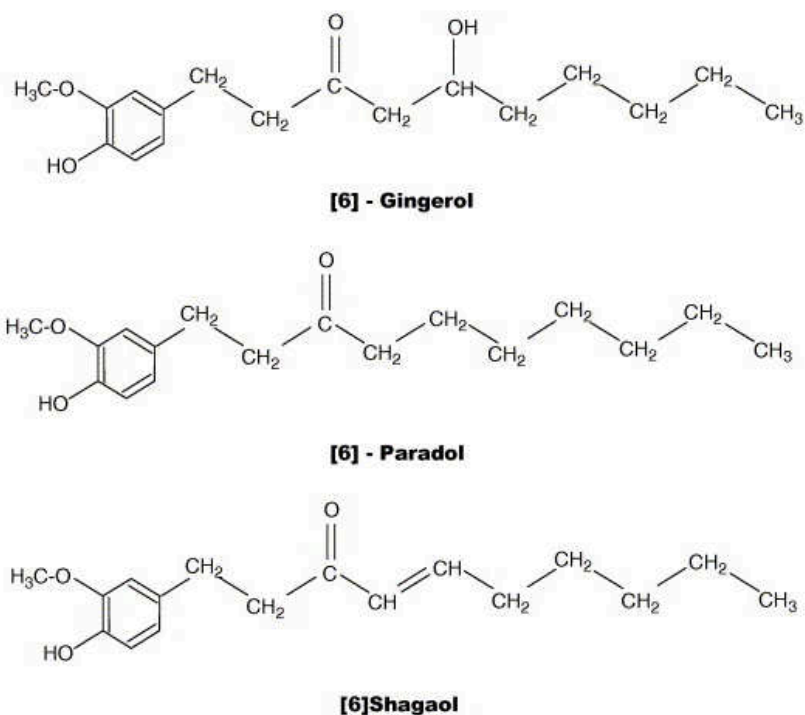


Figura 9. Principales entidades químicas con actividad biológica presentes en el jengibre. Esta especie contiene componentes biológicamente activos, mayoritariamente se presentan como compuestos no volátiles, como los gingeroles, los shogaoles, los paradoles y la zingerona. Modificado de Shukla y Singh, 2007.

2.11.2. [6]-gingerol

Se sabe que el [6]-gingerol es un análogo estructural de la capsaicina (Fig.10), debido a que presentan grupos funcionales similares unidos a su grupo fenólico, además de presentar similitudes en su larga cadena de acilo insaturado (Viswanadhan et al., 2007). El [6]-gingerol (5S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona es el componente principal del rizoma del jengibre y es el responsable de la sensación de picor que se percibe al momento de consumirse, mientras que, el [8]-gingerol, el [10]-gingerol y el [6]-shogaol se encuentran en cantidades menores. Estudios anteriores, demuestran que el [6]-gingerol posee una gran variedad de efectos farmacológicos, entre los que destacan, efectos anti-piréticos, cardiotónicos, inhibición de la actividad motora espontánea, biosíntesis de prostaglandinas, anti-nociceptivas y anti-inflamatorias (Aeschbach et al., 1994; Young et al., 2005; Gauthier et al., 2013). En la actualidad se sabe que el [6]-gingerol

presenta una fuerte actividad anti-oxidante, con la subsecuente eliminación de los radicales superóxido e hidroxilo (Dugasani et al., 2010; Sagar et al., 2011).

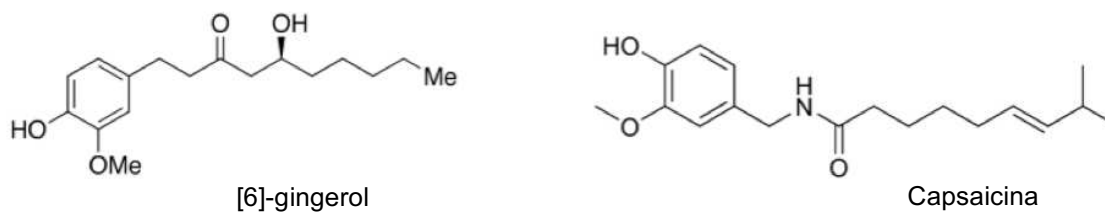


Figura 10. Similitudes estructurales entre el [6]-gingerol y la capsaicina.

2.11.3. Actividad anti-inflamatoria del [6]-gingerol

Estudios anteriores demuestran que la administración de [6]-gingerol (25 mg/kg y 50 mg/kg) disminuye las conductas nociceptivas (fase II) generadas por la administración de formalina (Young et al., 2005). Además, la administración de [6]-gingerol (50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg) reduce el volumen del edema generado por la administración de carragenina al 1% (Young et al., 2005). Otro estudio muestra que el [6]-gingerol disminuye la producción de la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) mediante la atenuación de la expresión del gen iNOS mediada por NF- κ B (Aktan et al., 2006). En conjunto, estos datos sugieren que el [6]-gingerol es capaz de reducir las conductas nociceptivas en distintos modelos de dolor inflamatorio.

2.11.4. El [6]-gingerol y dolor neuropático

El [6]-gingerol es un análogo estructural de la capsaicina, debido a que presenta grupos funcionales similares unidos a su grupo fenólico, además de presentar similitudes en su larga cadena de acilo insaturado (Viswanadhan et al., 2007). Se sabe que los canales TRPV1, juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. Este canal es activado por diversos agonistas endógenos como la capsaicina, ingrediente activo que se encuentra en los chiles rojos (Caterina y Julius, 2001). Estudios anteriores, proponen que la administración

i.t del [6]-gingerol reduce las conductas nociceptivas generadas por la constricción crónica del nervio ciático en ratas (Gauthier et al., 2013). Apoyándose de la hipótesis de que los vaniloides naturales pueden ayudar al alivio del dolor neuropático, debido a que los canales vaniloides de potencial transitorio (TRPV1) se encuentran expresados a nivel periférico y central (Guénette et al., 2007; Lionnet et al., 2010).

2.12. Especies reactivas de oxígeno

Un radical libre es una molécula con un electrón no apareado en su órbita más externa (Walia et al., 2003), por lo tanto, aplicado a un sistema biológico, un radical libre implica que el oxígeno (O_2) se encuentra en su forma más reactiva denominándose especies reactivas de oxígeno (EROS), estas son moléculas químicamente reactivas que contienen O_2 . Los ejemplos incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), óxido nítrico (NO) y oxígeno molecular (O_2). Las EROS son moléculas pequeñas y altamente reactivas que pueden oxidar a las proteínas, los lípidos y al ácido desoxirribonucleico (ADN). Además, las EROS participan en la generación de otras especies de oxidantes como los peróxidos y superóxidos etc. Las EROS se encuentran en el organismo en concentraciones del orden nanomolar o micromolar, éstas son necesarias para la homeostasis en el organismo, pero en exceso producen efectos perjudiciales (Grover y Samson, 2016). Las EROS se encuentran en concentraciones normales, participan en distintas vías de señalización, por ejemplo: 1) La degradación de proteínas y organelos celulares a través del lisosoma (Scherz-Shouval y Elazar, 2011). 2) Funcionan como mediadores de la apoptosis en infecciones virales (Li et al., 2016). Hay muchos tipos diferentes de radicales libres que participan en la homeostasis en el organismo, pero la producción excesiva de las EROS en una célula puede conducir a la oxidación de macromoléculas y se ha confirmado que es responsable de la generación de mutaciones, envejecimiento y muerte celular (Reshi et al., 2014). El efecto que estas pueden causar en el organismo y sobre las funciones depende de la cantidad de las EROS y la cantidad de tiempo que la célula ha sido expuesta (Li et al., 2016).

2.12.1. Especies reactivas de oxígeno y dolor

Las EROS están implicadas en numerosas patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y diversas condiciones de dolor, incluyendo al dolor neuropático e inflamatorio (Olanow, 1992; Coyle and Puttfarcken, 1993; Balazs y Leon, 1994; Gerlach et al., 1994; Jenner, 1994; Lewén et al., 2000). La principal fuente de las EROS en el sistema nervioso es la cadena de transporte de electrones que se lleva a cabo en las membranas internas de las mitocondrias produciendo ATP y generando fugas de electrones durante su transporte, esto genera la producción del anión O^{2-} , que posteriormente se transforma en hidroxilo. En presencia de metales de transición tales como hierro libre, la sobreproducción de las EROS resulta en la peroxidación de lípidos, proteínas y oxidación de ácidos nucleicos (Antolovich et al., 2002). Estudios recientes sugieren que las EROS están implicadas en la generación del dolor, incluyendo al dolor neuropático e inflamatorio. En estas condiciones, los niveles de radicales libres a nivel intracelular aumentan y la eliminación de estos es importante para restablecer condiciones fisiológicas normales. Estudios recientes sugieren que el empleo de compuestos de origen natural con alto potencial anti-oxidante es capaz de reducir las conductas nociceptivas en diversos modelos de dolor. Por ejemplo, la administración de manguferina reduce la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6, en un modelo de dolor neuropático (de Los Monteros-Zuñiga et al., 2016). Por otra parte, la administración de resveratrol y curcumina reducen la alodinia mecánica inducida por la constricción crónica del nervio ciático (Yu et al., 2014; Tao et al., 2016). En conjunto estos estudios sugieren que los anti-oxidantes de origen vegetal juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático.

2.12.2. Estrés oxidativo y dolor neuropático

El estrés oxidativo se considera un factor predominante en las enfermedades neurodegenerativas agudas, crónicas y en las lesiones cerebrales traumáticas (Jenner, 1994; Contestabile, 2001). Bajo condiciones fisiológicas normales, la producción de las EROS se encuentra en equilibrio, esto se debe a la activación de

diversos mecanismos anti-oxidantes. En contraste, en condiciones anormales, los niveles de las EROS se elevan hasta el punto que pueden poner en peligro la integridad funcional y estructural de las células, lo que conduce a un daño irreversible (Jenner, 1994; Contestabile, 2001). Existen diversos sistemas de defensa contra las agresiones generadas por la generación de las EROS que son cruciales en las respuestas inflamatorias donde participan en procesos fisiológicos como la cascada de ácido araquidónico y la fagocitosis. Además, se sabe que la lesión de un nervio periférico aumenta la producción de las EROS en la médula espinal en condiciones de dolor persistente. Estos datos sugieren que las EROS presentes en la médula espinal, están implicados en la neuropatía y el dolor inflamatorio (Kim et al., 2004). Esto se debe a que un aumento de la producción de O_2 en las mitocondrias media la sensibilización de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal y por lo tanto, en el dolor persistente (Lee et al., 2007).

2.12.3. Actividad anti-oxidante del [6]-gingerol

El estrés oxidativo generado por la presencia de las EROS está ligada a la fisiopatología de las diversas enfermedades neurodegenerativas que afectan al SNC y al SNP (Jenner, 1994; Lewén et al., 2000).

Los anti-oxidantes se pueden encontrar de diversas formas; los anti-oxidantes enzimáticos se encuentran de manera natural en el organismo (endógenos) como la glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa. Los anti-oxidantes no enzimáticos (exógenos) como las vitaminas, polifenoles, flavonoides y minerales se encuentran presentes en los alimentos. Sin embargo, un exceso de las EROS provoca un desequilibrio homeostático entre la generación de las EROS y la capacidad anti-oxidante para eliminarlos, dando lugar a un ataque electrofílico a proteínas, ADN y lípidos, dando como resultado daño celular y tisular. Estudios anteriores demuestran que el [6]-gingerol participa en la eliminación de las EROS en fibroblastos derivados de pólipos nasales inducidos por TGF- β 1 y células de melanoma murino B16F10, respectivamente (Huang et al., 2011; Park et al., 2012). Además, el [6]-gingerol es capaz de inhibir de manera dosis-dependiente la producción de NO e iNOS en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (Park

et al., 2012). Sugiriendo que el efecto protector del [6]-gingerol frente a las reacciones de oxidación y nitración están mediadas por la generación de peroxinitritos (Ippoushi et al., 2003; Dugasani et al., 2010).

2.13. Vías clásicas de modulación del dolor de los agentes anti-oxidantes

2.13.1.1 Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es un radical libre altamente permeable a través de las membranas celulares y es sintetizado por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasás (NOS) a partir de la L-arginina, oxígeno y diferentes cofactores dependiendo del tipo de células donde se lleve a cabo la síntesis (Hobbs and Ignarro, 1996; Marletta et al., 1998) (Fig. 11). El NO se utiliza, ampliamente, como una molécula de señalización en las células de todo el cuerpo. Asimismo, el NO es un importante regulador de diversos procesos biológicos, incluyendo el tono vascular, la permeabilidad, la adhesión plaquetaria, la neurotransmisión y la respiración mitocondrial. Además, el NO puede inhibir la adhesión de los leucocitos y participar en la defensa anti-microbiana, pero también puede tener efectos deletéreos incluyendo la inhibición de la función enzimática, la promoción del daño al ADN y la activación de procesos inflamatorios (Freire et al., 2009; Hollenberg y Cinel, 2009). El NO presenta efectos sobre complejos metálicos y radicales alquilo, incluyendo a la guanilato ciclasa (GC), a los citocromos y radicales lipídicos (Freire et al., 2009). Además, éste actúa como segundo mensajero mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCS) y participa en las vías de transducción de señales que implican al guanosin monofosfato cíclico (GMPc) (Hollenberg y Cinel, 2009). Actualmente, se han identificado tres miembros de la familia de enzimas del NOS en los mamíferos: la NOS neuronal (nNOS), la NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible (iNOS) presentan distintas características funcionales y estructurales (Stuehr et al., 2004). Tanto la actividad de la nNOS (también conocido como Tipo I) como de la eNOS (Tipo III) está modulada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina, ambas isoformas se expresan de forma constitutiva en el cerebro (Alderton et al., 2001).

Por otra parte, la iNOS (Tipo II) se expresa en respuesta a la presencia de mediadores inflamatorios y proinflamatorios que actúan sobre macrófagos, astrocitos y microglia; su función es independiente de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Stuehr y Griffith, 1992). A continuación, se mencionan las características más importantes de las distintas isoformas de la NOS:

- La nNOS se expresa de forma constitutiva en neuronas específicas del cerebro, su actividad enzimática está regulada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. La nNOS se expresa en el tejido cerebral, médula espinal, en ganglios simpáticos y glándulas suprarrenales, en nociceptores y en células epiteliales de diversos órganos (Förstermann et al., 1994). La nNOS juega un papel importante en la regulación a largo plazo de la transmisión sináptica (potenciación a largo plazo) en el SNC (O'Dell et al., 1991; Schuman y Madison, 1991).
- La eNOS se expresa principalmente en células endoteliales, aunque también se ha detectado en miocitos cardíacos, plaquetas y en ciertas neuronas del cerebro. Al igual que nNOS, la eNOS es activada por la acción de calmodulina activada por Ca^{2+} . La actividad de la eNOS aumenta de forma considerable cuando el Ca^{2+} intracelular aumenta (Förstermann y Li, 2011).
- La iNOS no suele expresarse en las células, pero su expresión puede ser inducida por la presencia de lipopolisacáridos bacterianos, citocinas y otros agentes. Una vez expresada, la iNOS está constantemente activa y no es regulada por Ca^{2+} (Förstermann y Li, 2011).

El NO es una molécula muy estable en concentraciones fisiológicas relativamente bajas (Garthwaite, 2008) ya que ésta se produce estequiométricamente después de la conversión de L-arginina en citrulina en un proceso que requiere tanto nicotinamida adenina fosfato dinucleótido en su forma reducida (NADPH^+) como de oxígeno molecular (O_2) como co-sustratos, entre otros factores (Moncada et al., 1989; Marletta et al., 1998). El NO produce reacciones directas con el organismo, se produce entre concentraciones bajas de NO y proteínas que contienen hierro, como la guanilato GC, que juega un papel fundamental en la mayoría de las acciones fisiológicas que ejerce el NO en el organismo (Wink et al., 2000). Las

reacciones indirectas ocurren cuando aumentan las concentraciones de NO generando especies reactivas de óxido de nitrógeno (ERN), un ejemplo de esto es la generación del radical oxidante peroxinitrito que puede causar potenciales efectos nocivos en las células (Wink et al., 2000).

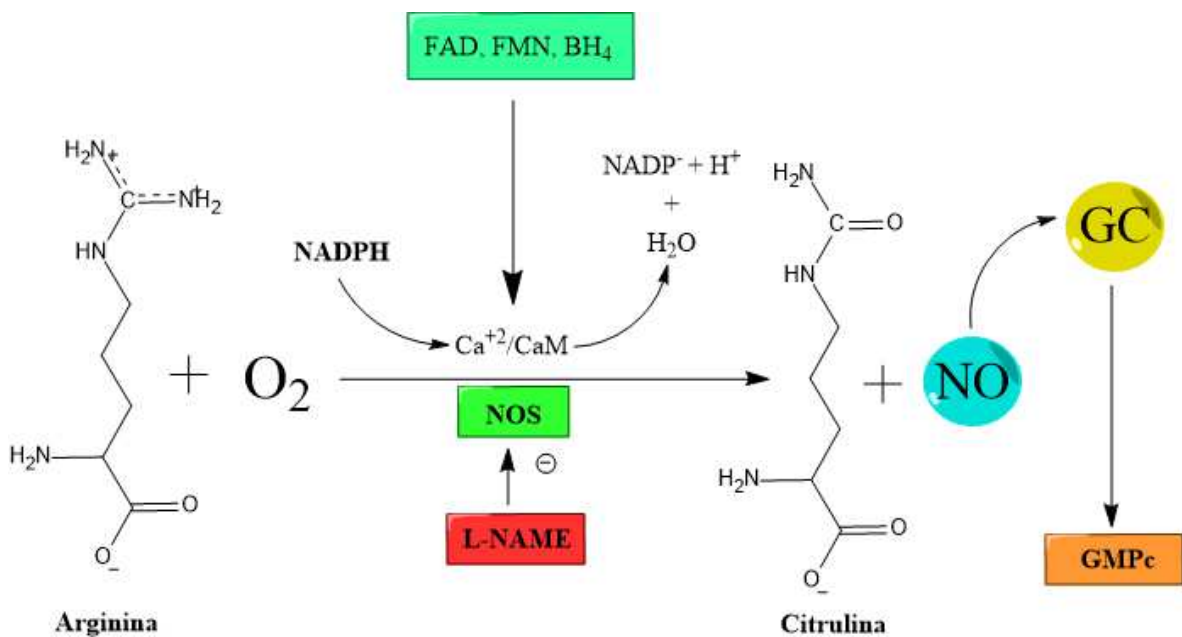


Figura 11. Síntesis del óxido nítrico (NO). Representación esquemática que muestra la vía sintética responsable de la producción de NO a partir de arginina y O_2 catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Los cofactores que participan son la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato en su forma reducida ($NADPH^+$), tetrahidrobiopterina (BH), flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD). La síntesis de NO puede ser farmacológicamente abolida por la acción del éster metílico de N-omega-nitro-L-arginina (L-NAME), un inhibidor tanto de la nNOS como de la eNOS. Abreviaturas: Calcio/calmodulina (Ca^{2+}/CaM), guanosin monofosfato cíclico (GMPc), guanilato ciclasa (GC). Modificado de Freire et al., 2009.

El NO desempeña un papel complejo y diverso en la modulación del procesamiento nociceptivo. El NO es una molécula de señalización que desempeña un papel importante en los estados de dolor agudo (Toriyabe et al., 2004) y crónico (Chen et al., 2010) tanto a nivel central (Freire et al., 2009) como periférico (Miyamoto et al., 2009). A nivel central el NO se concentra en el asta dorsal de la médula espinal donde se deriva de diversas fuentes (incluidas las células gliales). La nNOS es la forma predominante de la NOS en el asta dorsal, en algunas poblaciones

neuronales y vasos sanguíneos (Freire et al., 2009; Miclescu y Gordh, 2009). En cuanto a la iNOS existe un cierto desacuerdo si esta isoforma también participa en la transmisión central del dolor o si se expresa sólo periféricamente durante los procesos inflamatorios o dolor neuropático (Freire et al., 2009). La producción de NO por la nNOS en el SNC requiere de la afluencia de Ca^{2+} a través de la activación de los receptores NMDA (Oess et al., 2006; Garthwaite, 2008). El aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} desencadena una cascada de eventos que incluyen la activación de nNOS, seguido por el aumento de la producción de NO (Miclescu y Gordh, 2009). El receptor intracelular para el NO es la guanilato ciclasa soluble (GCS), su activación por NO promueve la conversión de ATP en GMPc. La NO-GMPc es una vía de señalización que se encuentra presente en las neuronas de la médula espinal, implicada en la plasticidad sináptica como en la sensibilización central (Meller et al., 1992). La estimulación del GMPc es una de las numerosas acciones biológicas directas de el NO, la actividad de esta molécula de señalización intracelular modula la actividad de muchos objetivos celulares, incluyendo GMPc-dependiente de proteína quinasa (PKG), canales iónicos y fosfodiesterasas (Miclescu y Gordh, 2009).

2.13.1.2. Efecto dual del NO

El NO posee un doble papel en la regulación de los procesos nociceptivos, es decir, puede generar efectos pro-nociceptivos o producir efectos anti-nociceptivos (Cury et al., 2011). Este efecto se genera tanto a nivel central como periférico. Estudios anteriores demuestran que la administración intratecal de 3-morfolinisidonimina (SIN-1), un donador de NO, produce un doble efecto, dependiente, de la dosis en un modelo de dolor neuropático en ratas. Las dosis bajas (0.1-2.0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) disminuyen las conductas nociceptivas (anti-nocicepción), mientras que las dosis altas (10 y 20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) aumentan las conductas nociceptivas (pro-nocicepción) inducidas por la constricción crónica del nervio ciático (Cury et al., 2011). El inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ) (4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) bloquea el efecto anti-nociceptivo inducido por SIN-1. Además, se observó la reducción del efecto pro-nociceptivo inducido por el SIN-1 (dosis altas) en ratas neuropáticas, lo que indica que ambos efectos (anti-

nocicepción y pro-nocicepción) se producen a través de un mecanismo espinal que implica la activación de GC (Cury et al., 2011). Asimismo, la administración intraplantar de dosis bajas (0,1-1 µg/pata) de L-arginina aumenta las respuestas nociceptivas en la fase II de la prueba de formalina en ratones, mientras que la administración de una dosis alta (10 µg/pata) suprime este efecto nociceptivo (Cury et al., 2011). Ambas acciones fueron revertidas mediante la administración de L-NAME, lo que demuestra que tanto los efectos pro-nociceptivos y anti-nociceptivos de L-arginina están mediados por la formación periférica de NO (Kawabata et al., 1994). En conjunto, estos datos sugieren que el efecto dual del NO no solo depende de la dosis de los donadores de NO, sino también del modelo experimental utilizado (Cury et al., 2011). Asimismo, el efecto anti-nociceptivo y pro-nociceptivo del NO puede ser el resultado de distintas vías de señalización. Además, el efecto del NO depende del tipo, la fase del proceso nociceptivo, los estímulos utilizados (térmicos, o mecánicos) y los donadores o inhibidores del NO (dependiendo de la dosis empleada) podrían generar efectos anti-nociceptivos o pro-nociceptivos (Anbar y Gratt, 1997; Granados-Soto et al., 1997; Sousa y Prado, 2001; Rocha et al., 2002; Cury et al., 2011).

2.13.2. Canales de potasio

Los canales de potasio juegan un papel importante en la conformación de la excitabilidad y los patrones de disparo de las células (Hille, 2001). Los canales de potasio se dividen en cuatro clases principales basadas en su estructura: dos, cuatro, seis y siete dependiendo de los dominios transmembranales (Choe, 2002; Kuang et al., 2015). Existe una gran diversidad de canales de potasio entre los cuales tenemos a los que son activados por Ca^{2+} , los que son dependientes de voltaje, los de poro doble y los canales rectificadores. Debido a que el K^+ posee un potencial de equilibrio negativo en la membrana celular, la apertura de estos canales estabiliza el potencial de membrana hiperpolarizando a la célula hasta llegar a un punto cercano al potencial de equilibrio. Por lo tanto, los canales de potasio juegan un papel importante en el establecimiento del potencial de membrana en reposo y la duración de los potenciales de acción. Estos canales también desempeñan un

papel en la frecuencia de disparo repetitiva, por lo tanto, suprimen la excitabilidad celular (Miller, 2000). Los canales de potasio (Kir) de rectificación interna, conducen la corriente rectificadora hacia adentro de la célula, hiperpolarizando así la membrana (Hibino et al., 2010). Los canales Kir son cruciales para estabilizar el potencial de membrana en reposo y regular la excitabilidad en muchos tejidos (Miller, 2000). Este grupo consta de siete subfamilias: Kir1 a Kir7. Todos los miembros de la familia de canales Kir tienen la misma estructura básica, la cual consiste en terminales intracelulares de amino (H_2N) y carboxilo ($COOH$) y dos segmentos de extensión de membrana (M1 y M2) (Hibino et al., 2010).

Los canales de potasio sensibles a adenosin trifostato (KATP) se encuentran presentes en las neuronas periféricas y centrales, así como en diversos tejidos incluyendo, células pancreáticas, el corazón, el musculo esquelético y el musculo liso vascular, en donde juegan un papel importante en la regulación de la excitabilidad de la membrana celular y la liberación de neurotransmisores (Wu et al., 2011). Los canales KATP están compuestos de 8 subunidades proteicas. Cuatro de estos canales son miembros de la familia Kir rectificadores (Kir 6.1 o Kir 6.2), mientras que los otros 4 pertenecen a la familia de los receptores a sulfonilurea (SUR_1 , SUR_{2A} , SUR_{2B} y SUR_{2C}) (Inagaki et al., 1995, 1996). Estudios recientes han demostrado que las subunidades de los canales KATP, SUR_1 , SUR_2 y Kir 6.2 se expresan en GRD y en células gliales satelitales después de la axotomía del nervio periférico, lo que sugiere que la pérdida de las corrientes en las que participan los KATP pueden contribuir a la generación y al mantenimiento del dolor neuropático, debido a un aumento en la excitabilidad de la membrana y al aumento de la liberación de neurotransmisores (Kawano et al., 2009a, 2009b).

2.13.3. Vía del óxido nítrico-GMP cíclico-Canales de potasio sensibles a ATP y el dolor

Para que se genere un efecto anti-nociceptivo inducido por el NO es necesario que se genere GMPc. Varios autores sugieren que existe una estrecha relación entre la activación de la vía NO-GMPc y la apertura de canales K^+ sensibles a ATP. Esta sugerencia se basa en datos experimentales que demuestran que los fármacos

donadores de NO están mediados por la apertura específica de KATP (Soares et al., 2000; Du et al., 2011). Además, los agonistas de los KATP, como el nitroprusiato de sodio y dibutilil-GMPc, potencian el efecto anti-nociceptivo (Alves et al., 2004). Por otra parte, estudios recientes demuestran que varios fármacos o productos naturales estimulan la vía de L-arginina-NO-GMPc, con la subsecuente activación de los KATP (Abacioğlu et al., 2001; Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Déciga-Campos y López-Muñoz, 2004; de Los Monteros-Zuñiga et al., 2016). En conjunto, los datos anteriores indican que el NO es capaz de generar anti-nocicepción mediante la activación de la vía del NO-GMPc generando la apertura de canales de K^+ sensibles a ATP con él consiguiendo aumento de las corrientes de K^+ , restableciendo el umbral del nociceptor activado. La acción analgésica de el NO depende de la formación GMPc, la activación de PKG, y la consecuente apertura de canales de K^+ (Cury et al., 2011).

2.13.4 Vía opioidérgica

Los opiáceos se han utilizado durante miles de años para el tratamiento del dolor, y en el siglo pasado se han hecho numerosos avances en el desarrollo y la investigación de nuevos opioides y sus derivados. El sistema opioide es crítico en la modulación del dolor y la anti-nocicepción (Al-Hasani y Bruchas, 2011). El sistema opioide está conformado por una familia de péptidos opioides endógenos que se encuentran agrupados en tres sub-familias: las endorfinas, las encefalinas y las dinorfinas (Gutstein et al., 2007). Recientemente, se han identificado otros opioides endógenos que participan en la modulación del dolor, por ejemplo la nociceptina y las endomorfina, cuya importancia en el tratamiento del dolor aún sigue siendo estudiada (Bodnar, 2007). Una vez que estos péptidos son sintetizados se almacenan en vesículas neuronales y son liberados en el espacio intrasináptico en respuesta a un estímulo nervioso (Goicoechea García et al., 2009). Los péptidos opioides y sus receptores se encuentran expresados a lo largo de todo el circuito neural nociceptivo, así como en las regiones críticas del sistema nervioso central, incluyendo las zonas involucradas con el sistema de recompensa y las estructuras cerebrales relacionadas con la emoción (Al-Hasani y Bruchas, 2011). Los opioides

clásicos trabajan uniéndose a receptores opioides que se encuentran, principalmente, en el SNC y en el tracto gastrointestinal. Existen cuatro receptores opioides principales: Mu (μ), Delta (δ), Kappa (κ) (Chen et al., 1993; Nicholson, 2003) y el receptor a nociceptina NOP (Mollereau y Mouledous, 2000), con sus respectivos subtipos (μ 1, μ 2, κ 1, κ 2, κ 3, δ 1, δ 2 y orl 1, respectivamente) (Gutstein et al., 2007). Los receptores transmembranales de tipo opioide se encuentran acoplados a las proteínas G que son activados en condiciones naturales por opioides endógenos (Law et al., 2000). Las diferentes clases de receptores opioides se encuentran asociadas con distintas respuestas neurológicas, con las que participan en la modulación del dolor, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (Lomber et al., 2008).

2.13.4.1. Señalización de los receptores opioides

Se ha demostrado que los receptores opioides se encuentran expresados en las vías descendentes que modulan la transmisión nociceptiva, incluyendo a la médula del locus coeruleus y el área gris periacueductal. Estos receptores son expresados en estructuras límbicas, corticales y del mesencéfalo (Al-Hasani y Bruchas, 2011). La activación de los receptores opioides inhiben directamente las neuronas, que a su vez inhiben la transmisión del dolor en la médula espinal (McNicol et al., 2003; Ahlbeck, 2011). Los cuatro receptores opioides cuentan con 7 segmentos transmembranales acoplados a las proteínas G inhibitorias, que después de su activación por un ligando, ya sea endógeno o exógeno, las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ se disocian una de otra, y posteriormente actúan sobre varias vías efectoras intracelulares (Childers et al., 1979). Uno de los aspectos más relevantes de la transducción de señales vía receptor opioide se relaciona con su capacidad para modular los canales iónicos dependientes de K^+ y Ca^{2+} (Al-Hasani y Bruchas, 2011). Este proceso causa hiperpolarización celular e inhibe la actividad neuronal tónica. En varios informes se demuestra que el efecto inhibitor de los opioides sobre la excitabilidad neural está mediado por las interacciones de los receptores opioides con la proteína G regulada hacia el interior del canal de potasio (Kir3) (Torrecilla et al., 2002, 2008). Cuando estos receptores se activan, se genera una reducción de

Ca^{2+} en las corrientes que son sensibles a los bloqueadores de canales tipo P/Q, tipo N y tipo L (Rusin et al., 1997). La inhibición inducida por el receptor opioide está mediada por la unión de la subunidad $\text{G}\beta\gamma$ generando una disminución de la conductancia del Ca^{2+} . Se cree que este evento de unión reduce la abertura de los poros del canal (Zamponi y Snutch, 2002). Numerosos informes han demostrado que los receptores opioides interactúan con los canales Ca^{2+} y los modulan.

2.13.5. Vía Serotoninérgica

La serotonina, también conocida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), es un neurotransmisor de tipo monoamina que es considerado como uno de los neurotransmisores más importantes en el cerebro. La 5-HT es sintetizada por las neuronas de los núcleos de rafé en el mesencéfalo (Hoyer et al., 1994) a partir del aminoácido triptófano. El núcleo del rafé contiene la mayoría de las neuronas serotoninérgicas que inervan el prosencéfalo. Esta región del mesencéfalo se divide en el núcleo del rafé dorsal (NRD) y el núcleo mediano del rafé (NMR) (van der Kooy y Hattori, 1980), en donde el NRD se encuentra localizado en la línea media del tronco encefálico y se subdivide en las regiones rostral y caudal. Por otra parte, el NMR se encuentra localizado en el extremo rostral al núcleo pontino del rafé. Las neuronas serotoninérgicas originadas en el núcleo del rafé dorsal y/o en el núcleo mediano del rafé, inervan las áreas del prosencéfalo enviando proyecciones al área tegmental ventral (ATV) y sustancia nigra (SN), así como a todo el prosencéfalo incluyendo a la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo. La neurotransmisión serotoninérgica regula una amplia gama de procesos fisiológicos y conductuales incluyendo, la termorregulación, la respiración, la cognición, la agresión, la regulación endócrina, la alimentación, el ciclo de sueño-vigilia, la sensibilidad al dolor, la función vascular y la emesis (Lucki, 1998; Roth et al., 2004). La desregulación del sistema serotoninérgicos cerebral favorece la aparición de trastornos neuropsiquiátricos como la depresión, la ansiedad y la esquizofrenia (Roth et al., 2004). La serotonina juega un papel fundamental en la nocicepción (Bardin, 2011) y en la inflamación a nivel central y periférico (Zeitz et al., 2002). El efecto de la 5-HT en la célula depende del tipo de receptor que está activando y de

la integración de la señal en la red neuronal (Sommer, 2006). Su implicación en el procesamiento del dolor es compleja ya que la 5-HT puede inhibir y/o facilitar la transmisión nociceptiva dependiendo del estímulo nociceptivo y la naturaleza de los receptores de 5-HT que son activados a nivel periférico y central (Millan, 2002).

Hasta la fecha, se han identificado siete familias de receptores serotoninérgicos, seis de ellas acopladas a proteínas G y una de ellas a un receptor ligado a un canal iónico. Sus designaciones incluyen 5-HT₁ (5-HT_{1A/1B/1D/1E/1F}, Gi), 5-HT₂ (5-HT_{2A/2B/2C}, Gq), 5-HT₃ (5-HT_{3A/3B/3C}, canal iónico), 5-HT₄ (Gs) 5-HT₅ (5-HT_{5A/5B}, Gi), 5-HT₆ (Gs) y 5-HT₇ (Gs) (Millan et al., 2002).

2.13.5.1. Acciones de la 5-HT sobre el SNP

En el SNP, las principales fuentes celulares encargadas de liberar 5-HT son las plaquetas y los mastocitos. Cuando se presenta una lesión, la concentración de 5-HT aumenta rápidamente y su acción depende de los receptores expresados en las neuronas aferentes que se encuentran en las proximidades. El ARNm de los subtipos de receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A-C}, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇ se han detectado en los GRD, lo que sugiere la presencia de todos estos receptores en los nervios sensoriales periféricos (Pierce et al., 1996; Nicholson et al., 2003; Sommer, 2006). Estudios *in vitro* demuestran que la 5-HT posee un efecto inhibitorio sobre las fibras nerviosas periféricas, demostrando que tiene la capacidad de sensibilizar ectópicamente las fibras aferentes axotomizadas en ratas, contribuyendo así a la sensibilización e hiperalgia periférica (Kessler et al., 1992; Sommer, 2006). Por otra parte, la activación de los receptores 5-HT_{1A/1B/1D} y 5-HT_{5A} se encuentra estrechamente relacionado con la disminución de las conductas nociceptivas (Granados-Soto et al., 2010; Muñoz-Islas et al., 2014). En apoyo a lo anterior, la administración de sumatriptán, un agonista 5-HT_{1B/D}, reduce la hiperalgia térmica en ratones con inflamación periférica (Bingham et al., 2001). Los datos anteriores sugieren que la activación de éstos receptores están asociados con los efectos anti-nociceptivos a nivel periférico. En contraste, los receptores serotoninérgicos a nivel periférico como 5-HT_{2A/2B/2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ promueven efectos pro-

nociceptivos (Rocha-González et al., 2009; Godínez-Chaparro et al., 2011; Cervantes-Durán et al., 2016).

2.13.5.2. Acciones de la 5-HT sobre el SNC

Varios estudios indican que la serotonina modula las respuestas nociceptivas en roedores. Esta modulación es compleja ya que la 5-HT puede inhibir y/o facilitar la transmisión nociceptiva dependiendo del sitio y la naturaleza de los receptores 5-HT (Cervantes-Durán et al., 2013). La creciente evidencia indica que el sistema descendente serotoninérgico está implicado en la inhibición, la facilitación y la transmisión nociceptiva espinal (Yaksh et al., 1979; Suzuki et al., 2004; Wei et al., 2010; Millan et al., 2002). La administración intratecal de 5-HT en la médula espinal reduce las conductas nociceptivas en las ratas, pero los hallazgos dependen de la calidad del estímulo, la dosis utilizada y del modelo de dolor empleado (Godínez-Chaparro et al., 2011; Cervantes-Durán et al., 2013; Muñoz-Islas et al., 2014; Rocha-González et al., 2014). Asimismo, el bloqueo de la síntesis o el agotamiento de la 5-HT a nivel espinal reduce la alodinia mecánica en diversos modelos de dolor neuropático (Wei et al., 2010; Rahman et al., 2006). En contraste, la administración intratecal de 5-HT *per se* genera analgesia (Bradin et al., 2000; Jeong et al., 2004; Rocha-González et al., 2005). En particular, se ha reportado que el receptor 5-HT₃ se encuentra asociado con procesos pro-nociceptivos a nivel central (Bravo-Hernández et al., 2012). Sin embargo, existe evidencia de que los receptores 5-HT₂ (Aira et al., 2010), 5-HT₄ (Song et al., 2011), 5-HT₆ (Jayarajan et al., 2015) y 5-HT₇ (Amaya-Castellanos et al., 2011) también contribuyen a la nocicepción en modelos de dolor neuropático de larga duración. Estudios más recientes han informado que los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} (Aira et al., 2010) a nivel espinal desempeñan un papel pro-nociceptivo. Por el contrario, los receptores 5-HT_{2A} (Pineda-Farias et al., 2015) y 5-HT_{2C} (Obata et al., 2004) desempeñan un papel anti-nociceptivo (Tabla 1).

2.13.5.3. Receptores serotoninérgicos

- **Receptor 5-HT₁:** Esta sub-familia de receptores está conformada por cinco miembros, los cuales incluyen al receptor 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}, (Barnes y Sharp, 1999). Los receptores 5-HT₁ poseen propiedades inhibitorias ya que se encuentran acoplados a una proteína Gi, además su activación induce el cierre de los canales de K⁺ y Ca²⁺, respectivamente (Rocha-González et al., 2009; Jeong et al., 2012). Se ha informado que la activación de estos receptores produce anti-nocicepción al ejercer un efecto inhibitorio sobre la excitabilidad neuronal tanto a nivel central como periférico (Granados-Soto et al., 2010; Godínez-Chaparro et al., 2013; Avila-Rojas et al., 2015).
- **Receptor 5-HT₂:** Esta sub-familia de receptores serotoninérgicos está conformada por tres miembros, los cuales incluyen al receptor 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (Alexander et al., 2008). Estos se encuentran acoplados a proteínas Gq ejerciendo una influencia inhibitoria sobre las corrientes de K⁺ generando excitabilidad neuronal (Barnes y Sharp, 1999). Estudios recientes reportan que los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} juegan un papel pro-nociceptivo en la modulación de la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Thibault et al., 2008; Silveira et al., 2010; Cervantes-Durán et al., 2013)
- **Receptor 5-HT₃:** Este receptor es un canal catiónico activado por un ligando, este pertenece a la superestructura del receptor de nicotina / ácido γ -aminobutírico (GABA) (Faerber et al., 2007). El receptor 5-HT₃ es un pentámero constituido por cinco monómeros que forman un cuerpo cilíndrico que puede permear fácilmente pequeños cationes como Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (Faerber et al., 2007) generando excitación neuronal. La activación de los receptores 5-HT₃ a nivel espinal produce hipersensibilidad dolorosa inducida por la lesión de nervios periféricos (Oatway et al., 2004; Gu et al., 2011) generando efectos de tipo pro-nociceptivos (Bravo- Hernández et al., 2012).
- **Receptor 5-HT₄:** Este miembro de la familia de receptores serotoninérgicos se encuentra acoplado a una proteína Gs que influye positivamente en la adenilato ciclasa y, en consecuencia, el aumento del AMPc. A su vez, el

AMPC activa a la PKA y los canales de sodio que conducen a la despolarización y la nocicepción (Godínez-Chaparro et al., 2011; Cervantes-Durán et al., 2013). En apoyo a lo anterior, estudios anteriores reportan que el receptor 5-HT₄ juega un papel pro-nociceptivo en la modulación de la transmisión nociceptiva a nivel periférico y central (Song et al., 2011; Gódinez-Chaparro et al., 2012).

- **Receptor 5-HT₅:** Este miembro de la super-familia de receptores serotoninérgicos, comprende dos miembros el 5-HT_{5A} y el 5-HT_{5B}. Estos receptores se encuentran acoplados a una proteína G_{i/o} que inhibe a la adenilato ciclasa generando un bloqueo sobre la actividad neuronal promoviendo conductas anti-nociceptivas a nivel espinal y periférico en varios modelos de dolor inflamatorio y neuropático (Cervantes-Durán et al., 2013; Muñoz-Islas et al., 2014; Avila-Rojas et al., 2015; Vidal-Cantú et al., 2016).
- **Receptores 5-HT₆:** Estos receptores serotoninérgicos se encuentran acoplados positivamente a adenilato ciclasa aumentando la producción de AMPC, generando un aumento de la actividad neuronal (Viguiet et al., 2013), esto genera una despolarización y por lo tanto, el desarrollo de conductas nociceptivas. En apoyo a lo anterior, estudios recientes demuestran que la activación del receptor 5-HT₆ promueve la aparición de efectos pro-nociceptivos a nivel periférico y central (Godínez-Chaparro et al., 2011,2012).
- **Receptores 5-HT₇:** Este receptor se encuentra acoplado a una proteína G estimuladora que influye positivamente en la adenilato ciclasa y en consecuencia aumenta el AMPC, lo que puede conducir a la despolarización y la nocicepción (Godínez-Chaparro et al., 2011). Estudios anteriores demuestran que la activación de estos receptores serotoninérgicos inducen efectos pro-nociceptivos a nivel periférico y central (Godínez-Chaparro et al., 2011,2012; Amaya-Castellanos et al., 2011).

Tabla 1. Fármacos, modelos experimentales y efectos farmacológicos implicados en el efecto pro-nociceptivo y anti-nociceptivo de los receptores 5-HT.

Receptor	Fármaco (antagonista)	Vía de administración	Modelo	Efecto	Referencia
5-HT _{1A}	Way-100635	Intratecal	SNL	Anti-nociceptivo	Ávila-Rojas et al., 2015
	Way-100635	Intratecal	Formalina	Anti-nociceptivo	Granados-Soto et al., 2010
5-HT _{1B/1D}	GR-127935	Intratecal	SNL	Anti-nociceptivo	Ávila-Rojas et al., 2015
	SB-224289 (5-HT _{1B}) BRL-15572 (5-HT _{1D})	Intratecal	Formalina	Anti-nociceptivo	Vidal-Cantú et al., 2016
5-HT _{2A}	Sarpogrelato	Intratecal	CCI	Pro-nociceptivo	Nitanda et al., 2005
	Ketanserina	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Cervantes-Duran et al 2013
5-HT _{2B}	RS-127445	Intratecal	SNL	Pro-nociceptivo	Pineda-Farias et al., 2015
	RS-127445	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Cervantes-Duran et al 2013
5-HT _{2C}	RS-102221	Intratecal	SNL	Pro-nociceptivo	Obata et al., 2004
	RS-102221	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Cervantes-Duran et al 2013
5-HT ₃	Ondansetrón	Intraperitoneal	CCI	Pro-nociceptivo	Jasmine Siew et al., 2016
	Ondansetrón	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Bravo-Hernández et al., 2012
5-HT ₄	SDZ-205.557.SDZ	Intratecal	CCI	Pro-nociceptivo	(Song et al., 2011)
	GR-125487	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Godínez-Chaparro et al., 2012
5-HT ₅	SB-699551	Intratecal	SNL	Anti-nociceptivo	Ávila-Rojas et al., 2015
	SB-699551	Intratecal	Formalina	Anti-nociceptivo	Muñoz-Islas et al., 2014
5-HT ₆	SB-742457	Oral	CCI	Pro-nociceptivo	Jayarajan et al., 2015
	SB-258585	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Godínez-Chaparro et al., 2012
5-HT ₇	SB-269970	Intratecal	SNL	Pro-nociceptivo	Amaya-Castellanos et al., 2011
	SB-269970	Intratecal	Formalina	Pro-nociceptivo	Godínez-Chaparro et al., 2012

2.13.6. Canales iónicos TRP

Desde la caracterización de la super-familia de los canales iónicos de potencial transitorio (TRP), estos han sido estudiados y clasificados en base a la homología de las secuencias primarias de aminoácidos, debido a la enorme variabilidad existente en cuanto a selectividad catiónica, tipo de ligando, regulación, función, etc. (Clapham, 2003). Los canales TRP se encuentran clasificados en 6 sub-familias. Estas sub-familias están comprendidas por los canales iónicos TRPV (vaniloide), actualmente conocido como TRPV1, TRPM (melastatina), TRPC (canónica), TRPA (ankirina), TRPP policistina y TRPML (mucolipina) (Nilius et al., 2007). Son canales catiónicos ubicados en las terminales axónicas de los nociceptores y responden a una serie de estímulos, incluyendo térmicos (calor o frío), mecánicos y químicos (Nilius et al., 2007; Ferrer-Montiel et al., 2012). Estos canales se encargan de propagar potenciales de acción hacia el asta dorsal de la médula espinal favoreciendo la activación de neuronas de segundo orden, que llevan la información hacia centros supraespinales. Los canales TRP han sido relacionados directamente con el sistema somatosensorial y la señalización del dolor debido a sus diversos mecanismos de activación (Basso y Altier, 2016). El canal TRPV1 sigue siendo el miembro de la familia TRP más estudiado y mejor caracterizado, debido a que se ha implicado en una amplia variedad de procesos celulares y fisiológicos, incluyendo la detección de estímulos nocivos tanto físicos como químicos. Actualmente, este canal sigue siendo estudiado por su gran potencial para el alivio del dolor (Basso y Altier, 2016).

2.13.6.1. Canal TRPV1

El canal TRPV1 fue clonado en el año 1997 (Caterina et al., 1997) y fue nombrado receptor de capsaicina o receptor vaniloide, ya que es activado selectivamente por la presencia de capsaicina mediante la excitación de las terminales sensoriales polimodales (Caterina et al., 1997). La estructura funcional de los canales TRPV1 está comprendida por un tetrámero, cada subunidad consta de seis dominios transmembranales, residuos hidrofóbicos entre el quinto y el sexto dominio que conforma el poro. El canal TRPV1 presenta en su estructura tres dominios de

anquirina en el extremo N terminal implicado en la modulación endógena por ser el sitio de unión a calmodulina (Lishko et al., 2007). Por otro parte, el canal TRPV1 presenta residuos que pueden ser fosforilados por la presencia de la PKA (Lishko et al., 2007) y la PKC (Bhave et al., 2003). El canal es activado principalmente por la capsaicina ingrediente activo que se encuentra en el chile picante (Ferrer-Montiel et al., 2012), por la resiniferatoxina (RTX) un éster de diterpeno altamente irritante aislado de *Euphorbia resinifera* (Caterina et al. 1997), por el calor nocivo (≥ 43 °C), por un pH por debajo de 5,2 (Szallasi y Blumberg, 1989; Ferrer-Montiel et al., 2012) y diversos agonista provenientes de compuestos naturales, tales como la piperina encontrada en la pimienta negra, la zingerona que se encuentra mayoritariamente en el rábano picante, los gingeroles, que son compuestos no volátiles encontrados en el jengibre crudo y por último los shogaoles que son productos de deshidratación de gingeroles (Yang et al., 2003; Suh y Oh, 2005). Todos estos compuestos comparten la similitud de ser altamente lipofílicos y por lo tanto presentan una gran afinidad por el canal iónico TRPV1 (Yang et al., 2003). La activación del canal TRPV1 permite la entrada de cationes monovalentes y divalentes, predominantemente Ca^{+2} , lo que produce una hiperactividad en la terminación nociceptiva. Inicialmente, la expresión tisular de los canales TRPV1 es descrita en una subpoblación de neuronas del GRD y ganglios del trigémino (TG), en el asta dorsal de la médula espinal y el núcleo caudal del trigémino espinal mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* (Caterina y Julius, 2001). Posteriormente, se determinó que el canal TRPV1, también, se encuentra expresado en neuronas del hipotálamo y en astrocitos (Doly et al., 2004).

2.13.6.2. Canales TRPV1 y su implicación en el dolor inflamatorio

En la actualidad se ha relacionado al canal TRPV1 con una amplia variedad de patologías estrechamente ligadas con procesos inflamatorios (Nilius et al., 2007). Estudios anteriores demuestran que la activación del canal TRPV1 es inducida por condiciones inflamatorias, por lo tanto, el umbral de activación se ve disminuido (Palazzo et al., 2010). Las reacciones de fosforilación y desfosforilación generadas por la presencia de la PKA y la PKC regulan en mayor medida la actividad del

receptor y el desarrollo de dolor inflamatorio. La activación del canal TRPV1 durante la inflamación es un proceso dinámico que se produce por la combinación de ligandos endógenos, pH bajo y temperatura corporal. Los agentes pro-inflamatorios como el factor de crecimiento nervioso (FCN), el ATP, la bradicinina, la serotonina, la histamina, las proteasas y las quimiocinas conducen a la sensibilización de TRPV1 mediante la activación de la fosfolipasa C (Palazzo et al., 2010). Los receptores TRPV1 juegan un papel fundamental en el proceso de la nocicepción. Estudios realizados con ratones noct out (K.O) que carecen del canal (TRPV1^{-/-}) disminuyen los procesos de nocicepción e inflamación (Caterina et al., 2000; Caterina y Julius, 2001), apoyando la hipótesis de que el canal TRPV1 es esencial en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia térmica inducida por un daño tisular (Julius y Basbaum, 2001).

2.13.6.3. Canales TRPV1 y su implicación en el dolor neuropático

El FCN aumenta después de una lesión en el nervio periférico y puede regular el canal TRPV1 en condiciones de dolor neuropático (Campbell y Meyer, 2006). Por otra parte, este canal está regulado positivamente en las neuronas no dañadas y está regulado negativamente en las neuronas que se encuentran en el sitio de la lesión del nervio periférico (Campbell y Meyer, 2006). Además, los canales TRPV1 están poco expresados en las neuronas del GRD en el modelo de la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Hudson et al., 2001). La regulación positiva del canal TRPV1 a nivel periférico y central en condiciones de dolor neuropático está directamente relacionada con el desarrollo de la alodinia mecánica (Campbell and Meyer, 2006). Una característica de los canales TRPV1 es su sensibilidad a los mediadores inflamatorios liberados durante la lesión del nervio periférico, generando una disminución en el umbral de temperatura después de la exposición de las neuronas DRG a moléculas nociceptivas como el FCN, bradicinina y PEG₂. Este proceso de sensibilización es un sello del aumento bien definido en la excitabilidad del nociceptor que subyace al desarrollo de hiperalgesia y alodinia en condiciones de dolor neuropático (Lilian Basso et al., 2017). Además, la activación del canal TRPV1 se encuentra asociada con la presencia de diversas patologías

como; neuralgia post-herpética, constricción de nervios periféricos, neuralgia trigeminal y neuropatía periférica diabética (Cortright y Szallasi 2004, Premkumar 2010, Premkumar y Sikand 2008, Szallasi 2006, Szallasi y Appendino 2004, Szallasi et al., 2007). La contribución de los canales TRPV1 en el dolor neuropático ha creado un interés en el la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el manejo y/o tratamiento de este tipo de dolor.

3. Hipótesis

El [6]-gingerol es capaz de revertir la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 a través de la activación de la vía NO-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP, activación del canal TRPV1 y la modulación del sistema opioidérgico y serotoninérgico.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Investigar el efecto anti-alodínico del tratamiento agudo del [6]-gingerol en ratas con lesión en los nervios espinales L5-L6. Así como, evaluar los posibles mecanismos de acción involucrados en el efecto anti-alodínico inducido por este fármaco.

4.2. Objetivos particulares

1. Analizar el efecto de la administración intratecal de [6]-gingerol sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Determinación del 50% del umbral de retiro de la pata).
 - 1.1. Estandarizar la cirugía de la ligadura de los nervios espinales L5-L6 en ratas propuesto por Kim y Chung (1992).
 - 1.2. Estandarizar el modelo conductual de *up-down* para la evaluación de la alodinia mecánica mediante la determinación del 50% del umbral de retiro de la pata, utilizando los filamentos de von Frey.
 - 1.3. Realizar una curva dosis-respuesta de la administración intratecal del [6]-gingerol sobre la alodinia en ratas neuropáticas.

2. Analizar el posible mecanismo de acción que subyace el efecto anti-alodínico inducido por [6]-gingerol en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.

2.1. Analizar la participación de la vía del NO-GMPcíclico-canales de K⁺ sensibles a ATP en el efecto anti-alodínico inducido con [6]-gingerol en animales con dolor neuropático.

2.1.1. Evaluar el efecto de la administración del inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME, 10-100 µg, i.t.), el inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ, 1-10 µg, i.t.) y el bloqueador de los canales de potasio sensibles a ATP (glibenclamida, 5-50 µg, i.t.) 10 min antes de una dosis eficaz de [6]-gingerol (i.t.). Inmediatamente después se evaluará el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min mediante la determinación del 50% del umbral de retiro de la pata.

2.2. Analizar la participación del sistema opioidérgico en el efecto anti-alodínico inducido con [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.

2.2.1. Evaluar el efecto de la administración de naloxona (50 µg/rata, i.t.), de naltrindol (1-10 µg, i.t.), de 5-GNT (5-50 µg, i.t.) y de CTOP (1.5-15 µg, i.t.) 10 min antes de una dosis eficaz de [6]-gingerol (i.t.) y se evaluará el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste mediante la determinación del 50% del umbral de retiro de la pata.

2.3. Analizar la participación del sistema serotoninérgico a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{5A} en el efecto anti-alodínico inducido con [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.

2.3.1. Evaluar el efecto de la administración de metiotepina (30 mg/rata, i.t.), de WAY-100635 (0,6-6 mg/rata, i.t.), de SB-224289 (0,5-5 mg/rata i.t.), de BRL-15572 (0,4-4 mg/rata, i.t.) y de SB-699551 (0,6-6 mg/rata, i.t.) 10 min antes de una dosis eficaz de [6]-gingerol (i.t.) y se evaluará el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste mediante la determinación del 50% del umbral de retiro de la pata.

2.4. Analizar la participación del canal TRPV1 en el efecto anti-alodínico inducido con [6]-gingerol en ratas con dolor neuropático.

2.4.1. Evaluar el efecto de la administración de AMG 9810 (30 mg/ Kg) y de BCTC (100 mg/ Kg) 10 min antes de la administración de una dosis eficaz de [6]-gingerol y se evaluará el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste mediante la determinación del 50% del umbral de retiro de la pata.

2.5. Realizar las pruebas estadísticas mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido de la prueba de Tukey o Bonferroni según sea el caso para comparar las diferencias significativas entre los tratamientos realizados.

5. Metodología

5.1. Animales

Los experimentos fueron realizados en ratas hembra de la cepa Wistar, con un peso de 140 a 160 g que tuvieron acceso libre a agua y alimentos antes de cada experimento. Los animales fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (Protocolo 123 aprobado por el comité de ética de la UPEAL). Todos los experimentos fueron realizados siguiendo los Lineamientos y Estándares para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983).

5.2. Fármacos

El [6]-gingerol fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100%. Sin embargo, el porcentaje máximo de DMSO en cada dosis fue del 10%. La naloxona, la metiotepina, el 5-guanidinaltrindol (5-GNT), el CTOP, el N ω -nitro-L-arginina-metil-éster hidroclicida (L-NAME), el WAY-100635 (N-(2-(4-(2-metoxifenil)-1-piperazinetil)-N-(2-piridinil) ciclohexanocarboxamida), el BRL 15572 (3-[4-(4-clorofenil) piperazin-1-il] clorhidrato -1,1-difenil-2-propanolol), el SB 224289 (1'-metil-5 - [[2 '-metil-4' - (5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il) bifenil-4-il] carbonil] 2,3,6,7 espiro tetrahidro [furo [2,3-f] indol-3,4 'piperidina) fueron disueltos en solución salina al 0.9%. La glibenclamida y el AMG 9810 ((2E)-N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxano-6-il) -3- [4- (1,1-dimetiletil) fenil] -2-propenamida)) fueron disueltos en DMSO al 5%. El SB-699551 (N-[2-(dimetilamino)etil]-N-[[40- [[(2-feniletil) amino] metil] [1,10-bifenil] - 4 il] metil] ciclopentano propanamida dihidrocloruro) y el BCTC (4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimeti etil) fenil]-1-piperazinecarboxamide) fueron disueltos en DMSO al 10%. El ODQ (1H-(1, 2,4) oxadiazol (4,3-A) quinoxalin-1-ona) fue disuelto en DMSO al 10%, el naltrindol fue disuelto en tween 20 al 10%. [6]-gingerol, L-NAME, glibenclamida, WAY-100635, ODQ, BCTC DMSO se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La naloxona, metiotepina, naltrindol, 5-GNT, CTOP fueron

adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA). El SB 224289, BRL 15572, AMG 9810 y SB-699551 fue adquirido en Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

5.3. Modelos experimentales

5.3.1. Cirugía de nervios espinales

En 1992 los investigadores Kim y Chung desarrollaron un modelo de mononeuropatía inducida por una fuerte ligadura en los nervios espinales L5 y L6 (SNL) (Fig. 12). Este modelo es ampliamente utilizado en el estudio del dolor neuropático debido a que es altamente reproducible, las alteraciones en el comportamiento como la alodinia mecánica, la hiperalgesia térmica y el dolor espontáneo se presentan a partir de las 24 a 48 h posteriores a la ligadura de los nervios espinales persistiendo hasta la semana 16. Cabe señalar que los animales sometidos a la cirugía presentan un bajo índice de autotomía (Kim y Chung, 1992). Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (45/12 mg/Kg, i.p.). Posteriormente, se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm de diámetro a nivel de las crestas ilíacas con el propósito de identificar y exponer los nervios espinales L5-L6 de la médula espinal. Estos se ligaron con sutura de seda 4-0 distal al ganglio de la raíz dorsal. En el grupo de las ratas falsamente operadas (Sham) los nervios espinales fueron expuestos, pero no se ligaron. Después de cerrar la incisión se les dio un periodo de recuperación de 14 días. Las ratas que presentaron algún tipo de déficit motor fueron descartadas del estudio.

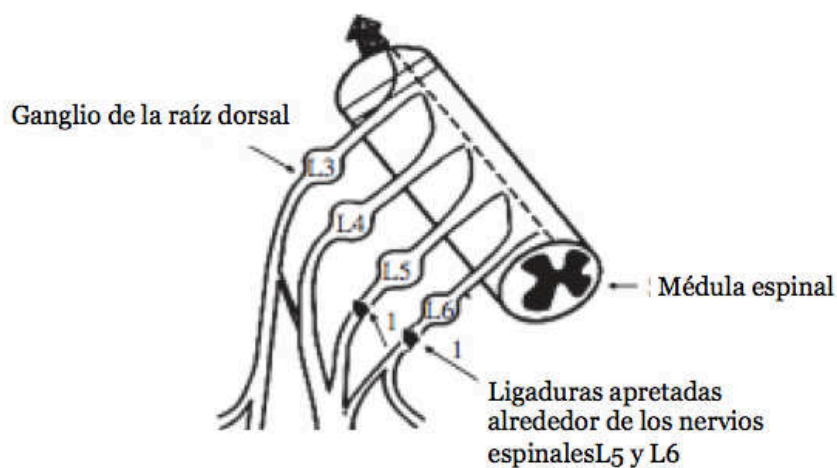


Figura 12. Ligadura de nervios espinales. Representación esquemática donde se muestra la ligadura de los nervios espinales propuesto por Kim y Chung en 1992. Modificado de Jaggi et al., 2011.

5.3.2. Inyección intratecal

La administración i.t (Fig. 13) de los distintos tratamientos utilizados y del [6]-gingerol, se realizó mediante el método descrito por Mestre y colaboradores en 1994, donde la administración se realizó sujetando fuertemente a la rata de la parte superior a la altura de las patas traseras y la pelvis. Una vez sujetado el animal se inserta una aguja de calibre 22-G acoplada a una jeringa Hamilton de 25- μ L sobre las vértebras lumbares L5-L6, a través de la cavidad subaracnoidea en la región donde termina la médula espinal y comienza la cauda equina, esto con la finalidad de reducir la posibilidad de provocar un daño sobre la médula. Una vez que la jeringa está en la posición correcta se procedió a la administración de los distintos fármacos en un volumen de 20 μ L. Esta es una técnica muy utilizada, debido en parte a las ventajas que presenta, ya que es muy rápida, no se necesita anestésico al animal y posee una gran reproducibilidad en los datos de comportamiento (Mestre et al., 1994).

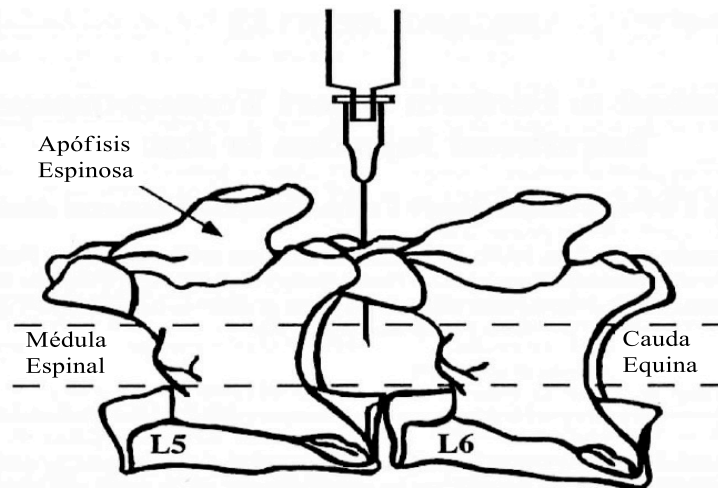


Figura 13. Administración intratecal. Representación esquemática en donde se muestra la inserción de la aguja entre la cavidad subaracnoidea que se encuentra entre las vértebras lumbares L5-L6. Modificado de Mestre et al., 1994.

5.3.3. Determinación del 50% del umbral de retiro de la pata

Para la evaluación de las conductas nociceptivas (alodinia mecánica) inducidas por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 se realizó mediante el método descrito por Chaplan y colaboradores en 1994 (Chaplan et al., 1994),

El 50% del umbral de retiro de la pata se determinó mediante el método de *up-down* descrito por Dixon (Dixon, 1965, 1980) y modificado por Chaplan (Chaplan et al., 1994). Las pruebas de comportamiento se realizaron en grupos independientes de ratas ($n=6$), donde se cuantificó la alodinia mecánica en respuesta a los estímulos generados con los filamentos de von Frey aplicados sobre la superficie plantar de la extremidad posterior izquierda (Chaplan et al., 1994). Para realizar este procedimiento, las ratas son colocadas de manera individual en cámaras de observación de acrílico transparente sobre una superficie de malla metálica 30 min antes de la evaluación de la alodinia mecánica para permitirles adaptarse en su entorno. Los umbrales del 50% de retiro de la pata se midieron usando el paradigma de ensayo *up-down* (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1965, 1980). Para esto se aplicó un estímulo mecánico con ayuda de los filamentos de von Frey, la fuerza de estos filamentos comprende desde los 0.4 g hasta llegar a los 15 g. Este estímulo se aplicó durante 10 seg en intervalos de un min. Se comenzó el ensayo con un filamento de

2g; cuando se produjo una respuesta positiva de retiro de la pata se marco con una "X" y se procedio a disminuir de manera progresiva al filamento inmediatamente inferior. Por otra parte, cuando se obtubo una respuesta negativa ante el estímulo mecánico se marco con una "O" y se procedio a la aplicación de un filamento inmediatamente superior. Para que una respuesta se tome como positiva tiene que ocurrir una retirada abrupta de la extremidad, cualquier otro comportamiento distinto al retiro de la pata se tomo como negativo. La prueba debe realizarse hasta que se registren seis respuestas iguales una vez que se presente el primer cambio en la respuesta conductual o hasta que se exceda el valor del filamento de gramaje más alto (15 g). Todos los datos obtenidos fueron transformados en valores numéricos mediante la aplicación de la siguiente formula:

$$50\% \text{ Umbral} = \left(\frac{10^{(Xf+k\delta)}}{10000} \right)$$

Donde:

Xf: Valor en unidades logarítmicas del último filamento de Von Frey utilizado.

k: Valor obtenido a partir de las tablas de Dixon (Dixon, 1980).

δ: Media de las diferencias entre los puntos fuertes de estímulo en unidades logarítmicas.

Por otra parte, para que los datos experimentales se visualizaran más fácilmente, así como, para determinar la dosis necesaria de [6]-gingerol y reducir el 50% de umbral de retiro de la pata, se decidio graficar el Máximo Efecto Posible (%MEP) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%MEP = \left(\frac{(ABC_{[6]-Gingerol} - ABC_{SNL})}{(ABC_{SHAM} - ABC_{SNL})} \right)$$

Donde:

ABC: Área bajo la curva del curso temporal de la disminución del 50% del umbral de retiro de la pata comparada con los grupos Sham y SNL. Todos los resultados experimentales se presentan como la media ± el error estándar de los datos obtenidos de 6 animales por grupo.

Durante el desarrollo del procedimiento experimental se evitó una estimulación mecánica en la región donde se encuentran las almohadillas y en cualquier otra región que no sea la zona plantar de la pata, todo esto con la finalidad de no incurrir en respuestas falsas positivas ya que estas pueden ser generadas por la activación de las fibras A β mielinizadas (Ji y Woolf, 2001). Lo que se buscó en este método experimental fueron las sensaciones nociceptivas generadas por la activación de las fibras A δ y C (Ji y Woolf, 2001).

5.4. Diseño experimental

Con el propósito de estandarizar la medición de la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Las ratas se prepararon de acuerdo al método descrito por Kim y Chung. Posteriormente, se realizó la cirugía (ver cirugía de nervios espinales) en donde se expusieron y ligaron los nervios espinales L5-L6 de la médula espinal. En el grupo de las ratas falsamente operadas (Sham), los nervios se expusieron, pero no fueron ligados. Después de cerrar la incisión, a los animales se les dio un periodo de recuperación de 14 días. Las ratas que presentaron algún tipo de déficit motor fueron descartadas del estudio.

La alodinia mecánica se evaluó en ratas con lesión de los nervios espinales L5-L6 como reportan Chaplan et al., en 1994. Se realizó un curso temporal del umbral de retiro de la pata por el método *up-down* los días 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 14, posterior a la ligadura de los nervios espinales. Por otra parte, se determinó el posible efecto anti-alodínico del [6]-gingerol en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6, el día 14, los animales recibieron dosis crecientes de [6]-gingerol por vía i.t (1, 3, 6 y 10 μ g/rata), 10 min antes de evaluar la conducta nociceptiva (alodinia táctil) por el método *up-down*. Posteriormente, fue monitoreado el efecto del [6]-gingerol sobre el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste compuesto. Grupos independientes de ratas (n=6) fueron utilizados para cada condición experimental.

5.4.1. Participación de la vía óxido nítrico-GMP cíclico-canales de K⁺ sensibles a ATP

Para evaluar si el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en animales que presentan ligadura de los nervios espinales L5-L6 es mediado por la vía óxido nítrico-GMP cíclico-canales de K⁺ sensibles a ATP, se administró el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME, 10-100 µg, i.t.) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2008), el inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ, 1-10 µg, i.t.) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2008) y el bloqueador de canales de potasio sensibles a ATP (glibenclamida, 5-50 µg, i.t.) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2008) 10 min antes de la administración de una dosis eficaz del [6]-gingerol y se determinó el 50% del umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste compuesto.

5.4.2. Participación del sistema opioidérgico

Para determinar si el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas esta mediado por la vía opioidérgica, se administró el antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona (50 µg/rata) (Izquierdo et al., 2013) 10 min antes de la administración de una dosis eficaz de [6]-gingerol. 10 min después, se administró el [6]-gingerol y se evaluó el 50% del umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste compuesto.

5.4.3. Participación del sistema serotoninérgico

Para determinar si el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas esta mediado por la vía serotoninérgica, los animales fueron administrados con el antagonista no selectivo de los receptores 5-HT metiotepina (30 µg/rata) (Izquierdo et al, 2013; Rocha-González et al, 2010) 10 min antes de la administración de una dosis efectiva de [6]-gingerol (10 µg/rata), que se administró 10 min antes de la evaluación de la alodinia por el método up-down, además, con el fin de investigar la posible implicación de los subtipos 5-HT_{1A/1B/1D} y el 5-HT_{5A} se administraron; el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, WAY-100635 (0,6-6 µg/rata) (Ávila-Rojas et al., 2015); el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1B}, SB-

224289 (0,5-5 $\mu\text{g/rata}$) (Godínez-Chaparro et al, 2013); el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1D}, BRL-15572 (0,4-4 $\mu\text{g/rata}$) (Godínez-Chaparro et al., 2013) y el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{5A}, SB-699551 (0,6-6 $\mu\text{g/rata}$) (Muñoz- Islas et al., 2014). 10 min después de la administración i.t del [6]-gingerol se evaluó el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste.

5.4.4. Participación del canal TRPV1

Para determinar si el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas esta mediado por el canal TRPV1 se administrarán los antagonistas selectivos de los canales TRPV1, el AMG 9810 (30 $\mu\text{g/rata}$) y el BCTC (100 $\mu\text{g/rata}$) (Gavva et al., 2005) 10 min antes de la administración de una dosis eficaz de [6]-gingerol. 10 min después de la administración intratecal del [6]-gingerol se evaluó el umbral de retiro de la pata a los 10, 30, 60, 120 y 240 min posteriores de la administración de éste.

5.5. Análisis de datos y estadística

Todos los resultados experimentales se presentaron como la media \pm el error estándar de los datos obtenidos de 6 animales por grupo. Las curvas fueron construidas a partir del umbral de retiro de la pata en función del tiempo. Un incremento en el umbral de retiro de la pata del 50% fue considerado como un efecto anti-alodínico. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de la prueba de Tukey o Bonferroni, respectivamente, para comparar las diferencias entre los tratamientos. Se consideró que existen diferencias estadísticas cuando se obtuvo un nivel de significancia $P < 0.05$.

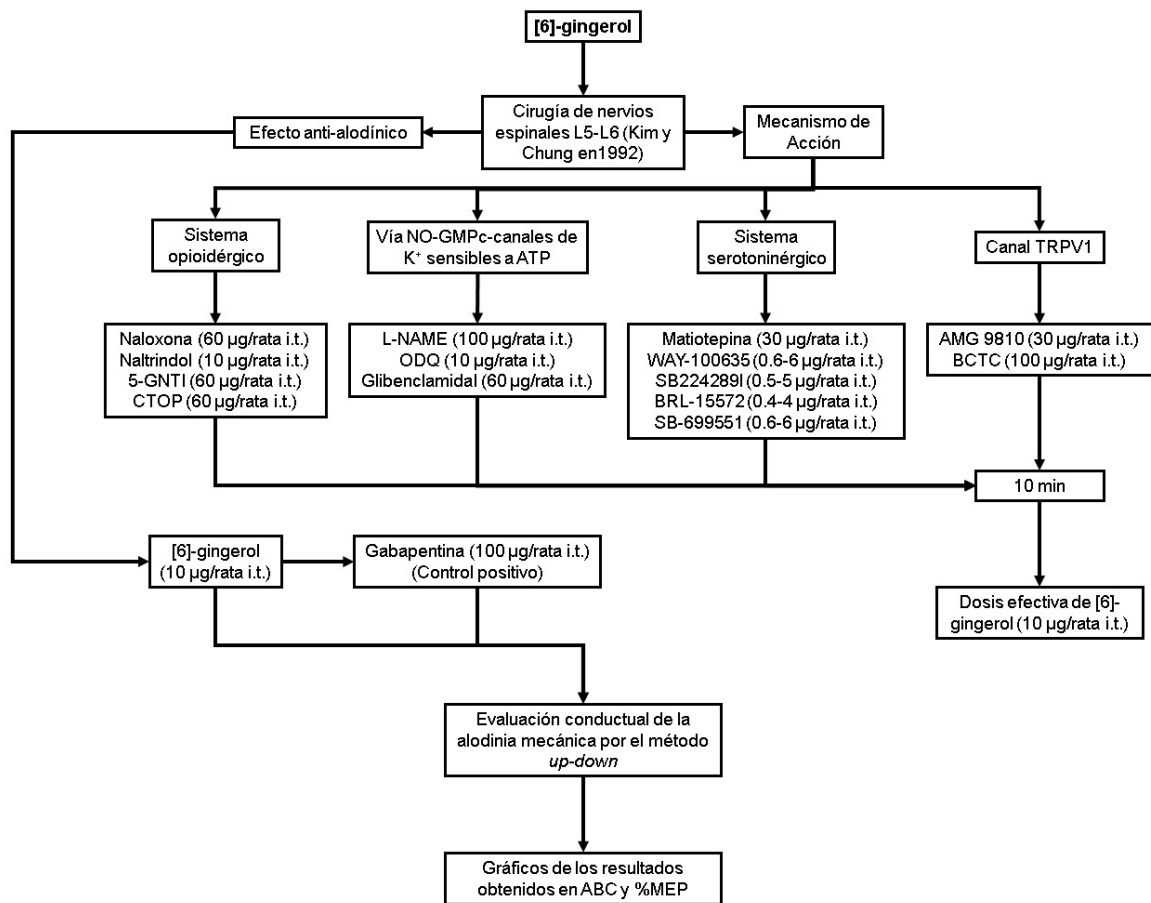


Figura 14. Diseño experimental para la evaluación del efecto anti-alodínico del [6]-gingerol en ratas neuropáticas.

6. Resultados

6.1. Estandarización de la cirugía de nervios espinales L5-L6, así como el modelo conductual de up-down

La ligadura de los nervios espinales L5-L6 redujo el 50% del umbral de retiro de la pata en la pata ipsilateral, comparado con los animales falsamente operados (Sham), lo cual es indicativo de la inducción de la alodinia mecánica (Fig. 15).

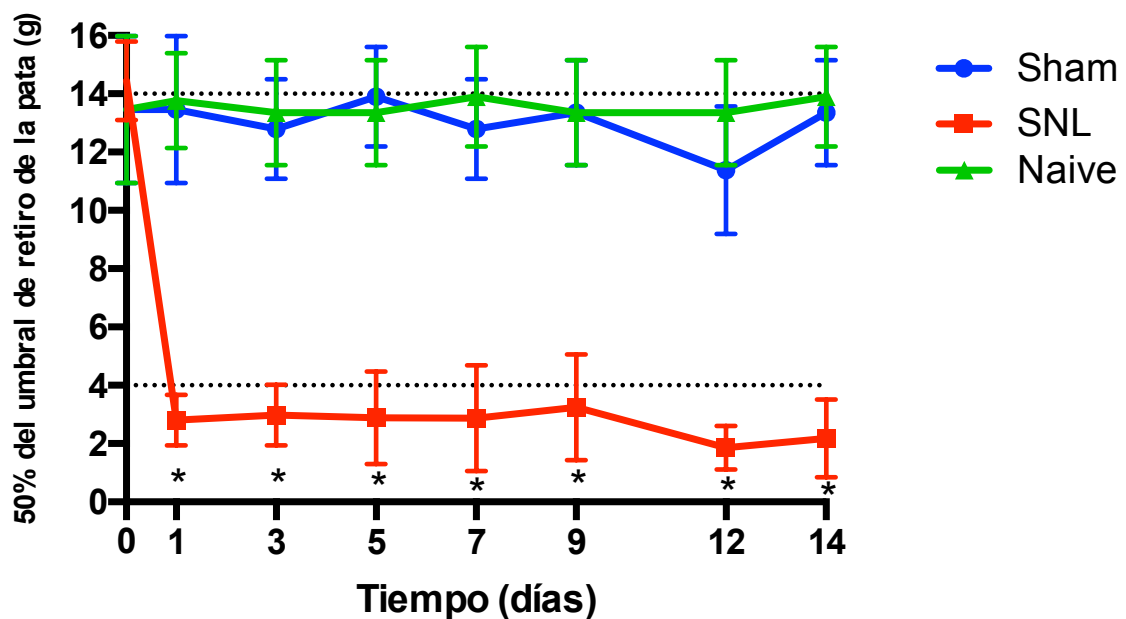


Figura 15 . Curso temporal del efecto anti-alodínico observado en ratas con la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL) comparados con las ratas falsamente operadas (Sham) y las ratas sin tratamiento (Naive). El umbral de retiro de la pata se evaluó los días 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 14 días posteriores a la cirugía. Los datos se expresan como la media ± E.E. de 6 animales por grupo. *P ≤ 0,05 frente al grupo Sham determinado mediante una ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Bonferroni.

6.2. Efecto de la administración intratecal de [6]-gingerol sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6

La administración intratecal (Fig. 16A y B) de dosis crecientes de [6]-gingerol (1-10 $\mu\text{g/rata}$), pero no del vehículo, incrementa el umbral de retiro de la pata de manera dosis-dependiente en ratas neuropáticas. La administración intratecal de una dosis efectiva de gabapentina (100 $\mu\text{g/rata}$), utilizada como control positivo, revirtió la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Cabe señalar que la dosis de 10 $\mu\text{g/rata}$ de [6]-gingerol produjo el 86% de efecto anti-alodínico máximo (%MEP) comparado con gabapentina (62%) (Fig. 16B). El %MEP producido por la administración intratecal de [6]-gingerol se observó 60 min después de la administración y éste disminuyó gradualmente hasta los 240 min (Fig. 15A).

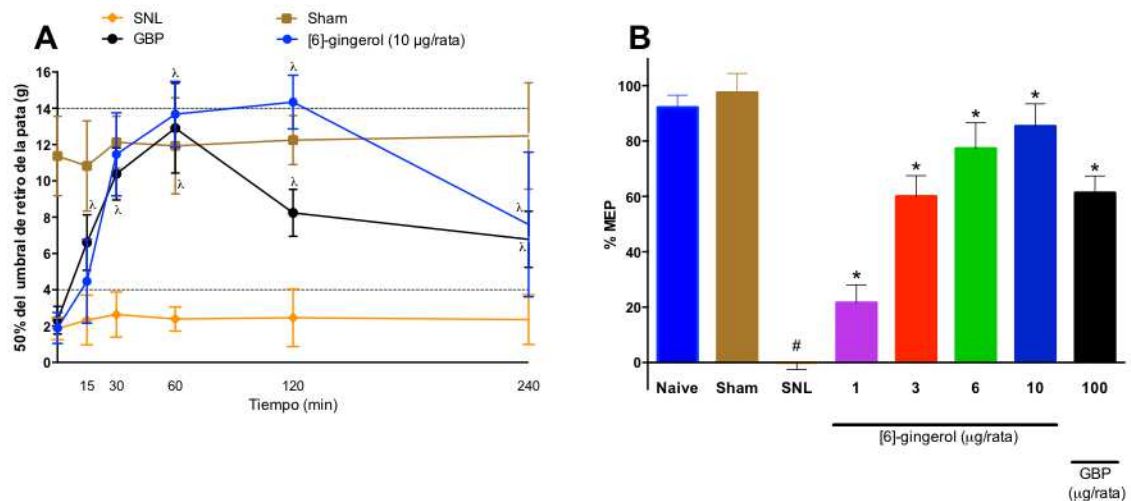


Figura 16. Curso temporal del efecto anti-alodínico inducido por la administración intratecal de [6]-gingerol en ratas sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). El umbral de retiro de la pata fue determinado 14 días después de la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (% MEP) (B). Los datos se expresan como la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. * $P \leq 0,05$ frente al grupo SNL y # $P \leq 0,05$ vs al grupo Sham determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. $\wedge P \leq 0,05$ vs al grupo SNL, determinado por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Bonferroni. Abreviaturas: GBP: gabapentina.

6.3. Efecto del L-NAME, ODQ y glibenclamida sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas

El pre-tratamiento intratecal con L-NAME (100 µg/rata, Fig. 17A y B, $P \leq 0,05$), ODQ (10 µg/rata, Fig. 17C y D, $P \leq 0,05$) o glibenclamida (50 µg/rata, Fig. 17E y F, $P \leq 0,05$) previene, significativamente, el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol (10 µg/rata) en ratas neuropáticas. La administración de L-NAME, ODQ y glibenclamida, *per se*, no modificó la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6.

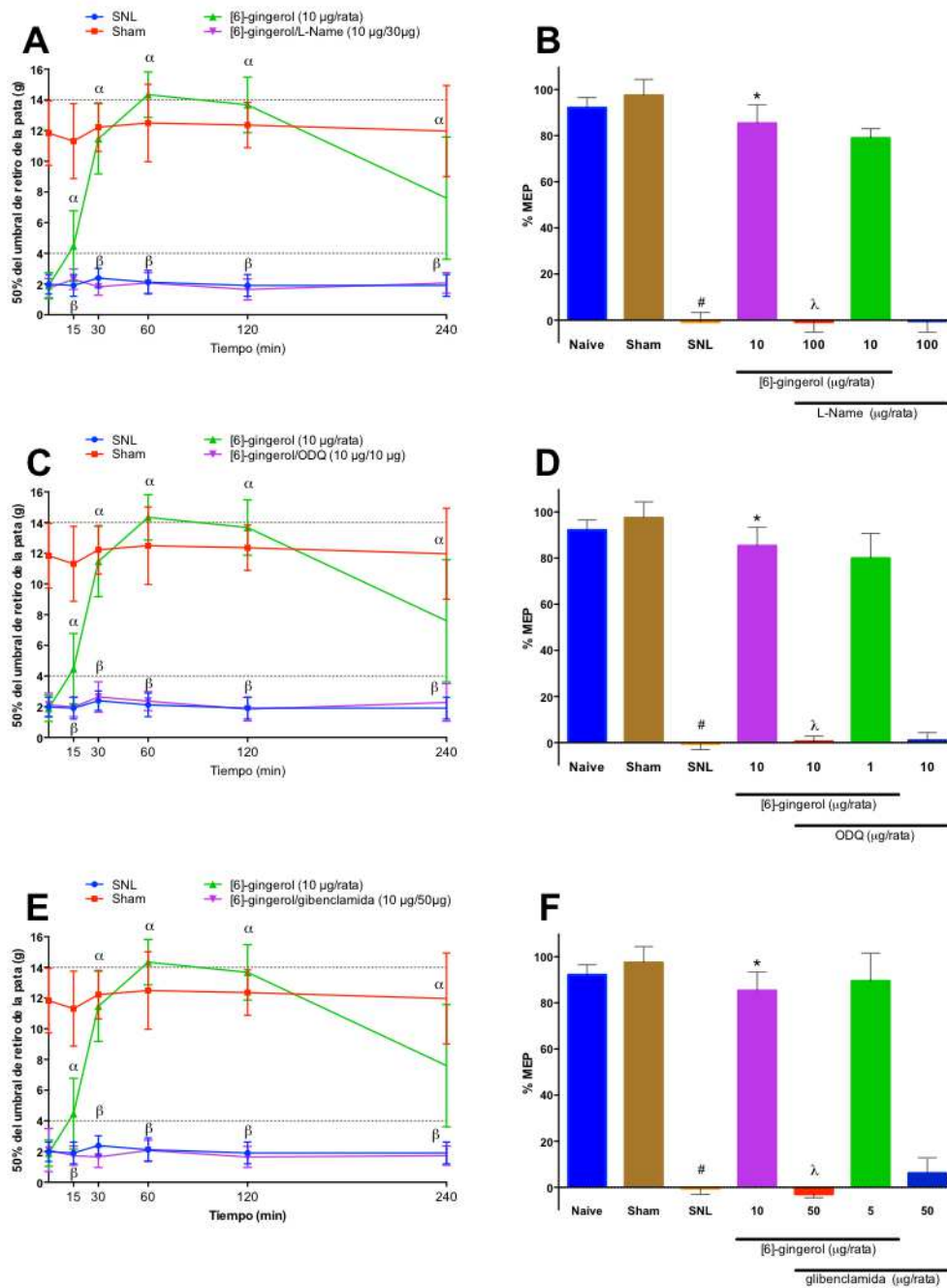


Figura 17. Curso temporal del pre-tratamiento intratecal con L-NAME (A y B), ODQ (C y D) y glibenclamide (E y F); sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). Los datos se expresan como la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. El umbral de retiro de la pata fue determinado 14 días después de la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (% MPE). * $P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $^{\#}P \leq 0,05$ vs al grupo Sham y $^{\lambda}P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol, determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. $^{\alpha}P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $^{\beta}P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol determinado por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Bonferroni.

6.4. Efecto de la naloxona sobre el efecto anti-alóidico inducido el [6]-gingerol en ratas neuropáticas

El pre-tratamiento intratecal con naloxona (50 $\mu\text{g}/\text{rata}$, Fig. 18A y B, $P \leq 0,05$) no produjo ningún cambio en el efecto anti-alodínico inducido por la administración intratecal de [6]-gingerol (10 $\mu\text{g}/\text{rata}$) en ratas neuropáticas. Además, la administración de naloxona, *per se*, no modificó la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Fig. 18B).

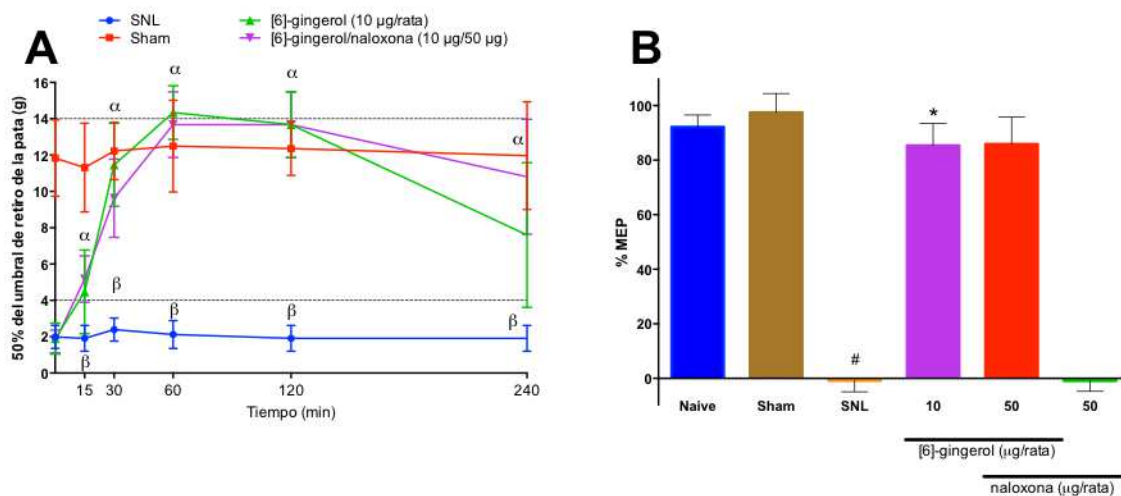


Figura 18. Curso temporal del pre-tratamiento intratecal con naloxona (A y B); sobre el efecto anti-alodínico inducido por la administración del [6]-gingerol en ratas sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). El umbral de retiro de la pata fue determinado 14 días después de la cirugía. Los datos se expresan como la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. Las barras muestran el máximo efecto posible (% MPE). * $P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y # $P \leq 0,05$ vs al grupo Sham determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. $\alpha P \leq 0,05$ vs al grupo SNL determinado por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Bonferroni.

6.5. Efecto de AMG 9810 y BCTC sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas

El pre-tratamiento intratecal con AMG 9810 (30 µg/rata, Fig. 19A y B, $P \leq 0,05$) y BCTC (100 µg/rata, Fig. 19C y D, $P \leq 0,05$) previno el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol (10 µg/rata) en ratas neuropáticas. La administración de AMG 9810 y BCTC, *per se*, no modificó la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6.

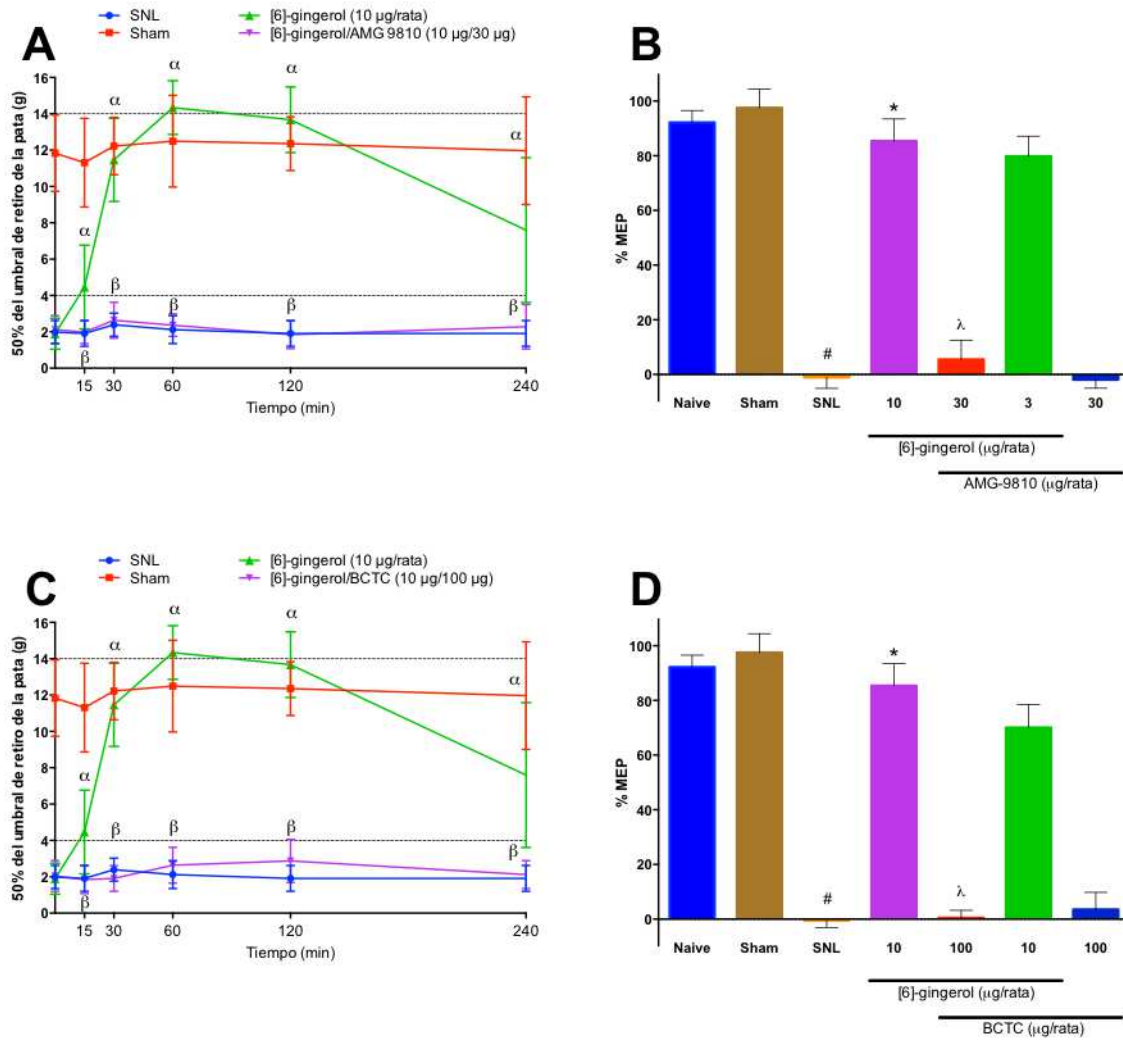


Figura 19. Curso temporal del pre-tratamiento intratecal con AMG 9810 (A y C) y BCTC (B y D); sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). Los datos se expresan como la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. El umbral de retiro de la pata fue determinado 14 días después de la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (% MPE). * $P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $\#P \leq 0,05$ vs al grupo Sham y $\lambda P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol, determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. $\alpha P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $\beta P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol determinado por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Bonferroni.

6.6. Efecto de la metiotepina, WAY-100635, SB-224289, BRL-15572 y SB-699551 sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas

El pre-tratamiento intratecal con metiotepina (30 $\mu\text{g}/\text{rata}$, Fig. 20A y B, $P \leq 0,05$), WAY-100635 (6 $\mu\text{g}/\text{rata}$, Fig. 21A y B, $P \leq 0,05$), SB- 224289 (5 $\mu\text{g}/\text{rata}$, Fig. 21C y D, $P \leq 0,05$), BRL-15572 (4 $\mu\text{g}/\text{rata}$, Fig. 21E y F, $P \leq 0,05$) y SB-699551 (6 $\mu\text{g}/\text{rata}$, Fig. 21G y H, $P \leq 0,05$) previene significativamente el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol (10 $\mu\text{g}/\text{rata}$) en ratas neuropáticas. La administración de metiotepina, WAY-100635, SB- 224289, BRL-15572 y SB-699551, *per se*, no modificó la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (Fig. 19B, Fig. 21B, D, F y H).

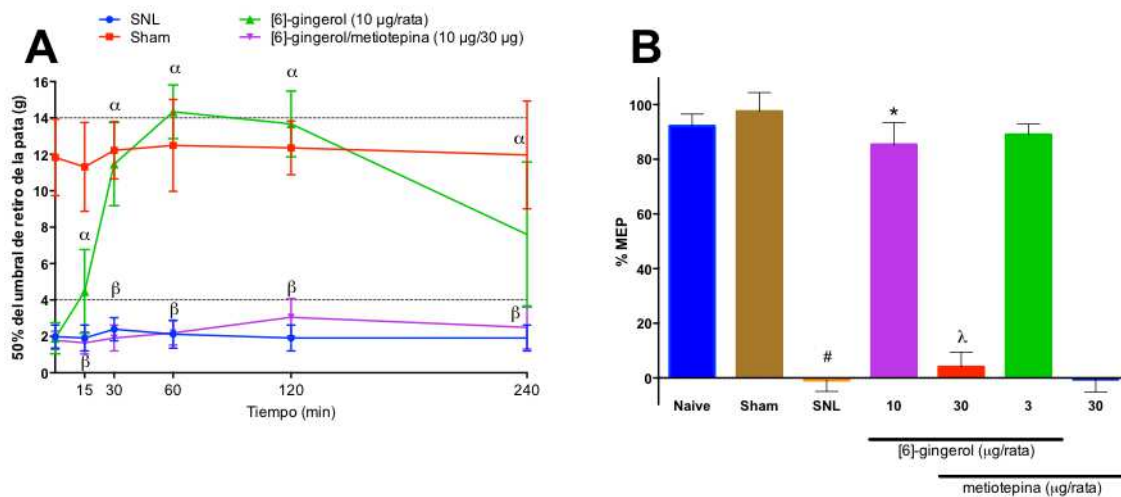


Figura 20. Curso temporal del pre-tratamiento intratecal con metiotepina (A y B) sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). Los datos se expresan como la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. El umbral de retiro de la pata fue determinado 14 días después de la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (% MPE). * $P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $\#P \leq 0,05$ vs al grupo Sham y $\lambda P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol, determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. $\alpha P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $\beta P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol determinado por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Bonferroni.

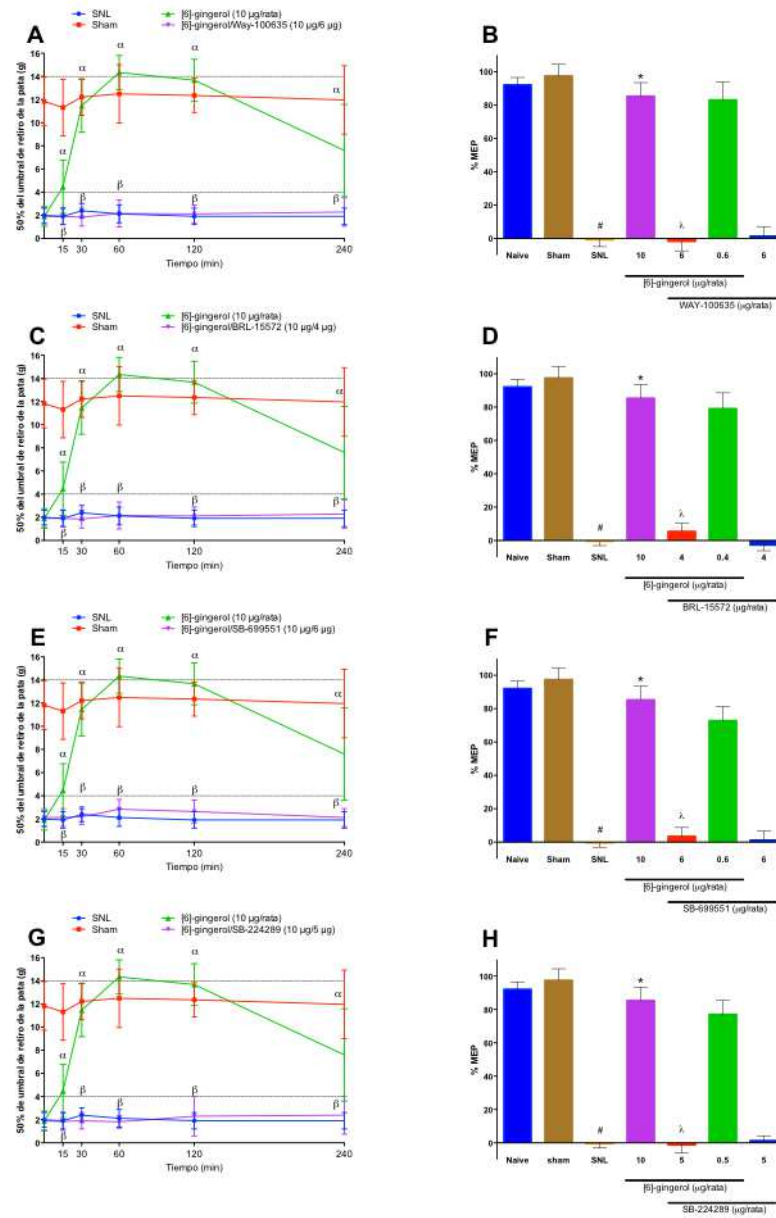


Figura 21. Curso temporal del pre-tratamiento intratecal con WAY-100635 (A y B), BRL-15572 (C y D), SB-699551 (E y F) y SB-224289 (G y H) sobre el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas sometidas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). Los datos se expresan como la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. El umbral de retiro de la pata fue determinado 14 días después de la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (% MEP). * $P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $\#P \leq 0,05$ vs al grupo Sham y $\lambda P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. $\alpha P \leq 0,05$ vs al grupo SNL y $\beta P \leq 0,05$ vs al grupo de [6]-gingerol determinado por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Bonferroni.

7. Discusión

La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo conductas nociceptivas (alodinia mecánica) de largo plazo en la pata izquierda (ipsilateral) (Kim y Chung, 1992). En nuestro estudio, las conductas nociceptivas se observaron desde el día 1 hasta el día 14 posteriores a la cirugía. La evaluación conductual sugiere que las ratas SNL presentan alodinia mecánica, esto se observó como el levantamiento de la pata ipsilateral de forma violenta tras la estimulación con un filamento de von Frey menor o igual a 4 g. Por otra parte, los grupos de ratas Sham y Naive no muestran señales de alodinia mecánica después de la estimulación con los filamentos de von Frey, esto sugiere que la cirugía, *per se*, no genera dolor neuropático (alodinia mecánica). Por lo tanto, estos datos sugieren que la ligadura de los nervios espinales L5-L6 desarrolla alodinia mecánica de largo plazo concordando con lo reportado por Kim y Chung en 1992 (Kim y Chung, 1992). Cabe señalar que, ninguna de las ratas sometidas al procedimiento quirúrgico mostro déficit motor ni señales de autotomía. Así mismo, se puede decir que el modelo de dolor neuropático empleado en nuestro estudio es reproducible en nuestras manos.

En el presente estudio se demostró que la administración i.t de [6]-gingerol reduce de manera dosis-dependiente la alodinia mecánica generada por la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Los datos obtenidos muestran que la administración de una dosis efectiva de [6]-gingerol (10 µg/rata) es capaz de aumentar el umbral de retiro de la pata (86%), alcanzando valores similares a los obtenidos en los grupos Sham (97%) y Naive (92%). En apoyo a lo anterior, estudios recientes demuestran que la administración i.t de [6]-gingerol disminuye la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica inducida por la ligadura del nervio ciático (Gauthier et al., 2013). En conjunto, estos datos sugieren que el [6]-gingerol disminuye la alodinia mecánica inducida por la lesión de un nervio periférico de forma similar a la administración i.t de una dosis de 100 µg/rata de gabapentina (62%), el cual es un fármaco antiepiléptico de primera línea ampliamente utilizado en el tratamiento del dolor neuropático a nivel de la clínica (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004; Finnerup et al., 2015).

7.1. Posible participación de la vía del NO-GMP-cíclico canales de K⁺ sensibles a ATP en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol

Estudios anteriores, han demostrado que algunos compuestos de origen vegetal reducen de forma significativa (dependiente de la dosis) las conductas nociceptivas generadas por la presencia de dolor neuropático a través de la vía del NO-GMPcíclico-canales de K⁺ sensibles a ATP (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2006; Izquierdo et al., 2013; Quiñonez-Bastidas et al., 2013; de Los Monteros-Zuñiga et al., 2016). Por lo tanto, se evaluó la participación de esta vía en el efecto anti-alodínico generado por el [6]-gingerol. Se observó que la administración i.t del pre-tratamiento con el inhibidor no selectivo de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME) (Gibson et al., 1990) y el inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ) (Moro et al., 1996) previenen de forma significativa el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que el efecto anti-alodínico del [6]-gingerol es modulado a través de la vía NO-GMP cíclico. Del mismo modo, la administración i.t del pre-tratamiento con glibenclamida (bloqueador de los canales de K⁺ sensibles a ATP) (Edwards y Weston, 1993; Mixcoatl-Zecuatl et al., 2006) previene de manera significativa el efecto anti-alodínico generado por el [6]-gingerol. En conjunto, estos datos sugieren que el [6]-gingerol produce su efecto anti-alodínico al favorecer la vía NO-GMPc canales de K⁺ sensibles al ATP.

Nuestros datos están de acuerdo con reportes que demuestran que el NO estimula los canales de K⁺ sensibles a ATP en neuronas del GRD de ratas axotomizadas, probablemente, favoreciendo la hiperpolarización y anti-nocicepción (Kawano et al., 2009). Además, inhibidores selectivos y no selectivos de la sintasa del óxido nítrico disminuyen la alodinia mecánica y fría, así como la hiperalgesia térmica en ratas neuropáticas (Meller et al., 1992; Yoon et al., 1998; Mabuchi et al., 2003; De Alba et al., 2006; Chacur et al., 2010). En contraste, el NO media las conductas nociceptivas inducidas por el dolor neuropático en la médula espinal (Meller y Gebhart, 1993). Además, el [6]-gingerol inhibe la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Dugasani et al., 2010). Las diferencias pueden deberse a las

condiciones experimentales. Cabe señalar que el NO puede tener un efecto dual sobre el procesamiento nociceptivo en la médula espinal (Cury et al., 2011). En este sentido, Las dosis bajas de SIN-1 reducen la alodinia mecánica inducida por la ligadura del nervio ciático, mientras que las dosis más altas aumentan la alodinia mecánica o no tienen ningún efecto (Sousa y Prado, 2001). Las discrepancias pueden deberse a las diferencias en las dosis de donantes de NO, el modelo de dolor utilizado para la evaluación y al tipo de animales de experimentación utilizados en los diferentes estudios (Cury et al., 2011).

7.2. Posible participación de la vía opioidérgica en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol

La administración i.t del pre-tratamiento con naloxona (50 µg/rata) (Izquierdo et al., 2013) no fue capaz de prevenir el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas. La falta de efecto no puede atribuirse a la dosis administrada de naloxona debido a que diversos reportes demuestran que la administración de 50 µg/rata de naloxona bloquea a los receptores opioidérgicos (Doi y Jurna, 1982; Thomas et al., 1992; Zahn et al., 1997). Además, se ha demostrado que la naloxona es un antagonista no selectivo de los receptores opioides μ , κ , y δ (Codd et al, 1995). Por lo tanto, los datos obtenidos bajo nuestro modelo experimental sugieren que los receptores opioides no participan en el efecto anti-alodínico inducido por la administración de [6]-gingerol a nivel espinal.

La falta de efecto del sistema opioidérgico en el dolor neuropático se puede deber a los siguientes factores:

- 1) Debido a una alteración y reducción en el número de receptores opioides como resultado de una degeneración de las neuronas aferentes primarias causada por la lesión en el nervio dañado (Ossipov et al., 1996; Courteix et al., 2004).
- 2) Debido a una alteración en la transducción de señales como resultado de un mal acoplamiento con las proteínas Gi (Stevens et al., 1991; Zhang et al., 1998).

- 3) Debido a la desensibilización de los receptores opioides mediante la activación constante de los receptores NMDA (Arden et al., 1995).
- 4) Debido a una reducción en el efecto de los receptores opioides debido a la sobreproducción de NO (Reis et al., 2000).
- 5) Debido a la generación del fenómeno de tolerancia (Hoffmann y Wiesenfeld-Hallin, 1994; Stanfa et al., 1994; Mao et al., 1995).
- 6) En condiciones patológicas la colecistocinina puede activar directa o indirectamente las neuronas de la MRV facilitadoras del dolor a través de los receptores CCK2 (Zhang et al., 2009).

7.3. Posible participación de la vía serotoninérgica en el efecto anti-alodínico del [6]-gingerol

En contraste con la naloxona, el pre-tratamiento i.t con metiotepina, antagonista no selectivo de los receptores serotoninérgicos, bloquea significativamente el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas. Dado que la metiotepina muestra una alta afinidad por los subtipos de receptores 5-HT_{1/2/5/7} (Hoyer et al., 1994). Nuestros datos sugieren que el sistema serotoninérgico participa en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas con la ligadura de los nervios espinales L5-L6. La implicación del sistema serotoninérgico en el procesamiento del dolor es compleja ya que la 5-HT puede inhibir y/o facilitar la transmisión nociceptiva dependiendo del tipo de estímulo nociceptivo y la naturaleza de los receptores de 5-HT expresados a nivel periférico y central (Millan, 2002). Se sabe que la MRV es un componente importante del sistema modulador descendente que constituye un mecanismo importante en el control de la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Basbaum y Fields, 1984, Millner, 2002, Dubner y Ren, 2004). Por lo tanto, la activación tónica de las influencias facilitadoras descendentes esta estrechamente relacionada con la hiperexcitabilidad neuronal en el SNC en modelos animales de dolor persistente, lo que contribuye significativamente en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia en presencia de estados de dolor crónico después de generarse una lesión en nervios periféricos (Porreca Et al., 2002, Suzuki et al., 2004, Ren y Dubner, 2002, 2007). Se ha

observado que la administración i.t de 5-HT, *per se*, sobre la médula espinal revierte la alodinia mecánica en ratas con ligadura de los nervios espinales (Bardin et al., 1997; Sanchez et al., 2005). El efecto anti-alodínico de la 5-HT se ha atribuido a la activación de los receptores 5-HT_{1/5} (Muñoz-Islas et al., 2014; Avila-Rojas et al., 2015). En contraste, los receptores 5-HT_{2/7} se han asociado con efectos pronociceptivos (Amaya-Castelanos et al., 2011; Bardin et al., 1997; Meuser et al., 2002; Thibault et al., 2008; Nakai et al., 2010). Aunque estos datos no concuerdan con lo reportado con (Brenchat et al., 2010; Li et al., 2014). En consecuencia, nuestros datos sugieren que el [6]-gingerol reduce la alodinia mecánica por activación de los receptores espinales 5-HT₁ y 5-HT₅. Nosotros encontramos que los antagonistas selectivos 5-HT_{1A} (WAY-100635, Laporte et al., 1994), 5-HT_{1B} (SB-224289, Gaster et al., 1998), 5-HT_{1D} (BRL-15572, Hagan et al., 1997) y 5-HT_{5A} (SB-699551, Corbett et al., 2005) son capaces de revertir la alodinia mecánica inducida por la administración i.t. de [6]-gingerol en ratas neuropáticas. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que el pre-tratamiento i.t. con [6]-gingerol podría ejercer su efecto anti-alodínico vía la activación de los receptores 5-HT_{1A/1B/1D} y 5-HT_{5A}, generando una hiperpolarización de la membrana, evitando así el envío de la señal nociceptiva y, por lo tanto, una disminución en la sensación dolorosa en ratas.

7.4. Posible participación del canal TRPV1 en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol

Por último, se observó que el pre-tratamiento i.t. con los bloqueadores selectivos del canal TRPV1, el AMG 9810 y el BCTC (Gavva et al., 2005; Kanai et al., 2007) previenen significativamente el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol. Teniendo en cuenta, que el [6]-gingerol es un análogo estructural de la capsaicina (Gauthier et al., 2013) y recientemente se demostró que es un agonista del receptor TRPV1 (Ohbuchi et al., 2016). Esta información nos hace suponer que el [6]-gingerol podrá ejercer su efecto anti-alodínico vía mecanismos muy parecidos a los producidos por capsaicina. Estudios recientes demuestran que la administración i.t. de capsaicina atenúa la hiperalgesia térmica en ratas neuropáticas, modelo CCI (Zhang K, 2014). El efecto anti-alodínico inducido por capsaicina pudiera explicarse

vía la desensibilización y/o internalización del canal TRPV1 (De Petrocellis et al., 2001; Prescott y Julius, 2003) por los siguientes mecanismos:

1) La fosforilación inducida mediante la participación de algunas quinasas incluyendo la PKA (De Petrocellis et al., 2001; Rathee et al., 2002; Vlachová et al., 2003), la PKC (Premkumar et al., 2004; Varga et al., 2006) y la quinasa II dependiente del complejo generado por calcio calmodulina (CaMKII) (Jung et al., 2004). Estas quinasas generan fosforilaciones que sensibilizan las respuestas del canal TRPV1 a los diversos agonistas que lo activan.

2) El inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) fue propuesto inicialmente como un modulador inhibitorio de la actividad de TRPV1. La activación de receptores metabotrópicos activa a la fosfolipasa C (PLC) que usa a PIP_2 como sustrato y lo hidroliza produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). Esta hidrólisis de PIP_2 conduciría a la activación de TRPV1 (Chuang et al., 2001). Se ha propuesto que la desensibilización del canal se debe principalmente al agotamiento de los niveles de PIP_2 en la membrana celular (Prescott y Julius, 2003), esto genera como consecuencia la sensibilización del canal TRPV1 por PIP_2 , por una respuesta dependiente de la concentración del estímulo aplicado (Lukacs et al., 2007). Sin embargo, se necesitan realizar más estudios que ayuden a dilucidar el posible mecanismo por el cual el [6]-gingerol ejerce su efecto anti-alodínico vía TRPV1.

Al parecer el [6]-gingerol induce anti-nocicepción a través de la activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A/1B/1D} y 5A, así como vía la activación NO-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP. Es probable que el [6]-gingerol pueda activar todas estas vías por la estimulación de un blanco en común. Cabe señalar que los receptores 5-HT_{1A/1B/1D} y 5A están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (proteína Gi/o) y su activación abre y cierra canales de K⁺ y Ca²⁺, respectivamente, resultando en hiperpolarización y consecuentemente produce anti-nocicepción (Rocha-González et al., 2009; Jeong et al., 2012). Además, se sabe que la subunidad $\beta\gamma$ de los receptores acoplados a una proteína Gi promueve la activación de la vía de señalización PI3K/ PI3K γ que consecuentemente, estimula la vía NO-

GMPC-Canales de K^+ sensibles a ATP (Cunha et al., 2009,2012). Esta vía puede causar la hiperpolarización de neuronas nociceptivas. Por lo tanto, es posible especular que el [6]-gingerol pueda ejercer su efecto anti-alodínico a través de la activación inicial de la proteína G_i y de manera directa o indirecta promueva la activación vía la NO-GMPC-Canales de K^+ sensibles a ATP. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos que nos ayuden a sustentar esta hipótesis.

8. Conclusiones

1. La administración intratecal de [6]-gingerol reduce de manera dosis-dependiente la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6.
2. La administración intratecal de una dosis de 10 μ g/rata de [6]-gingerol es capaz de reducir la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 incluso de forma superior a la gabapentina, un fármaco anti-epiléptico de primera línea ampliamente utilizado a nivel de clínica para el tratamiento del dolor neuropático.
3. El efecto anti-alodínico del [6]-gingerol puede estar mediado por la participación de la vía del NO-GMPc-canales de K⁺ sensibles a ATP, el sistema serotoninérgico implicando la activación de los receptores 5-HT_{1A/1B/1D} y 5A a nivel central. Por otra parte, los datos también sugieren la posible participación de los canales TRPV1 para generar su efecto anti-nociceptivo. Por último, se descarta la participación del sistema opioidérgico en el efecto anti-alodínico inducido por el [6]-gingerol en ratas neuropáticas.
4. En conjunto, todas las evidencias anteriores expuestas sugieren que el [6]-gingerol puede ser un buen candidato para el manejo y tratamiento del dolor neuropático.

9. Bibliografía

- Abacioğlu N, Ozmen R, Cakici I, Tunçtan B, Kanzik I (2001) Role of L-arginine/nitric oxide pathway in the antinociceptive activities of morphine and mepyramine in mice. *Arzneimittelforschung* 51:977–983.
- Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 32:31–36.
- Ahlbeck K (2011) Opioids: a two-faced Janus. *Curr Med Res Opin* 27:439–448.
- Aira Z, Buesa I, Salgueiro M, Bilbao J, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ (2010) Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury. *Neuroscience* 168:831–841.
- Aktan F, Hennes S, Tran VH, Duke CC, Roufogalis BD, Ammit AJ (2006) Gingerol metabolite and a synthetic analogue Capsarol inhibit macrophage NF-kappaB-mediated iNOS gene expression and enzyme activity. *Planta Med* 72:727–734.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2008) *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 3rd edition. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 2:S1-209.
- Al-Hasani R, Bruchas MR (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115:1363–1381.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000:40–56.
- Altman RD, Marcussen KC (2001) Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 44:2531–2538.
- Alves DP, Soares AC, Francischi JN, Castro MSA, Perez AC, Duarte IDG (2004) Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K⁺ channels, and sodium nitroprusside and

- dibutyryl-cGMP. *Eur J Pharmacol* 489:59–65.
- Amaya-Castellanos E, Pineda-Farias JB, Castañeda-Corral G, Vidal-Cantú GC, Murbartián J, Rocha-González HI, Granados-Soto V (2011) Blockade of 5-HT₇ receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 99:591–597.
 - Anbar M, Gratt BM (1997) Role of nitric oxide in the physiopathology of pain. *J Pain Symptom Manage* 14:225–254.
 - Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 127:183–198.
 - Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lamah J, Sadée W (1995) Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* 65:1636–1645.
 - Arora D, Rani A, Sharma A (2013) A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn Rev* 7:179–187.
 - Attal N (2012) Neuropathic pain: mechanisms, therapeutic approach, and interpretation of clinical trials. *Contin Minneap Minn* 18:161–175.
 - Attal N (2013) [Pharmacological treatment of neuropathic pain in primary care]. *Rev Prat* 63:795–802.
 - Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, European Federation of Neurological Societies (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 17:1113-e88.
 - Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, Fermanian J, Bouhassira D (2011) The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain* 152:2836–2843.
 - Avila-Rojas SH, Velázquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Granados-Soto V (2015) Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res* 1622:377–385.

- Balazs L, Leon M (1994) Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res* 19:1131–1137.
- Bardin L, Bardin M, Lavarenne J, Eschalier A (1997) Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp Brain Res* 113:81–87.
- Bardin L (2011) The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol* 22:390–404.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152.
- Baron R, Mayoral V, Leijon G, Binder A, Steigerwald I, Serpell M (2009) Efficacy and safety of 5% lidocaine (lignocaine) medicated plaster in comparison with pregabalin in patients with postherpetic neuralgia and diabetic polyneuropathy: interim analysis from an open-label, two-stage adaptive, randomized, controlled trial. *Clin Drug Investig* 29:231–241.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139:267–284.
- Basso L, Altier C (2016) Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 32:9–15.
- Bhawe G, Hu H-J, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW (2003) Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci* 100:12480–12485.
- Bingham S, Davey PT, Sammons M, Raval P, Overend P, Parsons AA (2001) Inhibition of inflammation-induced thermal hypersensitivity by sumatriptan through activation of 5-HT(1B/1D) receptors. *Exp Neurol* 167:65–73.
- Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA (1998) The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 19:141–147.
- Bodnar RJ (2007) Endogenous Opiates and Behavior: 2006. *Peptides* 28:2435–2513.

- Bordia A, Verma SK, Srivastava KC (1997) Effect of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56:379–384.
- Brenchat A, Nadal X, Romero L, Ovalle S, Muro A, Sánchez-Arroyos R, Portillo-Salido E, Pujol M, Montero A, Codony X, Burgueño J, Zamanillo D, Hamon M, Maldonado R, Vela JM (2010) Pharmacological activation of 5-HT₇ receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain* 149:483–494.
- Burnstock G, Wood JN (1996) Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6:526–532.
- Campbell JN, Meyer RA (2006) Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron* 52:77–92.
- Caterina MJ, Julius D (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487–517.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- Cervantes-Durán C, Rocha-González HI, Granados-Soto V (2013) Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in the pronociceptive and antinociceptive effects of fluoxetine in rats. *Neuroscience* 252:396–409.
- Cervantes-Durán C, Vidal-Cantú GC, Godínez-Chaparro B, Granados-Soto V (2016) Role of spinal 5-HT₂ receptors subtypes in formalin-induced long-lasting hypersensitivity. *Pharmacol Rep PR* 68:434–442.
- Chacur M, Matos RJB, Alves AS, Rodrigues AC, Gutierrez V, Cury Y, Britto LRG (2010) Participation of neuronal nitric oxide synthase in experimental neuropathic pain induced by sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 43:367–376.

- Chaparro LE, Wiffen PJ, Moore RA, Gilron I (2012) Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*:CD008943.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55–63.
- Chen Y, Boettger MK, Reif A, Schmitt A, Üçeyler N, Sommer C (2010) Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Mol Pain* 6:13.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44:8–12.
- Chen Y, Oatway MA, Weaver LC (2009) Blockade of the 5-HT₃ receptor for days causes sustained relief from mechanical allodynia following spinal cord injury. *J Neurosci Res* 87:418–424.
- Childers SR, Creese I, Snowman AM, Snyder SH (1979) Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides. *Eur J Pharmacol* 55:11–18.
- Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3:115–121.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411:957–962.
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524.
- Clark AK, Old EA, Malcangio M (2013) Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res* 6:803–814.
- Codd EE, Shank RP, Schupsky JJ, Raffa RB (1995) Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 274:1263–1270.

- Colpaert FC, Wu W-P, Hao J-X, Royer I, Sautel F, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu X-J (2004) High-efficacy 5-HT_{1A} receptor activation causes a curative-like action on allodynia in rats with spinal cord injury. *Eur J Pharmacol* 497:29–33.
- Connell DW, Sutherland MD, Connell DW, Sutherland MD (1969) A re-examination of gingerol, shogaol, and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), A re-examination of gingerol, shogaol, and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Aust J Chem Aust J Chem* 22, 22:1033, 1033–1043, 1043.
- Contestabile A (2001) Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr Top Med Chem* 1:553–568.
- Corbett DF, Heightman TD, Moss SF, Bromidge SM, Coggon SA, Longley MJ, Roa AM, Williams JA, Thomas DR (2005) Discovery of a potent and selective 5-HT_{1A} receptor antagonist by high-throughput chemistry. *Bioorg Med Chem Lett* 15:4014–4018.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic Pain. *Annu Rev Neurosci* 32:1–32.
- Costigan M, Woolf CJ (2000) Pain: molecular mechanisms. *J Pain Off J Am Pain Soc* 1:35–44.
- Courteix C, Coudoré-Civiale M-A, Privat A-M, Pélissier T, Eschalier A, Fialip J (2004) Evidence for an exclusive antinociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, in two animal models of neuropathic pain. *Pain* 110:236–245.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689–695.
- Codd EE, Shank RP, Schupsky JJ, Raffa RB (1995) Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 274:1263–1270.
- Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, Souza GR, Verri WA, Funez MI, Dias QM, Schivo IR, Domingues AC, Sachs D, Chiavegatto S,

- Teixeira MM, Hothersall JS, Cruz JS, Cunha FQ, Ferreira SH (2010) Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4442–4447.
- Cunha TM, Souza GR, Domingues AC, Carreira EU, Lotufo CM, Funez MI, Verri WA, Cunha FQ, Ferreira SH (2012) Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol Pain* 8:10.
 - Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide Biol Chem* 25:243–254.
 - D'Amours F (1996) Postoperative Pain Management. *J Orthop Sports Phys Ther* 24:227–236.
 - de Los Monteros-Zuñiga AE, Izquierdo T, Quiñonez-Bastidas GN, Rocha-González HI, Godínez-Chaparro B (2016) Anti-allodynic effect of mangiferin in neuropathic rats: Involvement of nitric oxide- cyclic GMP-ATP sensitive K(+) channels pathway and serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav.*
 - De Petrocellis L, Harrison S, Bisogno T, Tognetto M, Brandi I, Smith GD, Creminon C, Davis JB, Geppetti P, Di Marzo V (2001) The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 77:1660–1663.
 - Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ (2004) Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *Eur J Pharmacol* 484:193–199.
 - Dixon WJ (1965) The Up-and-Down Method for Small Samples. *J Am Stat Assoc* 60:967–978.
 - Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441–462.
 - Doi T, Jurna I (1982) Intrathecal pentobarbital prevents naloxone-induced facilitation of the tail-flick response in the rat. *Neurosci Lett* 32:81–84.

- Doly S, Fischer J, Salio C, Conrath M (2004) The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci Lett* 357:123–126.
- Dray A (1995) Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75:125–131.
- Du X, Wang C, Zhang H (2011) Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. *Mol Pain* 7:35.
- Dubner R, Ruda MA (1992) Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* 15:96–103.
- Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN (2010) Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol* 127:515–520.
- Edwards G, Weston AH (1993) Induction of a glibenclamide-sensitive K-current by modification of a delayed rectifier channel in rat portal vein in insulinoma cells. *Br J Pharmacol* 110:1280–1281.
- Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidmeier H, Fischer W (2007) The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research--evolving concepts in management of pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 560:1–8.
- Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A, Planells-Cases R, Fernández-Ballester G, González-Ros JM, Messeguer A, González-Muñiz R (2012) Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat* 22:999–1017.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565–575.
- Finnerup NB et al. (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *Lancet Neurol* 14:162–173.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DLH, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Raja SN, Rice

- ASC, Serra J, Smith BH, Treede R-D, Jensen TS (2016) Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain* 157:1599–1606.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118:289–305.
 - Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertens Dallas Tex* 1979 23:1121–1131.
 - Förstermann U, Li H (2011) Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol* 164:213–223.
 - Freire MAM, Guimarães JS, Leal WG, Pereira A (2009) Pain Modulation by Nitric Oxide in the Spinal Cord. *Front Neurosci* 3:175–181.
 - Gao, Ji R-R (2010) Targeting Astrocyte Signaling for Chronic Pain. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 7:482–493.
 - Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K (2007) Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* 131:262–271.
 - Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27:2783–2802.
 - Gauthier M-L, Beaudry F, Vachon P (2013) Intrathecal [6]-gingerol administration alleviates peripherally induced neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytother Res PTR* 27:1251–1254.
 - Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis J-C, Treanor JJS (2005) AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 313:474–484.

- Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 63:793–807.
- Gibson A, Mirzazadeh S, Hobbs AJ, Moore PK (1990) L-NG-monomethyl arginine and L-NG-nitro arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol* 99:602–606.
- Godínez-Chaparro B, Barragán-Iglesias P, Castañeda-Corral G, Rocha-González HI, Granados-Soto V (2011) Role of peripheral 5-HT(4), 5-HT(6), and 5-HT(7) receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 152:687–697.
- Godínez-Chaparro B, López-Santillán FJ, Argüelles CF, Villalón CM, Granados-Soto V (2013) Role of 5-HT_{1B/1D} receptors in the reduction of formalin-induced nociception and secondary allodynia/hyperalgesia produced by antimigraine drugs in rats. *Life Sci* 92:1046–1054.
- Goicoechea García C, Fontelles M, Isabel M (2009) Sistemas cannabinoide y opioide en los mecanismos y el control del dolor. *Reumatol Clínica* 5:5–8.
- Gomezese Ribero Ó, Ribero ÓFG, Olaya HLG (2001) Dolor: una mirada introductoria. *MedUNAB* 4.
- Govindarajan VS (1982) Ginger chemistry, technology, and quality evaluation: part 1. *Crit Rev Food Sci Nutr* 17:1–96.
- Granados-Soto V, Argüelles CF, Rocha-González HI, Godínez-Chaparro B, Flores-Murrieta FJ, Villalón CM (2010) The role of peripheral 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience* 165:561–568.
- Granados-Soto V, Rufino MO, Gomes Lopes LD, Ferreira SH (1997) Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 340:177–180.
- Grant KL, Lutz RB (2000) Ginger. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm* 57:945–947.
- Grover AK, Samson SE (2016) Benefits of antioxidant supplements for knee

osteoarthritis: rationale and reality. *Nutr J* 15:1.

- Guénette SA, Ross A, Marier J-F, Beaudry F, Vachon P (2007) Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* 562:60–67.
- Hagan JJ, Slade PD, Gaster L, Jeffrey P, Hatcher JP, Middlemiss DN (1997) Stimulation of 5-HT_{1B} receptors causes hypothermia in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 331:169–174.
- Hans G, Sabatowski R, Binder A, Boesl I, Rogers P, Baron R (2009) Efficacy and tolerability of a 5% lidocaine medicated plaster for the topical treatment of post-herpetic neuralgia: results of a long-term study. *Curr Med Res Opin* 25:1295–1305.
- Hayman M, Kam PCA (2008) Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Curr Anaesth Crit Care* 19:338–343.
- Hempenstall K, Nurmikko TJ, Johnson RW, A'Hern RP, Rice ASC (2005) Analgesic therapy in postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *PLoS Med* 2:e164.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291–366.
- Hobbs AJ, Ignarro LJ (1996) Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol* 269:134–148.
- Hoffmann O, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) The CCK-B receptor antagonist CI 988 reverses tolerance to morphine in rats. *Neuroreport* 5:2565–2568.
- Hollenberg SM, Cinel I (2009) Bench-to-bedside review: Nitric oxide in critical illness – update 2008. *Crit Care* 13:218.
- Houghton P (2007) Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. *Br J Clin Pharmacol* 64:248.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology

- classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157–203.
- Huang H-C, Chiu S-H, Chang T-M (2011) Inhibitory effect of [6]-gingerol on melanogenesis in B16F10 melanoma cells and a possible mechanism of action. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1067–1072.
 - Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4:197–206.
 - Huang Y-G, Zhang Q, Wu H, Zhang C-Q (2016) A Comparison of Surgical Invasions for Spinal Nerve Ligation with or without Paraspinal Muscle Removal in a Rat Neuropathic Pain Model. *BioMed Res Int* 2016:6741295.
 - Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J (2001) VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* 13:2105–2114.
 - Huie CW (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem* 373:23–30.
 - Inagaki N, Gono T, Iv JPC, Wang C-Z, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996) A Family of Sulfonylurea Receptors Determines the Pharmacological Properties of ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Neuron* 16:1011–1017.
 - Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S (1995) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* 270:5691–5694.
 - Ippoushi K, Azuma K, Ito H, Horie H, Higashio H (2003) [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Sci* 73:3427–3437.
 - Izquierdo T, Espinosa de los Monteros-Zuñiga A, Cervantes-Durán C, Lozada MC, Godínez-Chaparro B (2013) Mechanisms underlying the antinociceptive effect of mangiferin in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 718:393–400.

-
- Jenner P (1994) Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet Lond Engl* 344:796–798.
 - Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice ASC, Treede R-D (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152:2204–2205.
 - Jeong H-J, Mitchell VA, Vaughan CW (2012) Role of 5-HT(1) receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. *Br J Pharmacol* 165:1956–1965.
 - Ji RR, Woolf CJ (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 8:1–10.
 - Johansson L, Sohn D, Thorberg SO, Jackson DM, Kelder D, Larsson LG, Rényi L, Ross SB, Wallsten C, Eriksson H, Hu PS, Jerning E, Mohell N, Westlind-Danielsson A (1997) The pharmacological characterization of a novel selective 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor antagonist, NAD-299. *J Pharmacol Exp Ther* 283:216–225.
 - Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203–210.
 - Jung J, Shin JS, Lee S-Y, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U (2004) Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279:7048–7054.
 - Kanai Y, Hara T, Imai A, Sakakibara A (2007) Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *J Pharm Pharmacol* 59:733–738.
 - Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, Takagi H (1994) Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br J Pharmacol* 112:547–550.
 - Kawano T, Zoga V, Gemes G, McCallum JB, Wu H-E, Pravdic D, Liang M-Y, Kwok W-M, Hogan Q, Sarantopoulos C (2009a) Suppressed Ca²⁺/CaM/CaMKII-dependent K(ATP) channel activity in primary afferent neurons mediates hyperalgesia after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*

106:8725–8730.

- Kawano T, Zoga V, Kimura M, Liang M-Y, Wu H-E, Gemes G, McCallum JB, Kwok W-M, Hogan QH, Sarantopoulos CD (2009b) Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain* 5:12.
- Kessler W, Kirchhoff C, Reeh PW, Handwerker HO (1992) Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P. *Exp Brain Res* 91:467–476.
- Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA (2002) Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:9086–9098.
- Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou J-L, Lee I, Chung K, Chung JM (2006) Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *PAIN* 122:53–62.
- Kim HK, Park SK, Zhou J-L, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM (2004a) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111:116–124.
- Kim HK, Park SK, Zhou J-L, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM (2004b) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111:116–124.
- Kim J-K, Kim Y, Na K-M, Surh Y-J, Kim T-Y (2007) [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. *Free Radic Res* 41:603–614.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355–363.
- Kim S-H, Han S-Y, Azam T, Yoon D-Y, Dinarello CA (2005) Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α . *Immunity* 22:131–142.
- Kuang Q, Purhonen P, Hebert H (2015) Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci* 72:3677–3693.

- Langner E, Greifenberg S, Gruenwald J (1998) Ginger: history and use. *Adv Ther* 15:25–44.
- Laporte AM, Lima L, Gozlan H, Hamon M (1994) Selective in vivo labelling of brain 5-HT_{1A} receptors by [³H] WAY 100635 in the mouse. *Eur J Pharmacol* 271:505–514.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain Off J Am Pain Soc* 10:895–926.
- Law PY, Wong YH, Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:389–430.
- Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V (2001) Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 426:39–44.
- Le Bars D (2009) Le Bars D, Cadden SW (2009) What is a wide-dynamic-range cell? In « The senses: a comprehensive reference » vol 5: Pain, Bushnell C, Basbaum AI (eds), Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 763-773.
- Lee I, Kim HK, Kim JH, Chung K, Chung JM (2007) The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133:9–17.
- Lewén A, Matz P, Chan PH (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17:871–890.
- Li S-F, Zhang Y-Y, Li Y-Y, Wen S, Xiao Z (2014) Antihyperalgesic effect of 5-HT₇ receptor activation on the midbrain periaqueductal gray in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 127:49–55.
- Li Z, Xu X, Leng X, He M, Wang J, Cheng S, Wu H (2016) Roles of reactive oxygen species in cell signaling pathways and immune responses to viral infections. *Arch Virol*:1–8.
- Liang MH (1992) From America: cookbook medicine or food for thought:

- practice guidelines development in the USA. *Ann Rheum Dis* 51:1257–1258.
- Lionnet L, Beaudry F, Vachon P (2010) Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytother Res PTR* 24:1645–1653.
 - Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54:905–918.
 - Lomberk G, Cruciani R, Urrutia R (2008) Primers on molecular pathways--pain and opioid receptors, I. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP AI* 8:544–545.
 - Lovkova MI, Buzuk GN, Sokolova SM, Kliment'eva NI (2001) [Chemistry of medicinal plants (review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 37:261–273.
 - Lovkova MY, Rabinovich AM, Ponomareva SM, Buzuk GN, Sokolova SM (1989) *Why do plants cure*. Nauka, Moscow, Russia.
 - Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44:151–162.
 - Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T (2007) Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:7070–7080.
 - Luo ZD, Chaplan SR, Scott BP, Cizkova D, Calcutt NA, Yaksh TL (1999) Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 19:9201–9208.
 - Ma QP, Woolf CJ (1995) Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain* 61:383–390.
 - Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995) Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 62:259–274.

- Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM (1998) Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 2:656–663.
- Marshall TM, Herman DS, Largent-Milnes TM, Badghisi H, Zuber K, Holt SC, Lai J, Porreca F, Vanderah TW (2012) Activation of descending pain-facilitatory pathways from the rostral ventromedial medulla by cholecystokinin elicits release of prostaglandin-E₂ in the spinal cord. *Pain* 153:86–94.
- Mascolo N, Jain R, Jain SC, Capasso F (1989) Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). *J Ethnopharmacol* 27:129–140.
- Mason P, Fields HL (1989) Axonal trajectories and terminations of on- and off-cells in the cat lower brainstem. *J Comp Neurol* 288:185–207.
- McCleskey EW, Gold MS (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61:835–856.
- McNicol E, Horowicz-Mehler N, Fisk RA, Bennett K, Gialeli-Goudas M, Chew PW, Lau J, Carr D, American Pain Society (2003) Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: a systematic review. *J Pain Off J Am Pain Soc* 4:231–256.
- Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ (1992) Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 50:7–10.
- Meller ST, Gebhart GF (1993) Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52:127–136.
- Mercadante S, Porzio G, Ferrera P, Aielli F, Adile C, Ficorella C, Giarratano A, Casuccio A (2012) Tapentadol in cancer pain management: a prospective open-label study. *Curr Med Res Opin* 28:1775–1779.
- Merskey (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6:249.
- Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32:197–200.

- Meuser T, Pietruck C, Gabriel A, Xie G-X, Lim K-J, Pierce Palmer P (2002) 5-HT₇ receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sci* 71:2279–2289.
- Miclescu A, Gordh T (2009) Nitric oxide and pain: “Something old, something new.” *Acta Anaesthesiol Scand* 53:1107–1120.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355–474.
- Miller C (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 1:REVIEWS0004.
- Mixcoatl-Zecuatl T, Medina-Santillán R, Reyes-García G, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V (2004) Effect of K⁺ channel modulators on the antiallodynic effect of gabapentin. *Eur J Pharmacol* 484:201–208.
- Mixcoatl-Zecuatl T, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V (2006) The nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channel pathway participates in the antiallodynic effect of spinal gabapentin. *Eur J Pharmacol* 531:87–95.
- Mixcoatl-Zecuatl T, Quinonez-Bastidas GN, Caram-Salas NL, Ambriz-Tututi M, Araiza-Saldana CI, Rocha-Gonzalez HI, Medina-Santillan R, Reyes-Garcia G, Granados-Soto V (2008) Synergistic antiallodynic interaction between gabapentin or carbamazepine and either benfotiamine or cyanocobalamin in neuropathic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30:431–441.
- Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A (2009) TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* 4:e7596.
- Mollereau C, Mouledous L (2000) Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* 21:907–917.
- Moncada S, Palmer RM (1991) Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* 15:16–19.

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1989) The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans* 17:642–644.
- Muñoz-Islas E, Vidal-Cantú GC, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Quiñonez-Bastidas GN, Pineda-Farias JB, Barragán-Iglesias P, Granados-Soto V (2014) Spinal 5-HT_{5A} receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 120:25–32.
- Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1480–1485.
- Nakagawa T, Kaneko S (2010) Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J Pharmacol Sci* 114:347–353.
- Nakai, K., Nakae, A., Oba, S., Mashimo, T., Ueda, K., (2010). 5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 14, 999–1006.
- Nicholson B (2003) Responsible prescribing of opioids for the management of chronic pain. *Drugs* 63:17–32.
- Nicholson R, Small J, Dixon AK, Spanswick D, Lee K (2003) Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 337:119–122.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165–217.
- Ohbuchi K, Mori Y, Ogawa K, Warabi E, Yamamoto M, Hirokawa T (2016) Detailed Analysis of the Binding Mode of Vanilloids to Transient Receptor Potential Vanilloid Type I (TRPV1) by a Mutational and Computational Study. *PloS One* 11:e0162543.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11285–11289.

- Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Müller-Esterl W (2006) Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 396:401–409.
- Olanow CW (1992) An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32 Suppl:S2-9.
- Ossipov MH, Kovelowski CJ, Wheeler-Aceto H, Cowan A, Hunter JC, Lai J, Malan TP, Porreca F (1996) Opioid antagonists and antisera to endogenous opioids increase the nociceptive response to formalin: demonstration of an opioid kappa and delta inhibitory tone. *J Pharmacol Exp Ther* 277:784–788.
- Pal PB, Sinha K, Sil PC (2013) Mangiferin, a natural xanthone, protects murine liver in Pb(II) induced hepatic damage and cell death via MAP kinase, NF- κ B and mitochondria dependent pathways. *PLoS One* 8:e56894.
- Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Berrino L, Rossi F, Maione S (2010) Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain* 6:66.
- Park EJ, Pezzuto JM (2002) Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 21:231–255.
- Park SA, Park I-H, Cho J-S, Moon Y-M, Lee SH, Kim TH, Lee SH, Lee H-M (2012) Effect of [6]-gingerol on myofibroblast differentiation in transforming growth factor beta 1-induced nasal polyp-derived fibroblasts. *Am J Rhinol Allergy* 26:97–103.
- Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ (1996) 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553–559.
- Premkumar LS, Qi Z-H, Van Buren J, Raisinghani M (2004) Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol* 91:1442–1449.
- Prescott ED, Julius D (2003) A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300:1284–1288.
- Price GW, Burton MJ, Collin LJ, Duckworth M, Gaster L, Göthert M, Jones BJ, Roberts C, Watson JM, Middlemiss DN (1997) SB-216641 and BRL-

15572--compounds to pharmacologically discriminate h5-HT1B and h5-HT1D receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:312–320.

- Quiñonez-Bastidas GN, Cervantes-Durán C, Rocha-González HI, Murbartían J, Granados-Soto V (2013) Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of epicatechin in diabetic rats. *Life Sci* 93:637–645.
- Rahman W, Bannister K, Bee LA, Dickenson AH (2011) A pronociceptive role for the 5-HT2 receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Brain Res* 1382:29–36.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang S-Y, Nau C, Kress M (2002) PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:4740–4745.
- Reis DJ, Regunathan S (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 21:187–193.
- Ren K, Hylden JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner R (1992) The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain* 50:331–344.
- Reshi ML, Su Y-C, Hong J-R (2014) RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int J Cell Biol* 2014:e467452.
- Rocha JC da S, Peixoto MEB, Jancar S, Cunha F de Q, Ribeiro R de A, Rocha FAC da (2002) Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* 136:588–596.
- Rocha-González HI, Ramírez-Aguilar M, Granados-Soto V, Reyes-García JG, Torres-López JE, Huerta-Cruz JC, Navarrete A (2014) Antineuropathic effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin in streptozotocin-induced diabetic rodents. *BMC Complement Altern Med* 14:129.
- Roth BL, Hanizavareh SM, Blum AE (2004) Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 174:17–24.

- Rusin KI, Giovannucci DR, Stuenkel EL, Moises HC (1997) Kappa-opioid receptor activation modulates Ca²⁺ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 17:6565–6574.
- Sandkühler J (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3:9.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 36:30–38.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:333–341.
- Scholz J, Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5:1062–1067.
- Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503–1506.
- Shukla Y, Singh M (2007b) Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 45:683–690.
- Silva NCC, Fernandes Júnior A (2010) Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Trop Dis* 16:402–413.
- Silveira JWS, Dias QM, Del Bel EA, Prado WA (2010) Serotonin receptors are involved in the spinal mediation of descending facilitation of surgical incision-induced increase of Fos-like immunoreactivity in rats. *Mol Pain* 6:17.
- Soares AC, Leite R, Tatsuo MA, Duarte ID (2000) Activation of ATP-sensitive K (+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol* 400:67–71.
- Sommer C (2006) Is serotonin hyperalgesic or analgesic? *Curr Pain Headache Rep* 10:101–106.
- Sousa AM, Prado WA (2001) The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res* 897:9–19.

- Stanfa L, Dickenson A, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme. *Trends Pharmacol Sci* 15:65–66.
- Stuehr DJ, Griffith OW (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65:287–346.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang Z-Q, Wei C-C, Adak S (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 279:36167–36170.
- Suh Y-G, Oh U (2005) Activation and activators of TRPV1 and their pharmaceutical implication. *Curr Pharm Des* 11:2687–2698.
- Szallasi A, Blumberg PM (1989) Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30:515–520.
- Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51:159–212.
- Szczudlik A, Dobrogowski J, Wordliczek J, Stępień A, Krajnik M, Leppert W, Woron J, Przeklasa-Muszyńska A, Kocot-Kępska M, Zajączkowska R, Janecki M, Adamczyk A, Malec-Milewska M (2014) Diagnosis and management of neuropathic pain: review of literature and recommendations of the Polish Association for the study of pain and the Polish Neurological Society - part one. *Neurol Neurochir Pol* 48:262–271.
- Tao L, Ding Q, Gao C, Sun X (2016) Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. *Int Immunopharmacol* 34:165–172.
- Thibault K, Van Steenwinckel J, Brisorgueil M-J, Fischer J, Hamon M, Calvino B, Conrath M (2008) Serotonin 5-HT_{2A} receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain* 140:305–322.
- Thomas DA, Oliveras JL, Maixner W, Dubner R (1992) Systemic morphine administration attenuates the perceived intensity of noxious heat in the monkey. *Pain* 49:129–135.

- Toriyabe M, Omote K, Kawamata T, Namiki A (2004) Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology* 101:983–990.
- Torrecilla M, Marker CL, Cintora SC, Stoffel M, Williams JT, Wickman K (2002) G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:4328–4334.
- Torrecilla M, Quillinan N, Williams JT, Wickman K (2008) Pre- and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: a study of GIRK-knockout mice. *Eur J Neurosci* 28:618–624.
- Treede R-D, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630–1635.
- Twining CM, Sloane EM, Milligan ED, Chacur M, Martin D, Poole S, Marsh H, Maier SF, Watkins LR (2004) Peri-sciatic proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, and complement induce mirror-image neuropathic pain in rats. *Pain* 110:299–309.
- Van der Kooy D, Hattori T (1980) Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain Res* 186:1–7.
- Varga A, Bölcskei K, Szöke E, Almási R, Czéh G, Szolcsányi J, Pethö G (2006) Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience* 140:645–657.
- Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T (1992) Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11617–11621.
- Viguier F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S (2013) Multiple roles of serotonin

- in pain control mechanisms--implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. *Eur J Pharmacol* 716:8–16.
- Viswanadhan VN, Sun Y, Norman MH (2007) Three-dimensional quantitative structure-activity relationships and activity predictions of human TRPV1 channel antagonists: comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity index analysis of cinnamides. *J Med Chem* 50:5608–5619.
 - Vlachová V, Teisinger J, Susánková K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklický L (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:1340–1350.
 - Vranken J (2009) Mechanisms and Treatment of Neuropathic Pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9:71–78.
 - Waldmann R, Lazdunski M (1998) H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 8:418–424.
 - Walia M, Samson SE, Schmidt T, Best K, Kwan CY, Grover AK (2003) Effects of peroxyntirite on pig coronary artery smooth muscle. *Cell Calcium* 34:69–74.
 - Wall PD, Devor M (1983) Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17:321–339.
 - Walter TL, Chau TT (1995) Antinociceptive activities of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) following intracerebroventricular (i.c.v.) and intrathecal (i.t.) administration in mice. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al* 44 Suppl 2:S133-134.
 - Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W (2010) Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:8624–8636.
 - Wink DA, Miranda KM, Espey MG (2000) Effects of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *Semin Perinatol* 24:20–23.

- Woolf CJ (2000) Pain. *Neurobiol Dis* 7:504–510.
- Woolf CJ (2004) Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann Intern Med* 140:441–451.
- Woolf CJ (2010) What is this thing called pain? *J Clin Invest* 120:3742–3744.
- Woolf CJ, Costigan M (1999) Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7723–7730.
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet* 353:1959–1964.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science* 288:1765–1768.
- Yonehara N, Kudo C, Kamisaki Y (2003) Involvement of NMDA-nitric oxide pathways in the development of tactile hypersensitivity evoked by the loose-ligation of inferior alveolar nerves in rats. *Brain Res* 963:232–243.
- Yang BH, Piao ZG, Kim Y-B, Lee C-H, Lee JK, Park K, Kim JS, Oh SB (2003) Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res* 82:781–785.
- Yoon YW, Sung B, Chung JM (1998) Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport* 9:367–372.
- Young H-Y, Luo Y-L, Cheng H-Y, Hsieh W-C, Liao J-C, Peng W-H (2005) Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J Ethnopharmacol* 96:207–210.
- Yu D, Cao Y, Mei X, Wang Y, Fan Z, Wang Y, Lv G (2014) Curcumin improves the integrity of blood-spinal cord barrier after compressive spinal cord injury in rats. *J Neurol Sci* 346:51–59.
- Zamponi GW, Snutch TP (2002) Modulating modulation: crosstalk between regulatory pathways of presynaptic calcium channels. *Mol Interv* 2:476–478.
- Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI (2002) The 5-HT₃ subtype of serotonin

receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:1010–1019.

- Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Bredt D, Synder SH, Hökfelt T (1993) Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335:563–575.
- Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hökfelt T (1998) Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 82:223–240.
- Zhang W, Gardell S, Zhang D, Xie JY, Agnes RS, Badghisi H, Hruby VJ, Rance N, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J (2009) Neuropathic pain is maintained by brainstem neurons co-expressing opioid and cholecystokinin receptors. *Brain J Neurol* 132:778–787.
- Zhang K, Ramamurthy S, Prihoda TJ, Eckmann MS (2014) Effect of delayed intrathecal administration of capsaicin on neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *J Pain Res* 7:547–554.
- Zhuo M (2007) Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain* 3:14.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.
- Zin CS, Nissen LM, Smith MT, O'Callaghan JP, Moore BJ (2008) An update on the pharmacological management of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *CNS Drugs* 22:417–442.