

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Proyecto asociado:

**Estudio de los mecanismos de acción que participan en el
efecto antialodínico inducido por dehidrodiisoeugenol en ratas
neuropáticas**

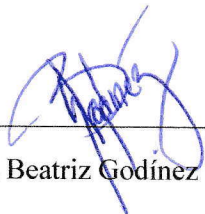
Proyecto Servicio social:

Alumna: Beatriz Cordova Alonso

Asesor interno: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

Asesor externo: Dra. Liliana Hernández Vázquez

Laboratorio: Farmacodinamia de inflamación y dolor, Edificio N, Lab 004.
Depto. Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco



Dra. Beatriz Godínez Chaparro



Dra. Liliana Hernández Vázquez

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	4
Dolor.....	4
Clasificación del dolor	4
Dolor neuropático	5
Tratamiento del dolor neuropático.....	5
Plantas medicinales	7
ANTECEDENTES PARTICULARES.....	7
Dehidrodiisoeugenol	7
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
METODOLOGÍA.....	11
Animales	11
Fármacos	11
Ligadura del nervio espinal (SNL).....	11
Método de up-down para determinar el umbral del retiro de la pata.....	12
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
RESULTADOS.....	14
Estandarización de la cirugía de nervios espinales L5-L6, así como el modelo conductual de up-down.....	14
Efecto de la administración intraperitoneal de Dehidrodiisoeugenol sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6	15
Efecto de la administración intraperitoneal de Licarina A (-) sobre la alodinia mecánica en ratas neuropáticas	16
Efecto de la administración intratecal de dehidrodiisoeugenol sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6	17
Efecto de la naloxona sobre el efecto antialodínico inducido por el dehidrodiisoeugenol en ratas neuropáticas.....	18
DISCUSIÓN	19

CONCLUSIÓN	20
REFERENCIAS.....	21

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos secundarios en tratamiento farmacológico del dolor neuropático. 7

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curso temporal de los grupos SNL, Sham y Naive. 16

Figura 2. Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intraperitoneal de dehidrodiisoeugenol en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL)..... 17

Figura 3. Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intraperitoneal de Licarina A (-) en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL)..... 18

Figura 4. Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intratecal de dehidrodiisoeugenol en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL)..... 19

Figura 5. Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intratecal de naloxona en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL)..... 20

RESUMEN

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico que se produce como resultado de una lesión o disfunción en el sistema nervioso central o periférico. Puede ser causado por una variedad de condiciones como, lesiones de la médula espinal, neuropatía diabética, herpes zóster, esclerosis múltiple, etc. El tratamiento para el dolor neuropático incluye el uso de una amplia gama de medicamentos como antiepilépticos, antidepresivos, opioides, lidocaína, entre otros, se distinguen en 3 líneas diferentes de tratamiento de acuerdo con su efectividad, pero al ser variado el paciente puede experimentar efectos secundarios por su ingesta. Por lo tanto, la búsqueda en tener nuevas moléculas naturales es para preservar el bienestar físico y mental del paciente.

El dehidrodiisoeugenol es un neolignano, se obtiene de diferentes familias de plantas como *Aristolochiaceae*, *Magnoliaceae* y *Piperaceae*, además, se aisló por primera vez de la corteza de *Myristica fragans* que ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas. En este estudio se determinó el efecto antialodínico de dehidrodiisoeugenol en un modelo de dolor neuropático en ratas. Para ello, las ratas fueron sometidas a una cirugía de ligadura de los nervios espinales L5-L6, con el fin de generar alodinia, siendo un síntoma característico del dolor neuropático. La administración intraperitoneal e intratecal de dehidrodiisoeugenol bloqueó de manera dosis dependiente la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales.

INTRODUCCIÓN

DEFINICIÓN DE DOLOR

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) propuso una nueva definición de dolor en 2020, definiéndolo como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada con daño tisular real o potencial (IASP, 2020).

El dolor es una experiencia sensorial multidimensional que es intrínsecamente desagradable y dañina (Woolf, 2004). En 1968, Mary Margo McCaffrey definió el dolor como “cualquier experiencia que la persona dice que es dolor, existiendo siempre que él o ella dice que lo es” (Vidal, 2020), dando importancia al componente subjetivo del dolor. Asimismo, aunque no exista lesión objetiva se valida el dolor como algo real (Vidal, 2020).

La importancia del dolor se debe a que es un mecanismo de defensa, es decir, una señal de alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo. A nivel neurofisiológico, la percepción del dolor necesita de la participación del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP). El dolor desencadena una serie de reacciones en ambos sistemas que permite la percepción del mismo, con la finalidad de disminuir la causa y limitar las consecuencias (Romera et al, 2000).

CLASIFICACIÓN DEL DOLOR

El dolor puede ser clasificado en tres categorías: Dolor Nociceptivo, Dolor Inflamatorio y Dolor Patológico.

- Dolor nociceptivo, es una respuesta protectora del cuerpo ante estímulos nocivos.
- Dolor inflamatorio, está asociado con daño tisular y la infiltración de células inmunitarias y puede promover la reparación al causar hipersensibilidad al dolor hasta que se produzca la curación.
- Dolor patológico, es un estado de enfermedad causado por daño al Sistema Nervioso periférico o central (neuropático) o por su función anormal (nociplástico) (Woolf, 2010).

DOLOR NEUROPÁTICO

Con respecto al dolor neuropático es un tipo de dolor crónico que se produce como resultado de una lesión o disfunción en el sistema nervioso central o periférico. Puede ser causado por una variedad de condiciones como, lesiones de la médula espinal, neuropatía diabética, herpes zóster, esclerosis múltiple, entre otras. El dolor neuropático se describe a menudo como una sensación de ardor, hormigueo, hinchazón o choque eléctrico y puede ser constante o intermitente. Además, el dolor neuropático se caracteriza por la presencia de hipersensibilidad del dolor como la alodinia y la hiperalgesia. La alodinia se refiere a una sensación dolorosa provocada por un estímulo que en condiciones normales es inocua, ante el tacto, presión suave, calor o frío moderado. Por otro lado, la hiperalgesia, se define como una respuesta exagerada a un estímulo doloroso de mayor duración e intensidad (Cruciani et al, 2006).

Es un tipo de dolor difícil de tratar y puede requerir una combinación de medicamentos y terapias para aliviar los síntomas (Woolf, 2002).

TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO

El tratamiento farmacológico empleado en el dolor neuropático incluye antiepilépticos, antidepresivos, opioides, lidocaína, entre otros. Tales medicamentos se distribuyen en diferentes líneas de tratamiento de acuerdo con su efectividad.

Estos se distinguen básicamente en 3 líneas de tratamiento:

- *Primera línea;* antidepresivos tricíclicos, antidepresivos duales, neuromoduladores y anestésicos locales.
- *Segunda línea;* opioides.
- *Tercera línea;* antiepilépticos, otros antidepresivos y cannabinoides (Gómez, 2015).

A pesar de la eficacia de algunos medicamentos, el paciente puede experimentar efectos secundarios por su ingesta. Como se muestra en la tabla 1, los síntomas secundarios por línea de tratamiento (Gómez, 2015).

Tabla 1. Efectos secundarios del tratamiento farmacológico del dolor neuropático.

Línea de tratamiento	Efectos secundarios
<i>Primera línea</i>	<ul style="list-style-type: none">- Antidepresivos tricíclicos (Amitriptilina, Fluoxetina, Imipramina, Citalopram); estreñimiento, sequedad de boca, retención urinaria, o incluso aumento de peso, confusión y trastornos cardíacos (Cruciani y Nieto 2006).- Antidepresivos duales; náuseas

	- Neuromoduladores (Gabapentina); somnolencia y mareo
<i>Segunda línea</i>	- Opioides (Tramadol, Metadona, Buprenorfina); náuseas, vómitos, estreñimiento y vértigos
<i>Tercera línea</i>	- Antiepilépticos (Carbamazepina, Clonazepán, Pregabalina); su eficacia es cuestionable, aunque es útil para tratar un tipo de dolor en específico. - Otros antidepresivos; eficacia limitada. - Cannabinoides; existe muy poca evidencia de su utilidad.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que cada caso de dolor neuropático es único, dependerá de la causa del dolor y la gravedad de los síntomas, por tanto, se puede requerir un enfoque para el tratamiento.

Con todo lo anterior, se busca el bienestar físico y mental del paciente. Por tanto, se indaga en tener nuevas moléculas naturales y una alternativa podría ser, la medicina herbaria, la cual se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad (Gallegos, 2016).

PLANTAS MEDICINALES

Así como hay tratamientos químicos también hay tratamientos naturales, es decir, plantas medicinales, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos

pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Bermúdez, et al, 2005).

Las plantas medicinales son fuente directa de agentes terapéuticos, o de intermediarios para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de fármacos sintéticos y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Akerlele, 1993).

ANTECEDENTES PARTICULARES

DEHIDRODIISOEUGENOL

El Dehidrodiisoeugenol (DHIE) con fórmula molecular, $C_{20}H_{22}O_4$, también conocido como Licarina A, es un neolignano perteneciente al grupo de los fenoles. Se obtiene comúnmente de diferentes familias de plantas como *Aristolochiaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae* y *Piperaceae*, además, se aisló por primera vez de la corteza de *Myristica fragans* en 1973. Aunque es bien sabido que el compuesto se puede encontrar en varias concentraciones (entre 0.08mg a 0.53mg/g planta) dependiendo de la especie. El DHIE es un cristal incoloro con un punto de fusión de 132°-133°C y con aroma intenso (Godínez, et al, 2022).

La creciente evidencia ha indicado que DHIE tiene una amplia gama de actividades biológicas como; propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas. Dicho lo anterior, hay estudios de toxicidad de DHIE (5mg/kg/ 21 días, subcutáneo) los cuales han demostrado tejidos normales de hígado y riñón, asimismo, las pruebas bioquímicas funcionales también fueron normales,

concluyendo que DHIE no produce efectos tóxicos, al menos en ratones (Godínez, et al, 2022).

Con respecto a la actividad antiinflamatoria, el DHIE inhibe la expresión de la COX-2, pero no la COX-1 en macrófagos murinos RAW264.7 y células RBL-2H3 cuando se estimula con lipopolisacárido (LPS) y dinitrofenil-albumina sérica humana (DNP-HAS) respectivamente. Asimismo, el DHIE disminuye los niveles de prostaglandina D2 (PGD2) en células RBL-2H3 estimuladas con (DNP-HAS) (Murakami et al, 2005). Teniendo en cuenta lo anterior, el DHIE puede ser un inhibidor de la expresión del gen COX-2 y en consecuencia inhibir la producción de PGD2 (Godínez, et al, 2022).

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es un problema frecuente en la sociedad, tan solo el dolor crónico afecta, aproximadamente, del 25% al 29% de la población en general a nivel mundial (Covarrubias et al., 2010). Dentro de los diferentes tipos de dolor, el de tipo neuropático es de gran relevancia debido a su prevalencia, por los síntomas que presenta, y los retos actuales en su manejo farmacológico. Se estima que la prevalencia del dolor neuropático se encuentra en un rango del 7% al 10% a nivel mundial (Colloca et al., 2017). Asimismo, el dolor neuropático se encuentra asociado con un aumento en la prescripción de medicamentos y a la búsqueda de atención médica por parte del paciente, quien padece este tipo de dolor suele experimentar un conjunto de síntomas como sensación de ardor, alodinia e hiperalgesia, tales síntomas suelen ser persistentes y tienden a volverse crónicos con el paso del tiempo, y estos síntomas no suelen ser mitigados con los

analgésicos comunes (Colloca et al., 2017). Tan solo en México los costos a la atención de los problemas del dolor corresponden al 3% del producto interno bruto, lo cual es mayor que el costo por enfermedades cardiovasculares y cáncer juntas (Miranda, 2017). Por ello, es importante la búsqueda de tratamientos efectivos que ayuden al manejo terapéutico adecuado de este tipo de dolor, lo que ha llevado a la exploración de nuevas alternativas farmacológicas. En este sentido, llama la atención el dehidrodiisoeugenol el cual es un compuesto que ha mostrado poseer efecto antiinflamatorio o potencial actividad antinociceptiva que se quiere explorar en este proyecto de investigación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antialodínico del tratamiento agudo de dehidrodiisoeugenol en ratas con lesión de los nervios espinales L5-L6. Así como la posible participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico inducido por (+/-) DHIE.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la administración intraperitoneal aguda de (+/-) dehidrodiisoeugenol y (-) dehidrodiisoeugenol sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - 1.1. Estandarizar la cirugía de la ligadura de los nervios espinales L5-L6 en ratas.

- 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.
- 1.3. Realizar una curva dosis-respuesta de la administración intratecal e intraperitoneal del (+/-) dehidrodiisoeugenol y (-) dehidrodiisoeugenol sobre la alodinia en ratas neuropáticas.
2. Analizar el posible mecanismo de acción que subyace el efecto antialodínico inducido por dehidrodiisoeugenol en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - 2.1 Determinar la participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico inducido por (+/-) dehidrodiisoeugenol en ratas con la ligadura de los nervios espinales L5-L6.
 - 2.2 Evaluar el efecto de la administración intratecal de naloxona (5-50 µg/rata).

METODOLOGÍA

ANIMALES

Los experimentos se realizaron en ratas machos de la cepa Wistar, con un peso de 160 a 180 gramos, con acceso libre a agua y alimentos antes de cada experimento. (Protocolo no.214 aprobado por el CICUAL). Los animales fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL-Bioterio) de la UAM-Xochimilco. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los Lineamientos y Estándares para la Investigación del Dolor Experimental en Animales y la NOM-062-ZOO-1999.

FÁRMACOS

El dehidrodiisoeugenol fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y tween, en donde, el porcentaje máximo en cada dosis era al 5% respectivamente, además, se agregó solución salina. Por otra parte, la naloxona fue disuelta en solución salina. El (+/-) y (-) dehidrodiisoeugenol fueron proporcionados por la Dra. Liliana Hernández Vázquez.

LIGADURA DEL NERVIO ESPINAL (SNL)

El modelo animal de mononeuropatía periférica propuesto por Kim y Chung en 1992 consiste en la ligadura del nervio espinal (SNL). En dicho modelo las ratas son anestesiadas y colocadas en posición prona (boca abajo) donde se afeita la espalda baja, luego se realiza una incisión larga de aproximadamente 2 cm a nivel de la cresta iliaca posterior, con la finalidad de acceder a los nervios espinales lumbares izquierdos (Espinosa de los Monteros, 2016). Los nervios espinales L5 y L6 se identifican y se separan meticulosamente del músculo librando el nervio espinal L4 adyacente y a continuación se ligan fuertemente distal del ganglio de la raíz dorsal (GRD) usando una sutura de seda (4,0) (Komori et al, 2007). Posteriormente, se suturó la incisión, y se les dio un periodo de recuperación de 14 días para su evaluación. Las ratas que presentaron alguna anomalía motora fueron descartadas para el estudio.

MÉTODO DE UP-DOWN PARA DETERMINAR EL UMBRAL DEL RETIRO DE LA PATA

El modelo experimental de ligadura del nervio espinal (SNL), típicamente estudia la alodinia e hiperalgesia inducidas mediante la aplicación de estímulos mecánicos

para determinar el grado de nocicepción del animal de experimentación (Gómez-Barrios, et al, 2009). Para la evaluación de las conductas nociceptivas, alodinia mecánica, se realizó mediante el método descrito por Chaplan (Chaplan, et al, 1994).

El 50% del umbral de retiro de la pata se determinó por el método de up-down detallado por Dixon y Chaplan (Dixon, 1965, Chaplan et al, 1994). Las pruebas se realizaron en grupos independientes de ratas (n=6), donde se cuantificó la alodinia mecánica en respuesta a los estímulos provocados con los filamentos de Von Frey, empleados sobre la superficie plantar de la extremidad posterior izquierda (Chaplan, et al, 1994). Para ejecutar este procedimiento, las ratas fueron colocadas de manera individual en cámaras transparentes de observación de acrílico transparente sobre una superficie de malla metálica 10 minutos antes de la evaluación de la alodinia mecánica para que las ratas se adaptaran en el entorno (Chaplan et al, 1994, & Mata, 2017). Para esto se aplicó un estímulo mecánico con ayuda de los filamentos de Von Frey, la fuerza de estos filamentos comprende desde los 0.4g hasta llegar a los 15g, dicho estímulo se puso durante 10 segundos en intervalos de 1 minuto. Cuando se reproducía una respuesta positiva de retiro de la pata se marcaba con una "X" en un formato (hoja especial para registrar los retiros de la pata) y se procedía a disminuir de manera progresiva al filamento inmediatamente inferior. Para que una respuesta se tomara como positiva tenía que ocurrir una retirada abrupta de la extremidad. Así mismo, cuando se obtenía una respuesta negativa ante el estímulo mecánico se marcaba con una "O" y se procedía a la aplicación de un filamento inmediatamente superior. Se tomaba como negativo cualquier otro comportamiento distinto al retiro de la pata (Mata, 2017).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas en grupos independientes (n=6) fueron utilizadas para cada estudio experimental. Con el propósito de estandarizar la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6, se realizó un curso temporal del umbral de retiro de la pata por el método de up-down, el día 14 posterior a la ligadura de los nervios espinales.

Con el propósito de determinar el posible efecto antialodínico de dehidrodiisoeugenol en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6. El día 14, día en el que el fenómeno de alodinia mecánica ha sido instaurado, se asignaron 6 grupos de ratas por compuesto, cada una de las cuales fueron administradas con una dosis aguda de dehidrodiisoeugenol por vía intraperitoneal (i.p.) (0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1, 10mg/kg) y por vía intratecal (i.t.) (1, 10µg/rata), así como del vehículo (DMSO 5% y Tween 5%), y un grupo falsamente operado (Sham) donde a los animales se les realizó la cirugía, se identificaron los nervios, pero no se ligaron.

Por otro lado, para determinar la posible participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico del dehidrodiisoeugenol en ratas con dolor neuropático se utilizó un antagonista no selectivo de los receptores opioides, naloxona (5-50µg/rata) (Doi y Jurna, 1982). El día 14 posterior a la cirugía de la ligadura de los nervios espinales, la naloxona y el dehidrodiisoeugenol se administraron juntos, es decir, en una sola aplicación, estos se administraron por vía intratecal, posteriormente, se realizó la evaluación de 30 a 240 minutos.

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN DE LA CIRUGÍA DE NERVIOS ESPINALES L5-L6, ASI COMO EL MODELO CONDUCTUAL DE UP-DOWN

La ligadura de los nervios espinales L5-L6 disminuyó el 50% del umbral de retiro de la pata en la extremidad inferior izquierda, comparado con el grupo Sham, lo cual indica la inducción de alodinia mecánica (Fig. 1).

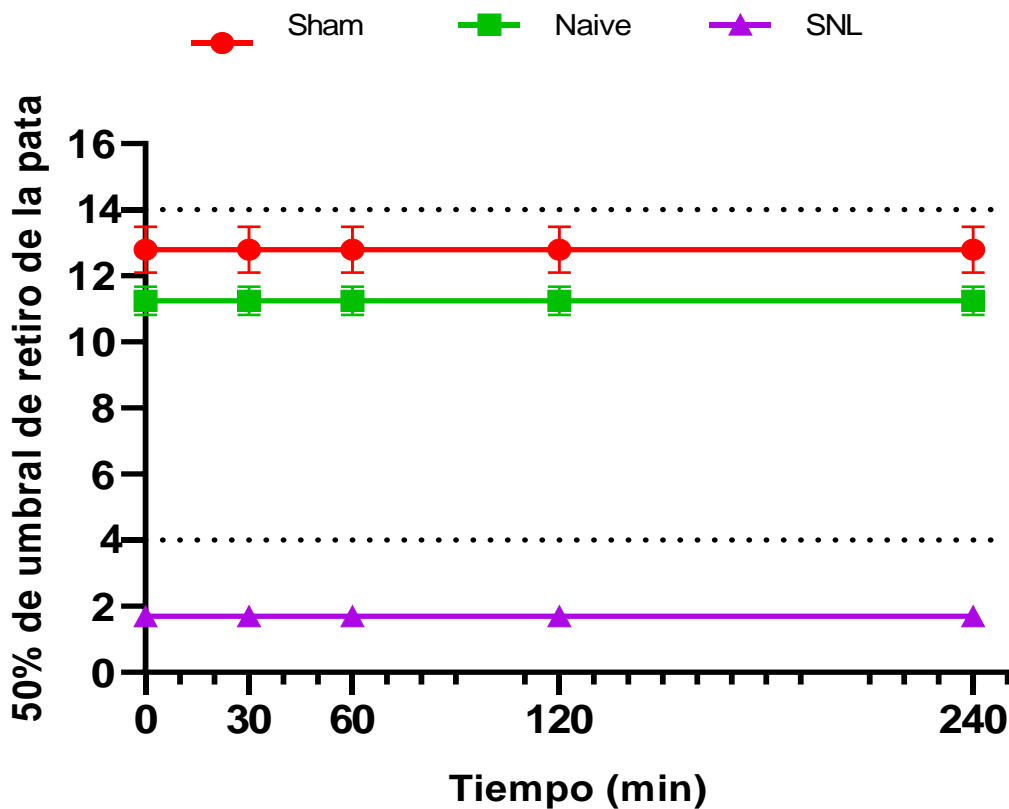


Figura 1. Curso temporal de los grupos SNL, Sham y Naive. Curso temporal del efecto antialodínico observado en ratas con ligadura de los nervios espinales (SNL) comparados con las ratas falsamente operadas (Sham) y las ratas sin tratamiento (Naive). El umbral de retiro de la pata se evaluó el día 14 posterior a la cirugía SNL en un lapso de tiempo de cuatro horas, es decir, 240 minutos.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE (+/-) DEHIDRODIISOEUGENOL SOBRE LA ALODINIA MECÁNICA INDUCIDA POR LA LIGADURA DE LOS NERVIOS ESPINALES L5-L6

La administración intraperitoneal (Fig. 2A y B) de dosis crecientes de dehidrodiisoeugenol (0.01-10mg/kg), pero no del vehículo, incrementa el umbral de retiro de la pata de manera dosis dependiente en ratas neuropáticas. La administración intraperitoneal de una dosis efectiva de gabapentina (100mg/kg), empleada como control positivo, revirtió la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Además, la dosis de 1mg/kg de dehidrodiisoeugenol produjo el 70% de efecto alodínico máximo (%MEP) comparado con gabapentina (60%) (Fig. 2B). El %MEP producido por la administración intraperitoneal de dehidrodiisoeugenol se percibió minutos después de la administración y este seguía teniendo efecto hasta los 240 minutos (1mg/kg) mientras que en la dosis (0.01mg/kg) se redujo gradualmente hasta las 4 horas (Fig. 2A).

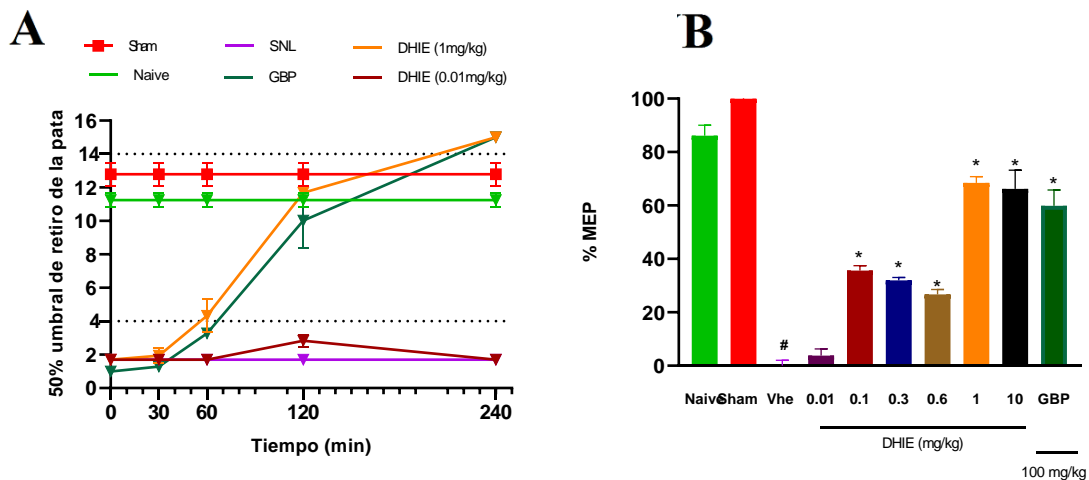


Figura 2. (A) Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intraperitoneal de dehidrodiisoeugenol en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). El umbral de retiro de la pata fue determinado el día 14 posterior a la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (%MEP) (B). Los datos se expresan como la media de 6 ratas por grupo. El valor de la # $P < 0.0001$ del grupo Vhe frente al grupo Sham,

El valor de la $*P < 0.0001$ del grupo Vhe vs los grupos (0.1, 0.3, 0.6, 1, 10 y GBP). Son los diferentes tratamientos determinados por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. Abreviaturas: GBP: gabapentina, DHIE: dehidrodiisoeugenol, Vhe: Vehículo.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE LICARINA A (-) SOBRE LA ALODINIA MECÁNICA EN RATAS NEUROPÁTICAS

La administración intraperitoneal (Fig. 3A y B) de dosis crecientes de Licarina A (-) (0.1 – 100mg/kg) incrementa ligeramente el umbral de retiro de la pata con la dosis de 100mg/kg a los 120 minutos, y va decayendo a los 240 minutos (fig. 3A). El %MEP producido por la administración intraperitoneal de Licarina A (-) se puede comprobar con un 19% de máximo efecto alodínico (fig. 2B), el cual es inferior al 70% de dehidrodiisoeugenol como se muestra en la (Fig. 2).

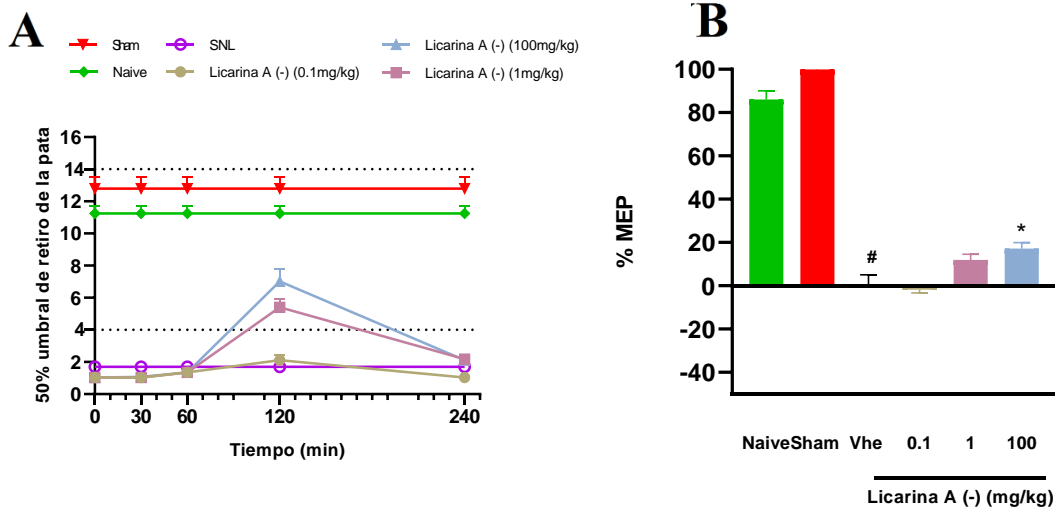


Figura 3. (A) Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intraperitoneal de Licarina A (-) en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). El umbral de retiro de la pata fue determinado el día 14 posterior a la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (%MEP). (B) Los datos se expresan como la media de 6 ratas por grupo. El valor de la # $P < 0.0001$ del grupo Vhe frente al grupo Sham, el valor de la $*P < 0.0208$ del grupo Vhe vs el grupo (100mg/kg), tratamiento determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE (+/-) DEHIDRODIISOEUGENOL SOBRE LA ALODINIA MECÁNICA INDUCIDA POR LA LIGADURA DE LOS NERVIOS ESPINALES L5-L6

La administración intratecal (Fig. 4) de dehidrodiisoeugenol de dosis (1-10 $\mu\text{g}/\text{rata}$) incrementa el umbral de retiro de la pata de manera dosis efectiva en ratas neuropáticas. Se observó que la dosis efectiva es de 10 $\mu\text{g}/\text{rata}$ a los 60 minutos y va incrementando hasta los 240 minutos, en contraste, con la dosis 1 $\mu\text{g}/\text{rata}$ donde el efecto máximo es a los 60 minutos, pero va decayendo a los 120 minutos hasta los 240 minutos (Fig. 4A). En el %MEP (Fig. 4B) se aprecia el 79% de (10 $\mu\text{g}/\text{rata}$) de efecto alodínico máximo, el cual es superior al 24% de la dosis (1 $\mu\text{g}/\text{rata}$).

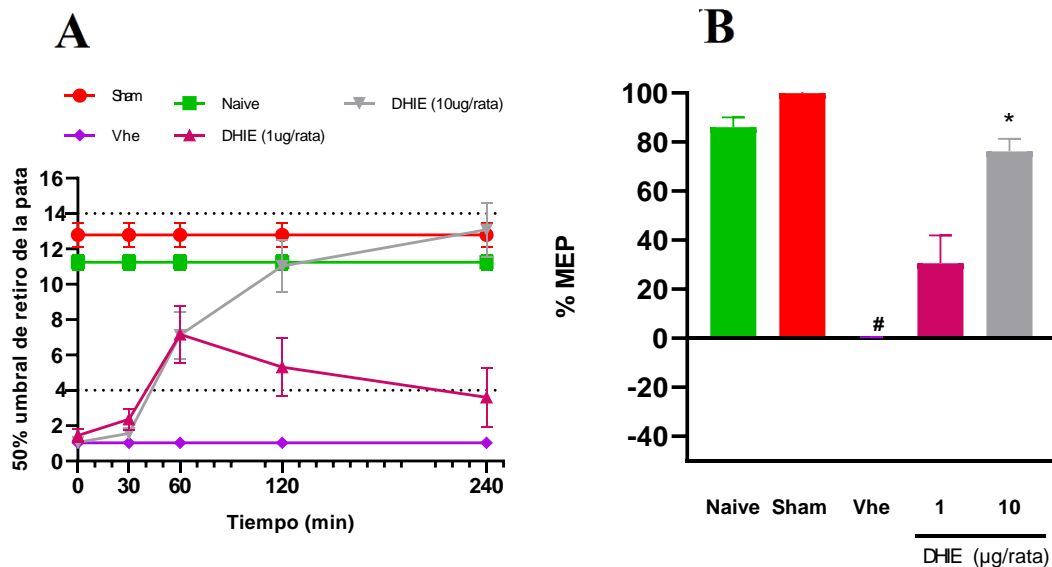


Figura 4. (A) Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intratecal de dehidrodiisoeugenol en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). El umbral de retiro de la pata fue determinado el día 14 posterior a la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (%MEP) (B). Los datos se expresan como la media de 6 ratas por grupo. El valor de la # $P < 0.0001$ del grupo Vhe frente al grupo Sham, el valor de la * $P < 0.0001$ del grupo Vhe vs el grupo (10 $\mu\text{g}/\text{rata}$) determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. Abreviaturas: DHIE: dehidrodiisoeugenol.

EFFECTO DE LA NALOXONA SOBRE EL EFECTO ANTIALODÍNICO INDUCIDO EL DEHIDRODIISOEUGENOL EN RATAS NEUROPÁTICAS

El tratamiento intratecal con naloxona (50µg/rata) (Fig. 5A) no produjo un cambio en la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Además, se aprecia que la naloxona (50µg/rata) no bloquea el efecto antialodínico inducido por el dehidrodiisoeugenol (10 µg/rata) (Fig. 5B).

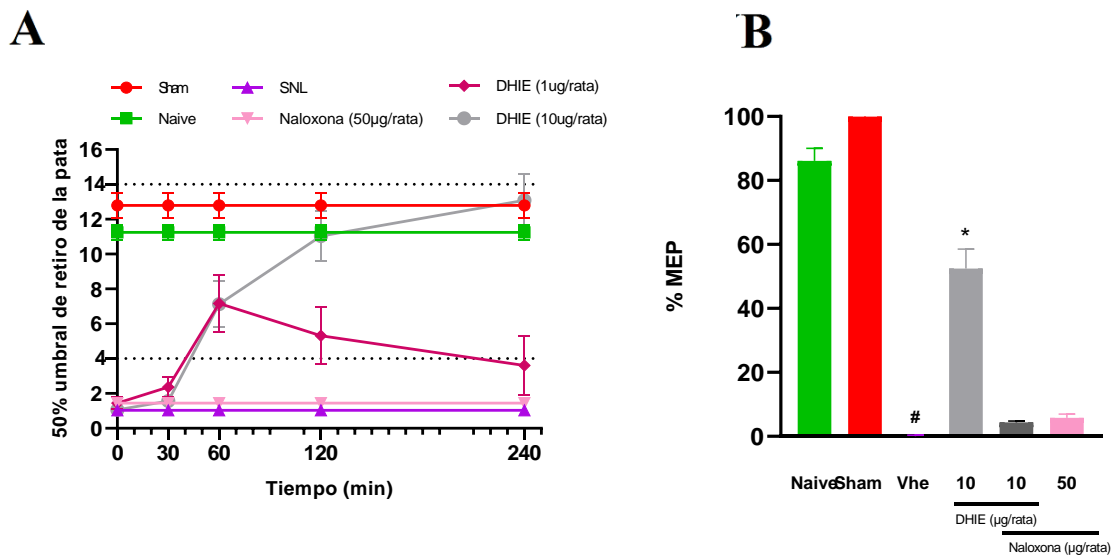


Figura 5. (A) Curso temporal del efecto antialodínico inducido por la administración intratecal de naloxona en ratas sujetas a la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (SNL). El umbral de retiro de la pata fue determinado el día 14 posterior a la cirugía. Las barras muestran el máximo efecto posible (%MEP) (B). Los datos se expresan como la media de 6 ratas por grupo. El valor de la # $P < 0.0001$ del grupo Vhe frente al grupo Sham, el valor de la * $P < 0.0001$ del grupo Vhe vs el grupo (10µg/rata) determinado por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. Abreviaturas: DHIE: dehidrodiisoeugenol.

DISCUSIÓN

La cirugía de la ligadura de los nervios espinales L5-L6, provocó alodinia mecánica que fue evidente en la pata posterior izquierda de la rata. 14 días posteriores del procedimiento, en el grupo SNL se observó que las ratas levantaban la pata o la retiraban cuando ésta era estimulada con los filamentos de Von Frey (menor o igual a 4g). Por otro lado, los grupos de ratas Sham y Naive, no mostraron comportamientos nociceptivos (alodinia mecánica), después de la estimulación con los filamentos de Von Frey, esto indica que posterior a la cirugía no genera dolor neuropático. Por todo esto, la ligadura de los nervios espinales L5-L6 fomenta a largo plazo alodinia mecánica, como es afirmado por Kim y Chung (Kim y Chung, 1992).

En el presente trabajo se expuso que en la administración intraperitoneal (i.p) de dehidrodiisoeugenol redujo de manera dosis dependiente la alodinia mecánica generada por la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Los datos mostraron que la administración de una dosis efectiva de dehidrodiisoeugenol (1mg/kg) es capaz de aumentar el umbral de retiro de la pata (70%), alcanzando poco más o menos valores similares a los obtenidos en los grupos Sham (100%) y Naive (85%). Algo semejante sucede con la administración i.p. de gabapentina (100mg/kg) (60%), siendo este un antiepiléptico de tercera línea, y se utiliza con frecuencia para tratar el dolor neuropático (Wiffen, et al, 2017).

En cuanto a la posible participación de la vía opioidérgica en el efecto antialodínico, la administración intratecal (i.t) de naloxona (50µg/rata) no se obtuvo un resultado positivo en el efecto antialodínico en ratas con ligadura de los nervios espinales L5-

L6. La dosis administrada demuestra que bloquea el efecto antialodínico inducido por dehidrodiisoeugenol. El efecto puede atribuirse a la dosis de la naloxona utilizado, ya que, esta dosis ha demostrado ser lo suficiente alta para bloquear los receptores opioides en otros modelos de dolor (Doi y Jurna, 1982). Por lo cual, los datos que se obtuvieron en el presente estudio aluden que los receptores opioides si participaron en el efecto antialodínico inducido por el dehidrodiisoeugenol.

CONCLUSIÓN

Para concluir, se consiguió desarrollar el modelo animal de dolor neuropático el cual consiste en la ligadura de los nervios espinales L5-L6, la cual se expuso la alodinia, siendo esta un síntoma conocido del dolor neuropático. Por otra parte, los resultados de dehidrodiisoeugenol administrado por vía intraperitoneal e intratecal redujo de manera dosis dependiente la alodinia originada por la cirugía de ligadura de los nervios espinales L5-L6.

Por consiguiente, los resultados obtenidos proponen que el dehidrodiisoeugenol es idóneo de producir un efecto antialodínico similar al de gabapentina (fármaco antiepiléptico de tercera línea, que se utiliza en el tratamiento del dolor neuropático).

Finalmente, se demostró la posible participación del sistema opioidérgico en el efecto antialodínico inducido por dehidrodiisoeugenol en ratas con cirugía de ligadura de los nervios espinales L5-L6.

REFERENCIAS

- Akerele, O. (1993). *Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar*. Foro Mundial de la Salud, 14: 390-395.
- Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, (2020). *IASP anuncia una definición revisada de dolor*.
- Bermúdez, Alexis, Oliveira-Miranda, María A., & Velázquez, Dilia. (2005). *La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales*. Interciencia, 30(8), 453-459.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. (1994). *Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw*. J Neurosci Methods. 55-63.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. (2017). *Neuropathic pain*. Nat Rev.
- Covarrubias-Gómez A, Guevara-López U, Gutiérrez-Salmerón C, et al. (2010). *Epidemiología del dolor crónico en México*. Rev. Mex Anest; 33(4):207-213.
- Cruciani, R.A., Nieto, M.J. (2006). *Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes*. Scielo.
- Dixon. W. (1965). *The Up-and-Down Method for Small Simplex*. Journal of the American Statistical Association.
- Doi T, Jurna I. (1982). *Intrathecal pentobarbital prevents naloxone-induced facilitation of the tail-flick response in the rat*. Neurosci Lett

- Espinosa De los Monteros Zúñiga, A. (2016). *Estudio del Efecto Antialodínico de la mangiferina en dolor neuropático en rata*. Repositorio Institucional de UAM-Xochimilco.
- Gallegos-Zurita, Maritza. (2016). *Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador*. Anales de la Facultad de Medicina, 77(4), 327-332.
- García Meijide, J.A. and Gómez-Reino Carnota, J.J. (2000). *Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 Y ciclooxigenasa-2*, Revista Española de Reumatología. Elsevier.
- Godínez-Chaparro B, Pérez-Gutiérrez S, Pérez-Ramos J, Heyerdahl-Viau I, Hernández-Vázquez L. (2022). *Synthesis and Biological Activities of Dehydrodiisoeugenol: A Review*. Pharmaceuticals (Basel).
- Gómez Ayala, A.-E. (2015). *Dolor Neuropático*, Farmacia Profesional.
- Gómez-Barrios, Juan Vicente, & Tortorici, Víctor. (2009). *Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 28(1), 2-11.
- González, M.C. and Padrón, A. (2018) *La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI*. Revista Habanera de Ciencias Médicas.
- Kim, S.H. and Chung, J.M. (1992). *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat*. UTMB Health Research Expert Profiles.
- Komori N, Takemori N, Kim HK, Singh A, Hwang SH, Foreman RD, Chung K, Chung JM, Matsumoto H. (2007). *Proteomics study of neuropathic and*

nonneuropathic dorsal root ganglia: altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury. Physiol Genomics.

- Mata Bermúdez, A. (2017). *Estudio de los Mecanismos de Acción Que participan en el Efecto anti-alodínico del [6]-gingerol en Ratas neuropáticas*, Repositorio Institucional de UAM-Xochimilco.
- Miranda, P. (2017). *En México, 27% de la población padece o padecerá dolor crónico*. El Universal.
- Murakami, Y. Shojia, M. Hirata, A. Tanaka, S. Yokoe, I. Fujisawa S. (2005). *Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages*, Archives of Biochemistry and Biophysics. Academic Press.
- Romera, E., Perena, M. and Rodrigo, M., (2000). *Neurofisiología del dolor*.
- Vidal, J. (2020). *Versión actualizada de la definición de dolor de la IASP: un paso adelante o un paso atrás*. Unidad de dolor reumático, Hospital Universitario de Guadalajara, España.
- Wiffen, P. *et al.* (2017). *Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults*. Cochrane Library.
- Woolf, C.J. (2002). *Can we conquer pain?* Nature Neuroscience.
- Woolf, C.J. (2004). *Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific*. Annals of Internal Medicine, 441–451
- Woolf, C.J. (2010). *What is this thing called pain?* J Clin Invest. Nov;120(11):3742-4.