VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Evaluación preclínica de la actividad antinociceptiva (sobre dos cepas de ratones), de un extracto de jengibre obtenido por la técnica de fluidos supercríticos.

Luna Stephany López-Díaz [1], Juan José Rocha-Bonilla [2], Miguel Said Vargas-Chagoya [1], Carolina Escobedo-Martínez [3]

[1] Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.
ls.lopezdiaz@ugto.mx, ms.vargaschagoya@ugto.mx

[2] Maestría en Ciencias Farmacéuticas, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.
jj.rochabonilla@ugto.mx

[3] Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.
c.escobedo@ugto.mx

Resumen

El dolor constituye un importante problema de salud pública, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas con actividad analgésica y antiinflamatoria continúa siendo un área de gran interés. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antinociceptiva de un extracto de *Zingiber officinale* (Jengibre) obtenido mediante la técnica de fluidos supercríticos y analizar la pertinencia del uso de las cepas de ratón CD-1 y BALB/c en la prueba de formalina. Para ello, se realizó una revisión bibliográfica sobre ambas cepas, lo que respaldo el empleo de la cepa BALB/c por su mayor reproducibilidad y amplia utilización en este modelo experimental, mientras que la cepa CD-1 presentó mayor variabilidad genética. Este estudio nos llevó a decidir evaluar experimentalmente el extracto de jengibre a una dosis de 100 mg/kg en ratones de la cepa BALB/c mediante la prueba de formalina, comparándolo con un grupo administrado sólo del vehículo y otro con diclofenaco sódico (100 mg/kg). La respuesta nociceptiva se determinó mediante el registro del número de sacudidas durante 60 minutos y los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Los resultados registraron una disminución significativa en el número de sacudidas por parte del extracto durante la fase II (Inflamatoria) para la prueba de formalina, concluyendo que el extracto obtenido mediante la técnica de fluidos supercríticos y enriquecido en 6-gingerol presentó actividad antinociceptiva frente al dolor inflamatorio y que esta técnica de extracción constituyó una metodología eficiente que ofreció una alta pureza y conservó compuestos bioactivos con potencial farmacológico.

Palabras clave: dolor, nocicepción, CD-1, BALB/c, jengibre, formalina.

Introducción

El dolor constituye uno de los principales motivos de consulta médica y uno de los problemas de salud con mayor impacto sobre la calidad de vida de la población. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, un daño tisular real o potencial (Raja *et al.,* 2020). Más allá de representar un mecanismo fisiológico de protección, cuando el dolor persiste o se vuelve crónico ocasiona repercusiones físicas y psicológicas, afectando la funcionalidad de los pacientes y generando una elevada carga para los sistemas de salud (Cohen *et al.,* 2021). A pesar de los avances alcanzados en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, el tratamiento del dolor continúa siendo un desafío debido a la complejidad de los procesos biológicos que participan en su generación y mantenimiento, así como a la variabilidad en la respuesta de los pacientes a los tratamientos disponibles (Ferrer-Peña *et al.*, 2024).

ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

La nocicepción se define como el proceso neuronal de codificación de los estímulos nocivos. Aunque los modelos animales no pueden reflejar todos los componentes del dolor clínico, el ratón se ha utilizado ampliamente como modelo genético de la nocicepción (Wotton *et al*., 2022). La nocicepción comprende cuatro etapas: transducción, transmisión, modulación y percepción. Durante la transducción, un estímulo físico o químico se convierte en una señal eléctrica que, a continuación, puede transmitirse. La transmisión se refiere al desplazamiento de esta actividad eléctrica a través del sistema nervioso. La modulación es la alteración de la actividad neuronal a lo largo de las vías de transmisión (Karcz, M., *et al*. 2024). La alteración de cualquiera de estas etapas puede favorecer el desarrollo de estados de hipersensibilidad o dolor persistente, razón por la cual constituyen importantes blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos analgésicos (Raja *et al.,* 2020). Por lo tanto, aunque están relacionados, dolor y nocicepción no son lo mismo.

Dependiendo de su origen fisiopatológico, el dolor puede clasificarse como nociceptivo, inflamatorio, neuropático o nociplástico, categorías que presentan mecanismos biológicos distintos y que requieren modelos experimentales específicos para su estudio (Murphy *et al.,* 2023). Entre ellos, la prueba de formalina destaca por reproducir de manera confiable tanto la fase inicial de activación directa de nociceptores como la fase inflamatoria subsecuente, razón por la cual constituye uno de los modelos más utilizados para evaluar la actividad antinociceptiva de nuevos compuestos en estudios preclinicos.

En la práctica clínica, el tratamiento farmacológico del dolor depende principalmente del uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y de analgésicos opioides. Los AINEs representan una de las primeras opciones terapéuticas para el manejo del dolor leve y moderado; sin embargo, su administración prolongada puede ocasionar efectos adversos gastrointestinales, renales y cardiovasculares que limitan su empleo, especialmente en pacientes con enfermedades concomitantes (Dowell *et al*., 2022). Por su parte, los opioides continúan siendo de suma importancia para el tratamiento del dolor intenso, aunque su utilización se encuentra limitada por el riesgo de desarrollar tolerancia, dependencia o inclusive adicción (Paul *et al*., 2021). Estas limitaciones han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas capaces de ofrecer una eficacia comparable con un perfil de seguridad más favorable.

En este contexto, los productos naturales han adquirido un papel relevante como fuente de nuevas moléculas bioactivas con potencial farmacológico. A lo largo de la historia, numerosas plantas medicinales han sido empleadas para aliviar el dolor y la inflamación, conocimiento que ha servido como un inicio para el desarrollo de múltiples fármacos. El interés científico por estos recursos continúa en crecimiento debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios que producen, entre ellos flavonoides, alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos, los cuales poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antinociceptivas demostradas experimentalmente (Atanasov *et al*., 2021; Rengasamy *et al*., 2021).

La planta medicinal *Zingiber officinale Roscoe,* conocida como jengibre (Figura 1A) ha mostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, antieméticas, gastroprotectoras y neuroprotectoras (Zhang *et al*., 2021; Ma *et al*., 2021). Su actividad biológica se atribuye principalmente a compuestos fenólicos y terpenoides, entre los que destacan los gingeroles (6-, 8- y 10-gingerol), shogaoles, paradoles, zingerona y terpenos (α-zingibereno y β-bisaboleno); siendo el 6-gingerol (Figura 1B) el principal (Ballester *et al*., 2022). Además, la evidencia preclínica y clínica disponible indica que presenta actividad antinociceptiva y antiinflamatoria, relacionada con la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y lipooxigenasa (LOX), la modulación de mediadores proinflamatorios y la disminución de dolor y edema en diferentes modelos experimentales (Ballester *et al.,* 2022).

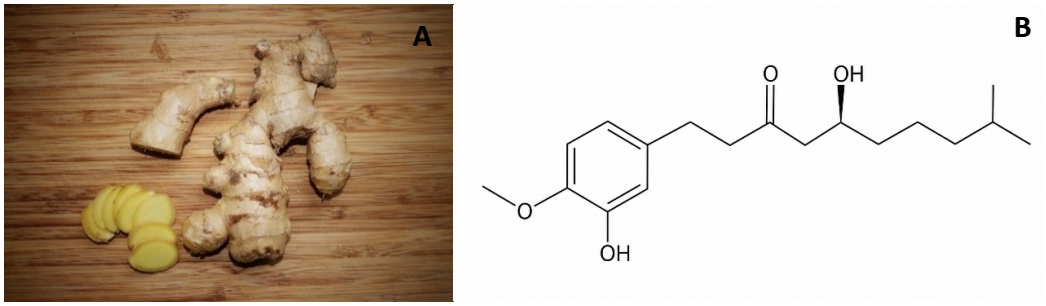


Figura 1. A. Rizoma de Zingiber Officinale, B. Estructura del 6-gingerol.

VOLUMEN 45
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

El extracto de jengibre (Figura 2A) empleado en este estudio fue obtenido mediante solvatación con dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) en estado supercrítico (Figura 2B), una técnica que comprende las etapas de presurización, ajuste de temperatura, extracción y separación, permitiendo obtener extractos de alta pureza sin dejar residuos de solventes orgánicos. Además, al realizarse a bajas temperaturas, favorece la conservación de compuestos termoestables como el 6-gingerol, principal metabolito bioactivo del jengibre. Estas condiciones hacen de la extracción con fluidos supercríticos una alternativa eficiente para la obtención de extractos destinados a estudios farmacológicos. (Roman Paez *et al.,* 2016).

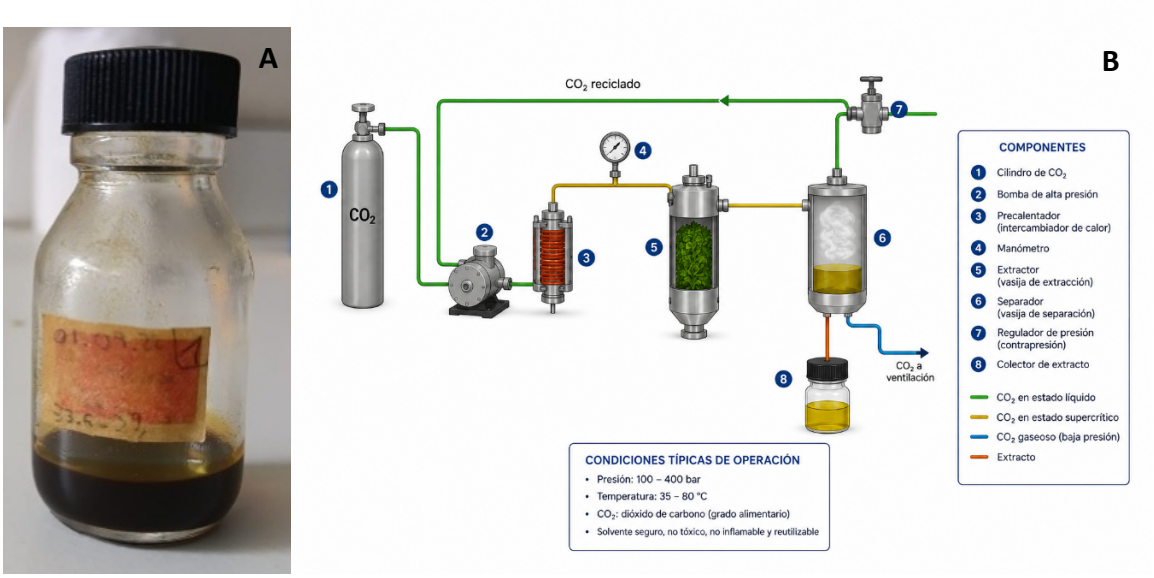


Figura 2.A. Extracto de Zingiber officinale obtenido mediante fluidos supercríticos, B. Sistema de extracción con fluidos supercríticos.

Como fármaco de referencia para comparar la actividad biológica del extracto de *Zingiber officinale*, se usó la sal sódica de diclofenaco, un AINE utilizado para el tratamiento del dolor de origen inflamatorio y musculoesquelético. Su acción farmacológica se basa en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, lo que le da efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos. En comparación con otros AINE de uso común, como ibuprofeno o naproxeno, el diclofenaco presenta una elevada potencia antiinflamatoria y una eficacia analgésica comparable o superior en diversas condiciones clínicas, por lo que es empleado con frecuencia como fármaco de referencia en estudios preclínicos para evaluar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de compuestos de origen natural (da Costa *et al*., 2017; Derry *et al.*, 2017).

La utilización de dos cepas de ratones con diferente antecedente genético constituye una estrategia ampliamente empleada en investigación preclínica para determinar la consistencia y reproducibilidad del efecto farmacológico de un compuesto. Las diferencias genéticas entre cepas pueden modificar la sensibilidad basal al dolor, la respuesta inflamatoria y la eficacia de los agentes analgésicos, por lo que la evaluación en más de un modelo animal incrementa la validez y la capacidad de extrapolación de los resultados experimentales (Mogil, 2020; Sorge & Totsch, 2022). En este contexto, la cepa CD-1, al ser una cepa no consanguínea, presenta una mayor diversidad genética y variabilidad fenotípica, lo que permite simular con mayor fidelidad la heterogeneidad observada en la población humana. En contraste, la cepa BALB/c, al ser consanguínea, posee una genética homogénea que favorece la reproducibilidad experimental y facilita la identificación de cambios inducidos por el tratamiento (Bryant, 2021). En conjunto, la comparación de ambas cepas permite determinar si la actividad antinociceptiva de un compuesto se mantiene independientemente de su genética, fortaleciendo la evidencia preclínica sobre su potencial terapéutico (Sorge & Totsch, 2022).

Materiales y Métodos

Reactivos

La solución acuosa de formalina (2%) se preparó a partir de formaldehido comercial (Sigma-Aldrich®). El diclofenaco es grado materia prima farmacéutica de CAMQUIM CHEMICALS y el vehículo utilizado para la re suspensión de las muestras a evaluar fue aceite de maíz (Mazola).

Obtención del extracto natural

El extracto de *Zingiber officinale se* obtuvo por la técnica de fluidos supercríticos que se realizó físicamente en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas del Instituto de Investigaciones Fármaco bioquímicas en la Universidad Mayor de San Andrés de la Paz, Bolivia.

Animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los estándares éticos para la investigación experimental del dolor en animales y la norma oficial mexicana para el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo experimental (CIBIUG-P16-2020) fue aprobado y supervisado por el comité Institucional de Ética para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad de Guanajuato. Se utilizaron 18 ratones BALB/c con un peso de 30-35 gramos obtenidos del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Los animales se organizaron en distintos grupos bajo un ciclo luz /oscuridad de 12 h (23º ± 2ºC) con libre acceso a alimento y agua. Al término de los experimentos los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

Prueba de formalina

Los animales se agruparon en tres grupos (cada grupo con una n = 6) y tuvieron un ayuno de una hora previó a la administración oral mediante cánula del vehículo (aceite de maíz), extracto de *Zingiber officinale* (100 mg/kg, *p.o.*) y diclofenaco (100 mg/kg, *p.o.*), respectivamente (FIGURA 3A). Después de una hora de la administración se realizó la inducción de nocicepción a través de la inyección intraplantar de 20 µL de formalina (2%) en la extremidad posterior derecha (FIGURA 3B), dentro de este tiempo 10 minutos previo al estímulo nociceptivo el animal se colocó en el cilindro transparente para habituarse (FIGURA 3C). La evaluación conductual se realizó con el registro del número de sacudidas de la extremidad posterior inyectada; en intervalos de 5 minutos durante un periodo total de 60 minutos. La prueba comprendió una fase temprana o neurogénica (0–10 min) y una fase tardía o inflamatoria (10–60 min). La disminución significativa del número de sacudidas en cualquiera de las fases se interpretó como evidencia de actividad antinociceptiva.

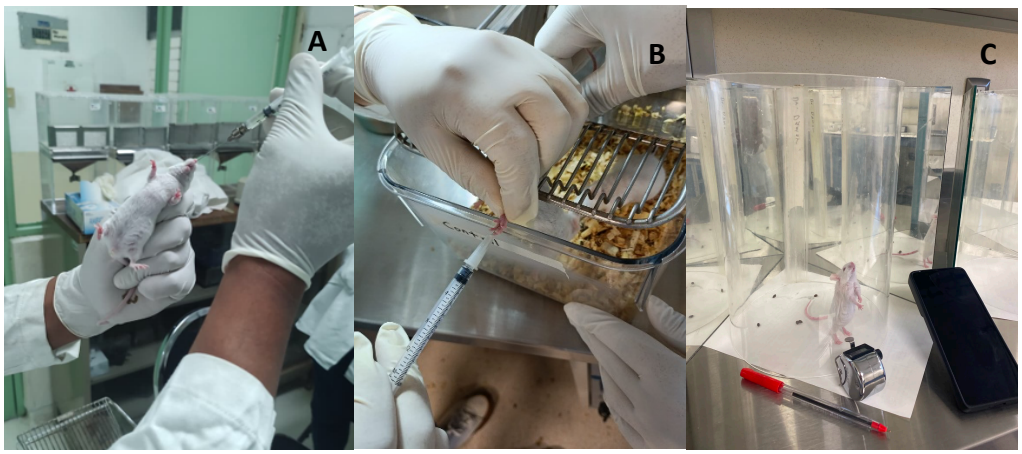


Figura 3. A. Administración oral, B. Administración intraplantar, C. Registro de la respuesta nociceptiva durante la prueba de formalina. Se muestra la cuantificación manual del número de sacudidas de la extremidad posterior inyectada en un ratón mediante un contador mecánico durante el periodo de observación.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media ± el error estándar de la media (EEM). El análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) evaluó las diferencias entre los grupos experimentales, seguido de la prueba post hoc de Dunnett para comparar cada tratamiento con el grupo vehículo. Se consideró estadísticamente

significativa una diferencia cuando $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 10.0.

Resultados

Prueba de formalina sobre la cepa CD-1

Se hizo una búsqueda bibliográfica en distintas fuentes (Google Scholar, ScienceDirect, PubMed, Web of Science) para recopilar información relacionada a este estudio en un periodo de 2017 – 2026 y se logró tener un panorama sobre las cepas de elección con respecto a los resultados de estudios realizados, además de información relevante sobre su genética. De acuerdo a la literatura, la cepa BALB/c es el modelo experimental más utilizado.

En la búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos para validar la utilización de las cepas CD-1 y BALB/c para la prueba de formalina; se incluyeron las palabras clave: formalina, CD-1, BALB/c, dolor, inflamación, nocicepción, antinocicepción.

La revisión evidenció que los factores genéticos influyen en la sensibilidad al dolor y la eficacia de analgésicos. Se enfatizó que variantes genéticas entre cepas modifican la expresión de receptores, conductas y vías inflamatorias implicadas en la nocicepción (Mogil, 2020). En cuanto a la nocicepción basal, (Rüdeck *et al.,* 2020) se encontró que los ratones BALB/c son más sensibles al dolor espontáneo que la cepa C57BL/6J, y que la respuesta analgésica a buprenorfina varía por cepa (Rüdeck *et al.*, 2020). Aunque no se dispone de estudios directos recientes comparando las respuestas inflamatorias entre BALB/c y CD-1, se sabe que CD-1, al ser consanguínea, exhibe variación genética que puede traducirse en respuestas inmunitarias más heterogéneas y robustas en modelos tóxicos o inflamatorios (Jung *et al.*, 2023). Finalmente se optó por la utilización de la cepa BALB/c debido a que se encontró mayor evidencia bibliográfica de esta cepa en investigaciones con objetivos y metodologías similares.

Se considera que existe efecto antinociceptivo desde el punto de vista estadístico de las fases del dolor (comparando ambas fases con un grupo control), en las cuales los resultados de la fase 1 son significativos para la nocicepción, mientras que los resultados de la fase 2 son significativos para el efecto antiinflamatorio.

Prueba de formalina sobre la cepa BALB/c

La evaluación del efecto antinociceptivo del extracto de *Zingiber officinale* (100 mg/kg, *p.o.*) se comparó con un grupo vehículo y un grupo tratado con diclofenaco sódico (100 mg/kg, *p.o.*). En la Figura 4 se observa el perfil característico del modelo bifásico, lo cual correspondió a la fase temprana o neurogénica (0–10 min) que comienza con un efecto nociceptivo en los primeros 5 minutos, seguido de una disminución de dolor (efecto antinociceptivo), tras ello la fase tardía o inflamatoria (10–60 min), donde el grupo vehículo presentó el mayor número de sacudidas y el extracto disminuyó la conducta nociceptiva, mientras que el diclofenaco sódico produjo una reducción más marcada del número de sacudidas, principalmente durante la fase inflamatoria.

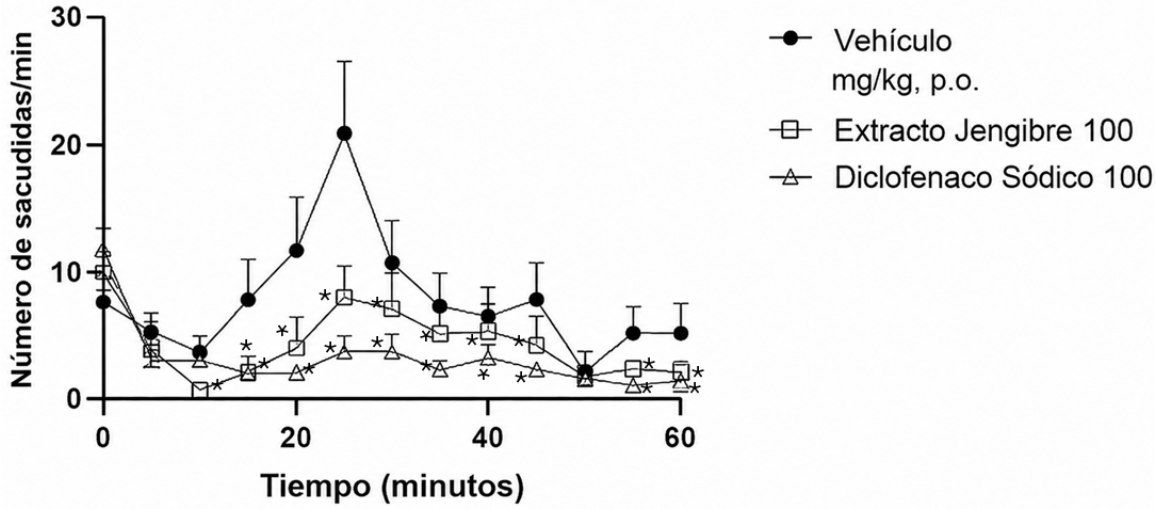


Figura 4. Efecto de la administración vía oral del extracto de jengibre (100 mg/kg) y diclofenaco sódico (100 mg/kg) sobre el número de sacudidas inducidas por formalina (2%) en ratones (n=6) durante 60 minutos. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett utilizando GraphPad Prism. Se consideró diferencia significativa cuando p<0.05.

En este estudio se optó por el diclofenaco sódico debido a que es la sal más utilizada como control positivo en la literatura para este modelo experimental, lo que facilita la comparación de los resultados obtenidos con estudios previos. El diclofenaco sódico fue seleccionado como fármaco de referencia debido a su amplio empleo en modelos preclínicos de dolor inflamatorio, incluida la prueba de formalina. Su efecto antinociceptivo se atribuye principalmente a la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), disminuyendo la síntesis de prostaglandinas involucradas en la sensibilización periférica. (Gan, 2010; Chuasuwan *et al.,* 2009).

El análisis evidenció que los ratones tratados con el extracto de jengibre presentaron un menor número de sacudidas en la extremidad afectada en comparación con el grupo vehículo durante gran parte de la fase inflamatoria (Figura 5). Aunque el diclofenaco produjo la mayor reducción de la respuesta nociceptiva, el extracto mostró una tendencia similar, indicando que posee actividad biológica relevante frente al dolor inflamatorio (fase 2). Esto concuerda con estudios recientes que atribuyen esta actividad a la presencia de 6-gingerol y otros compuestos fenólicos capaces de inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la regulación de las enzimas COX-2 y LOX, además de disminuir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-6 (Ballester *et al.*, 2022).

En la cuantificación por fases se observó que durante la fase I no existió diferencia significativa entre el vehículo, el extracto de jengibre y el diclofenaco, lo que indicó que ninguno de los tratamientos modificó la respuesta nociceptiva inicial inducida por la formalina. Durante la fase I siempre existió dolor nociceptivo menor que el dolor inflamatorio presente en la fase II.

En la fase II se observó una disminución significativa del número de sacudidas en los animales tratados con el extracto de jengibre y una inhibición aún mayor en el grupo tratado con el fármaco de referencia respecto al grupo vehículo. Estos resultados indican que el extracto tuvo actividad antinociceptiva frente al dolor inflamatorio, aunque con una eficacia inferior al diclofenaco sódico.

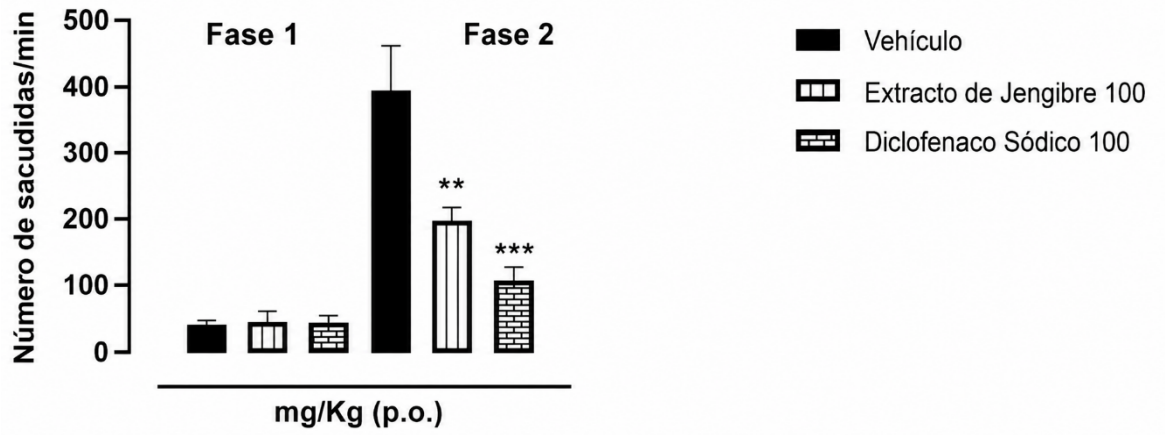


Figura 5. Efecto de la administración vía oral del extracto de jengibre (100 mg/kg) y diclofenaco sódico (100 mg/kg) sobre el número de sacudidas inducidas por formalina (2%) durante la fase 1 y fase 2 del ensayo nociceptivo en ratones (n=6). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett utilizando GraphPad Prism. Se consideró diferencia significativa cuando p<0.05.

El grupo vehículo presentó un menor número de sacudidas durante la fase I (Figura 5) en comparación con la fase II, donde la respuesta nociceptiva aumentó considerablemente. Este comportamiento corresponde al patrón característico de la prueba de formalina, un modelo bifásico ampliamente utilizado para evaluar la actividad antinociceptiva de nuevos compuestos. La menor respuesta observada durante la fase temprana se atribuye principalmente a la activación directa de las terminaciones nerviosas periféricas por la formalina, mientras que la respuesta más intensa de la fase tardía se relaciona con el establecimiento de procesos inflamatorios y fenómenos de sensibilización central (Asiri., *et al* 2024).

El incremento del número de sacudidas durante la fase II puede explicarse por la liberación de diversos mediadores proinflamatorios, entre ellos prostaglandinas, bradicinina, histamina, serotonina, óxido nítrico y citocinas como TNF-α (Factor de Necrosis Tumoral Alfa) e IL-1β (Interleucina 1 beta). Estos mediadores aumentan la excitabilidad de las fibras nociceptivas y favorecen la sensibilización del sistema nervioso central, prolongando e intensificando la respuesta dolorosa. Debido a ello, es común observar que el grupo vehículo presenta una barra considerablemente mayor durante la fase inflamatoria que durante la fase neurogénica, como ocurrió en el presente estudio (Laraib *et al.,* 2025).

Conclusión

El extracto de *Zingiber officinale* mejor conocido como jengibre presentó actividad antinociceptiva principalmente durante la fase II inflamatoria para la prueba de formalina en ratones BALB/c. La extracción mediante fluidos supercríticos permitió obtener un extracto de alta pureza y conservar compuestos bioactivos como el 6-gingerol, favoreciendo su evaluación farmacológica. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial de los extractos obtenidos por esta tecnología como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos fitomedicamentos de origen natural con actividad analgésica y antiinflamatoria.

Bibliografía/Referencias

Wotton, J. M., Peterson, E., Flenniken, A. M., Bains, R. S., Veeraragavan, S., Bower, L. R., et al. (2022). Identifying genetic determinants of inflammatory pain in mice using a large-scale gene-targeted screen. Pain, 163(6), 1139–1157. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002481

Fraguela-Meissimilly et al. (2023). New Trends in Supercritical Fluid Technology and Pressurized Liquids for the Extraction and Recovery of Bioactive Compounds from Agro-Industrial and Marine Food Waste. Molecules, 28, 4421.

Herzyk et al. (2024). Supercritical Extraction Techniques for Obtaining Biologically Active Substances from a Variety of Plant Byproducts. Foods, 13, 1713.

Turnaturi, R., Piana, S., Spoto, S., Costanzo, G., Reina, L., Pasquinucci, L., & Parenti, C. (2024). From plant to chemistry: Sources of antinociceptive non-opioid active principles for medicinal chemistry and drug design. Molecules, 29(4), 815. https://doi.org/10.3390/molecules29040815

Tadege, G., Sirak, B., Abebe, D., & Nureye, D. (2023). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude leaf extract and solvent fractions of Commelina latifolia Hochst. ex A. Rich. (Commelinaceae) in murine models. Frontiers in Pharmacology, 14, 1284087. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1284087

Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. Pain, 161(9), 1976–1982. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939

Ferrer-Peña, R., Lipnik-Stangelj, M., & Goicoechea, C. (2024). Editorial: Advances in chronic pain treatment. Frontiers in Medicine, 11, 1496449. https://doi:10.3389/fmed.2024.1496449

Cohen, S. P., Vase, L., & Hooten, W. M. (2021). Chronic pain: An update on burden, best practices, and new advances. The Lancet, 397(10289), 2082–2097. https://doi:10.1016/S0140-6736(21)00393-7

Paul, A. K., Smith, C. M., Rahmatullah, M., Nissapatorn, V., Wilairatana, P., Spetea, M., Gueven, N., & Dietis, N. (2021). Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A review. Pharmaceuticals, 14(11), 1091. https://doi.org/10.3390/ph14111091

Dowell, D., Ragan, K. R., Jones, C. M., Baldwin, G. T., & Chou, R. (2022). CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain—United States, 2022. MMWR Recommendations and Reports, 71(3), 1–95. https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7103a1

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Taskforce, T. I. N. P. S., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., . . . Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nature Reviews Drug Discovery, 20(3), 200–216. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z

Ballester, P., Cerdá, B., Arcusa, R., Marhuenda, J., Yamedjeu, K., & Zafrilla, P. (2022). Effect of ginger on inflammatory diseases. Molecules, 27(21), 7223. https://doi.org/10.3390/molecules27217223

Rengasamy, K. R. R., Mahomoodally, M. F., Joaheer, T., & Zhang, Y. (2021). A systematic review of traditionally used herbs and animal-derived products as potential analgesics. Current Neuropharmacology, 19(4), 553–588. https://doi.org/10.2174/1570159X18666200808151522

Turnaturi, R., Piana, S., Spoto, S., Costanzo, G., Reina, L., Pasquinucci, L., & Parenti, C. (2024). From plant to chemistry: Sources of antinociceptive non-opioid active principles for medicinal chemistry and drug design. Molecules, 29(4), 815. https://doi.org/10.3390/molecules29040815

Fraguela-Meissimilly, H., Bastías-Monte, J. M., Vergara, C., Ortiz-Viedma, J., Lemus-Mondaca, R., Flores, M., Toledo-Merma, P., Alcázar-Alay, S., & Gallón-Bedoya, M. (2023). New trends in supercritical fluid technology and pressurized liquids for the extraction and recovery of bioactive compounds from agro-industrial and marine food waste. Molecules, 28(11), 4421.

https://doi.org/10.3390/molecules28114421

Zhang, M., Zhao, R., Wang, D., Wang, L., Zhang, Q., Wei, S., Lu, F., Peng, W., & Wu, C. (2021). Ginger (Zingiber officinale Rosc.) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents. Phytotherapy Research, 35(2), 711–742. https://doi.org/10.1002/ptr.6858

Herzyk, F., Piłakowska-Pietras, D., & Korzeniowska, M. (2024). Supercritical extraction techniques for obtaining biologically active substances from a variety of plant byproducts. Foods, 13(11), 1713. https://doi.org/10.3390/foods13111713

Smith, J. C. (2019). A review of strain and sex differences in response to pain and analgesia in mice. Comparative Medicine, 69(6), 490–500. https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000066

Nwachukwu, K. N., Evans, W. A., Sides, T. R., Trevisani, C. P., Davis, A., & Marshall, S. A. (2021). Chemogenetic manipulation of astrocytic signaling in the basolateral amygdala reduces binge-like alcohol consumption in male mice. Journal of Neuroscience Research, 99(8), 1957–1972. https://doi.org/10.1002/jnr.24841

Mogil, J. S. (2020). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. Nature Reviews. Neuroscience, 21(7), 353–365. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0310-6

Cable, J., Ronald, P. C., Voytas, D., Zhang, F., Levy, A. A., Takatsuka, A., Arimura, S., Jacobsen, S. E., Toki, S., Toda, E., Gao, C., Zhu, J., Boch, J., Van Eck, J., Mahfouz, M., Andersson, M., Fridman, E., Weiss, T., Wang, K., . . . Bagchi, R. (2021). Plant genome engineering from lab to field—a Keystone Symposia report. Annals of the New York Academy of Sciences, 1506(1), 35–54. https://doi.org/10.1111/nyas.14675

Román Páez, M. A., Rivera Narváez, C. M., Cardona Bermúdez, L. M., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., Passaro Carvalho, C., & Quiceno Rico, J. M. (2016). Guía de extracción por fluidos supercríticos: fundamentos y aplicaciones.

Karcz, M., Abd-Elsayed, A., Chakravarthy, K., Aman, M. M., Strand, N., Malinowski, M. N., Latif, U., Dickerson, D., Suvar, T., Lubenow, T., Peskin, E., D'Souza, R., Cornidez, E., Dudas, A., Lam, C., Farrell Ii, M., Sim, G. Y., Sebai, M., Garcia, R., Bracero, L., … Deer, T. (2024). Pathophysiology of Pain and Mechanisms of Neuromodulation: A Narrative Review (A Neuro Project). Journal of pain research, 17, 3757–3790. https://doi.org/10.2147/JPR.S475351

Murphy, A. E., Minhas, D., Clauw, D. J., & Lee, Y. C. (2023). Identifying and Managing nociplastic pain in Individuals with Rheumatic Diseases: A Narrative review. Arthritis Care & Research, 75(10), 2215–2222. https://doi.org/10.1002/acr.25104

da Costa, B. R., Reichenbach, S., Keller, N., Nartey, L., Wandel, S., Jüni, P., & Trelle, S. (2017). Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: A network meta-analysis. The Lancet, 390(10090), e21–e33. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31744-0

Derry, S., Wiffen, P. J., Moore, R. A., McNicol, E. D., Bell, R. F., Carr, D. B., McIntyre, M., & Wee, B. (2017). Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for cancer pain in adults. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017(7), CD012638. https://doi.org/10.1002/14651858.CD012638.pub2

Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current medical research and opinion*, *26*(7), 1715-1731.

Chuasuwan, B., Binjesoh, V., Polli, J. E., Zhang, H., Amidon, G. L., Junginger, H. E., ... & Barends, D. M. (2009). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Diclofenac sodium and diclofenac potassium. *Journal of pharmaceutical sciences*, *98*(4), 1206-1219.

Rüdeck, J., Vogl, S., Heinl, C., Steinfath, M., Fritzwanker, S., Kliewer, A., Schulz, S., Schönfelder, G., & Bert, B. (2020). Analgesic treatment with buprenorphine should be adapted to the mouse strain. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 191, 172877. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172877

Jung, Y. H., Wang, H.-L. V., Ali, S., Corces, V. G., et al. (2023). Characterization of a strain-specific CD-1 reference genome reveals potential inter- and intra-strain functional variability. BMC Genomics, 24, 437.

Asiri, Y. I., Moni, S. S., Ramar, M., & Chidambaram, K. (2024). Advancing pain understanding and drug discovery: insights from preclinical models and recent research findings. *Pharmaceuticals*, *17*(11), 1439.

Laraib, I., Qasim, S., Uttra, A. M., & Al-Joufi, F. A. (2025). Anti-inflammatory, antihyperalgesic, and gastric safety profiling of ocimene: Attenuation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers by modulating toll-like receptor 4 and pyroptosis pathways. *ACS Pharmacology & Translational Science*, *8*(3), 748-761.