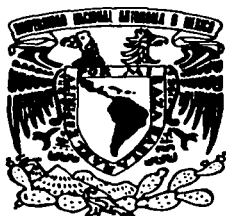


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DEL EFECTO ANALGESICO DE
DICLOFENACO SOLO Y COMBINADO CON
VITAMINAS DEL COMPLEJO B (B₁, B₆ Y B₁₂) EN UN
MODELO DE HIPERALGESIA TERMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
NADIA LIZETH CARAM SALAS

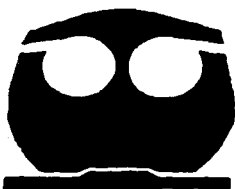
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Paginación

Discontinua

JURADO ASIGNADO:

Presidente Prof. ANA MARÍA VÁZQUEZ ALVAREZ
Vocal Prof. ATONATIU EDMUNDO GOMEZ MARTÍNEZ
Secretario Prof. VINICIO GRANADOS SOTO
1er. Suplente Prof. MARTHA LETICIA JIMÉNEZ PARDO
2do. Suplente Prof. JOSÉ MANUEL MORALES HERNÁNDEZ

La parte experimental de esta Tesis se realizó en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN, Sede Sur) bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Dr. Vinicio Granados Soto

Nadia Lizeth Caram Salas



Asesor



Sustentante



Dedico esta tesis a mis **padres, hermanas y abuelitos**. Por su paciencia, dedicación, consejos y amor, que me han impulsado para terminar una meta importante de mi vida.

A mi **universidad**. Por cobijarme y por dejarme vivir en esa casa inmensa llena de sabiduría, sueños, aspiraciones y metas.

A mis **maestros**. Por sus enseñanzas, orientación, paciencia, conocimientos y dedicación, que me guiaron durante mi carrera y que trataré de aprovechar en mi vida futura.

A todos mis **amigos** que estuvieron con migo en los momentos de angustia y felicidad durante mi estancia en la facultad de química.

Y a todas las personas que siempre han confiado en mi.





Agradezco primeramente a **Dios**, a ese ser que no veo pero que siempre ha estado conmigo. Gracias por darme la oportunidad de finalizar un sueño que no solo es mío si no de toda la gente que me quiere y que yo quiero. Gracias a **Dios** he terminado un capítulo del libro de mi vida junto con los seres que amo y que han sido, son y serán especiales durante mi desarrollo espiritual, sentimental y profesional.

A mi **Mamá** (Lulú) y a mi **Papá** (Eteban), por todo su esfuerzo, dedicación, comprensión, consejos, cuidados, apoyo, desvelos, cariño, pero sobre todo por su amor que siempre me ha acompañado a lo largo de mi vida, en los bueno y malos momentos, por compartir conmigo los sueños, metas que me he propuesto y alcanzado. Gracias por ser mis padres.

A mis hermanas **Gaby** y **Yenín** por compartir conmigo sus metas, sueños, aspiraciones, por que con su ejemplo me han impulsado para seguir adelante en mis estudios, a no rendirme en los momentos difíciles durante mi vida de estudiante. Gracias por brindarme su apoyo incondicional.

A mi **abuelita Luchita** por darme todo su amor, dedicación, educación, ejemplo, paciencia y por sus consejos. Gracias por ser mi abuelita, amiga, complice y mi segunda madre. Gracias.





Agradezco especialmente al **Dr. Vinicio Granados Soto** por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Gracias por su comprensión, consejos, sugerencias y paciencia durante el desarrollo de mi tesis.

A **Guadalupe Vidal Cantú** y a todos mis **compañeros** del laboratorio 12 del **CINVESTAV** por el apoyo, amistad y consejos que me dieron durante mi tesis.

A mis amigos de carrera **Toño, Héctor, Abel, Italia, Cesar, Andrea, Guadalupe, Sergio Tania B, Karym, Carlos** y a todos mis amigos que en este momento no recuerdo pero que su amistad siempre la valorare.

A **José Antonio Guerrero Analco**, por su apoyo incondicional en amistad, cariño, comprensión, durante todos los momentos que estuvimos juntos en las buenas y en las malas. Gracias.

A la **familia Guerrero Analco** por regalarme lo mas hermoso en la vida que es la fe la esperanza y la tenacidad.

A mis universidad (**UNAM**) por ser mi segunda casa, por dejarme estudiar en sus recintos y darme la oportunidad de conocer a su gente que siempre serán un





ejemplo para mí. Gracias por otorgarme su sabiduría para que pueda seguir adelante durante mi vida profesional.

A todos mis **profesores** por obsequiarme su tiempo, conocimientos, paciencia en el transcurso de mi carrera que se-que será la base de una nueva vida para mí.

A mis maestros, **Ernesto Guerrero Padilla, Raúl Garza V. y Natalia de la Torre Aceves** por sus consejos, orientación, apoyo y confianza que siempre tuvieron para conmigo. Mil gracias.

Especialmente le doy gracias a Dios por darme la oportunidad de compartir una parte de mi vida con mis **abuelitos: Lalo y Gabriel** y con don **Carlos** por que aunque ya no están conmigo siempre, en su momento me dieron el mejor ejemplo, cariño, comprensión y amor. Muchas gracias.

A mis **tíos y primos** por su cariño, confianza, apoyo y consejos a lo largo de mi vida. Gracias.

A mis **compañeras de maestría** y a todas aquellas personas que no mencioné pero que de alguna manera han influido en mi vida .





ÍNDICE

i	Tablas y figuras.	i
ii	Abreviaturas.	iii
I.	ANTECEDENTES.	1
II.	INTRODUCCIÓN.	4
II.1	Dolor y nocicepción.	4
II.2	Fisiología del dolor.	6
II.2.1	Nociceptores.	6
II.2.2	Médula espinal.	8
II.2.3	Asta posterior de la médula espinal.	9
II.2.4	Sistema espinotalámico.	10
II.2.5	Sistema trigeminal.	11
II.3	Neuromoduladores del dolor e inflamación.	13
II.3.1	Dopamina.	14
II.3.2	Histamina.	15
II.3.3	Serotonina.	15
II.3.4	Sustancia P.	16
II.3.5	Glutamato.	17
II.4	Inflamación y dolor.	17
II.4.1	Iones Hidrógeno (H ⁺).	18
II.4.2	Metabolismo del ácido araquidónico.	18



	II.4.3	Cininas.	20
	II.4.4	Óxido nítrico.	21
III.		MÉTODOS PARA EVALUAR EL AFECTO ANTINOCICEPTIVO.	22
	III.1	Modelos mecánicos.	22
	III.2	Modelos eléctricos.	22
	III.3	Modelos térmicos.	23
	III.4	Modelos químicos.	24
	III.4.1	Prueba de formalina.	24
	III.4.2	Modelo de contorsiones y distensión colorrectal.	24
	III.4.3	Modelo de inflamación por carragenina. .	25
IV.		ANALGÉSICOS.	26
	IV.1	Analgésicos No Esteroidales (AINES).	27
	IV.2	Diclofenaco.	27
	IV.2.1	Mecanismos de acción del ... diclofenaco.	28
	IV.2.1.1	Nivel periférico.	28
	IV.2.1.2	Nivel central.	30
	IV.2.2	Farmacocinética y metabolismo.	30
IV.3		Propiedades analgésicas y anti-inflamatorias de las vitaminas del complejo B (B₁, B₆, B₁₂).	31
	IV.3.1	Tiamina (vitamina B ₁).	31
	IV.3.1.1	Absorción, destino y excreción.	32



IV.3.2	Piridoxina (vitamina B₆).	33
IV.3.2.1	Absorción, destino y excreción.	34
IV.3.3	Cianocobalamina (vitamina B₁₂).	34
IV.3.3.1.	Absorción, destino y excreción.	35
V.	JUSTIFICACIÓN.	38
VI.	HIPÓTESIS.	40
VII.	OBJETIVOS.	41
VII.1	Objetivos generales.	41
VII.2	Objetivos particulares.	41
VIII.	METRIALES Y MÉTODOS.	42
VIII.1	Animales.	42
VIII.2	Modelo de dolor.	42
VIII.3	Inducción de edema por carragenina.	44
VIII.3.1	Diagrama de flujo	45
VIII.4	Medición de la acción analgésica por diclofenaco.	46
VIII.4.1	Diagrama de flujo	47
VIII.5	Medición de la adición analgésica del complejo de vitaminas B (B₁, B₆, B₁₂).	48
VIII.5.1	Diagrama de flujo	49
VIII.6	Potencia del efecto analgésico del diclofenaco con vitaminas del complejo B (B₁, B₆, B₁₂).	50
VIII.6.1	Diagrama de flujo	51





VIII.7	Medición del efecto de diclofenaco sin la formación del edema.	52
	VIII.7.1 Diagrama de flujo	53
VIII.8	Criterios de exclusión.	54
VIII.9	Fármacos.	54
IX.	EVALUACIÓN DE RESULTADOS.	55
X.	RESULTADOS.	56
XI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	69
XII.	CONCLUSIONES.	75
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.	76
	Artículo	87





i. TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1.	Características y propiedades de las fibras nerviosas.	7
2.	Sistemas que participan en la integración y modulación del dolor.	9
3.	Componentes principales del asta posterior de la médula.	10
4.	Tabla de la latencia después de la administración de la administración de carragenina y salina.	57
5.	Tabla de la latencia después de la administración de diclofenaco y carragenina.	60
6.	Tabla de la latencia después de la administración del complejo de vitaminas B y carragenina.	63
7.	Tabla de la latencia después de la co-administración de diclofenaco con el complejo de vitaminas B y carragenina.	66
8.	Tabla de la latencia después de la administración de diclofenaco y salina.	68

FIGURAS

1.	Fibras de conducción del estímulo doloroso.	5
2.	Esquema de los componentes de un nervio cutáneo.	8
3.	Sistema de modulación nociceptiva.	12
4.	Mediadores químicos de la nocicepción liberados por las terminaciones nerviosas que contribuyen al dolor e inflamación.	14
5.	Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico.	20
6.	Curva de volumen vs. tiempo en el desarrollo del edema producido por carragenina.	26
7.	Estructura química del diclofenaco y sus metabolitos identificados.	28
8.	Estructura química de la tiamina (vitamina B₁).	32
9.	Estructura química de la piridoxina (vitamina B₆).	34



10. Estructura química de la cianocobalamina (vitamina B ₁₂).	37
11. Fotografía del equipo para evaluar la hiperalgesia térmica.	43
12. Fotografía de la administración subcutánea de carragenina y salina en la pata derecha de la rata (A) y administración oral de diclofenaco (B).	44
13. Curso temporal de la latencia por la inducción de edema por carragenina.	56
14. Curso temporal de la latencia de la actividad analgésica de diclofenaco.	58
15. Gráfica de ABC de la actividad analgésica de diclofenaco.	59
16. Curso temporal de la latencia de la actividad analgésica del complejo de vitaminas B.	61
17. Gráfica de ABC de la actividad analgésica del complejo e vitaminas B.	62
18. Curso temporal de la latencia de la potenciación de diclofenaco por el complejo de vitaminas B.	64
19. Gráfica de ABC de la potenciación de la actividad analgésica de diclofenaco por el complejo de vitaminas B.	65
20. Curso temporal de la latencia de la actividad de la actividad de diclofenaco sin el estímulo hiperalгésico inducido por Carragenina	67



ii. Abreviaturas

ANOVA	Análisis de Varianza.
ABC	Area Bajo la Curva.
ADN	Acido Desoxirribonucleico.
AINES	Analgésicos antiinflamatorios no esteroidales.
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico.
ARN	Acido Ribonucleico
B ₂	Receptor para Bradicinina.
BK	Bradicinina.
CGPR	Gen relacionado al péptido de calcitonina.
CoA	Coenzima A.
CO ₂	Dióxido de Carbono.
COX	Ciclooxigenasa.
CYP	Citocromo P ₄₅₀ .
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico.
H1	Receptores para Histamina.
5 HT3	Receptores para Serotonina.
i.c.v.	Administración Intra-cerebroventricular.
IL-1	Interleucina 1.
i.t.	Administración Intra-tecal.
n	Número de animales.
NADPH	Fosfato de dihidrocotinamida adenin dinucleótido.
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal.



Abreviaturas

NO	Oxido Nítrico.
PG	Prostaglandina.
PMN	Polimorfonuclear.
PVI	Péptido Vasoactivo Intestinal.
s.c	Adminstración Sub-cutánea.
SP	Sustancia P
O ₂	Oxígeno.
p.o	Adminstración Oral.



I. ANTECEDENTES

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo heterogéneo de sustancias que comparten propiedades analgésicas y antipiréticas con eficacia variable. Tienen la capacidad de inhibir a la ciclooxigenasa (COX) (Ferreira y cols., 1972), enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas (PGs), uno de los mecanismos por el cual se produce analgesia (Vane y Botting, 1996). También se sabe que los AINEs bloquean la actividad de los nociceptores inhibiendo la hiperalgesia y el dolor (Lorenzetti y Ferreira, 1985). Sin embargo, su eficacia analgésica es menor a la de los opioides.

Con la finalidad de aumentar la eficacia analgésica de los AINEs y la de disminuir los efectos indeseables, se han empleado diversas estrategias experimentales. Una de ellas es combinar AINEs con cafeína (Granados-Soto y Castañeda-Hernandez, 1999) o morfina (Granados-Soto y cols., 1999). Otra es la combinación de AINEs con vitaminas del complejo B (Reyes-García y cols., 1999).

Es bien sabido que el efecto analgésico del complejo de vitaminas B se ha asociado con un aumento del control inhibitorio aferente de las neuronas de la médula espinal (Fu y cols., 1988; 1990), con la reducción de la respuesta de las neuronas talámicas ante una estimulación nociva (Jurna y Bonke, 1988; Sharma y cols., 1990; Jurna y cols., 1990), y con el aumento de la regeneración de las fibras nerviosas (Jurna y cols., 1990). En adición, este complejo de vitaminas B se ha usado extensivamente como un adyuvante analgésico para el tratamiento





de diferentes tipos de dolor (Vetter. y cols., 1988; Kuhlwein y cols., 1990; Meyer y cols., 1991, Lettko y cols., 1991) como es el caso de dolores de espalda o lumbalgias (Bruggemman y cols., 1990; Jurna y cols., 1990), dolores en neuropatía diabética, polineuropatías y dolores reumáticos (Bartoszyk, 1990).

Bruggemann, Lettko y Vetter en 1991 esclarecieron que la administración del complejo de vitaminas B, además de disminuir la dosis de diclofenaco, también reduce la duración en el tratamiento para diversos tipos de dolor.

Existe evidencia documental de que el complejo de vitaminas B, solas o combinadas presenta actividad analgésica en diversos modelos de dolor, mientras que el efecto anti-inflamatorio se ha observado en la prueba de edema inducida por carragenina. Se ha descrito que estas vitaminas potencian el efecto analgésico de AINEs (Bartoszyk y cols., 1989, 1990; Dimpfel y col., 1990) como es el caso de metamizol (Wild y cols., 1990) morfina y paracetamol (Jurna y cols., 1990) y del diclofenaco en un modelo de dolor tipo inflamatorio (Bartoszyk y Wild, 1989; Reyes-García y cols., 1999).

Existe controversia de si las vitaminas del complejo B realmente producen alivio del dolor por si solas o si son capaces de aumentar el efecto analgésico del diclofenaco (Eschalier et al., 1983; Misumi y cols., 1985; Brom y cols., 1995).

Puesto que hay poca información sobre los estudios de la interacción del complejo de vitaminas B como analgésico adyuvante para potenciar el efecto del diclofenaco o de otros AINEs y esclarecer el tipo de actividades que le confieren esta co-administración, es necesario estudiar el efecto del diclofenaco solo o combinado con el complejo de vitaminas B en diversos modelos de hiperalgesia y





así establecer si la co-administración potencia el efectos analgésico y anti-inflamatorio del diclofenaco y de otros AINEs.





II. INTRODUCCION.

II.1. Dolor y Nocicepción.

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial (Lipton, 1991), es una experiencia subjetiva y el foco predominante de las manifestaciones clínicas, que cuando tienen la suficiente intensidad se justifica con la atención clínica (Hyman y Cassem, 1995).

La función del dolor es ayudar a mantener la integridad del organismo ante un daño que, eventualmente, pudiera ser destructivo. Sin embargo, muchas veces el dolor sobrepasa esta función y se vuelve patológico (Fields y Martin, 1994). El componente sensorial del dolor se denomina *nocicepción*. La nocicepción es un término neurofisiológico que se enfoca a los mecanismos neuronales por los cuales se detectan los estímulos nocivos (Hyman y Cassen, 1995) e involucra la transducción de impulsos nerviosos por terminales periféricas (**nociceptores**). El estímulo nocivo activa las terminaciones sensitivas periféricas de los nociceptores aferentes primarios por un proceso de transducción. El mensaje se transmite por el nervio periférico a la médula espinal, en donde ocurre sinapsis con las células que se originan en las vías ascendentes principales del dolor y llega hacia centros superiores del dolor como el tálamo y corteza (**Figura 1**). Este mecanismo electroquímico complejo consiste en cuatro procesos fisiológicos distintos:

1. La *transducción* que describe la conversión de estímulos nocivos en señales eléctricas por terminaciones nerviosas periféricas.





2.-*Transmisión* es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas.

3.-La *modulación* describe la alteración de las señales nociceptivas dentro del asta dorsal de la médula espinal. En ella se entrecruzan terminaciones nerviosas de diferentes tipos, y se liberan neurotransmisores que inhiben, alteran o amplifican la señal sensorial.

4.-*Percepción* es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor.

La función del sistema nociceptivo es detectar, localizar e identificar los procesos que lesionan los tejidos. La percepción del estímulo nociceptivo es controlado a cualquier nivel de la vía sensitiva aferente, desde el nervio periférico hasta la corteza cerebral (Hyman y Cassem, 1995).

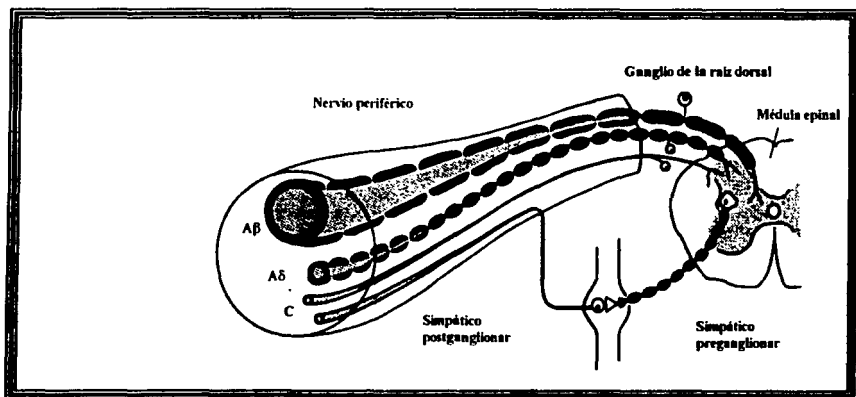


Figura 1. Fibras de conducción del estímulo doloroso.





II.2. Fisiopatología del dolor.

II.2.1. Nociceptores.

Los nociceptores están localizados en todo el cuerpo, son ramificaciones terminales especializadas de las fibras nerviosas sensitivas. Estos nociceptores se pueden activar directa o indirectamente por una sensación térmica, mecánica o química que pueden desencadenar el proceso del dolor. El dolor puede surgir a partir de la estimulación de los receptores del dolor o nociceptores, éstos están localizados en cuatro zonas principales del cuerpo: la piel (cutáneos), las estructuras músculo-esqueléticas, músculo-visceral y visceral. Los nociceptores pueden contener uno de los varios tipos de axones, clasificados en cuatro grupos principales, dependiendo de su diámetro y grado de mielinización: fibras A- α , A- β , A- δ y C (Fields y Martín, 1994; Hyman y Cassem, 1995) (Tabla 1). Las fibras A- α son fibras mielinizadas, tienen un diámetro de 12-22 μm , responden a actividad motora propioceptiva. Las fibras A- β tienen menor diámetro (5-13 μm), están más mielinizadas e incluyen a mecano-receptores cutáneos que responden al tacto ligero y estiramiento. Las fibras A- δ responden sólo a estímulos mecánicos moderadamente intensos o nocivos, están poco mielinizadas y el diámetro del axón es de 1 a 5 μm , su velocidad de conducción es de 6-30 m/seg. En ausencia de estimulación estos receptores son silenciosos, no responden al frío intenso, ni a las sustancias algógenas, pero sí a los estímulos nocivos calóricos que se aplican repetitivamente. Las fibras C son amielínicas y el diámetro de su axón es de 0.2





a 1.3 μm , tienen una velocidad de conducción de 0.2-2.3 m/seg (Bowman y Rand, 1984) además son nociceptores que responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos (Figura 2).

Tabla 1. Características y propiedades de las fibras nerviosas.

<i>Clasificación de las fibras nerviosas</i>	<i>Diámetro de la fibra</i>	<i>Velocidad de conducción</i>	<i>Otras características anatómicas y fisiológicas</i>
MIELINIZADAS	μm	m/seg	
A- α	12-22		Motora proceptiva
A- β	5-13	30-70	Tacto ligero (sensibilidad al músculo) presión
A- γ	3-8	14-40	Tono muscular
A- δ	1-5	6-30	Mecánicos pero pueden sensibilizarse con estímulos térmicos repetitivos
B- β	1-5	12-30	Dolor, temperatura (frio-calor) presión
B- β	1-3	3-15	Nervios autonómicos preganglionares
NO MIELINIZADAS			
C-1 IV	0.2-1.2	2	Dolor, temperatura (frio-calor)
C-2 IV	0.3-1.3	2	Vaso-motor, visceromotor, pilo-motor/sudor



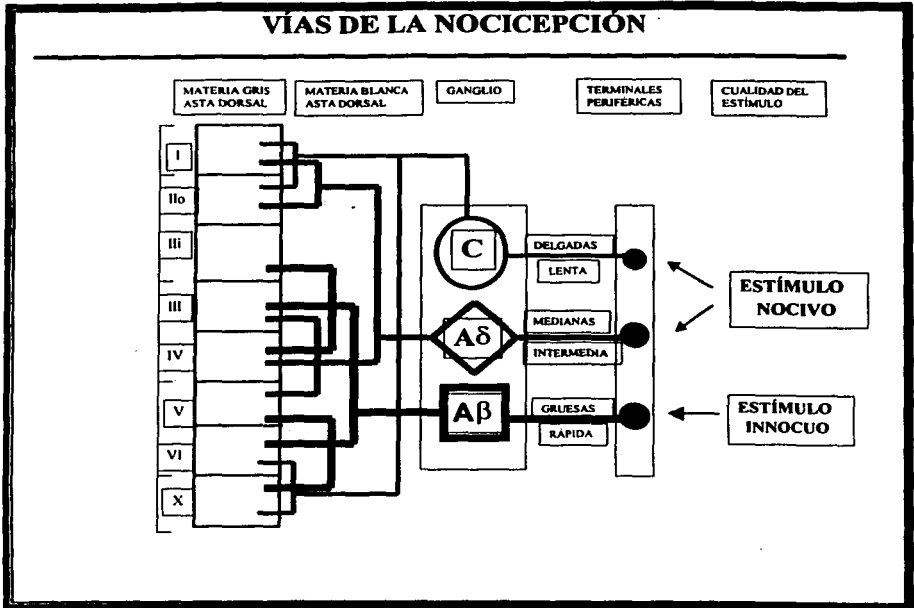


Figura 2. Esquema de los componentes de un nervio cutáneo típico. Los axones aferentes primarios son mielinizados de diámetro grande (A- β), mielinizados de diámetro pequeño (A- δ) y amielínicos (C).

II.2.2. Médula Espinal.

La estimulación de los nociceptores cutáneos produce impulsos que son transmitidos por las fibras A δ y C, y llegan a la médula a través de los nervios espinales.

Las tres cuartas partes de las fibras A δ responden a estímulos inocuos mecánicos y térmicos y sólo una cuarta parte responde a estímulos mecánicos





muy intensos que dañan a los tejidos. Estas unidades nociceptivas constituidas por estas fibras se hallan no sólo en la piel y tejido celular subcutáneo, sino también en las vísceras, músculos y otras estructuras profundas. En las raíces dorsales el 50% de las fibras C no mielínicas pertenecen a los mecanorreceptores que responden a la estimulación inocua del cuero cabelludo u otras zonas del folículo, mientras que unos pocos son sensibles a la estimulación térmica inocua. Del 50% restante, alrededor del 20% son nociceptores mecánicos y un 30% nociceptores térmicos. Algunas fibras de umbral alto son también polimodales; responden tanto al calor nociceptivo como a la distorsión mecánica intensa (Tabla 2).

Tabla 2. Sistemas que participan en la integración y modulación del dolor.

SISTEMA TRANSMISOR*	Fibras A β	Fibras Aδ y C **
Espesor	Gruesas	Finas
Funcionalidad	No nociceptivas	nociceptivas
Velocidad de conducción	Alta	Baja
Adaptación	Rápida	Lenta
Agotamiento	Fácil	Difficil
Actúan como	Sistema inhibidor	Sistema activador

- * La descarga es responsable del mensaje doloroso.
- ** Los dos tipos de fibras forman parte de las raíces sensitivas de los nervios espinales que penetran en el asta posterior de la médula.

II.2.3. Asta posterior de la médula espinal.

El asta posterior es una estructura altamente compleja, contiene diversos tipos de neuronas y sinapsis, además de la recepción y la transmisión, produce un alto grado de procesamiento sensitivo que incluye abstracción local,





integración, selección y distorsión apropiada. Por lo tanto, se produce una marcada modulación de la nocicepción y de otras sensaciones, mediante una forma muy compleja de procesamiento local que se activa a través de fenómenos de excitación e inhibición provenientes de la periferia, de las interneuronas locales, tallo cerebral y cerebro, involucrándose neurotransmisores locales y centrales (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes principales del asta posterior de la médula

- ❖ Terminales centrales de neuronas primarias aferentes inervando tejido cutáneos y profundos.
- ❖ Neuronas internas, incluyendo neuronas locales y neuronas de proyección.
- ❖ Axones terminales de neuronas externas originadas principalmente desde vías descendentes del tallo cerebral.

II.2.4. Sistema espinotalámico.

Es la vía más importante para la transmisión nociceptiva de la médula espinal al tálamo. El haz espinotalámico lateral, formado por fibras largas mielinizadas que hacen conexión directa con el tálamo, en los núcleos ventrolateral y posterior. Allí se establecen sinapsis en las fibras de la corteza somatosensorial, conduciendo los impulsos nociceptivos más rápidamente procesando la información en forma discriminativa en forma continua.

El haz espinotalámico medio, filogenéticamente más antiguo, se localiza en la zona media y está compuesto por fibras cortas que se proyectan a la formación reticular de la médula media, a los puentes laterales y cerebro medio (área límbica media) y luego al núcleo talámico intralaminar medial. Estas fibras





espinorreticulares establecen contacto con fibras que se conectan con estructuras hipotalámicas, del cerebro límbico anterior y con otras zonas del cerebro. Este sistema no está organizado para brindar información discriminada, pero está involucrado en las respuestas reflejas relacionadas con la circulación y la función endocrina; provocando el impulso motivacional y el efecto displacentero que lleva al organismo a la reacción.

II.2.5. Sistema trigeminal.

La nocicepción de la región cefálica se conduce por fibras sensoriales de los nervios craneanos V, VII, IX y X, cuyas fibras proximales penetran en el tallo encefálico, asociándose con el núcleo sensitivo del trigémino, donde hacen sinapsis con neuronas de segundo orden. Estos nociceptores trigeminales centrales están localizados en la porción inferior del núcleo caudado (caudal) del asta posterior de la médula espinal cervical.

Muchos de ellos atraviesan varias zonas hasta la formación reticular del tallo encefálico hipotalámico y los núcleos talámicos medial e intralaminar (Figura 3).



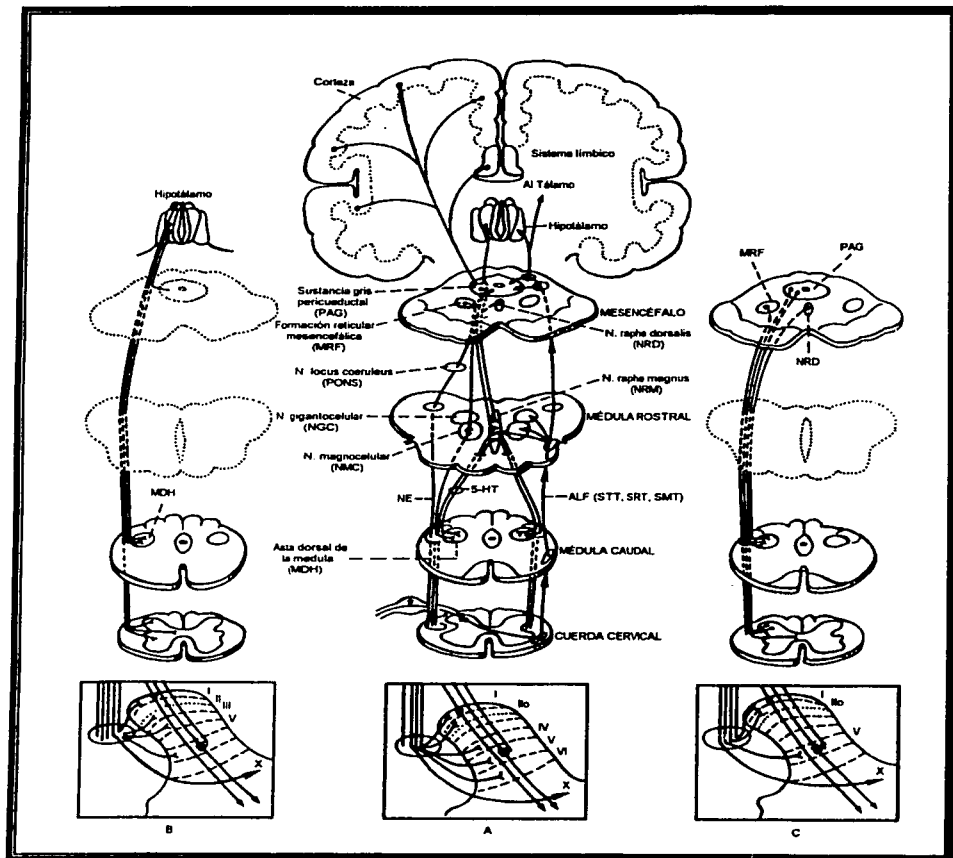


Figura 3. Sistema de modulación nociceptiva: A. Sistema anterolateral ascendente (ALF), B. Sistema hipotálamo-espinal descendente y C. Sistema PAG-espinal.





II.3. Neurmoduladores del dolor y la inflamación.

Existen diversas sustancias químicas llamadas neuromoduladores, que median o facilitan el proceso de inflamación, alterando las funciones de las neuronas ocasionando o modulando el dolor. Entre los neuromoduladores más comunes se encuentran la histamina, serotonina, bradicinina, el factor activador de plaquetas, interleucina-1, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, sustancia P, protones, radicales libres, péptido vasoactivo intestinal (PVI), noroepinefrina, dopamina, glicina, GABA, neurotensina, óxido nítrico (Vane y Botting, 1990). Sin embargo, las funciones de cada una de estas sustancias no están completamente esclarecidas, ya que hay una interacción íntima con la liberación de las mismas en el sitio de lesión (**Figura 4**), lo cual provoca que la acción de una modifica la respuesta de otra.

Aunque algunas de estas sustancias químicas activan a los nociceptores, y por tanto están involucradas directamente en la generación del dolor, otras llevan a la sensibilización de la respuesta nociceptiva ante un estímulo natural (Meyer y cols., 1994).

A continuación se mencionan algunos de los neuromoduladores de mayor importancia sobre el dolor y la nocicepción.



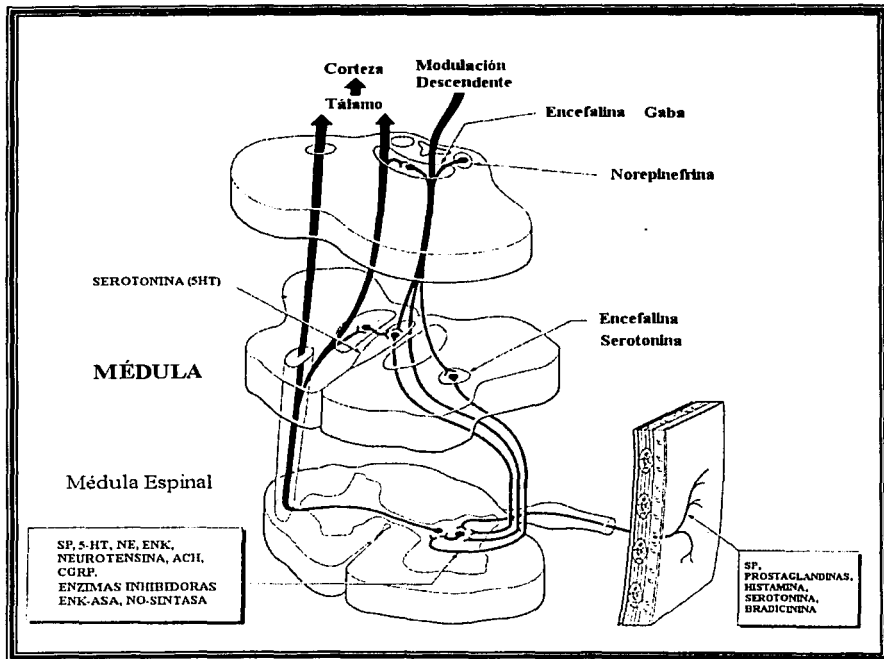


Figura 4. Mediadores químicos de la nocicepción liberados por las terminaciones nerviosas que contribuyen al dolor e inflamación.

II.3.1. Dopamina.

Es una catecolamina derivada de la hidroxilación de la tirosina y de la descarboxilación de la dopa. Parece jugar un papel importante en la modulación del dolor ya que al unirse a su receptor preganglionar sensibiliza a los nociceptores causantes de la hiperalgesia. Existen neuronas dopaminérgicas en





la sustancia negra, en el cerebro medio, en el núcleo del mesencéfalo y el hipotálamo. Además se ha demostrado que la administración de dopamina intracerebral aumenta la actividad analgésica de la morfina (Stimel, 1983).

II.3.2. Histamina.

La histamina puede ser identificada en el cerebro, los niveles más altos se localizan en el cerebelo, hipotálamo ventral y región preóptica (Stimel, 1983). La histamina se produce por descarboxilación de la histidina, por efecto de la enzima L-histidina descarboxilasa. Esta sustancia se libera en los procesos de degranulación de las células cebadas, provocados por mediadores de la inflamación. La activación de su receptor H_1 produce un aumento en la permeabilidad de la membrana neuronal al calcio, liberando péptidos y cininas causando hiperalgesia.

II.3.3. Serotonina (5-HT).

La serotonina (5-hidroxitriptamina) se produce por descarboxilación del 5-hidroxitriptófano. La serotonina se libera desde los eritrocitos y macrófagos durante un daño al tejido y puede sensibilizar y activar directamente a los nociceptores provocando dolor. Actualmente se han relacionado tres subtipos de receptores de serotonina: 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃. Se ha visto que los receptores 5-





HT_{1A} facilitan la respuesta nociceptiva en tanto que los receptores 5-HT_{1B/D} la inhiben (Alhaider y Wilcox, 1993).

Los receptores 5-HT₂ acoplados a proteínas G sensibilizan a las neuronas mediante la activación de la fosfolipasa C que produce IP₃ y DAG, lo que libera calcio, aumentando su concentración intracelular, que a su vez provocan un aumento en la descarga neuronal. Los receptores 5-HT₃ se encuentran acoplados a canales iónicos que aumentan la permeabilidad de sodio y disminuyen la de potasio permitiendo una repetición más frecuente de disparos neuronales produciendo hiperalgesia (Wilcox y cols., 1990).

II.3.4. Sustancia P.

La sustancia P es un polipéptido perteneciente a la familia de las neurocininas que agrupa a la neurocinina A y al péptido relacionado al gen de la calcitonina. Es una sustancia que se encuentra en el asta dorsal de la médula espinal, en la duramadre, médula espinal y aferencias sensoriales (Hall y Geppetti, 1995; Basbaum y Fields, 1999).

La sustancia P es un neurotransmisor aferente primario liberado por la activación de fibras C, esta involucrado en reacciones inflamatorias debidas a un daño tisular químico o térmico (Gamse, 1984) que produce vaso dilatación, incremento en la permeabilidad plasmática, liberación de histamina por mastocitos e incremento en la actividad fagocitaria de neutrófilos y macrófagos. Cuando hay una producción exagerada de impulsos anormales en el asta dorsal, se libera





sustancia P, presentándose una despolarización prolongada, representándose como hiperalgesia (Boehmer y cols., 1989).

II.3.5. Glutamato.

El glutamato es un neurotransmisor ampliamente asociado a la neurotransmisión excitatoria rápida entre los nociceptores y las neuronas espinales (Wilcox, 1991). Más de la mitad de las neuronas del asta dorsal liberan glutamato en respuesta al dolor (Wilcox y cols., 1997). En apoyo a esta interpretación, se menciona a la capsaicina, que es una sustancia presente en el chile que provoca dolor y que activa selectivamente los nociceptores C polimodales estimulando la liberación de glutamato de las neuronas aferentes primarias. Además, se ha visto que la recuperación de glutamato y aspartato en microdiálisis del asta dorsal de la médula espinal en vivo se incrementa después de la inyección de químicos nocivos en la periferia (Skilling y cols., 1988), proporcionando soporte adicional a la hipótesis que el glutamato y aspartato están relacionados con la actividad nociceptiva.

II.4. Inflamación y dolor.

La respuesta inflamatoria generalmente está asociada con dolor (Stimmel y cols., 1983). Los mediadores químicos de la nocicepción surgen no sólo de los tejidos dañados y de las células que intervienen en la inflamación si no también de las neuronas nociceptivas. Las terminaciones nerviosas libres, liberan sustancias algésicas en los tejidos activando así nociceptores adyacentes,





contribuyendo al dolor e inflamación. Después de una lesión tisular, se libera potasio, serotonina e histamina desde las células dañadas y vasos lesionados originando una respuesta triple (activación de nociceptor, enrojecimiento y edema). Al comienzo de esta respuesta la bradicinina (BK) inicia con la liberación de prostaglandinas (PG), lo que origina la activación de los nociceptores y un aumento de la permeabilidad vascular y la hiperalgesia. La transmisión del estímulo a las fibras aferentes originan la liberación de sustancia P (SP) y CGRP en el sitio de lesión, bradicinina e histamina. Estas sustancias activan a los nociceptores restantes que originan la respuesta inflamatoria y dolor (Wolf, 1991).

II.4.1. Iones Hidrógeno (H^+).

Se producen en condiciones tisulares ácidas como en la inflamación, isquemia, hipoxia e inflamación, producen dolor, espasmo muscular y en estados de enfermedad hiperalgesia debido a que aumentan la permeabilidad de la membrana, causando dolor y espasmo muscular. Los protones inducen el aumento de la sensibilidad al aumentar la permeabilidad de la membrana, incrementando así la sensibilidad mecánica.

II.4.2. Metabolitos de ácido araquidónico.

Los fosfolípidos son componentes importantes de las membranas celulares y se ven sometidos a la degradación por fosfolipasas bajo ciertas condiciones,





como la exposición de las células a estímulos inflamatorios o nocivos (Ferreira y cols., 1972).

La segmentación de los fosfolípidos causa la liberación del ácido araquidónico, que puede metabolizarse para formar mediadores y reguladores de la inflamación como son los leucotrienos, tromboxanos y las prostaglandinas (PGE_2 , $PGE_{2\alpha}$) pertenecientes al grupo de los prostanoides (Figura 5).

Las prostaglandinas son moléculas lipofílicas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico después del efecto de la enzima ciclooxigenasa. La PGE_2 modula varios fenómenos inflamatorios, incrementa la permeabilidad vascular e incrementa la sensibilidad al dolor, también estimula la formación del AMPc (segundo mensajero) en muchos tipos de células inflamatorias suprimiendo varias respuestas inmunitarias, como son la liberación de mediadores de las células cebadas y reacciones citotóxicas mediadas por linfocitos, los receptores de prostaglandinas se encuentran acoplados a proteínas G que al ser activados inhiben canales de potasio y activan canales de sodio provocando la despolarización e incrementado la velocidad de disparo, además induce la liberación de, sustancia P y óxido nítrico (NO) produciendo la hiperalgesia (Vanegas y Schaible, 2001).



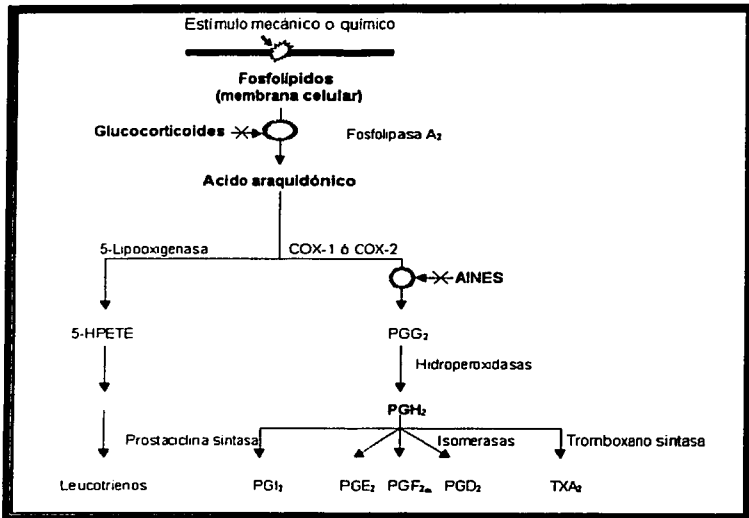


Figura 5. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y mecanismo de acción de los AINEs.

II.4.3. Cininas.

Las cininas actúan como mediadores de la inflamación, afectando la liberación de prostaglandinas, citocinas y radicales libres, estimulando neuronas posganglionares para inducir hiperalgesia. La bradicinina es uno de los compuestos liberados inicialmente en lesiones tisulares, esta sustancia es la responsable de la activación prolongada de nociceptores. Esta activación se manifiesta como una extravasación de plasma originando el edema, seguido por una concentración de células endoteliales y a un aumento de la permeabilidad



vascular, sensibilizando nociceptores en el músculo, articulaciones y piel (Calixto y cols., 2000). Otra cinina es la calicreína, la cual afecta a los receptores B_2 de la neuronas sensoriales, alterando la función de fosfolípidos de la membrana, los canales de sodio y calcio, haciéndola más permeable al sodio y calcio, permitiendo una repetición más frecuente de disparos neuronales, provocando hiperalgesia.

II.4.4. Óxido nítrico.

El óxido nítrico es un mediador biológico que se produce endógenamente a partir del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por la sintasa de óxido nítrico; reacción que requiere de NADPH y O_2 como cofactores (Elliot y Elliot, 1997). La biosíntesis del óxido nítrico ocurre en tejidos que incluyen células del endotelio vascular, plaquetas, leucocitos, fibroblastos, en células de la corteza adrenal y pulmón. Además, el óxido nítrico puede servir como mensajero neuronal a nivel periférico (Bult y cols., 1990; Gibson y cols., 1990; Tucker y cols., 1990) y central (Garthwaite y cols., 1991) y está implicado en eventos fisiológicos como la fiebre, neurotoxicidad, neuroplasticidad y nocicepción (Vincent y Hope, 1992; Bredt y Snyder, 1992; Aley y cols., 1998).

Esto ocurre por que el óxido nítrico es un radical libre soluble tanto en medios lipídicos como en acuosos, lo que le permite difundir rápidamente desde su lugar de síntesis hasta otros sitios como el músculo liso de diversos órganos (Schuman y Madison, 1994), por lo cual se ha sugerido que esta relacionado en la transmisión a nivel central (SNC) y a nivel periférico (Sousa y Prado, 2001).





III. MODELOS PARA EVALUAR EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO.

Los modelos consisten en la administración de sustancias químicas (modelos químicos), aplicación de presión mecánica en alguna región del cuerpo del animal (modelos mecánicos), de calor (modelos térmicos) y de voltaje (modelos eléctricos) y luego se compara la capacidad de un fármaco estudiado para suprimir o retrasar la aparición de una respuesta dolorosa empleando un analgésico conocido (Grewall, 1992, Dibuisson y Denis, 1977; Kuhar y Pasternak, 1984; Tjølsen y cols., 1992; Malmberg y cols., 1992).

III.1. Modelos mecánicos.

Este tipo de estímulos poseen la ventaja de que pueden graduarse de acuerdo a la intensidad o duración del estímulo, pero tienen la desventaja de no ser específicos. Pues hay estimulación de mecanorreceptores de bajo umbral (Le Bars y cols., 2001).

Se basan en la aplicación de una presión constante por medio de una pinza arterial cuidadosamente graduada en la cola o en los extremos de las patas de los animales. Al momento en que se desencadena un comportamiento de lucha o emisión de queja, se interrumpe el estímulo, y se toma nota del umbral para observar la respuesta (Ferreira y cols, 1978; Kuhar y Pasternak, 1984).

III.2. Modelos eléctricos.

Se han creado diversos métodos que dan descargas eléctricas ligeras a los animales a través del piso de la jaula o por electrodos aplicados en la piel en los





sitios sensibles de la mucosa rectal, la pulpa dentaria o en la cola de la rata o ratón (Grewall, 1952).

Poseen la ventaja de ser cuantificables, reproducibles y no invasivos, sin embargo, tienen la desventaja de ser un estímulo no selectivo debido a que estimulan también fibras no nociceptivas (Le Bars, 2001).

III.3. Modelos térmicos.

Se basa en la aplicación de calor ("tail-flick", "tail-plinch" o "hot-plate"). En la prueba de la *plancha caliente* o "hot-plate" se colocan ratas o ratones sobre la superficie de una placa caliente a una temperatura de 51-55°C. Después de un periodo de latencia los animales muestran signos de molestia, como lamerse los extremos de las patas o saltar (Ankier 1974).

En la prueba de *calor radiante*, se enfoca la luz de un bulbo eléctrico sobre una zona rasurada del dorso del animal. Se utiliza una prueba similar en voluntarios humanos; el calor se enfoca en la frente que previamente se pinta de negro con hollín para aumentar la absorción del calor. El individuo señala cuando siente dolor.

En todas las pruebas mencionadas anteriormente no es posible decir que la sensación en el animal es la misma que experimenta el hombre. Pero los resultados que se obtienen en estas pruebas son de gran importancia en el cernimiento de fármacos que pueden dar idea de su eficacia, potencia y mecanismo de acción.





III.4. Modelos químicos.

III.4.1. Prueba de formalina.

Esta prueba se encuentra dentro de los modelos químicos e involucra un dolor continuo generado por un daño tisular (Dubuisson y Denis, 1977). Consiste en inyectar formalina de 1 a 5% en la pata de la rata (Tjölse y cols., 1992) y se observa el comportamiento del animal tal como elevar, sacudir, lamer o morder la pata inyectada, traduciéndolo como una respuesta medible ante el efecto nociceptivo de la formalina. La respuesta es bifásica y la duración es de aproximadamente una hora (Wheeler-Aceto y cols., 1990; 1991).

III.4.2. Modelo de contorsiones y de distensión colorrectal.

Es un modelo tipo visceral químico por que se administra una inyección intraperitoneal de sustancias algógenas como son: ácido acético, fenilquinona, benzoquinona o bradicinina produciendo una respuesta característica de contorsiones en los animales debido a que se provoca un estímulo progresivo, de larga duración y ofrecen la ventaja de medir el comportamiento del animal a través del tiempo cuando se le administra fármacos analgésicos (Dickerson y cols., 1965).





III.4.3. Modelo de inflamación por carragenina.

Como ya se había mencionado, no se puede observar respuestas analgésicas del diclofenaco en modelos que se consideran exclusivos para opioides como es el caso de la plancha caliente o tail-flik, por ello se han desarrollado otros modelos donde se pueda ver la actividad de los AINEs en la reducción del edema. Por tal motivo se empleó este modelo para ver la acción del diclofenaco y el complejo de vitaminas B sobre la disminución del edema producido por carragenina.

Este modelo se clasifica como modelo químico por que emplea una sustancia química (**carragenina**) para producir inflamación o edema en la pata del animal (Winter y cols., 1962; Schreiber y cols., 1968). Y como modelo térmico por que posterior a la administración de **carragenina** se aplica un imputso térmico en la pata inflamada de la rata.

La carragenina es un mucopolisacárido derivado del musgo marino Irlandés, *Chondrus* que al ser administrado al animal causa edema en dos fases. La primera fase comienza en la primera hora después de la inyección de 50 µl de carragenina. En la segunda fase, se desarrolla totalmente el edema (inflamación), esta fase comienza al finalizar la primera hora y treinta minutos después se encuentra el pico máximo de inflamación, con una duración de 3 horas (**Figura 6**).





El mecanismo de formación del edema por carragenina es desconocido, pero se sabe que esta sustancia probablemente no está relacionada a la histamina o serotonina, ya que se ha observado que varias dosis de un antagonista de histamina y serotonina fueron inactivas para disminuir el edema producido por carragenina (Winter y cols., 1962).

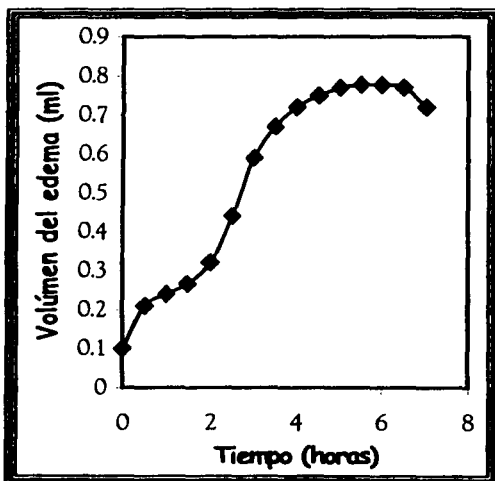


Figura 6. Curva de volumen contra tiempo en el desarrollo de edema en ratas inyectadas con 50 μ l de carragenina en la pata derecha.

IV. ANALGÉSICOS.

Un analgésico es una sustancia que a través de su acción sobre el sistema nervioso central o bien en el sistema nervioso periférico, sirve para reducir o disminuir el sufrimiento originado por dolor, sin producir inconciencia.





IV.1. Analgésicos Anti-inflamatorios No Esteroidales (AINEs).

Los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de fármacos con acciones similares que ejercen sus efectos por uno o más mecanismos de acción, pero su estructura química es diversa. Los fármacos más utilizados son el ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, indometacina, sulindac, piroxicam, meloxicam, nimesulide, ketorolac y diclofenaco (Insel, 1996; Vaile y Davis, 1998). Estos fármacos son utilizados por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y anti-inflamatorias. Su principal mecanismo de acción es la inhibición de la ciclooxigenasa 1 (COX-1; constitutiva) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2; inducida en el sitio de inflamación), mediante la cual se produce la reducción de prostaglandinas y tromboxanos (Cashman, 1996). Las prostaglandinas participan en la sensibilización y la excitación de los nociceptores y por lo tanto en el dolor e hiperalgesia. Por lo tanto, el mecanismo de acción principal de los AINEs se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (**Figura 6**).

IV.2. Diclofenaco.

El diclofenaco es un AINE que se utiliza principalmente en dolores reumáticos y no reumáticos (Menaseé y cols., 1978). La actividad analgésica y anti-inflamatoria se debe principalmente a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Menassé y cols., 1978). Estructuralmente, es la sal de sodio del ácido o-[(2,6-dicloro-fenil)amino]-fenil acético, cuya estructura se muestra en la **Figura 7**.



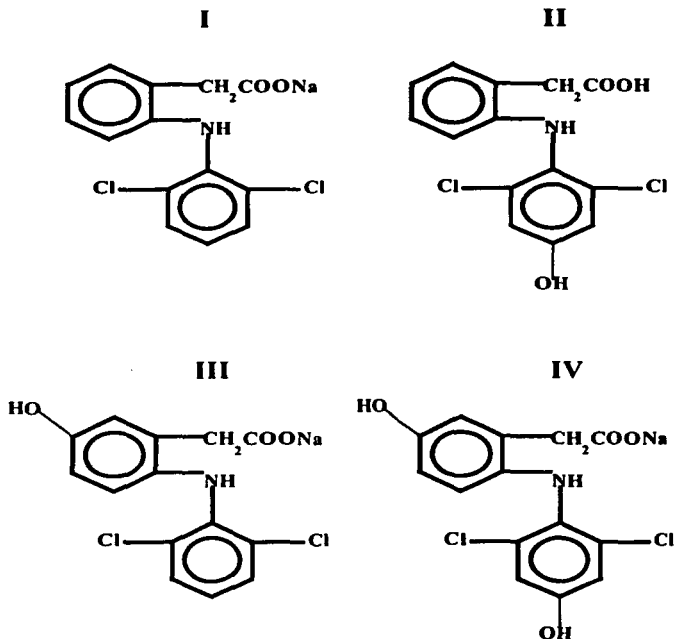


Figura 7: Estructura química del diclofenaco y sus metabolitos identificados en la rata. el diclofenaco sódico (I), 4'-hidroxi-diclofenaco (II), 5-hidroxi-diclofenaco (III) y 4',5-hidroxi-diclofenaco (IV).

IV.2.1. Mecanismo de acción del diclofenaco.

IV.2.1.1. Nivel periférico.

Como otros agentes anti-inflamatorios, el diclofenaco inhibe la síntesis de prostaglandinas tanto *in vitro* (Ku y cols., 1975; García-Rafanell y Forn, 1979), como *in vivo* de una manera competitiva (Menassé y cols., 1978; Oliw y cols., 1978; Mair y cols., 1979) explicando así gran parte de su actividad



farmacológica. También se ha reportado que este fármaco disminuye la producción de prostaglandinas, de leucocitos y células sinoviales de manera independiente de su acción inhibitoria sobre la COX, estimulando la reincorporación del ácido araquidónico hacia los triglicéridos (Ku y cols., 1986; O'Neill y Lewis, 1989).

La acción analgésica del diclofenaco no está asociada solamente con la prevención de la sensibilización de los nociceptores (inhibición de la síntesis de prostaglandinas), si no que disminuyen el número de receptores sensibilizados al dolor. Este mecanismo involucra la producción de óxido nítrico (Tonussi y Ferreira, 1994). Se ha sugerido que además de esta acción y de la acción inhibitoria de prostaglandinas, el diclofenaco aparentemente posee un mecanismo adicional de acción analgésica mediante la liberación de péptidos endógenos (Sacerdote y cols., 1985). Las concentraciones de β -endorfinas en el plasma y el líquido cefalorraquídeo (LCR) están aumentadas (Sacerdote y cols., 1985) después de la administración de diclofenaco. Adicionalmente, se ha demostrado que, *in vitro*, el diclofenaco presenta un efecto inhibitorio sobre la elastasa de los polimorfonucleares (PMN), la cual es una proteína que participa en la degradación del cartilago en los proceso reumáticos crónicos (Steinmeyer y Kalbhen, 1990). También se ha observado que los PMN generan efectos inhibitorios sobre la adhesividad y la quimiotaxis inducida naturalmente por los atrayentes durante el proceso inflamatorio (Berradía y cols., 1988).





IV.2.1.2. Nivel central.

El efecto antinociceptivo del diclofenaco involucra un componente del sistema nervioso central. Parte de su efecto antinociceptivo parece estar mediado por el sistema opioide descendente inhibitorio, el sistema serotoninérgico y/u otros sistemas de neurotransmisión que interfieren con el tráfico del impulso doloroso de tipo visceral a nivel espinal (Björkman, 1995). En modelos como el de contorsión abdominal y el de distensión colorrectal (modelos de dolor tipo visceral), la administración i.c.v. o i.t. de diclofenaco produce un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis. Este efecto central se bloquea por la administración de naloxona (Björkman y cols., 1990). Sin embargo, en otros modelos que se consideran exclusivos o selectivos para opioides (plancha caliente y "tail flick") el diclofenaco no muestra propiedades nociceptivas. Esto indica que la acción central del diclofenaco es independiente de la activación de receptores opioides.

IV.2.2. Farmacocinética y metabolismo.

El diclofenaco se absorbe rápida y completamente, alcanzando una concentración máxima en plasma al término de 2 a 3 horas. Se advierte un notable efecto de primer paso. El diclofenaco es altamente afin a proteínas plasmáticas (99%) y su vida media es de aproximadamente dos horas. Se acumula en el líquido sinovial después de su ingestión lo que origina una mayor duración del efecto terapéutico. Se metaboliza en el hígado por medio de la familia del citocromo P₄₅₀ CYP2D6 para dar 4-hidroxiciclofenaco que es el





metabolito principal y otras formas hidroxiladas. Se excreta por la orina el 65% y en la bilis el 35% (Goodman y Gilman, 2000).

IV.3. Propiedades analgésicas y anti-inflamatorias del complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂).

Los fármacos con actividad analgésica como la aspirina, paracetamol, diclofenaco, etc, con frecuencia causan efectos secundarios si se administran a altas dosis, después de un uso prolongado o si se administran dosis bajas en forma individual tienen poca eficacia. Por lo tanto, la combinación de analgésicos puede ser una opción para obtener una alta eficacia analgésica con un mínimo de efectos adversos, debido a que se requiere menos dosis de los fármacos co-administrados.

Se conoce que el complejo de vitaminas B tienen actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria (Bartoszy y cols., 1989), pero su mecanismo de acción es desconocido. Este complejo, compuesto por tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆) y cianocobalamina (vitamina B₁₂) son esenciales para la síntesis de neurotransmisores, para la producción de mielina en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico (Bermond, 1989).

IV.3.1. Tiamina (vitamina B₁).

La tiamina (Figura 8) es la primera vitamina del complejo B. La deficiencia de esta vitamina causa polineuropatía, acompañada por una degeneración axonal. Altas dosis de tiamina producen bloqueo ganglionar (Castro, 1965;





Boissier, 1966) y supresión de la transmisión del estímulo neural. La relación entre la vitamina B₁ y el sistema nervioso fue la base para extender el uso de altas dosis de tiamina por diversas rutas con el propósito de aliviar el dolor neuropático ya que la tiamina prácticamente carece de acciones farmacológicas a bajas dosis en humanos (Bermond, 1989).

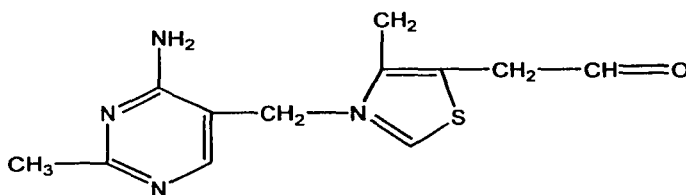


Figura 8. Estructura química de la tiamina.

IV.3.1.1 Absorción, destino y excreción

La tiamina es una coenzima esencial para el metabolismo de los carbohidratos, interviene en la descarboxilación oxidativa del piruvato de acetil coenzima A y en la síntesis de acetilcolina (mediador químico neuronal).

La tiamina y sus ésteres tiene un alto grado de recambio en el organismo y no se almacena en ningún órgano o tejido por tiempos prolongados, por lo que es indispensable una ingesta continua.

La tiamina y sus derivados que ingresan por vía digestiva natural o por vía parenteral, se depositan rápidamente en el hígado, el músculo, el cerebro y en menor grado en otros tejidos, su absorción es en la porción proximal del intestino





delgado, se almacena en pequeños depósitos en el músculo con una breve vida biológica

La tiamina en exceso se almacena y se deposita en sus 3 tipos de ésteres, pasado cierto límite se elimina el resto por orina (<http://www.plmlatina.com>).

IV.3.2. Piridoxina (vitamina B₆).

La vitamina B₆ (Figura 9), es una coenzima de lisiloxidasa, esencial para la formación del fibroblasto (Mielke y cols., 1985) ya que éstos ayudan a la síntesis y liberación de colágeno por la influencia del ácido ascórbico. Se sabe que el colágeno es esencial para la formación de articulaciones, que es el sitio donde se originan muchas condiciones de dolor.

La concentración de piridoxina en sangre es baja en artritis reumatoide (Igari y cols., 1978), aunque no es bien conocido si el decremento de esta vitamina es una causa o una consecuencia de los mecanismos reumáticos. Estudios recientes muestran que la administración de piridoxina puede suprimir directamente la respuesta de estímulos nociceptivos, lo que sugiere que esta supresión puede originar una respuesta analgésica (Sharma y cols., 1989). Finalmente, la influencia de la piridoxina en el metabolismo de serotonina indica que puede prevenir manifestaciones del dolor.



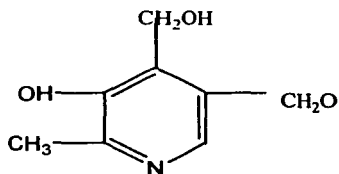


Figura 9. Estructura química de la piridoxina.

IV.3.2.1 Absorción, destino y excreción.

La piridoxina, es rápidamente absorbida por el tracto gastrointestinal después de la administración oral; sin embargo, la absorción gastrointestinal puede ser disminuida en pacientes con síndrome de mala absorción gástrica. Las concentraciones séricas normales de piridoxina son de 30-80 mg/ml.

La vitamina B₆ se almacena principalmente en hígado y en menor grado en músculo y cerebro.

La vida media biológica de la piridoxina parece ser de 15 a 20 días, en hígado el su principal metabolito el piridoxal es oxidado a ácido piridóxico, el cual es excretado por la orina (<http://www.plmlatina.com>).

IV.3.3. Cianocobalamina (vitamina B₁₂).

Se ha visto que la vitamina B₁₂ (**Figura 10**) incrementa el ARN en neuronas. Esta vitamina es un factor esencial para la formación de propionil-CoA dentro del ciclo de Krebs y proporcionar metalmalonil-CoA a las neuronas,





metamalonil-CoA, es el último metabolito importante para la síntesis de cerebrosidos neuronales y fosfolípidos para la producción de mielina (Carson y cols., 1971).

Uno de los papeles más importantes de la cianocobalamina es la transformación de poliglutamato a tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de hemoglobina y glóbulos rojos en la formación de sangre. La deficiencia de esta vitamina ocasiona el síndrome neuroanémico originando dolor.

Estudios recientes en ratas confirman que la administración de vitamina B₁₂ disminuye el dolor provocado por diversas sustancias tales como la carragenina, caolín, calcio, etc. observándose una actividad preventiva y una actividad terapéutica. La actividad preventiva se obtiene al administrar vitamina B₁₂ media hora antes de la provocación del dolor y la actividad terapéutica se observa 2 horas después de la provocación del dolor (Bermond y cols., 1989).

La vitamina B₁₂, además de prevenir la anemia, ayuda a disminuir el dolor provocado por sustancias que inducen inflamación (Bermond y cols., 1989).

IV.3.3.1 Absorción, destino y excreción.

La vitamina B₁₂ es regularmente absorbida por el intestino delgado distal, cuando se suministra por vía oral. En el estómago la vitamina B₁₂ libre se une al factor intrínseco, que es una glicoproteína excretada por la mucosa gástrica que es necesaria para una absorción activa de la vitamina por el tracto gastrointestinal. El complejo es detenido transitoriamente en receptores específicos de la pared del íleon distal, antes de que la vitamina sea absorbida y entre a la circulación





sistémica.

El mecanismo de transporte del factor intrínseco es saturado por 1.5-3 mg de vitamina B₁₂; sin embargo, cantidades adicionales de vitaminas pueden ser absorbidas independientemente del factor intrínseco, por difusión pasiva a través de la pared intestinal.

Este mecanismo de difusión pasiva es importante sólo en presencia de cantidades de vitamina mucho más grandes (mínimo 1 mg). En la administración por vía oral de vitamina B₁₂ en dosis menores de 3 mg, el pico de concentración plasmática no se alcanza hasta después de 8-12 horas, porque la vitamina es transitoriamente retenida en la pared del ileon distal.

En las células de la mucosa intestinal la vitamina B₁₂ es liberada del factor intrínseco, y se une rápidamente a las proteínas del plasma en la sangre, principalmente a una proteína de almacenamiento transcobalamina III. Las concentraciones sanguíneas de transcobalamina II se retiran después de que la vitamina B₁₂ es absorbida.

En estado de ayuno la mayor parte de la vitamina circulante se une a la transcobalamina I. La vitamina B₁₂ es distribuida en el hígado y médula ósea y otros tejidos, incluyendo la placenta. El almacenamiento corporal total de la vitamina B₁₂ en sujetos sanos está estimado en un rango de 1-11 mg con un promedio de 5 mg del 50-90% está almacenado en el hígado.

Cuando la vitamina B₁₂ es administrada en cantidades que exceden la capacidad de unión en plasma, hígado y otros tejidos, está libre en sangre y disponible para excreción urinaria. Aproximadamente del 10-15% es sintetizada





diariamente por bacterias en el intestino grueso, pero es excretada por las heces, sin ser absorbida (<http://www.plmlatina.com>).

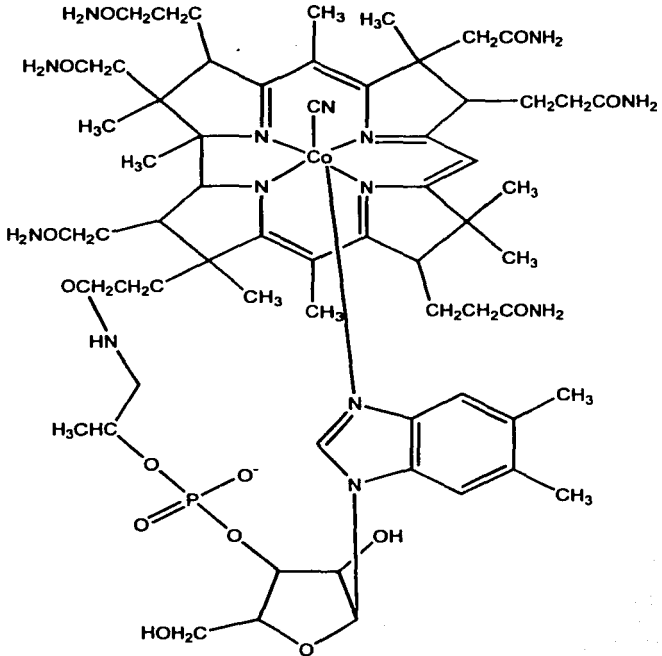


Figura 10. Estructura química de la cianocobalamina.





V. JUSTIFICACIÓN.

Hasta la fecha no se conoce el mecanismo de acción por el cual el complejo de vitaminas B producen alivio de dolor. Algunos reportes sugieren que el efecto analgésico de las vitaminas del complejo B se ha asociado a un aumento del control inhibitorio aferente de las neuronas de la médula espinal (Fu y cols., 1988; 1990) y la reducción de la respuesta de las neuronas talámicas a la estimulación nociva (Jurna y Bonke, 1988; Sharma y cols., 1990; Jurna y cols., 1990) originando un efecto antinociceptivo (analgésico) en modelos de inducción del dolor por sustancias químicas.

Existe evidencia experimental de que las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ solas o combinadas presentan actividad analgésica en diversos modelos de dolor, este efecto anti-inflamatorio se ha observado en la prueba de edema inducida por carragenina. Además, se ha descrito que el complejo de vitaminas B potencian el efecto analgésico del diclofenaco en un modelo de dolor tipo inflamatorio (Bartoszyk y Wild, 1989; Reyes-García y cols., 1999).

Existe controversia si las vitaminas del complejo B realmente producen alivio del dolor por si solas o si son capaces de aumentar el efecto analgésico del diclofenaco (Eschalier y cols., 1983; Misumi y cols., 1985; Bromm y cols., 1995). Eschalier menciona que los efectos de la vitamina B₁₂, al compararse con la aspirina y salina al 0.9% en tres diferentes modelos (eléctrico, térmico y químico) para medir el dolor en ratas y ratones, no muestra actividad antinociceptiva después su administración.





Sin embargo, varios estudios indican que esta vitamina se ha utilizado como analgésico en el tratamiento de diferentes tipos de dolor (Leich 1953; Mellendy 1953; Laveig 1968; Natali 1969; Denner y cols., 1976). Esta aparente contradicción ponen en duda la actividad de las vitaminas para disminuir la hiperalgesia.

Misumi y col. (1985) en un estudio de neuropatía inducida por 2,5-hexanediona observa que las vitaminas B₁₂ o B₆ no muestran actividad analgésica ni ayudan a la mejoría de la neuropatía. Todos estos estudios indican que la eficacia o actividad de las vitaminas dependen del tipo de modelo utilizado. Por lo tanto, la finalidad de este trabajo es tratar de explorar el papel del complejo de vitaminas B para aliviar el dolor y como potenciador de los mecanismos de analgesia, con la co-administración de un analgésico no esteroideal (diclofenaco) en un modelo de hiperalgesia térmica.





VI. HIPÓTESIS.

- ❖ El complejo de vitaminas (B₁, B₆, B₁₂) no produce analgesia y aumenta el efecto analgésico del diclofenaco en un modelo de hiperalgesia térmica en la rata.





VII. OBJETIVOS.

VII.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto analgésico del diclofenaco solo y combinado con el complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂) en un modelo de hiperalgesia térmica.

VII. 2. Objetivos particulares.

- ❖ Estandarizar el modelo para evaluar la hiperalgesia térmica.
- ❖ Estudiar el efecto del complejo de vitaminas B en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina.
- ❖ Determinar el efecto del diclofenaco en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina.
- ❖ Evaluar la interacción entre las vitaminas del complejo B y diclofenaco.





VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VIII.1. Animales.

Se utilizaron 78 ratas Wistar con $n=6$ por cada grupo, hembras de 7-9 semanas de edad, con un peso de 170-220 g. A las ratas se les mantuvo con libre acceso al agua, retirándoles el alimento 12 horas antes de los experimentos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Guías sobre Aspectos Éticos para la investigación de Dolor Experimental en animales (IASP, 1983). Cada rata se utilizó solo una vez y se sacrificó en una cámara saturada con CO_2 al final del experimento.

VIII.2. Modelo de Dolor.

Se empleó el modelo de hiperalgesia térmica previamente validado y estandarizado por Dirig y colaboradores (1997). El equipo consta de una superficie de vidrio, la cual se mantiene a temperatura constante de $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (Figura 11). El estímulo térmico es manejado por un brazo mecánico y una termocopla, en ésta se encuentra un foco orientado a la superficie interna del vidrio, por donde se hace incidir el estímulo térmico nocivo controlado por un voltímetro a 5.5 amperios y un espejo que permite visualizar cada una de las patas del animal para incidir el haz de luz sobre éstas. El estímulo térmico generado produce una temperatura de 30°C (temperatura del piso) al inicio e incrementa rápidamente hasta alcanzar los $41-42.5^\circ\text{C}$ a los 12 segundos aproximadamente. El cursor de tiempo se activa automáticamente al encender el interruptor de luz y se mide la latencia, que es el momento en el que la rata





retira la pata de la superficie al sentir molestias originadas por el estímulo térmico. Este movimiento hace que los sensores de movimiento del equipo detengan el cursor de tiempo y el estímulo térmico.

Previo al estudio fue necesario ambientar a las ratas durante 30 minutos sobre la superficie de vidrio, separadas por cajas de acrílico para eliminar variaciones en la medición de la latencia originada por estrés.

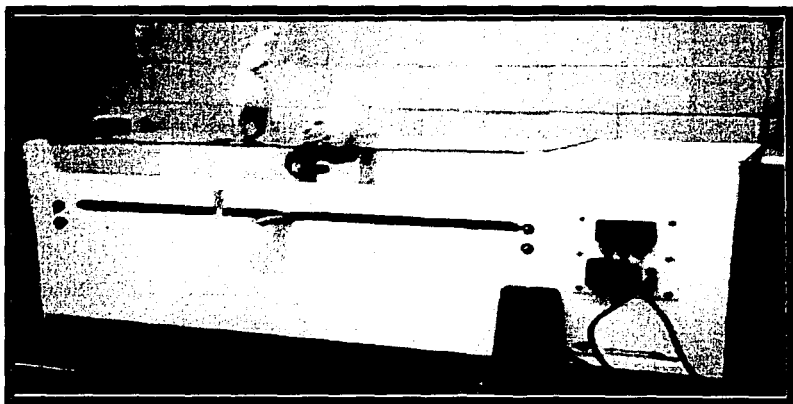


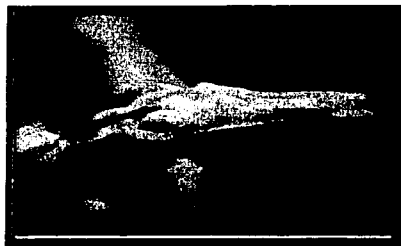
Figura 11. Fotografía del equipo para evaluar la hiperalgesia térmica





VIII. 3. Inducción de edema por carragenina.

La primera parte del experimento se destinó para determinar el efecto de la carragenina para producir hiperalgesia comparada con salina. Se utilizaron 2 grupos (n=6) de ratas. El primer grupo se inyectó con 50 μ l de solución carragenina (1%) por vía intraplantar en la pata derecha (**Figura 12**). Se midió el tiempo de latencia cada 30 minutos durante 4 horas. El segundo grupo se le inyectó por vía intraplantar 50 μ l de salina en la pata derecha de la rata, midiendo el tiempo de latencia de la misma manera que en el grupo de carragenina.



(A)



(B)

Figura 12. Fotografía de la administración intraplantar de carragenina y/o salina en la pata derecha de la rata (A). Administración oral de diclofenaco (B).





VIII.3.I. Diagrama de flujo

INDUCCIÓN DE EDEMA POR CARRAGENINA



GRUPO 1

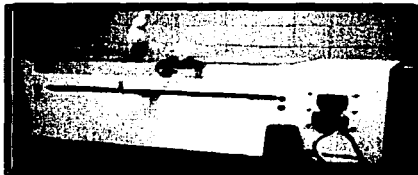
n=6

50 μ l carragenina

50 μ l salina

GRUPO 2

n=6





VIII.4. Medición de la actividad analgésica de diclofenaco.

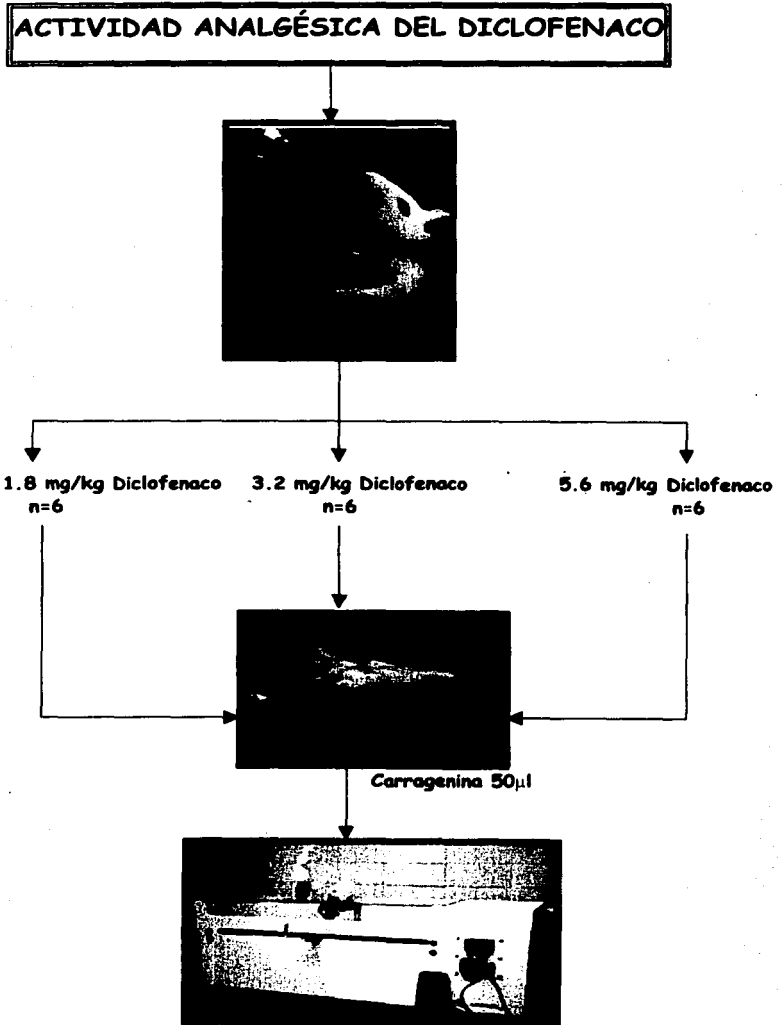
La segunda parte experimental se destinó para determinar si el diclofenaco p.o. produce alivio de la hiperalgesia térmica en ratas. Se utilizaron tres grupos de (n=6) ratas para cada dosis.

Al primer grupo se administró por vía oral (p.o.) 1.8 mg/kg de diclofenaco, al segundo grupo se administró 3.2 mg/kg y al tercer grupo se administró 5.6 mg/kg de diclofenaco, después de 10 minutos se inyectó 50 μ l de carragenina (1%) en la pata derecha de la rata (**Figura 12**). Se midió el tiempo de latencia cada 30 minutos durante 4 horas.





VIII.4.I. Diagrama de flujo



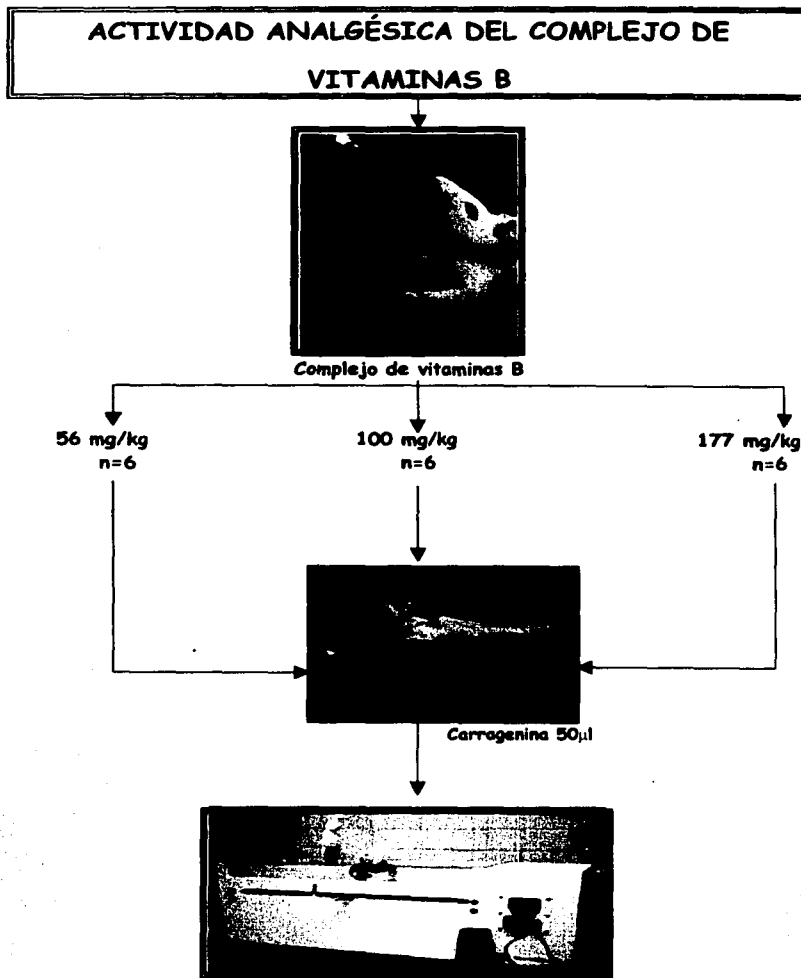


VIII.5. Medición de la actividad analgésica del complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂).

En la tercera parte del experimento se evaluó el efecto de las vitaminas sobre la respuesta hiperalgésica producida por carragenina. Las vitaminas se administraron en una proporción 100:100:1, es decir una dosis de 100mg/kg de tiamina-piridoxina-cianocobalamina contiene 100 mg/kg de tiamina, 100 mg/kg de tiamina, 100 mg/kg de piridoxina y 1.0 mg/kg de cianocobalamina. Se administraron dosis crecientes de la mezcla de vitaminas p.o. (56, 100 y 177 mg/kg) y 10 minutos después se inyectó 50 µl de carragenina (1%) por vía intraplantar en la pata derecha (**Figura 12**) utilizando un grupo (n=6) para cada dosis. Se midió el tiempo de latencia cada 30 minutos durante 4 horas.



VIII.5.1. Diagrama de flujo





VIII.6. Potenciación del efecto analgésico del diclofenaco por el complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂).

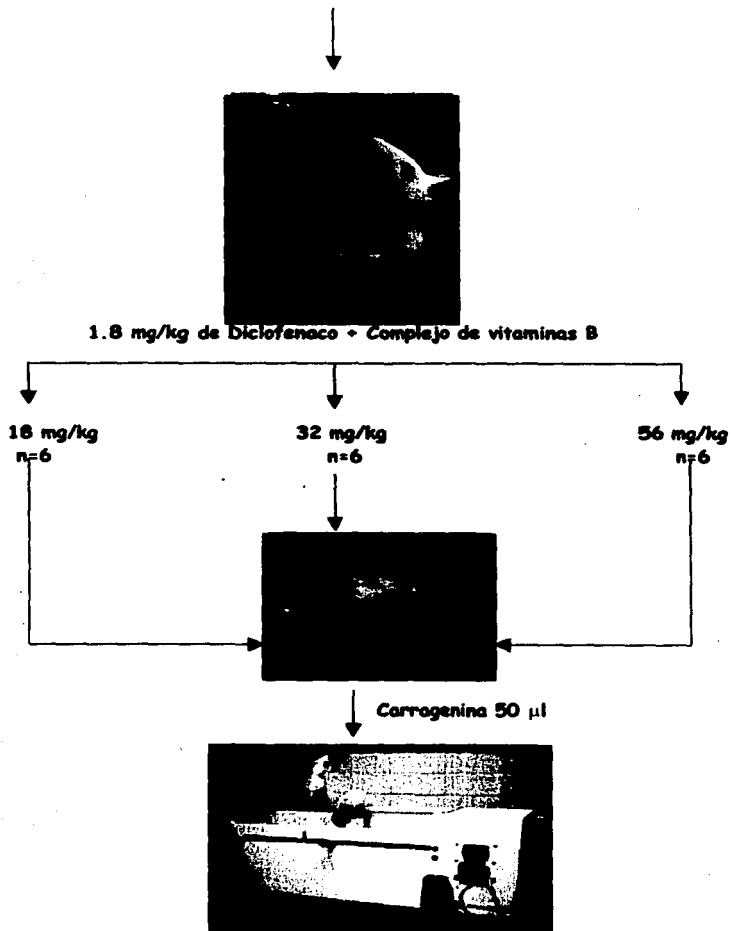
La cuarta parte experimental se realizó para determinar si la combinación de una dosis inactiva de diclofenaco (1.8 mg/kg) y dosis crecientes del complejo de vitaminas (18, 32 y 56 mg/kg) administrados por vía oral aumentan la respuesta antinociceptiva del diclofenaco por el complejo de vitaminas. 10 minutos después se inyectó 50 µl de carragenina (1%) por vía intraplantar (Figura 12) en la pata derecha, utilizando una (n=6) ratas para cada dosis. Las dosis de diclofenaco y vitaminas se eligieron a partir de las curvas dosis-respuesta. Se midió el tiempo de latencia cada 30 minutos durante 4 horas.





VIII.6.I. Diagrama de flujo

POTENCIACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO DEL DICLOFENACO POR EL COMPLEJO DE VITAMINAS B





VIII.7. Medición del efecto del diclofenaco sin la administración de carragenina.

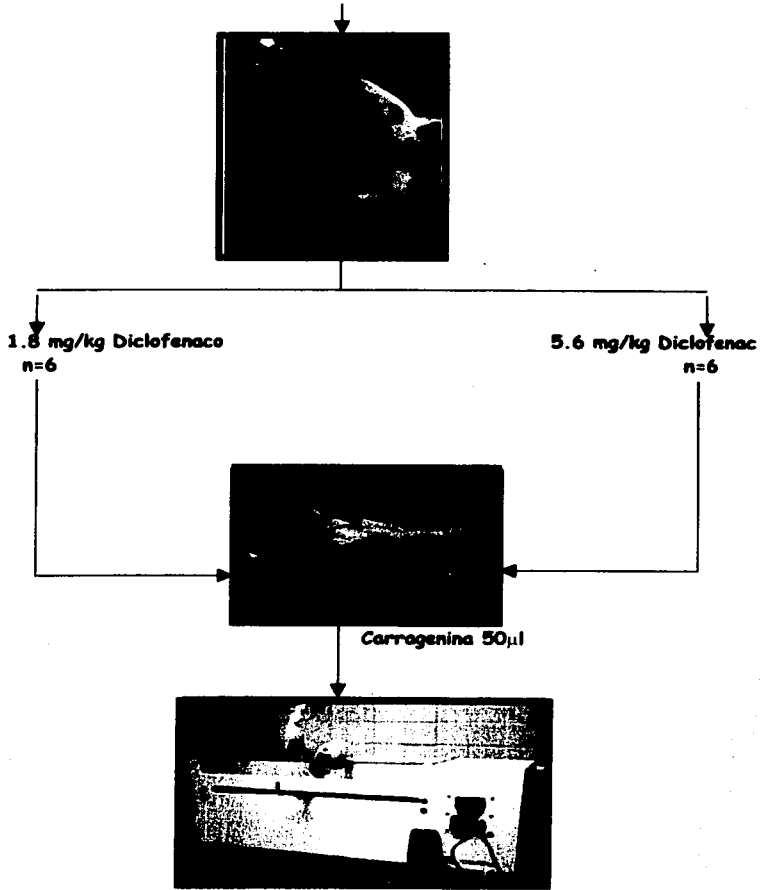
En la quinta parte experimental se determinó la efectividad del diclofenaco. Se utilizaron 2 dosis de diclofenaco 1.8 y 5.6 mg/kg para bloquear el estímulo térmico agudo sin la sensibilización producida por carragenina (**Figura 12**) con una (n=6) ratas para cada dosis. Después de 10 minutos se administró por vía intraplantar 50 μ l de solución salina. Se midió el tiempo de latencia cada 30 minutos durante 4 horas.





VIII.7.1. Diagrama de flujo

ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL DICLOFENACO SIN CARRAGENINA





VIII.8. Criterios de exclusión.

Se eliminaron ratas con administración incompleta de carragenina, solución salina o de los compuestos analgésicos (diclofenaco o vitaminas), sangrado excesivo en el sitio de inyección de carragenina o salina, estrés producido por diversos factores como son: factores ambientales como la temperatura, ruido, factores de estrés durante el manipuleo de los animales.

VIII.9. Fármacos

El diclofenaco sódico y las vitaminas del complejo B fueron proporcionados por Merck México. La carragenina λ se obtuvo de Sigma (S. Louis, MO, EUA). Los compuestos analgésicos se administraran por vía oral disueltos en carboximetilcelulosa al 0.5%.





IX. EVALUACION DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos se analizaron de la siguiente manera: Los datos se expresaron como el promedio del tiempo de latencia (tiempo en que tarda la rata en levantar la pata) para cada grupo experimental ($n= 6$) de los diferentes grupos \pm el error estándar. Se realizaron curvas de latencia contra tiempo para cada grupo y se calculó el área bajo la curva (ABC) de cada fase por el método de los trapezoides.

Los datos fueron graficados con el programa Sigma plot versión 4.01 para las gráficas de latencia contra tiempo. En las gráficas de barras se utilizó el programa Prisma en la versión 3.0, para realizar estas gráficas se utilizó los datos de área bajo la curva. Todos los datos se compararon con sus respectivos controles por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguidos por una prueba de Dunnett cuando se requirió hacer comparaciones múltiples con un grupo control. En todos los casos el nivel de significancia elegido fue de 0.05.





X. RESULTADOS.

La administración de 50 μ l de solución salina (0.9%) en el cojinete plantar de la pata derecha no produjo modificación de la latencia (9-13 segundos). En contraste, la administración de 50 μ l de carragenina (1%) disminuyó significativamente la latencia al estímulo térmico comparado con la administración de salina (Figura 13, Tabla 4). La inyección de carragenina redujo la latencia a partir de los 30 minutos, observándose una disminución máxima (3-4 segundos), aproximadamente a las 2 horas, que se mantuvo constante durante las siguientes 2 horas (Tabla 4).

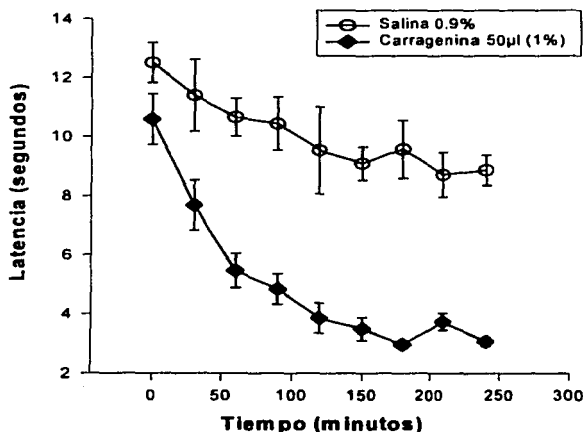


Figura 13. Curso temporal de la latencia observado después de la administración de solución salina (0.9%) y carragenina (1%) en un modelo de hiperalgesia térmica. Los datos son el promedio de 6 animales \pm error estándar.





Tabla 4. Valores de latencia observados con la administración de salina (0.9%) y carragenina 50 μ l (1%). Los valores son el promedio de 6 animales \pm el error estándar.

<i>LATENCIA (Segundos)</i>		
Tiempo (Min)	Salina (0.9%)	Carragenina 50 μl (1%)
0	12.5 \pm 0.68	10.6 \pm 0.86
30	11.39 \pm 1.22	7.67 \pm 0.85
60	10.65 \pm 0.64	5.46 \pm 0.58
90	10.43 \pm 0.90	4.83 \pm 0.52
120	9.53 \pm 1.47	4.83 \pm 0.51
150	9.08 \pm 0.56	3.48 \pm 0.39
180	9.56 \pm 0.98	2.95 \pm 0.13
210	8.70 \pm 0.75	3.73 \pm 0.28
240	8.85 \pm 0.51	3.05 \pm 0.15

La administración oral de diclofenaco sódico revirtió de manera dependiente de la dosis la hiperalgesia térmica inducida por carragenina (**Figura 14, Tabla 5**). La figura 14 muestra el curso temporal observado después de la administración oral de dosis crecientes de diclofenaco. La dosis mínima de diclofenaco necesaria para producir un efecto anti-hiperalgésico significativo fue 3.2 mg/kg (**Figura 15**). La administración de la dosis de 5.6 mg/kg de diclofenaco produjo el efecto máximo observado, pero no fue capaz de bloquear completamente la hiperalgesia inducida por carragenina.





La administración oral de vitaminas produjo un efecto anti-hiperalgésico modesto, pero solo con la dosis más alta probada (177 mg/kg) (Figura 16, Tabla 6). La figura 16 muestra el curso temporal observado después de la administración oral de dosis crecientes de vitaminas.

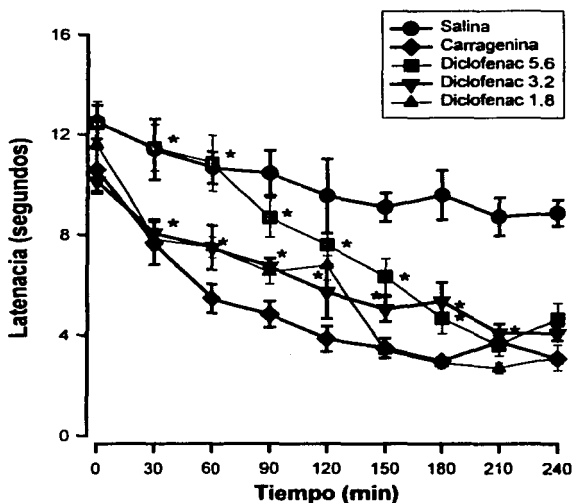


Figura 14. Curso temporal de la latencia observado después de la administración de dosis crecientes de diclofenaco (mg/kg) en un modelo de hiperalgesia térmica. Los datos son el promedio de 6 animales \pm error estándar. * Significativamente diferente del grupo tratado con carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey.



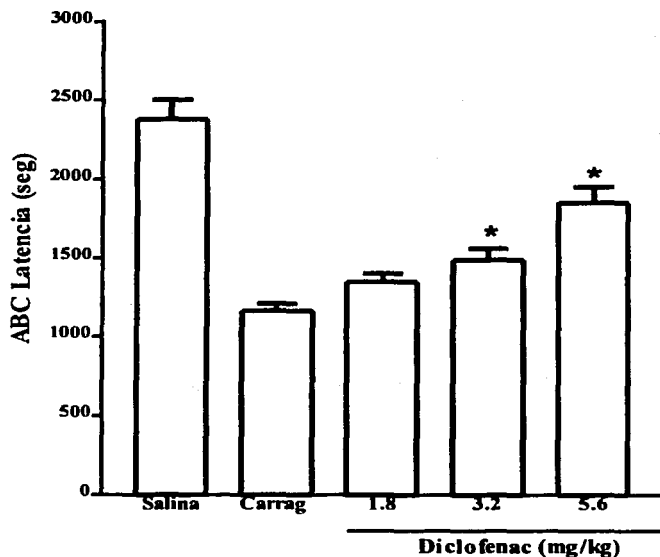


Figura 15. Efecto de la administración oral de diclofenaco en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina (carrag). Los datos están representados como el área bajo la curva (ABC) de la latencia en función del tiempo. Las barras son el promedio de 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente del grupo tratado con carragenina.



Tabla 5. Curso temporal de la latencia observada con diferentes dosis de diclofenaco (1.8, 3.2 y 5.6 mg/kg) en el modelo de hiperalgnesia térmica inducida por carragenina. Los valores son el promedio de 6 animales \pm el error estándar. * Significativamente diferente del grupo tratado con carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey.

LATENCIA (Seg)				
Tiempo (min)	Carragenina	Diclofenaco (1.8 mg/kg)	Diclofenaco (3.2 mg/kg)	Diclofenaco (5.6 mg/kg)
0	10.6 \pm 0.86	11.60 \pm 0.94	10.12 \pm 0.48	12.45 \pm 0.87
30	7.67 \pm 0.85	7.82 \pm 0.43	8.06 \pm 0.55*	11.46 \pm 0.93*
60	5.46 \pm 0.58	7.50 \pm 0.41*	7.49 \pm 0.88*	10.84 \pm 1.12*
90	4.83 \pm 0.52	6.52 \pm 0.48*	6.74 \pm 0.32*	8.67 \pm 0.77*
120	4.83 \pm 0.51	6.80 \pm 0.60*	5.73 \pm 1.07	7.60 \pm 0.44*
150	3.48 \pm 0.39	3.38 \pm 0.25	5.04 \pm 0.50*	6.34 \pm 0.72*
180	2.95 \pm 0.13	2.88 \pm 0.21	5.35 \pm 0.75*	4.67 \pm 0.61*
210	3.73 \pm 0.28	2.60 \pm 0.21	4.07 \pm 0.37*	3.58 \pm 0.42
240	3.05 \pm 0.15	3.10 \pm 0.51	4.07 \pm 0.29	4.64 \pm 0.64

La administración de la dosis de 56 y 100 mg/kg de vitaminas no fue capaz de bloquear la hiperalgnesia inducida por carragenina, mientras que la dosis de 177 mg/kg produjo un efecto muy pequeño, pero significativo (Figura 17).

La administración oral de una dosis inactiva de diclofenaco (1.8 mg/kg) con la combinación de vitaminas del complejo B a diferentes dosis (18, 32 y 56 mg/kg) produjo un claro efecto anti-hiperalgésico (Figura 18, Tabla 16). La figura 18 muestra el curso temporal observado después de la administración oral de dosis



crecientes de diclofenaco con vitaminas del complejo B. La administración de la dosis de diclofenaco 1.8 mg/kg con vitaminas del complejo B a 18 y 32 mg/kg de vitaminas no fue capaz de bloquear totalmente la hiperalgesia inducida por carragenina, mientras que el diclofenaco a 1.8 mg/kg con la dosis de vitaminas 56 mg/kg produjo un efecto significativo mayor (Figura 19).

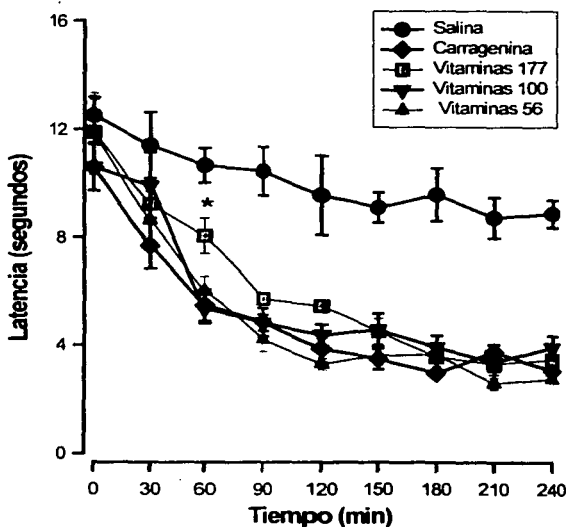


Figura 16. Curso temporal de la latencia observado después de la administración de dosis crecientes de vitaminas en un modelo de hiperalgesia térmica. Los datos son el promedio de 6 animales \pm error estándar. * Significativamente diferentes con respecto a carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey.

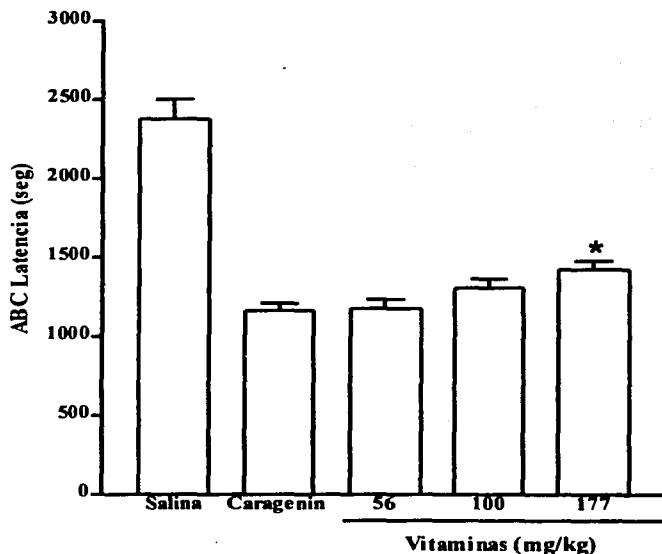


Figura 17. Efecto de la administración oral de vitaminas del complejo B en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina. Los datos están representados como el área bajo la curva (ABC) de la latencia en función del tiempo. Las barras son el promedio de 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente con respecto a carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.



Tabla 6. Curso temporal de la latencia observada con diferentes dosis de vitaminas del complejo B (32, 100 y 177 mg/kg) en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina. Los valores son el promedio de 6 animales \pm el error estándar. * Significativamente diferentes con respecto a carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.

LATENCIA (Seg)				
Tiempo (min)	Carragenina	Vitaminas 56 mg/kg	Vitaminas 100 mg/kg	Vitaminas 177 mg/kg
0.00	10.6 \pm 0.86	11.82 \pm 1.51	10.60 \pm 0.89	11.88 \pm 1.22
30.0	7.67 \pm 0.85	8.61 \pm 1.07	9.91 \pm 1.22	9.21 \pm 0.49
60.0	5.46 \pm 0.58	5.99 \pm 0.54	5.34 \pm 0.54	8.04 \pm 0.66*
90.0	4.83 \pm 0.52	4.20 \pm 0.44	4.81 \pm 0.30	5.69 \pm 0.19
120	4.83 \pm 0.51	3.29 \pm 0.21	4.36 \pm 0.39	5.43 \pm 0.11
150	3.48 \pm 0.39	3.61 \pm 0.36	4.56 \pm 0.60	4.50 \pm 0.48
180	2.95 \pm 0.13	3.63 \pm 0.41	3.91 \pm 0.43	3.55 \pm 0.42
210	3.73 \pm 0.28	2.58 \pm 0.21	3.35 \pm 0.31	3.30 \pm 0.39
240	3.05 \pm 0.15	2.74 \pm 0.14	3.90 \pm 0.43	3.45 \pm 0.40

En ratas que no recibieron carragenina, la administración oral de diclofenaco sódico a las dosis de 1.8 y 5.6 mg/kg no muestra actividad analgésica, cuando son sometidas a un estímulo térmico agudo (**Figura 20, Tabla 8**). La Figura 20 muestra el curso temporal observado después de la administración oral de diclofenaco (1.8 y 5.6 mg/kg). Ninguna dosis presentó actividad significativa con respecto al grupo administrado con salina.



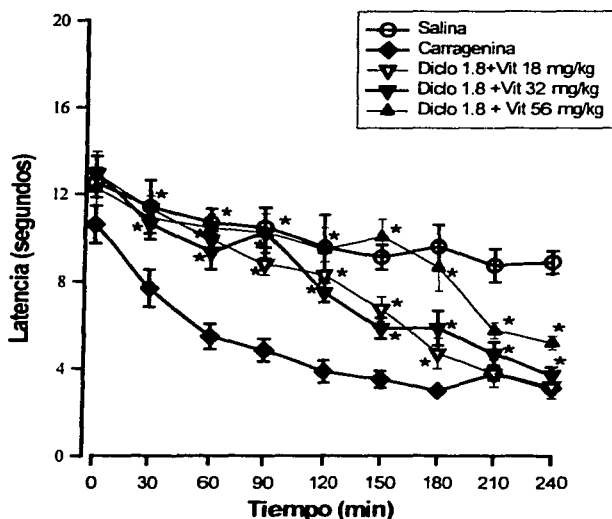


Figura 18. Curso temporal de la latencia observado después de la administración de diclofenaco 1.8 mg/kg con vitaminas a diferentes concentraciones (18, 32 y 56 mg/kg) en un modelo de hiperalgesia térmica. Los datos son el promedio de 6 animales \pm error estándar. * Significativamente diferente del grupo tratado con carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey.

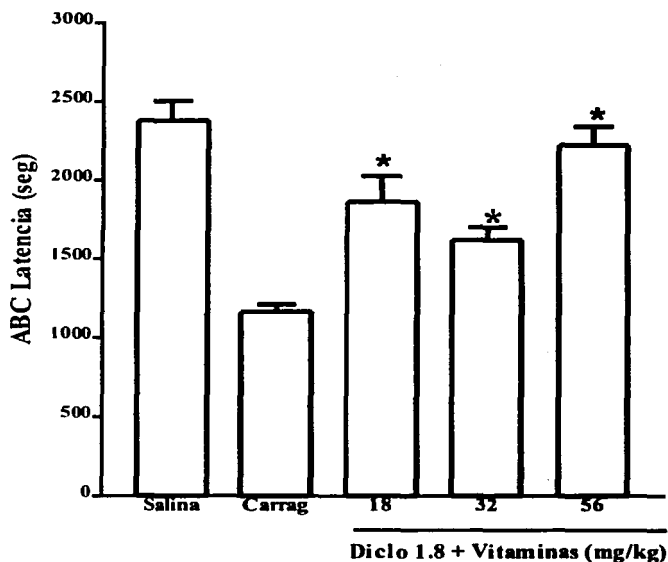


Figura 19. Efecto de la administración oral de diclofenaco (1.8 mg/kg) y vitaminas del complejo B a las dosis de 18, 32 y 56 mg/kg en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina (Carrag.). Los datos están representados como el área bajo la curva (ABC) de la latencia en función del tiempo. Las barras son el promedio de 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferentes con respecto a carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.



Tabla 7. Curso temporal de la latencia observada con diclofenaco a 1.8 mg/kg y diferentes dosis de vitaminas del complejo B (18, 32 y 56 mg/kg) en el modelo de hiperalgesia térmica inducida por carragenina. Los valores son el promedio de 6 animales \pm el error estándar. * Significativamente diferentes con respecto a carragenina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey.

LATENCIA (Seg)				
Tiempo (min)	Carragenina	Diclofenaco + Vitaminas (18 mg/kg)	Diclofenaco + Vitaminas (32 mg/kg)	Diclofenaco + Vitaminas (56 mg/kg)
0.00	10.58 \pm 0.86	12.88 \pm 1.07	12.95 \pm 0.74	12.24 \pm 0.84
30.0	7.67 \pm 0.85	11.31 \pm 0.58 *	10.61 \pm 0.72 *	10.88 \pm 0.51 *
60.0	5.46 \pm 0.58	9.88 \pm 0.68 *	9.32 \pm 0.79 *	10.41 \pm 0.64 *
90.0	4.83 \pm 0.52	8.78 \pm 0.50 *	10.19 \pm 0.1.16 *	10.20 \pm 0.88 *
120	4.83 \pm 0.51	8.28 \pm 0.59 *	7.47 \pm 0.44 *	9.43 \pm 0.98 *
150	3.48 \pm 0.39	6.71 \pm 0.56 *	5.83 \pm 0.48*	9.99 \pm 0.81*
180	2.95 \pm 0.13	4.68 \pm 0.70	5.84 \pm 0.80 *	8.62 \pm 1.08 *
210	3.73 \pm 0.28	3.76 \pm 0.63	4.66 \pm 0.54*	5.73 \pm 0.36*
240	3.05 \pm 0.15	3.16 \pm 0.54	3.68 \pm 0.36*	5.17 \pm 0.30*



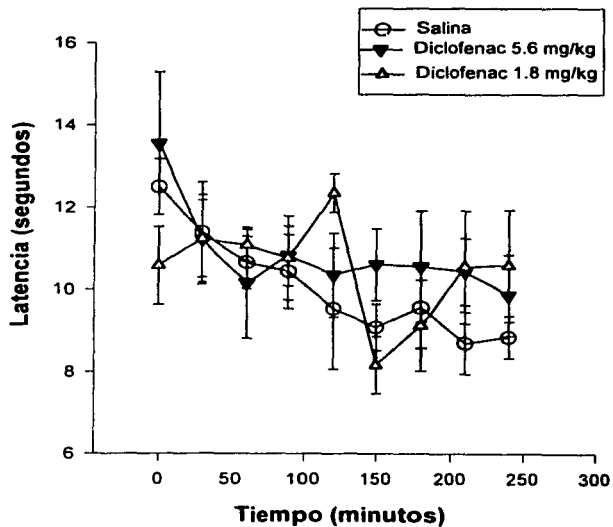


Figura 20. Curso temporal de la latencia observado después de la administración de diclofenaco (1.8 y 5.6 mg/kg) en ratas sometidas a un estímulo térmico. Los datos son el promedio de 6 animales \pm error estándar.

Tabla 8. Curso temporal de la latencia observada con diclofenaco (1.8 y 5.6 mg/kg) en ratas sometidas a un estímulo térmico. Los valores son el promedio de 6 animales \pm el error estándar.

LATENCIA (Seg)			
Tiempo (min)	Salina	Diclofenaco (1.8 mg/kg)	Diclofenaco (5.6 mg/kg)
0.00	12.5 \pm 0.68	10.58 \pm 0.95	13.55 \pm 1.75
30.0	11.39 \pm 1.22	11.23 \pm 0.94	11.21 \pm 1.09
60.0	10.65 \pm 0.64	11.07 \pm 0.39	10.16 \pm 1.35
90.0	10.43 \pm 0.90	10.76 \pm 1.02	10.81 \pm 0.75
120	9.53 \pm 1.47	12.35 \pm 0.47	10.35 \pm 1.02
150	9.08 \pm 0.56	8.16 \pm 0.70	10.60 \pm 0.87
180	9.56 \pm 0.98	9.12 \pm 1.10	10.56 \pm 1.35
210	8.70 \pm 0.75	10.55 \pm 1.37	10.4 \pm 0.81
240	8.85 \pm 0.51	10.58 \pm 1.36	9.86 \pm 0.98



IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

IX.1. ACCIÓN ALGÉSICA Y PRODUCCIÓN DE EDEMA POR CARRAGENINA.

El modelo de carragenina es un modelo asociado al dolor (Winter y cols., 1962). La inflamación se produce por acumulación de líquido en los espacios intercelulares, por obstrucción venosa o linfática o por un aumento en la permeabilidad vascular. Este fenómeno se acompaña por la internalización de iones potasio (K^+) en la célula, provocando una despolarización celular y por la formación rápida de la bradicinina (BK), que facilita la activación de los nociceptores mecanotérmicos de las fibras C, actuando directamente sobre receptores a BK del tipo B_2 , localizadas en el nociceptor (Chapman y Dickenson, 1992; Damas y cols., 1999) o sobre las células inflamatorias (macrófago). Las prostaglandinas y leucotrienos (Hyman Cassems, 1995), liberados al espacio extracelular actúan sobre los nociceptores por medio de los receptores de prostaglandinas (PGE_2) acopladas al adenilato ciclasa resultando en un aumento en la producción intracelular del AMPc. Aunque la BK y en menor grado el K^+ son responsables de la activación de las fibras C, las PGs son las que inician o facilitan los impulsos que viajan por las fibras terminales que conducen el dolor. La SP, junto con la serotonina (5-HT), aumenta la permeabilidad vascular, lo que asegura que los nociceptores se sensibilicen, originando que los nociceptores localizados en el lugar de lesión, junto con cascada de sustancias inflamatorias, provoque hiperalgesia, edema y dolor .





Este fenómeno se puede observar en la **Figura 13**, con la administración de carragenina 1% por vía s.c. en la pata derecha de la rata, donde se observa una conducta dolorosa por la disminución de la latencia de 3-4 segundos (**Tabla 4**) ante un estímulo térmico a partir de los 30 minutos manteniéndose este fenómeno durante las siguientes 3 horas y media que duró el experimento, siguiendo una conducta similar a la reportada por otros investigadores (Bartoszyk y cols., 1989)

IX.2. ACCIÓN ANALGÉSICA DEL DICLOFENACO.

El efecto analgésico del diclofenaco se ha reportado previamente en estudios de dolor en humanos (Todd y cols., 1988) y en modelos de dolor en animales como el de contorsión abdominal, distensión rectal (Björkman y cols., 1990) y dolor articular (Reyes-García y cols., 1999) mediante la inducción de dolor por compuestos químicos.

El diclofenaco actúa como un inhibidor de la ciclooxygenasa y por ende de la producción de prostaglandinas (PG's), prostaciclina (PGI) y tromboxanos (Ferreira y cols., 1973, 1974), interfiere con la cascada del ácido araquidónico originando una disminución de la formación de leucotrienos por inhibición de la 5-lipooxygenasa (Ku y cols., 1986) aumentando la reincorporación del ácido araquidónico hacia los triglicéridos de membrana disminuyendo el sustrato en donde actúa la COX (Ku y cols., 1986). Además, disminuye la elastasa de los polimorfonucleares (PMN), disminuyendo la adhesividad y la quimiotaxis de éstos durante la inflamación (Berradía y cols., 1988).





En el presente trabajo se observa que la administración oral de diclofenaco, produce efecto analgésico (**Figura 14**) a partir de los 60 minutos para la dosis de 1.8 y 3.2 de mg/kg y un efecto analgésico casi de inmediato a la dosis de 5.6 mg/kg de diclofenaco. En la **Tabla 5** se observa que la dosis de 3.2 mg/kg aumentó la latencia (6.1 s) después de la primera hora de la administración de diclofenaco manteniendo este comportamiento durante 2 horas y disminuyendo la latencia a 4.07 s en la última hora. Con la dosis de 5.6 mg/kg de diclofenaco, la latencia se mantuvo siempre arriba del control en un promedio de 8.33 segundos, observando que a estas dosis se presenta un efecto analgésico prolongado.

En la **Figura 15**, al graficar ABC vs dosis, las barras muestran que las dosis de 3.2 y 5.6 mg/kg de diclofenaco son significativamente diferentes del grupo tratado con carragenina, confirmando que a estas dosis hay una buena respuesta antinociceptiva o analgesia. Estos resultados, coinciden con resultados obtenidos en el modelo PIFIR (Reyes-García, 1999), ya que la dosis de 1.8 mg/kg no presenta una respuesta analgésica.

IX.3. ACCIÓN ANALGÉSICA DEL COMPLEJO DE VITAMINAS B (B₁, B₆ Y B₁₂).

El efecto analgésico del complejo de vitaminas B ha sido previamente reportado en humanos como una opción en el tratamiento contra dolores reumáticos, neuropáticos y dolores presentes en enfermedades degenerativas de la columna vertebral como en lumbalgias, entre otros (Abbas y cols., 1997; Bermond, 1989), en varios modelos de inducción de dolor en animales como en "tail-flick", "hot-plate", "heat-coil", "tail-pressure", inducción de edema por





carragenina (Bartoszyk y Wild 1988; Zimmermann y cols., 1989). Este tipo de estudios muestran además una actividad analgésica del complejo de vitaminas B contra el dolor neuropático en ratas (Misumi y cols., 1985) como supresor de la actividad nociceptiva en gatos (Fu y cols., 1988) reduciendo la nocicepción en animales tratados con quinonas, causante de la constricción abdominal (Bartoszyk y Wild, 1990; Zimmermann y cols., 1990).

Por otro lado, evidencias experimentales indican que el mecanismo de acción del complejo de vitaminas B tiene una acción inhibitoria sobre las neuronas nociceptivas en la médula espinal y en el tálamo (Fu y cols., 1988; Jurna y Bonke, 1988; Jurna y cols., 1989; Zimmermann y cols., 1989). Además, se ha observado que el complejo de vitaminas B tiene un efecto similar al guanosin monofosfato cíclico (GMPc), que es un segundo mensajero intracelular que promueve el crecimiento celular, la síntesis de DNA y proteínas, pero este mecanismo aun no se conoce totalmente (Vesely y cols., 1985). Pero otros autores afirman que el complejo de vitaminas B no induce una respuesta antinociceptiva per-se (Eschaliier y cols., 1983; Reyes-García y cols., 1999).

Nosotros observamos que la actividad analgésica del complejo de vitaminas B en el modelo de hiperalgesia térmica inducido por carragenina solo se muestra a la dosis de 177 mg/kg (Tabla 15, Figura 17), observando dos picos máximos de la actividad analgésica a los 60 y 120 minutos (Figura 16) que va disminuyendo conforme transcurre el tiempo.

Estos resultados confirman que la actividad analgésica no es una tendencia lineal de dosis-respuesta y que a estas dosis no hay un efecto anti-hiperalgésico en el modelo de hiperalgesia térmica. Los datos están de acuerdo con los reportes





previos acerca de la falta de eficacia de la mezcla del complejo de vitaminas B (Gerardo-Reyes y cols., 1999). En contraste varios reportes indican que las vitaminas son efectivas para quitar el dolor en varios modelos (Bartoszyk y cols., 1989; Jurna y cols., 1991). La diferencia podría deberse al tipo de modelo o a la dosis utilizada en este estudio.

IX.4. POTENCIACIÓN DE LA ACCIÓN ANALGÉSICA DEL DICLOFENACO CON LA COADMINISTRACIÓN DEL COMPLEJO DE VITAMINAS B.

El diclofenaco es un AINE ampliamente utilizado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y degenerativas como en los dolores locales cutáneos, reumáticos, lumbalgias, entre otras. Además, se ha mostrado que un tratamiento concomitante con vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ da una mayor respuesta antinociceptiva que con diclofenaco solo (Vetter y cols., 1988; Bartoszyk, 1989; Reyes-García y cols., 1999). Estudios en humanos, han demostrado que el complejo de vitaminas B incrementa la actividad anti-hiperalgésica y anti-inflamatoria del diclofenaco, disminuyendo el tiempo de tratamiento y las dosis diarias de diclofenaco, obteniendo la misma eficacia que con el diclofenaco solo pero a dosis menores (Kuhlwein y cols., 1990; Bruggemann y cols, 1990; Vetter y cols., 1988; Jurna y cols., 1991).

El mecanismo por el cual el complejo de vitaminas B, particularmente la vitamina B₁₂ produce una potenciación del efecto analgésico del diclofenaco no es claro. Muchos autores sugieren que hay una inhibición en la actividad nociceptiva





en las neuronas de la espinal dorsal (Fu y cols., 1988), aumentando la actividad serotoninérgica (Dimpfel y cols., 1990) que origina los efectos antinociceptivos de las vitaminas sobre algunos AINES.

Nosotros pudimos confirmar que la combinación de una dosis inactiva de diclofenaco (1.8 mg/kg) y dosis crecientes del complejo de vitaminas B (18, 32 y 56 mg/kg) aumentaron la respuesta antihiperalgésica de manera dosis-dependiente (**Figura 19, Tabla 7, Figura 18**).

Estos resultados nos dan evidencia de que en este modelo, dosis pequeñas del complejo de vitaminas B (18-56 mg/kg) fueron suficientes para incrementar significativamente el efecto anti-inflamatorio del diclofenaco. En otros modelos es necesario utilizar dosis de 100-200 mg/kg para llegar a la misma actividad con la misma relación de vitaminas (100:100:1) o sea 100 o 200 mg/kg de vitamina B₁, 100 o 200 mg/kg de vitamina B₆ y 1 o 2 mg/kg de vitamina B₁₂ (Bartoszyk y cols., 1989; Reyes- García. y cols., 1999).

IX.5. EFECTO DE DICLOFENACO EN RATAS SIN EL ESTIMULO HIPERALGÉSICO INDUCIDO POR CARRAGENINA.

Como se puede observar en la **Figura 20** y en la **Tabla 8**, el diclofenaco sódico no muestra una actividad analgésica a dosis de 1.8 y 5.6 mg/kg. Esto nos sugiere que la actividad analgésica del diclofenaco solo se presenta cuando hay un daño producido por una inflamación, a pesar de que las ratas fueron sometidas a un estímulo térmico.





XI.- CONCLUSIONES.

- ❖ El diclofenaco produjo un efecto analgésico en el modelo de hiperalgnesia térmica inducido por carragenina. Se observó un comportamiento dosis-respuesta a las dosis de 3.2 y 5.6 mg/kg.
- ❖ Las vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂) en un modelo de hiperalgnesia térmica inducido por carragenina tuvieron un efecto analgésico modesto.
- ❖ La co-administración de diclofenaco y el complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂) incrementó significativamente el efecto analgésico.
- ❖ El diclofenaco no presentó efecto analgésico en ratas sin inflamación (sin tratamiento con carragenina).
- ❖ El uso de la combinación de diclofenaco con el complejo de vitaminas B podría emplearse como terapia en pacientes con dolores tipo inflamatorio.





XIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbas ZG, Swai AB: Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *East Afr Med J.* 1997;74:803-808.
- Aley KO, McCarter G and Levine JD: Nitric oxide signalling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci.* 1998;18:7008-7014.
- Ankier SI: New hot plate test to quantify and nociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur J Pharmacol* 1974;27:1-4.
- Bartoszyk GD, Wild A: Additive Antinociceptive Effects of Vitamins B₁, B₆ and B₁₂ in The Writhing Test and Antinoception in the Heat at Coil Test. *Neurosci Lett.* 1989;101:95-100.
- Bartoszyk GD: Interaction de vitamines B₁, B₆ y B₁₂, whit nonsteroidal anti-inflammatory drugs and analgesics: animal experiments. *Klinische Wochenschrift.* 1990;68:121-124.
- Bermond P: Analgesic and anti-inflammatory properties of vitamins. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* 1989;30:153-160.
- Berradia N, March and Arvier M, Humbert JC, Vigneron C: Effects of indomethacin and diclofenac on some functions of polymorphonuclear neutrophils. *J Pharm Pharmacol.* 1988;40:806-808.





- Björkman R, Hedner J, Hedner T, Henning M: Central, naloxone-reversible antinociception by diclofenac in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1990; 342:171-176.

- Björkman R: Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Experimental studies in the rat. Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1995;103:1-44.

- Boehmer CG, Norman L, Catton M, Fine LG, Mantyh, PW: High levels of mRNA coding for substance P, somatostatin and α -tubulin are expressed by rat and rabbit dorsal root ganglia neurons. *Peptides.* 1989;10:1179-1194.

- Boissier JR, Tillement JP, Merlin L: Fluorimetric titration of large quantities of free and bound thiamine in tissues. *Ann Pharm Fr.* 1966;24:633-638.

- Bowman WC y Rand MJ: *Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas, Aplicaciones clínicas.* Interamericana México, D.F., 1984;161:14-16.

- Bredt DS and Snyder SH: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 1992;8:3-11.

- Bromm K, Herrmann WM & Schulz H: Do the B-vitamins exhibit antinociceptive efficacy in men? Results of placebo-controlled repeated-measures double-blind study. *Neuropsychobiol.* 1995;31:156-165.

- Bruggermann G, Koehler CO, Koch EM: Results of a double-blind study of diclofenac + vitamin B₁, B₆, B₁₂ versus diclofenac in patients with acute pain of the lumbar vertebrae. A multicenter study. *Klin Wochenschr.* 1990;68: 116-120.





- Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman: AG Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990; 24;345:346-347.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM: Kinins in pain and inflammation. *Pain*. 2000; 87:1-5.
- Chapman V, Dickenson AH: The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1992;4;219:427-433.
- Corson JA, Kahn R, Enesco HE: High levels of vitamin B₁₂ versus minimum requirement: biological and behavioral differences. *Int J Vitam Nutr Res*. 1971;41:68-78.
- Dakshinamurti K, Sharma SK & Bonke D: Influence of B vitamins on binding properties of serotonin receptors in the CNS of rats. *Klin Wochenschr*. 1990;68:142-145.
- Damas J, Damas G: Inflammation and stress. *Med Liege*. 1999; 54:751-758.
- De Castro J, Gasparetto A, Giron G: On the curarizing action of large doses of thiamine. *Acta Anaesthesiol*. 1965;16:33-50.
- Dickerson GD, Engle RD, Guzman F, Rodgers DW: The intraperitoneal bradykinin-evoked pain test for analgesia. *Life Sciences* 1965;4:2063-2069.
- Dimpfel W, Spuler M, Bonke D: Influence of repeated vitamin B administration on the frequency pattern analysed from rat brain electrical activity (Tele-Stereo-EEG). *Klin Wochenschr*. 1990;19;68:136-141.





- Dirig DM, Ali Salami & Michael L: Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods*. 1997;76:183-191.
- Elliot WH, Elliot DC: Chemical signaling in the body. *Biochemistry and molecular biology*. Oxford University. Press, Hong Kong. 1997; 359-364.
- Eschaliier A, Aumaitre O, Decamps A & Dordain G: A comparison of the effects of vitamin B₁₂ and aspirin in three experimental pain models in rats and mice. *Psychopharmacol*. 1983;81:228-231.
- Fields HL y Martin JB: Manifestaciones de la enfermedad. Dolor. Ed. Harrison. Principios de Medicina Interna. Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, Fauci y Kasper editores. Vol. 1 Madrid: Interamericana McGraw-Hill. 1994. Pp. 57-63.
- Ferreira SH: Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*. 1972;13;240:200-203.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM: Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol*. 1978;15;53:39-48.
- França DS, Souza ALS, Almeida KR, Dolabella SS, Martinelli C, Coelho MM: B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception en mice. *Neuron*. 1997;76:183-191.
- Fu GQ, Carstens E, Stelzer B & Zimmermann M: B vitamins suppress spinal dorsal horn nociceptive neurons in the cat. *Neurosci Lett*. 1988;95:192-197.
- Fu QG, Sandkuhler J & Zimmermann M: B-Vitamins Enhance Afferent Inhibitory Controls of Nociceptive Neurons in the Rat Spinal Cord. *Klin Wochenschr*. 1990;68:125-128.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA





- Garcia-Rafanell J, Forn J: Correlation between antiinflammatory activity and inhibition of prostaglandin biosynthesis induced by various non-steroidal anti-inflammatory agents. *Arzneimittelforschung*. 1979;29:630-633.
- Garthwaite J: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*. 1991;14:60-67.
- Gibson A, Mirzazadeh S, Hobbs, AJ and Moore: L-NG-nitro-arginine and its methyl ester are potent inhibitors of non-adrenergic, non-cholinergic transmission in the rat anococcygeus. *Br J Pharmacol*. 1990;100:749-752.
- Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamic factors in the potentiation of the antinociceptive effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by caffeine. *J Pharmacol. Toxicol. Meth*. 1999; 42:67-72.
- Grewall RS: A method for testing analgesics in mice. *Br. J. Pharmacol*. 1952;7:433-436.
- Hyman SE y Cassem NH: Dolor en Neurología. Ed. Científica Médica Latinoamericana. 1995. P.p 1-20.
- <http://www.plmlatina.com>
- IASP: Ethical Guidelines for Investigations on Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*. 1983;16:109-110.
- Igari T: Serum Vitamin B₁₂ levels of patients whit rheumatoid arthritis. *Tohoku J. Exp. Med*. 1978;16:125- 287.





- Janka HU, Bremen: The pain-therapeutic efficacy of highly dosed B-complex vitamins in diabetic polyneuropathy. *Klin Wochenschr.* Congress in Berlin, German. 199;24-27.
- Jurna I, Bonke D: Dose-dependent inhibition by naloxone of nociceptive activity evoked in the rat thalamus. *Pain.* 1988;35:349-54.
- Jurna I, Carlson KH, Bonke D, Fu QG and Zimmermann M: Suppression of thalamic and spinal nociceptive neuronal response by pyridoxine, thiamine, and cyanocobalamin. *Ann New York Acad Sci.* 1990;585:492-495.
- Ku EC, Wasvary JM, Cash WD: Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Biochem Pharmacol.* 1975;1;24:641-643.
- Ku EC, Lee W, Kothari HV, Scholer D W: Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med.* 1986; 28;80:18-23.
- Kuhar MJ y Pasternak GW: "Analgesics Neurochemical, Behavioral and Clinic Perspectives". Editado por Kuhar M. y Pasternak G. Raven Press, New York, 1984 pp. 289-312.
- Kuhlwein A, Meyer HJ, Koehler CO: Reduced diclofenac administration by B vitamins: results of a randomized double-blind study with reduced daily doses of diclofenac (75 mg diclofenac versus 75 mg diclofenac plus B vitamins) in acute lumbar vertebral syndromes. *Klin Wochenschr.* 1990; 19;68:107-115.



- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW: Animal models in nociception. *Pharmacol.* 2001;53:597-652.
- Lettko M, Wiesbaden: The analgesic efficacy of B-complex vitamins in degenerative illnesses of the vertebral column. *Klin Wochenschr. Congress in Berlin, German.* 1990;23:24-27.
- Lipton S: PAIN, Mechanism and Management. Wells, Editory JDC y Woolf CJ. Vol. 47. New York, London: British Medical Bulletin, Churchill Livingstone. Pp i-iv.
- Lorenzetti BB, Ferrerira SH: Model of analgesic action of dipirone: direct antagonism of inflamatory hiperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 1985;114:375-381.
- Malmberg AB, Hedner T, Fallgren B, Calcutt NA: The effect of α -trinositol (D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate) on formalin-evoked spinal amino acid and prostaglandin E₂ levels. *Brain Research.* 1997;747:160-164.
- Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R, Jaques R: Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1978;22:5-16.
- Meyer HJ: B-Complex vitamins shorten the duration of therapy of degeneratively related vertebral-column syndromes with diclofenac. Results of randomized double-blind investigations. *Klin Wochenschr. Congress in Berlin, German.* 1991;6:24-27.
- Mielke K: Vitamine der B-Gruppe: Aditive Effkte bei der medikamentosen therapie rheumatischer Erkankungen. *Therapie-Woche.* 1985;35:3313.



- Misumi J, Nagano M, Kaisaku J and Hitoshi T: Effects of vitamin B₁₂ and B₆ on 2,5-exanedione-induced neuropathy. Arch Toxicol. 1985;56:204-206.
- Olwin E, Lunden I, Anggard E: In vivo inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney by non-steroidal anti-inflammatory drugs. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1978;42:179-184.
- Reyes GG, Medina SR, Terán RF, Mateos GE, Castillo HC: Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat. J Pharmacol Toxicol. 1999;42:79-85.
- Sacerdote P, Carrabba M, Galante A, Pisati R, Manfredi B, Panerai AE: Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. Inflamm Res. 1995;44:486-490.
- Sacerdote P, Adamski J, Puhakka, Alaepaluoto J, Vuolteenaho O, and Ryhanen J: Postoperative pain relief in children. A comparison between caudal bupicaine and intramuscular diclofenac sodium. Anesthesia. 1994; 49:57-61.
- Sharma SK, Bolster B and Dakshinamurti K: Effects of Pyridoxine on Nociceptive Thalamic Unit Activity. Ann New York Acad Sci. 1990;549-554.
- Skilling SR, Smullin DH, Beitz AJ, Larson A: A extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. J Neurochem. 1988;51:127-132.





- Steinmeyer J, Kalbhen DA: Pharmacological influence on polymorphonuclear granulocytes elastase under various test conditions. *Arzneimittelforschung*. 1990;40:196-200.
- Stimmel B: Neuroregulators and Pain: Pain, analgesia and addiction: The pharmacologic treatment of pain. Ed. Raven Press. N. York. 1983. Cap.2:18-36.
- Tjølsen A, Hunskaar S, Rosland JH y Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51:5-17.
- Todd PA, Sorkin EM: Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1988;35:244-285.
- Tonussi CR, Ferreira SH: Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol*. 1994;14:173-179.
- Tucker JF, Brave SR, Charalambous L, Hobbs AJ and Gobbson A: L-NG-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1990;100:663-664.
- Vaile JH, Davis P: Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions. A review of the literature. *Drugs*. 1998;56:783-799.
- Vane JR, Botting RM: Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Rheumatol*. 1996;25:9-21.
- Vetter G, Breggermann G, Lettko M, Schwieger G, Asbach H, Biermann W, Blasius K, Brinkmann R, Bruns H, Dorn E: Shortening diclofenac therapy by





- B vitamins. Results of a randomized double-blind study, diclofenac 50 mg versus diclofenac 50mg plus B vitamins, in painful spinal diseases with degenerative changes. *Z Rheumatology*. 1988;47:351-362.
- Vincent SR and Hope BT: Neurons that say NO. *Trends Neurosci*. 1992;15:108-113.
 - Wilcox, George L: Pharmacology of Pain and Analgesia. Departments of Pharmacology and Neuroscience, Graduate Program in Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, USA. 1991. P.p. 573-584.
 - Wilcox GL, Seybold V: Pharmacology of spinal afferent processing. In: *Anesthesia: Biologic Foundations*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publisher. 1997;557-576.
 - Wilcox GL., Alhaider AA: Nociceptive and antinociceptive action of serotonin agonist administered intrathecally. In: *Serotonin and Pain* (J-M. Besson, ed.). Amsterdam: Elsevier. 1990;205-219.
 - Wild A, Zimmerman M, Bartozyk GD, Jurna I: Antinociceptive properties of pyridoxine. Neurophysiological and behavioral findings. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;585:219-230.
 - Winter CA, Risley HA., Nuss GW, Carragenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 1962;111:544-547.
 - Woolf CJ: Generation of acute pain, central mechanism. *British Medical Bulletin*. 1991;47:523-533.



- Zanin MT, Ferreira SH: Relationship between edema and plasma exudation in rat paw carrageenin inflammation. *Agents Actions*. 1978;8:606-609.

B Vitamins Increase the Anti-Hyperalgesic Effect of Diclofenac in the Rat

G. REYES-GARCÍA¹*, R. MEDINA-SANTILLÁN¹, F. TERÁN-ROSALES¹, C. CASTILLO-HENKEL¹, G.C. VIDAL-CANTÚ², N.L. CARAM-SALAS² & V. GRANADOS-SOTO²

¹Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina-IPN, Plan de San Luis y Díaz Mirón S/N, Col. Casco de Santo Tomás, 11340 México, D.F.; ²Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, México, D.F., México

B vitamins have been reported to be clinically useful alone or combined with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in some painful disorders such as polyneuropathy [1], neuritis [2], painful vertebral syndrome [3] or rheumatic diseases [4]. There is evidence that B vitamins are able to increase the antinociceptive activity of diclofenac in animals [5,6]. In humans, B vitamin preparations have been extensively used as an analgesic adjuvant combined with diclofenac for the treatment of acute lumbar vertebral pain [3,7]. However, as some negative results have also been reported [8-10], the adjuvant properties of the B vitamins complex are not completely established. In the present study, we evaluated the analgesic activity of diclofenac alone and combined with the B vitamins complex (B₁, B₆ and B₁₂) in the thermal hyperalgesia test.

METHODS: Female Wistar rats aged 7-8 weeks (weight range, 170-220 g) from our own breeding facilities were used in this study. The rats had free access to drinking water before the experiment, whereas that food was withdrawn 12 h before the study. All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals [11]. Additionally, the Institution Animal Care Committee approved the study.

Evaluation of antinociceptive activity. To assess thermal hyperalgesia, a paw thermal stimulator previously described [12-13] was used. The device consisted of a glass surface upon which the rats were placed individually in Plexiglass cubicles. The glass surface temperature was maintained at 30 ± 0.1°C. The thermal nociceptive stimulus originated from a focused projection bulb that was manually manipulated to permit the stimulus to be delivered separately to both hind paws of each test subject. This stimulus was positioned under each footpad before and after carrageenin injection (50 µl, 10 mg/ml). A timer was automatically actuated with the light source, and the response latency was defined as the time required for the paw to show an abrupt withdrawal. In all cases, a cut-off of 20 s was employed to avoid tissue injury. Rats were acclimated to the test chamber for 20-30 min prior to testing. Testing was carried out immediately before and every 30 min up to 4 h after drugs administration. At the end of experiments the rats were killed in a CO₂ chamber.

Drugs. B vitamins and diclofenac sodium were kindly provided by Merck México (Mexico City). All drugs were dissolved in saline.

Study design. Association of thiamin, pyridoxine and cyanocobalamin was used in a proportion of 100:100:1. This means that a dose of 100 mg/kg of thiamin-pyridoxine-cyanocobalamin indicates 100 mg/kg thiamin, 100 mg/kg pyridoxine and 1 mg/kg cyanocobalamin. Rats received oral administration of 30-177 mg/kg of B vitamins 10 min before the carrageenin injection. In order to explore the possible synergism between B vitamins and diclofenac, a dose of diclofenac

(1.8 mg/kg) was combined with increasing doses of B vitamins (10-56 mg/kg). Selection of doses was based on pilot studies carried out in our laboratory. Rats in all groups were tested for possible side effects measured as reduction of righting, stepping, comical and pinna reflexes before and after drug administration.

Data analysis and statistics. All results are presented as means ± SEM for at least 6 animals per group. Latency (in seconds) versus dose was used to construct time courses. Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test was used to compare differences between treatments. Differences were considered to reach statistical significance when P<0.05.

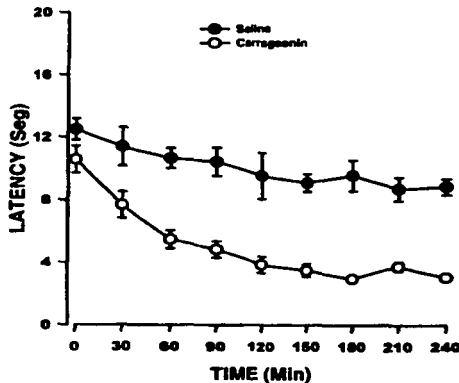


Figure 1. Hyperalgesic effect of carrageenin injected into the rat paw. Rats were injected with saline or carrageenin into the plantar pad and then submitted to a thermal nociceptive stimulus originated from a focused projection. Data are expressed as the latency (seconds) and are the means ± SEM for 6 animals.

RESULTS: Administration of carrageenin, but not saline, in the rat paw produced a hyperalgesic response which lasted about 4 h (Figure 1). Oral administration of diclofenac, but not B vitamins, produced a significant anti-hyperalgesic effect (Fig. 2). In addition, administration of a diclofenac dose (1.8 mg/kg) and increasing doses of B vitamins (18-56 mg/kg) dose-dependently reduced carrageenin-induced thermal hyperalgesia (Fig. 3).

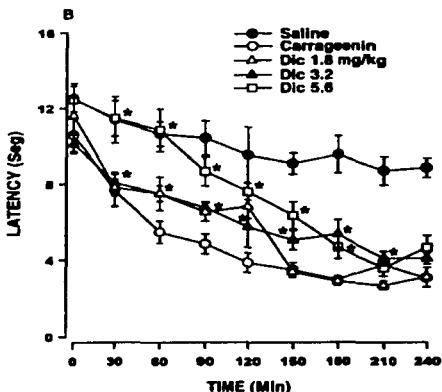
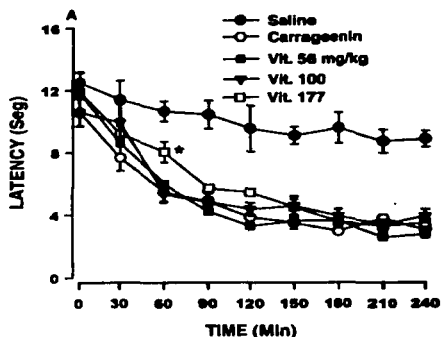


Figure 2. Antihyperalgesic effect of either B vitamins (A) or diclofenac (B) on thermal hyperalgesia induced by carrageenin. Rats were pretreated with carrageenin and then received B vitamins or diclofenac. Data are expressed as the latency (seconds) and are the means \pm SEM for 6 animals. * Significantly different from the carrageenin group ($p < 0.05$), as determined by analysis of variance followed by Tukey's test.

DISCUSSION: Diclofenac is known to cause antinociception after systemic administration in several models of pain in animals [6,14-19], as well as in clinical pain in humans [20]. In our study, we observed that oral administration of diclofenac produced dose-related antinociception in the thermal hyperalgesia model. These results demonstrate the oral antinociceptive efficacy of diclofenac. Moreover, our results agree with previous ob-

servations about the fact that NSAIDs are able to reduce thermal hyperalgesia.

The B vitamin mixture was essentially inactive in the thermal hyperalgesia test, but significantly increased the anti-hyperalgesic effect of diclofenac. These results agree with previous observations [6,8] about the lack of effect of B vitamins. Moreover, results agree with previous reports about the ability of B vitamins to increase the efficacy of diclofenac [5-6] and also support the possibility for achieving analgesic efficacy with a mixture of drugs in nociceptive systems not originally affected by the individual drugs. However, lower doses of the B vitamins mixture (18-56 mg/kg) were necessary to significantly increase diclofenac's antihyperalgesic effect than previous reported (100-250 mg/kg) [5,6]. The question of whether the observed effect of the combination is antinociceptive or anti-inflammatory in nature remains open. Results from our laboratory suggest an antinociceptive rather than anti-inflammatory effect, as naloxone was able to block diclofenac-B vitamins mixture-induced antinociceptive effect [21].

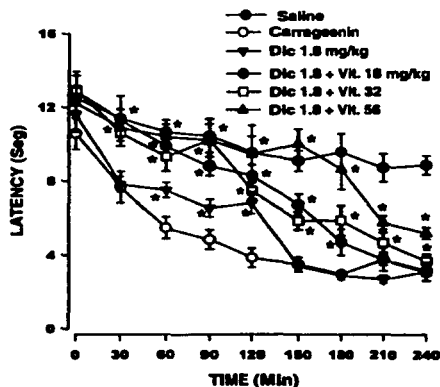


Figure 3. Antihyperalgesic effect of the diclofenac-B vitamins combination on thermal hyperalgesia induced by carrageenin. Rats were pretreated with carrageenin and then received the combination. Data are expressed as the mean latency (seconds) \pm SEM for 6 animals. # Significantly different from the carrageenin group ($p < 0.05$), as determined by analysis of variance followed by Tukey's test.

Increased efficacy of the combination could be due to the different mechanisms of action of both diclofenac and B vitamins. Diclofenac can directly block the inflammatory sensitization, produced by carrageenin, in addition to its inhibitory action on peripheral and spinal prostaglandin synthesis [22]. It has been suggested that this property of

diclofenac is due to the activation of a NO-cyclic GMP pathway in the periphery [18]. On the other hand, B vitamins are able to diminish pain through the activation of afferent inhibitory control of nociceptive neurons at the spinal cord [23-24].

In summary, our data showed that the combination of diclofenac and B vitamins has a better anti-hyperalgesic profile in the thermal hyperalgesia test than the individual drugs and support the clinical use of this combination in inflammatory pain conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors greatly appreciate the bibliographic assistance of Hector Vázquez.

REFERENCES

1. Kunze K: *Mat Med Nordm* 31: 190 (1979).
2. Small FB: *Can Med Assoc J* 118: 375 (1978).
3. Bruggemann G, Kochler CO & Koch EM: *Klin Wochenschr* 68: 116 (1990).
4. Moller T & Haase W: *Therapiewoche* 37: 876 (1987).
5. Bartoszyk GD & Wild A: *Neurosci Lett* 101: 95 (1989).
6. Reyes-García G, Medina-Santillán R, Terán-Rosales F, Mateos-García E & Castillo-Henkel C: *J Pharmacol Toxicol Meth* 42: 73 (1999).
7. Kuhlwein A, Meyer HJ & Koehler CO: *Klin Wochenschr* 68: 107 (1990).
8. Eschaliér A, Aumaitre O, Decamps A & Dordain G: *Psychopharmacol* 81: 228 (1983).
9. Misumi J, Nagano M, Kaisaku J & Hitoshi T: *Arch Toxicol* 56: 204 (1985).
10. Brom K, Herrmann WM & Schulz H: *Neuropsychobiol* 31: 156 (1995).
11. IASP: *Pain* 16: 109 (1983).
12. Dirig DM, Salami A, Rathbun ML, Ozaki GT & Yaksh TL: *J Neurosci Methods* 76: 183 (1997).
13. Granados-Soto V, Kalecheva I, Hua XY, Newton A & Yaksh TL: *Pain* 85: 395 (2000).
14. Takashima T, Kado Y & Ono T: *Clin Reports* 6: 50 (1972).
15. Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R & Jaques R: *Scand J Rheumatol Suppl* 22: 5 (1978).
16. Noguchi Y, Ishiko J & Ohtsuki I: *Roy Soc Med Int Congr Symp Series* 67: 61 (1984).
17. Scholer DW, Ku EC, Boettcher I & Schweizer A: *Am J Med* 80: Suppl. 4B: 34 (1986).
18. López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Torres-López JE, Pícazo YF, Flores-Murrieta FJ & Granados-Soto V: *Pharm Sci* 2: 189 (1996).
19. Torres-López JE, López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G & Granados-Soto V: *J Pharmacol Exp Ther* 282: 685 (1997).
20. Todd PA & Sorkin EM: *Drugs* 35: 244 (1988).
21. Reyes-García G, Medina-Santillán R, Terán-Rosales F, Castillo-Henkel C, Rodríguez-Silverio J, Torres-López JE, Ochoa-Cetina L, Medina-Tato DA & Granados-Soto V: *Proc West Pharmacol Soc* 44: 139 (2001).
22. Tonussi CR & Ferreira SH: *Eur J Pharmacol* 251: 173 (1994).
23. Fu QG, Carstens E, Stelzer B & Zimmermann M: *Neurosci Lett* 95: 192 (1988).
24. Fu QG, Sandkuhler J & Zimmermann M: *Klin Wochenschr* 68: 125 (1988).