



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS ANALGÉSICO,
ANTIINFLAMATORIO Y GASTROENTEROPROTECTOR DEL ACEITE
DE PESCADO, EN LA ADMINISTRACIÓN DE INDOMETACINA**

Tesis que presenta:

Biól. MARCO VINICIO ÁNGELES ZARAGOZA

Para Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de:

FARMACOLOGÍA

Directores de Tesis:

Dr. Gilberto Castañeda Hernández
Dra. Aracely E. Chávez Piña

Esta tesis fue realizada en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Zacatenco, con las asesorías de la Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña, Profesora Titular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, y del Dr. Gilberto Castañeda Hernández, Investigador Titular del Departamento de Farmacología.

Dedicado a mi familia y amigos.

Agradezco al **Dr. Gilberto Castañeda Hdz.** por su apoyo constante, por su confianza en mí, y por sus aportaciones a mi desarrollo profesional.

Agradezco a la **Dra. Aracely Chávez Piña** por compartir su experiencia conmigo, además de su paciencia y por brindarme asesoría durante todo el proyecto.

Agradezco a mi comité tutorial: la **Dra. Liliana Favari**, la **Dra. Carmen García** y el **Dr. Jorge Sánchez**, por sus aportaciones al buen desarrollo de este proyecto.

Agradezco a **Lourdes González**, **Patricia González** y a **Arianna Rodríguez** por el apoyo técnico que me brindaron y por su colaboración.

Agradezco a todos mis **compañeros** de laboratorio y de generación, por brindarme su ayuda, sus experiencias y su conocimiento.

Agradezco al **CONACyT** por el apoyo becario otorgado, así como el apoyo económico de los proyecto SIP-SIN-2011/01 y CONACyT 178027.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	IV
ABREVIATURAS USADAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DOLOR E INFLAMACIÓN.....	1
1.1.1. <i>Dolor</i>	1
1.1.1.1. Tipos de dolor.....	1
1.1.1.2. Nocicepción.....	3
1.1.1.2.1. Transducción.....	4
1.1.1.2.2. Conducción.....	6
1.1.1.2.3. Transmisión.....	7
1.1.1.2.4. Percepción.....	8
1.1.2. <i>Inflamación</i>	9
1.1.2.1. Inflamación aguda.....	10
1.1.2.1.1. Procesos vasculares.....	11
1.1.2.1.2. Procesos celulares.....	12
1.1.2.1.3. Mediadores químicos de la inflamación.....	14
1.1.2.2. Inflamación crónica.....	18
1.2. TRATAMIENTO DEL DOLOR Y LA INFLAMACIÓN.....	19
1.2.1. <i>AINE's</i>	20
1.2.2. <i>Otros tratamientos</i>	22
1.3. EFECTOS ADVERSOS DE LOS AINE´s.....	22
1.3.1. <i>Riesgo cardiovascular</i>	24
1.3.2. <i>Daño gastrointestinal</i>	25
1.3.3. <i>Terapias concomitantes</i>	26
1.4. ACEITE DE PESCADO.....	28
1.4.1. <i>Características</i>	28
1.4.2. <i>Ventajas y beneficios</i>	28
1.5. MÉTODOS DE EVALUACIÓN.....	33
1.5.1. <i>Plantar Test</i>	33
1.5.2. <i>Prueba de edema inducido por carragenina en ratas</i>	35
1.5.3. <i>Evaluación de daños gastrointestinales</i>	36
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. HIPÓTESIS.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. GENERAL.....	40
4.2. ESPECÍFICOS	40

5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	41
5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
5.3.1. Grupos y Controles.....	42
5.3.2. Esquemas de Administración.....	43
5.3.3. Pruebas de dolor.....	44
5.3.4. Pruebas de Inflamación.....	45
5.3.5. Evaluación del Daño Gastrointestinal.....	46
5.3.6. Análisis estadístico.....	47
6. RESULTADOS	48
6.1. EFECTO ANALGÉSICO DEL ACEITE DE PESCADO	50
6.2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ACEITE DE PESCADO	51
6.3. EFECTO GASTROENTEROPROTECTOR DEL ACEITE DE PESCADO.....	52
7. DISCUSIÓN	56
8. CONCLUSIONES	61
9. PERSPECTIVAS	62
9. ANEXOS	63
ANEXO 1	63
10. REFERENCIAS	64

ABREVIATURAS USADAS

AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
AP	Aceite de Pescado
AM	Aceite de Maíz
COX	Ciclooxigenasa
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IBP's	Inhibidores de la Bomba de Protones
LC-PUFA	Long Chain-Poliunsaturated Fatty Acids
LOX	Lipooxigenasa
PG	Prostaglandina
SSF	Solución Salina Fisiológica
TxA ₂	Tromboxano A ₂
UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.-----	15
FIGURA 2. SELECTIVIDAD DE LOS AINE's.-----	24
FIGURA 3. ESQUEMAS DE ADMINISTRACIÓN.-----	44
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DEL INSTRUMENTAL.-----	46
FIGURA 5. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR EL DOLOR.-----	48
FIGURA 6. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR LA INFLAMACIÓN.-----	49
FIGURA 7. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR EL DAÑO GÁSTRICO.-----	49
FIGURA 8. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR EL DAÑO ENTÉRICO.-----	50
FIGURA 9. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL AP.-----	51
FIGURA 10. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL AP.-----	52
FIGURA 11. DAÑO GASTROINTESTINAL AGUDO Y PROTECCIÓN POR EL AP.-----	53
FIGURA 12. DAÑO GASTROINTESTINAL CRÓNICO Y PROTECCIÓN POR EL AP.-----	54
FIGURA 13. EFECTO GASTROPROTECTOR DEL AP.-----	55
FIGURA 14. EFECTO ENTEROPROTECTOR DEL AP.-----	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA NOCICEPCIÓN.	4
TABLA 2. ESTUDIOS QUE MUESTRAN LOS BENEFICIOS CARDIOVASCULAR DEL AP.	29
TABLA 3. EFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LA ULCERACIÓN GÁSTRICA INDUCIDA POR INDOMETACINA.	33

RESUMEN

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) han probado ser eficaces en el tratamiento del dolor y la inflamación, sin embargo, entre los efectos adversos más relevantes de los mismos se encuentran los riesgos cardiovasculares y el daño gastroentérico. Estas desventajas de los AINE's hacen evidente la necesidad de alternativas terapéuticas que ofrezcan eficacia y mayor seguridad.

El aceite de pescado (AP) es una mezcla de lípidos que se extrae de los tejidos grasos de los peces, tiene un rico contenido de ácidos grasos poliinsaturados Ω -3, y estudios previos han mostrado que tiene efectos cardio y gastroprotectores importantes. Estas características hacen que el AP sea un candidato importante en el diseño de estrategias para el tratamiento del dolor y la inflamación, y para la protección gastroentérica de pacientes cuya terapia incluya AINE's.

En este trabajo, se emplearon ratas Wistar hembras a las que se les administró indometacina y AP para evaluar los efectos antinociceptivo, antiinflamatorio y gastroenteroprotector del AP, frente a la administración aguda y crónica de este AINE.

Se observó que el AP no presenta interferencia con la eficacia de la indometacina, no presenta efecto analgésico propio y no presenta sinergismo aparente en ningún caso, sin embargo, posee un efecto antiinflamatorio *per se* y es capaz de reducir los daños gástrico y entérico generados por la administración de indometacina, bajo los esquemas agudo y crónico.

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) have shown to be an effective therapy against inflammation and pain, however, between the most relevant adverse effects of these drugs are cardiovascular risks and gastroenteric damage. These NSAID's disadvantages make clear the necessity of alternate therapies which may offer efficacy and greater security.

Fish oil (FO) is an Ω -3 PUFA rich mixture of lipids, which is extracted from fish adipose tissues, and several studies have demonstrated that it has important cardio and gastroprotective effects. These features make FO a relevant candidate for the design of strategies against inflammation and pain, as well as for the gastroenteric protection of patients whose therapy includes NSAID's.

In this study, female Wistar rats were administered with indomethacin and FO in order to assess the antinociceptive, the antiinflammatory and the gastroenteroprotective effects of FO against both, acute and chronic administration of this NSAID.

It was observed that FO does not interfere with the effect of indomethacin, also it has no analgesic properties neither any apparent synergism with it, but FO showed an antiinflammatory effect *per se* as well as a reduction in gastric and enteric damages generated by the acute and chronic administration of indomethacin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DOLOR E INFLAMACIÓN.

1.1.1. Dolor.

El dolor es una experiencia intrínsecamente desagradable que, normalmente, se encuentra asociada a un daño físico¹. Fisiológicamente, se distingue entre dolor y nocicepción; considerando que la nocicepción se refiere a las señales que llegan al sistema nervioso central como resultado de la activación de los receptores sensoriales (llamados nociceptores), que proveen la información acerca del daño tisular. El dolor, por su parte, corresponde a la experiencia emocional que usualmente acompaña a la nocicepción.

1.1.1.1. Tipos de dolor.

Aunque el dolor se percibe como una sensación homogénea, existen en realidad diferentes tipos. De acuerdo a sus características, el dolor se puede clasificar según su duración, su fisiología, su localización, y su presentación^{2,3,4}.

Según su duración:

- Agudo, que tiene una duración de segundos hasta días, desaparece cuando cesa la afección que le dio origen, corresponde con una respuesta simpática y neuroendócrina aumentada y tiene la función de alarma e incapacidad funcional que permite la recuperación.
- Crónico, que persiste por meses o años, aún después de que ha cesado la afección que lo originó. La respuesta simpática y neuroendócrina se

encuentran disminuidas y no corresponde a una función biológica, aunque emocionalmente tiene mucha relevancia.

Según su fisiología:

- Nociceptivo, también denominado dolor fisiológico, se origina por estimulación directa de los nociceptores y tiene la característica de fungir como una alarma frente a la presencia de un estímulo potencialmente dañino, de tal suerte que se considera un sistema protector que busca evitar la lesión de los tejidos comprometidos.
- Inflamatorio, se presenta cuando esta prevención falla y el daño ocurre, de tal suerte que el organismo busca promover la reparación de dicho daño. En este proceso de reparación, la sensibilidad a los estímulos aumenta y aquéllos que normalmente no resultaban dolorosos ahora se perciben como tal, favoreciendo la inmovilización y el evitar contacto con la zona afectada, permitiendo así una recuperación completa¹.
- Neuropático, que es generado por una disfunción en el sistema nervioso. Se presenta en ausencia de daño tisular y puede manifestarse con diferentes intensidades.

Según su localización:

- Somático, que tiene su origen en la piel y en los tejidos más profundos (p. Ej. articulaciones y músculos), es producido por activación de nociceptores y se percibe de una manera bien localizada. Además presenta un componente primario rápido y de carácter punzante, después de la lesión, y un componente secundario retardado y difuso, que permite mantener el estímulo doloroso.
- Visceral, que tiene su origen en los órganos internos, mediante la activación de nociceptores por infiltración, compresión, distensión, tracción o isquemia de vísceras pélvicas, abdominales o torácicas. Es un dolor difuso pues se

extiende a zonas alejadas del órgano lesionado. No presenta un componente primario y normalmente se describe como un dolor profundo y opresivo, acompañado de un respuesta motora refleja y autonómica⁵.

Según se presenta:

- Continuo, que se mantiene sin periodos de remisión.
- Intermitente, que presenta intervalos de remisión intercalados con períodos variables de duración del dolor.
- Subintrante, que intercala períodos de dolor intensos con otros de tipo moderado.

1.1.1.2. Nocicepción.

La percepción del dolor requiere de un proceso que abarca desde el estímulo hasta la interpretación del mismo como dolor. Este proceso se conoce como nocicepción y se integra por la transducción, la conducción, la transmisión y la percepción de las señales generadas por los estímulos dañinos^{1, 5}.

En esta señalización se encuentran involucradas las fibras aferentes primarias A δ y C. Las fibras A δ son fibras nerviosas mielinizadas de mediano calibre, mientras que las fibras C son fibras no mielinizadas y de menor calibre. Ambos tipos de fibras pueden ser estimuladas por el frío, el calor y la presión, a partir de la activación de nociceptores como el RPTV-1, generando potenciales de acción que eventualmente llegarán a la médula espinal y, después, al hipotálamo, para finalmente ser interpretados a nivel de la corteza cerebral¹.

Existen diferentes tipos de nociceptores, algunos de ellos son sensibles a un tipo de estímulo (p. ej. calor o presión), mientras que otros pueden estimularse mediante más de uno de éstos. Así mismo, la diferencia entre las fibras A δ y C, se ve reflejada en la velocidad con la que el estímulo se transmite a lo largo de cada fibra hasta llegar al sistema nervioso central. Dado que las fibras A δ son mielinizadas y de mayor calibre, permiten una transmisión más rápida de la señal, mientras que las

fibras C muestran un retraso con respecto a éstas. Esta diferencia da lugar a la existencia de dos sensaciones dolorosas sucesivas, al ser estimulados los nociceptores en ambas fibras⁵.

1.1.1.2.1. Transducción.

Se conoce como transducción a la conversión de los estímulos nocivos (presión, temperatura, etc.) en señales eléctricas, por los nociceptores que se encuentran en las terminales nerviosas de las fibras aferentes primarias. Estos nociceptores presentan un umbral de excitación alto, además de que la mayoría son polimodales, es decir, responden a estímulos tanto mecánicos como químicos y de temperatura^{1,6}. Existen diferentes canales iónicos en las terminales sensoriales y en el soma de las neuronas (tabla 1), los cuales se encuentran estrechamente relacionados al proceso de transducción ya que las corrientes iónicas entrantes o salientes, que se generan por la activación de estos canales iónicos, producen una despolarización de la membrana y, consecuentemente, un incremento en la excitabilidad neuronal⁶.

TABLA 1. PRINCIPALES CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA NOCICEPCIÓN.

Canal iónico	Sensibilidad y/o efectos de su activación	Corriente iónica
Na⁺	<ul style="list-style-type: none"> • Generación del potencial de acción. • Generación y mantenimiento del dolor neuropático. 	Entrante de ión sodio.
Ca⁺²	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de neurotransmisores (sustancia P y PRGC). • Despolarización neuronal. 	Incremento intracelular de iones de calcio.
K⁺	Estabilización de la membrana mediante hiperpolarización.	Saliente de ión potasio.
RPTV1	Sensibles a capsaicina, a calor (> 43 °C), a sustancias ácidas y a productos de las prostaglandinas (12-HPETE).	Entrante de cationes no selectivos.

RPTV2	Sensibles a calor (> 52°C).	Entrante de cationes no selectivos.
RPTV3	Sensibles a temperatura media (aproximadamente 31 °C).	Entrante de cationes no selectivos
RPTV4	Sensor de hipotonicidad y temperatura media.	Entrante de cationes no selectivos
RPTM8	Sensible al frío (23 – 26 °C) y agentes químicos como el mentol.	Entrante de cationes no selectivos
RPTA1	Sensible al frío (< 17 °C).	Entrante de cationes no selectivos
CISA	Sensible al ácido extracelular.	Entrante de cationes no selectivos
P2X	Sensible al ATP. Relacionado con el dolor neuropático.	Entrante de cationes no selectivos
R-5HT₃	Sensible a serotonina. Relacionado con dolor neuropático.	Entrante de cationes no selectivos

RPT: receptor de potencial transitorio; RPTV: receptor de potencial transitorio relacionado con receptores vaniloideos; RPTM: receptor de potencial transitorio relacionado a melastanina; CISA: canal iónico sensible a ácido; P2X: receptor purinérgico subtipo X; R-5HT₃: receptor a serotonina tipo 3.

Existen además diferentes mediadores químicos que modulan positivamente la actividad de los nociceptores:

- Bradicینina. Sensibiliza a los nociceptores mediante un aumento en la producción de prostaglandinas por activación de la fosfolipasa A₂, en las neuronas simpáticas postganglionares, además estimula directamente a los nociceptores. Esta activación de los nociceptores, por la bradicینina, da lugar a la generación de diacilglicerol y a la activación de proteína cinasa C, dando lugar a un incremento en la conductancia del ión sodio.
- Noradrenalina. Estimula la producción de prostaglandinas en las neuronas simpáticas postganglionares.

- Factor de crecimiento neural. Se produce por la acción de IL-1B y sensibiliza a los nociceptores. También actúa aumentando la expresión de genes que codifican para bradicinina, entre otros péptidos.
- Iones hidrógeno. Despolarizan las fibras aferentes nociceptivas mediante la apertura de canales de sodio y mediante la apertura de canales no selectivos, permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .
- ATP. El trifosfato de adenosina (ATP) es capaz de estimular a los receptores de la familia P_{2x} , generando una despolarización inmediata y un aumento en el Ca^{2+} intracelular. Este efecto ocurre en fibras de diámetro pequeño de neuronas sensoriales, donde se localizan los receptores P_{2x2} y P_{2x3} .
- Sustancia P y PRGC. Estas sustancias son capaces de activar directamente a algunos nociceptores, además la sustancia P da lugar a extravasación plasmática, a liberación de histamina por parte de los mastocitos, a la liberación de citosinas por parte de los macrófagos, y a la liberación de prostaglandinas y colagenasas por parte de los sinoviocitos.

Además de estos mediadores, también intervienen leucotrienos, citosinas, aminas y prostaglandinas, de las cuales se hace una descripción más detallada en el apartado de inflamación.

1.1.1.2.2. Conducción.

Después de que el estímulo nocivo se ha transformado, por los nociceptores, a potenciales de acción, éstos se propagan hacia la médula espinal mediante las fibras aferentes primarias.

Se distinguen tres tipos de estas fibras:

- $\text{A}\beta$, que tienen un diámetro grande (8mm), son mielinizadas y su velocidad de conducción alcanza los 50 m/s. Estas fibras detectan estímulos inocuos y no contribuyen a la conducción nociceptiva.

- A δ , que también son mielinizadas pero de menor calibre (3mm). Conducen impulsos nociceptivos y alcanzan velocidades de 5-30 m/s. En el dolor somático son las responsables del dolor primario.
- C, que son pequeñas (1mm) y no mielinizadas. Son responsables del dolor somático secundario y del dolor visceral. Su velocidad de conducción va de 0.5-2 m/s. Algunas de estas fibras están capacitadas para liberar mediadores como sustancia P y PRGC, tanto en las terminales periféricas como en las centrales.

1.1.1.2.3. Transmisión.

Las fibras aferentes primarias llegan a la médula espinal, donde la información nociceptiva puede ser conducida hacia el cerebro o puede ser inhibida por los sistemas descendentes⁷.

En este punto, las fibras aferentes hacen sinapsis con neuronas de la sustancia gris de la médula espinal, de las cuales las más importantes en la transmisión nociceptiva son las que se encuentran en las láminas I, II y V, del asta dorsal¹. En este nivel, el glutamato cobra importancia como neurotransmisor de la información nociceptiva a nivel central y actúa sobre cuatro receptores:

- N-metil-D-aspartato (NMDA), que también es sensible al aspartato y se encuentra a nivel postsináptico. El mecanismo efector ocurre mediante un canal de cationes con cinética lenta.
- α -amino-3-hidroxi-5-hidroxi-5-metil-4-isoxazolproinato (AMPA), que se encuentra ubicado a nivel postsináptico y al ser un canal de cationes de cinética rápida, permite la transmisión, también rápida, de la información nociceptiva.
- Kainato, que se encuentra ubicado de manera presináptica y postsináptica, aunque no se encuentran tan abundantemente. Actúa mediante un canal de cationes de cinética rápida y con baja permeabilidad de Ca²⁺, generando una transmisión rápida de la información.

- Metabotropos, que se encuentran acoplados a proteínas G, tanto en la presinapsis como en la postsinapsis, y permiten una modulación sináptica, mediante la formación de trifosfato de inositol y liberación de Ca^{2+} .

En general, se piensa que las terminaciones de las fibras A δ secretan glutamato a nivel de la médula espinal, mientras que las fibras C, además del glutamato, liberan péptidos como el PRGC y la sustancia P, responsables del dolor tardío. Estos neurotransmisores producen la excitación de neuronas de segundo orden, incrementando los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo cual da lugar a la activación de la fosfolipasa A₂, NOS y varias cinasas. Las prostaglandinas y el óxido nítrico (ON) son también importantes en este evento, ya que pueden facilitar la liberación de más neurotransmisores, como el glutamato y la sustancia P, de las fibras aferentes nociceptivas. Lo anterior ocurre por acción directa, como es el caso del ON, o mediante la interacción con receptores específicos, en el caso de las prostaglandinas⁸.

Las sustancias mediadoras neuroquímicas implicadas en la modulación de la señal nociceptiva, a este nivel, pueden ser de carácter excitatorio (favoreciendo la transmisión nociceptiva), como la sustancia P, la PRGC y la neurocinina A; mientras que también pueden ser de carácter inhibitorio, como los opiáceos endógenos (encefalina, dinorfina y endorfina), la somatostatina, la norepinefrina, la serotonina y el ácido gamma amino butírico (GABA).

Después de su integración, en el asta dorsal de la médula espinal, la información nociceptiva se conduce, mediante las neuronas de proyección, a centros superiores en el cerebro⁹.

1.1.1.2.4. Percepción.

La integración y el ulterior proceso del estímulo doloroso, se llevan a cabo en los centros supraespinales, constituidos principalmente por¹:

- La formación reticular, que es un mediador de las funciones motoras, sensitivas y autonómicas, involucrado en los impulsos de aversión y en los aspectos afectivo-emocionales del dolor.
- El tálamo, que permite la consciencia de los estímulos cutáneos finos, relacionados con el dolor. Tiene además la función de distinguir entre el tipo de dolor (quemadura, parestesia o cambios térmicos), y actúa como centro de relevo par los estímulos nociceptivos aferentes.
- El hipotálamo, que integra y regula la respuesta neuroendócrina y del sistema nervioso autónomo, además de organizar la respuesta somática y visceral por la presencia del dolor.
- El sistema límbico, que interviene en las reacciones del estado anímico y del estado emocional.
- La corteza cerebral, que, en las áreas somatosensoriales, interpreta la información dolorosa. Interviene así en la discriminación y en la localización del dolor.

Bajo condiciones patológicas y, dependiendo de la edad y otros factores psicosociales, el dolor puede ser debilitante e incluso causa de depresión para quienes lo padecen. Esto ocurre ya que, aunque es esencialmente una sensación, el dolor se encuentra ligado a factores cognitivos y emocionales, que le confieren atribuciones de sufrimiento^{1, 10}.

El dolor limita la actividad profesional de quienes lo padecen. Esto conlleva a importantes consecuencias tanto en la vida social de los pacientes como en la economía (a diferentes niveles). Se estima que uno de cada cinco sujetos pierde su trabajo y un tercio presenta problemas en su actividad laboral a consecuencia del dolor crónico¹⁰.

1.1.2. Inflamación.

La inflamación es un mecanismo de respuesta que se presenta en el tejido conectivo vascularizado, frente a la invasión de organismos patógenos y/o frente a algún daño

tisular. Este fenómeno se caracteriza principalmente por la liberación de diversas sustancias, por parte de las células del tejido dañado circundante, y por el reclutamiento de las células del sistema inmunológico, principalmente neutrófilos, además de una acumulación de fluido, que permiten la localización, dilución y destrucción de los agentes causantes de la inflamación. Sin embargo, el reclutamiento de estas células trae consigo, también, consecuencias no benéficas, puesto que deben abrirse paso a través del tejido para alcanzar la zona afectada y para ello se liberan diversos mediadores químicos que pueden generar aumento de dolor y mayor inflamación¹¹. Así mismo, la inflamación se considera inadecuada cuando se desencadena bajo las siguientes circunstancias¹²:

- En forma exacerbada y/o sin control (choque anafiláctico).
- En forma crónica (cáncer, obesidad).
- Debido a sustancias ajenas al organismo (alergias).
- Frente a tejidos del propio organismo (enfermedades autoinmunes).

La meta final es liberar al organismo del tejido dañado, las células muertas y las necróticas, es decir, la reparación del daño, sin embargo, en algunos casos la inflamación puede ser detrimental y llega a constituir parte del proceso patológico, por lo que se requiere su control mediante el uso de fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores¹²⁻¹³.

1.1.2.1. Inflamación aguda.

La inflamación aguda es un proceso inmediato y se desencadena como respuesta a una agresión generada por:

- Patógenos (virus, bacterias, hongos, etc.).
- Estímulos nocivos físicos (frío, calor, trauma, etc.).
- Estímulos nocivos químicos (toxinas, venenos, ácidos, etc.).
- Necrosis tisular (infarto por isquemia, etc.).

Los principales síntomas de la inflamación aguda son el rubor, el calor, el tumor, el dolor, y la pérdida de función de la zona afectada. Esto ocurre debido a que la inflamación aguda trae consigo modificaciones en el calibre de los vasos sanguíneos, para facilitar el flujo de la sangre, y alteraciones en la estructura microvascular, alterando también la permeabilidad. Estos eventos permiten la salida de proteínas plasmáticas y leucocitos, así como la migración de los mismos a la zona lesionada. Más aún, el dolor es una consecuencia de la activación y sensibilización de las fibras nerviosas aferentes primarias⁷.

En el proceso de inflamación, la contracción de las células endoteliales se encuentra mediada por diferentes aminas, eicosanoides, y citocinas, incluyendo la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el interferón gamma (INF- γ). De igual manera, la adhesión de leucocitos se encuentra mediada por la presencia de proteínas de membrana, que se expresan como resultado de la señalización propia de dichas citocinas y eicosanoides^{11, 13}.

1.1.2.1.1. Procesos vasculares.

El primer cambio en la microcirculación corresponde a una vasoconstricción transitoria, con duración de apenas unos segundos, y después ocurre una vasodilatación bastante manifiesta de arteriolas, capilares y vénulas. Esta vasodilatación da lugar a un incremento en la cantidad de sangre, en la zona afectada. Conforme la microvasculatura se permeabiliza, el fluido rico en proteínas se extravasa hacia el tejido circundante y provoca un aumento en la viscosidad sanguínea, por un aumento relativo de eritrocitos. Finalmente, ocurre un estasis del flujo sanguíneo¹⁴.

En la fase temprana de la inflamación, la dilatación arteriolar y el incremento del flujo sanguíneo, generan un aumento en la presión hidrostática, lo que ocasiona el movimiento de fluido de los capilares hacia los tejidos. Este fluido se conoce como trasudado y es, en esencia, un ultrafiltrado del plasma sanguíneo, con poca cantidad de proteínas. Posteriormente, este trasudado aumenta su contenido protéico y

celular, convirtiéndose así en un exudado inflamatorio, que tiene las funciones de diluir el agente agresor, aumentar el flujo linfático para retirar a dicho agente de la zona, y rodear el área afectada con diferentes proteínas defensivas (como proteínas del complemento e inmunoglobulinas)¹⁵.

1.1.2.1.2. Procesos celulares.

La inflamación aguda se caracteriza por la migración de células inflamatorias, que pasan de la sangre al área de lesión. Los neutrófilos prevalecen en la fase temprana (primeras 2 horas) pero, posteriormente, penetran células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, así como linfocitos y células plasmáticas. No obstante, los neutrófilos continúan predominando durante varios días¹⁶.

La extravasación de los leucocitos hacia el sitio de inflamación obedece a una secuencia de acontecimientos que son¹⁷:

- Marginación y rodamiento de leucocitos. Al disminuir la velocidad del flujo sanguíneo, los eritrocitos, que son más ligeros, tienden a moverse más rápido y forman agregados celulares densos en el eje central del vaso sanguíneo, favoreciendo así el desplazamiento de los leucocitos hacia la periferia de los vasos y su interacción con las células endoteliales¹⁸. En seguida de este fenómeno, los leucocitos presentan una serie de adhesiones transitorias débiles, que conforman el proceso de rodamiento y que está mediado por moléculas de adhesión de la familia de las selectinas. Las selectinas son receptores expresados en los leucocitos y en el endotelio, que contienen un dominio extracelular que une azúcares. Los tres miembros de esta familia son la E-selectina, que se expresa en células endoteliales; la P-selectina, que se encuentra en plaquetas y también en el endotelio; y la L-selectina, que se expresa en la mayoría de los leucocitos. Cabe mencionar que las selectinas endoteliales se expresan muy poco y que, bajo condiciones inflamatorias, se incrementa su expresión gracias a la acción de mediadores específicos¹⁸.

- Adhesión y transmigración. La adhesión corresponde al afianzamiento de la unión entre leucocitos y células del endotelio. Este afianzamiento está mediado por integrinas que se expresan en la superficie de los leucocitos y por sus ligandos, que se expresan en la superficie de las células endoteliales. Las integrinas son glicoproteínas transmembranales que forman heterodímeros, y que son activadas por ciertas quimiocinas. A su vez, las citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1), favorecen la expresión de los ligandos de dichas integrinas en la membrana de las células endoteliales¹⁹. Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos migran a través de la pared del vaso sanguíneo por diapédesis, estimulada por quimiocinas de los tejidos extravasculares y con ayuda de la molécula de adhesión plaqueta-endotelio (CD-31), que se expresa tanto en los leucocitos como en las células endoteliales. Cuando los leucocitos han extravasado, liberan colagenasas que degradan la membrana basal, para abrirse paso¹⁹.
- Quimiotaxis. Una vez que los leucocitos han alcanzado el espacio intersticial, se dirigen a la zona donde se encuentra la lesión y/o el agente dañino. Este direccionamiento ocurre gracias a un gradiente de agentes quimiotácticos, que corresponden a productos bacterianos, fragmentos del complemento, metabolitos del ácido araquidónico, y algunas citocinas. Esta quimiotaxis depende de la interacción de los agentes quimiotácticos con receptores específicos en la membrana de los leucocitos, así como de la producción de segundos mensajeros. Este proceso de transducción de señales da lugar a la activación de la fosfolipasa C y de la cinasa C, generando un incremento de calcio intracelular y, gracias a esto, a los eventos de contracción celular, responsables del movimiento¹⁶.
- Activación. Los agentes quimiotácticos, también son capaces de activar a los leucocitos mediante su interacción con receptores específicos, dando lugar a la fagocitosis, a la degranulación y secreción de enzimas lisosomales, al inicio de la actividad oxidativa, a la producción de prostaglandinas y citocinas proinflamatorias, y a la regulación de las moléculas de adhesión leucocitaria¹⁷.

1.1.2.1.3. Mediadores químicos de la inflamación.

Todos los procesos descritos anteriormente, se desencadenan gracias a la acción de diversos mediadores químicos, procedentes de las células en el sitio de la inflamación o de mediadores circundantes en el plasma (sintetizados por el hígado). Los derivados de las células pueden encontrarse en gránulos intracelulares que se liberan al estimularse la célula (histamina) o formarse *de novo*, en respuesta a un estímulo (prostaglandinas y citocinas). La mayoría de estos mediadores ejercen su efecto mediante receptores específicos en las células diana y, algunos de ellos, pueden estimular la producción de otros mediadores en estas mismas células (amplificación). Una vez activados y liberados, la mayoría de los mediadores químicos tiene una vida corta ya que son inactivados por enzimas o sufren la acción de inhibidores¹⁴.

Entre los principales mediadores químicos se encuentran:

- Aminas vasoactivas. La histamina y la serotonina se pueden encontrar preformadas en mastocitos y en otras células, y constituyen a los primeros mediadores liberados durante la inflamación aguda. La histamina se produce en varios tipos celulares, principalmente en mastocitos circundantes de los vasos sanguíneos, en basófilos circulantes y en plaquetas. Se libera frente a estímulos físicos (calor, trauma), reacciones alérgicas (por unión de anticuerpos IgE a los receptores Fc en mastocitos), en respuesta a fragmentos de proteínas del complemento C3 y C5, neuropéptidos (sustancia P), y ciertas citocinas (IL-1, IL-8). La histamina que se libera disminuye durante la primera hora después del comienzo de la inflamación, al ser inactivada por la histaminasa. La serotonina tiene efectos similares a la histamina y se encuentra en los gránulos densos de las plaquetas, liberándose durante la agregación plaquetaria. Ambas aminas producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad⁷.

- Eicosanoides. De estos mediadores, los principales corresponden a las prostaglandinas, los tromboxanos, los leucotrienos y las lipoxinas. Se forman a partir del ácido araquidónico (figura 1), que es un ácido graso insaturado de 20 átomos de carbono, que contiene cuatro dobles enlaces y que se encuentra formando parte de la membrana celular (esterificado con fosfolípidos). Para la producción de estos eicosanoides, es necesaria la activación de la fosfolipasa A₂ (FLA₂), la cual no sólo da lugar a estos derivados del ácido araquidónico sino que puede dar lugar también al lisogliceril-fosforilcolina, el precursor del factor activador de plaquetas (FAP)²⁰.

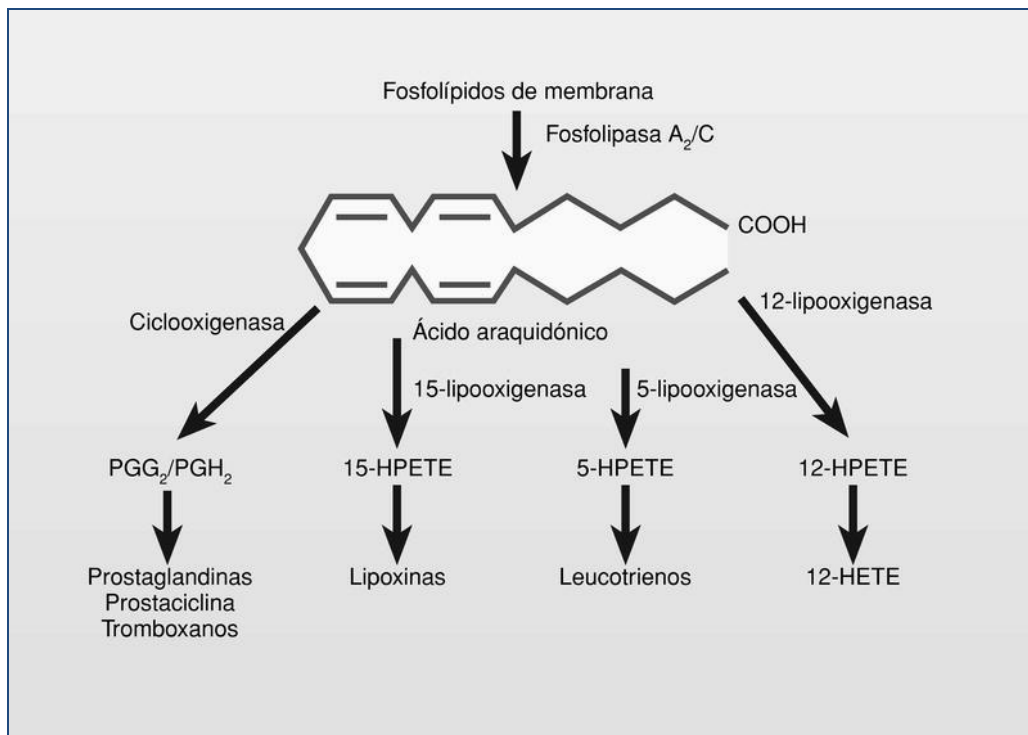


Figura 1. METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.

Modificado de Benaiges (2001).

El ácido araquidónico libre se metaboliza principalmente de dos formas: por la ciclooxigenasa (COX), de la cual existen dos isoformas, COX-1 y COX-2, y dan lugar a los prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos); y por las lipooxygenasas, que inician la síntesis de leucotrienos, lipoxinas y otros

compuestos como las resolvinas, las cuales participan en el proceso de resolución de la inflamación²⁰⁻²¹⁻²².

- Prostanoides. A principios de la década de los 90's, se identificaron dos isoenzimas de la COX, la COX-1, que se encontraba de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos, y la COX-2, que se inducía en la inflamación. Esta característica llevó a la idea de que las prostaglandinas producidas por la COX-1 tenían una función homeostática, mientras que las producidas por la COX-2 eran responsables del dolor y de la inflamación²³. Sin embargo, se ha observado que tanto la COX-1 participa en los procesos de inflamación, así como la COX-2 participa en procesos de homeostasis^{24,25,22, 26}.

Los principales prostanoides son la prostaglandina E₂ (PGE₂), PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} y el tromboxano A₂ (TXA₂). La respuesta inflamatoria siempre va acompañada de la liberación de prostanoides, predominantemente de PGE₂ y a veces PGI₂. En las zonas de inflamación aguda, éstas se generan por parte de los tejidos y de los vasos sanguíneos locales, así mismo los mastocitos liberan PGD₂ y, en la inflamación crónica, los monocitos y los macrófagos liberan PGE₂ y TXA₂²⁰. Las prostaglandinas PGE₂, PGI₂ y PGD₂ inhiben la agregación plaquetaria y son potentes vasodilatadores, además de presentar efectos sinérgicos con otros vasodilatadores inflamatorios como la bradicinina y la histamina. Además de esto, son capaces de sensibilizar las fibras aferentes de tipo C, potencializando el efecto nociceptivo de la bradicinina. Por su parte, el TXA₂ se produce fundamentalmente en las plaquetas y provoca vasoconstricción y agregación plaquetaria²⁷.

- Leucotrienos. El metabolismo del ácido araquidónico por parte de la lipooxigenasa-5 (LOX-5), da lugar al leucotrieno A₄ (LTA₄), el cual se puede modificar por acción enzimática en LTB₄, principalmente en los neutrófilos. También puede dar lugar a LTC₄, LTD₄ y LTE₄, los cuales tienen incorporados aminoácidos a su estructura y son producidos en los eosinófilos, en los mastocitos, en los basófilos y en los macrófagos. Estos leucotrienos son importantes en la anafilaxia y en las acciones sobre el sistema respiratorio y el sistema cardiovascular^{20, 28}.

El LTB₄ cobra especial importancia en los procesos de inflamación, ya que es un mediador que actúa sobre receptores específicos en los neutrófilos y propicia un aumento en la expresión de moléculas de adhesión. Además estimula la degranulación, la producción de citocinas y la proliferación de macrófagos y linfocitos²⁸.

- Lipoxinas. Las lipoxinas A₄ (LXA₄) y B₄ (LXB₄) se identificaron como la interacción de los productos de la LOX-5 y de la LOX-15, en leucocitos activos. Se consideran reguladores negativos de los productos del ácido araquidónico y son, en gran medida, responsables de la resolución de la inflamación^{29, 27, 30}.
- Citocinas. Son péptidos que, en las reacciones inmunitarias e inflamatorias, se liberan por parte de las células involucradas en dichas reacciones. La familia de las citocinas incluye a los interferones, a las interleucinas, al TNF- α , a diversos factores de crecimiento, a las quimiocinas y a los factores estimuladores de colonias. Estas moléculas permiten controlar la proliferación, la diferenciación y la activación celular, mediante mecanismos autócrinos o parácrinos⁷. La IL-1 y el TNF- α son citocinas inflamatorias primarias, que inducen la formación de otras citocinas¹⁴. Existen además citocinas con actividad antiinflamatoria, como es el caso del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y de las interleucinas IL-4, IL-10 e IL-3, que regulan la magnitud de la respuesta inflamatoria⁷.
- Óxido nítrico. Este compuesto es un gas soluble de vida corta y se produce por diferentes tipos celulares. Interviene en una amplia variedad de funciones, como la regulación de la liberación de neurotransmisores, el flujo sanguíneo, la relajación del músculo liso y la vasodilatación, entre otros. El ON es sintetizado a partir de la L-arginina, oxígeno molecular y NADPH, por la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés). Se reconocen tres isoformas, dos de ellas son constitutivas (cNOS), dependientes de la calcio/calmodulina y corresponden a la sintetasa de óxido nítrico epitelial (eNOS) y a la sintetasa de óxido nítrico neural (nNOS), mientras que la tercera isoforma es inducible (iNOS) e independiente de la calcio/calmodulina,

producida en macrófagos y en células endoteliales, en respuesta a citocinas y mediadores como IL-1, TNF- α , interferón y endotoxinas bacterianas³¹.

- Neuropéptidos. Se liberan por parte de neuronas sensitivas y contribuyen a las reacciones de inflamación neurógena. Los péptidos más importantes son la sustancia P, la neurocinina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC). La sustancia P y la neurocinina actúan sobre los mastocitos, liberando histamina y otros mediadores, lo cual produce contracción del mRGC actúa como un potente vasodilatador⁷.
- Bradicinina. Esta molécula produce efectos vasodilatadores y un aumento en la permeabilidad vascular. Estos efectos se deben en parte a la producción de PGI₂ y a la liberación de ON. Es además una sustancia que genera dolor, y da lugar a la contracción del músculo liso, de manera lenta y sostenida³².

1.1.2.2. Inflamación crónica.

La inflamación crónica, por su parte, se caracteriza por la infiltración de células mononucleares, la destrucción del tejido por las células inflamatorias, y las áreas de angiogénesis y fibrosis activas¹³. La transición de inflamación aguda a crónica tiene lugar cuando la respuesta aguda no puede resolverse, lo cual puede deberse a que el agente patógeno causante ha resistido las defensas del organismo (infecciones persistentes) o a que existe un problema en la respuesta (inmunosupresión).

La mayoría de los procesos inflamatorios son auto-limitados y se resuelven después de cierto tiempo mediante la liberación de sustancias endógenas que tienen como finalidad el control de algunos eventos como la migración celular, la proliferación, la eliminación de células apoptóticas, entre otros. Este mecanismo es necesario, considerando que la meta es proteger al organismo de una inflamación exacerbada³².

La resolución de la inflamación depende, en gran medida, de la inhibición del influjo de neutrófilos, así como de su apoptosis y subsecuente fagocitosis por parte de los macrófagos. Sin embargo, el microambiente de las señales químicas puede

influenciar a estas células, dando lugar a patrones de supervivencia celular y, en consecuencia, una falla en la resolución exitosa de la inflamación^{11, 33}.

1.2. TRATAMIENTO DEL DOLOR Y LA INFLAMACIÓN.

Las características de los fenómenos de dolor e inflamación, su impacto en la calidad de vida, y las situaciones descritas en las que, más allá de cumplir una función protectora, dan lugar a un malestar, son razones por las que ambos padecimientos requieren de una terapia farmacológica.

En farmacología existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

- a) Los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides, que son los más potentes antiinflamatorios.
- b) Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's).

También existen dos grupos importantes y bien diferenciados de analgésicos: Los opioides como la morfina, la meperidina y el fentanilo, y los no opiáceos o AINE's.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los pacientes con dolor en tres escalones de intensidad con el objetivo de establecer el correcto tratamiento. La clasificación de la OMS es la siguiente:

- Grupo 1: analgésicos de acción periférica, representado por los analgésicos no opioides del tipo antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como el diclofenac, ibuprofeno y otros como el paracetamol.
- Grupo 2: analgésicos centrales débiles, se encuentran representando a este grupo la codeína, también el D-propoxifeno y el tramadol.
- Grupo 3: analgésicos centrales fuertes, tales como la morfina, meperidina, metadona, también la hidrocodona y oxycodona.

1.2.1. AINE's.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) son de los fármacos más vendidos en el mundo, ya sea por prescripción o automedicación³⁴. Son agentes que se emplean en patologías diversas y de manera crónica e incluso de por vida, como en la artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, entre otras. Por esta razón, la relación costo-riesgo-beneficio de su uso debe tenerse en consideración al elegir la mejor terapia³⁵.

Entre los AINE's más importantes se encuentran los salicilatos, como la aspirina; los indoles, como la acetaminofeno y la indometacina; los derivados del ácido acético, como el diclofenac y el ketorolaco; y los derivados del ácido propiónico, como el ibuprofeno y el naproxeno. Todos ellos, son un grupo de fármacos cuyo efecto primario es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, que son los mediadores responsables de la fiebre, el dolor y la inflamación. Esta inhibición ocurre mediante el bloqueo de las enzimas ciclooxigenasas (COX 1/2). La mayoría de los AINE's son inhibidores reversibles y competitivos de las COX's, mientras que el ácido acetil salicílico es un inhibidor irreversible ya que acetila a la enzima en el sitio activo. Esto lo hace uno de los agentes más útiles como antiagregante plaquetario ya que inhibe la enzima ciclooxigenasa plaquetaria (COX-1) por toda la vida de la plaqueta (7-11 días), dado que las plaquetas son fragmentos celulares y son incapaces de sintetizar una nueva enzima. Los efectos analgésico y antiinflamatorio de los diferentes AINE's varían de acuerdo al tipo de fármaco, sin embargo, es sabido que la indometacina es uno de los más potentes, aunque también es uno de los más tóxicos³⁶.

Algunos estudios sugieren que existen otros mecanismos de acción, sobre todo para sus acciones antiinflamatorias. De acuerdo con esto, se ha visto que algunos AINE's inhiben la enzima lipooxigenasa *in vitro* y lo mismo se ha observado en algunos modelos animales, utilizando diclofenac e indometacina. Estos 2 agentes disminuyen los leucotrienos y prostaglandinas de leucocitos y células sinoviales por estimular la reincorporación del ácido araquidónico libre en los triglicéridos de las membrana⁸.

Todos estos AINE's, sin embargo, se consideran tradicionales, ya que durante la década de los 90's, se desarrolló un grupo de AINE's, conocidos como coxibs o

inhibidores selectivos de la COX-2. Este nuevo grupo de fármacos mostró tener importantes efectos analgésico y antiinflamatorio pero presentaron otro tipo de riesgos a la salud que dieron lugar a que la terapia de elección para las afecciones de dolor e inflamación continúen siendo los AINE's tradicionales³⁶⁻³⁷. De manera más detallada, la idea general de que los productos resultantes de la COX-2 eran los responsables del dolor y de la inflamación, dio lugar a que las compañías farmacéuticas invirtiesen en el desarrollo de fármacos con alta selectividad para la COX-2, con la intención de producir un antiinflamatorio efectivo y con un alto margen de seguridad, susceptible de emplearse de forma prolongada y en pacientes sensibles y/o con alteraciones gástricas y renales. De esta forma, surgieron los llamados "coxibs" como lo son el rofecoxib, el celecoxib, el valdecoxib, el parecoxib, el etoricoxib y el lumiracoxib, que se introdujeron rápidamente al mercado³⁸⁻³⁹. Estos fármacos, como ya se mencionó, bloquean selectivamente la isoenzima COX-2, pero lo hacen en diferente proporción⁴⁰. Este bloqueo selectivo, en comparación con los AINE's tradicionales (cuyo bloqueo es relativamente indistinto), se asocia a un menor riesgo gastrointestinal⁴¹. De hecho, se ha observado que para que ocurra el daño gastrointestinal, se requiere el bloqueo de ambas isoformas de la COX²². Por otro lado, se observó que en algunos casos, el rofecoxib producía efectos cardiovasculares adversos e incluso mortales⁴², lo que hizo que este fármaco se retirase del mercado, unto con el valdecoxib. Estos efectos cardiovasculares adversos, se explican como una pérdida del equilibrio pues, al bloquear la COX-2, disminuye la PGI₂, con efectos antiagregante y vasodilatador, y la producción de TXA₂, con efectos proagregante plaquetario y vasoconstrictor, aumenta con respecto a los de PGI₂, de tal suerte que la prevalencia de TXA₂ sobre la PGI₂ aumenta el riesgo de trombosis⁴³.

Por lo anterior, la búsqueda de fármacos más seguros y eficaces para el tratamiento del dolor y de la inflamación aún continúa y tiene dos acepciones principales⁴⁰:

1. Definir nuevas estrategias dentro del complejo proceso del dolor y la inflamación, considerando la participación de las isoformas de la COX, así como de la LOX-5 y a las lipoxinas sintéticas.

2. Modificar los AINE's tradicionales para que se pueda obtener un efecto protector sobre la mucosa gástrica.

1.2.2. Otros tratamientos.

Además de los AINE's, como se mencionó anteriormente, existen otros tipos de antiinflamatorios, principalmente de tipo esteroideo, cuya función se basa en la supresión del sistema inmunológico. Esta supresión evita la infiltración de células hacia el tejido, así como el aumento de señales químicas pro-inflamatorias y relacionadas con el dolor. Sin embargo, este tipo de terapias no se recomiendan para el uso terapéutico prolongado ya que pueden generar afecciones al sistema inmunológico del paciente⁴⁴.

También se cuenta con otro tipo de analgésicos, además de los AINE's, que llevan a cabo su función a nivel del sistema nervioso central, suprimiendo la percepción del dolor incluso aunque el daño se encuentre presente. Este tipo de fármacos presentan mayor efectividad en el alivio del dolor, sin embargo, muchos de ellos pueden causar desbalances en el proceso de señalización neuronal e incluso cierto grado de dependencia, por lo que se recomienda usarlos cuando es muy necesario y sólo por períodos cortos de tiempo⁴⁴⁻⁴⁵.

1.3. EFECTOS ADVERSOS DE LOS AINE's.

Como ya se ha visto, los AINE's, debido a su efectividad y su menor riesgo (en comparación con otros tratamientos), siguen siendo el tratamiento de elección para las afecciones de dolor e inflamación. Sin embargo, los AINE's representan una terapia que aún está lejos de ser completamente segura, y aunque se ha estipulado que los riesgos son menores, éstos no dejan de ser severos (al menos en potencia)³⁴.

El principal daño asociado a los AINE's es de tipo gastrointestinal. Endoscópicamente, las lesiones producidas por los AINE's incluyen hemorragias

subepiteliales, erosiones, úlceras, e incluso perforaciones. La prevalencia descrita de la úlcera gastroduodenal, en usuarios crónicos de AINE's, varía de un estudio epidemiológico a otro, pero se ha establecido dentro de un intervalo que va del 14 al 31% y, entre los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de úlceras inducidas por AINE's se encuentran: la edad avanzada (> 60 años), las dosis elevadas de AINE's, los antecedentes de dispepsia, la úlcera o hemorragia digestiva, el uso de corticoides y la presencia de artritis reumatoide grave^{34, 46}.

Los AINE's interfieren además en muchos procesos asociados a la membrana celular como la activación de la fosfolipasa C en los neutrófilos, y la de NADPH oxidasa de los macrófagos. El ibuprofeno, la indometacina y los salicilatos inhiben algunas funciones de neutrófilos, como por ejemplo la agregación célula-célula. También se piensa que los AINE's pueden inhibir algunos procesos celulares por desacoplar las interacciones proteína-proteína dentro de la bicapa lipídica de la membrana celular, incluyendo los procesos regulados por proteínas G⁴⁷, pero dentro de todas sus acciones en el organismo, se considera que es la misma inhibición de las COX la que da lugar a los efectos adversos. En este sentido, dentro de la variedad de los AINE's, existe un intervalo de selectividad hacia la inhibición de la COX-1 o de la COX-2, del cual depende, en cierta medida, la generación de los efectos adversos (figura 2).

Los AINE's llamados tradicionales presentan una menor selectividad, esto es, inhiben, más o menos, de igual manera a ambas enzimas y, en algunos casos, presentan cierta selectividad hacia la COX-1. Por su parte, los AINE's conocidos como coxibs inhiben con mayor selectividad a la COX-2, aunque también hay algunos de éstos que son menos selectivos. La importancia de esta inhibición enzimática para la generación de riesgos a la salud estriba en la función de cada isoforma. La COX-1 es una ciclooxigenasa constitutiva que se encuentra principalmente en las células del estómago y en las plaquetas. En las plaquetas, como se mencionó brevemente, lleva a cabo la función de producir tromboxano A₂ (TxA₂), el cual es importante para el fenómeno de la agregación plaquetaria y la coagulación. En el estómago, se encarga de producir prostaglandinas de la serie E₂ (PGE₂), principalmente, las cuales propician una mayor irrigación sanguínea (por vasodilatación), así como citoprotección, ya que regulan la acidez del lumen

estomacal y favorecen la producción de moco y bicarbonato. Por su parte, la COX-2 es una ciclooxigenasa inducible, que se presenta en tejido vascular, entre otros, y que se produce frente a un daño o lesión. Esta isoforma da lugar a fenómenos inflamatorios que incluyen el reclutamiento e infiltración de leucocitos en la zona^{37, 48}. De manera muy general, la inhibición de la COX-1 traería como resultado una pérdida importante en la citoprotección de células gástricas, así como una disminución en la capacidad de coagulación, mientras que la inhibición de la COX-2 acarrearía un aumento en la respuesta inflamatoria, principalmente. Dicho de otra manera: la inhibición de la COX-1 da lugar a riesgos gastrointestinales, y la inhibición de la COX-2 da lugar a riesgos cardiovasculares^{22, 37, 48}.

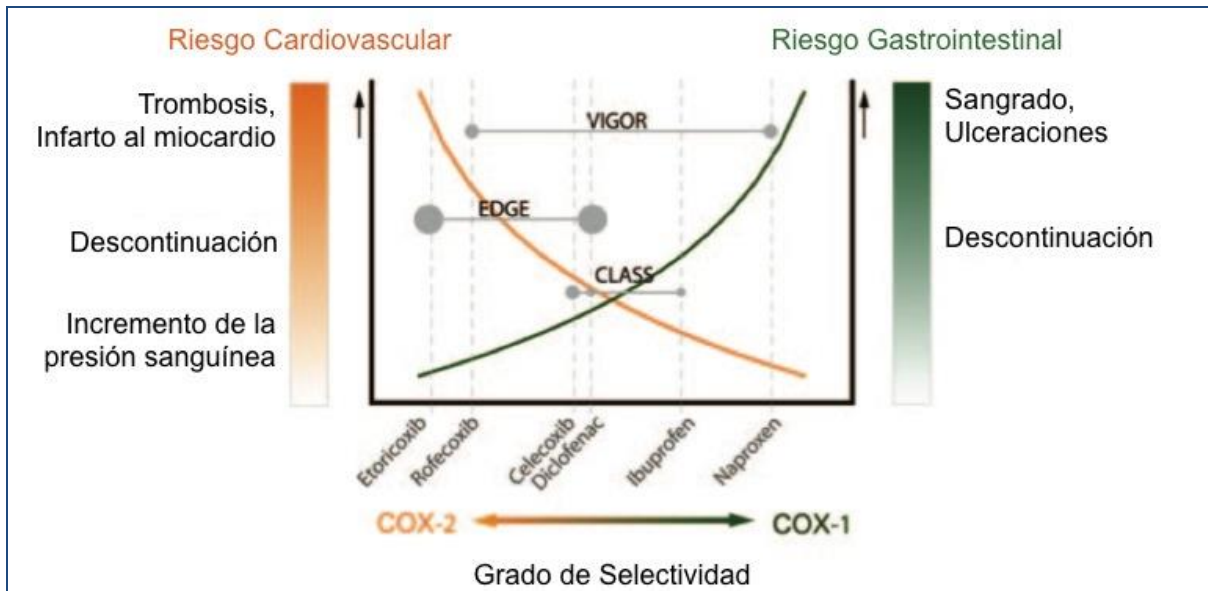


Figura 2. SELECTIVIDAD DE LOS AINE's.

Se observan los riesgos del uso de AINE's, dependiendo de su selectividad hacia la COX-1 o hacia la COX-2. VIGOR, EDGE y CLASS son estudios comparativos entre algunos AINE's, que aquí se muestran de manera representativa. Figura modificada de Antman *et al.* (2007)⁴⁹.

1.3.1. Riesgo cardiovascular.

Los coxibs, como ya se dijo, son inhibidores más o menos selectivos de la COX-2. Inicialmente se pensó que podrían resolver el problema del daño gastrointestinal que

generaban los AINE's tradicionales ya que al inhibir preferencialmente a la COX-2, no se perdían los efectos citoprotectores mencionados. Sin embargo, al ser estudiados sus efectos adversos, se encontró que presentaban otro tipo de riesgos, incluso más severos que el daño gastrointestinal, que como ya se mencionó, estriban principalmente en un aumento en las probabilidades de sufrir una trombosis y fallas cardiacas⁴².

La inhibición de la COX-2, es verdad que dio lugar a una terapia efectiva para aliviar dolor e inflamación, sin embargo, se presentaron efectos adversos a nivel cardiovascular, como son la trombosis vascular e incluso el infarto al miocardio. La razón por la cual se presentan este tipo de eventos es que la COX-2, produce, a nivel del endotelio vascular, prostaciclina (PGI₂), la cual mantiene la dilatación de los vasos, mientras que, como ya se dijo, en las plaquetas, la COX-1 produce TxA₂, que propicia la agregación plaquetaria. El funcionamiento de ambas enzimas da lugar a un balance que permite un flujo sanguíneo adecuado, pero al inhibir selectivamente a la COX-2, se pierde este balance a favor de la agregación plaquetaria y, aún más, se mantiene el reclutamiento e infiltración de leucocitos. Estos factores potencializan la formación de coágulos que derivan en la trombosis y, a su vez, puedan originar fallas en el sistema cardiovascular (infarto al miocardio). Por esta razón, se consideró que los coxibs representaban un mayor riesgo a la salud que los AINE's tradicionales, a pesar de que algunos dan lugar a daños gastrointestinales severos^{36, 39}.

1.3.2. Daño gastrointestinal.

Por otro lado, el daño gastrointestinal, del cual son responsables la mayoría de los AINE's tradicionales, es generado por la inhibición de la enzima COX-1, principalmente, aunque últimamente se ha estipulado que para que este daño se presente, es necesaria la inhibición de ambas COX²². Las acciones biológicas de las PG en el tracto digestivo son varias. Algunas como PGE₂ presentan efectos vasodilatadores, favoreciendo una mejor irrigación sanguínea al tejido gástrico, algunas otras tienen capacidad contráctil sobre la musculatura lisa, modulan la secreción mucosa epitelial y controlan la secreción ácida estimulada por histamina, al

bloquear directamente a los receptores ubicados en las células parietales. Al inhibir esta enzima, disminuye la producción de moco y de bicarbonato, además de perder elementos de regulación en la acidez gástrica. Esto conlleva a que se presente una mayor probabilidad de daño tisular por acción del ácido estomacal, que puede variar desde erosiones hasta ulceraciones y perforaciones. Además de este tipo de daño, se sabe que los AINE's ejercen un efecto tóxico directamente sobre las células del epitelio. Este daño se genera a nivel celular ya que, al ser la mayoría de los AINE's de tipo ácido, en el medio gástrico son capaces de difundir al interior de la célula, donde forman radicales que, como se había mencionado brevemente, pueden desacoplar la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, afectar las uniones proteína-proteína, y formar aductos en la membrana, entre otros, que dan como resultado la muerte de la célula. Al morir las células epiteliales, queda aún más desprotegido el tejido gástrico frente a la acción del medio ácido, propiciando así daños considerables^{35-36, 48, 50}.

A nivel intestinal, esta formación de aductos no se pierde sino que se mantiene puesto que diferentes AINE's, como la indometacina, sufren circulación enterohepática, esto es, son desechados por vía hepática, de tal suerte que ingresan al lumen intestinal y son capaces de dañar directamente a las células del epitelio. De manera similar, los daños a estas células, generan una pérdida de la integridad en la estructura celular del intestino, la cual deriva en lesiones que pueden ser tan severas como las perforaciones⁴⁸. Además, esta pérdida de la integridad en el epitelio entérico, propicia una mayor permeabilidad intestinal, la cual se encuentra ligada a una mayor probabilidad de invasión de microorganismos, generando infecciones y cambios en la microbiota. En un trabajo llevado a cabo por Schoultz *et al.* (2012), se observó que la administración de indometacina perturba la función mitocondrial de las células epiteliales y aumenta la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)⁵¹, y que este aumento es capaz de generar una mayor permeabilidad de bacterias⁵².

1.3.3. Terapias concomitantes.

Frente a la elección de los AINE's tradicionales o los coxibs, se ha manifestado una preferencia por los AINE's tradicionales, a pesar de sus riesgos, bajo el entendido de que el daño gastrointestinal representa, en sí mismo, una menor severidad que el daño cardiovascular potencial de los coxibs⁴⁰.

Ahora bien, dada la necesidad de reducir el daño gástrico generado por los AINE's, se han empleado terapias concomitantes, que han mostrado reducir dichos daños. Este tipo de terapias incluyen, principalmente, a inhibidores de la bomba de protones (IBP's), como el omeprazol, pantoprazol, esomeprazol, etc. y, en menor medida, a otros reguladores de la secreción ácido-gástrica, como son los antagonistas competitivos del receptor a histamina H₂ (ranitidina, famotidina, etc.), antagonistas competitivos del receptor muscarínico a acetilcolina M₃, y antagonistas competitivos del receptor a gastrina. La inhibición de estos receptores, así como de la bomba de protones, a nivel gástrico, trae como consecuencia una menor formación de ácido clorhídrico (HCl) en el lumen del estómago. Esta disminución de la acidez representa también una disminución en los daños tisulares que se han mencionado anteriormente y, por lo tanto, se logra aumentar la seguridad gástrica de los AINE's. Sin embargo, nuevamente se presenta una problemática importante al emplear estas terapias concomitantes en las terapias para el dolor y la inflamación. A saber, los IBP's, los cuales son los mayormente utilizados, actúan inhibiendo la bomba de protones de las células parietales del estómago. Esta inhibición ocurre mediante la formación de un enlace covalente entre el fármaco y la bomba de protones, por lo que existe una reducción en la cantidad de ésta, en la membrana celular. El tratamiento continuo y/o prolongado con estos fármacos da lugar entonces a una alteración de la acidez gástrica (la cual se reduce) y que puede derivar en hipoclorhidria. La falta de acidez en el lumen gástrico (hipoclorhidria) tiene consecuencias relevantes puesto que da lugar a indigestión pero incluso puede propiciar disbiosis. La disbiosis es un cambio en la microbiota del intestino, que puede alterar los patrones digestivos y en algunos casos también puede generar infecciones. Considerando que la acidez gástrica es una de las barreras primarias de defensa contra los microorganismos, no es ilógico pensar que al aumentar demasiado y/o por mucho tiempo el pH gástrico, se pierda una importante protección

frente a los microorganismos que, pueden acceder al organismo y propiciar desde cambios en la flora intestinal hasta patogenicidad^{53 54}.

Además de este primer problema, los IBP's han mostrado que no sólo no son capaces de proteger al intestino del daño causado por los AINE's, sino que por sí mismos, estos inhibidores alteran la microbiota y favorecen mayores daños a nivel entérico^{54 55 56}

1.4. ACEITE DE PESCADO.

1.4.1. Características.

El aceite de pescado (AP), es una mezcla de lípidos rica en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Ω -3 (Ω -3 PUFA's), cuyos principales componentes son el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5), cuyas estructuras químicas se pueden apreciar en el Anexo 1. Estos ácidos grasos se consideran esenciales ya que no se sintetizan en el organismo sino que deben consumirse para poder adquirirlos⁵⁷.

Al ser grasas insaturadas, comúnmente se encuentran en mayor concentración en peces y/o animales de aguas profundas o frías, como lo son la sardina, el salmón, el arenque, la foca, entre otros, formando parte de su estructura corporal, en diferentes cantidades y proporciones. En el ser humano, también se pueden encontrar formando parte de la membrana celular y además pueden ser metabolizados para dar lugar a productos y/o metabolitos y subproductos que tienen funciones dentro del organismo.

1.4.2. Ventajas y beneficios.

El interés por el AP y los Ω -3 PUFA's comenzó con las observaciones de Kromann y Green (1974), quienes dieron cuenta de que los esquimales presentaban una menor tasa de incidencia de eventos cardiovasculares. Estas observaciones llevaron al

estudio de la influencia que tenía la dieta de este grupo humano sobre la salud y, conforme los estudios se han incrementado, se ha visto que el AP presenta diferentes funciones y beneficios para el ser humano⁵⁸.

Entre algunos de los aspectos observados se encuentran la salud cardiovascular, debida en gran medida a la capacidad de los Ω -3 PUFA's para disminuir los niveles de triglicéridos en sangre, así como regular la cantidad de colesterol y las lipoproteínas de baja densidad (LDL's, por sus siglas en inglés). Incluso se ha mostrado que el AP es capaz de proteger el corazón por daño isquémico, así como de disminuir el riesgo de sufrir infarto⁵⁹. En la tabla 2 se muestra un resumen de los beneficios cardiovasculares que presenta el AP.

Tabla 2. ESTUDIOS QUE MUESTRAN LOS BENEFICIOS CARDIOVASCULAR DEL AP.

Autores	Tipo de estudio	Principales hallazgos
Bang <i>et al.</i>	Observacional	Baja tasa de muertes por EAC en esquimales de Groenlandia que consumen grandes cantidades de pescado.
Albert <i>et al.</i> (US Physicians Health Study)	Observacional	El consumo de pescado, al menos una vez por semana, disminuye el riesgo de MSC, en hombres.
Albert <i>et al.</i>	Epidemiológico	El aumento de Ω -3 PUFA's en sangre se asocia con la reducción del riesgo de muerte súbita en hombres, sin evidencia de enfermedad cardiovascular previa.
Lemaitre <i>et al.</i> (Cardiovascular Health Study)	Epidemiológico	El incremento en el consumo de Ω -3 PUFA's se asocia con la reducción del riesgo de isquemia cardíaca mortal en hombres mayores (≥ 65 años).
Streppel <i>et al.</i>	Epidemiológico	El consumo de pescados grasos se asocia con una disminución del riesgo de

		MSC. No hay relación clara entre la dosis de Ω -3 PUFA's y el riesgo de MSC.
Burr <i>et al.</i> (DART study)	Prueba clínica (después de IM, consumo en dieta)	El consumo moderado de pescados grasos (dos o tres porciones a la semana) reduce la mortalidad en hombres que se han recuperado de IM.
GISSI-Prevenzione Investigators	Prueba clínica (después de IM, con suplementos)	El tratamiento con Ω -3 PUFA's disminuyó el riesgo de enfermedad cardiovascular, en general, y de MSC.
Burr <i>et al.</i> (DART-2 study)	Prueba clínica (con EAC, dieta recomendada)	Los hombres a quienes se les recomendó la dieta de AP y más aún quienes se suplementaron con cápsulas, presentaron un incremento en el riesgo de muerte cardíaca, especialmente MSC.
Svensson <i>et al.</i>	Prueba clínica (prevención secundaria en hemodiálisis, con suplementos)	El tratamiento con Ω -3 PUFA's no redujo el total de eventos cardiovasculares y muerte en una población de alto riesgo, pero redujo sustancialmente el número de IM's como resultado secundario.
Yokoyama <i>et al.</i> (JELIS study)	Prueba clínica (prevención primaria, con suplementos)	El tratamiento con Ω -3 PUFA's no mostró beneficios en los eventos coronarios mayores en el grupo de prevención primaria, pero en el subgrupo de prevención secundaria mostró reducción de los eventos coronarios no-fatales.
GISSI-HF Investigators	Prueba clínica (falla cardíaca, con suplementos)	El tratamiento con Ω -3 PUFA's redujo la mortalidad por todas las causas pero no la MSC; se presume una reducción sustancial en la muerte por arritmias.
Bucher <i>et al.</i>	Metaanálisis	Dietary and non-dietary intake of n-3 PUFA reduces overall mortality, mortality

		due to MI, and SCD in patients with CHD
León <i>et al.</i>	Revisión sistemática	n-3 PUFA supplementation associated with reduction in deaths from cardiac causes but no effect on arrhythmias or all-cause mortality
Zhao <i>et al.</i>	Revisión sistemática	n-3 PUFA has a beneficial effect on prevention of SCD in patients with previous MI but not in patients who have angina

Modificado de Saravanan (2010)⁶⁰.

Por otra parte, el AP, principalmente por el componente de DHA, ha mostrado tener un importante papel en la salud y el desarrollo de la retina⁶¹ y del sistema nervioso central⁶², al grado de encontrarlo actualmente como un suplemento adicionado en alimentos infantiles. En estudios animales se ha demostrado que la reducción de DHA en el cerebro se encuentra asociada a deficiencias en la arborización neuronal, a patologías sinápticas como lo son las deficiencias de serotonina y de dopamina, a deficiencias neurocognitivas, y a un incremento de las conductas de ansiedad, agresión y depresión⁶². Así mismo, se ha visto que los Ω -3 PUFA's son capaces de activar diferentes receptores nucleares, que actúan como factores de transcripción de proteínas que modulan genes sensibles a los cambios de reducción-oxidación y genes relacionados con inflamación. Entre los principales se encuentran el receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR- α) y el receptor retinoide X. En el caso de PPAR- α , el resultado de esta acción da lugar a una prevención de la disfunción celular endotelial así como la prevención del remodelamiento vascular. Lo anterior ocurre mediante la inhibición de la producción de IL-1, de endotelina 1 y de ON inducible^{61, 63}.

Pero estos no son los únicos beneficios del AP o de sus componentes. Numerosos estudios dan cuenta del importante papel del AP en la protección gástrica, así como en sus efectos antiinflamatorios y antinociceptivos^{64 65 66}.

Los Ω -3 PUFA's modulan la producción de citocinas, la proliferación de linfocitos y la activación de macrófagos mediante la modulación, a su vez, del metabolismo del ácido araquidónico (AA, C20:4)⁶⁷. Los Ω -3 PUFA's son capaces de reemplazar al AA que se encuentra en los fosfolípidos de la membrana celular, por lo cual reducen la disponibilidad de AA para las COX, lo cual conlleva a la reducción en la producción de prostaglandinas (PG's) que se encuentran relacionadas con la cascada de inflamación, como lo son los eicosanoides de la serie 2. Más aún, los Ω -3 PUFA's pueden ser metabolizados directamente por las COX, lo cual da como resultado la producción de eicosanoides antiinflamatorios de la serie 3⁶⁷. Estudios que se han llevado a cabo en células, con EPA y con DHA, han mostrado que son capaces de inhibir la producción de COX-2 inducida por lipopolisacáridos, así como la reducción de citocinas proinflamatorias, incluyendo el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, e IL-12, en células endoteliales⁶⁸. Además de esto, estudios que se han llevado a cabo en animales, con el AP que, como ya se mencionó, tiene un importante contenido de EPA y DHA, han mostrado respaldar las observaciones in vitro acerca del decremento de citocinas proinflamatorias^{69,70,71}. Sin embargo, las prostaglandinas que se obtienen del AA se consideran de la serie 2 y tienen una actividad mayor, con respecto a las generadas por el metabolismo del DHA o del EPA. Esta mayor actividad da lugar a una mayor respuesta inflamatoria y, también, a un aumento en los eventos de dolor e inflamación. Por su parte, el DHA y el EPA, dan lugar a las prostaglandinas de la serie 3, las cuales se ha observado que no pierden su actividad pero que, en cuanto a sus efectos pro-inflamatorios, presentan una disminución importante⁷².

De manera puntual, se ha observado que el DHA y un concentrado de aceite de pescado tienen un significativo efecto analgésico, en diferentes modelos murinos de nocicepción^{64 65 66}. Así mismo, estudios epidemiológicos han mostrado que el AP es capaz de reducir la inflamación en pacientes con diferentes enfermedades crónicas, como artritis reumatoide y espondilitis anquilosante, además de que sus componentes principales son metabolizados para dar lugar a moléculas cuya función es propiciar la resolución de la inflamación^{73 11 21 32 33}. Finalmente, se ha visto que el AP es capaz de disminuir la presencia de ulceraciones gástricas cuando éstas se generan por la administración de algún AINE^{74 72 75 76}. De hecho, aunque a nivel

intestinal no se han llevado a cabo estudios, sí se ha observado que frente a la administración de indometacina, el AP es capaz de reducir significativamente las ulceraciones, de manera dosis dependiente⁷⁵ (tabla 3). Esto mismo se ha observado empleando otros AINE's como la aspirina⁷⁶, e incluso se ha visto que al emplear no el AP sino uno de sus componentes principales, el DHA, éste es capaz de reducir las lesiones gástricas causadas por la indometacina⁷².

TABLA 3. EFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LA ULCERACIÓN GÁSTRICA INDUCIDA POR INDOMETACINA.

Tratamiento	Dosis (oral, p.o)	Índice de ulceraciones	Inhibición (%) [⊙]
Indometacina sola	300 mg/kg	3.00 ± 0.25	-
AM+indometacina	10 mL/kg	2.88 ± 0.16	-
AP+indometacina	5 mL/kg	1.50 ± 0.34**	47.9
AP+indometacina	10 mL/kg	1.00 ± 0.36***	65.33

⊙ M ± SEM. a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z, AP = aceite de pescado.

Los valores indican la media ± SEM para un grupo de seis ratas. Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control de aceite de maíz (Mann-Whitneys's, prueba de U): ** P<0.02; *** P<0.001.

⊙ Para ratas tratadas, con respecto de las administradas con AM.

Modificado de Al Harbi *et al.* (1995)⁷⁵.

1.5. MÉTODOS DE EVALUACIÓN.

1.5.1. Plantar Test.

De manera general, los signos de dolor más confiables son los signos físicos. La investigación también se ha enfocado en varios indicadores bioquímicos (catecolaminas, corticoides, opioides, etc.), pero este tipo de indicadores carecen de especificidad. Esto mismo ocurre con otros parámetros, como los de tipo electrofisiológico (electroencefalogramas, potenciales evocados, etc.)⁷⁷. Actualmente, el estudio de las reacciones de comportamiento representa un buen indicador de la

percepción de una sensación desagradable, que resulta de un estímulo algogénico⁷⁸. Se debe enfatizar que estos signos son inequívocos y que cada especie expresa el dolor en una manera relacionada con su propio repertorio de comportamientos.

En las pruebas que involucran estímulos térmicos, siempre es la piel la que se estimula. Estas pruebas no involucran tejidos viscerales o músculo esqueléticos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el calor radiante también estimula a los termorreceptores, por lo que la aplicación de una rampa térmica da lugar a una organizada e inalterable secuencia de activación, primero los termorreceptores, luego los termorreceptores junto con los nociceptores y, después los nociceptores únicamente. La fuente de estimulación nociceptiva puede ser lejana o estar en contacto directo con la piel. Bajo condiciones normales, la temperatura de la piel resulta de un equilibrio entre el calentamiento debido a la cama de capilares arteriovenosos, y de la pérdida de calor por la superficie de la piel. El calor produce una interrupción local y transitoria de este equilibrio⁷⁹. Dado que lo que se busca es estimular los nociceptores, se requiere que existan las menores variaciones posibles en la temperatura de la piel⁸⁰, por lo que una rampa térmica no representa la mejor opción. Estas desventajas se pueden superar empleando una fuente de calor tipo láser. Este tipo de estimuladores tienen diferentes ventajas: 1) una longitud de onda que puede ser monocromática e infrarroja, que resulta en una casi total absorción, sin importar el color de la piel; 2) una baja penetración, por lo que la energía térmica absorbida en la piel se concentra en la región termosensible de las terminales nerviosas (cerca de los 60-120 μm debajo de la piel); 3) un rayo altamente controlable temporal y espacialmente; y 4) una rampa térmica de pendiente muy pronunciada, por lo que se alcanza la temperatura deseada en milisegundos. Todas estas ventajas, junto con el hecho de que no se requiere de contacto directo, asegura una selectiva y casi completamente sincronizada activación de las terminales de las fibras nerviosas⁷⁸.

Con la intención de estudiar el fenómeno de hiperalgesia, como resultado de la inflamación, Hargreaves *et al.* (1988)⁷⁹ dieron lugar a un modelo en el que la fuente de calor se aplica a una pata de la rata que a sido previamente inflamada mediante la inyección de carragenina. En este modelo, después de la inyección de carragenina

en la pata trasera de la rata, se le aplica el estímulo térmico y se registra el tiempo en que la rata responde al estímulo térmico, considerando que, en presencia de la hiperalgesia, el estímulo térmico generará el comportamiento doloroso en la rata, más rápidamente⁷⁸.

1.5.2. Prueba de edema inducido por carragenina en ratas.

La carragenina es un extracto mucopolisacárido descubierto en 1862 por el farmacéutico inglés Stanford. Este compuesto se emplea para inducir una respuesta inflamatoria aguda, no inmunomediada, altamente reproducible⁸¹. El modelo de edema inducido por carragenina se basa en la administración subcutánea de 100 μ L de carragenina, usualmente al 1%, a nivel de la aponeurosis plantar de la rata. La respuesta inflamatoria generada es determinada por un incremento en el tamaño de la pata (edema), el cual alcanza su máximo alrededor de las cinco horas, posteriormente a la administración de carragenina⁸¹. Para medir el edema se emplea el pletismómetro, que consta de una celda llena de líquido donde se introduce la pata de la rata para que un transductor determine el desplazamiento de líquido que genera. La diferencia en el desplazamiento del líquido con respecto al basal normal representa el curso de la inflamación.

Este modelo es útil para evaluar la contribución de los mediadores involucrados en cambios vasculares que ocurren en la inflamación aguda³¹. En ratas, es un evento bifásico en el que varios mediadores operan secuencialmente para producir la inflamación. La fase inicial del edema, desde la inyección de la carragenina hasta la primera hora, involucra la liberación de histamina, de 5-hidroxitriptamina (5-HT) y de bracinina; por su parte, la segunda fase, que va de la primera hora hasta las seis horas, se ha correlacionado con una elevada producción de PG's, infiltración de neutrófilos y su activación, con la consecuente liberación de mediadores, entre los que se encuentran radicales libres de oxígeno, como lo son el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-)³¹. Otro punto importante es que en este modelo se ha corroborado la existencia de una retroalimentación positiva, dependiente de prostanoïdes, que inducen una mayor cantidad de COX-2 a nivel de la epidermis⁸².

Por último, cabe destacar el papel del TNF- α en esta prueba, ya que es necesario para la migración de los neutrófilos después de la inyección de carragenina, y es fundamental en la formación del edema⁸³.

1.5.3. Evaluación de daños gastrointestinales.

Diferentes modelos animales se han empleado para la investigación de la patogénesis de las lesiones gastrointestinales, así como para evaluar el efecto de diferentes fármacos que se emplean para el tratamiento de estas lesiones. El daño al estómago es uno de los efectos adversos más importantes, asociado a los AINE's, como la indometacina, tanto en humanos como en animales, sin embargo, se sabe que los AINE's no sólo dañan esta parte del tracto gastrointestinal, sino también el intestino delgado, por lo que la evaluación de lesiones gástricas y entéricas son parámetros de importancia en este tipo de estudios⁸⁴.

Existen diferentes formas de evaluar el daño gastrointestinal, principalmente dependiendo de lo que se desea estudiar. Cuando lo que se busca es distinguir el tipo de daño que se ha generado, lo más recomendable es emplear técnicas a nivel tisular, que permitan conocer el grado de lesión que se presenta, como la inmunohistoquímica y la histopatología^{85,86}. Sin embargo, cuando lo que se desea evaluar es la extensión del daño, de una forma más generalizada, entonces se cuentan con técnicas macroscópicas, por demás sencillas. Usualmente, las diferentes partes del tracto gastrointestinal se “abren” para exponer la superficie interna, donde se encuentran las lesiones, y se lleva a cabo una medición del área lesionada (en mm²), la cual puede llevarse a cabo directamente con un instrumento de medición graduado a este nivel⁸⁷, o mediante el uso de un software computacional, que permite el cálculo del área lesionada mediante análisis fotográfico.

En el caso del análisis macroscópico directo, se ha observado en diferentes estudios^{88,75, 84, 87, 89} que ofrece buenos resultados para modelos animales (específicamente ratas, gatos y perros) y bajo diferentes tipos de inductores del

daño, principalmente para los daños producidos por etanol y AINE's, e incluso se ha establecido de manera protocolaria la medición directa⁸⁴.

2. JUSTIFICACIÓN

Las terapias actuales para el tratamiento del dolor y la inflamación representan, por sí mismas, un riesgo para la salud y, dada la importancia del dolor y la inflamación como impacto negativo en la calidad de vida, es necesario contar con alternativas que permitan aumentar la seguridad de este tipo de terapias, sin menguar la eficacia de las mismas.

Bajo esta consideración, el aceite de pescado ha mostrado tener características relevantes para el tratamiento del dolor y la inflamación, por lo que el estudio de sus efectos, al ser administrado de manera concomitante con la indometacina, como analgésico, como antiinflamatorio y como gastroenteroprotector, resultan de importancia en el desarrollo de nuevas estrategias seguras y eficaces.

3. HIPÓTESIS

El aceite de pescado tiene un efecto gastroenteroprotector y presenta sinergismo analgésico y antiinflamatorio con la indometacina.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Evaluar los efectos analgésico, antiinflamatorio y gastroenteroprotector del aceite de pescado, en las administraciones crónica y aguda de la indometacina

4.2. ESPECÍFICOS

a) Evaluar el efecto analgésico de la interacción indometacina-aceite de pescado, en el modelo térmico plantar.

b) Evaluar el efecto antiinflamatorio de la interacción indometacina-aceite de pescado, en el modelo de carragenina, en la pata de la rata.

c) Demostrar el efecto gastroprotector del aceite de pescado, administrado a largo plazo, en el daño generado por la administración crónica y aguda de indometacina.

d) Evaluar el efecto enteroprotector del aceite de pescado, administrado a largo plazo, en el daño generado por la administración crónica y aguda de indometacina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar, de 180-200 g de peso, provistas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco, bajo el protocolo No. 0107. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad ($21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 50%, respectivamente). El alimento (LABDIET® FORMULAB DIET) y el agua (Bonafont®) se administraron *ad libitum*.

5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Se empleó aceite de pescado (AP) de la marca Sigma® (Fish oil, from menhaden, No. Cat. F8020-1L) con contenido del 30% de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Ω -3 (Ω -3 LC-PUFA's, por sus siglas en inglés). Este aceite se empleó para la administración de animales experimentales, por vía oral.

El aceite de maíz se obtuvo de la marca comercial Golden Hills® (Lote 1211-7082), con contenido no específico de LC-PUFA's. Este aceite se empleó para la administración oral de animales control.

Para la imbibición requerida en las pruebas de inflamación (ver apartado de Diseño Experimental), se empleó la sustancia Ornano BBC 97 de la marca Ornano®

Además de estas sustancias, se prepararon soluciones para la administración de los animales, así como para la experimentación y evaluación de los diferentes parámetros del estudio:

- a) Bicarbonato de Sodio 5%: se pesaron 5 gr de H_3NaCO_2 (J.T. Baker®, No. de Cat. 3506-01) y se aforaron a 100 mL con agua HPLC (Burdick & Jackson®, No. de Cat. AH365-4). Esta solución se empleó como vehículo de la indometacina y para la administración, por vía oral, de los animales a los que no se les administró indometacina (como control).
- b) Carragenina 1%: se pesaron 0.5 g de carragenina (Sigma®, No. de Cat. 22048) y se aforaron a 50 mL con SSF; sin agitar, se refrigeró la mezcla a 4°C durante 12 horas. Esta solución se empleó para generar inflamación y/o dolor en la pata de las ratas.
- c) Indometacina: la indometacina se preparó en bicarbonato de sodio 5%. Se pesaron 2 gr de indometacina (Sigma®, No. de Cat. I-8280) por cada mL de bicarbonato. Esta solución fue de uso inmediato y la cantidad de solución se preparó de acuerdo al número de ratas que se administraron (vía oral) cada día, ajustando las dosis por rata (30 mg/ kg y/o 5 mg/ kg) a su equivalente en mL de solución.
- d) Solución Salina Fisiológica (SSF): se preparó con NaCl (J.T. Baker®, No. de Cat. 3624-01) al 0.9% en agua destilada. Esta solución se empleó para la administración oral de animales del grupo control.
- e) Solución para Pletismómetro (Cloruro de Sodio/Ornato): se pesaron 144 mg de NaCl (J.T. Baker®, No. de Cat. 3624-01) y se disolvieron en agua destilada, se agregó 1 mL de ornato y se aforó hasta 250 mL, con agua destilada. Esta solución se consideró en condiciones de uso durante una semana y se empleó para las mediciones de la inflamación.

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.3.1. Grupos y Controles

Dada la naturaleza lipídica del aceite de pescado (AP), se empleó una sustancia de naturaleza similar como control y, se eligió el aceite de maíz (AM), con base en

estudios previos por parte de otros grupos de trabajo^{75 90}. Sin embargo, con el fin de establecer que el aceite de maíz era un grupo control adecuado para este trabajo, se llevaron a cabo experimentos que permitieron corroborarlo, haciendo una comparación, en cada caso, con grupos que se administraron con solución salina fisiológica (SSF), como se muestra en la figura 5.

Una vez establecido el AM como control se consideró, para cada experimento, evaluar los efectos del AP en la administración concomitante con indometacina o con bicarbonato. De esta forma, cada experimento constó de 4 grupos de ratas: 1) AM y bicarbonato, 2) AM e indometacina, 3) AP y bicarbonato, y 4) AP e indometacina. Para formar los grupos, se consideró un tamaño de muestra de 6 ratas ($n = 6$) por cada grupo. Los animales obtenidos del UPEAL se repartieron aleatoriamente en los diferentes grupos, antes de ser marcados e iniciar las administraciones de AP.

5.3.2. Esquemas de Administración

El AP y el AM, según cada grupo de ratas, se administraron diariamente, durante 14 días, a una dosis de 0.5 mL/ 100 gr p.o., en todos los casos. La administración del AP y del AM se inició el mismo día que se obtuvieron los animales.

Se establecieron dos esquemas de administración de la indometacina o bicarbonato, con la finalidad de evaluar los efectos del AP frente a la exposición continua y frente a la exposición aguda de este AINE.

El primer esquema de administración fue de tipo agudo ya que se llevó a cabo dándole a las ratas una dosis alta y única de 30 mg/ kg p.o. En este caso, la dosis de indometacina o bicarbonato, se administró después de 14 días de administrar el AP o el AM (figura 3).

El segundo esquema fue de tipo crónico ya que se les administró a las ratas una dosis menor (5 mg/ kg p.o.) de indometacina o bicarbonato, pero diariamente durante los últimos cuatro días de administración del AP o AM (figura 3).

Las ratas se pusieron en ayuno de sólidos durante 16 horas, previas a las pruebas experimentales para evaluar el dolor y la inflamación.

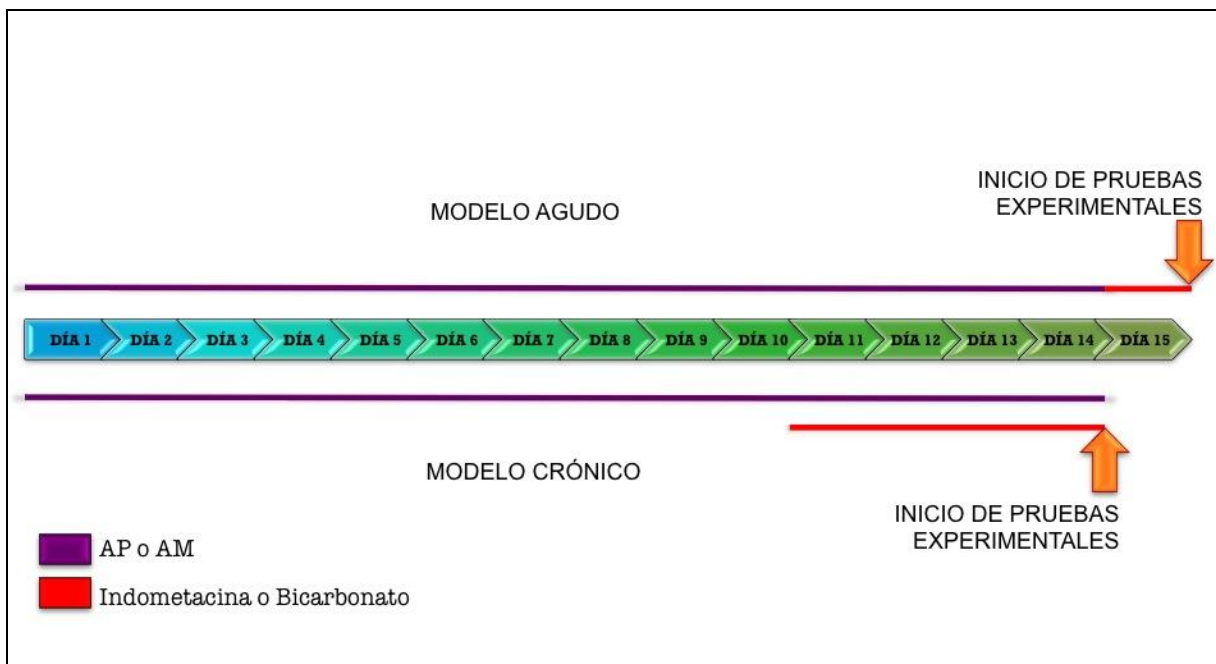


Figura 3. ESQUEMAS DE ADMINISTRACIÓN.

Se muestran los esquemas de administración agudo y crónico. El inicio de las pruebas experimentales marca el término de las diferentes administraciones.

5.3.3. Pruebas de dolor

La evaluación del efecto antinociceptivo o analgésico del AP se llevó a cabo mediante la prueba de *Plantar Test*. Para esta prueba se empleó el aparato Ugo Basile® modelo 7371, del cual se aprecia una representación de sus componentes principales en la figura 4. El aparato consta de una plataforma de material translúcido, sobre la cual se colocan los animales, dentro de cubículos individuales. Por debajo de esta plataforma se encuentra un generador de luz infrarroja (75 mW), el cual se puede manipular y mover a lo largo de toda la superficie. Finalmente, se cuenta con un registrador que cronometra el tiempo de exposición a la luz infrarroja. El haz de luz se apaga de forma automática al detectar movimiento, de tal suerte que

el registro de latencia (tiempo de exposición a la luz infrarroja) abarca desde que se hace incidir la luz hasta que se retira o se mueve la pata de la rata sobre la que se ha hecho incidir el haz infrarrojo⁷⁸.

Para llevar a cabo esta prueba, las ratas se colocaron en los cubículos durante 45 minutos o más, para su aclimatación. En seguida se llevó a cabo el registro de la latencia basal, haciendo incidir el haz infrarrojo en la pata trasera derecha de cada rata. Después de esta primera medición, a las ratas se les inyectaron, en la región plantar de esta misma pata, 100 µL de carragenina 1% y se llevó a cabo un nuevo registro de latencia (tiempo 0). Después de este registro, se tomaron latencias a los 30 min, 1 h, 2h, 3 h, 4 h y 5 h (tiempos 1 a 6, respectivamente).

Esta prueba fue aplicada de igual manera a todos los grupos de los dos esquemas de administración.

5.3.4. Pruebas de Inflamación

Para la evaluación del efecto antiinflamatorio del AP se empleó un pletismómetro Ugo Basile® modelo 7140, el cual se aprecia en la figura 4. El aparato consta de un soporte en el que se sostienen un contenedor de líquido (solución para pletismómetro) y dos contenedores cilíndricos pequeños también con esta solución, interconectados entre sí. En uno de estos cilindros se encuentra inmerso un sensor electrónico que detecta los cambios en la elevación del líquido y, en el otro, se lleva a cabo la inmersión de la pata trasera izquierda de las ratas. El sensor se encuentra acoplado a un registrador que especifica la magnitud del desplazamiento del líquido, debido a la inmersión de la pata de la rata⁹¹.

Para llevar a cabo esta prueba, se calibró el aparato empleando diferentes “pesas” y ajustando la magnitud del desplazamiento de acuerdo con las mismas. Una vez calibrado el aparato, se llevó a cabo una medición basal de cada rata. Después de esta primera medición se inyectaron, en la región dorsal de la pata trasera izquierda de cada rata, 100 µL de carragenina 1% y se llevó a cabo una nueva medición

(tiempo 0). A partir de este registro, se llevaron a cabo mediciones a los 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 7 h (tiempos 1-8, respectivamente).

Esta prueba fue aplicada de igual manera a todos los grupos de los dos esquemas de administración.

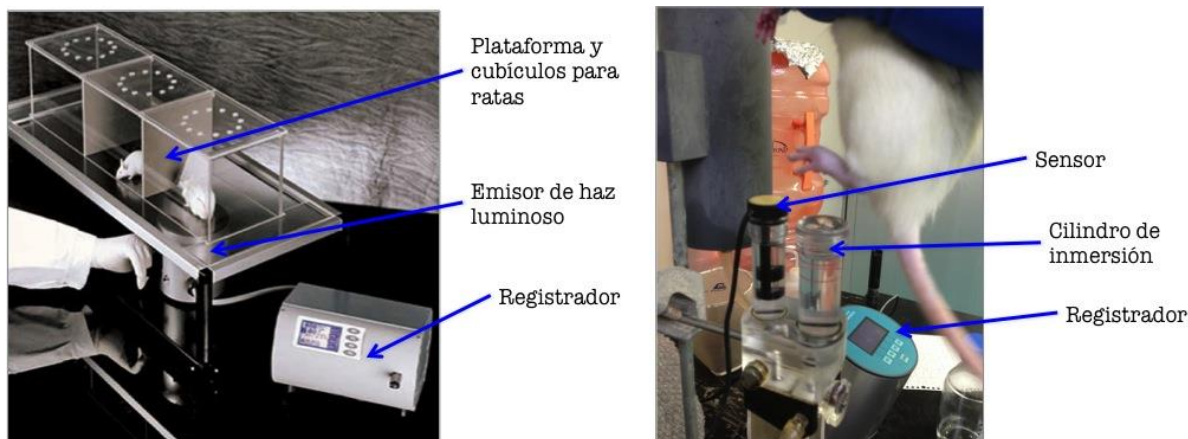


Figura 2. REPRESENTACIÓN DEL INSTRUMENTAL.

Se muestran, a grandes rasgos, los aparatos empleados para los experimentos de *Plantar Test* (izquierda) y para inflamación (Pletismómetro, imagen derecha).

5.3.5. Evaluación del Daño Gastrointestinal

Para la evaluación del efecto gastro y enteroprotector del AP, se llevó a cabo el recuento de lesiones gástricas e intestinales (en la región luminal) de manera visual y directa. Este registro se efectuó empleando una regla graduada (a nivel milimétrico) y determinando, cuidadosamente, el área de cada lesión presente.

Para el daño gástrico se consideró el total de mm² de lesiones presentes. En el caso del daño entérico, se consideró el porcentaje del área lesionada, esto se hizo a partir de la cantidad de mm² de lesiones con respecto al total de la superficie intestinal analizada.

La evaluación del daño gástrico se acopló a los experimentos de dolor, de tal suerte que, una vez terminada la prueba de *Plantar Test*, las ratas se sacrificaron en cámara de CO₂ y se les extrajo el estómago mediante cirugía. Cada estómago se

abrió empleando tijeras de cirugía estándar con puntas R/R, desde la región pilórica y por la curvatura mayor, hasta el cardias. Después de abrir los estómagos, se lavaron en agua corriente y se examinaron a la luz para determinar la cantidad de superficie lesionada, teniendo particular cuidado de revisar entre los pliegues y en las orillas (que corresponden a la curvatura mayor).

La evaluación del daño entérico se acopló a los experimentos de inflamación. En este caso, 24 horas después de haber administrado la indometacina, las ratas se sacrificaron en cámara de CO₂ y se les extrajo el intestino delgado mediante cirugía. El intestino delgado se dividió en 5 segmentos equivalentes en longitud y se tomó el cuarto segmento (correspondiente a las regiones del yeyuno e ileon) para abrirlo y exponer el lumen; esto se hizo con ayuda de tijeras de cirugía estándar con puntas R/R. Una vez expuesto el lumen intestinal, se llevó a cabo la medición del área total del segmento intestinal y en seguida se midió la cantidad de superficie lesionada (en mm²), con ayuda de una regla graduada (a nivel milimétrico).

5.3.6. Análisis estadístico

Los datos de latencia del *Plantar Test*, así como los datos de inflamación, dieron lugar a una curva temporal (por cada rata) a partir de la cual se determinó el área bajo la curva (AUC) por el método trapezoidal y, posteriormente, con estos datos se llevó a cabo la comparación entre los diferentes grupos tratados mediante un ANOVA de una vía ($p \leq 0.05$; I.C. del 95%) y Tukey.

Los datos de lesiones gástricas y entéricas se analizaron directamente por ANOVA de una vía ($p \leq 0.05$; I.C. del 95%) y Tukey (comparaciones múltiples).

Para el análisis estadístico se empleó el software GraphPad Prism® 6.0b (Trial) para Mac OS X, el cual no se encontraba limitado en ninguna de las funciones.

6. RESULTADOS

El aceite de maíz mostró ser un control adecuado ya que no mostró diferencias en sus efectos con respecto a la SSF (figuras 5 y 7), excepto en los casos de la inflamación y del daño entérico crónico (figuras 6 y 8). Por esta razón, para el análisis de resultados de la inflamación y del daño entérico, se tomaron en cuenta también los datos de la SSF.

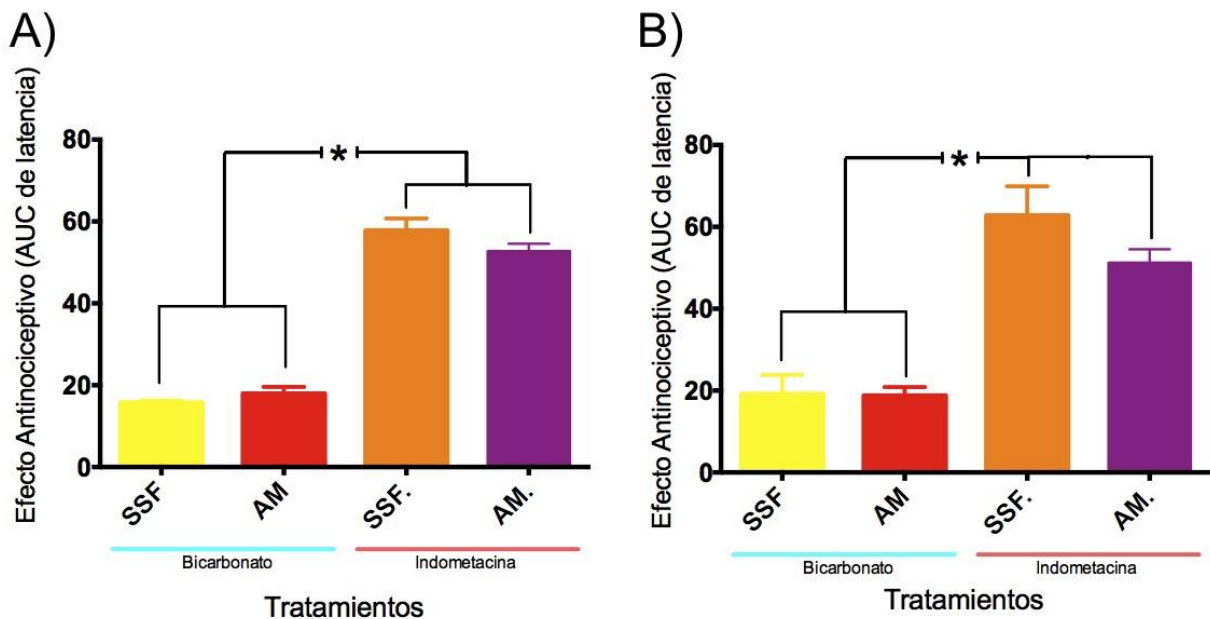


Figura 5. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR EL DOLOR.

Se comparó el aceite de maíz (AM) contra la solución salina fisiológica (SSF), respecto de sus efectos a nivel antinociceptivo, en ambos modelos de administración: (A) agudo y (B) crónico, en presencia de indometacina o de su vehículo. Los datos se analizaron mediante prueba de t ($p < 0.05$) y mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$, Tukey post hoc) para determinar las diferencias entre grupos. Las barras representan el valor de la media \pm SEM ($n=6$).

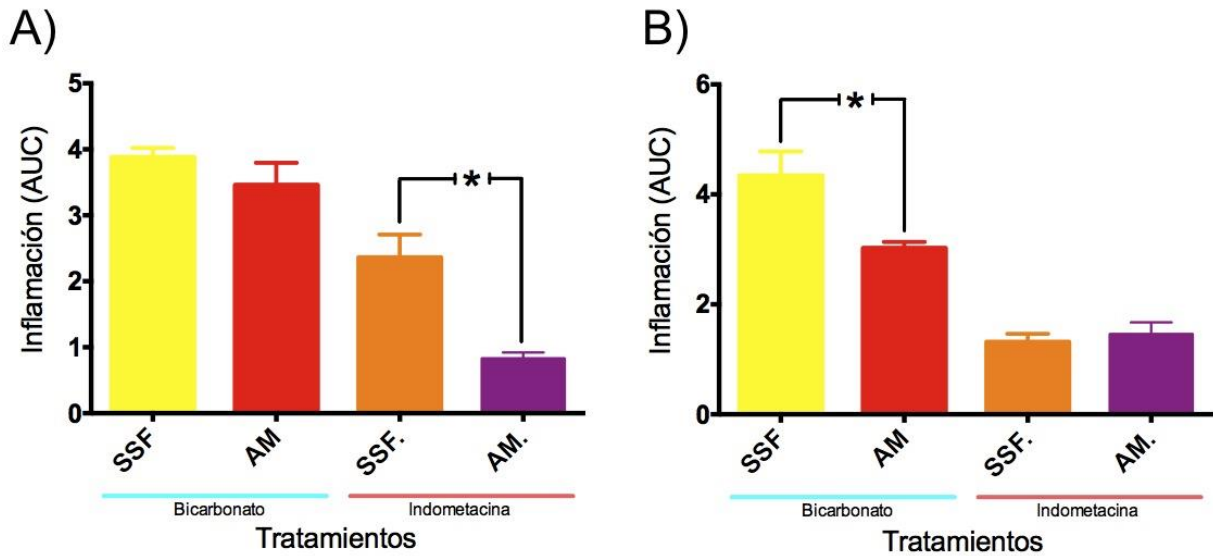


Figura 6. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR LA INFLAMACIÓN.

Se comparó el aceite de maíz (AM) contra la solución salina fisiológica (SSF), respecto de sus efectos a nivel antiinflamatorio, en ambos modelos de administración: (A) agudo y (B) crónico, en presencia de indometacina o de su vehículo. Los datos se analizaron mediante prueba de t ($p < 0.05$) y mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$, Tukey post hoc) para determinar las diferencias entre grupos. Las barras representan el valor de la media \pm SEM ($n=6$).

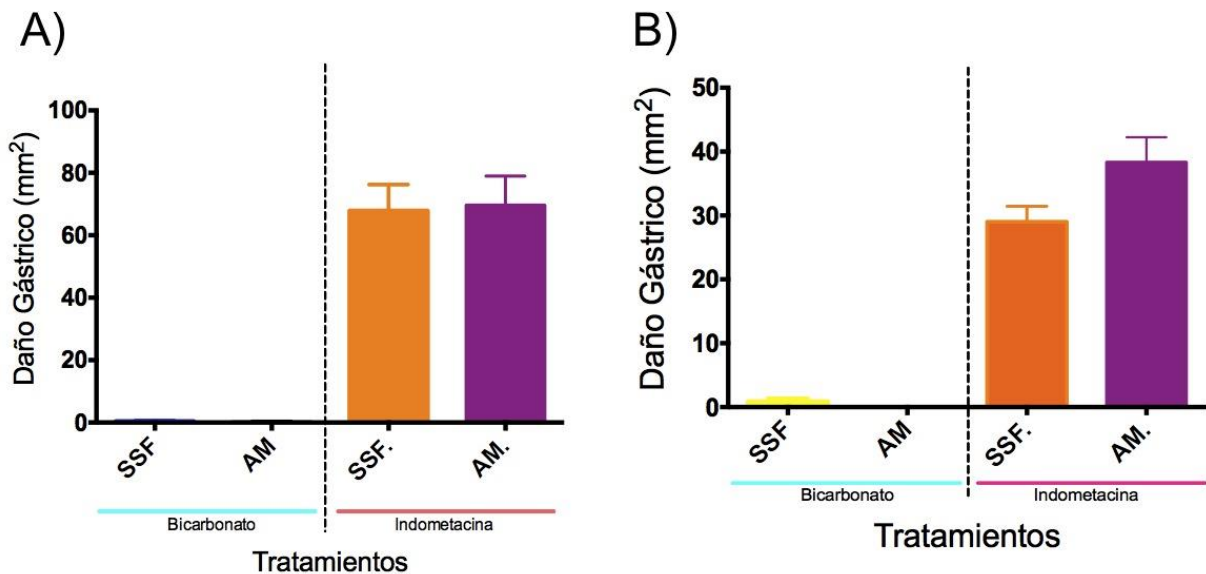


Figura 7. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR EL DAÑO GÁSTRICO.

Se comparó el aceite de maíz (AM) contra la solución salina fisiológica (SSF), respecto de sus efectos a nivel gastroprotector, en ambos modelos de administración: (A) agudo y (B) crónico, en presencia de indometacina o de su vehículo. Los datos se analizaron mediante prueba de t ($p < 0.05$; Tukey post

hoc) para determinar las diferencias entre grupos. Las barras representan el valor de la media \pm SEM (n=6).

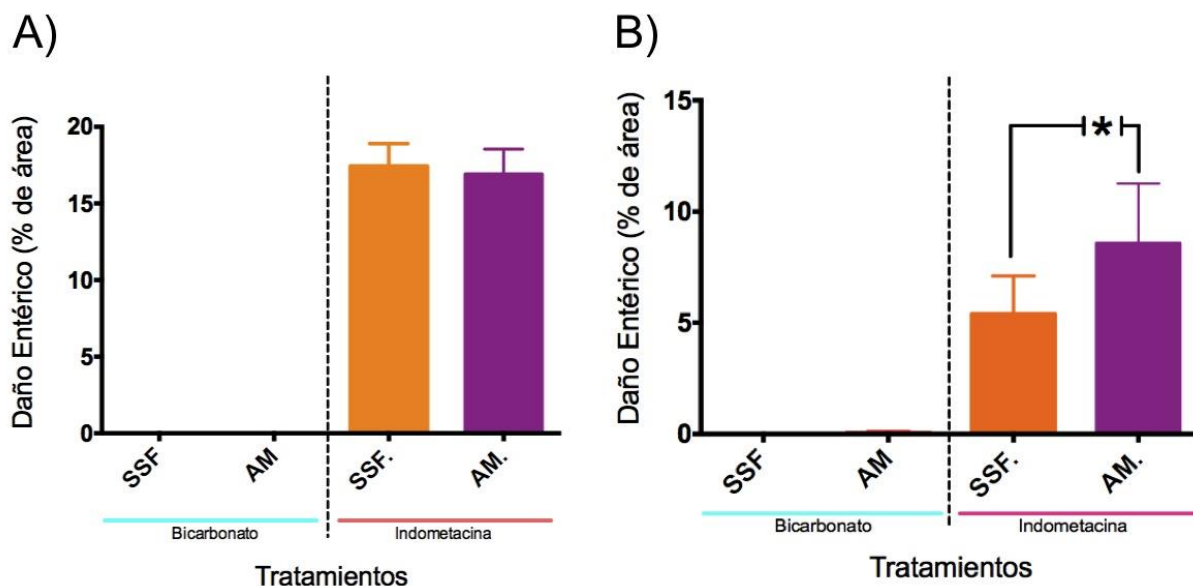


Figura 8. DETERMINACIÓN DEL GRUPO CONTROL PARA EVALUAR EL DAÑO ENTÉRICO.

Se comparó el aceite de maíz (AM) contra la solución salina fisiológica (SSF), respecto de sus efectos a nivel enteroprotector, en ambos modelos de administración: (A) agudo y (B) crónico, en presencia de indometacina o de su vehículo. Los datos se analizaron mediante prueba de t ($p < 0.05$; Tukey post hoc) para determinar las diferencias entre grupos. Las barras representan el valor de la media \pm SEM (n=6).

6.1. EFECTO ANALGÉSICO DEL ACEITE DE PESCADO

El AP no presentó interferencia con el efecto analgésico de la indometacina, sin embargo por sí mismo, no mostró tener efecto antinociceptivo, como se muestra en la figura 9. El efecto analgésico de la indometacina se mantiene, al administrar aceite de pescado (AP), tanto en el modelo agudo como en el crónico. El AP no presentó sinergismo al administrarse junto con indometacina, en ambos modelos de administración.

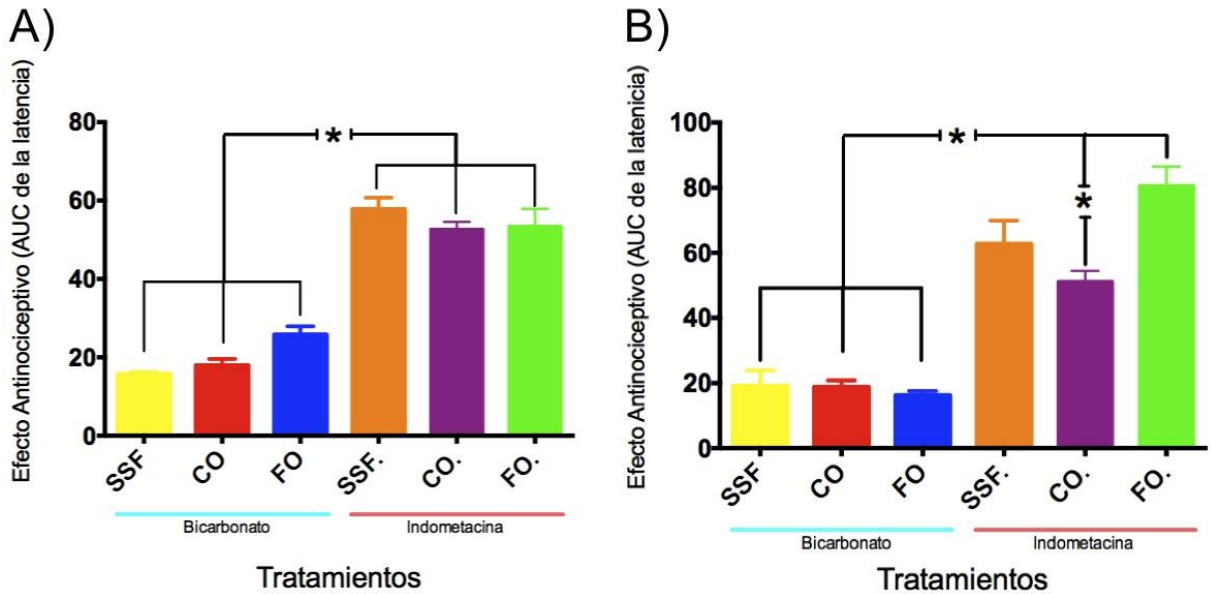


Figura 9. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL AP.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$, Tukey post hoc) para determinar las diferencias entre grupos (SSF. Solución salina fisiológica; AM, aceite de maíz y AP, aceite de pescado). Las barras representan el valor de la media \pm SEM ($n=6$).

6.2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ACEITE DE PESCADO

El AP mostró tener efecto antiinflamatorio al administrarse por vía oral. Este efecto antiinflamatorio, sin embargo, aunque se observa una tendencia, no presentó sinergismo significativo al administrarse de manera concomitante el AP con la indometacina (bajo los esquemas de administración agudo y crónico), tal como se muestra en la figura 10. Se observó, además, que el AM tiene un efecto antiinflamatorio significativo pero que, de manera individual, no es mayor al que presentó el AP.

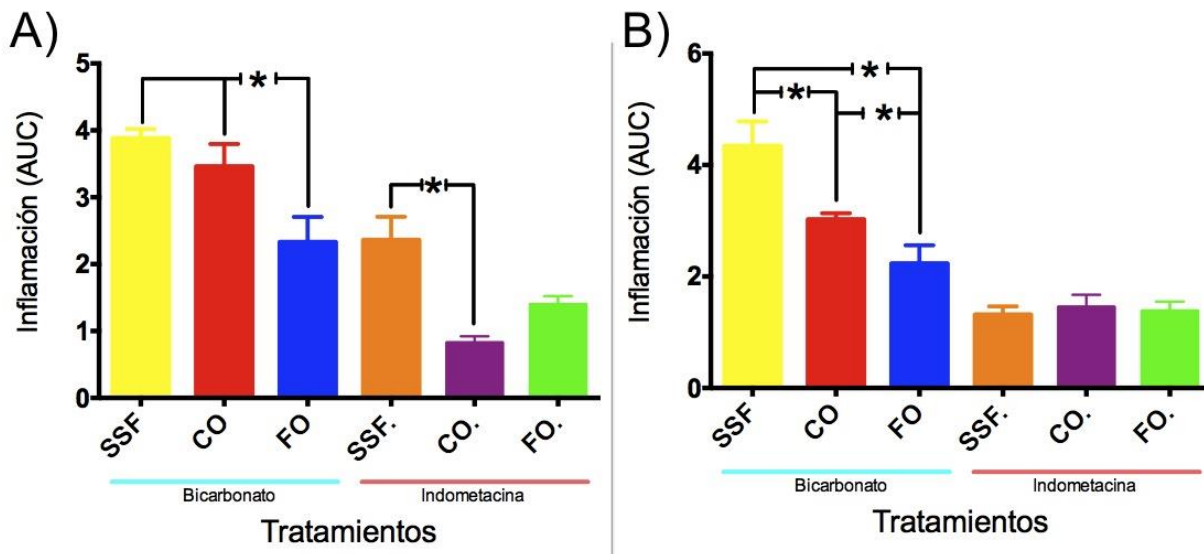


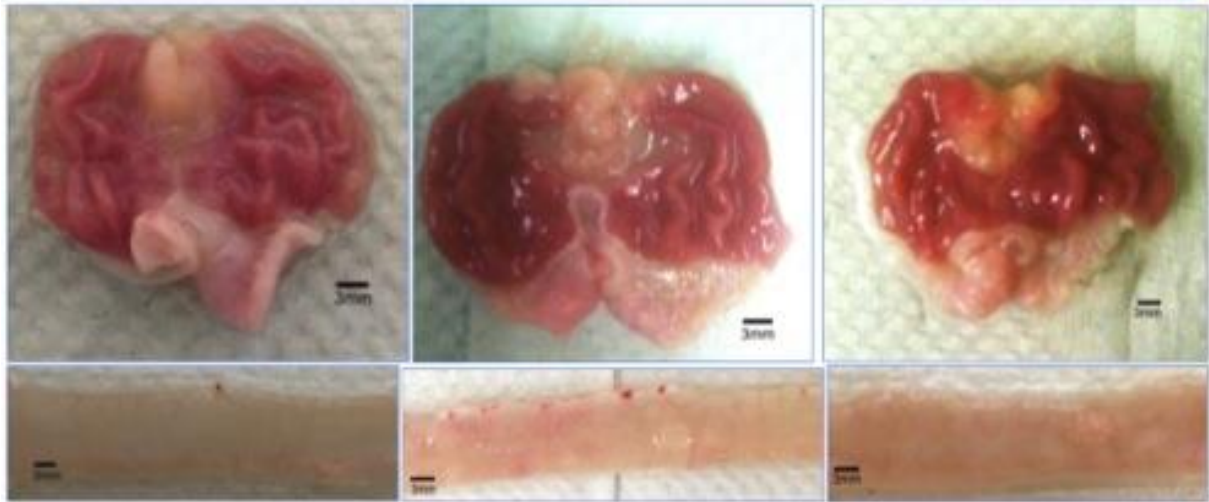
Figura 10. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL AP.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$, Tukey post hoc) para determinar las diferencias entre grupos (SSF, solución salina fisiológica; AM, aceite de maíz; AP, aceite de pescado). Las barras representan el valor de la media \pm SEM ($n=6$).

6.3. EFECTO GASTROENTEROPROTECTOR DEL ACEITE DE PESCADO

La cantidad de lesiones presentes en el estómago se logró reducir cerca del 50%, con respecto a los estómagos que no fueron administrados con AP sino con AM o con SSF, como se aprecia en las figuras 11 y 12. Se observó el daño (macroscópico) generado por la indometacina, administrada bajo los esquemas agudo (30 mg/ kg p.o., vía oral, dosis única), y crónico (5 mg/ kg p.o., vía oral, durante 4 días), a los niveles gástrico y entérico. Los animales a los que se les administró el AP presentaron menor cantidad de lesiones con respecto a los animales administrados con solución la salina fisiológica (SSF) y con el aceite de maíz (AM). Nótese la pérdida de pliegues en el estómago de los animales tratados con SSF y AM. Al analizar los datos, se observó que el AP tiene efectos gastroprotector y enteroprotector significativos, frente a la administración de indometacina, bajo los esquemas agudo y crónico (figuras 13 y 14).

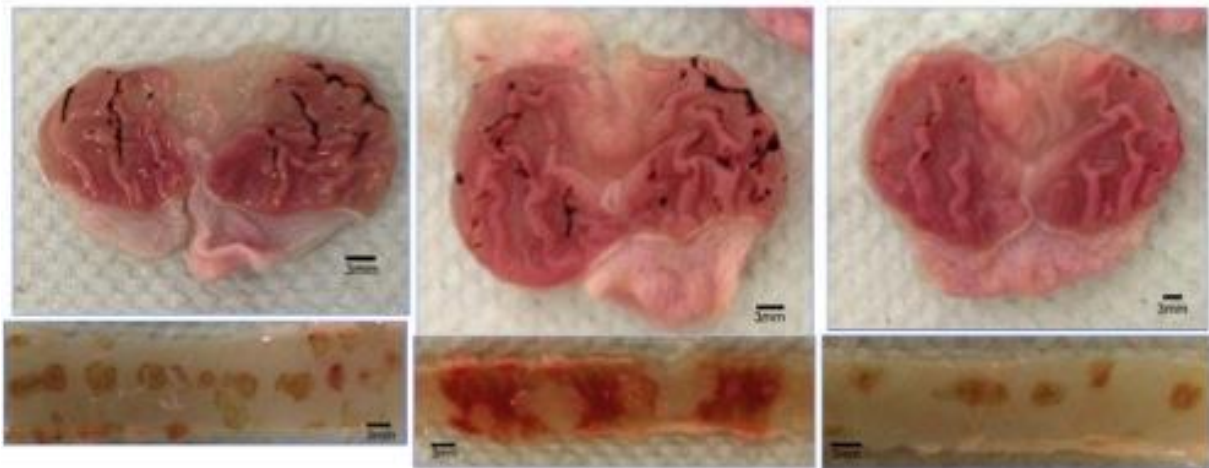
BICARBONATO



SSF

AM

AP



INDOMETACINA

Figura 11. DAÑO GASTROINTESTINAL AGUDO Y PROTECCIÓN POR EL AP.

Se muestran imágenes representativas del daño gastrointestinal agudo al administrar solución salina fisiológica (SSF), aceite de maíz (AM), y la protección del aceite de pescado (AP).

BICARBONATO



SSF

AM

AP



INDOMETACINA

Figura 12. DAÑO GASTROINTESTINAL CRÓNICO Y PROTECCIÓN POR EL AP.

Se muestran imágenes representativas del daño gastrointestinal crónico al administrar solución salina fisiológica (SSF), aceite de maíz (AM), y la protección del aceite de pescado (AP).

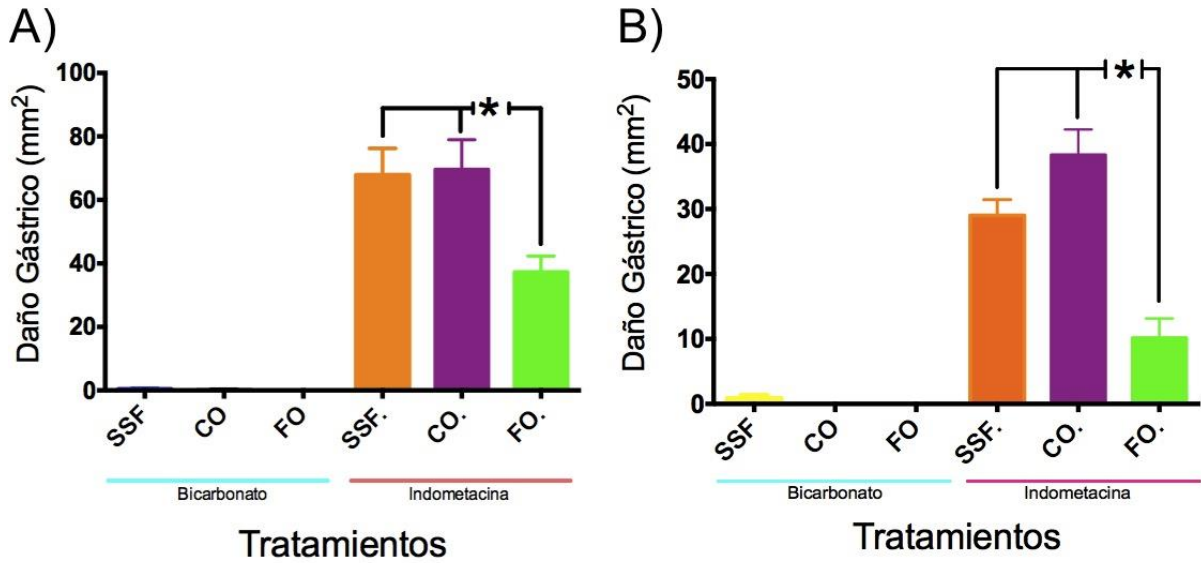


Figura 13. EFECTO GASTROPROTECTOR DEL AP.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y Tukey (post hoc) para determinar las diferencias entre grupos (SSF, solución salina fisiológica; AM, aceite de maíz; AP, aceite de pescado). Las barras representan el valor de la media \pm SEM ($n=6$).

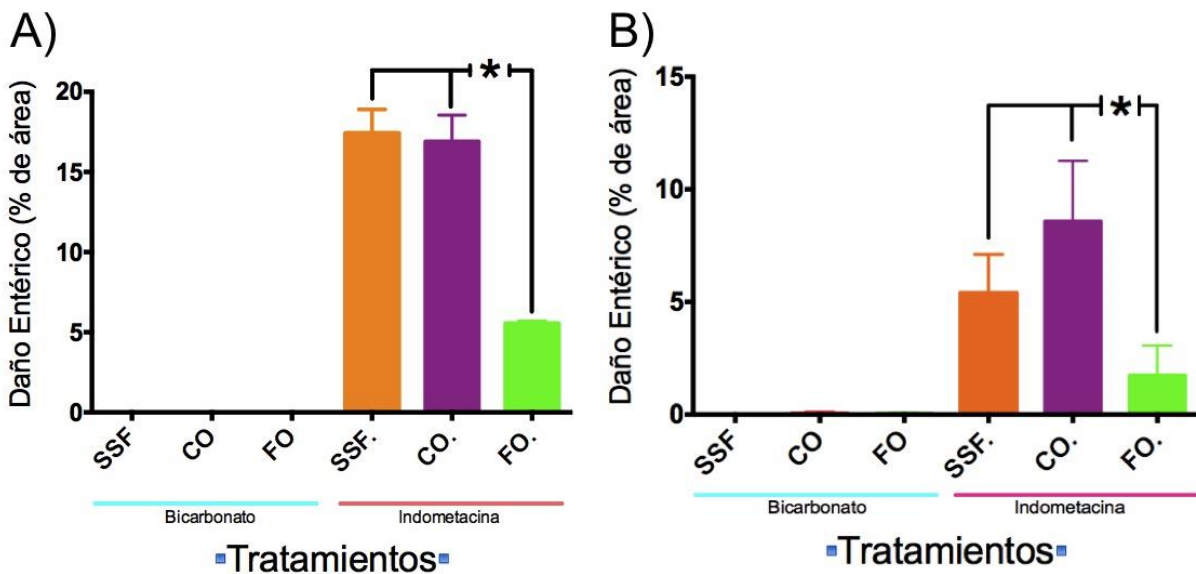


Figura 14. EFECTO ENTEROPROTECTOR DEL AP.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y Tukey (post hoc) para determinar las diferencias entre grupos (SSF, solución salina fisiológica; AM, aceite de maíz; AP, aceite de pescado). Las barras representan el valor de la media \pm SEM ($n=6$).

7. DISCUSIÓN

El aceite de maíz ha sido empleado como un grupo control para la evaluación de lesiones gastrointestinales por otros grupos de trabajo⁷⁵. En nuestro caso, al evaluar al AM con respecto de la SSF, se encontró que en la mayoría de los casos no presenta efectos sobre los parámetros que se emplearon en la caracterización de los efectos analgésico, antiinflamatorio y gastroenteroprotector del AP, sin embargo, esto no se cumplió en el caso del daño entérico por administración crónica de indometacina, así como para el caso de la inflamación. Esto puede deberse a la variación que existe en los individuos que conformaron cada grupo experimental puesto que las diferencias entre el AM y la SSF no se presentaron de manera consistente en todos los parámetros, ni en ambos modelos de administración, así como tampoco en todos los grupos administrados con AM, por cada parámetro evaluado. De manera detallada, el AM presentó un mayor daño entérico, bajo el esquema crónico, al administrarlo junto con la indometacina, por lo que las diferencias entre el AM y el AP se observan también mayores, sin embargo, la protección del AP se aprecia de manera significativa con respecto de la SSF también. Más aún, en el caso de la inflamación, se observa una tendencia a disminuir ésta, al administrar AM, lo cual puede deberse, en este caso, no sólo a la variación sino al contenido variable de lípidos poliinsaturados que contiene el AM; incluso se ha observado que diferentes aceites vegetales presentan un sinergismo aparente con la indometacina, en la reducción de la inflamación⁹². En cualquier caso, la importancia de estas comparaciones da cuenta del hecho de que no es la mera naturaleza lipídica del AP la que presenta los efectos observados sino que éstos son atribuibles a los lípidos específicos que conforman al AP y que, como ya se mencionó, un importante porcentaje de dichos lípidos corresponde a EPA y DHA. Aunque no se observó un efecto analgésico por parte del AP, se observó que la administración concomitante de éste con la indometacina no afecta la eficacia de dicho AINE. Esto representa una ventaja puesto que el AP se mantiene como una alternativa en el tratamiento del dolor y la inflamación dados sus efectos gastro y enteroprotectores y considerando que, como se dijo anteriormente en este trabajo, la

terapia contra el dolor y la inflamación requiere de una mayor seguridad sin por ello generar un detrimento en la eficacia. De esta manera, el AP mostró que si bien no genera una aportación significativa para el alivio del dolor, permite actuar a la indometacina sin disminuir su efectividad.

Cabe mencionar que estos resultados parecieran contradecir a los resultados obtenidos por Nakamoto *et al.*^{65 66}, con respecto a la presencia de un efecto analgésico. Sin embargo, existen algunas consideraciones relevantes que pueden dar lugar a esta discrepancia. Existen estudios en perros donde tampoco se observó un efecto antinociceptivo por parte del AP⁹³ pero se observó que, de manera global, mejoraba la calidad de algunos parámetros de salud. Considerando además, que el grupo de trabajo de Nakamoto estudió el efecto antinociceptivo de sólo uno de los componentes del AP, el DHA, esto indicaría que el DHA es en gran medida el responsable de dicho efecto analgésico y que la cantidad con la que se cuenta de este compuesto en el AP no es suficiente para alcanzar a observar dicho efecto, por la administración de AP. Esto parece concordar con los resultados expuestos por Veigas y Fernandes (2011), pues al administrar no AP sino un concentrado del mismo, se logró obtener un efecto analgésico significativo⁶⁴. Lo anterior explicaría, al menos en parte, que el AP por sí mismo no presente un efecto analgésico significativo y que, para obtener dicho efecto, se requieran dosis mayores de AP o simplemente una mayor concentración de DHA en la mezcla lipídica o bien un tiempo de administración mayor.

Por otra parte, la presencia de un efecto antiinflamatorio significativo por parte del AP, concuerda con las observaciones previas en las que se ha visto que el consumo de PUFA's omega-3 es capaz de disminuir la inflamación en pacientes con diferentes afecciones de salud, como la artritis reumatoide^{60 94}. En nuestro caso, se vio que la disminución de la inflamación ocurría tiempo después de haber generado la respuesta inflamatoria con la carragenina, lo cual indica que el efecto antiinflamatorio del AP está mediado probablemente por derivados del EPA y del DHA y que la generación de estos derivados requiere tiempo debido a la necesidad de un metabolismo ulterior. Estas observaciones parecen estar en concordancia con el hecho de que a partir del EPA y del DHA se generan resolvinas^{21 11}, las cuales se ha

visto que favorecen la terminación del proceso inflamatorio. Así mismo, cabe mencionar que la indometacina presenta un efecto más rápido puesto que no requiere de un proceso metabólico prolongado y que es administrada en un tiempo suficiente, antes de la generación de la inflamación. Este mismo efecto de la indometacina, el cual se presenta rápidamente y eficazmente, puede estar enmascarando el efecto del AP, por lo que al administrarlos de manera concomitante no se observa un sinergismo aparente entre ellos. Por otro lado, la inhibición de las COX y las lipooxigenasas⁹⁵ por parte de la indometacina, es probablemente una limitante para el metabolismo necesario del DHA y del EPA hacia la producción de resolvinas, y debido a esta razón es que se alcance a apreciar un efecto antiinflamatorio del AP sólo en ausencia de la indometacina.

En cuanto a la gastroprotección, el AP mostró que es capaz de reducir el daño gástrico por la indometacina (administrada bajo un esquema agudo o crónico) hasta aproximadamente un 50%. Si consideramos que las dosis del esquema agudo son relativamente elevadas con respecto a lo que se estipula para un paciente, se podría aseverar que el daño inicial por indometacina deberá ser menor y que, en conjunto con el AP, se podría obtener una mayor protección gástrica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por diversos grupos de trabajo^{72, 75-76}, los cuales ya han mostrado que el AP tiene la facultad de disminuir las ulceraciones a nivel de estómago. Pero, aunque esta ventaja ya ha sido demostrada y por demás es una ventaja que comparte con las terapias concomitantes actuales (dígase IBP's), existe aún otro beneficio del AP que ratifica su importancia al considerar el desarrollo de terapias alternativas. Este beneficio es que también ofrece una enteroprotección significativa frente a las administraciones aguda y crónica de la indometacina. En estudios recientes se ha propuesto que la activación de los neutrófilos es un evento importante que precede al daño generado por la indometacina⁹⁶. Fukumoto *et al.* demostraron que la acumulación de neutrófilos en el tejido, medido por la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y por la expresión de mRNA del quimioatrayente de keratinocitos (KC), involucrado en la quimiotaxis y en la activación de neutrófilos, incrementó significativamente en el intestino de animales tratados con indometacina.

Más aún, en animales tratados con indometacina pero deficientes de TNF- α se observó que los niveles de MPO y de mRNA de KC se encontraban reducidos, con respecto de animales silvestres, indicando que la deficiencia de TNF- α juega un papel protector frente al daño intestinal⁹⁷. Considerando que el AP es capaz de modular la producción de citocinas proinflamatorias, de tal forma que disminuye la cantidad de infiltración de leucocitos⁷², es probable que la protección entérica que se obtuvo en este estudio se deba, al menos en parte, a que la acumulación de neutrófilos se ve disminuida al administrar AP y que, esto implica una menor producción de ROS en las zonas afectadas por la indometacina, lo cual es importante pues, como Schoultz *et al.* mostraron anteriormente, parte del daño entérico generado por la indometacina se encuentra mediado por la formación de ROS⁵². La ventaja sobre otras terapias está en el hecho de que los IBP's no sólo no presentan la disminución de los daños a este nivel sino que incluso pueden por si mismos dar lugar a patologías importantes, como hipoclorhidria y disbiosis que, a la larga generan complicaciones en el tracto intestinal y que, lejos de representar un beneficio, representan un aumento en el daño, impactando en la calidad de vida del paciente que hace uso de estas terapias⁵⁵. Estas observaciones con respecto a la enteroprotección que genera el AP frente a la administración de indometacina, se suman a otros beneficios a nivel intestinal que también son importantes y que dan al AP renovada relevancia para considerarlo una opción en el tratamiento concomitante del dolor y de la inflamación. A saber, permite mantener una microbiota saludable e incluso una recuperación de la misma después de haber sufrido alteraciones^{98 99}, como las que incluso llega a provocar la indometacina.

Esta nueva ventaja que ha demostrado tener el AP frente al daño generado por la administración de la indometacina, se suman a diversos beneficios anteriormente probados y demostrados por diferentes grupos de trabajo, y realzan la importancia de considerar al AP como una alternativa viable para su uso terapéutico. Aquí se puntualiza la relevancia del AP como gastroenteroprotector y se postula que su uso concomitante con AINE's podría beneficiar a los pacientes que requieren y/o se encuentran bajo la terapia para el dolor y la inflamación. Bajo esta consideración,

resulta deseable llevar a cabo investigaciones subsecuentes que permitan evaluar los efectos del AP frente a otros AINE's, así como investigar su uso terapéutico en humanos afectados por el dolor y/o la inflamación.

8. CONCLUSIONES

1. La administración del AP no presenta interferencia en el efecto analgésico de la indometacina.
2. El AP mostró tener efecto antiinflamatorio después de algunas horas de haber inducido la inflamación, sin embargo, la administración concomitante de AP e indometacina no presentó un efecto sinérgico significativo.
3. La administración del AP genera protección gástrica y entérica, frente a la administración de indometacina (bajo los esquemas agudo y crónico).
4. El AP mostró ser una alternativa viable para ser investigada como parte de la terapia para el dolor y la inflamación.

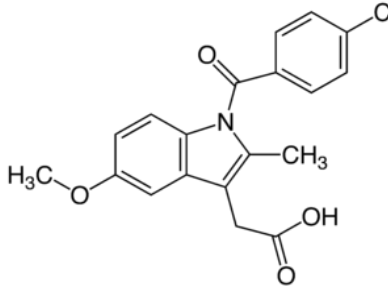
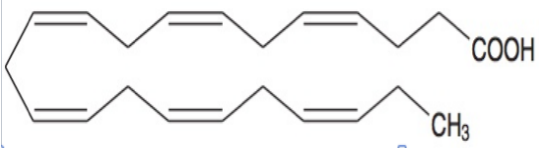
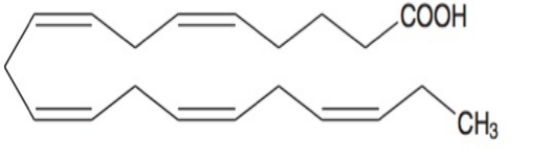
9. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar las lesiones gastroentéricas con ayuda de un software y llevar a cabo histologías que permitan determinar, de manera más precisa y específica, los daños gástrico y entérico generados.
2. Probar la efectividad del AP frente a otros AINE's.
3. Continuar con las pruebas de la administración del AP, a nivel clínico.

9. ANEXOS

ANEXO 1

En la siguiente tabla se muestran las estructuras químicas de la indometacina, el DHA y el EPA.

Molécula	Nombre	Estructura
Indometacina	2-[1-(4-clorobenzoil)- 5-metoxi-2-metilindol-3-il]ácido acético	
DHA	Ácido Docosahexaenóico (C22:6)	
EPA	Ácido Eicosapentaenóico (C20:5)	

10. REFERENCIAS

1. Woolf, C. J., Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* **2004**, *140* (6), 441-451.
2. Ito, S.; Okuda-Ashitaka, E.; Minami, T., Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neuroscience research* **2001**, *41* (4), 299-332.
3. Loeser, J. D.; Melzack, R., Pain: an overview. *Lancet* **1999**, *353* (9164), 1607-1609.
4. Woolf, C. J.; Bennett, G. J.; Doherty, M.; Dubner, R.; Kidd, B.; Koltzenburg, M.; Lipton, R.; Loeser, J. D.; Payne, R.; Torebjork, E., Towards a mechanism-based classification of pain? *Pain* **1998**, *77* (3), 227-9.
5. Fein, A., Nociceptors and the perception of pain. University of Connecticut Health Center: Farmington, Connecticut, 2012.
6. Lee, Y.; Lee, C. H.; Oh, U., Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells* **2005**, *20* (3), 315-324.
7. Rang, D. M., Ritter JM, Moore PK, *Farmacología*. 5 ed.; Elsevier: Madrid, España, 2004.
8. Dolin, S., Padfield, N., *Pain Medicine Manual*. 2 ed.; Elsevier: USA, 2004.
9. Millan, M. J., The induction of pain: An integrative review. *Prog Neurobiol* **1999**, *57* (1), 1-164.
10. Breivik, H.; Collett, B.; Ventafridda, V.; Cohen, R.; Gallacher, D., Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* **2006**, *10* (4), 287-333.
11. El Kebir, D.; Gjorstrup, P.; Filep, J. G., Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *P Natl Acad Sci USA* **2012**, *109* (37), 14983-14988.
12. Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454* (7203), 428-435.
13. Gil, A., Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2002**, *56* (8), 388-96.
14. Kumar, A. A., Fausto N, Mitchell R, *Robbins Basic Pathology*. 8 ed.; Saunders: USA, 2007.
15. Lentsch, A., Ward, PA., The NFkappaB/IkappaB system in acute inflammation. *Arch Immunol Ther Exp* **2000**, *48*, 59-63.
16. Luster, A. D.; Alon, R.; von Andrian, U. H., Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology* **2005**, *6* (12), 1182-90.
17. Jaeschke, S. C., Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of leukocyte biology* **1997**, *61*, 647-53.
18. Cook-Mills, J. M.; Deem, T. L., Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of leukocyte biology* **2005**, *77* (4), 487-95.
19. Cotran, R. S.; Mayadas-Norton, T., Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathologie-biologie* **1998**, *46* (3), 164-70.

20. Funk, C. D., Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **2001**, *294* (5548), 1871-5.
21. Serhan, C. N.; Clish, C. B.; Brannon, J.; Colgan, S. P.; Chiang, N.; Gronert, K., Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* **2000**, *192* (8), 1197-1204.
22. Wallace, J. L.; Devchand, P. R., Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Brit J Pharmacol* **2005**, *145* (3), 275-282.
23. Vane, J. R.; Botting, R. M., Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American journal of medicine* **1998**, *104* (3A), 2S-8S; discussion 21S-22S.
24. Katori, M. M., Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* **2000**, *49*, 367-92.
25. Langenbach, R., Morham, R., Tiano, HF., Loftin, CD., Ghanayem, BI., Chulada, PC., Mahler, JF., Lee, CA., Goulding, EH., Kluckman, KD., Kim, HS., Smithies, O., Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* **1995**, *83*, 483-92.
26. Morham, S. G.; Langenbach, R.; Loftin, C. D.; Tiano, H. F.; Vouloumanos, N.; Jennette, J. C.; Mahler, J. F.; Kluckman, K. D.; Ledford, A.; Lee, C. A.; Smithies, O., Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* **1995**, *83* (3), 473-82.
27. Serhan, C. N.; Savill, J., Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **2005**, *6* (12), 1191-7.
28. Ford-Hutchinson, A. W., Leukotriene B4 in inflammation. *Critical reviews in immunology* **1990**, *10* (1), 1-12.
29. Parkinson, J. F., Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflammation & allergy drug targets* **2006**, *5* (2), 91-106.
30. Schwab, J. M.; Serhan, C. N., Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Current opinion in pharmacology* **2006**, *6* (4), 414-20.
31. Salvemini, D.; Wang, Z. Q.; Wyatt, P. S.; Bourdon, D. M.; Marino, M. H.; Manning, P. T.; Currie, M. G., Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* **1996**, *118* (4), 829-38.
32. Bento, A. F.; Claudino, R. F.; Dutra, R. C.; Marcon, R.; Calixto, J. B., Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators 17(R)-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent Experimental Colitis in Mice. *J Immunol* **2011**, *187* (4), 1957-1969.
33. Ji, R. R.; Xu, Z. Z.; Strichartz, G.; Serhan, C. N., Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci* **2011**, *34* (11), 599-609.
34. Tamblyn, R.; Berkson, L.; Dauphinee, W. D.; Gayton, D.; Grad, R.; Huang, A.; Isaac, L.; McLeod, P.; Snell, L., Unnecessary prescribing of NSAIDs and the management of NSAID-related gastropathy in medical practice. *Ann Intern Med* **1997**, *127* (6), 429-38.
35. Navarrete, A.; Oliva, I.; Sanchez-Mendoza, M. E.; Arrieta, J.; Cruz-Antonio, L.; Castaneda-Hernandez, G., Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol* **2005**, *57* (12), 1629-1636.

36. Wallace, J. L.; Vong, L., NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Invest Dr* **2008**, *9* (11), 1151-1156.
37. Galarraga, B.; Ho, M.; Youssef, H. M.; Hill, A.; McMahon, H.; Hall, C.; Ogston, S.; Nuki, G.; Belch, J. J. F., Cod liver oil (n-3 fatty acids) as an non-steroidal anti-inflammatory drug sparing agent in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2008**, *47* (5), 665-669.
38. Hawkey, C. J., Cox-2 Inhibitors. *Lancet* **1999**, *353* (9149), 307-314.
39. Donnelly, M. T.; Hawkey, C. J., Review article: COX-II inhibitors--a new generation of safer NSAIDs? *Alimentary pharmacology & therapeutics* **1997**, *11* (2), 227-36.
40. Coruzzi, G.; Venturi, N.; Spaggiari, S., Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* **2007**, *78* (2), 96-110.
41. Cryer, B., The role of cyclooxygenase selective inhibitors in the gastrointestinal tract. *Current gastroenterology reports* **2003**, *5* (6), 453-8.
42. Chin, A.; Commerford, P., Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* **2007**, *97* (7), 500-3.
43. Bannwarth, B., Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors have a future? *Drug Safety* **2005**, *28* (3), 183-189.
44. Kelley, N. E.; Tepper, D. E., Rescue therapy for acute migraine, part 3: opioids, NSAIDs, steroids, and post-discharge medications. *Headache* **2012**, *52* (3), 467-82.
45. McHughes, M.; Lipman, A. G., Managing osteoarthritis pain when your patient fails simple analgesics and NSAIDs and is not a candidate for surgery. *Current rheumatology reports* **2006**, *8* (1), 22-9.
46. Seo, P. J., Kim, N., Kim, J., Lee, BH., Nam, RH., Lee, HS., Park, JH., Lee, MK., Chang, H., Jung, HC., Song, IS., Comparison of indomethacin, diclofenac and aspirin-induced gastric damage according to age in rats. *Gut Liver* **2012**, *6* (2), 210-217.
47. Jung, J.; Nam, Y.; Sohn, U. D., Inhibitory Effects of ECQ on Indomethacin-Induced Gastric Damage in Rats. *Korean J Physiol Pha* **2012**, *16* (6), 399-404.
48. Wallace, J. L., Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Pract Res Cl Ga* **2001**, *15* (5), 691-703.
49. Antman, E., Bennett, J., Daugherty, A., Furberg, C., Roberts, H., Taubert, K., Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the american heart association. *Circulation* **2007**, *115*, 1634-1642.
50. Wallace, J. L., Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev* **2008**, *88* (4), 1547-1565.
51. Yoshikawa, T., Naito, Y., Kishi, A., Tomii, T., Kaneko, T., Iinuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., Kondo, M., Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut Liver* **1993**, *34* (6), 732-7.
52. Schoultz, I.; McKay, C. M.; Graepel, R.; Phan, V. C.; Wang, A.; Soderholm, J.; McKay, D. M., Indomethacin-induced translocation of bacteria across enteric epithelia is reactive oxygen species-dependent and reduced by vitamin C. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **2012**, *303* (5), G536-45.
53. Pereira, S. P.; Gainsborough, N.; Dowling, R. H., Drug-induced hypochlorhydria causes high duodenal bacterial counts in the elderly. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **1998**, *12* (1), 99-104.

54. Lewis, S. J.; Franco, S.; Young, G.; O'Keefe, S. J., Altered bowel function and duodenal bacterial overgrowth in patients treated with omeprazole. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **1996**, *10* (4), 557-61.
55. Wallace, J. L.; Syer, S.; Denou, E.; de Palma, G.; Vong, L.; McKnight, W.; Jury, J.; Bolla, M.; Bercik, P.; Collins, S. M.; Verdu, E.; Ongini, E., Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology* **2011**, *141* (4), 1314-22, 1322 e1-5.
56. Lim, Y. J.; Phan, T. M.; Dial, E. J.; Graham, D. Y.; Lichtenberger, L. M., In vitro and in vivo protection against indomethacin-induced small intestinal injury by proton pump inhibitors, acid pump antagonists, or indomethacin-phosphatidylcholine. *Digestion* **2012**, *86* (2), 171-7.
57. Fedorova-Dahms, I.; Marone, P. A.; Bauter, M.; Ryan, A. S., Safety evaluation of DHA-rich Algal Oil from *Schizochytrium* sp. *Food Chem Toxicol* **2011**, *49* (12), 3310-3318.
58. Simopoulos, A. P., Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* **2002**, *21* (6), 495-505.
59. Kristensen, S. D.; Decaterina, R.; Schmidt, E. B.; Endres, S., Fish-Oil and Ischemic-Heart-Disease. *Brit Heart J* **1993**, *70* (3), 212-214.
60. Saravanan, P.; Davidson, N. C.; Schmidt, E. B.; Calder, P. C., Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet* **2010**, *376* (9740), 540-550.
61. SanGiovanni, J. P.; Chew, E. Y., The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in retinal and eye research* **2005**, *24* (1), 87-138.
62. McNamara, R. K.; Carlson, S. E., Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **2006**, *75* (4-5), 329-49.
63. Di Minno, M. N. D.; Russolillo, A.; Lupoli, R.; Ambrosino, P.; Di Minno, A.; Tarantino, G., Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroentero* **2012**, *18* (41), 5839-5847.
64. Veigas, J. M.; Williams, P.; Halade, G.; Rahman, M. M.; Yoneda, T.; Fernandes, G., Fish oil concentrate delays sensitivity to thermal nociception in mice. *Pharmacol Res* **2011**, *63* (5), 377-382.
65. Tokuyama, S.; Nakamoto, K., Unsaturated Fatty Acids and Pain. *Biol Pharm Bull* **2011**, *34* (8), 1174-1178.
66. Nakamoto, K.; Nishinaka, T.; Mankura, M.; Fujita-Hamabe, W.; Tokuyama, S., Antinociceptive Effects of Docosahexaenoic Acid against Various Pain Stimuli in Mice. *Biol Pharm Bull* **2010**, *33* (6), 1070-1072.
67. Murali, G.; Milne, G. L.; Webb, C. D.; Stewart, A. B.; McMillan, R. P.; Lyle, B. C.; Hulver, M. W.; Saraswathi, V., Fish oil and indomethacin in combination potentially reduce dyslipidemia and hepatic steatosis in LDLR^{-/-} mice. *J Lipid Res* **2012**, *53* (10), 2186-2197.
68. Khalfoun, B.; Thibault, F.; Watier, H.; Bardos, P.; Lebranchu, Y., Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol* **1997**, *400*, 589-597.
69. Whiting, C. V.; Bland, P. W.; Tarlton, J. E., Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. *Inflamm Bowel Dis* **2005**, *11* (4), 340-349.

70. Renier, G.; Skamene, E.; Desanctis, J.; Radzioch, D., Dietary N-3 Polyunsaturated Fatty-Acids Prevent the Development of Atherosclerotic Lesions in Mice - Modulation of Macrophage Secretory Activities. *Arterioscler Thromb* **1993**, *13* (10), 1515-1524.
71. Yaqoob, P.; Calder, P., Effects of Dietary-Lipid Manipulation Upon Inflammatory Mediator Production by Murine Macrophages. *Cell Immunol* **1995**, *163* (1), 120-128.
72. Pineda-Pena, E. A.; Jimenez-Andrade, J. M.; Castaneda-Hernandez, G.; Chavez-Pina, A. E., Docosahexaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated acid protects against indomethacin-induced gastric injury. *Eur J Pharmacol* **2012**, *697* (1-3), 139-143.
73. Xue, B. Z.; Yang, Z. G.; Wang, X. F.; Shi, H., Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Antagonize Macrophage Inflammation via Activation of AMPK/SIRT1 Pathway. *Plos One* **2012**, *7* (10).
74. Abimosleh, S. M.; Tran, C. D.; Howarth, G. S., Emu Oil Reduces Small Intestinal Inflammation in the Absence of Clinical Improvement in a Rat Model of Indomethacin-Induced Enteropathy. *Evid-Based Compl Alt* **2013**.
75. Alharbi, M. M.; Islam, M. W.; Alshabanah, O. A.; Algharably, N. M., Effect of Acute Administration of Fish-Oil (Omega-3 Marine Triglyceride) on Gastric-Ulceration and Secretion Induced by Various Ulcerogenic and Necrotizing Agents in Rats. *Food Chem Toxicol* **1995**, *33* (7), 553-558.
76. Bhattacharya, A.; Ghosal, S.; Bhattacharya, S. K., Effect of fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. *Prostag Leukotr Ess* **2006**, *74* (2), 109-116.
77. Ichinose, F.; Miyazaki, M.; Goto, T.; Takahashi, H.; Terui, K.; Niimi, Y.; Uezono, S.; Morita, S.; Yanagida, H., Electroencephalographic responses to the formalin test in rats. *Pain* **1999**, *80* (1-2), 251-6.
78. Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S. W., Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* **2001**, *53* (4), 597-652.
79. Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J., A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **1988**, *32*, 77-88.
80. Galbraith, J. A.; Mrosko, B. J.; Myers, R. R., A system to measure thermal nociception. *Journal of neuroscience methods* **1993**, *49* (1-2), 63-8.
81. Morris, C. J., Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in molecular biology* **2003**, *225*, 115-21.
82. Nantel, F.; Denis, D.; Gordon, R.; Northey, A.; Cirino, M.; Metters, K. M.; Chan, C. C., Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Brit J Pharmacol* **1999**, *128* (4), 853-859.
83. Rocha, A. C.; Fernandes, E. S.; Quintao, N. L.; Campos, M. M.; Calixto, J. B., Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol* **2006**, *148* (5), 688-95.
84. Takeuchi, K.; Satoh, H., Measurement of small intestinal damage. *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines* **2010**, *Chapter 21*, Unit 21 7.
85. Okada, A.; Kinoshita, Y.; Waki, S.; Fukui, H.; Maekawa, T.; Matsushima, Y.; Kawanami, C.; Kishi, K.; Nakata, H.; Wang, H. Y.; Hassan, S.; Chiba, T., Rat gastric mucosal cells express ICAM-1 and proinflammatory cytokines during indomethacin-induced mucosal injury. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **1998**, *131* (6), 538-47.

86. Fouad, A. A.; Al-Sultan, A. I.; Yacoubi, M. T.; Gomaa, W., Ameliorative effects of telmisartan in diabetic rats with indomethacin-induced gastric ulceration. *Eur J Pharmacol* **2010**, *637* (1-3), 162-70.
87. Bhargava, K. P.; Gupta, M. B.; Tangri, K. K., Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur J Pharmacol* **1973**, *22* (2), 191-5.
88. Moustafa, Y. M.; Khoder, D. M.; El-Awady, E. E.; Zaitone, S. A., Sildenafil citrate protects against gastric mucosal damage induced by indomethacin in rats. *European review for medical and pharmacological sciences* **2013**, *17* (2), 179-88.
89. Karumi, Y., Augustine, AI, Umar, IA., Gastroprotective effects of aqueous extract of *Adansonia digitata* leaf on ethanol-induced ulceration in rats. *Journal of Biological Sciences* **2008**, *8* (1), 225-228.
90. Yang, Q.; Kock, N. D., Effects of Dietary Fish Oil on Intestinal Adaptation in 20-Day-Old Weanling Rats After Massive Ileocecal Resection. *Pediatr Res* **2010**, *68* (3), 183-187.
91. Sugishita, E.; Amagaya, S.; Ogihara, Y., Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Journal of pharmacobio-dynamics* **1981**, *4* (8), 565-75.
92. Odabasoglu, F.; Halici, Z.; Cakir, A.; Halici, M.; Aygun, H.; Suleyman, H.; Cadirci, E.; Atalay, F., Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and alpha-tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur J Pharmacol* **2008**, *591* (1-3), 300-6.
93. Hielm-Bjorkman, A.; Roine, J.; Elo, K.; Lappalainen, A.; Junnila, J.; Laitinen-Vapaavuori, O., An un-commissioned randomized, placebo-controlled double-blind study to test the effect of deep sea fish oil as a pain reliever for dogs suffering from canine OA. *Bmc Vet Res* **2012**, *8*.
94. Cleland, L. G.; James, M. J.; Proudman, S. M., The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* **2003**, *63* (9), 845-853.
95. Sagi, S. A.; Weggen, S.; Eriksen, J.; Golde, T. E.; Koo, E. H., The non-cyclooxygenase targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lipoxygenases, peroxisome proliferator-activated receptor, inhibitor of kappa B kinase, and NF kappa B, do not reduce amyloid beta 42 production. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278* (34), 31825-30.
96. Santucci, L.; Fiorucci, S.; Dimatteo, F. M.; Morelli, A., Role of Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Release and Leukocyte Margination in Indomethacin-Induced Gastric Injury in Rats. *Gastroenterology* **1995**, *108* (2), 393-401.
97. Fukumoto, K.; Naito, Y.; Takagi, T.; Yamada, S.; Horie, R.; Inoue, K.; Harusato, A.; Htrata, I.; Matsu, T.; Mizushima, K.; Hirai, Y.; Yoshida, N.; Uchiyama, K.; Ishikawa, T.; Handa, O.; Konishi, H.; Wakabayashi, N.; Yagi, N.; Kokura, S.; Ichikawa, H.; Kita, M.; Yoshikawa, T., Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis or indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Int J Mol Med* **2011**, *27* (3), 353-359.
98. Lu, J.; Caplan, M. S.; Li, D.; Jilling, T., Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol-Gastr L* **2008**, *294* (5), G1181-G1190.
99. Li, Q. R.; Zhang, Q.; Wang, C. Y.; Tang, C.; Zhang, Y. M.; Li, N.; Li, J. S., Fish Oil Enhances Recovery of Intestinal Microbiota and Epithelial Integrity in Chronic Rejection of Intestinal Transplant. *Plos One* **2011**, *6* (6).