



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Evaluación del efecto antinociceptivo y seguridad de la  
combinación de ketorolaco y ácido docosahexaenoico en  
un modelo murino”**

**Tesis que presenta**

**M. en C. Alan Martín García Barrera**

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**

**CIUDAD DE MÉXICO.**

**DICIEMBRE, 2016**

*DEDICATORIA*

*A mi mamá y hermanos.*

*Por hacer mi vida especial.*

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca con el número de registro, otorgada para la realización del presente proyecto.**

## **Agradecimientos**

En principio quiero agradecer al Dr. Gilberto Castañeda Hernández, por sus consejos y enseñanzas científicas y de vida.

A la Dra. Aracely E. Chávez Piña, por su asesoría, confianza y guía durante la realización del presente trabajo.

A los Doctores Liliana Favari Perozzi y Pablo Muriel de la Torre por sus valiosas contribuciones en la elaboración del proyecto.

A la Q.F.B Lourdes Gonzáles Flores por su asistencia técnica y por todo lo que me enseñó durante mi estancia en el laboratorio.

A todos mis amigos del laboratorio 34 y de generación, en especial a Suset, Lorena e Isaac).

A mis compañeros de laboratorio de la ENMH del IPN, por su apoyo y conocimientos transmitidos durante este periodo.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Dolor	1
1.1.1. Clasificación del dolor	1
1.1.2. Dolor nociceptivo	3
1.1.3. Dolor inflamatorio	5
1.1.4. Dolor maladaptativo o patológico	5
1.2. Terapéutica del dolor	6
1.3. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	7
1.3.1. Mecanismo de acción	7
1.3.2. Efecto terapéutico	9
1.3.3. Efectos adversos	9
1.4. Ketorolaco	12
1.4.1. Estructura química	12
1.4.2. Farmacocinética	12
1.4.3. Farmacodinamia	13
1.5. Terapias	14
1.5.1. Terapias preventivas	14
1.5.2. Terapias alternativas	14
1.6. Ácidos grasos	15
1.7. Ácido docosahexaenoico (DHA)	16
1.8. Modelos animales experimentales	17

1.8.1. Clasificación	17
1.8.2. Pruebas basadas en el uso de estímulos de corta duración	17
1.8.3. Pruebas basadas en el uso de estímulos de larga duración	18
1.8.4. Modelo de la formalina	19
1.9. Análisis isobolográfico	22
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>24</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>28</b>
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos particulares	28
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
6.1. Animales de experimentación	29
6.2. Reactivos y fármacos	29
6.3. Modelo de la formalina	29
6.4. Modelo de daño gástrico en ratas	30
6.5. Método experimental de nocicepción inducido por la formalina	30
6.6. Método experimental de evaluación del daño gástrico	32
6.7. Determinación de la interacción farmacológica de la combinación	33
6.8. Análisis estadístico	36
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
7.1. Actividad antinociceptiva	37
7.2. Efecto antinociceptivo del ketorolaco-DHA	38
7.2.1. Curva dosis-respuesta del ketorolaco	38
7.2.2. Curva dosis-respuesta del DHA	39
7.3. Efecto antinociceptivo de la combinación DHA-ketorolaco en las tres proporciones (1:1, 1:3 y 3:1)	40
7.3.1. Índice de interacción	44
7.4. Análisis isobolográfico de la interacción antinociceptiva entre la combinación DHA-ketorolaco en sus diferentes proporciones	45

7.5.	Seguridad gástrica	46
7.5.1.	Daño gástrico generado por el ketorolaco	47
7.5.2.	Seguridad gástrica generada por el DHA	48
7.5.3.	Seguridad gástrica generada por la combinación DHA-ketorolaco	49
<b>8.</b>	<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>50</b>
8.1.	Evaluación del efecto antinociceptivo	50
8.2.	Interacción entre el DHA-ketorolaco	51
8.3.	Evaluación de la seguridad gástrica	53
<b>9.</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>56</b>
<b>10.</b>	<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación del dolor.....	2
<b>Figura 2.</b> Escalera analgésica de la O.M.S.....	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los AINEs.....	8
<b>Figura 4.</b> Principales efectos secundario relacionados a la inhibición de las ciclooxigenasas.....	11
<b>Figura 5.</b> Estructura química del ketorolaco trometamina.....	12
<b>Figura 6.</b> Metabolismo general de los ácidos grasos n-6 y n-3.....	15
<b>Figura 7.</b> Metabolismo del DHA.....	16
<b>Figura 8.</b> Curso temporal bifásico de la prueba de formalina.....	20
<b>Figura 9.</b> Representación gráfica de un isoblograma.....	23
<b>Figura 10.</b> Metodología de la prueba de formalina al 1%.....	31
<b>Figura 11.</b> Metodología de la evaluación del daño gástrico.....	32
<b>Figura 12.</b> Esquema del método para caracterizar el efecto de interacción farmacológica en dos fármacos. DE <sub>30</sub> (dosis efectiva 30).....	35
<b>Figura 13.</b> Efecto antinociceptivo del ketorolaco en la prueba de la formalina al 1%.....	38
<b>Figura 14.</b> Efecto antinociceptivo del DHA en la prueba de la formalina al 1%.....	39
<b>Figura 15.</b> Curvas dosis-efecto de la combinación DHA-ketorolaco de la segunda fase de la prueba de formalina al 1% .....	43

<b>Figura 16.</b> Isoblograma de la interacción farmacológica entre DHA-ketorolaco del efecto antinociceptivo de la prueba de formalina (fase II) .....	45
<b>Figura 17.</b> Daño generado por la administración de ketorolaco p.o.....	46
<b>Figura 18.</b> Imágenes representativas de las lesiones gástricas generadas por los diferentes tratamientos de ketorolaco p.o.....	47
<b>Figura 19.</b> Imágenes representativas del efecto gástrico generado por el DHA.....	48
<b>Figura 20.</b> Imágenes representativas del efecto gástrico inducido por la combinación DHA-ketorolaco.....	49
<b>Figura 21.</b> Posibles mecanismos involucrados en el efecto sinérgico de la combinación DHA-ketorolaco.....	53
<b>Figura 22.</b> Mecanismos de acción del DHA involucrados en el efecto gastroprotector.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Cálculos para la obtención de las dosis de los fármacos a usar en la combinación DHA-ketorolaco.....34

**Tabla 2.** Dosis utilizadas en la combinación DHA-ketorolaco en las tres proporciones diferentes 1:1, 1:3 y 3:1.....41

**Tabla 3.** Comparación de las  $DE_{30}$  teóricas y experimentales, así como el índice de las interacción de las combinaciones DHA-ketorolaco.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AINEs</b>	Antinflamatorios no esteroideos
<b>AR</b>	Arteriolar renal
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CCR5</b>	C-C quimiocina receptora de tipo 5 (C-C chemokine receptor type 5)
<b>CGPR</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (calcitonin gene-related peptide)
<b>cm</b>	Centímetros
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DE</b>	Dosis efectiva
<b>DE E</b>	Dosis efectiva experimental
<b>DE T</b>	Dosis efectiva teórica
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico (Docosahexaenoic acid)
<b>DPA</b>	Ácido docosapentaenoico (Docosapentaenoic acid)
<b>5-HT</b>	Serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT)
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico (Eicosapentaenoic acid)
<b>FSG</b>	Flujo sanguíneo glomerular
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteínas G (G-protein-coupled receptor)
<b>g</b>	Gramos
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>h</b>	Hora
<b>HO-1</b>	Hemo-oxigenasa-1
<b>HPETE</b>	Ácido hidroperoxi-eicosatetraenoico (Hydroperoxyeicosatetraeic acid)
<b>IAM</b>	Infarto agudo del miocardio

<b>IASP</b>	Asociación internacional para el estudio del dolor (International Association for the study of pain)
<b>ICC</b>	Insuficiencia cardiaca
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IR</b>	Insuficiencia renal
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>Kg</b>	kilogramo
<b>LOX</b>	Lipooxigenasa
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>mg</b>	Miligramo
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	Factor nuclear $\kappa\beta$
<b>O. M. S</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PD</b>	Protectina de la serie D
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>p.o.</b>	Vía oral ( <i>per os</i> )
<b>PPARs</b>	Receptores activados de proliferación de los peroxisomas (peroxisome proliferator activated receptors)
<b>PUFA</b>	Ácido graso poliinsaturado (polyunsaturated fatty acid)
<b>RvD</b>	Resolvina de la serie D1
<b>S.E.M</b>	Error estándar de la media (Standard error of the mean)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TRPV</b>	Receptor de potencial transitorio (Transient receptor potential cation channel subfamily V member)
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>Zadd</b>	Dosis efectiva 30 teórica
<b>Zexp</b>	Dosis efectiva 30 experimental
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Microlitro
<b><math>\gamma</math></b>	Índice de interacción

## RESUMEN

El dolor es una respuesta normal de alarma y protección, la cual está acompañada de una connotación físicoemocional, pero bajo ciertas circunstancias puede perder su función llegando a convertirse en una enfermedad, generando una disminución en la calidad de vida de quien lo padece, así como grandes gastos económicos. Por lo que el dolor actualmente es considerado un problema de salud pública a nivel mundial.

Dentro de las técnicas de analgesia para el tratamiento del dolor, se encuentra el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos convencionales (AINEs) como el ketorolaco, el cual dentro de su mecanismo general de acción está la inhibición de la COX, que es responsable de su efecto terapéutico, así como de sus efectos adversos, especialmente el daño gastrointestinal, siendo éste la principal causa de limitación del tratamiento a usos prolongados y/o altas dosis. Por tal motivo, la prescripción de dos o más agentes analgésicos en la práctica clínica es ampliamente usada, donde lo que se busca es disminuir las dosis y los efectos secundarios generados por esta clase de medicamentos. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha estudiado el ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso poliinsaturado omega-3 que posee propiedades gastroprotectoras, antinociceptivas y antiinflamatorias.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar mediante un análisis isoblográfico, la posible interacción sinérgica del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-ketorolaco en la prueba de formalina al 1% en ratas Wistar. Por otro lado, se analizó el impacto gastroprotector del DHA en la disminución del daño gástrico generado por el ketorolaco.

Primeramente, mediante la prueba de formalina al 1%, se realizaron las curvas dosis-respuesta del ketorolaco (0.1-3.0 mg/kg, p.o.) y DHA (30-177.83 mg/kg p.o.), donde se establecieron los valores de las  $DE_{30}$  por separado para cada uno de los agentes. Posteriormente se diseñaron las combinaciones DHA-ketorolaco manteniendo proporciones constantes de los agentes en cada una de las

combinaciones (1:1, 1:3 y 3:1), donde se determinó el valor de la  $DE_{30}$  teórica para cada una de las proporciones y se compararon con las  $DE_{30}$  experimentales de la combinación, mediante el índice de interacción y el isoblograma.

Los resultados isoblográficos indicaron que el efecto antinociceptivo de la combinación DHA-ketorolaco en la proporción 3:1 es de tipo sinérgico, mientras que en las proporciones 1:1 y 1:3 presentaron un efecto aditivo. Así mismo, en el análisis macroscópico de los estómagos tratados con ketorolaco todos presentaron lesiones hemorrágicas. En contraste, los grupos tratados únicamente con DHA y en combinación, no se encontró la presencia de lesiones gástricas.

En conclusión, los resultados sugieren que la combinación DHA y ketorolaco aparecen como una alternativa adecuada para lograr un buen efecto antinociceptivo, manteniendo una seguridad gastrointestinal aceptable.

## ABSTRACT

Pain is a normal response alarm and protection, which is accompanied by physical, emotional connotation, but under certain circumstances it may lose its function eventually becoming a disease, resulting in a decrease in the quality of life of the sufferer and as large economic costs. So the pain is currently considered a public health problem worldwide.

Among the techniques of analgesia for pain treatment is the use of conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ketorolac, which in its general mechanism of action is inhibition of COX, which is responsible for its therapeutic effect, and their adverse effects, especially gastrointestinal damage, this being the main cause treatment limiting prolonged use and / or high doses. Therefore, the prescription of two or more analgesic agents in clinical practice is widely used, where what is sought is to reduce the dosage and side effects generated by this class of drugs. On the other hand, our working group has studied docosahexaenoic acid (DHA), a polyunsaturated fatty acid omega-3 that has gastroprotective, antinociceptive and anti-inflammatory properties.

Therefore, the aim of this study was to assess by isobolographic analysis of possible synergistic interaction antinociceptive effect of ketorolac-DHA combination in 1% formalin test in Wistar rats. Furthermore, the gastroprotective impact of DHA in decreasing gastric damage generated by ketorolac was analyzed.

First, by test 1% formalin, dose response curves of ketorolac (0.1-3.0 mg / kg, p.o.) and DHA (30-177.83 mg / kg p.o.), were established  $DE_{30}$  and were performed for each of the agents respectively. Then we proceeded to design combinations of DHA-ketorolac, maintaining constant proportions of agents in each of the combinations (1: 1, 1: 3 and 3: 1), where the value of the theoretical  $DE_{30}$  for each of the ratios is determined and compared with the experimental  $DE_{30}$  of combination, through interaction and index isobologram.

The isobolographic results indicated that the antinociceptive effect of ketorolac-DHA combination in 3:1 ratio was synergistic, whereas in the ratios 1:1 and 1:3 had an additive effect. Also, in the macroscopic analysis of the stomachs treated with ketorolac all had hemorrhagic lesions. In contrast, the groups treated only with DHA and in combination, the presence of gastric lesions was not found.

In conclusion, the results suggest that DHA and ketorolac combination appear as a suitable alternative to achieve good antinociceptive effect while maintaining an acceptable gastrointestinal safety.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. DOLOR

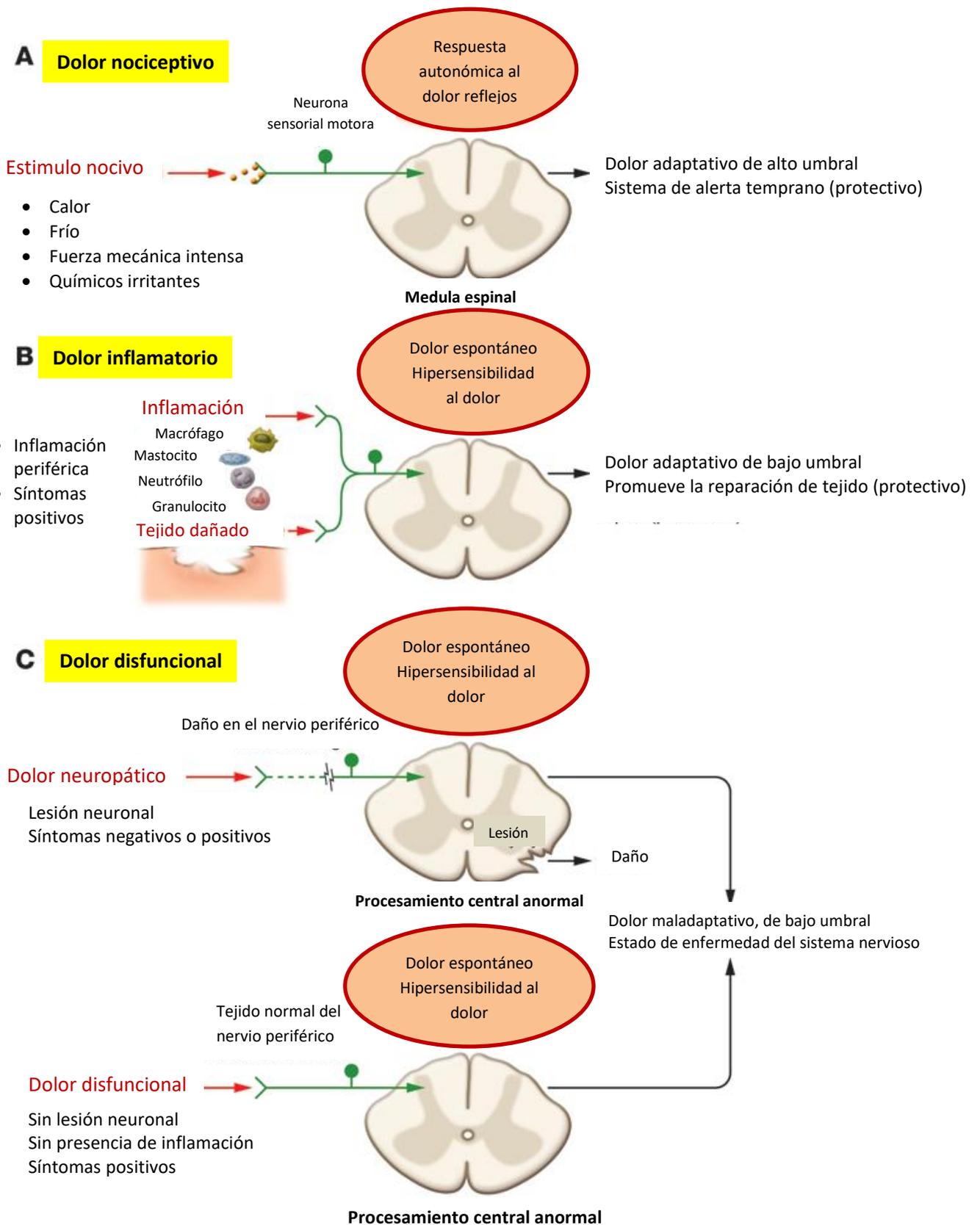
El dolor es un fenómeno rápido de alerta ante un estímulo nocivo, el cual tiene como objetivo garantizar la supervivencia del individuo.

El dolor es un proceso muy complejo, en el cual además de presentar una respuesta fisiológica, se genera una serie de factores que permiten al individuo dimensionar el dolor, por ejemplo: creencias, cultura, emociones, entre otros. De tal forma, que todos estos componentes alteran la forma como se padece el dolor y como se desarrolla la experiencia dolorosa del individuo. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) (por sus siglas en inglés) lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada o no con el daño tisular presente o potencial, o descrito en términos de tal daño [1].

### 1.1.1. Clasificación del dolor

El dolor, al ser un proceso multidimensional se puede clasificar en dos grandes grupos: el dolor adaptativo y maladaptativo.

El dolor adaptativo es un sistema fisiológico de protección, esencial para salvaguardar la vida del individuo, detectando y disminuyendo el contacto de estímulos nocivos. Además de funcionar como una señal de alarma, favorece la reparación tisular del tejido dañado. El dolor adaptativo se subdivide en dolor nociceptivo y dolor inflamatorio, mientras que el dolor maladaptativo o patológico comprende el dolor neuropático y el dolor disfuncional (**Figura 1**) [2].



**Figura 1.** Clasificación del dolor. Modificada de Woolf 2010.

### 1.1.2. Dolor nociceptivo

Es importante diferenciar el dolor de la nocicepción, ya que como se sabe el dolor es un proceso que dependerá de sensaciones y emociones. Es decir, el dolor siempre es subjetivo, mientras que el dolor nociceptivo es el mecanismo por el cual un estímulo químico, térmico o mecánico es detectado por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, llamadas nociceptores, en el cual el factor emocional no es considerado [3]. De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), se define como el proceso neuronal de codificación y procesamiento de estímulos nocivos. La nocicepción comprende cinco procesos fisiológicos principales: transducción, conducción, transmisión, percepción y modulación [4].

#### ➤ Transducción

En este primer paso, los estímulos nocivos son convertidos a potenciales de acción a nivel de nociceptores, los cuales se encuentran presentes en las terminales nerviosas periféricas.

#### ➤ Conducción

Es la propagación del potencial de acción a través de las terminaciones periféricas, las cuales tienen diámetros y velocidades de conducción diferentes. Bajo este esquema se pueden clasificar en dos tipos diferentes: fibras A y C.

Las fibras de clase A se dividen en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ . Las fibras  $A\alpha$  son de diámetro medio, mientras que las fibras  $A\beta$  son de diámetro grande, ambas son mielinizadas y responden a estímulos inocuos tanto químicos y mecánicos. A diferencia, las fibras  $A\delta$  son de diámetro medio, mielinizadas y responden a estímulos térmicos y mecánicos. Estas fibras  $A\delta$  son consideradas la primera respuesta al dolor.

Las fibras C son amielínicas, en consecuencia, transmiten el impulso de forma continua a lo largo del axón siendo así fibras de respuesta lenta. Por otro lado, presentan una ventaja ya que son polimodales, es decir, responden a estímulos químicos, térmicos y mecánicos. Además, constituyen más de la mitad de la población de fibras periféricas. Por tal motivo, son conocidas como fibras nociceptivas [5].

➤ Transmisión

Es el proceso mediante el cual las neuronas periféricas de primer orden ingresan a la médula espinal por el surco posterolateral, pasan la información a neuronas de segundo orden. Esto a través de la liberación de transmisores como glutamato, sustancia P, CGRP, entre otros.

➤ Percepción

La información periférica que entra al sistema nervioso central asciende por diferentes vías (espinotalámica, espinoretícula y espinomesencefálica) en la médula espinal. Para generar la percepción, es necesario que se integren todos los factores tanto emocionales como cognitivos y esto se realiza a través del hipotálamo, el cual es un integrador de la información para posteriormente mandarla a regiones superiores.

➤ Modulación

Es el proceso mediante el cual un estímulo nociceptivo es modulado o atenuado y se realiza a través de la alteración de la señal nociceptiva. Existen diversos mecanismos de modulación como la activación de la vía gabaérgica o la activación del sistema opioide endógeno.

### **1.1.3. Dolor inflamatorio**

El dolor inflamatorio es un mecanismo normal que provee protección contra infecciones, facilitando así la reparación tisular. El dolor inflamatorio es causado por la activación del sistema inmune ante un daño tisular generado por un estímulo nocivo, el cual desencadenará un proceso inflamatorio caracterizado por generar calor, rubor, tumefacción, dolor y pérdida de la función [6].

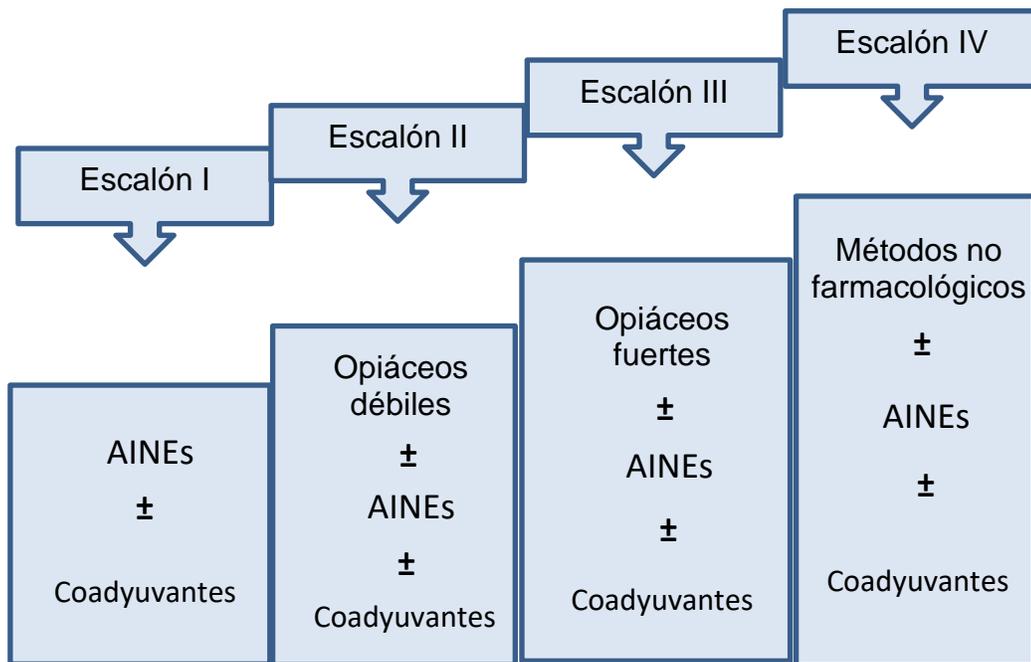
La inflamación puede clasificarse como aguda o crónica. La fase aguda se caracteriza por un flujo de plasma y leucocitos del torrente sanguíneo hacia el tejido dañado, posteriormente, los leucocitos liberarán mediadores químicos en el sitio de inflamación. Estos mediadores pueden incluir derivados de lípidos (prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas, etc.), mediadores peptídicos (citocinas o quimiocinas), especies reactivas de oxígeno (superóxido) y derivados de aminoácidos (histamina). De tal forma que prolongarán, madurarán y finalizarán la respuesta inflamatoria. Sin embargo, cuando no se produce una apropiada regulación de la respuesta inflamatoria, algunos mediadores (IL-6) escapan del sitio de inflamación hacia el torrente sanguíneo, los cuales pueden amplificar la señal y generar un efecto sistémico, el cual puede generar fibrosis y degeneración tisular. Este proceso puede tardar meses o años.

### **1.1.4. Dolor maladaptativo o patológico**

Este dolor resulta de un funcionamiento anormal del sistema nervioso (dolor neuropático) o también puede ocurrir en condiciones en la que no hubo presencia de tal daño o proceso inflamatorio (dolor disfuncional) pero si una enfermedad congénita [2].

## 1.2. TERAPÉUTICA DEL DOLOR

El dolor afecta a un grupo grande de la población mundial. Es considerado por muchos autores como un problema de salud pública. Hace 20 años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) implementó un método para el alivio o control del dolor conocido como escalera analgésica de 3 peldaños (**Figura 2**). El objetivo de esta guía es poner las bases para el manejo farmacológico del dolor mediante la exposición de cada grupo farmacológico (AINEs, opiáceos, coadyuvantes, etc.). La escalera analgésica es una estrategia en la que, dependiendo la intensidad del dolor se selecciona el peldaño que proporciona una guía para el tratamiento. De no funcionar se pasará al siguiente peldaño y así sucesivamente. El cuarto nivel no es precisamente un peldaño más. En este nivel no hay más dolor que antes, pero sin embargo, los pacientes sufren de dolor refractario, es decir, que a pesar de la administración de medicamentos, éstos no generan un efecto de mejoría en el padecimiento del dolor o los efectos secundarios no son tolerados por el paciente [7, 8].



**Figura 2.** Escalera analgésica de la O.M.S.

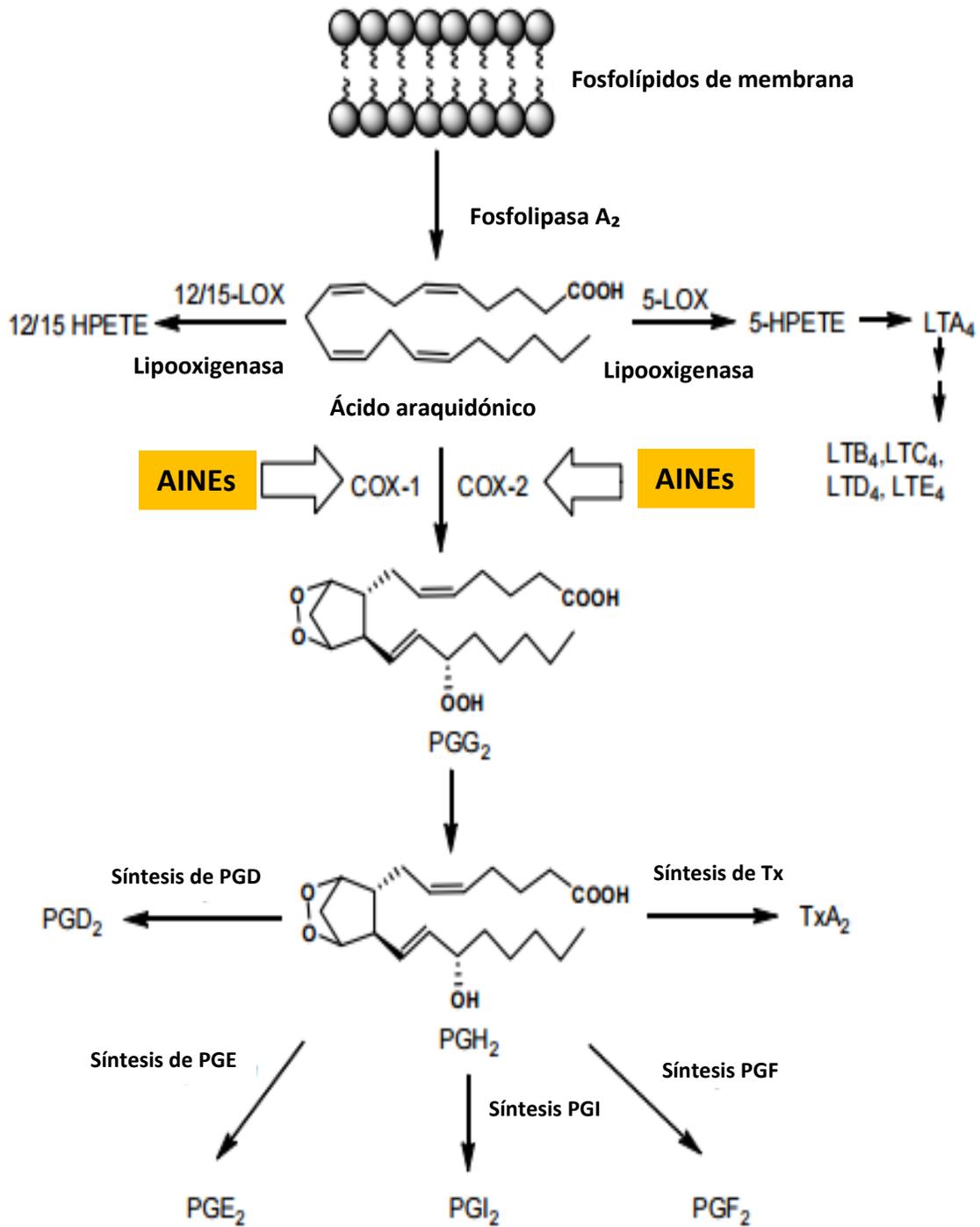
### 1.3. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son la piedra angular para el tratamiento de muchos padecimientos, dentro de ellos, el dolor, esto debido a que constituyen un grupo farmacológico muy heterogéneo. Son ampliamente utilizados, en la práctica clínica y son de venta libre, por lo cual, este tipo de medicamentos tienden a la automedicación. Los AINEs no producen depresión respiratoria, dependencia física y no inducen tolerancia. Su eficacia analgésica es limitada, debido a que presentan techo analgésico. Son efectivos para el tratamiento del dolor leve a moderado, aunque en algunos casos pueden controlar el dolor intenso. Su uso a largo plazo es limitado por sus grandes efectos secundarios [9].

Los AINEs al ser un grupo muy numeroso se pueden clasificar por su selectividad a la COX-1 o la COX-2, por su tiempo de vida media en plasma o por su similitud química [10, 11].

#### 1.3.1. Mecanismo de acción

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos tradicionales inhiben la actividad de la ciclooxigenasa (COX), generando una disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos, los cuales se forman a partir del ácido araquidónico (AA). La COX transforma al ácido araquidónico proveniente de las membranas en su precursor el prostanoide  $PGH_2$ , el cual es posteriormente metabolizado a la gran variedad de isoformas de prostaglandinas ( $PGI_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGD_2$ ) o tromboxano ( $TXA_2$ ). La disminución en la síntesis de prostaglandinas y su importancia en la generación del dolor, la inflamación y la fiebre, así como su actividad en los diferentes tejidos, es la responsable de la mayoría de los efectos terapéuticos y adversos de los AINEs (**Figura 3**).



**Figura 3.** Representación de la vía de biosíntesis de prostaglandinas (PG) y tromboxano (Tx) a partir del ácido araquidónico, mediante la COX1 / COX2, las cuales son inhibidas por los AINEs. Modificada de Rao y Knaus 2008.

### 1.3.2. Efecto terapéutico

Los AINEs son fármacos que comparten ciertas acciones terapéuticas como el efecto analgésico, antiinflamatorio, antipirético, entre otros, a pesar de no estar relacionados químicamente. De igual manera, comparten ciertos efectos secundarios; sin embargo, difieren del grado terapéutico alcanzado en cada uno de estos padecimientos. Por ejemplo, el paracetamol es un buen antipirético, pero carece de actividad antiinflamatoria, por el contrario, el naproxeno tiene buen efecto analgésico y antiinflamatorio, pero carece de actividad antipirética. Por otro lado, el ketorolaco presenta un buen efecto analgésico, pero tiene baja actividad antiinflamatoria. De tal forma que el conjunto de sus efectos farmacológicos representará sus propiedades terapéuticas. Son efectivos para el tratamiento del dolor leve-moderado, y en algunos casos se puede controlar el dolor intenso como el caso del ketorolaco, en el cual se ha comparado su eficacia con ciertos opiáceos como la morfina [12].

### 1.3.3. Efectos adversos

Los AINEs no selectivos inhiben en proporciones diferentes las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX), es decir COX-1 y COX-2 [13]. Estas son enzimas clave para la producción de prostaglandinas a partir del (AA), las cuales median funciones importantes en el organismo (**Figura 4**) [14].

#### ➤ Efecto gástrico

Desde los trabajos de Douth y Lintott en 1938, hasta la actualidad, está bien documentado que los AINEs pueden generar daño gastrointestinal (ulceraciones, hemorragias, perforaciones, dolor abdominal, entre otros). La probabilidad de la ocurrencia aumentará con el uso de dosis altas o consumo prolongado de los AINEs, la administración concomitante de corticosteroides y/o anticoagulantes, tabaquismo y bebidas alcohólicas. Esto debido a que los AINEs inhiben la síntesis

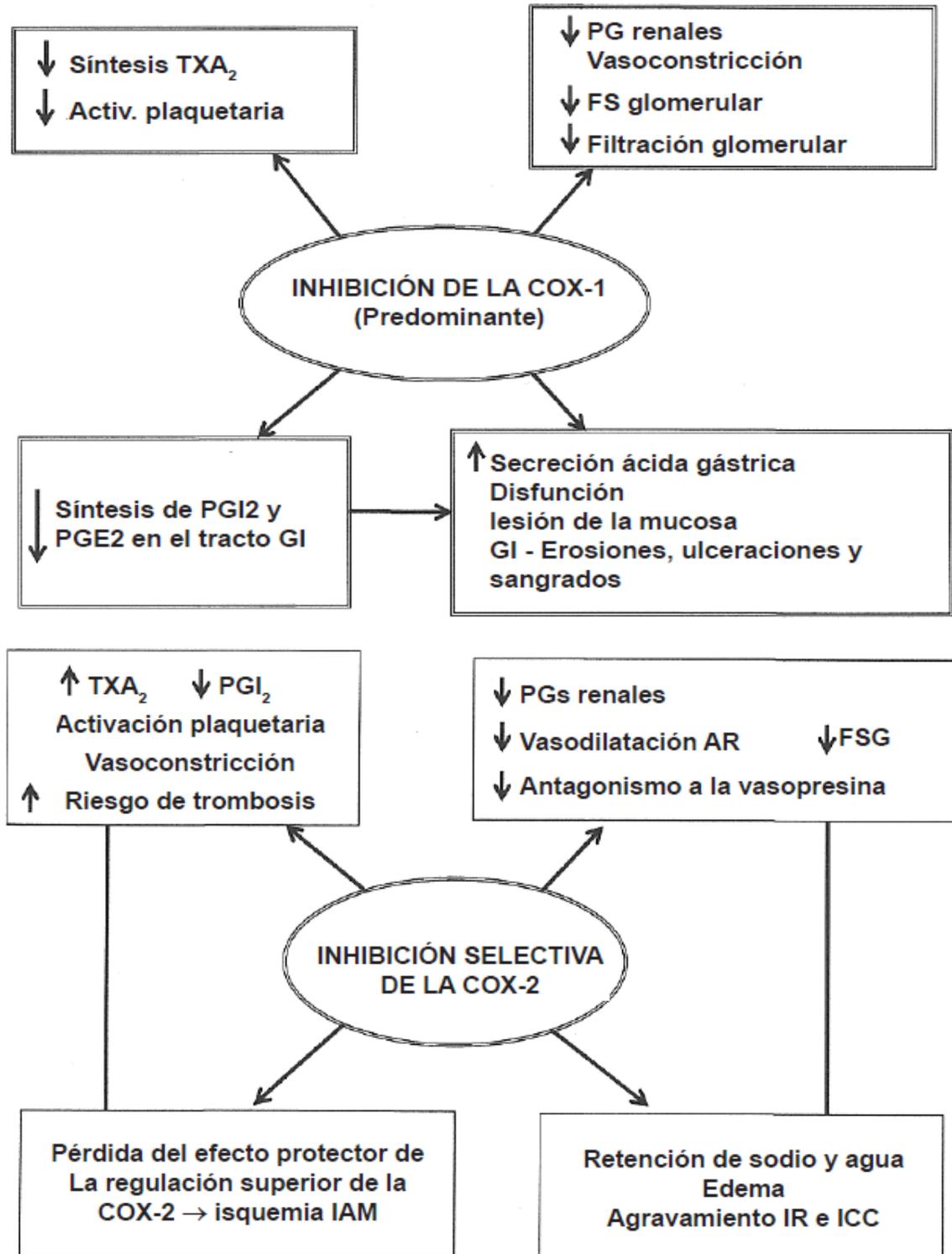
de prostaglandinas encargadas de mantener la defensa gástrica contra agentes nocivos. Dichas prostaglandinas están implicadas en la protección de la mucosa gástrica, incluyendo mucus y secreción de bicarbonato. De igual manera controlan la secreción del ácido estomacal, brindando una doble protección al epitelio gástrico del posible daño generado [15-17].

➤ Efecto cardiovascular

El TXA<sub>2</sub> es sintetizado principalmente en las plaquetas gracias a la COX-1, la cual ocasiona agregación plaquetaria, vasoconstricción y proliferación de las células musculares lisas. Por otro lado, la PGI<sub>2</sub> es sintetizada por la COX-2 en las células endoteliales macrovasculares, produciendo la relajación de las células musculares lisas vasculares, que lo convierte en un potente vasodilatador. Además, puede interactuar con los receptores IP de las plaquetas, el cual tiene una actividad antitrombótica. De tal forma, el TXA<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> mantienen la homeostasis cardiovascular y cerebrovascular [18, 19].

➤ Efecto renal

La homeostasis renal se lleva a cabo gracias a las prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>, generadas por la COX-1 en distintas partes de los riñones, que dilatan la vasculatura, disminuyen la resistencia vascular renal y aumentan la perfusión del órgano. Esto lleva a la redistribución del flujo sanguíneo. La inhibición de estos mecanismos culmina en una vasoconstricción aguda, isquemia medular y en algunas ocasiones, la insuficiencia renal.



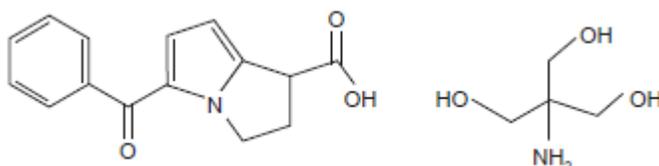
**Figura 4.** Principales efectos secundarios relacionados a la inhibición de las COX-1/COX-2. COX- ciclooxigenasa; PG - prostaglandina; Tx - tromboxano; GI – gastrointestinal; AR - arteriolar renal; FSG - flujo sanguíneo glomerular; IAM - infarto agudo de miocardio; ICC - insuficiencia cardiaca; IR- insuficiencia renal. Tomado de Batlouni, 2009.

## 1.4. KETOROLACO

El ketorolaco es uno de los más potentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) disponibles para uso clínico. Es frecuentemente utilizado para el dolor postoperatorio en pacientes hospitalarios y ambulatorios [20].

### 1.4.1. Estructura

Su nombre químico es el ácido ( $\pm$ )-5-benzoil-2, 3-dihidro-1*H*, pirrolizina-1-ácido carboxílico, 2-amino-2-(hidroximetil)-1, 3-propanediol-trometamina (**Figura 5**). Forma parte del grupo pirrozilina [21]. Dentro de sus vías de administración se encuentra la intravenosa, sublingual, intramuscular, oral, oftálmica, intranasal y cutánea [22].



**Figura 5.** Estructura química de ketorolaco-trometamina. Imagen tomada de Isiordia et al., 2010.

### 1.4.2. Farmacocinética

El ketorolaco es altamente soluble en agua por lo que se ha reportado que tiene una biodisponibilidad del 81 al 100% después de una administración oral. Por consiguiente, su acción es rápida ya que su efecto analgésico se presenta alrededor de los 10 minutos después de una administración IM o IV. Por el contrario, después de una administración oral, el efecto terapéutico se presenta cerca de los 30 minutos, por un tiempo aproximado de 1.5 a 4 horas. El ketorolaco se une altamente a proteínas por lo que su volumen de distribución es limitado. Sin embargo, el ketorolaco puede atravesar la placenta en un 10% [23].

➤ **Metabolismo y excreción**

El ketorolaco es metabolizado en el hígado, mediante glucoronidación y p-hidroxilación, se encuentra el 96% en la circulación en su forma activa como ketorolaco y el resto está presente como el metabolito inactivo (p-hidroxi ketorolaco). Tanto el ketorolaco como su metabolito es eliminado en un 90% en orina y el resto en heces, con un tiempo de vida media de eliminación de 4 a 6 horas [22, 24].

### 1.4.3. Farmacodinamia

➤ **Mecanismo de acción**

El mecanismo general del ketorolaco es la inhibición inespecífica de la COX- 1 y COX-2, las cuales median el paso inicial del metabolismo del AA hacia la producción de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Por otro lado, hay estudios que sugieren que dentro de su mecanismo de acción en el efecto antinociceptivo, está la inhibición de la síntesis del óxido nítrico, a través de la modulación de la expresión de la sintetasa de óxido nítrico endotelial, así como la liberación de opiáceos endógenos [25].

➤ **Efectos adversos**

Los efectos adversos del ketorolaco son similares a los otros AINEs. Incluyen sangrado intestinal, ulceración peptídica, falla renal, disfunciones hematológicas, inhibición de la agregación plaquetaria, entre otros [22, 26].

## **1.5. TERAPIAS**

### **1.5.1. Terapia preventiva**

Dentro del esquema de tratamiento para el dolor, está la administración combinada de AINEs con medicamentos supresores de ácido, como los inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, rabeprazol, pantoprazol, etc.) y antihistamínicos (ranitidina, cimetidina y famotidina). Esto con el objetivo de prevenir o disminuir los efectos secundarios generados por los mismos AINEs. Por otro lado, se ha visto que el uso prolongado de estos inhibidores puede generar otros efectos colaterales como la disbiosis, la cual se ha observado que llega a generar daño intestinal [17, 27].

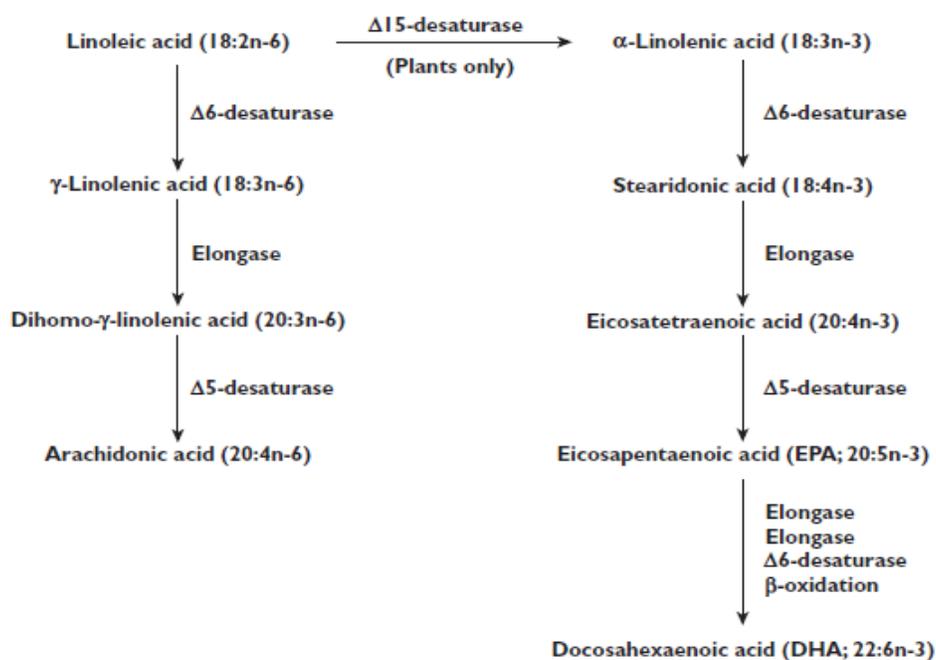
### **1.5.2. Terapia alternativa**

Por tal motivo, una de las estrategias actuales en la clínica para mejorar los efectos terapéuticos y disminuir los efectos secundarios es la administración combinada de dos o más medicamentos con el mismo efecto terapéutico, pero con diferente mecanismo de acción. El éxito de esta estrategia es gracias a que se consigue disminuir la dosis de cada medicamento. Además de que se logra cubrir un intervalo más amplio de padecimientos dolorosos de manera más eficiente.

Es por eso que actualmente hay muchos estudios donde se prueban moléculas con alto poder analgésico y antiinflamatorio combinadas con varios AINEs.

## 1.6. ÁCIDOS GRASOS

El consumo de grasa es un componente esencial en la dieta humana, pero mucha grasa o un desbalance en el tipo de grasas pueden tener efectos negativos en la salud o en el bienestar del individuo. El consumo crónico de calorías excesivas junto con una inactividad física promueve obesidad, diabetes y síndrome metabólico. Además, un consumo de ácidos grasos saturados (n-6) promueve una respuesta inflamatoria más exacerbada. En contraste, los ácidos grasos poli-insaturados PUFAs (omega-3) juegan un papel protector (**Figura 6**). Existen aproximadamente 6 tipos de omega-3 (n-3) dentro de los cuales 3, DHA, EPA y DPA han mostrado tener propiedades terapéuticas. Por ejemplo, en pacientes con intestino inflamado se ha visto que mejoran la mucosa intestinal y hay un menor número de recaídas. En pacientes con asma se ha observado que reduce la inflamación pulmonar y quimiotaxis de leucocitos. Por otro parte se ha visto en el modelo de rata, que protegen contra el daño gástrico inducido por la administración de diferentes AINEs [6, 16, 28].

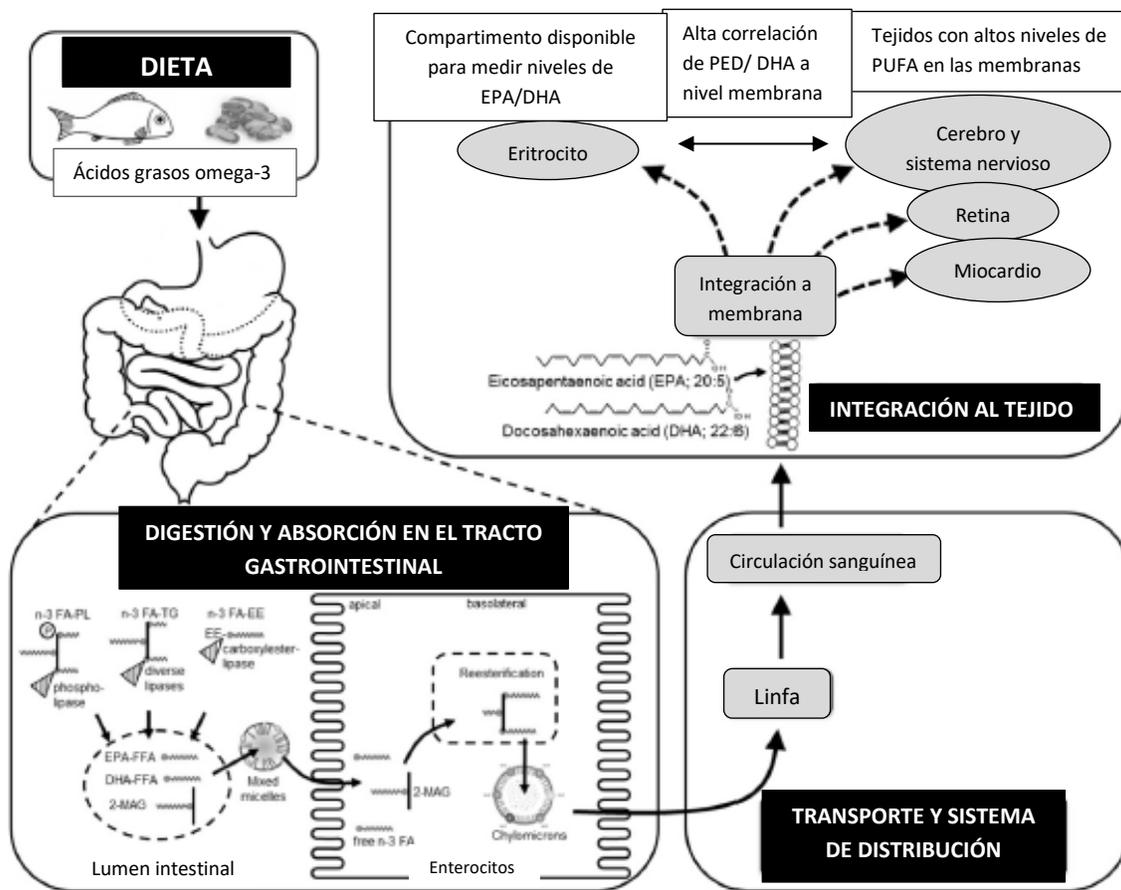


**Figura 6.** Metabolismo general de los ácidos grasos n-6 y n-3. Imagen tomada de Calder, 2012.

## 1.7. ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA)

El DHA es miembro de los omega-3 (n-3), lo cual indica que presenta un doble enlace carbono-carbono en la tercera posición respecto al grupo metil de la cadena del ácido poliinsaturado. El DHA no puede ser sintetizado de *ново* en el humano. Por tal motivo debe ser obtenido a partir de la dieta (pescado de agua fría, nueces y algunas semillas) o puede ser sintetizado en el organismo a partir del ácido linoleico (18:3 n-3) o del ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3).

El DHA que es obtenido a partir de la dieta tiene un proceso de absorción en el tracto gastrointestinal, para posteriormente ser transportado y distribuido al organismo como retina, cerebro, membranas celulares, entre otros (**Figura 7**) [29].



**Figura 7.** Metabolismo del DHA. Imagen modificada de Schuchardt y Hahn, 2013.

Estudios recientes en humanos y animales, han mostrado que presenta diferentes funciones, incluyendo efecto analgésico, antiinflamatorio, gastroprotector, neuroprotector y cardioprotector [30, 31]. Con varios mecanismos como la inhibición de la expresión de las moléculas de adhesión o la producción de resolvinas y protectinas, entre otros [6, 32].

## **1.8. MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES**

### **1.8.1. Clasificación**

Los modelos experimentales usados para evaluar el dolor cutáneo agudo y visceral agudo se pueden clasificar con base a las características físicas del estímulo nocivo [33]. De acuerdo a esta clasificación existen pruebas basadas en el uso de estímulos de corta y larga duración.

### **1.8.2. Pruebas basadas en el uso de estímulos de corta duración.**

Estas pruebas pueden subclasificarse dependiendo de su naturaleza: térmicas, mecánicas y químicas.

#### ➤ Pruebas basadas mediante estímulos térmicos

En estas pruebas, la piel es estimulada siempre térmicamente. Cabe mencionar que no implica la estimulación de tejido visceral o músculo esquelético. Dentro de los modelos térmicos más usados están: el retiro de la cola (tail-flick), retiro de la pata y plancha caliente (hot plate).

➤ Pruebas basadas mediante estímulos mecánicos

Las pruebas que actualmente se utilizan implican un estímulo progresivo o de una sola aplicación, así como el incremento gradual de la presión en alguna área del cuerpo, preferentemente la pata posterior y la cola del animal. Unas de las pruebas más utilizadas son: Randall y filamentos de von Frey.

➤ Pruebas basadas en un estímulo químico

En estos modelos se estimula químicamente alguna extremidad del animal como son: cola, pata, etc. Los agentes más usados son sustancias químicas irritantes. El comportamiento varía dependiendo de la especie, pero actualmente ya se encuentran bien validados los modelos [33].

### **1.8.3. Pruebas basadas en el uso de estímulos de larga duración**

Estas pruebas prácticamente implican la administración de un agente químico irritante como estímulo nociceptivo. Estas pruebas difieren de las de corta duración, debido a que no se determina un umbral nociceptivo, sino se cuantifica el curso temporal de la conducta que se observa después del estímulo.

➤ Inyecciones intraperitoneales de agentes irritantes

La exposición de agentes como: ácido acético, triptamina, acetilcolina, entre otros, irrita las membranas y genera una conducta estereotipada en los animales, la cual se caracteriza por contracciones abdominales, reducción en la actividad motora y movimientos en las extremidades. Esta prueba también se conoce como contorsión abdominal (writhing test) [4].

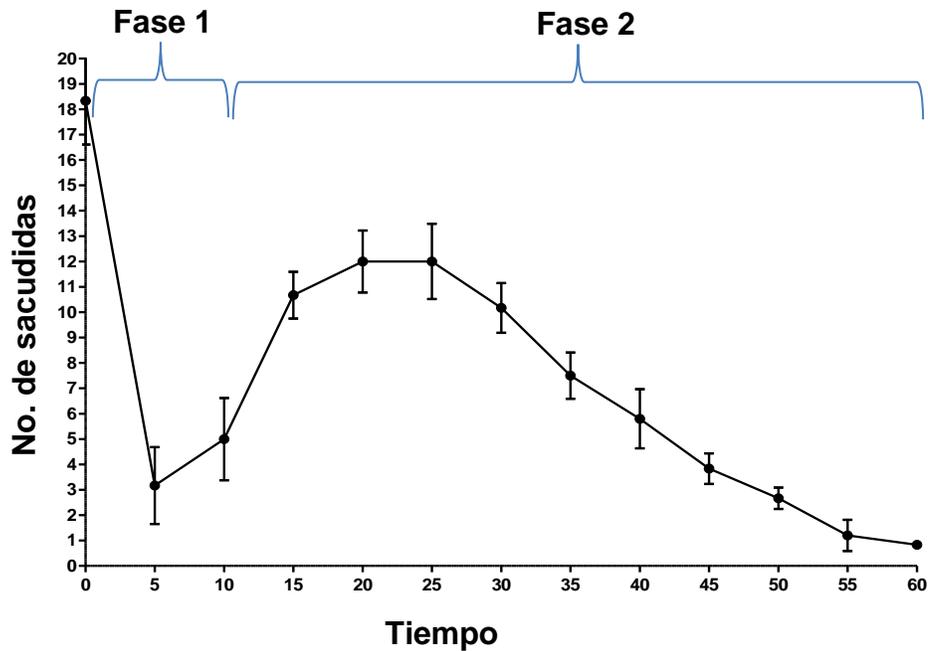
➤ Inyecciones intraplantares

La sustancia comúnmente usada es la formalina (formaldehído diluido); así como solución salina hipertónica, capsaicina, carragenina y adyuvante complemento de Freund.

1.8.4. Modelo de la formalina

La prueba de la formalina, en comparación a las demás pruebas comunes de nocicepción que están basadas en estímulos de corta duración, pero de alta intensidad, en las cuales la experiencia nociceptiva perdura poco tiempo, permite evaluar mecanismos modulatorios que pueden ser disparados por el mismo estímulo. La prueba de la formalina, en comparación, permite evaluar el modo en que el animal responde a un dolor de tipo moderado y continuo generado por un daño tisular [34]. Con base a lo anterior, se considera que esta prueba proporciona un modelo que se aproxima más al dolor clínico [35, 36]. Cabe mencionar que la respuesta producida por la formalina es solo uno de los componentes de la reacción inflamatoria inducida por este químico irritante. La prueba de la formalina produce respuestas nociceptivas cuantificables y reproducibles en varias especies, y con un patrón similar en la mayoría de las especies [37].

La respuesta conductual después de la inyección intraplantar de formalina es de tipo bifásica (**Figura 8**).



**Figura 8.** Curso temporal bifásico de la prueba de formalina

➤ Primera fase

Esta inicia después de la administración de este compuesto y tarda de 3 a 10 minutos. En esta fase se manifiestan conductas como: elevaciones, lamidas, sacudidas, mordisqueos y protección de la pata inyectada. Se ha sugerido que esta primera fase del modelo en roedores resulta de la interacción directa de la formalina con los nociceptores, generando la activación de las fibras aferentes tipo C, produciendo una rápida transmisión mono sináptica hacia las neuronas del asta dorsal de la médula espinal donde se provocan diversas reacciones como: incremento del glutamato y aspartato. Así mismo, se incrementan los niveles de taurina y glicina, aminoácidos inhibidores, posiblemente como mecanismo de protección [38].

➤ Segunda fase

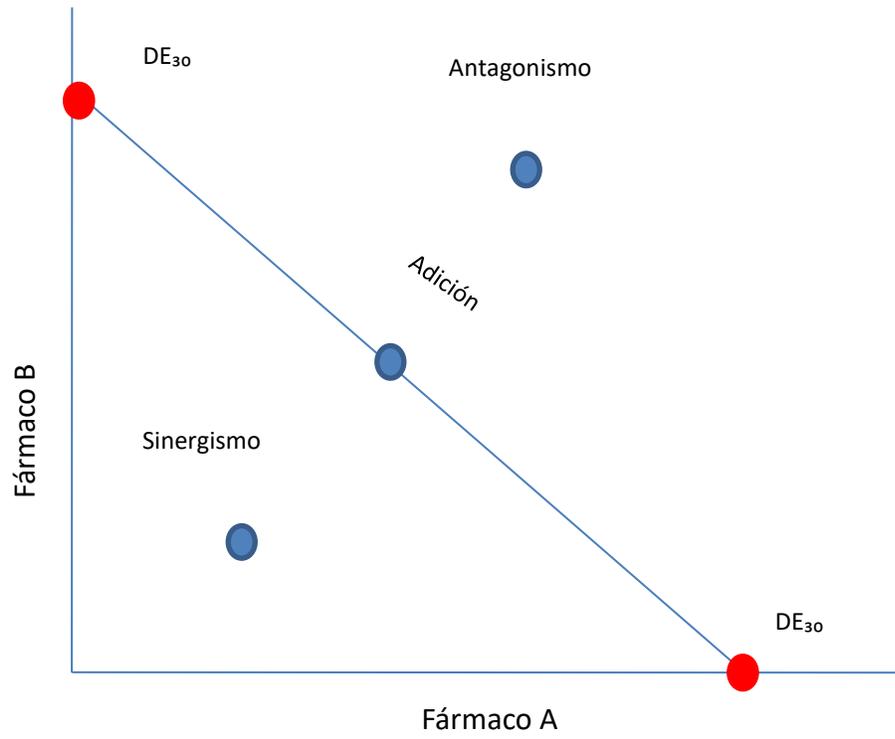
Posteriormente, hay un periodo de 10 a 15 minutos, donde los animales casi no muestran una conducta nociceptiva. Seguido a esto, se presenta la segunda fase, que inicia de los 15 a 60 minutos [34]. Se sugiere que esta fase está mediada por la combinación de una actividad escasa de las fibras aferentes y de un incremento de la sensibilidad de las neuronas de la médula espinal, así como, de un proceso inflamatorio [36, 38]. En esta fase está implicada la liberación de prostaglandinas, histamina (H1), serotonina (5-HT), entre otros [35, 39]. Por otra parte, se ha demostrado que para que se manifieste por completo la segunda fase, es necesario que se produzcan los procesos espinales, así como el proceso inflamatorio [34].

Existen varios factores que tienen que ser contemplados a la hora de realizar la prueba de la formalina. El primero es la temperatura, la cual se ha visto que al incrementar la temperatura del medio ambiente donde se desarrolla el experimento también se incrementa la respuesta nociceptiva del animal; se recomienda usar una temperatura alrededor de los 28°C. Por otro lado, es importante mantener un ambiente aislado de ruido ya que se podría confundir la respuesta nociceptiva [40].

## 1.9. ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO

Cuando se administran dos o más fármacos es necesario caracterizar el efecto que se está obteniendo de la combinación y una herramienta que lo permite es el isoblograma; el cual es un método gráfico que permite ver de manera visual la interacción que se esté efectuando de las dosis teóricas y de los pares experimentales; que pueden ser de tipo antagónico (subaditiva), aditivo y sinérgico o superaditiva (**Figura 9**) [41, 42].

El isoblograma se construye a partir de las dosis efectivas (DE20, DE30, DE50, etc.) que se usen para el análisis. Se grafica en el eje de las X, la DE del fármaco A y en el eje de las Y, la DE del fármaco B, que están unidas por una isobola o también llamada línea de aditividad, la cual representa visualmente todas las posibles dosis teóricas aditivas que pudieran presentarse. Esta isobola a su vez funciona como un parámetro de comparación con respecto a las DE experimentales, las cuales fueron obtenidas a partir de la administración de la combinación del fármaco A y el fármaco B, a una o más proporciones diferentes [43, 44]. El isoblograma se entiende de la siguiente manera, cuando la o las DE experimentales son graficadas por debajo de la isobola se dice que se obtiene un efecto sinérgico, si estas se grafican en la zona de la isobola se obtiene un efecto aditivo y por último, cuando las DE experimentales son graficadas por arriba de la isobola se dice que se obtiene un efecto antagónico. Aunado a esto se aplica un análisis estadístico (t de Student modificada) [45].



**Figura 9.** Representación gráfica de un isoblograma.

## 2. ANTECEDENTES

Los AINEs constituyen un grupo heterogéneo de medicamentos ampliamente utilizados, para el tratamiento de síntomas relacionados en diferentes padecimientos de dolor agudo (dolor de cabeza y dolor postoperatorio), y dolor crónico (artritis reumatoide, osteoartritis, y gota) [46]. A pesar de esto, su uso a largo plazo es limitado por presentar graves efectos secundarios (daño gastrointestinal, renal y problemas vasculares) [18, 47].

En la actualidad, los antagonistas de los receptores de histamina y los inhibidores de la bomba de protones, son prescritos con los AINEs como tratamientos profilácticos, pero estudios recientes han demostrado que el uso crónico de estas combinaciones desarrolla otras patologías [16].

Diversos reportes han comprobado que la administración de dos a más medicamentos con efectos similares son empleados en la clínica, permitiendo así, el uso de dosis más bajas de cada medicamento con el mismo o mejor efecto terapéutico disminuyendo los efectos secundarios [45]. Por consiguiente, diversos estudios han reportado la combinación de diferentes AINEs con opioides, analgésicos locales y otros agentes antinociceptivos donde además de mejorar la eficacia terapéutica han logrado una disminución en los eventos adversos. Un claro ejemplo es la administración sistémica del ketorolaco y local de tramadol, donde se muestra una interacción de potenciación (sinergismo) en el efecto antinociceptivo, en la segunda fase, en el modelo de la formalina en ratones [48]. De forma semejante se reportó que la administración de ketorolaco con morfina reduce los efectos secundarios del opioide (náuseas, vómito y sedación) con la misma eficacia analgésica que la administración única de morfina [49]. Así mismo, se ha reportado el sinergismo del efecto analgésico de la combinación de ketorolaco con vitamina B [50]. Bajo este esquema, la combinación de productos naturales con AINEs es en la actualidad una alternativa para optimizar los efectos antinociceptivos y antiinflamatorios sin agravar los efectos secundarios; por ejemplo, la combinación de naproxeno con frutas cítricas genera una potenciación del efecto terapéutico con

el menor daño gástrico [51]. De igual forma, se ha reportado un sinergismo del efecto antinociceptivo con alta seguridad gástrica, en la combinación de indometacina y ácido docosahexaenoico (DHA) [52].

De igual forma, se ha reportado en ratas Wistar un sinergismo del efecto antinociceptivo

### 3. Justificación

En la actualidad, no existe un tratamiento seguro y eficaz para el control del dolor y la inflamación a largo plazo, por lo que es un problema de salud pública, que genera grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son la piedra angular para el tratamiento de los diferentes tipos de dolor. Sin embargo, tanto los AINEs tradicionales como los de nueva generación (inhibidores de la ciclooxigenasa 2), están asociados a diferentes complicaciones como gastrointestinales, cardiovasculares y renales [18]. Por tal motivo, la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar el efecto terapéutico y minimizar los efectos secundarios aun continua y los productos naturales han mostrado ser buenos candidatos; en este sentido, se ha comprobado que el DHA tiene propiedades antiinflamatorias, antinociceptivas, gastro y cardioprotectoras [53]. Estudios recientes han demostrado que la administración combinada de DHA con otros AINEs como indometacina induce un efecto sinérgico en la antinocicepción con seguridad gástrica [52]. Pero si bien es cierto, no es posible generalizar este efecto con las demás posibles combinaciones con DHA. Por tal motivo, es necesario evaluar la eficacia y seguridad de otros AINEs como el ketorolaco mediante una administración combinada con DHA.

#### **4. HIPÓTESIS**

La administración combinada de ketorolaco y ácido docosahexaenoico (DHA) posee un efecto sinérgico en la respuesta antinociceptiva con alto margen de seguridad.

## **5. Objetivo**

### **5.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad farmacodinámica del efecto antinociceptivo y su seguridad gástrica de la combinación de ketorolaco-DHA en un modelo murino.

### **5.2. Objetivos particulares**

- Evaluar la dosis efectiva 30 ( $DE_{30}$ ) del efecto antinociceptivo de ketorolaco y DHA en el modelo de la formalina en ratas.
- Identificar la interacción farmacodinámica del efecto antinociceptivo de la combinación ketorolaco-DHA.
- Valorar la seguridad gástrica de la combinación ketorolaco-DHA en un modelo murino.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Animales de experimentación**

- Ratas Wistar hembras de 6 a 8 semanas de edad con un peso de 180 a 250 g.
- Los animales se mantuvieron en cajas con libre acceso al agua y con un ayuno de alimento de 14 horas antes del experimento.
- Se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz-oscuridad, a temperatura ambiente.
- Todos los experimentos se realizaron cumpliendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y siguiendo el “Programa Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV”. Asimismo, todos los experimentos se llevaron a cabo bajo las guías de “Estándares éticos para la investigación de dolor experimental en animales” [54].

### **6.2. Reactivos y Fármacos**

- Ketorolaco
- Ácido docosahexanoico (DHA)
- Formalina (1%)
- Aceite de oliva
- Solución salina

### **6.3. Modelo de Formalina**

- Cilindros transparentes de acrílico de 20 cm de diámetro por 40 cm de altura
- Termómetro
- Espejos de 30 cm de ancho por 45 cm de alto
- Agujas y jeringas

- Cronómetro y contador
- Calentador

#### **6.4. *Modelo de daño gástrico en ratas***

- Cámara fotográfica
- Programa ImageJ

#### **6.5. *Método experimental de nocicepción inducido por formalina***

El modelo experimental de formalina (**Figura 10**) se realiza en un cuarto ambientado a 27°C y aislado del ruido. Se coloca un cilindro sobre una mesa, el cual tiene dos espejos atrás formando un ángulo de 90° para facilitar la observación. La rata se coloca dentro de dicho cilindro y se deja en un periodo de adaptación de 30 minutos antes de iniciar el experimento. A continuación, es removida para la administración subcutánea de 50 µL de formalina diluida al 1% en la región subplantar de la pata trasera derecha. Acto seguido, se a cuantificar, el número de sacudidas de la pata durante un minuto cada cinco minutos durante el transcurso de una hora.

Se emplearon 4 grupos de animales (n=6) para caracterizar la curva dosis-efecto. El primer grupo recibió la administración oral de solución salina o aceite de oliva, siendo este el grupo control (vehículo). Al segundo grupo se le administró DHA (30-177.83 mg/kg, p.o.) 24 horas antes de la prueba de formalina. El tercer grupo recibió dosis crecientes de ketorolaco (0.1-3.0 mg/kg, p.o.) 10 minutos antes de la administración de formalina. Al grupo cuatro se le administró la combinación de ketorolaco-DHA en proporciones diferentes 1:1, 1:3 y 3:1 basadas en las fracciones (1/2, 1/4 y 1/8) de sus dosis efectivas (DE<sub>30</sub>), con sus respectivos tiempos de dosificación (DHA 24 horas y ketorolaco 10 min antes de la inyección de formalina). Se determinaron las DE<sub>30</sub> teóricas y experimentales de las combinaciones, para proceder a la identificación de la naturaleza de la interacción (potenciación, sumación o antagonismo) mediante el análisis isoblográfico. Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados por punción cardíaca [52].

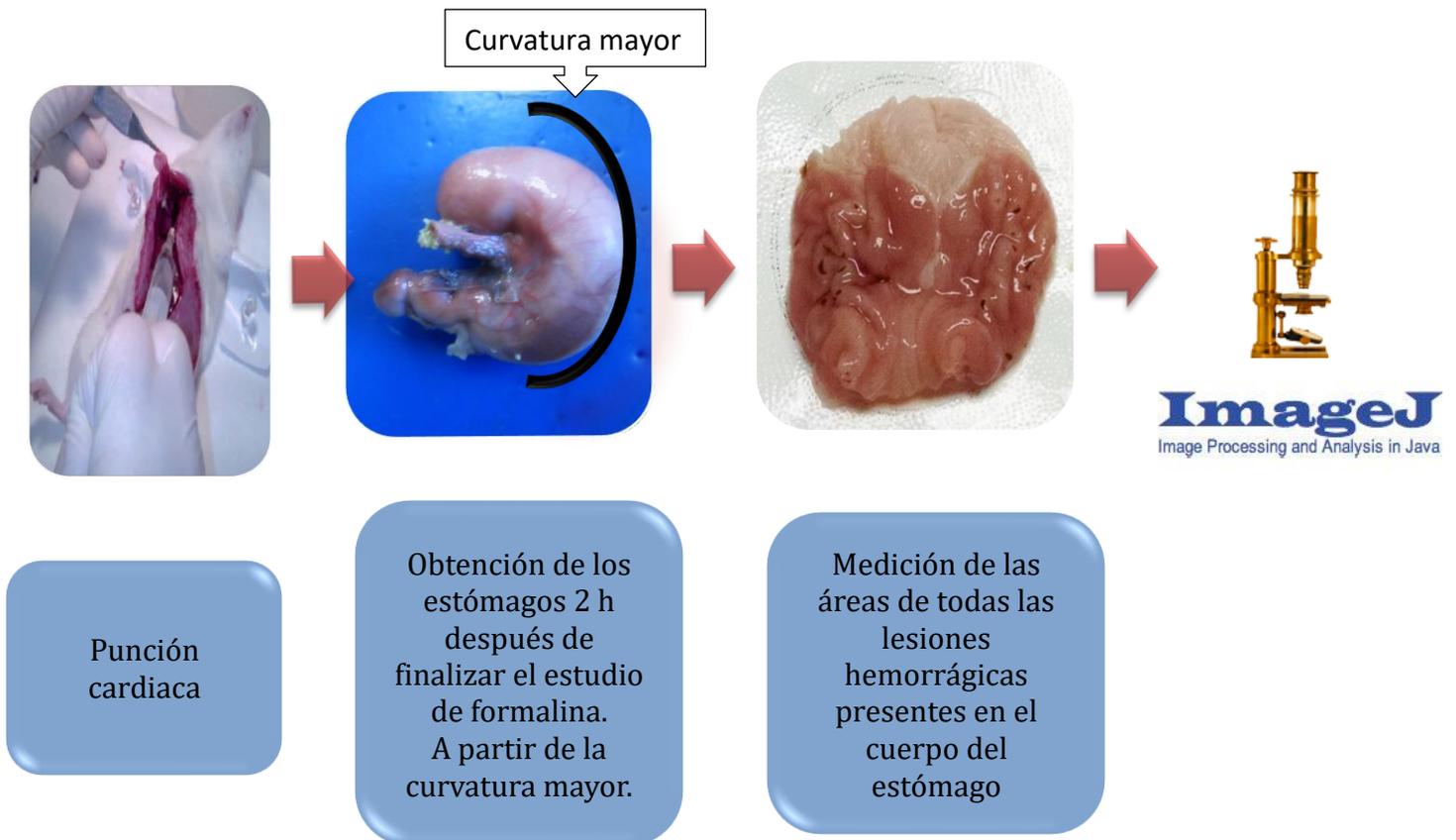


**Figura 10.** Metodología de la prueba de formalina al 1%.

## 6.6. Método de evaluación de daño gástrico

El daño gástrico se determinó en los grupos de animales que fueron sometidos al modelo de nocicepción inducido por formalina. Por consiguiente, se contó con los grupos que recibieron el vehículo, ketorolaco, DHA y la combinación de DHA-ketorolaco en sus diferentes proporciones.

Dos horas después de concluir el experimento de formalina se sacrificaron los animales para posteriormente realizar la extracción de los estómagos y la evaluación del daño gástrico mediante la medición de las áreas de todas las lesiones hemorrágicas presentes en el cuerpo del estómago, mediante el programa ImageJ [28, 52].



**Figura 11.** Metodología de la evaluación de daño gástrico.

## 6.7. Determinación de la interacción farmacológica de la combinación

Mediante el análisis isoblográfico se caracterizó la interacción farmacológica de la actividad antinociceptiva del DHA y ketorolaco.

A partir del número de sacudidas de la rata se obtuvo el porcentaje de antinocicepción que produjeron los fármacos, con respecto al grupo control (VEH) utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de Antinocicepción} = \left[ \frac{\sum \text{de sacudidas sin fármaco} - \sum \text{de sacudidas con fármaco}}{\sum \text{de sacudidas sin fármaco}} \right] * 100$$

Partiendo de las curvas dosis-efecto de los fármacos individuales se determinó la dosis efectiva 30 (DE<sub>30</sub>), la cual representa el 30% del efecto antinociceptivo producido por el fármaco, con base en estas DE<sub>30</sub> se determinó las dosis efectivas 30 teóricas (DE<sub>30</sub> T) de las diferentes combinaciones:

$$DE^{30}T = \left[ \frac{DE^{30}T \text{ DHA}}{2} + \frac{DE^{30}T \text{ Ketorolaco}}{2} \right]$$

Por otra parte, se calcularon las diferentes dosis para la combinación DHA-ketorolaco en sus diferentes proporciones (1:1, 1:3 y 3:1), mediante la función propuesta por Tallarida:

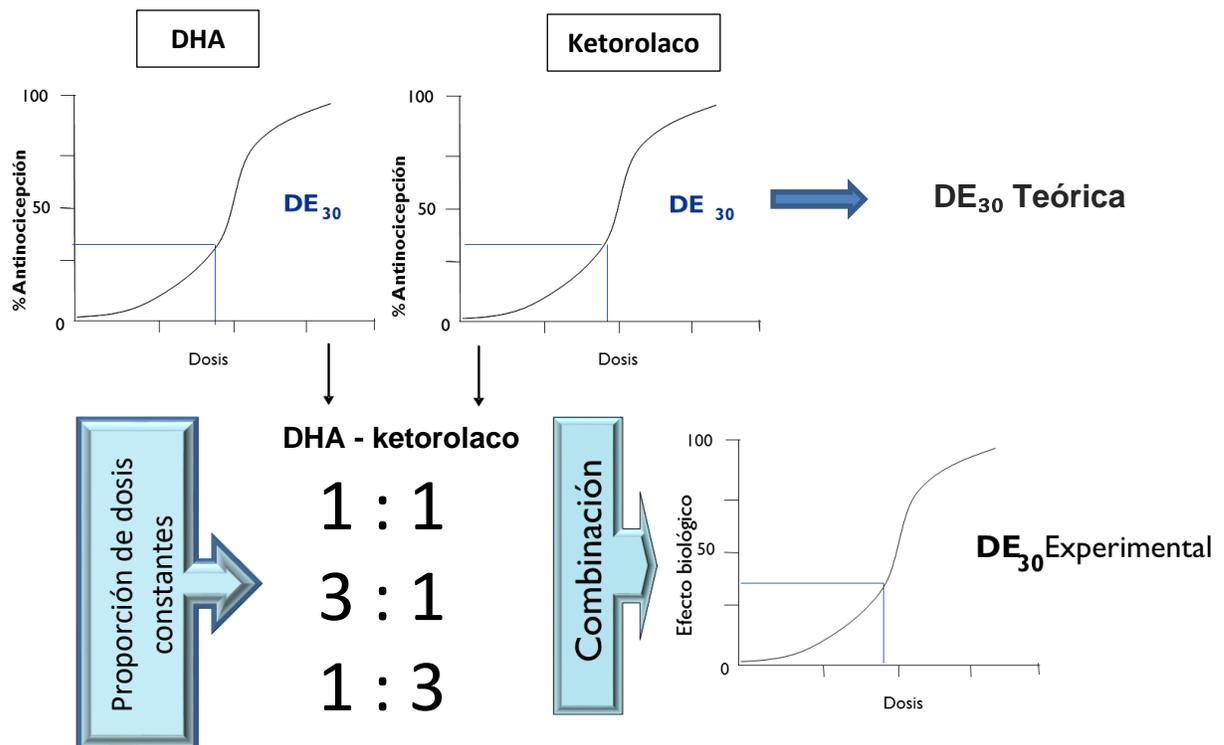
$$DE_{30} = f A + (1 - f) B$$

donde: f corresponde a la proporción del compuesto A (DHA) y 1-f corresponde a la proporción del compuesto B (ketorolaco).

<b>DHA- ketorolaco</b>
$\frac{DE_{30} (DHA) + DE_{30} (ketorolaco)}{2}$
$\frac{DE_{30} (DHA) + DE_{30} (ketorolaco)}{4}$
$\frac{DE_{30} (DHA) + DE_{30} (ketorolaco)}{8}$

**Tabla 1.** Cálculos para la obtención de las dosis de los fármacos a usar en la combinación DHA-ketorolaco, a diferentes proporciones, la dosis se obtiene sumando las  $DE_{30}$  y dividiéndolas en una progresión geométrica de razón  $\frac{1}{2}$ .

Posteriormente, se determinaron las curvas dosis-efecto antinociceptivo de la combinación DHA-ketorolaco en sus tres proporciones 1:1, 1:3 y 3:1 y mediante regresión lineal se calcularon las dosis efectivas 30 experimentales ( $DE_{30} E$ ) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Esquema del método para caracterizar el efecto de interacción farmacológica de dos fármacos.  $DE_{30}$  - dosis efectiva 30.

Por último, al obtener la  $DE_{30}$  teórica y la  $DE_{30}$  experimental, se determinó el índice de interacción ( $\gamma$ ) el cual se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\gamma = \frac{\text{Dosis del fármaco 1 en la } DE_{30} \text{ de la combinación}}{\text{DE}_{30} \text{ del fármaco 1 administrado individualmente}} + \frac{\text{Dosis del fármaco 2 en la } DE_{30} \text{ de la combinación}}{\text{DE}_{30} \text{ del fármaco 2 administrado individualmente}}$$

El valor del índice de interacción es una medida cuantitativa de la interacción entre dos fármacos y se entiende de la siguiente manera: valores de  $\gamma$  cercanos o iguales a 1 se dice que se tiene un efecto aditivo, valores menores a 1 implica un efecto sinérgico y valores por encima de 1 indica un efecto antagónico.

## 6.8. Análisis estadístico

Los datos de las curvas dosis-respuesta y de daño gástrico se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple Newman-Keuls realizadas con el programa GraphPad Prisma 5. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos que presentaron una  $p \leq 0.05$ .

## 7. Resultados

### 7.1. Actividad antinociceptiva

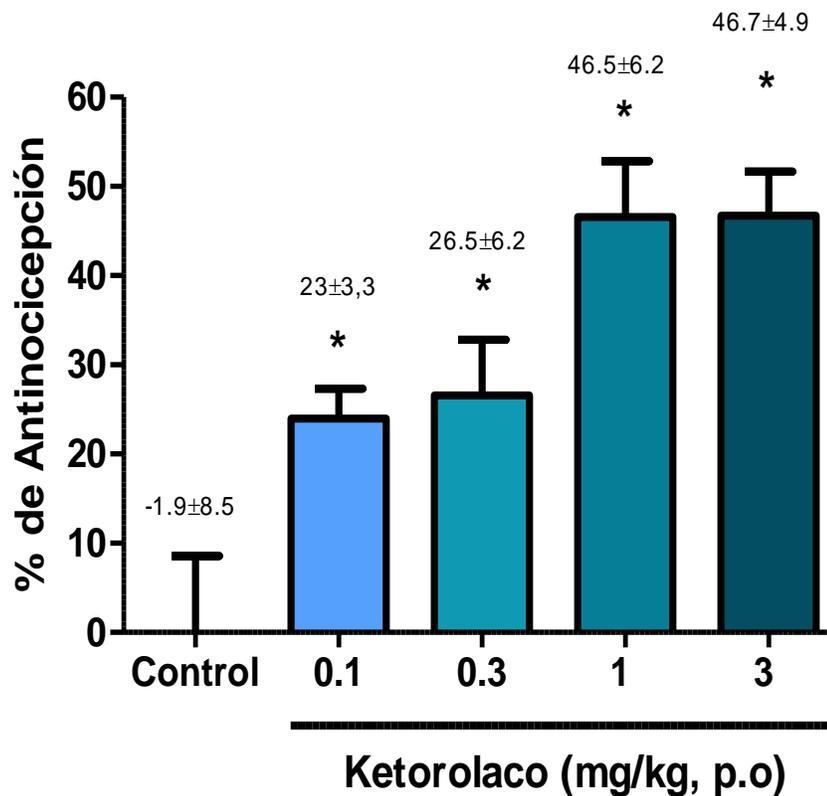
Se implementó el modelo experimental de nocicepción inducido por formalina al 1%, el cual produjo un comportamiento típico de sacudidas de tipo bifásico. La primera fase comienza inmediatamente después de la administración de formalina y gradualmente va disminuyendo hasta los 10 min. La segunda fase comienza cerca de los 15 min hasta aproximadamente 1 h, la cual fue analizada para fines de este estudio.

A partir del curso temporal se construyó las curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del DHA y ketorolaco (**Figura 12 y 13**). Mediante regresión lineal se obtuvieron los valores de las  $DE_{30}$  de los fármacos administrados individualmente.

## 7.2. Efecto antinociceptivo del ketorolaco y DHA

### 7.2.1. Curva dosis-respuesta del ketorolaco

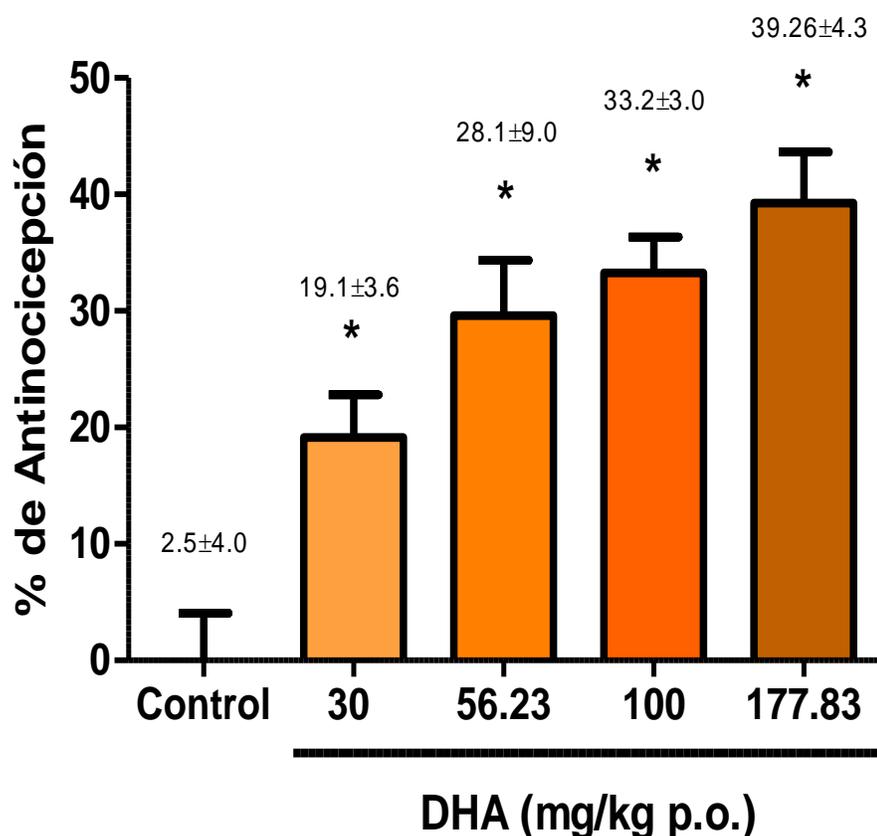
La administración oral de ketorolaco (0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg) 10 minutos antes del experimento redujo significativamente el comportamiento nociceptivo, caracterizado por el número de sacudidas de la pata después de la administración de formalina, en la segunda fase de la prueba (**Figura 13**).



**Figura 13.** Efecto antinociceptivo del ketorolaco en la prueba de la formalina al 1%. Las barras representan el promedio  $\pm$  S.E.M. (N=6), \*Diferencia significativa con respecto al control (solución salina),  $p < 0.05$  según lo determinado por el análisis ANOVA de una vía y Newman Keuls).

### 7.2.2. Curva dosis-respuesta del DHA

La administración oral del DHA (30, 56.23, 100 y 177.83 mg/kg) 24 horas antes de la prueba de formalina redujo el comportamiento nociceptivo de la segunda fase, caracterizada por el número de sacudidas de la pata derecha donde se realizó la administración local de formalina. Mientras que en la primera fase de la prueba los resultados fueron estadísticamente no significativos (**Figura 14**).



**Figura 14.** Efecto antinociceptivo del DHA en la prueba de la formalina al 1%. Las barras representan el promedio  $\pm$  S.E.M. (N=6), \*Diferencia significativa con respecto al vehículo (aceite de oliva),  $p < 0.05$  según lo determinado por el análisis ANOVA de una vía y Newman keuls).

A partir de las curvas dosis-respuesta del DHA y Ketorolaco, se realizó una regresión lineal para la obtención de las  $DE_{30}$  de los fármacos administrados individualmente, con sus respectivos errores estándar.

---


$$DE_{30} \text{ DHA} = 71.84 \pm 6.3 \text{ mg/kg, p.o.}$$

---


$$DE_{30} \text{ Ketorolaco} = 0.2559 \pm 0.10 \text{ mg/kg, p.o.}$$


---

### 7.3. Efecto antinociceptivo de la combinación DHA-ketorolaco en las tres proporciones diferentes (1:1, 1:3 y 3:1)

Una vez obtenidas las  $DE_{30}$  para ambos agentes: DHA y ketorolaco. Se diseñaron las combinaciones DHA-ketorolaco manteniendo las proporciones constantes de los agentes, en cada una de las combinaciones (1:1, 1:3 y 3:1) (**Tabla 2**).

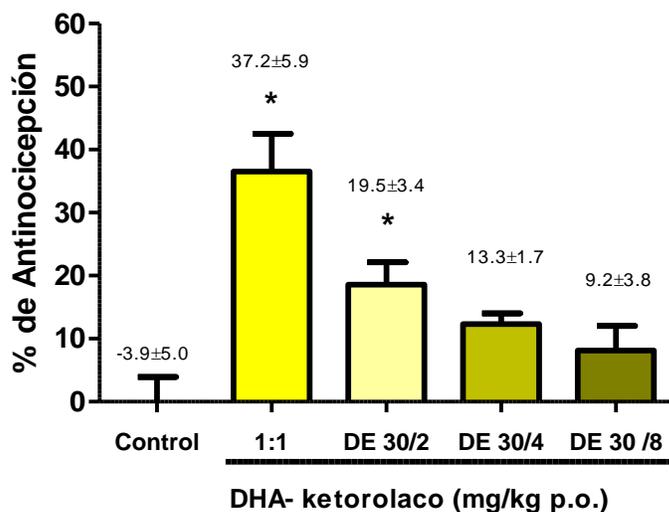
Proporción 1:1	DHA en la combinación (mg/kg)	Ketorolaco en la combinación (mg/kg)	Dosis total de la combinación (mg/kg)
$DE_{30} = 0.5 (DE_{30} \text{ DHA}) + (1 - 0.5) (DE_{30} \text{ ketorolaco})$	35.924	0.127	36.05
$\frac{DE_{30} (\text{DHA}) + DE_{30} (\text{ketorolaco})}{2} =$	17.96	0.063	18.02
$\frac{DE_{30} (\text{DHA}) + (DE_{30} (\text{ketorolaco}))}{4} =$	8.98	0.031	9.01
$\frac{DE_{30} (\text{DHA}) + (DE_{30} (\text{ketorolaco}))}{8} =$	4.49	0.015	4.50

Proporción 1:3	DHA en la combinación (mg/kg)	Ketorolaco en la combinación (mg/kg)	Dosis total de la combinación (mg/kg)
$DE_{30} = 0.25 (DE_{30} \text{ DHA}) + (1 - 0.25) (DE_{30} \text{ ketorolaco})$	17.96	0.191	18.15
$\frac{DE_{30} \text{ (DHA)} + DE_{30} \text{ (ketorolaco)}}{2} =$	8.98	0.095	9.07
$\frac{DE_{30} \text{ (DHA)} + (DE_{30} \text{ (ketorolaco)})}{4} =$	4.49	0.047	4.53
$\frac{DE_{30} \text{ (DHA)} + (DE_{30} \text{ (ketorolaco)})}{8} =$	2.24	0.023	2.26
Proporción 3:1	DHA en la combinación (mg/kg)	Ketorolaco en la combinación (mg/kg)	Dosis total de la combinación (mg/kg)
$DE_{30} = 0.75 (DE_{30} \text{ DHA}) + (1 - 0.75) (DE_{30} \text{ ketorolaco})$	53.88	0.063	53.94
$\frac{DE_{30} \text{ (DHA)} + DE_{30} \text{ (ketorolaco)}}{2} =$	26.94	0.031	26.97
$\frac{DE_{30} \text{ (DHA)} + (DE_{30} \text{ (ketorolaco)})}{4} =$	13.47	0.015	13.48
$\frac{DE_{30} \text{ (DHA)} + (DE_{30} \text{ (ketorolaco)})}{8} =$	6.73	0.007	6.74

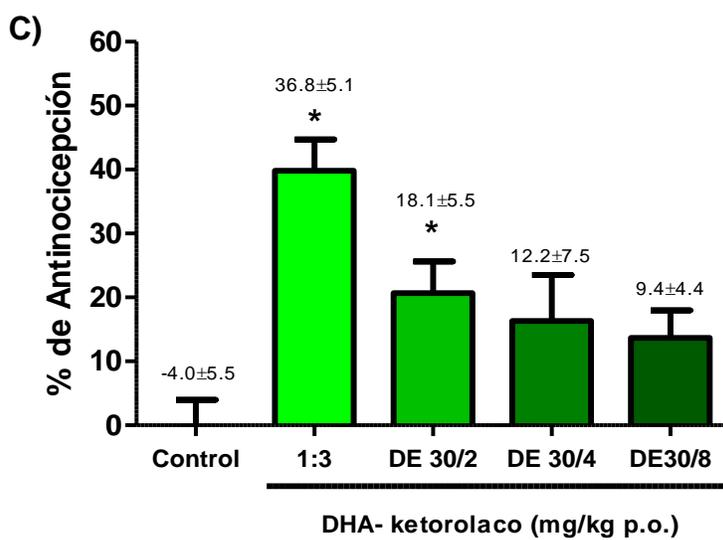
**Tabla 2.** Dosis utilizadas en la combinación DHA-ketorolaco en las tres proporciones diferentes 1:1, 1:3 y 3:1.

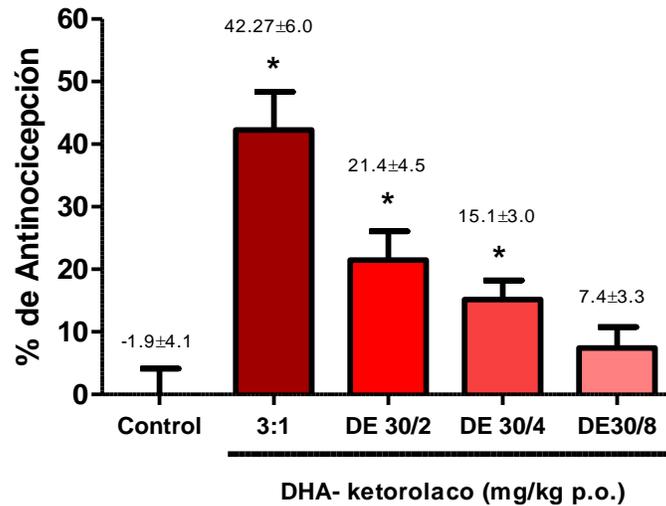
La administración de las combinaciones redujo significativamente el efecto antinociceptivo de la segunda fase del modelo de nocicepción inducido por formalina. Se realizaron las curvas dosis-efecto antinociceptivo de la combinación DHA-ketorolaco en las tres proporciones diferentes 1:1, 1:3 y 3:1 (**Figura 15**).

A)



B)





**Figura 15.** Curvas dosis-efecto de la combinación DHA-ketorolaco de la segunda fase de la prueba de formalina al 1%. A) Combinación DHA-ketorolaco en la proporción 1:1. B) Combinación DHA-ketorolaco en la proporción 1:3. C) Combinación DHA-ketorolaco en la proporción 3:1. Las barras representan el promedio ± S.E.M. (N=6), \*Diferencia significativa con respecto al control (aceite de oliva),  $p < 0.05$  según lo determinado por el análisis ANOVA de una vía y Newman Keuls).

### 7.3.1. Índice de interacción

Al contar con la DE<sub>30</sub> T y la DE<sub>30</sub> E fue posible obtener el índice de interacción (**Tabla 3**).

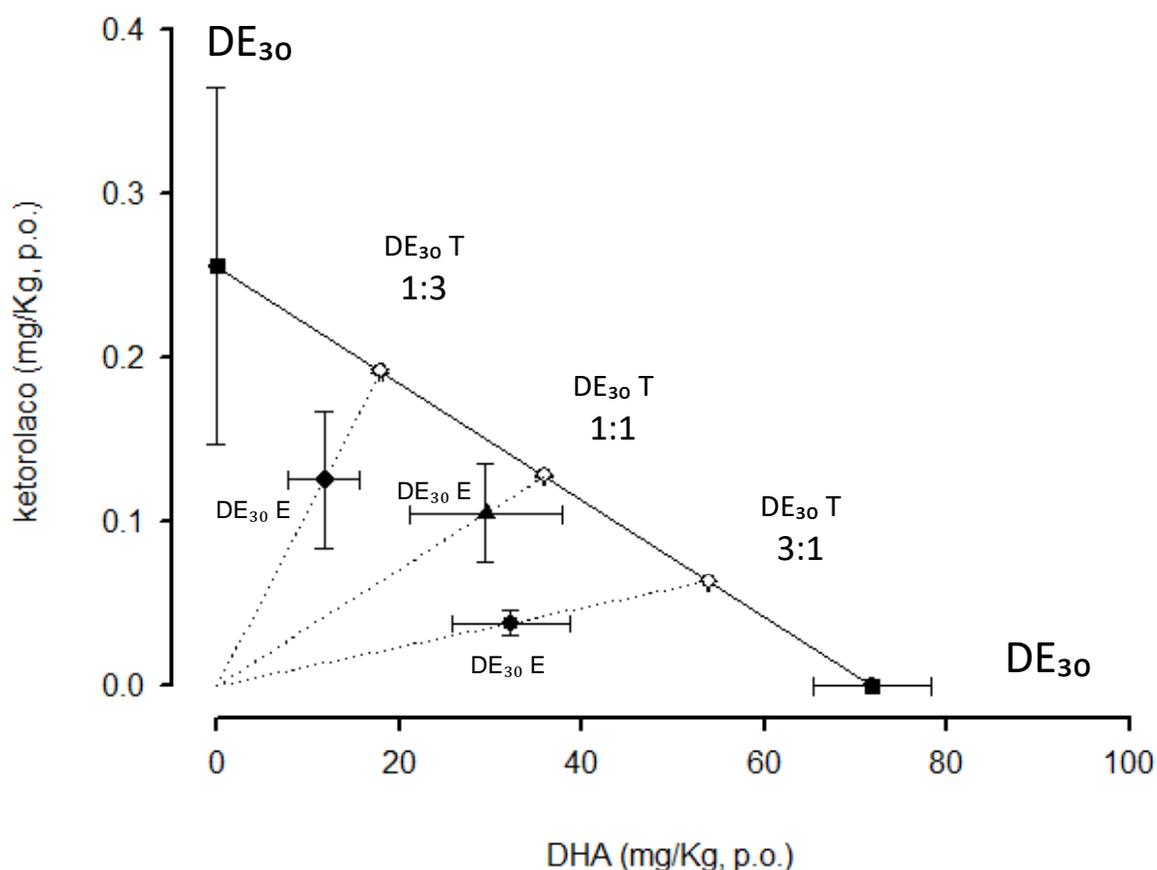
DHA-ketorolaco	DE <sub>30</sub> Teórica (Zadd)	DE <sub>30</sub> Experimental (Zexp)	Índice de interacción
<b>1:1</b>	36.05±3.19	29.60±8.47	<b>0.8212</b>
<b>1:3</b>	18.15±1.60	11.89±3.93	<b>0.6564</b>
<b>3:1</b>	53.95±4.79	32.28±6.39	<b>0.5983*</b>

**Tabla 3.** Comparación de las DE<sub>30</sub> T y DE<sub>30</sub> E con sus respectivos ± S.E.M. Índice de interacción de las combinaciones DHA-ketorolaco. \*Diferencia significativa entre DE<sub>30</sub> T y DE<sub>30</sub> E, p≤0.05.

El índice de interacción de la combinación de DHA-ketorolaco fue menor a 1 en todas las proporciones (1:1, 1:3 y 3:1). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, solo la proporción 3:1 mostró tener un efecto sinérgico, mientras que las proporciones 1:1 y 1:3 presentaron un efecto aditivo.

#### 7.4. Análisis Isoblográfico de la interacción antinociceptiva entre la combinación DHA-ketorolaco en sus diferentes proporciones.

La representación gráfica de la interacción entre DHA y ketorolaco en sus diferentes proporciones (1:1, 1:3 y 3:1) se puede ver claramente en el isoblograma (**Figura 16**), en todos los casos, las  $DE_{30}$  E caen por debajo de la isobola, indicando la presencia de una interacción sinérgica. Pero cabe señalar que a la hora de realizar el análisis estadístico, solo la proporción 3:1 presentó un efecto sinérgico, mientras que las proporciones 1:1 y 3:1 mostraron un efecto aditivo.

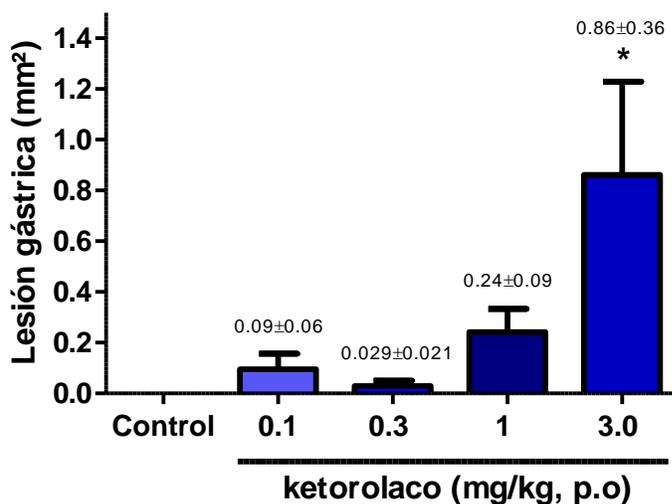


**Figura 16.** Isoblograma de la interacción farmacológica entre DHA-ketorolaco del efecto antinociceptivo de la prueba de formalina (fase II). Los valores de la  $DE_{30}$  para DHA y ketorolaco con sus respectivos errores estándar (■). Los puntos (o) corresponde a las  $DE_{30}$  teóricas de las diferentes proporciones 1:1, 1:3 y 3:1. De igual forma, los valores correspondientes de las  $DE_{30}$  experimentales de las proporciones 1:1 (▲) 1:3 (◆) y 3:1(●). Los datos se muestran con el promedio  $\pm$ SEM (N=6), \*  $p < 0.05$  (ANOVA de una vía y prueba de Newman-Keuls).

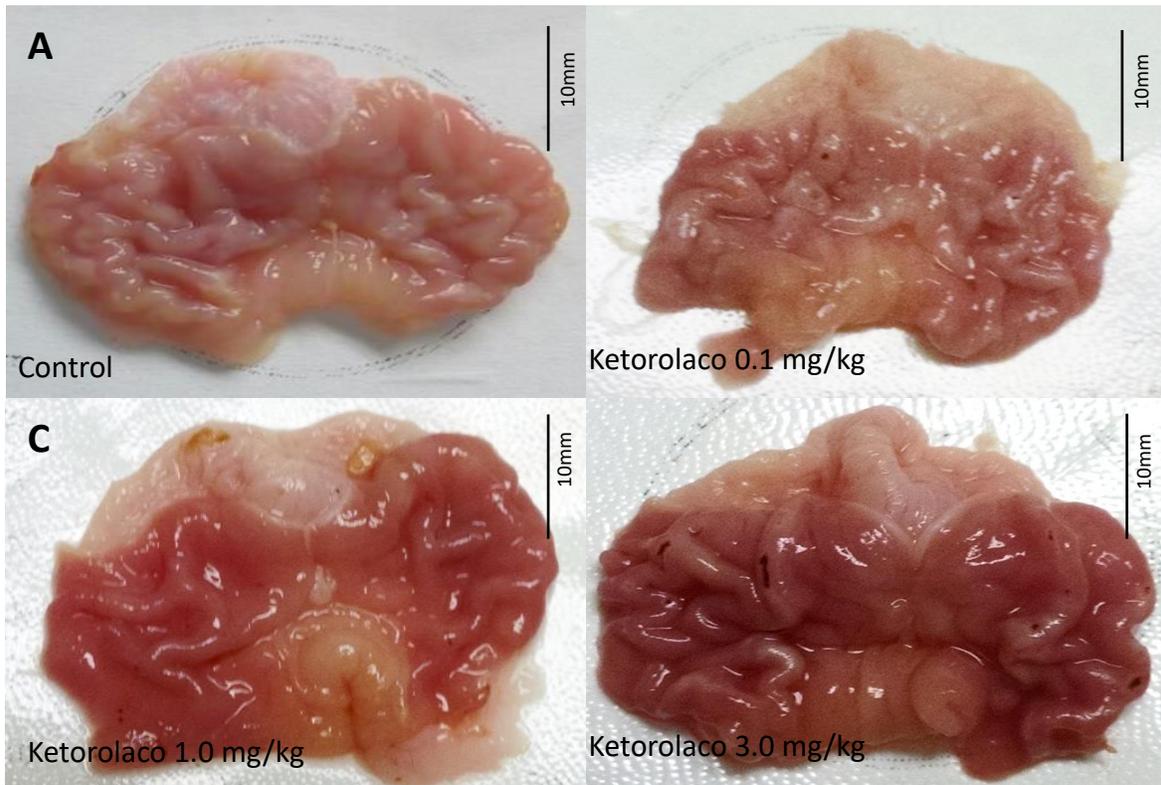
## 7.5. Seguridad gástrica

### 7.5.1. Efecto gástrico generado por el ketorolaco

Como se puede observar en la **Figura 17**, todas las dosis administradas de ketorolaco registraron daño gástrico, especialmente la dosis 3.0 mg/kg, la cual fue estadísticamente significativa. Esto se puede corroborar con las imágenes representativas de los estómagos (**Figura 18**).



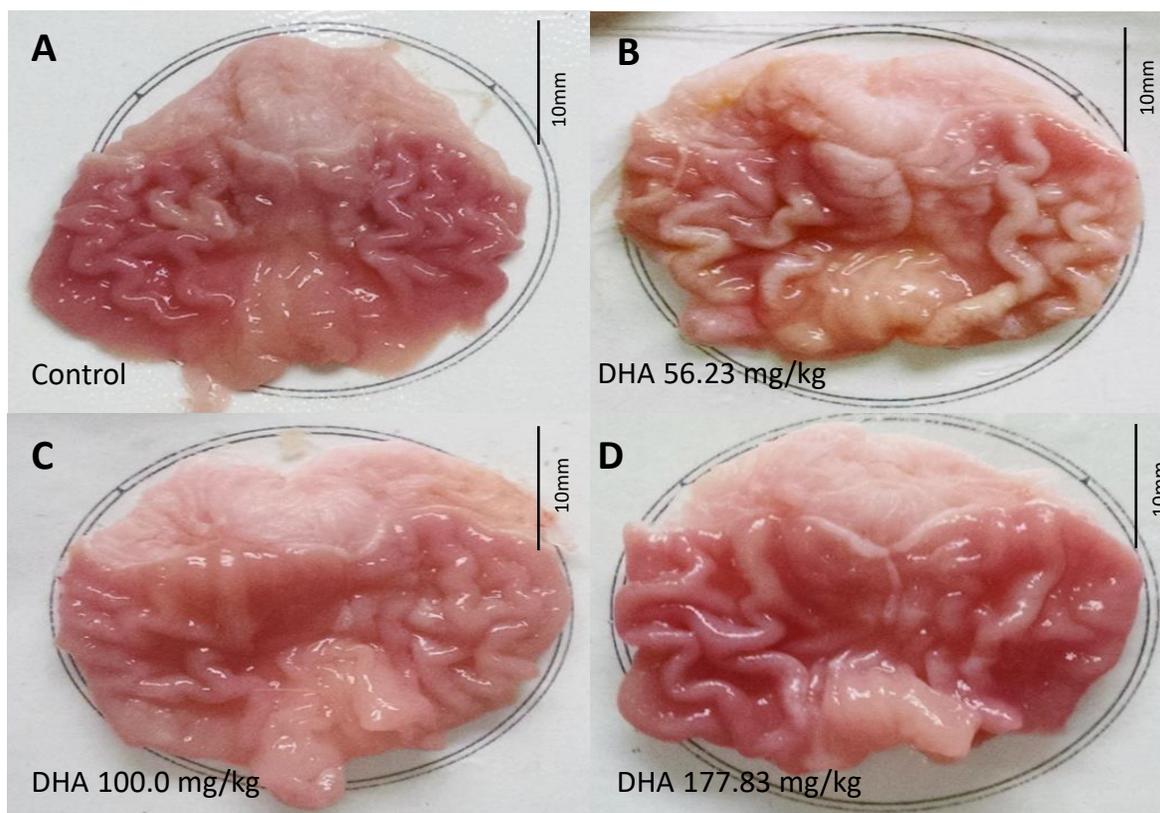
**Figura 17.** Daño generado por la administración de ketorolaco (0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg p.o.). Las barras representan el promedio ± S.E.M. (N=6), \*Diferencia significativa con respecto al vehículo (solución salina),  $p < 0.05$  según lo determinado por el análisis ANOVA de una vía y Newman Keuls).



**Figura 18.** Imágenes representativas de las lesiones gástricas generadas por los diferentes tratamientos de ketorolaco vía oral (A) Control, (B) Ketorolaco 0.1 mg/kg, (C) Ketorolaco 1.0 mg/kg y (D) Ketorolaco 3.0 mg/kg.

### 7.5.2. Seguridad gástrica generada por el DHA

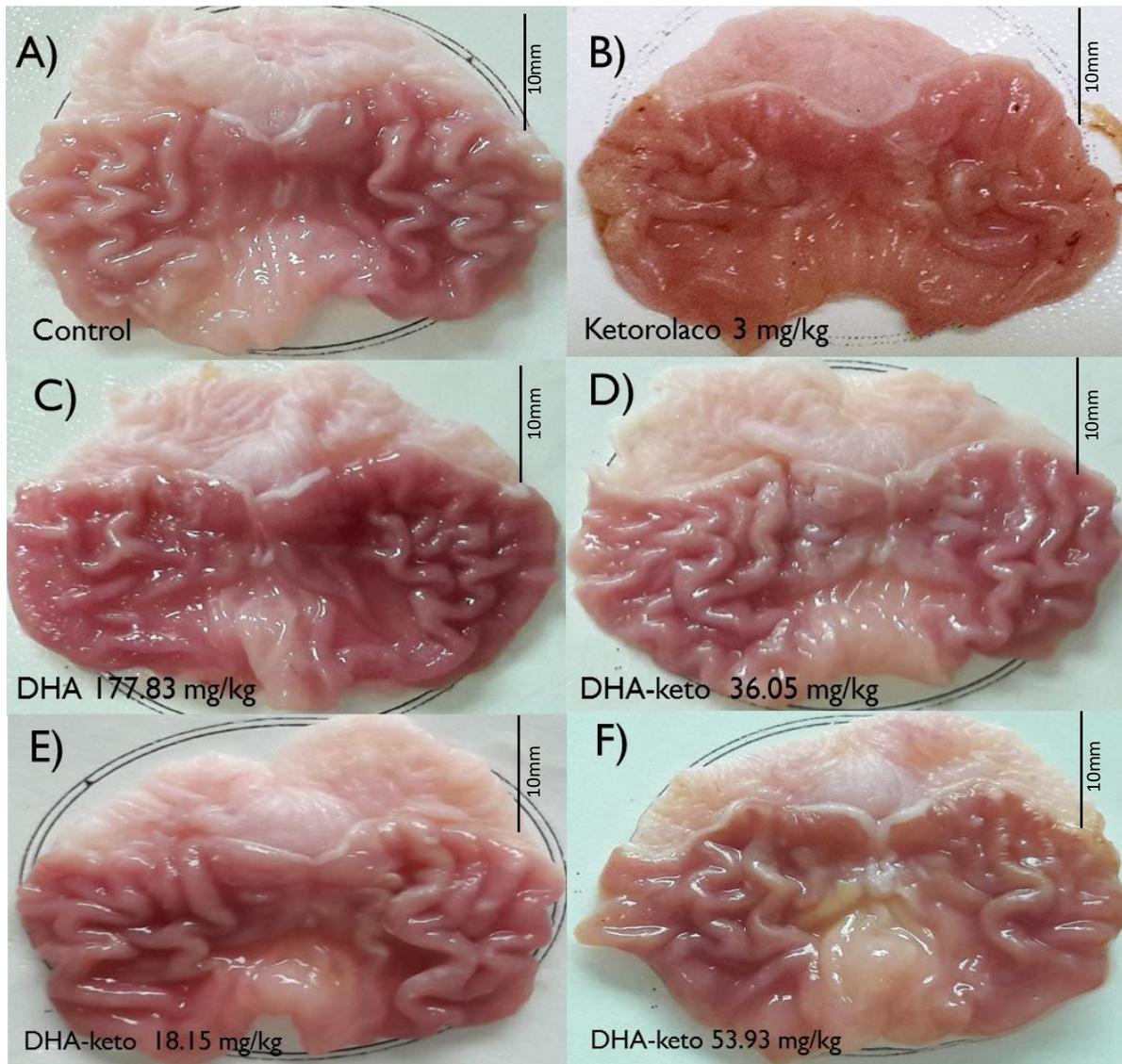
El DHA fue administrado en dosis crecientes (30, 56.23, 100 y 177.83 mg/kg) 24 horas antes de la prueba de formalina. De la misma forma, se realizó la extracción y disección de los estómagos y se procedió al análisis del daño gástrico mediante el software Image J. Como se puede apreciar en la **Figura 19** todos los grupos de animales a los cuales se les administró DHA por vía oral, no mostraron presencia de daño gástrico.



**Figura 19.** Imágenes representativas del efecto gástrico generado por el DHA en sus diferentes tratamientos vía oral (A) Control, (B) DHA 56.23 mg/kg, (C) DHA 100 mg/kg y (D) DHA 177.83 mg/kg.

### 7.5.3. Seguridad gástrica generada por la combinación DHA-ketorolaco

La evaluación de la seguridad gástrica de la combinación DHA-ketorolaco se realizó en las tres proporciones 1:1, 1:3 y 3:1. De igual forma, los estómagos de los animales fueron removidos y diseccionados, para luego ser analizados mediante el software (*Image J*). Como se puede apreciar en la **Figura 20** no hubo presencia de daño gástrico en las tres proporciones.



**Figura 20.** Láminas representativas del efecto gástrico inducido por los diferentes tratamientos. A) Control. B) Ketorolaco (3 mg/kg). C) DHA (177.83 mg/kg). D) DHA-ketorolaco proporción 1:1. E) DHA-ketorolaco proporción 1:3. F) DHA-ketorolaco proporción 3:1.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Evaluación del efecto antinociceptivo

En el presente estudio, los resultados obtenidos de la administración sistémica de ketorolaco (0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg) 10 minutos antes de la prueba de formalina, redujeron considerablemente la respuesta nociceptiva, mostrando efectos del 23 al 46.7 %, lo que concuerda con lo descrito por Medina-Santillán y colaboradores. El efecto antiinflamatorio y antinociceptivo reportado por el ketorolaco ha sido atribuido principalmente a la inhibición de la COX, impidiendo la síntesis de prostaglandinas, las cuales están involucradas en la respuesta nociceptiva producida por la formalina en la fase II.

En este estudio se corroboró el efecto antinociceptivo reportado por la administración oral del DHA [31]. Por otra parte, el efecto antinociceptivo obtenido por la administración única de DHA, es compatible con lo reportado por Arroyo- Lira y colaboradores en el 2014, donde el DHA generó un efecto antinociceptivo del 40 %; pero cabe resaltar que este efecto se obtuvo con una dosis de 300 mg/kg, que es superior a la usada en este estudio (177.83 mg/kg) esto pudiera ser debido a que en su metodología se administró 14 h y no 24 h antes de la prueba de formalina. Esta discrepancia de los resultados podría generarse por el proceso de absorción e integración del DHA a los tejidos, ya que se sabe que el DHA al introducirse a las membranas, modifica la composición las balsas lipídicas, las cuales son complejos proteicos capaces de desencadenar una respuesta nociceptiva o inflamatoria más exacerbada [6, 29].

## 8.2. Interacción entre DHA-ketorolaco

La interacción de la combinación entre el DHA y ketorolaco quedó demostrada a través del análisis isobolográfico, el cual reveló que las proporciones 1:1 y 1:3 presentaron un efecto aditivo, mientras que la proporción 3:1 generó un efecto sinérgico, este efecto es de gran interés ya que se logra disminuir las dosis del AINE y potenciar el efecto terapéutico.

El efecto del ketorolaco en combinación con otras moléculas como el complejo B en un modelo de formalina en rata es también mencionado, encontrándose un sinergismo de la combinación en una proporción 1:1 [50]. De igual manera, se ha reportado un efecto sinérgico en la combinación de ketorolaco-tramadol, usando un modelo de artritis en rata [55]. Del mismo modo se ha reportado el mismo efecto de la combinación ketorolaco-tramadol mediante un modelo de formalina en ratón [21].

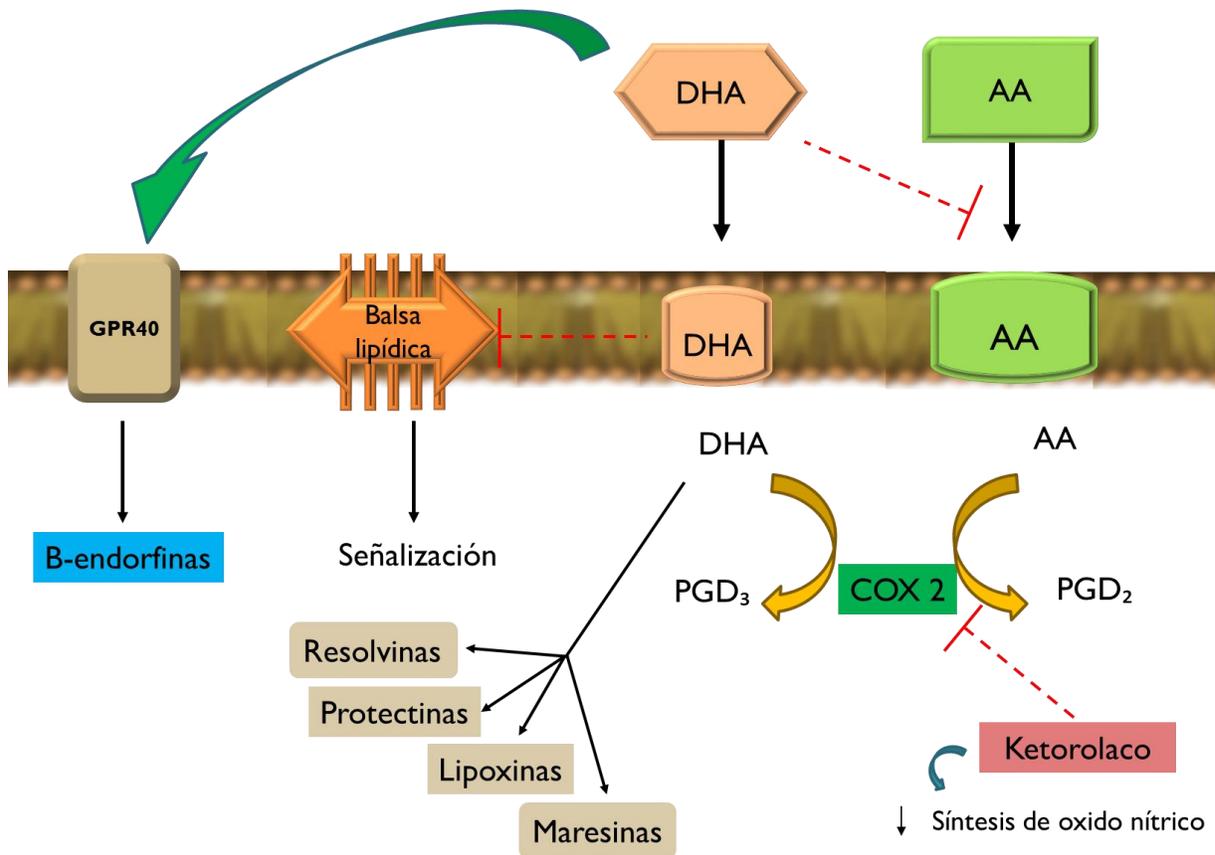
Este estudio pone de manifiesto que la sinergia entre el DHA-ketorolaco es, al menos en parte, generada por la actividad inhibitoria de la síntesis de prostaglandinas por parte del ketorolaco. Además, hay reportes donde se propone que el ketorolaco disminuye la síntesis del óxido nítrico, a partir de la regulación a la baja de la enzima sintetasa de óxido nítrico endotelial, que está relacionada con la migración de leucocitos al foco inflamatorio, favoreciendo así el proceso doloroso [25]. Estos mecanismos pudieran estar participando con los mecanismos reportados del DHA y así estar generando el sinergismo de la combinación.

Actualmente, hay muchos reportes de la capacidad antinociceptiva y anti-inflamatoria del DHA; en estudios recientes se propone que el efecto antinociceptivo inducido por el DHA es a través de la liberación de  $\beta$ -endorfinas, que es mediado por la señalización de los GPR40, el cual es parte de una gran familia de receptores que pueden ser activados por algunos ácidos grasos [31, 32, 56]. Por otro lado, el DHA tiene la capacidad de integrarse a las membranas lipídicas de las células, generando cambios en la composición de éstas. Las membranas lipídicas son ricas en AA, pero cuando se modifica la dieta aumentando más el consumo de omega-3

estos valores se modifican aumentando los niveles de DHA y EPA y disminuyendo los niveles de AA, esto mediante un proceso de competitividad. Este proceso involucra un cambio en la respuesta inflamatoria, ya que modifica la biodisponibilidad de los sustratos para generar prostaglandinas, en el caso del AA y resolvinas, protectinas, lipoxinas y maresinas, en el caso del DHA, que muchas veces funcionan como agonistas parciales de receptores involucrados en la respuesta nociceptivas [29, 53, 57].

Las resolvinas D1 (RvD1) tienen la capacidad de interactuar con los canales iónicos TRPV3, TRPV4 y TRPA1, los cuales están involucrados en la respuesta nociceptiva ante estímulos térmicos y químicos [58], así como se ha visto que la protectina D1 (PD1) tiene la capacidad de interactuar con los receptores CCR5 presentes en células inmunes, promoviendo el cambio del estado M1 pro-inflamatorio a un estado M2 resolutivo [59, 60].

Esta sinergia, si bien requiere ser completamente dilucidada, la suma de los mecanismos de acción ya reportados tanto del DHA como para el ketorolaco pudieran estar generando esta respuesta biológica (**Figura 21**).



**Figura 21.** Posibles mecanismos involucrados en el efecto sinérgico de la combinación DHA-ketorolaco.

### 8.3. Evaluación de la seguridad gástrica

Los resultados de la evaluación del daño gástrico inducido por el tratamiento previo del ketorolaco (0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg) (**Figura 18**), corresponden con el comportamiento reportado por la administración de éste y otros AINEs tradicionales [15, 26, 61]. Dicho daño es característico por desarrollar lesiones hemorrágicas en el cuerpo del estómago y este a su vez, se presenta de manera dosis-dependiente. Cabe mencionar que el mecanismo por el cual los AINEs generan el daño gástrico es atribuible a la inhibición de las síntesis de ciertas prostaglandinas como la PGE<sub>2</sub>, la cual está implicada en la formación del mucus y secreción de bicarbonato, y en la regulación de la secreción ácida [16, 26]. Aunado a esto, está la participación del

sistema inmune en el sitio de la lesión, a través de la expresión de moléculas de adhesión inducidas por citocinas como el TNF $\alpha$ , generando una disminución del flujo sanguíneo de las células epiteliales y promoviendo su muerte celular [15], de tal forma que estos mecanismos juegan un papel importante en la formación de dicho daño.

Del mismo modo se evaluó el efecto gástrico inducido por la administración de DHA (0.1, 0.3, 1 y 3 mg/kg p.o.) 24 horas antes de la prueba de formalina. En comparación con los resultados obtenidos por la administración única de ketorolaco, el DHA no desarrolló daño gástrico (**Figura 19**), lo que concuerda con la literatura ya que se ha reportado que el DHA tiene propiedades gastroprotectoras, esto se pudo constatar con los resultados obtenidos de la evaluación gástrica de la combinación DHA-ketorolaco en sus tres proporciones diferentes 1:1, 1:3 y 3:1, ya que no se encontró la presencia de tal daño (**Figura 20**). Estos resultados son comparables con los obtenidos por Pineda-Peña y colaboradores en el 2012, donde evaluaron el efecto gastroprotector del DHA en un modelo de daño gástrico inducido por indometacina (30 mg/kg, p.o.), en el cual encontraron que el DHA es capaz de revertir las lesiones gástricas inducidas por la indometacina de manera dependiente de la dosis. Además, Arroyo- Lira y colaboradores en el 2014 caracterizaron la combinación de DHA-indometacina, así como su seguridad gástrica. Ellos reportaron que dicha combinación presenta una seguridad gástrica aceptable comparada con la administración sola de indometacina.

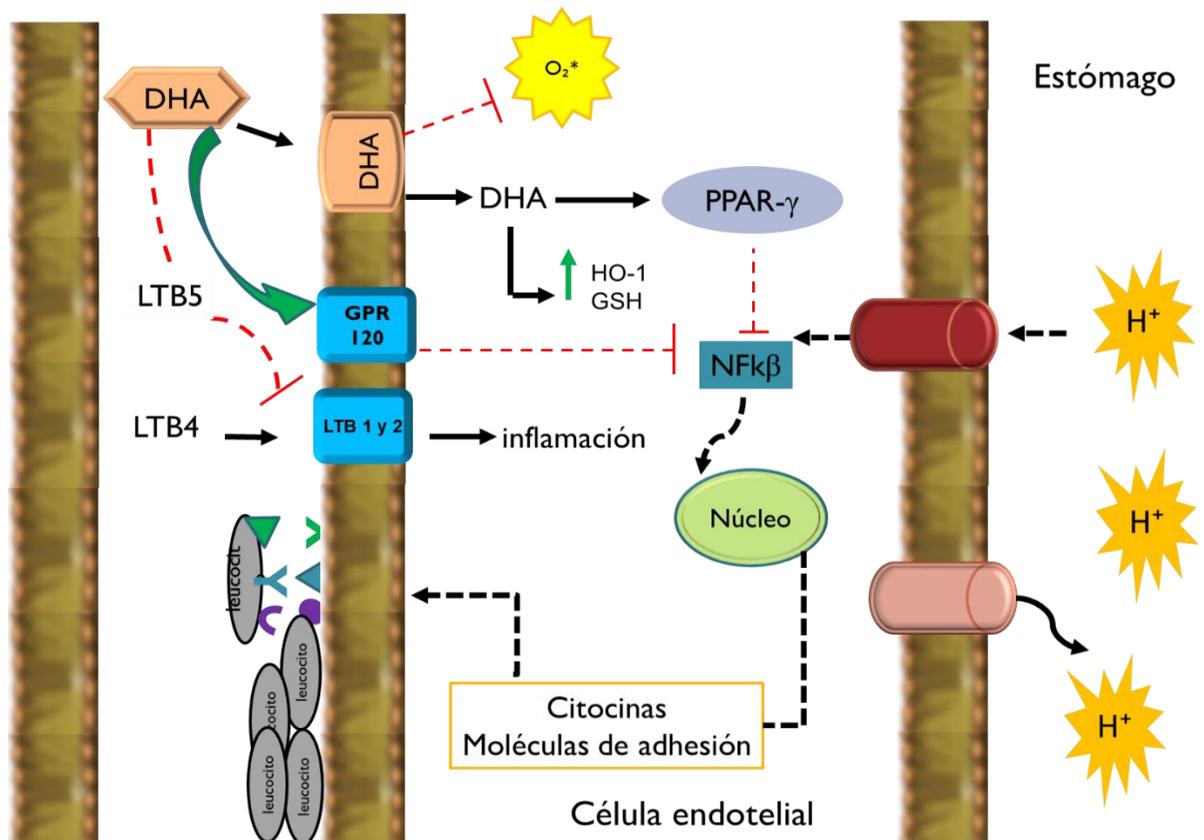
Varios autores han propuesto diferentes mecanismos de acción del DHA, dentro de los cuales pudiera estar implicada la acción gastroprotectora. Se sabe que el DHA puede actuar como antioxidante directo, ya que su estructura química le permite oxidarse, de tal forma que una vez que el DHA se integra a las membranas lipídicas, éste mantiene la integridad de las mismas impidiendo el daño generado por especies reactivas. Por otra parte, es capaz de aumentar la habilidad antioxidante de la célula promoviendo la síntesis de enzimas antioxidantes [57, 62].

Por otra parte, se ha reportado que el DHA es capaz de interactuar con los receptores GPR120 así como de interactuar con los receptores PPAR $\gamma$ ; estos

mecanismos están involucrados en la inhibición de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B, el cual está involucrado en la síntesis de citocinas y moléculas de adhesión [59, 60].

Se sabe que el LTB<sub>4</sub> participa en la respuesta inflamatoria, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos a partir de los receptores LTB<sub>1</sub> y 2. Algunos estudios han sugerido que otro posible mecanismo mediante el cual el DHA pudiera estar ejerciendo su efecto gastroprotector es a través de sus metabolitos como el LTB<sub>5</sub>, que es un agonista parcial de estos receptores, sugiriendo que favorece la resolución de la inflamación [28, 63].

Si bien es cierto que todos los reportes concuerdan con la respuesta gastroprotectora del DHA, los mecanismos mediante los cuales logra su efecto terapéutico, no están del todo esclarecidos.



**Figura 22.** Mecanismos de acción del DHA involucrados en el efecto gastroprotector.

## 9. CONCLUSIONES

- El DHA reduce el efecto nociceptivo inducido por el modelo de formalina (fase II).
- El ketorolaco reduce el efecto nociceptivo de la formalina (fase II).
- La combinación DHA-ketorolaco (3:1) produjo una potenciación, mientras que las proporciones (1:3) y (1:1) resultaron en un efecto aditivo en la antinocicepción.
- La presencia de DHA en las 3 combinaciones redujeron significativamente el daño gástrico inducido por el ketorolaco.
- La combinación DHA y ketorolaco aparecen como una alternativa adecuada para lograr un buen efecto antinociceptivo, manteniendo una seguridad gastrointestinal aceptable.

## REFERENCIAS

1. Kelly, D.J., M. Ahmad, and S.J. Brull, *Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities*. Can J Anaesth, 2001. **48**(10): 1000-10.
2. Woolf, C.J., *What is this thing called pain?* J Clin Invest, 2010. **120**(11): 3742-4.
3. Minett, M.S., et al., *Pain without nociceptors? Nav1.7-independent pain mechanisms*. Cell Rep, 2014. **6**(2): 301-12.
4. Barrot, M., *Tests and models of nociception and pain in rodents*. Neuroscience, 2012. **211**: 39-50.
5. Matsumoto, M., et al., *Characterization of three different sensory fibers by use of neonatal capsaicin treatment, spinal antagonism and a novel electrical stimulation-induced paw flexion test*. Mol Pain, 2006. **2**: 16.
6. Calder, P.C., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?* Br J Clin Pharmacol, 2013. **75**(3): 645-62.
7. Díaz, F.P., *Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico*. Oncología (Barcelona) 2005. **28**(3): 33-37.
8. Bernadá, M., *Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas*. Archivos de Pediatría del Uruguay, 2013. **84**(2): 143-145.
9. Ordóñez, A.R., *AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central*. Revista Mexicana de Anestesiología 2006. **29**(1): 36-40.
10. Rao, P. and E.E. Knaus, *Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond*. J Pharm Pharm Sci, 2008. **11**(2): 81-110.
11. Qandil, A.M., *Prodrugs of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), more than meets the eye: a critical review*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(12): 17244-74.
12. Rainer, T.H., et al., *Cost effectiveness analysis of intravenous ketorolac and morphine for treating pain after limb injury: double blind randomised controlled trial*. BMJ, 2000. **321**(7271): 1247-51.
13. Bingham, S., et al., *The role of the cyclooxygenase pathway in nociception and pain*. Semin Cell Dev Biol, 2006. **17**(5): 544-54.

14. Al-Saeed, A., *Gastrointestinal and Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs*. Oman Med J, 2011. **26**(6): 385-91.
15. Wallace, J.L. and L. Vong, *NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. **9**(11): 1151-6.
16. Wallace, J.L., *NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(1): 67-74.
17. Robinson, M.G., et al., *Effect of ranitidine on gastroduodenal mucosal damage induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Dig Dis Sci, 1989. **34**(3): 424-8.
18. Batlouni, M., *Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales*. Arq Bras Cardiol, 2010. **94**(4): 538-546.
19. Coxib, et al., *Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials*. Lancet, 2013. **382**(9894): 769-79.
20. Kao, C.W., et al., *Pain management of living liver donors with morphine with or without ketorolac*. Transplant Proc, 2012. **44**(2): 360-2.
21. Isiordia-Espinoza, M.A., Pozos-Guillen, A., Pérez-Urizar, J. y Chavarría-Bolanos, D., *Involvement of nitric oxide and ATP-sensitive potassium channels in the peripheral antinociceptive action of a tramadol-dexketoprofen combination in the formalin test*. Drug Dev Res, 2014. **75**(7): 449-54.
22. Vadivelu, N., et al., *Ketorolac tromethamine - routes and clinical implications*. Pain Pract, 2015. **15**(2): 175-93.
23. Mroszczak, E.J., et al., *Ketorolac tromethamine absorption, distribution, metabolism, excretion, and pharmacokinetics in animals and humans*. Drug Metab Dispos, 1987. **15**(5): 618-26.
24. Gupta, P., *Ketorolac*. Indian Pediatr, 1994. **31**(5): 575-8.
25. Hamza, M., et al., *Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation*. Mol Pain, 2010. **6**: 55.
26. Castellsague, J., et al., *Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications*. Drug safety, 2012. **35**(12): 1127-1146.

27. Takeuchi, K., et al., *Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(7-8): 459-66.
28. Pineda-Pena, E.A., et al., *Docosahexaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated acid protects against indomethacin-induced gastric injury*. Eur J Pharmacol, 2012. **697**(1-3): 139-43.
29. Schuchardt, J.P. and A. Hahn, *Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **89**(1): 1-8.
30. Maehre, H.K., et al., *omega-3 Fatty acids and cardiovascular diseases: effects, mechanisms and dietary relevance*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(9): 22636-61.
31. Nakamoto, K., et al., *Hypothalamic GPR40 signaling activated by free long chain fatty acids suppresses CFA-induced inflammatory chronic pain*. PLoS One, 2013. **8**(12): e81563.
32. Nakamoto, K., et al., *Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system*. Brain Res, 2012. **1432**: 74-83.
33. Le Bars, D., M. Gozariu, and S.W. Cadden, *Animal models of nociception*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): 597-652.
34. Tjolsen, A., et al., *The formalin test: an evaluation of the method*. Pain, 1992. **51**(1): 5-17.
35. Abbott, F.V., K.B. Franklin, and R.F. Westbrook, *The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats*. Pain, 1995. **60**(1): 91-102.
36. Dubuisson, D. and S.G. Dennis, *The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats*. Pain, 1977. **4**(2): 161-74.
37. Damas, J. and J.F. Liegeois, *The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **359**(3): 220-7.
38. Hunskar, S. and K. Hole, *The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain*. Pain, 1987. **30**(1): 103-14.
39. Azhdari-Zarmehri, H., et al., *Termination of nociceptive behaviour at the end of phase 2 of formalin test is attributable to endogenous inhibitory mechanisms, but not by opioid receptors activation*. Basic and clinical neuroscience, 2014. **5**(1): 48.

40. Rosland, J.H., *The formalin test in mice: the influence of ambient temperature*. Pain, 1991. **45**(2): 211-6.
41. Tallarida, R.J., H.L. Kimmel, and S.G. Holtzman, *Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **133**(4): 378-82.
42. Tallarida, R.J., D.J. Stone, Jr., and R.B. Raffa, *Efficient designs for studying synergistic drug combinations*. Life Sci, 1997. **61**(26): PL 417-25.
43. Tallarida, R.J., *An overview of drug combination analysis with isobolograms*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **319**(1): 1-7.
44. Tallarida, R.J., *Interactions between drugs and occupied receptors*. Pharmacol Ther, 2007. **113**(1): 197-209.
45. Tallarida, R.J., *Quantitative methods for assessing drug synergism*. Genes Cancer, 2011. **2**(11): 1003-8.
46. Fine, M., *Quantifying the impact of NSAID-associated adverse events*. Am J Manag Care, 2013. **19**(14 Suppl): s267-72.
47. Fosslie, E., *Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Ann Clin Lab Sci, 2005. **35**(4): 347-85.
48. Isiordia E, M., Guillén, A. P., Aguirre B, P., & Pérez Urizar, J., *Isobolographic analysis of the analgesic combination systemic ketorolac and local tramadol in the formalin test in mice* Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas, 2010. **41**(2): 42-49.
49. Kim, S.Y., et al., *Postoperative intravenous patient-controlled analgesia in thyroid surgery: comparison of fentanyl and ondansetron regimens with and without the nonsteroidal anti-inflammatory drug ketorolac*. Thyroid, 2008. **18**(12): 1285-90.
50. Medina-Santillan, R., et al., *B vitamins increase the analgesic effect of ketorolac in the formalin test in the rat*. Proc West Pharmacol Soc, 2004. **47**: 95-9.
51. Ortiz, M.I., et al., *The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats*. Arch Pharm Res, 2010. **33**(10): 1691-7.
52. Arroyo-Lira, A.G., F. Rodriguez-Ramos, and A.E. Chavez-Pina, *Synergistic antinociceptive effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and indomethacin in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 2014. **122**: 74-81.

53. Calder, P.C., *Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1851**(4): 469-84.
54. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. *Pain*, 1983. **16**(2): 109-10.
55. López-Muñoz, F.J., Díaz-Reval, M. I., Terrón, J. A., & Campos, M. D., *Analysis of the analgesic interactions between ketorolac and tramadol during arthritic nociception in rat*. *Eur J of Pharmacol*, 2004. **484**(2): 157-165.
56. Nakamoto, K., et al., *Possible involvement of beta-endorphin in docosahexaenoic acid-induced antinociception*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **666**(1-3): 100-4.
57. Stillwell, W. and S.R. Wassall, *Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*. *Chem Phys Lipids*, 2003. **126**(1): 1-27.
58. Ji, R.R., et al., *Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain*. *Trends Neurosci*, 2011. **34**(11): 599-609.
59. Ariel, A. and C.N. Serhan, *Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(4): 176-83.
60. Xu, Z.Z., et al., *Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions*. *Nat Med*, 2010. **16**(5): 592-7, 1p following 597.
61. Harris, S.I., et al., *Upper gastrointestinal safety evaluation of parecoxib sodium, a new parenteral cyclooxygenase-2—specific inhibitor, compared with ketorolac, naproxen, and placebo*. *Clin Ther*, 2001. **23**(9): 1422-1428.
62. Jung, K.A. and M.K. Kwak, *The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants*. *Molecules*, 2010. **15**(10): 7266-91.
63. Serhan, C.N., N. Chiang, and J. Dalli, *The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution*. *Semin Immunol*, 2015. **27**(3): 200-15.