

Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

“Evaluación de la capacidad hepatoprotectora y analgésica de la curcumina libre y la curcumina unida a fosfatidilcolina (curcuvet®)”

TESIS

Que presenta

EDUARDO ENRIQUE VARGAS POZADA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA.

Directores de la tesis:

Dr. Gilberto Castañeda Hernández

Dr. Pablo Muriel de la Torre

México, D.F.

Diciembre, 2015

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 15 del Departamento de Farmacología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Gilberto Castañeda Hernández y del Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Se contó con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro:
308517.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas.....	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
Resumen	IX
Abstract.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hígado	1
1.1.1 Biología celular del hígado	2
Hepatocitos	2
Células endoteliales	3
Células de Kupffer	3
Células estelares	4
Células de Pit.....	4
1.1.2 Funciones del hígado	5
1.1.3 Enfermedades hepáticas	5
1.2. Dolor	7
1.2.1 Nociceptores	8
1.2.2 Procesos involucrados en la nocicepción	9
Transducción	9
Transmisión	9
Modulación y percepción	10

1.2.3	<i>Mediadores químicos del dolor</i>	10
1.2.4	<i>Sensibilización periférica y central</i>	11
1.2.5	<i>Tratamiento actual del dolor</i>	13
2.	ANTECEDENTES.....	15
2.1	<i>Curcumina</i>	15
	Propiedades analgésicas de la curcumina.....	17
	Propiedades hepatoprotectoras de la curcumina.....	18
2.1.2.	Complejo curcumina-fosfatidilcolina.....	20
2.2	<i>Prueba de formalina</i>	22
2.3	<i>Modelo de daño hepático experimental inducido por la administración de tíoacetamida</i>	23
3.	JUSTIFICACIÓN	25
4.	HIPÓTESIS.....	26
5.	OBJETIVOS	26
5.1.	<i>Objetivo general</i>	26
5.2.	<i>Objetivos particulares</i>	26
6.	METODOLOGÍA.....	27
6.1.	<i>Animales de experimentación</i>	27
6.2.	<i>Modelo de la formalina</i>	27
6.3.	<i>Modelo de daño hepático agudo con tíoacetamida</i>	30
6.3.1.	Determinación de marcadores de daño hepático agudo.....	32
	Actividad de alanino aminotransferasa (ALT)	32
	Actividad de gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP).....	34
	Actividad de la fosfatasa alcalina (FA)	35
	Determinación del glucógeno hepático	36
	Determinación de proteínas	38

Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	39
Determinación del glutatión reducido (GSH).....	40
7. RESULTADOS	42
7.1. Modelo de la formalina.....	42
Comportamiento de pataleo	42
Área bajo la curva y porcentaje de antinocicepción	43
7.2. Modelo de daño hepático agudo	44
Actividad enzimática de ALT, FA y γ -GTP	44
Niveles de GSH, peroxidación lipídica y glucógeno	46
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	55
9.1. Conclusiones particulares	55
9.2. Conclusión general	55
APÉNDICE. Curvas de calibración.....	56
1.1 FOSFATASA ALCALINA	56
1.2 GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA	58
1.3 ALANINA AMINOTRANSFERASA	59
1.4 GLUTATIÓN REDUCIDO	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del hígado.....	1
Figura 2. Circulación sanguínea hepática.....	2
Figura 3. Biología celular del hígado	4
Figura 4. Esquema del daño hepático agudo.	7
Figura 5. Clasificación de los nociceptores.....	9
Figura 6. Nocicepción.	10
Figura 7. Mediadores químicos del dolor.....	11
Figura 8. Sensibilización periférica	12
Figura 9. Escalera analgésica de la OMS.....	14
Figura 10. Estructura química de los curcuminoides.	16
Figura 11. Porcentaje de antinocicepción a dosis ascendentes de curcumina.....	18
Figura 12. Blancos moleculares de la curcumina.	19
Figura 13. Análisis de la actividad de unión del NF- κ B al DNA.....	19
Figura 14. Esquematación del complejo formado por la fosfatidilcolina y la curcumina	21

Figura 15. Comparación de la concentración de la curcumina libre y la curcumina con fosfatidilcolina en plasma..... 21

Figura 16. Gráfica clásica del modelo de la formalina. 23

Figura 17. Metabolismo de la TAA y daño hepático. 24

Figura 18. Esquematización del modelo de la formalina.. 29

Figura 19. Biomarcadores de daño hepático. 32

Figura 20. Comportamiento de pataleo observado después de la inyección de formalina al 1% en la planta de la pata derecha de ratas Wistar 43

Figura 21. Área bajo la curva y porcentaje de antinocicepción en ratas tratadas mediante el modelo de formalina. 43

Figura 22. Determinación de la actividad enzimática de ALT, FA, y γ -GTP en suero..... 45

Figura 23. Determinación hepática de los niveles de glutatión reducido, peroxidación lipídica y glucógeno. 47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del dolor.	8
Tabla 2. Grupos del modelo de la formalina	28
Tabla 3. Grupos del modelo de daño agudo hepático con TAA.....	31
Tabla 4. Comparación de dosis de curcumina utilizadas por diferentes autores. .	50
Tabla 5. Comparación de dosis de tioacetamida y curcumina utilizadas por diferentes autores.....	51
Tabla 6. Curva estándar de FA.	56
Tabla 7. Curva de calibración de γ -GTP.	58
Tabla 8. Curva de calibración de ALT.....	59
Tabla 9. Curva de calibración de GSH.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos.
ALT	Alanino aminotransferasa.
ATP	Adenosín trifosfato.
Ca	Calcio.
CMC	Carboximetilcelulosa
CUR	Curcumina.
CUR-FOS	Curcumina-fosfatidilcolina.
Cox2	Ciclooxigenasa 2.
CCl ₄	Tetracloruro de carbono.
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
CYP	Citocromo.
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo.
FA	Fosfatasa alcalina.
FDA	Food and Drug Administration.
GABA	Ácido γ -aminobutírico.
GSH	Glutación reducido.
γ -GTP	Gamma-glutamil transpeptidasa.
H+	Ion hidrogeno.
HBV	Virus de la hepatitis tipo B.
HCV	Virus de la hepatitis tipo C.
HMGB1	Proteína del Grupo de Alta Movilidad Box1.
HSC	Células estelares hepáticas.
IASP	Asociación Internacional para el estudio del dolor.
IFN- γ	Interferón gamma.
IL	Interleucina.

ip.	Intraperitoneal.
iNOS	Sintasa de óxido nítrico.
K	Potasio.
K+	Ion potasio.
LCBC	Ligadura del conducto biliar común.
Lox	Lipooxigenasa.
MDA	Malondialdehído.
NF-κB	Factor nuclear κB.
Na	Sodio.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
NK	Natural killer.
NO	Óxido nítrico.
ns	No significativo.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SC	Sensibilización central.
SNC	Sistema nervioso central.
SP	Sensibilización periférica.
TAA	Tioacetamida.
TASO	Tioacetamida S-óxido.
TASO ₂	Tioacetamida S-dióxido.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1.
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2.
UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio.
TLR	Receptores tipo Toll.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral.
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1.

RESUMEN

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas, debido a la complejidad del órgano, es susceptible a una amplia variedad de trastornos.

Las enfermedades hepáticas son una de las primeras causas de muerte entre la población mexicana debido al alto índice de obesidad, alcoholismo, infecciones por virus de la hepatitis y por xenobióticos. Todo ello deriva en una alta frecuencia de pacientes con enfermedad hepática para la cual aún no se tiene un tratamiento adecuado.

Por otro lado, el dolor constituye un sistema de alarma que brinda protección y preservación del organismo, sin embargo, bajo ciertas circunstancias como ocurre en algunos tipos de dolor, éste deja de ser un signo para convertirse en la enfermedad, para la cual, no existe un tratamiento seguro y eficaz, lo que genera una disminución en la calidad de vida de las personas que lo padecen, así como pérdidas económicas importantes a nivel mundial.

La búsqueda de nuevas alternativas para tratar estos dos padecimientos continúa; en este sentido, la curcumina, un compuesto de una planta herbácea que se cultiva en regiones tropicales de Asia, ha demostrado plenamente su capacidad hepatoprotectora y antinociceptiva. Lamentablemente, el principal limitante para el uso de la curcumina, es su baja biodisponibilidad, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias farmacéuticas para aumentarla, una de éstas es la asociación de la molécula con fosfatidilcolina.

En el presente trabajo se comparó la capacidad antinociceptiva y hepatoprotectora de la curcumina libre contra la curcumina con fosfatidilcolina, se utilizó el modelo de la formalina para evaluar la capacidad antinociceptiva y el modelo de daño hepático agudo provocado por la administración de tioacetamida para evaluar la capacidad hepatoprotectora. En el modelo de la formalina se midió el comportamiento de pataleo, la disminución en el número de sacudidas se interpreta como efecto analgésico o antinociceptivo, se construyó una gráfica de área bajo la curva de sacudidas en función del tiempo y se calculó el porcentaje de

antinocicepción. En cuanto el modelo de daño hepático agudo se midieron biomarcadores de daño hepático como la alanino aminotransferasa, la fosfatasa alcalina, la gama-glutamiltanspeptidasa, el glutati3n reducido, el gluc3geno y la peroxidaci3n lip3dica.

Los resultados muestran que la curcumina y la curcumina con fosfatidilcolina disminuyen parcialmente el comportamiento de pataleo de la rata en el modelo de formalina, aunque no hay diferencia significativa entre ambos grupos en el 3rea bajo la curva de los pataleos contra el tiempo, ni en el porcentaje de antinocicepci3n. En cuanto a la actividad hepatoprotectora, la curcumina y la curcumina con fosfatidilcolina previnieron el incremento de la actividad enzim3tica de fosfatasa alcalina, pero no de alanino aminotransferasa ni de gama-glutamiltanspeptidasa. La curcumina con fosfatidilcolina previno el estr3s oxidativo a nivel membranal.

En el 3nico marcador de da3o hep3tico en el que fue mejor la curcumina con fosfatidilcolina respecto a la curcumina fue en la peroxidaci3n lip3dica. Por lo que estos resultados sugieren que la asociaci3n de la curcumina con fosfatidilcolina no mejora la farmacodinamia del compuesto.

ABSTRACT

The liver is responsible for 500 organic functions, due to the complexity of the organ; it is susceptible to a wide variety of disorders. Liver disease is one of the leading causes of death among the Mexican population due to the high rate of obesity, alcoholism, viral hepatitis and hepatitis for xenobiotics. All this leads to a high frequency of patients with liver disease for which is not taken appropriate treatment.

On the other hand the pain is an alarm system that provides protection and preservation of the body, but under certain circumstances as in some types of pain, it ceases to be a sign to become the disease, for which there is no safe and effective treatment, leading to a decrease in the quality of life for people who suffer as well as significant economic losses worldwide.

The search for new alternatives to treat these two diseases continued, in this sense, curcumin a compound of a herbaceous plant grown in tropical regions of Asia, it has fully demonstrated its antinociceptive and hepatoprotective ability. Unfortunately the main limitation for use curcumin is its low bioavailability, however, have established different pharmaceutical strategies for increasing this, one of these is the association with phosphatidylcholine.

In this work, the antinociceptive and hepatoprotective capacity of free curcumin against curcumin with phosphatidylcholine was compared, the formalin model was used to assess antinociceptive capacity and model of acute liver damage caused by administration of thioacetamide to assess the hepatoprotective ability. In the model of formalin flinching behavior it was measured, the decrease in the number of flinches is interpreted as an analgesic or antinociceptive effect, a graph of area under the curve was constructed of flinches in function of time and and the percentage of antinociception was calculated. For the model of acute liver damage, markers of liver damage alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase, reduced glutathione, glycogen and lipid peroxidation were measured.

The results show that curcumin and curcumin with phosphatidylcholine partially decrease flinching behavior in the rat in formalin model, but, no significant difference between these groups in the area under the curve of flinches against time, neither in percentage of antinociception. Referring to hepatoprotective activity, curcumin and curcumin with phosphatidylcholine prevented the increase of the enzymatic activity of alkaline phosphatase, but not of alanine aminotransferase or gamma-glutamyl transpeptidase. Curcumin with phosphatidylcholine prevented oxidative stress level membrane.

In the only marker of liver damage that was better curcumin formulated with phosphatidylcholine regarding curcumin was in lipid peroxidation. These results suggest that the association of curcumin with phosphatidylcholine not improves the pharmacodynamics of the compound.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hígado.

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo y el segundo más grande del organismo, solo superado por la piel (Schaub, 2002), constituye aproximadamente del 2 al 5% del peso corporal en el adulto y el 5% en el neonato, en adulto sanos de 18 a 35 años de edad el peso del hígado es aproximadamente de 1,500 gr (Molina and DiMaio, 2012).

Este órgano tiene forma cónica, es de color marrón rojizo oscuro, está situado en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal aunque también se extiende hasta el lado izquierdo, se encuentra por debajo del diafragma, está protegido por la caja torácica, mantiene su posición a través de ligamentos avasculares y está rodeado por la cápsula de Glisson que equivale al peritoneo visceral del hígado (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

Consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo, que a su vez están formados por miles de lobulillos, estos lóbulos se encuentran divididos por el ligamento falciforme. El lóbulo izquierdo, además, tiene otros dos pequeños lóbulos: el cuadrado y el caudado (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

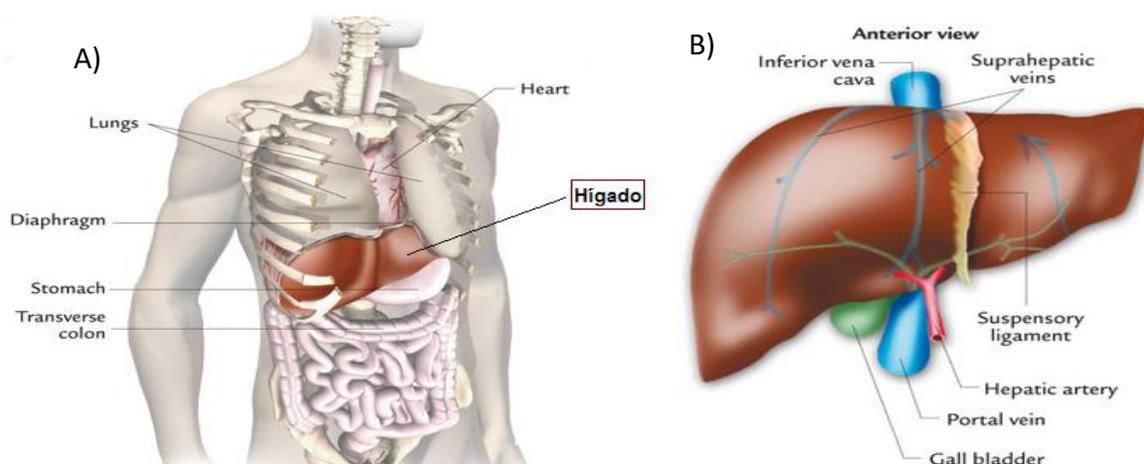


Fig.1. Anatomía del hígado. A) El hígado se encuentra ubicado en la región epigástrica justo debajo del diafragma siendo protegido por las costillas. B) El hígado se divide en dos lóbulos (derecho e izquierdo) divididos por los ligamentos falciforme y redondo.

El hígado recibe permanentemente alrededor del 13% de la sangre total del cuerpo y recibe 25% del gasto cardíaco, la circulación hepática es única ya que recibe sangre por medio de dos vasos sanguíneos; la sangre rica en oxígeno a través de la arteria hepática; y la vena porta lleva hasta el hígado sangre que contiene nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas en los intestinos. El hígado procesa esta sangre y descompone los nutrientes y drogas en formas más fáciles de usar por el resto del cuerpo, después la envía al corazón mediante la vena hepática (Lautt, 2009). El hígado tiene la particular capacidad de regenerar su propio tejido: puede perder hasta las tres cuartas partes del mismo y volver a su estado original (Riehle et al., 2011) .

La vulnerabilidad del hígado al daño se debe principalmente a su proximidad anatómica al suplemento sanguíneo y al tracto digestivo, así como a su habilidad para concentrar y biotransformar xenobióticos (Muriel and Rivera-Espinoza, 2008).

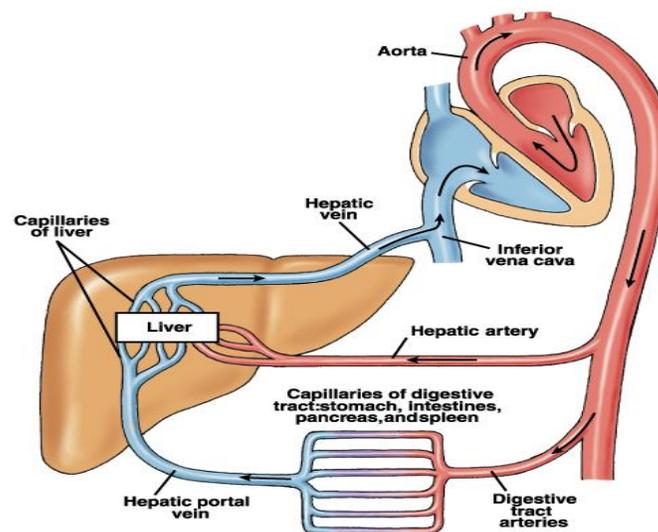


Fig. 2. Circulación sanguínea hepática. El hígado recibe sangre de dos fuentes, la vena porta y la arteria hepática, esta sangre es filtrada y enviada al corazón mediante la vena hepática.

1.1.1 Biología celular del hígado.

Hepatocitos.

Son las células parenquimatosas del hígado y representan aproximadamente el 80% de las células de este órgano, desempeñan las funciones metabólicas

características del hígado. Los hepatocitos, como otras células epiteliales, están situados en la interfase entre el exterior del organismo y el medio interno y organizan el intercambio de macromoléculas entre estos dos espacios. Para mediar esta función, los hepatocitos, están polarizados, la organización celular de los hepatocitos define tres regiones diferenciadas en su membrana: la membrana sinusoidal, situada frente al canal sinusoidal; la membrana basolateral en la región de contacto estrecho entre los hepatocitos; y por último, la membrana canalicular, cuyos pliegues forman el canaliculo biliar.

Los hepatocitos presentan muchos organelos citoplasmáticos debido a su función endocrina y exocrina. Entre ellos destacan las mitocondrias por sus necesidades energéticas; en el citoplasma también aparecen ribosomas libres en gran cantidad, lisosomas y peroxisomas, estas células tienen la capacidad de almacenar el glucógeno, el cual aparece en forma de gránulos densos en forma de rosetas. (Bernabé et al., 2008).

Células endoteliales.

Se encuentran tapizando la luz del sinusoides, poseen un citoplasma fenestrado a través del cual acceden los componentes de la sangre hacia la membrana sinusoidal de los hepatocitos, el espacio que se establece entre las células endoteliales y los hepatocitos se denomina espacio de Disse (Connolly et al., 2010).

Células de Kupffer.

Las células de Kupffer reciben el nombre del anatomista alemán Karl W. von Kupffer, poseen una notable capacidad para la fagocitosis, se sitúan frente a la membrana sinusoidal y son responsables de la eliminación de material particulado de la circulación portal. Así, estos macrófagos residentes del hígado son los principales productores en el hígado de citocinas, factores de crecimiento y mediadores biológicamente activos como factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucina 1 (IL) 1 β , IL-6 y tienen un papel muy relevante en los procesos vitales

para el organismo como la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria (Kolios et al., 2006).

Células estelares.

Las células estelares hepáticas (HSC) son células mesenquimales específicas del hígado con forma estrellada, están ubicadas a lo largo de los sinusoides en el espacio de Disse, y juegan un papel vital en la fisiología y la fibrogénesis hepática. Fisiológicamente son células con capacidad de almacenar lípidos y vitamina A. Sin embargo, durante la fibrogénesis hepática, sufren cambios morfológicos y funcionales muy importantes, se activan diferenciándose en células parecidas a los miofibroblastos con capacidad proliferativa, fibrogénica y contráctil para desempeñar un papel primordial en la configuración de la fibrosis hepática (Yin et al., 2013).

Células de Pit.

Son células específicas del hígado equivalentes a grandes linfocitos granulares del tipo natural killer (NK), pertenecen al grupo de células sinusoidales próximas a las células endoteliales, estas células pueden almacenar lípidos y al igual que las células de Kupffer brindan protección al organismo principalmente contra infecciones virales (Nakatani et al., 2004).

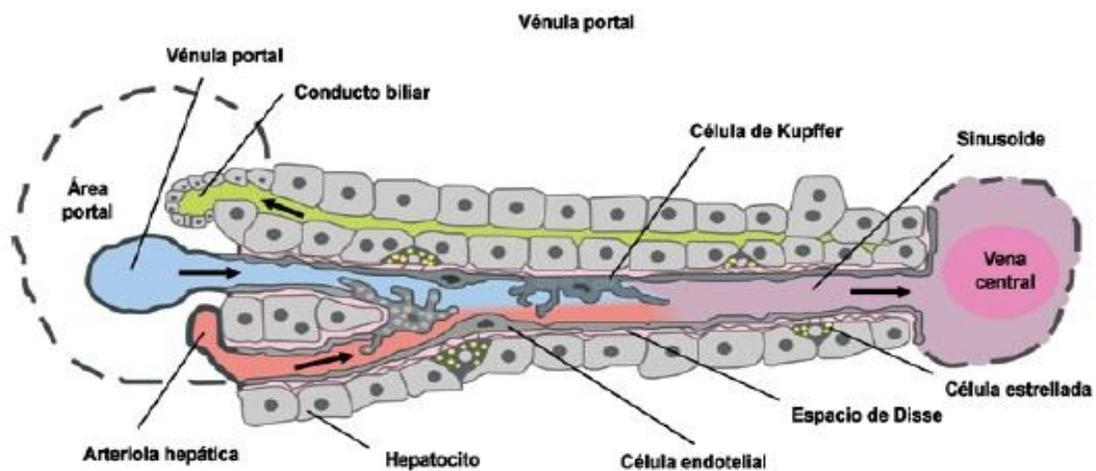


Fig. 3. Biología celular del hígado. Se aprecian las células del hígado entre las que destacan los hepatocitos, las células endoteliales, las células estrelladas y las células de Kupffer.

1.1.3 Funciones del hígado.

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas. Juega un papel en la digestión, en el metabolismo del azúcar y las grasas, e incluso en el sistema inmunitario. Es muy importante para mantener los niveles de glucosa en la sangre. Cuando la glucemia es baja, el hígado puede desdoblar el glucógeno en glucosa y liberarla en el torrente sanguíneo, los hepatocitos almacenan algunos triglicéridos; degradan ácidos grasos para generar adenosín trifosfato (ATP); sintetizan lipoproteínas, que transportan ácidos grasos, triglicéridos y colesterol hacia las células del organismo y desde éstas; sintetizan colesterol, y usan el colesterol para formar sales biliares, sintetiza proteínas transportadoras de esteroides y de otras hormonas en el plasma y algunas más corresponden a factores de coagulación. Por otro lado, los hepatocitos desaminan los aminoácidos, de manera que puedan utilizarse en la producción de ATP o convertirlos en hidratos de carbono o grasas (Hernández-Aquino, 2013).

La bilirrubina, que deriva del grupo hemo de los eritrocitos viejos, es captada por el hígado desde la sangre y se secreta en la bilis, las sales biliares se utilizan en el intestino delgado para emulsionar lípidos; además de glucógeno, el hígado es el sitio primario de almacenamiento de algunas vitaminas (A, B12, D, E y K) y de algunos minerales (hierro y cobre), que se liberan del hígado cuando se requieren en alguna parte del cuerpo (Hernández-Aquino, 2013).

Por si fuera poco, las células epiteliales hepáticas protegen el organismo de los agentes perjudiciales mediante gran variedad de procesos de desintoxicación, los cuales aportan sustancias desprovistas ya de sus propiedades nocivas (Hernández-Aquino, 2013).

1.1.3 Enfermedades hepáticas.

Debido a la complejidad del hígado, es susceptible a una amplia variedad de trastornos en los cuales las funciones del hígado pierden su equilibrio y pueden

producirse las enfermedades hepáticas. Las alteraciones de la funcionalidad hepática pueden darse con curso agudo o crónico.

El daño hepático agudo ocurre cuando se produce un daño masivo a este órgano, en este tipo de daño se compromete al menos el 70% de la masa hepática funcional. La necrosis del tejido hepático es característica de este tipo de daño y produce alteración de una o más funciones hepáticas (Schiodt et al., 1999).

La hepatitis es un proceso inflamatorio y necrótico de las células hepáticas con presentación de una gama amplia de manifestaciones clínicas y bioquímicas, que van desde la simple elevación asintomática de las cifras de aminotransferasas hasta la presentación clínica de enfermedades como hepatitis aguda y necrosis hepática fulminante.

Los detonantes más frecuentes para este padecimientos son los virus de la hepatitis tipo B (HBV) y C (HCV), abuso en el consumo de alcohol, y la exposición a fármacos o sustancias tóxicas. (Olaso and Friedman, 1998).

La señalización de citocinas juega un papel fundamental en la patogénesis del daño hepático, tanto el agudo como el crónico, ya que regulan la respuesta inflamatoria hacia el daño. La respuesta inmune dependiente de citocinas es regulada por linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) y las mismas células de Kupffer que son reclutadas. Estos tipos de células secretan IL-2, TNF- α , interferón gamma (IFN- γ), IL- 4, IL- 6, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), IL- 10, en conjunto estas citocinas regulan la respuesta inflamatoria y la fibrogénesis hepática (Bataller and Brenner, 2005; Kisseleva and Brenner, 2007).

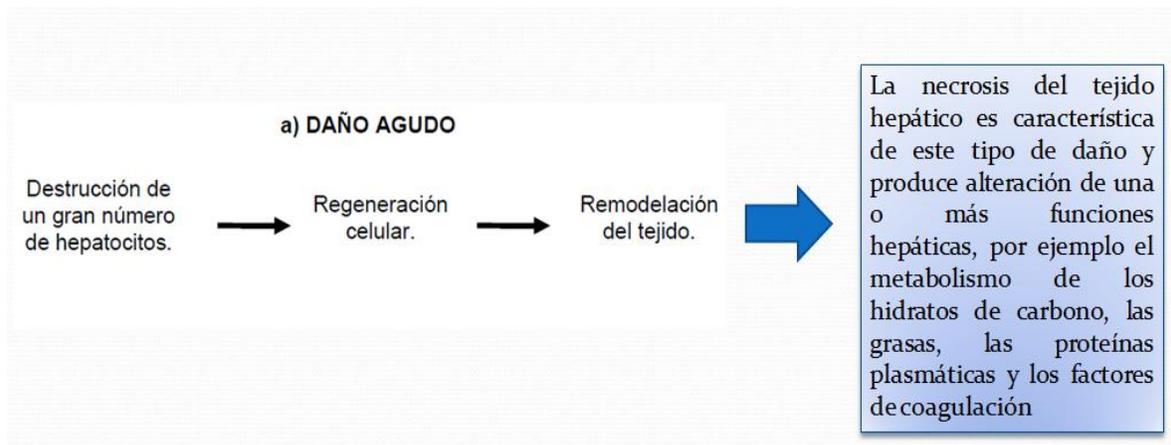


Fig. 4. Esquema del daño hepático agudo.

Los tratamientos comunes para esta enfermedad están encaminados a suprimir el estímulo inflamatorio, así como a detener el desarrollo de la fibrosis. Sin embargo, el único tratamiento viable es el trasplante de hígado, pero la variabilidad, oportunidad y la efectividad a largo plazo son hechos que restringen severamente esta terapia (Pellicoro et al., 2012).

1.2 Dolor.

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), éste se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño a los tejidos, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (Sharkey, 2013).

El dolor constituye un sistema de alarma que brinda protección y preservación del organismo ya que es un promotor de la reparación de tejidos mediante la creación de una región de hipersensibilidad localizada alrededor del sitio dañado, la hipersensibilidad minimiza el movimiento o contacto de la región del daño hasta la curación de éste, sin embargo, bajo ciertas circunstancias como ocurre con el dolor crónico, éste deja de ser un signo para convertirse en la enfermedad, este tipo de dolor es persistente y puede autoperpetuarse por un tiempo prolongado después de una lesión, e incluso, en ausencia de ella, carece de cualquier tipo de función fisiológica y disminuye la calidad de vida de quien lo padece (KuKanich, 2013).

La clasificación del dolor se puede hacer atendiendo a su duración, mecanismo, localización, intensidad, su presentación o etiología.

Tabla 1. Clasificación del dolor.

CRITERIO	Duración	Mecanismo	Localización	Intensidad	Presentación	Etiología
	Agudo	Nociceptivo	Somático	Leve	Continuo	Infecioso
	Crónico	Neuropático	Visceral	Moderado	Intermitente	Parasitario
				Severo	Subintrante	Oncológico
						Degenerativo
						Postraumático
						Inflamatorio
						Psicológico
		Desconocido				

La nocicepción por otra parte, solo involucra los procesos fisiológicos comunes a todos los seres con un sistema nervioso desarrollado (transducción, transmisión, modulación y percepción) sin el matiz psicosocial que individualizan la percepción del estímulo (MacFarlane et al., 2014). La percepción del dolor consta de un sistema neuronal sensitivo (nocioceptores) y unas vías nerviosas aferentes que responden a estímulos nociceptivos tisulares.

1.2.1 Nociceptores.

Los nociceptores son un grupo especial de receptores sensoriales capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos. Reciben y transforman los estímulos locales en potenciales de acción que son transmitidos a través de las fibras aferentes sensoriales primarias hacia el sistema nervioso central (SNC). El nociceptor se clasifica de acuerdo al tipo de fibra que lo constituye, distinguiéndose los nociceptores tipo A y C, las fibras C son amielinizadas y el impulso nervioso se transmite de manera continua a lo largo del axón y mientras que las fibras A transmiten el impulso nervioso a “saltos”, de un nódulo de Ranvier

a otro, lo que explica su mayor velocidad de conducción (Dubin and Patapoutian, 2010).

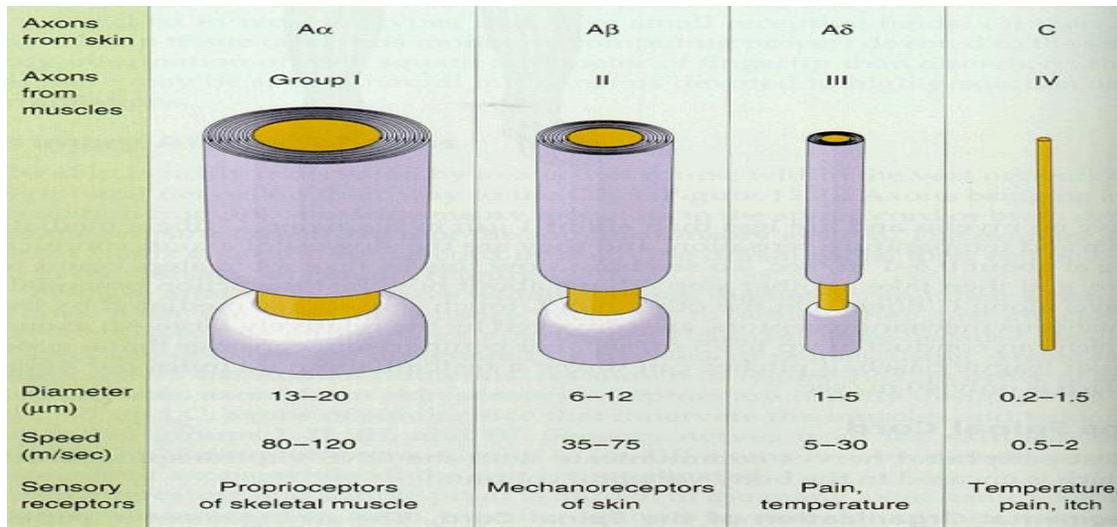


Fig. 5. Clasificación de los nociceptores. En esta figura se aprecia la estructura, el tamaño y la velocidad de conducción de los diferentes tipos de nociceptores.

1.2.2 Procesos involucrados en la nocicepción.

Transducción: La transducción es el proceso por el cual el estímulo nocivo periférico se transforma en un estímulo eléctrico, el estímulo doloroso libera sustancias que estimulan las fibras sensoriales periféricas, algunas de estas sustancias estimulan directamente al nociceptor y otras modifican su sensibilidad frente a otros agentes. La activación-desactivación de los nociceptores se produce como consecuencia de cambios en la membrana neuronal, la mayoría de ellos dependientes de Ca (Binshtok, 2011) (Mach, 2015).

Transmisión: La transmisión es la propagación del impulso nervioso hasta los nervios sensoriales del SNC. A nivel periférico, los diferentes estímulos nociceptivos activan simultáneamente mecanismos excitatorios e inhibitorios que determinan las características de la señal dolorosa esta señal alcanza el asta dorsal medular (Binshtok, 2011) (Mach, 2015).

Modulación y percepción: La información nociceptiva que alcanza la médula espinal sufre, antes de ser transmitida a centros superiores, una modulación inhibitoria mediante sistemas de control segmentarios y vías descendentes bulboespinales. Luego, esta información ya procesada, alcanza centros superiores (tálamo, sistema límbico y corteza cerebral) donde induce respuestas vegetativas, motoras y emocionales, dando como resultado la percepción del dolor (Mach, 2015).

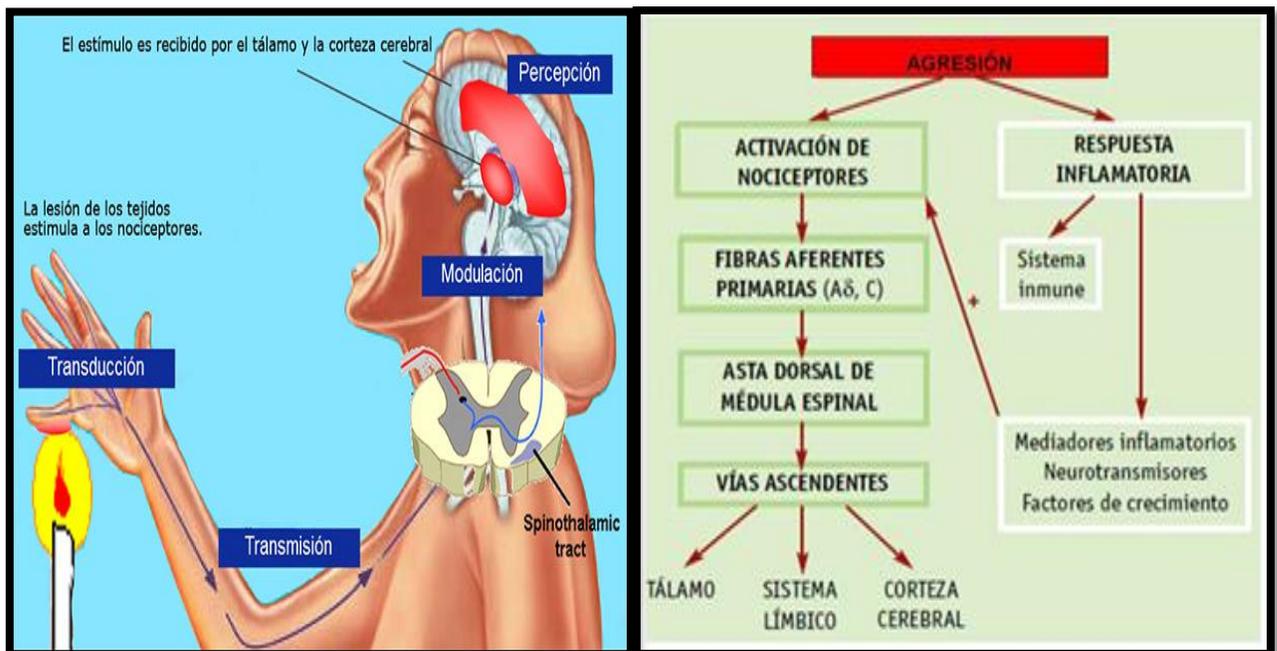


Fig. 6.- Nocicepción.

1.2.3 Mediadores químicos del dolor.

El dolor resulta en parte de la producción y liberación de ciertos mediadores químicos que estimulan las fibras sensoriales periféricas, entre ellos: iones (H^+ y K^+), aminas (serotonina, noradrenalina e histamina), óxido nítrico (NO), bradicinina, citocinas (interleucinas, $TNF-\alpha$), factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF), eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), péptidos (sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)), a nivel central también hay liberación de diversos neurotransmisores (Ácido γ -

aminobutírico (GABA), serotonina, glutamato) que participan en procesos de plasticidad y sensibilización central (SC) (Amaya et al., 2013).

En la figura 7 se aprecia la participación de un gran número de mediadores químicos que participan en la percepción y mantenimiento del dolor.

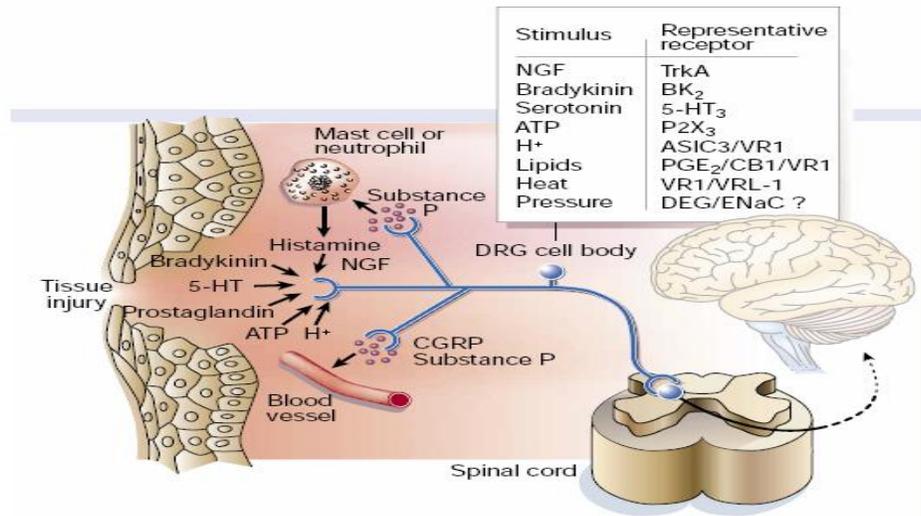


Fig. 7. Mediadores químicos del dolor

1.2.4 Sensibilización periférica y central.

La sensibilización periférica (SP) con mayor frecuencia ocurre debido a cambios asociados con la inflamación ya que se modifica el ambiente químico de la fibra nerviosa, cuando existe una lesión tisular, se ponen en funcionamiento los sistemas inmunitario y nervioso, comienzan a formarse canales iónicos en las terminaciones nerviosas en la zona de lesión, estos canales son aquellos que van a activar la estimulación nerviosa. A esta formación de canales iónicos, debemos sumarle que alrededor de ellos van a llegar sustancias químicas que facilitan esta activación, una “sopa inflamatoria” llena de glutamato, prostaglandinas, IL, factores de crecimiento, Na, Ca y NO.

Este mecanismo sensibiliza la zona dañada y permite reparar la lesión. Cuando este proceso fisiológico continúa y se perpetúa en el tiempo provoca una maladaptación; ya que teniendo más canales y su entorno lleno de sustancias que facilitan su activación, las terminales nerviosas serán capaces de activarse y crear

dolor sin que haya habido ningún estímulo real para que se activen. Pero la realidad es que se activan y son capaces de crear dolor cuando no sucede ningún problema real de daño tisular, como cuando se creó el proceso. Esto es el dolor espontaneo como consecuencia de una SP (Gracia, 2015).

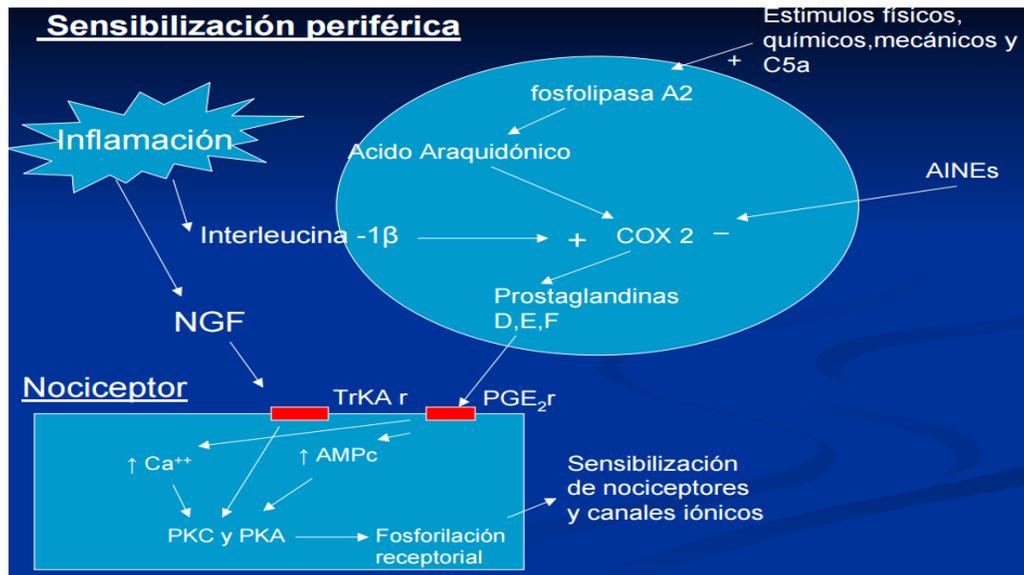


Fig. 8. Sensibilización periférica.

En 1983 se introdujo el concepto de SC, definido como el incremento en la excitabilidad y en la función de las neuronas de segundo orden encargadas de transmitir hacia el encéfalo información aferente que procede de los nociceptores periféricos, este incremento en la función neuronal es causado por incrementos en la excitabilidad de la membrana y la eficacia sináptica así como una inhibición disminuida del sistema somatosensorial, en respuesta a estímulos periféricos sostenidos, intensos o a daño neural (Latremoliere and Woolf, 2009).

En un estado de SC, las neuronas hiperexcitables se activan con mayor facilidad ante la entrada de señal nociceptiva periférica, tienden a amplificar la transmisión de información nociceptiva hacia centros superiores, y pueden de esta manera contribuir a la generación de estados clínicos de dolor patológico ya que se

inducen cambios en el procesamiento del estímulo nociceptivo que pueden desencadenar:

Alodinia: es la percepción de dolor después de un estímulo que no debería causar dolor.

Hiperalgnesia: estado de sensibilidad aumentada al dolor, lo que genera una respuesta exaltada al estímulo nocivo.

Dolor persistente: un aumento en la duración de la respuesta frente a una estimulación breve.

Dolor referido: es la extensión del dolor y de la hiperalgnesia a tejidos no lesionados.

Todos estos fenómenos pueden persistir aunque haya desaparecido la lesión periférica (Dubin and Patapoutian, 2010).

1.2.5 Tratamiento actual del dolor.

La escalera analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), fue publicada en 1986 para describir un método o protocolo de tratamiento y control del dolor en el cáncer. Sin embargo, los profesionales médicos la consideran como un principio general para el tratamiento de todos los tipos de dolor. Se basa en la administración gradual de fármacos analgésicos asociada a la evolución e incremento del dolor que deben conseguir que el enfermo esté libre de dolor.

La escalera analgésica de la OMS se muestra en la siguiente figura:

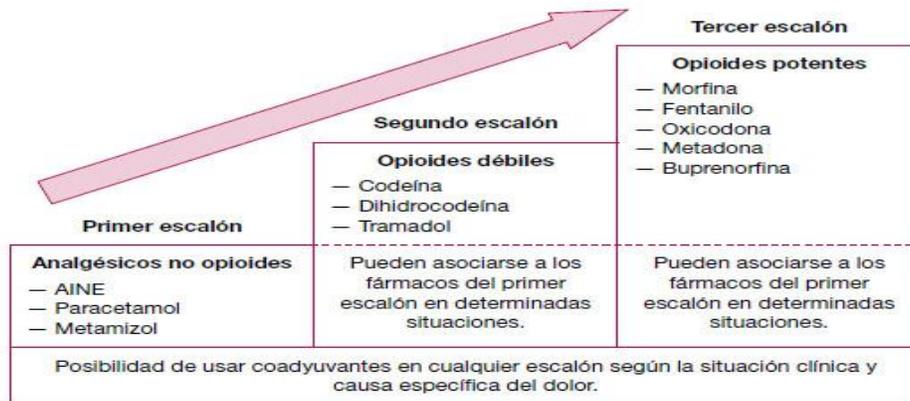


Fig. 9. Escalera analgésica de la OMS. Se basa en la administración gradual de fármacos analgésicos asociada a la evolución e incremento del dolor.

El problema es que dentro de la terapéutica actual, los medicamentos que aún siguen siendo los más recetados son los AINEs (anti-inflamatorios no esteroideos), sin embargo, su eficacia es limitada sobre todo porque sus acciones obedecen en gran medida a un bloqueo periférico de las prostaglandinas, catalogadas como causantes del dolor; sin embargo, estas sustancias no son las únicas generadoras de dolor y solo están involucradas en el desarrollo pero no en el mantenimiento de la hiperexcitabilidad espinal mediada por inflamación (KuKanich, 2013). Además, el uso de AINEs a largo plazo puede generar gran variedad de efectos adversos entre los cuales destacan la irritación gástrica y las enteropatías (Monteiro-Stegall et al., 2013), por lo tanto, en un tratamiento adecuado para el dolor, los AINEs son insuficientes, si no se administra otro fármaco más.

Los opioides constituyen una herramienta útil para tratar el dolor crónico, sin embargo su venta controlada y sus efectos adversos a largo plazo, entre los que destacan la dependencia, limitan su uso.

Lo anterior ha llevado a la búsqueda de nuevos analgésicos y se han sumado a la terapéutica del dolor una serie de fármacos que fueron diseñados para otro objetivo (antidepresivos, anticonvulsivos, sedantes, anestésicos, antivirales, antieméticos, etc.), que generan analgesia, permitiendo disminuir la dosis de AINEs y opioides.

2. ANTECEDENTES

2.1 Curcumina.

El turmérico o cúrcuma (*Cúrcuma longa*) es una planta herbácea que se cultiva en regiones tropicales de Asia (Ammon and Wahl, 1991). El rizoma o raíz de esta planta contiene ciertos compuestos denominados curcuminoides como la demetoxicurcumina, la ciclocurcumina, bisdemetoxicurcumina y el más abundante de ellos, la curcumina (CUR) (Srinivas et al., 1992). Este polifenol es insoluble en agua e inestable a pH básico.

Tiene una biodisposición oral baja eliminándose un 50-70% por las heces, ya que sufre un importante metabolismo de primer paso y degradación intestinal mediante glucuronidación y sulfatación, lo que explica su baja biodisponibilidad después de la administración oral. La absorción puede ser en su forma natural como CUR o como sus metabolitos dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina resultantes de la biotransformación por reducción que se lleva a cabo en el hígado y el intestino, estos metabolitos han demostrado contener algunas propiedades antiinflamatorias. Posteriormente, la CUR y sus metabolitos se biotransforman a conjugados monoglucurónicos que son excretados por vía renal (Pan et al., 1999).

En ratas, después de una administración oral de CUR (500 mg/kg) la concentración máxima (C_{max}) fue de 0.06 ± 0.01 µg/mL y el tiempo para alcanzar dicha concentración máxima (T_{max}) fue de 41.7 ± 5.4 min (Sharma et al., 2007). La vida media de eliminación es motivo de controversia, hay discrepancia entre los diferentes artículos ya que reportan una vida media desde 1.45 horas hasta 44.5 horas, todavía no hay una evidencia clara acerca de los factores que controlan la vida media de eliminación (Anand et al., 2007). Químicamente, la CUR es una dicetona-B enol con dos fenoles metoxilados.

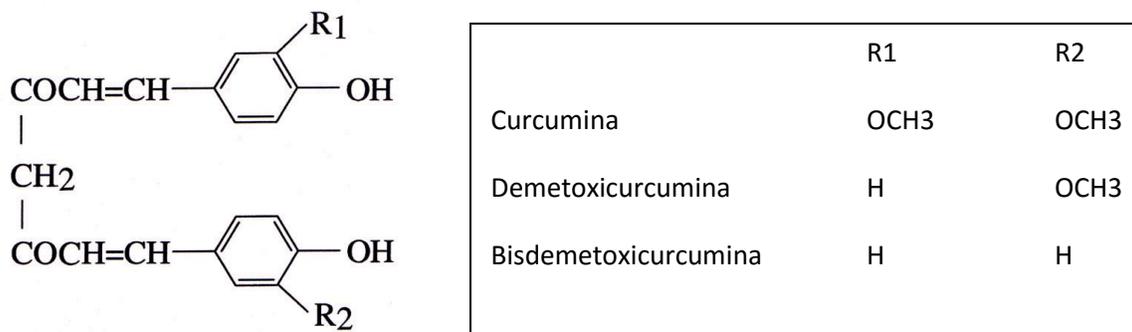


Fig. 10. Estructura química de los curcuminoides.

La CUR ha sido utilizada como especia en el curry, como colorante alimenticio y como remedio medicinal. En la medicina tradicional hindú se usa en el tratamiento de desórdenes biliares, tos, anorexia, desórdenes hepáticos, úlceras por presión en pacientes diabéticos, reumatismo y sinusitis; aplicándose a través de diferentes vías de administración como son la oral, la tópica e inhalada (Chainani-Wu, 2003). En la medicina tradicional China, el principal uso es para el tratamiento enfermedades relacionadas con dolores abdominales e ictericia (Ammon and Wahl, 1991).

Actualmente, se desarrollan numerosos estudios que han destacado las propiedades farmacológicas de la CUR como antiinflamatorio, (Chainani-Wu, 2003; Kohli et al., 2005), hepatoprotector (Muriel and Rivera-Espinoza, 2008; Reyes-Gordillo et al., 2008), antioxidante, inmunomodulador (Mesa et al., 2000), antineoplásico (Aggarwal and Harikumar, 2009) hipolipidémico, antiviral, antiprotozoárico, antifúngico y antibacteriano (Kohli et al., 2005). Debido a este amplio espectro de actividad, el uso de la CUR ha sido exitoso en el tratamiento experimental de algunas enfermedades como carcinoma epidermoide, carcinoma de colon, neoplasias hepáticas, varios tipos de neoplasias de glándula mamaria, leucemia de células T y B, psoriasis, esclerodermia, cicatrización de heridas, regeneración muscular después de un trauma, diabetes tipo II, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis quística, salmonelosis, giardiasis, prevención de infartos miocárdicos, aterosclerosis, entre otras (Shishodia et al., 2005).

Una de las características más interesantes de la CUR es la ausencia de efectos adversos graves a dosis terapéuticas (Cheng et al., 2001). En general, la CUR ha sido catalogada como “reconocida generalmente como segura” por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica (Chainani-Wu, 2003).

Se estima que en la India el consumo diario promedio por habitante oscila entre los 60-100 mg/kg de peso corporal (Chainani-Wu, 2003), sin que la población manifieste efectos no deseados; de hecho, estudios clínicos de fase I indican que el humano puede tolerar dosis tan altas como 8 g/día durante tres meses sin efectos colaterales adversos (Cheng et al., 2001).

Propiedades analgésicas de la curcumina.

La actividad antinociceptiva de la CUR se demostró en ensayos de inmersión de la cola y plato caliente en modelos de dolor neuropático en ratones diabéticos (Sharma et al., 2006), también fue eficaz en un modelo de hiperalgesia por dolor orofacial inducido por formalina (Mittal et al., 2009), en un modelo de nocicepción visceral inducido por ácido acético (Tajik et al., 2008) y en un modelo de dolor crónico producido por constricción crónica (Zhao et al., 2012), todos en ratas.

Entre los blancos moleculares de la actividad antiinflamatoria de la CUR, se encuentran la inhibición de factores de transcripción (Factor nuclear κ B (NF- κ B)), de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-5, IL6, IL-8, IL-12, TNF- α), de enzimas (Ciclooxigenasa 2 (Cox2), lipooxigenasa (Lox), sintasa de óxido nítrico (iNOS)) y de moléculas de adhesión (Aggarwal et al., 2007; Rivera-Espinoza and Muriel, 2009) que podrían explicar su actividad antinociceptiva. No obstante, también se identificó que el antagonismo del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) por la CUR (Yeon et al., 2010) y también que la apertura de los canales de potasio (K) dependientes de ATP intervienen en la actividad antinociceptiva (De Paz-Campos et al., 2012).

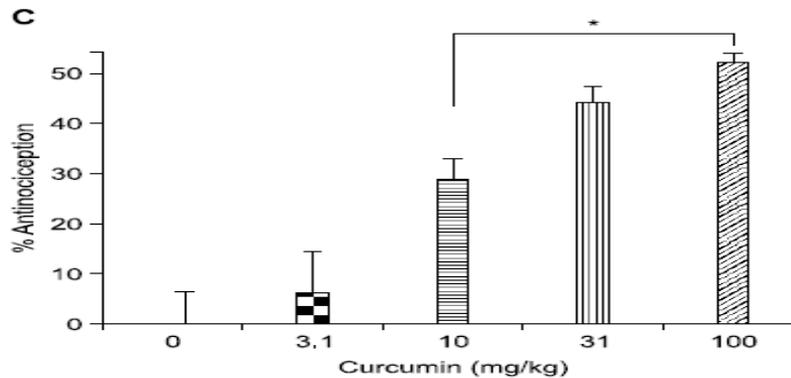


Figura 11.- Porcentaje de antinocicepción a dosis ascendentes de curcumina.

En la figura 11 se destaca que a partir de una dosis de 10 mg por kilogramo la curcumina ya muestra potencial antinociceptivo. (Gráfica tomada de De Paz-Campos et al., 2012).

Propiedades hepatoprotectoras de la curcumina.

La CUR es conocida por presentar una variedad de actividades hepatoprotectoras. Tiene propiedades antivirales, antifibróticas, antioxidantes, anti-inflamatorias, antitumorales, antiesteatosis y cuenta con actividad contra metales pesados. Este compuesto es capaz de modular la actividad del NF- κ B, un factor transcripcional que regula la respuesta inflamatoria, también como se mencionó es capaz de modular citocinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-5, IL6, IL-8, IL-12, TNF- α), y TGF- β , factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4, y la proteína del grupo de alta movilidad Box1 (HMGB1) contribuyendo así a la propiedad hepatoprotectora de la curcumina.

La CUR presenta efectos hepatoprotectores en el daño hepático experimental agudo y crónico inducido por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄), además de prevenir la cirrosis y la fibrosis que son inducidas por CCl₄, tioacetamida (TAA) o por la ligadura del conducto biliar común (LCBC) (Muriel and Rivera-Espinoza, 2008).

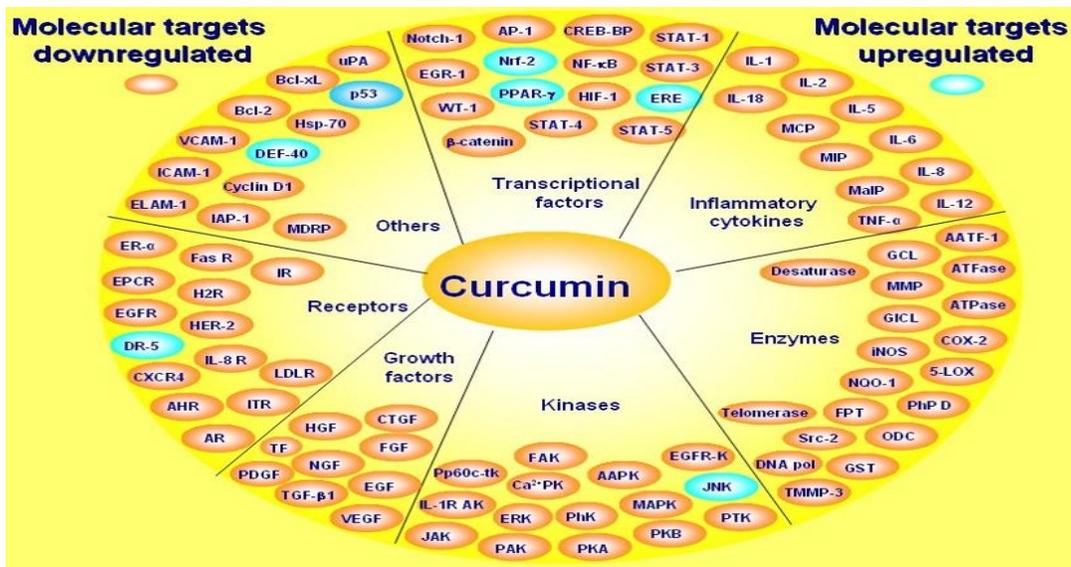


Fig. 12. Blancos moleculares de la curcumina.

La figura 12 muestra algunos blancos moleculares regulados por la curcumina lo que explica sus propiedades farmacológicas entre las que se destaca su capacidad antinociceptiva y hepatoprotectora.

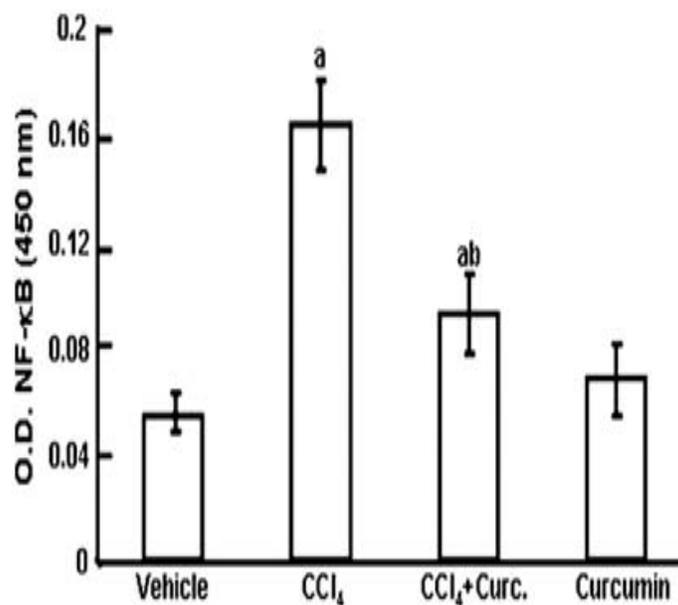


Fig. 13. Análisis de la actividad de unión del NF-κB al DNA en muestras de hígado de ratas control (vehicle), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas administradas con CCl₄ y tratadas con curcumina (CCl₄+Curc.), y ratas administradas solo con curcumina.

En la figura 2 se destaca la capacidad de inhibición del NF- κ B de la curcumina explicando uno de los múltiples mecanismos de hepatoprotección que tiene este compuesto. (Gráfica tomada de Reyes-Gordillo et al., 2007).

Sin embargo, su baja biodisponibilidad, debida principalmente a su baja absorción, rápido metabolismo y probable rápida eliminación del cuerpo, se ha señalado como principal limitante del uso de la CUR. Debido a esto, se han establecido diferentes estrategias farmacéuticas para mejorar su biodisponibilidad, una de éstas es la asociación con fosfatidilcolina.

2.1.2 Complejo curcumina-fosfatidilcolina.

La fosfatidilcolina es uno de los principales constituyentes de la bicapa lipídica de las membranas celulares. El complejo curcumina-fosfatidilcolina (CUR-FOS) es una formula farmacéutica patentada (curcuVET[®]), la CUR y lecitina de soya se formulan en una proporción de peso 1: 2, y luego se añaden dos partes de celulosa microcristalina para mejorar la fluidez, con un contenido total de CUR en el producto final de alrededor de 20%. Con esto se trata de mejorar la biodisponibilidad de compuestos como los polifenoles y ácidos triterpenoides, que normalmente se caracterizan por una escasa solubilidad tanto en agua como en disolventes orgánicos (Kidd, 2009; Semalty et al., 2010).

La CUR, al igual que la mayoría de los compuestos fenólicos de la dieta, es escasamente soluble tanto en agua como en disolventes oleosos, pero muestra grupos polares que pueden interactuar a través de enlaces de hidrógeno e interacciones polares con grupos complementarios, como las cabezas polares de fosfolípidos. Por lo tanto, la lecitina de soya tiene una cabeza altamente polarizada, con la carga negativa de un grupo fosfato y la carga positiva del grupo de amonio colina, y pueden formar complejos con una variedad de compuestos fenólicos poco solubles, incluyendo la CUR (Kidd, 2009; Semalty et al., 2010).

Los compuestos fenólicos como la CUR, muestran una alta afinidad por las membranas biológicas, y, una vez unidos con fosfolípidos, ésta se incorpora en

una matriz lipídica que puede aprovecharse del rápido intercambio de fosfolípidos entre membranas biológicas y los fluidos extracelulares, trasportándola y aumentando su captación celular.

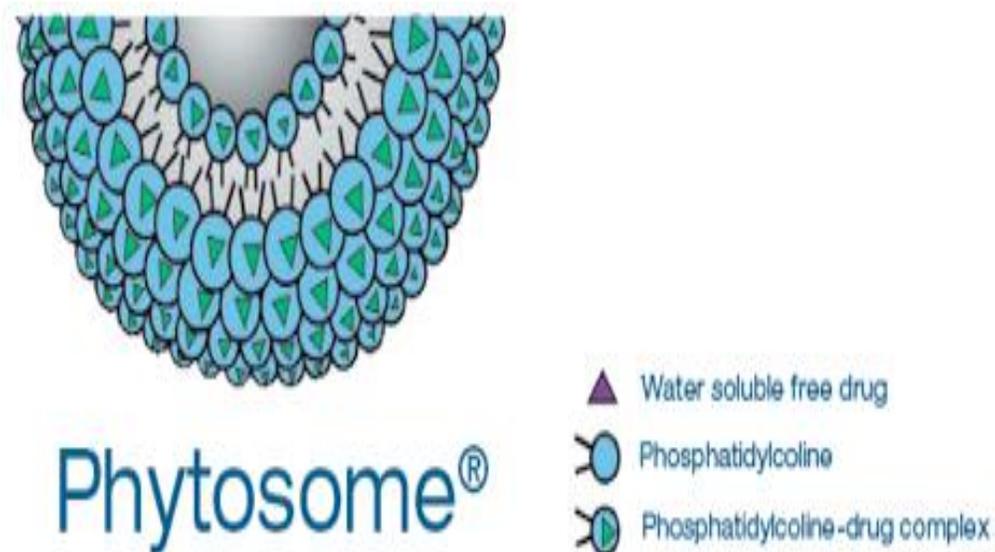


Fig. 14. Esquemmatización del complejo formado por la fosfatidilcolina y la curcumina.

En una investigación donde se dio una carga oral de CUR libre no formulada (340 mg/kg) y una cantidad del complejo CUR-FOS de 1,8 g/kg, (correspondiente a 340 mg/kg de CUR), a ratas Wistar macho, se evaluó la presencia de CUR y sus metabolitos a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración vía oral, en el plasma, hígado y la mucosa intestinal. Los resultados de este estudio mostraron que la formulación CUR-FOS suministra niveles sistémicos más altos de CUR que la CUR no formulada lo que sugiere un aumento en la biodisponibilidad de este compuesto (Marczylo et al., 2007).

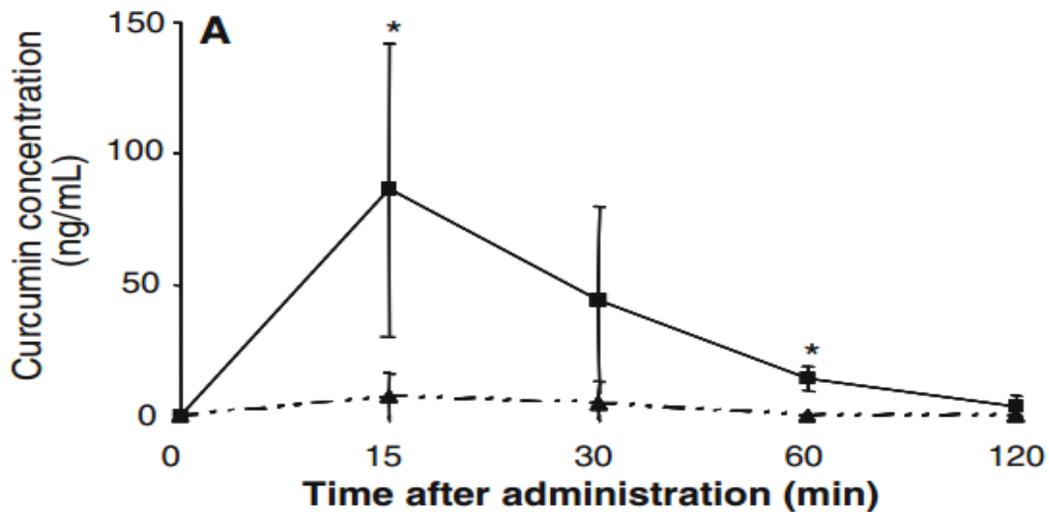


Fig. 15. Comparación de la concentración de la curcumina libre y la curcumina con fosfatidilcolina en plasma.

En la figura 15 se muestra con línea punteada la curcumina libre y con línea continua la curcumina con fosfatidilcolina. Se observa un incremento significativo en la concentración en plasma de la curcumina con fosfatidilcolina con respecto a la curcumina libre, lo que sugiere que la asociación de la curcumina con fosfatidilcolina aumenta la biodisponibilidad de la curcumina. (Gráfica tomada de Marczylo et al., 2007).

2.2 Prueba de formalina.

La prueba de formalina fue introducida como un modelo de dolor en 1977 por Dubuisson y Dennis, esta prueba consiste en administrar por vía subcutánea 50 μ l de formalina (solución diluida de formaldehído al 1%) en la región dorsal de la pata derecha, lo que produce una respuesta bifásica, la primera fase que va de los 0 a los 10 minutos refleja un dolor nociceptivo debido a la activación directa de los nociceptores sensoriales periféricos causado por la irritación química provocada por la formalina, a esta fase le sigue una interfase que comprende de los 10 a los 15 minutos en donde los animales reflejan poca actividad antinociceptiva y la segunda fase de los 15 a 60 minutos reflejaría un dolor de origen inflamatorio

reflejo de la liberación de mediadores proinflamatorios y con una importante contribución de una SC.

Esta prueba tiene la ventaja de que en este modelo se producen una serie de signos que son contabilizables y son una medida del dolor que puede ser aliviado por la acción de los analgésicos. Se puede valorar desde un parámetro postural que comprende diferentes posiciones protectoras de la extremidad afecta, pasando por un trabajo activo para aliviarlo como puede ser el lamido de la zona afecta o un parámetro reflejo como son las sacudidas de la extremidad. Uno de los inconvenientes técnicos de esta prueba es que tiene un periodo de observación de una hora por cada animal y requiere una gran concentración y paciencia por parte del investigador (Dubuisson and Dennis, 1977).

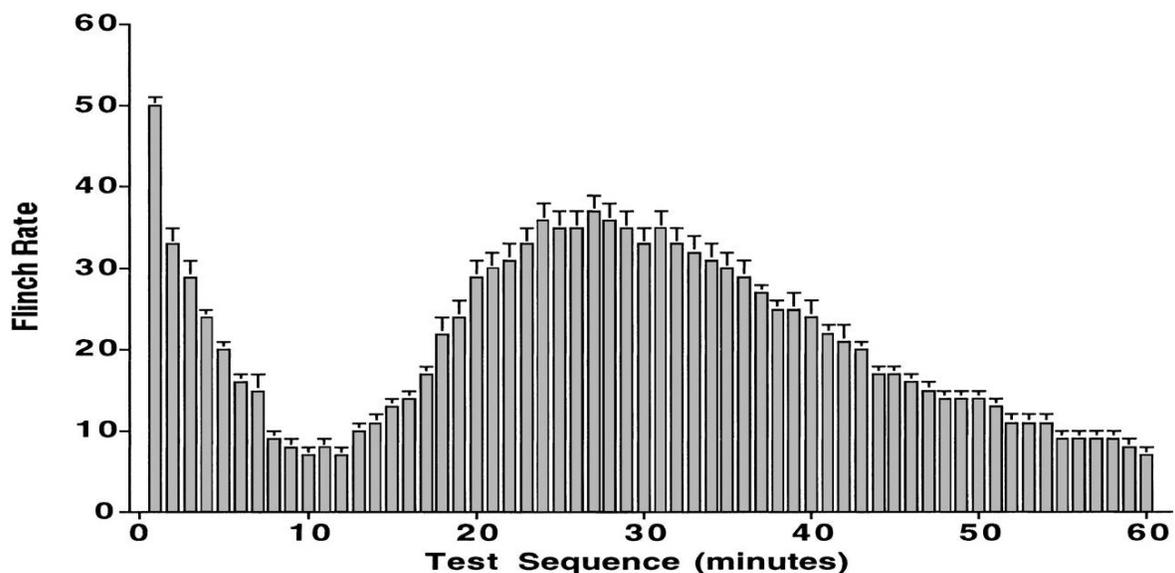


Fig. 16. Gráfica clásica del modelo de la formalina. (Figura tomada de Yaksh et al., 2001).

2.3 Modelo de daño hepático experimental inducido por la administración de tioacetamida.

La tioacetamida (TAA) (CH_3CSNH_2), comenzó a utilizarse como fungicida de los naranjos y cobró importancia en 1943 cuando se detectó su presencia en el jugo con el consiguiente riesgo para la salud.

Este compuesto es uno de los principales químicos utilizados para inducir daño hepático experimental. Después de su administración sufre un proceso de bioactivación por acción de enzimas que pertenecen al sistema de citocromos P450, principalmente la isoforma CYP2E1. Son varios los productos resultantes del metabolismo de la TAA entre los que destacan la tioacetamida S-óxido (TASO), este metabolito es un compuesto inestable y altamente reactivo conocido como radical libre, este metabolito puede seguir reaccionando con el mismo equipo enzimático produciendo otro radical libre aún más inestable y reactivo llamado tioacetamida S-dióxido (TASO₂), ambos metabolitos alteran la integridad de los hepatocitos, induciendo necrosis y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las ROS tienen la capacidad de atacar y destruir los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente los asociados a fosfolípidos, afectando con ello la permeabilidad de las membranas, también modifican la función normal del sistema antioxidante, produciendo así un desbalance en el estado redox de la célula.

Además, produce alteraciones moleculares que se caracterizan por un incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8 y el TNF- α y también aumenta la expresión del factor nuclear NF- κ B (Chilakapati et al., 2007).

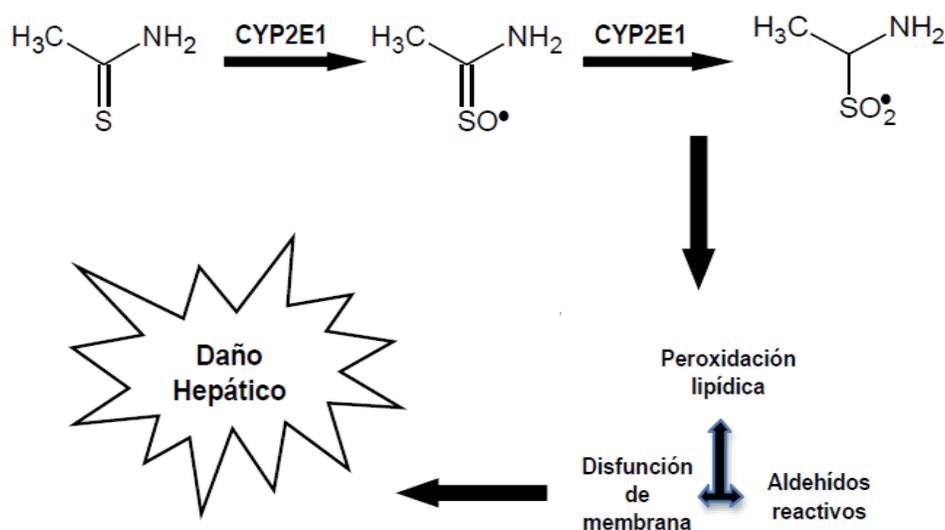


Fig. 17.- Metabolismo de la TAA y daño hepático.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas son una de las primeras causas de muerte entre la población mexicana debido al alto índice de alcoholismo, infecciones por virus de la hepatitis e intoxicaciones por xenobióticos. Todo ello deriva en una alta frecuencia de pacientes con enfermedad hepática para la cual aún no se tiene un tratamiento adecuado.

El dolor es otro padecimiento para el cual no existe un tratamiento seguro y eficaz, lo que genera una disminución en la calidad de vida de las personas que lo padecen, así como pérdidas económicas importantes a nivel mundial.

La búsqueda de nuevas alternativas para tratar estos dos padecimientos continúa, en este sentido, la CUR ha demostrado plenamente su capacidad hepatoprotectora y antinociceptiva, identificando múltiples mecanismos de acción, sin embargo, las investigaciones han señalado como principal limitante del uso de la CUR, su baja biodisponibilidad, sin embargo, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias farmacéuticas para aumentarla, una de éstas es la asociación con fosfatidilcolina, en el producto comercial curcuVET®.

Actualmente no hay estudios en los cuales se compare la capacidad hepatoprotectora de la CUR libre contra el complejo CUR-FOS en el modelo de daño agudo causado por la administración de TAA y antinociceptiva en el modelo de la formalina.

4. HIPÓTESIS

El complejo curcumina-fosfatidilcolina, debido a una mejora en su biodisponibilidad, será más efectivo que la curcumina libre para prevenir el daño hepático experimental y más potente como analgésico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar y comparar la eficacia hepatoprotectora y analgésica del complejo curcumina-fosfatidilcolina contra la curcumina libre en un modelo de daño hepático agudo provocado por la administración de tioacetamida y en el modelo de dolor causado por la inyección de formalina en la pata de ratas.

5.2 Objetivos particulares

- Comparar la eficacia hepatoprotectora de la curcumina libre contra el complejo curcumina-fosfatidilcolina mediante el modelo de tioacetamida.
- Comparar la actividad antinociceptiva de la curcumina libre contra el complejo curcumina-fosfatidilcolina mediante el modelo de la formalina en ratas.
- Correlacionar cambios serológicos de las enzimas hepáticas con la eficacia hepatoprotectora de la curcumina libre y el complejo curcumina-fosfatidilcolina.
- Correlacionar cambios en los marcadores de daño hepático con la eficacia hepatoprotectora de la curcumina libre y el complejo curcumina-fosfatidilcolina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas Wistar hembras para la prueba de formalina y ratas Wistar machos para el modelo de daño hepático agudo, éstas fueron proporcionadas 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-IPN), de un peso de 200 a 250 g. Los animales se mantuvieron en cajas con libre acceso a agua y alimento a. Para la prueba de formalina se pusieron en ayuno de alimento de 18 a 20 horas. Los ciclos de luz-obscuridad fueron de 12 x 12 horas a temperatura ambiente.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos éticos para la investigación del dolor en animales de experimentación (Zimmermann, 1986), en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” NOM-062-ZOO-1999 y atendiendo el Programa Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CINVESTAV-IPN”.

6.2 Modelo de la formalina

Objetivo: Evaluación del efecto antinociceptivo de la CUR libre comparada con el complejo CUR-FOS administrada por vía oral. Se realizó según la técnica modificada de Dubuisson y Dennis (1977).

Este experimento se llevó a cabo en un cuarto aislado del ruido a una temperatura de 24 °C. Se colocaron tres cilindros sobre una mesa con dos espejos atrás de cada uno de ellos formando un ángulo de 90° para facilitar la observación. Las ratas tuvieron un periodo de adaptación de 30 minutos en dichos cilindros antes de iniciar los experimentos. Una vez transcurridos los 30 minutos, la rata fue removida para la administración de los fármacos, veinte minutos después se administró por vía subcutánea 50 µl de formalina (solución diluida de formaldehído al 1%) en la región dorsal de la pata derecha. Después de la inyección de

formalina la rata fue colocada nuevamente en el interior de la cámara de observación.

Se emplearon 4 grupos de animales (n=6):

Grupo 1) Administración de 1mL de carboximetilcelulosa (CMC) (vehículo de la CUR) mediante sondeo orogástrico veinte minutos antes de la aplicación de formalina al 1 %.

Grupo 2) Administración de formalina al 1% (50 µl) vía subcutánea en el dorso de la pata posterior derecha.

Grupo 3) CUR libre 20mg/kg veinte minutos antes de la aplicación de formalina.

Grupo 4) CUR-FOS 20mg/kg veinte minutos antes de la aplicación de formalina.

Tabla 2. Grupos del modelo de la formalina.

Grupo	Sustancia a administrar
1.- Control de CMC	Administración de CMC por sondeo orogástrico, veinte minutos antes de la aplicación de formalina.
2.- Control de formalina	Aplicación de formalina al 1% vía subcutánea en el dorso de la pata posterior derecha.
3.- Curcumina libre	Administración por sondeo orogástrico de CUR 20 mg/kg, veinte minutos antes de la aplicación de formalina.
4.- Curcumina-fosfatidilcolina	Administración por sondeo orogástrico de CUR-FOS 20 mg/kg, veinte minutos antes de la aplicación de formalina.

Inmediatamente a la inyección, la rata mostró una conducta dolorosa o nociceptiva manifestada en forma de sacudidas de la pata derecha. El número de sacudidas se registró por periodos de 1 minuto cada 5 minutos durante 60 minutos. La conducta dolorosa en este modelo es bifásica. La primera fase (0-10 min) y la segunda fase (15-60 min) después de la inyección del irritante (Tjølsen et al., 1992). En este modelo la disminución en el número de sacudidas se interpreta como efecto analgésico o antinociceptivo.

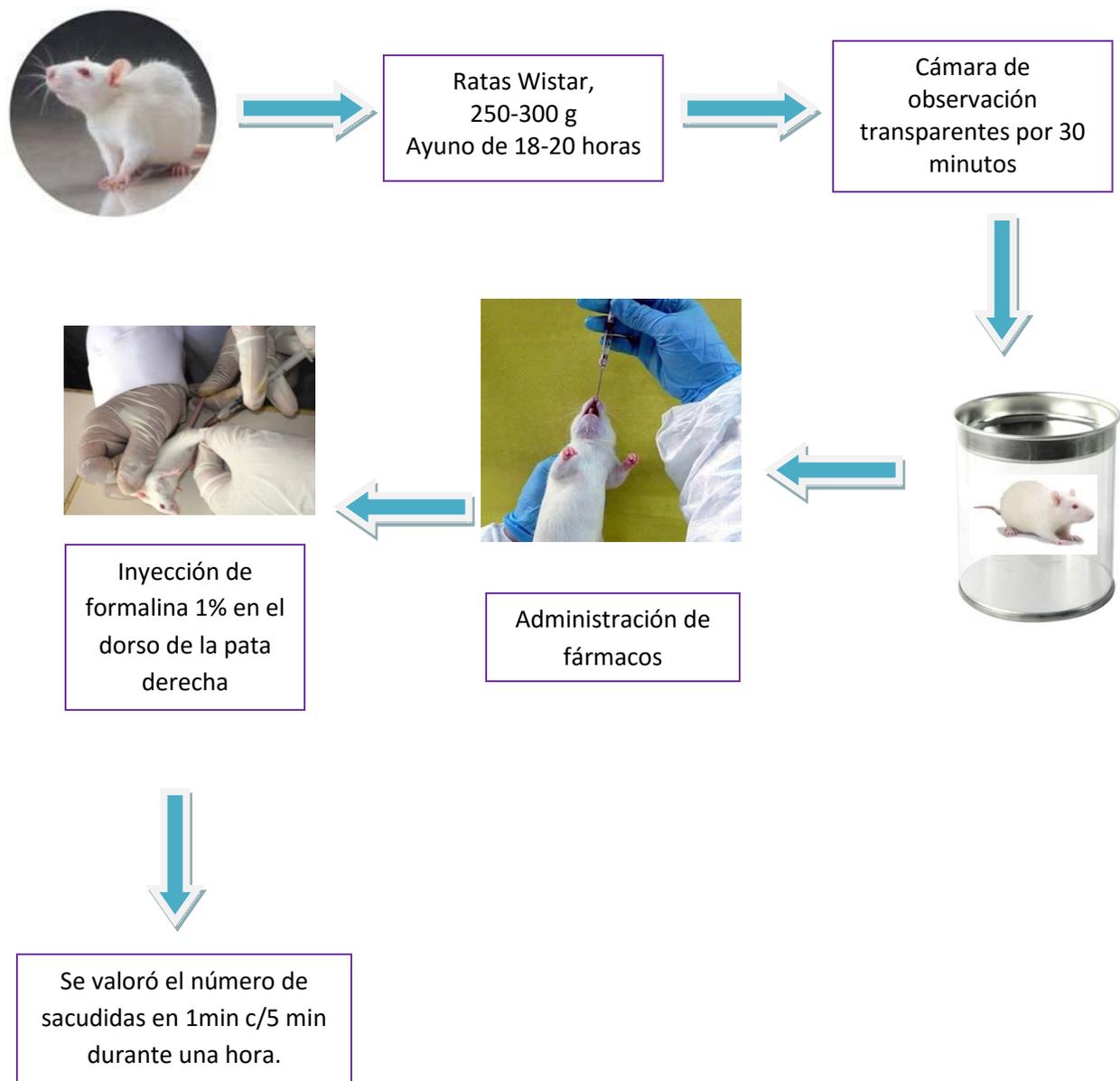


Fig. 18. Esquemización del modelo de la formalina.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio +/- el error estandar, se construyó una gráfica de sacudidas en función del tiempo. El área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales (una expresión global de la intensidad y duración del efecto) se calculó por el método de los trapezoides. El porcentaje de antinocicepción se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de antinocicepción} = \frac{\text{ABC del vehículo} - \text{ABC compuesto}}{\text{ABC del vehículo}} \times 100$$

(De Paz-Campos et al., 2012)

6.3 Modelo de daño hepático agudo con tioacetamida

Objetivo: Evaluación del efecto hepatoprotector de la CUR libre comparada con el complejo CUR-FOS administrada por vía oral.

Ratas macho Wistar se emplearon como modelo animal para establecer el daño hepático. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en los siguientes grupos (n=8).

Grupo 1) Control de CMC.

Grupo 2) TAA vía intraperitoneal (ip.) 200mg/kg dosis única.

Grupo 3) Administración por sondeo orogástrico de CUR libre 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar H₂O ip.

Grupo 4) Administración por sondeo orogástrico de CUR-FOS 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar H₂O ip.

Grupo 5) Administración de CUR libre 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar por vía oral una dosis única de 200 mg de TAA/kg ip.

Grupo 6) Administración de CUR-FOS 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar por vía oral una dosis única de 200 mg de TAA/kg ip (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos del modelo de daño agudo hepático con TAA.

Grupo	Fármaco o reactivo a administrar
1 Control CMC	CMC dos horas antes y dos horas después de administrar H ₂ O ip.
2 Control de TAA	TAA vía ip 200mg/kg dosis única.
3 Control curcumina libre	Curcumina libre 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar H ₂ O ip.
4 Control curcumina-fosfatidilcolina	Curcumina-fosfatidilcolina 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar H ₂ O ip.
5 Tratamiento con curcumina libre	Curcumina libre 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar por vía ip una dosis única de 200 mg de TAA/kg.
6 Tratamiento con curcumina-fosfatidilcolina	Curcumina-fosfatidilcolina 200mg/kg dos horas antes y dos horas después de administrar por vía ip una dosis única de 200 mg de TAA/kg.

Concluido el periodo de administración, las ratas se sacrificaron 24 hrs después de la administración de TAA, se obtuvo el hígado y muestras de sangre por punción cardiaca.

De las muestras sanguíneas se obtuvo el plasma para medir la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FA), gamma-glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) y alanino aminotransferasa (ALT). Las muestras de hígado se emplearon para cuantificar el glutatión reducido (GSH), el glucógeno y la peroxidación lipídica.

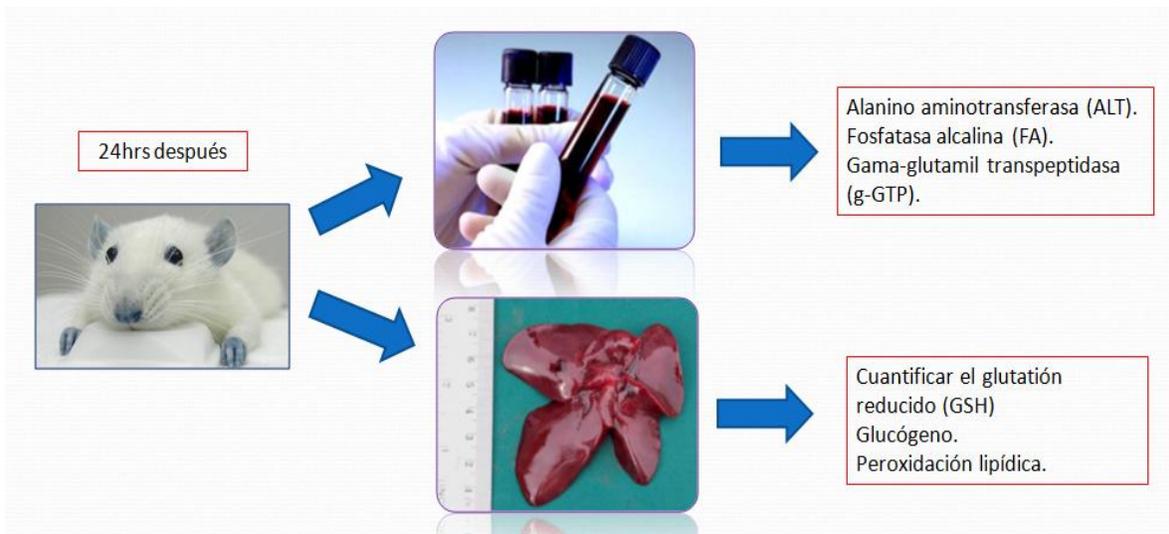


Fig. 19. Biomarcadores de da1o hep3tico medidos.

6.3.1 Determinaci3n de marcadores de da1o hep3tico

Determinaci3n de la actividad de alanino aminotrasferasa.

La ALT es una enzima que se localiza en gran concentraci3n en el citoplasma de los hepatocitos aunque se puede encontrar en menor medida en los ri1ones, coraz3n y m3sculos.

La determinaci3n de esta enzima es un par3metro que permite diagnosticar la posible ruptura celular o bien un aumento en la permeabilidad de la membrana.

La actividad de la enzima ALT se determina por el m3todo de Reitman and Frankel, 1957 en el que se mide el complejo colorido formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina, que se lee a 515 nm La determinaci3n est3 basada en la transferencia del grupo amino de la alanina al aceptor 2-oxoglutarato, tambi3n conocido como α -cetoglutarato o 2-oxopentanodiato. Tras la reacci3n se generan L-glutamato y piruvato, que en presencia de 2,4 dinitrofenilhidracina (2,4 DNPH) forma el derivado colorido 2,4 dinitrofenilhidrazona. La cantidad de 2,4 dinitrofenilhidrazona es proporcional a la actividad de ALT y puede cuantificarse a 515 nm en un espectrof3tometro de luz visible.

La determinación se realiza de la siguiente manera:

En tubos previamente rotulados se coloca:

	BLANCO (mL)	PROBLEMA (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero Problema	---	0.05
3.- Se mezcla y se agita suavemente, se incuba a 37oC durante 60 min.		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema.	0.050	---
6.- Se incuba a 37oC durante 15 min.		
7.- NaOH 0.4 N.	2.5	2.5
8.- Se lee los tubos a 515 nm.		

Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa.

La γ -GTP es una enzima de la membrana canalicular del hepatocito, aunque se distribuye ampliamente en el cuerpo, se destaca su presencia en el páncreas, vesículas seminales y cerebro, puede aumentar cuando hay un trastorno de las vías biliares, pancreatitis, hipertiroidismo y artritis reumatoide. El aumento en la γ -GTP, por lo general sugiere enfermedad de las vías biliares.

La técnica para cuantificar la actividad de γ -GTP se basa en la producción de p-nitroanilina a partir del sustrato γ -glutamyl-p-nitroanilida. La reacción en medio alcalino (pH aproximado de 8.2) y en presencia de iones Mg^{2+} es catalizada por la enzima γ -GTP, la cual favorece la transferencia del grupo γ -1-glutamyl del sustrato al aceptor glicil-glicina. El producto de la reacción es un compuesto colorido (p-nitroanilina) cuya absorbancia puede medirse por espectrofotometría a una longitud de 410 nm (Glossmann and Neville, 1972).

En un tubo de ensayo de 13x100mm se agrega los siguientes reactivos:

- 400 μ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2
- 100 μ l $MgCl_2$ 200 mM
- 100 μ l Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
- 200 μ l Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM.
- ✓ Previa incubación por 10 min a 37 C, se inicia la reacción al agregar 200 μ L de plasma.
- ✓ Se incuba a 37 °C durante 30 min, y se detiene la reacción con 2 mL de acidoacético 1.5 M.
- ✓ Se lee a 410 nm en el espectrofotómetro.
- ✓ Se hace un blanco sustituyendo los 200 μ l de plasma por agua.
- ✓ La actividad enzimática se determina interpolando el valor de la muestra en una curva estándar de p-nitroanilina y se reporta en μ mol de sustrato hidrolizado por litro de plasma por minuto.

Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina.

La enzima FA se encuentra presente en variadas estirpes celulares tales como el hepatocito en el epitelio biliar, el osteocito, el enterocito y las células del trofoblasto placentario. Por lo tanto, su elevación en el plasma puede ocurrir en diversas patologías hepatobiliares, óseas, intestinales y también en el último tercio del embarazo.

En el hígado, la FA se localiza en el canalículo hepático y la membrana sinusoidal, de manera que el incremento en los niveles séricos de esta enzima deriva principalmente de patologías asociadas a la obstrucción del conducto biliar.

En el laboratorio, la actividad enzimática de FA en plasma se puede determinar utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. El grupo fosfato es escindido de la molécula orgánica generando el producto colorido p-nitrofenol, que en disolución alcalina absorbe energía a una longitud de 405 nm (Berger y Rudolph, 1963).

Se siguió la técnica que a continuación se describe:

Se rotularon los tubos blancos y problemas para cada muestra.

- 1.- 0.25 mL buffer de glicina 0.1 M y MgCl₂ 1mM, pH 10.5
- 2.- 0.25 mL de sustrato p-nitro fenilfosfato.
- 3.- Se coloca en baño maría a 37 °C por 5 minutos.
- 4.- Se añade 50 µl de la muestra, mezclar suavemente.
- 5.- Se incuba 30 minutos a 37 °C.
- 6.- Se para la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N y se agita por inversión.
- 7.- Se lee la absorbancia a 410 nm.

El blanco es idéntico pero colocando 50 µl de agua en lugar de muestra.

Determinación del glucógeno hepático.

El glucógeno es la forma principal que emplea el organismo para almacenar la glucosa, los principales almacenes de glucógeno son el hígado y el músculo esquelético; sin embargo, este último carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa, por lo cual el hígado se convierte en la única fuente de glucosa para el resto de los tejidos. Cuando el hígado es afectado por un agente etiológico, los niveles de glucógeno se ven disminuidos, lo que refleja una pérdida de las funciones metabólicas propias del órgano.

La determinación del glucógeno hepático se realiza con la técnica de la antrona, en la cual muestras de tejido hepático previamente hidrolizadas en medio alcalino, se hacen reaccionar con una disolución ácida de antrona. El ácido sulfúrico provoca la deshidratación de los azúcares que se generaron durante la hidrólisis, convirtiéndolos en sus derivados tipo furfural; los furfurales condensan con la antrona produciendo un compuesto colorido que puede leerse en espectrofotómetro a una longitud de 620 nm.

El procedimiento de esta técnica es el siguiente:

- 1) Se pesan 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, se les adiciona 1.5 mL de KOH al 30%, se tapan y se hierven en baño de agua durante 30 min.
- 2) Después de enfriar los tubos, se pasa la solución a un matraz volumétrico de 25 mL, y se afora con agua.
- 3) Del matraz anterior se toma de 40 a 160 μ L con pipeta volumétrica, llevándolo a 1 mL en tubos esmerilados de 13x100, por duplicado, se prepara además un tubo blanco con 1 mL de agua y otros 2 estándares con 20 μ L de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y se lleva a 1 mL con agua.
- 4) Se prepara una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añaden 2 mL a cada tubo con ayuda de una bureta enfriado sobre hielo agitando suavemente

5) Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 min.

6) Se enfrían de inmediato sobre agua con hielo. Se leen a 620 nm.

Cálculos:

$20 \times A(\text{mtra})$

_____ = μg de glucógeno en la alícuota

$1.11 \times A(\text{std})$

$A(\text{mtra})$ = Absorbancia de la muestra.

$A(\text{std})$ = Absorbancia del estándar.

Se expresan los resultados como gramos de glucógeno/100 g de hígado teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

Determinación de proteínas.

Esta determinación se efectúa por el método de Bradford, 1976, en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomasie. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas y puede ser cuantificado en el espectrofotómetro.

Reactivos:

- Ácido Fosfórico al 85 % 100 mL
- Alcohol Etilico 50 mL
- Azul de Coomasie G-250 100 mg
- Se afora a un litro con agua.

Procedimiento:

- 1) Se colocan tres series de ocho tubos de 13X100 mm.

- 2) En una serie de ocho tubos, se toman 100 μ L de homogeneizado de hígado y se lleva a 1,000 mL con agua tridestilada.

- 3) Se toman alícuotas para proteínas y se llevan a 100 μ L con agua en las siguientes dos series de ocho tubos (de la dilución anterior se toman 20 μ L más 80 μ L de agua tridestilada).

- 4) Se añaden 2,400 μ L del reactivo de Bradford.

- 5) Terminado el proceso anterior, se lee la absorbancia del complejo colorimétrico a 595 nm.

- 6) Se prepara un blanco sustituyendo el homogeizado de hígado por 100 μ L de agua.

Determinación del grado de peroxidación lipídica.

La reacción de peroxidación lipídica puede monitorizarse en el laboratorio cuantificando los niveles de malondialdehído (MDA), el cual es uno de los productos derivados del acortamiento de la cadena de los ácidos grasos afectados. Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico que reacciona con el malondialdehído y sus subespecies reactivas oxidadas, esta reacción puede ser cuantificada en un espectrofotómetro (Buege and Aust, 1978).

Reactivos:

- Tris HCl 150 mM pH=7.4
- Acido Tricloroacético (TCA) al 15%
- Acido Tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (Se prepara en el momento la cantidad necesaria)

Procedimiento:

1. Se pesan 0.5 g de hígado.
2. Se homogeneiza en 5 mL de agua.
3. Se toman 300 μ l del homogenado al 10% y se agregan 700 μ l de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL.
4. Se incuba a 37 °C por 30 minutos.
5. Se agregan 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
6. Se colocan a ebullición por 45 minutos.
7. Se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm.

Determinación del glutati3n reducido

El GSH interviene en algunos procesos de detoxificaci3n, controla la permeabilidad de la membrana y el transporte de amino3cidos, actúa como coenzima y participa en los procesos de sntesis proteica, de DNA y RNA. De manera importante, el GSH mantiene el estado redox celular, interviniendo activamente en la defensa frente al estr3s oxidativo; de hecho, es considerado el principal antioxidante end3geno de la c3lula.

En respuesta a un daño por estr3s oxidativo, la actividad del sistema antioxidante end3geno se ve atenuada, pues la tasa de generaci3n de per3xidos lipídicos y ROS es superior a la capacidad que dicho sistema tiene para inactivar a los radicales libres. El hecho anterior se refleja como una disminuci3n en la concentraci3n de GSH.

La t3cnica para determinar el GSH en hígado se basa en la reacci3n entre el grupo sulfidrilo de la cisteína que pertenece al glutati3n y el 3cido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) del reactivo de Ellman. Tras la reacci3n se obtiene como producto el 3cido 5-tio-2-dinitrobenzoico, compuesto colorido que se lee en un espectrofot3metro a una longitud de onda de 412 nm.

Reactivos:

- Reactivo de Ellman

a) Se pesan 40 mg de 3cido 5,5'-ditiobis nitrobenzoico (DTNB).

b) Se preparan 100 mL de citrato de Na al 1%.

c) Se disuelven (a) en (b).

Se puede mantener congelado no m3s de dos semanas.

- Soluci3n de fosfatos Na_2HPO_4 0.3 M (disuelto en agua).

- Soluci3n precipitante: EDTA 5mM en TCA 5%. Se disuelve el EDTA en TCA.

Procedimiento:

1. Se homogeneizan 0.3g de hígado o 0.3 mL de sangre en 1.2 mL de solución precipitante.
2. Se centrifugan por 20 minutos a 12000 rpm.
3. Se toman 0.1mL del sobrenadante (por duplicado) y se agregan 2.1 mL de solución del fosfatos y 0.25 mL de reactivo de Ellman.
4. Se agitan y leen en el espectrofotómetro a 412 nm.

Análisis estadístico.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Se obtuvo la media y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamientos.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA de una vía), seguido de una prueba de Tukey. Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

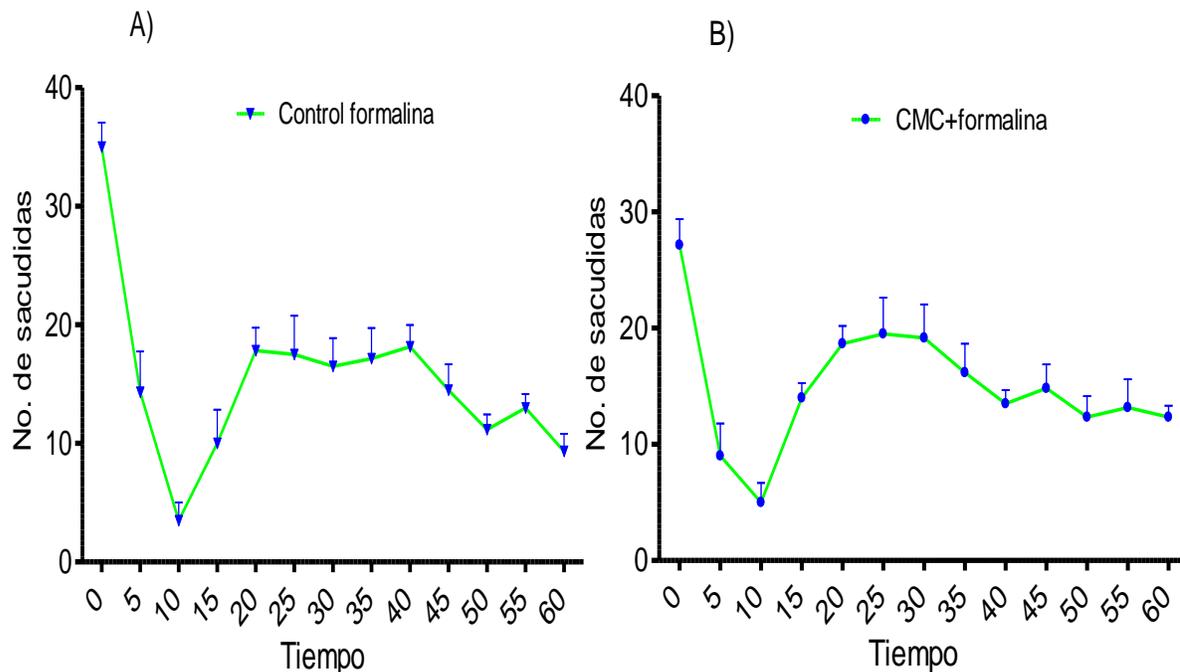
7. RESULTADOS

7.1 Modelo de la formalina.

La administración de formalina al 1% en la región plantar de la pata derecha de la rata produce una conducta característica llamada comportamiento de pataleo, representativo de un estado de dolor.

La administración de formalina produjo un patrón típico de conducta bifásica caracterizada por sacudidas de la pata inyectada (figura 20). La primera fase se presentó inmediatamente después de la administración subcutánea de formalina al 1%, la cual disminuyó gradualmente aproximadamente a los 10 minutos. La segunda fase se presentó 15 minutos después de la inyección de formalina con una duración aproximada de 45 minutos. Debido a que la CUR y la CUR-FOS solo modificaron la segunda fase, únicamente esta fase fue tomada en cuenta para los siguientes análisis.

La disminución en el número de sacudidas se interpretó como efecto analgésico o antinociceptivo.



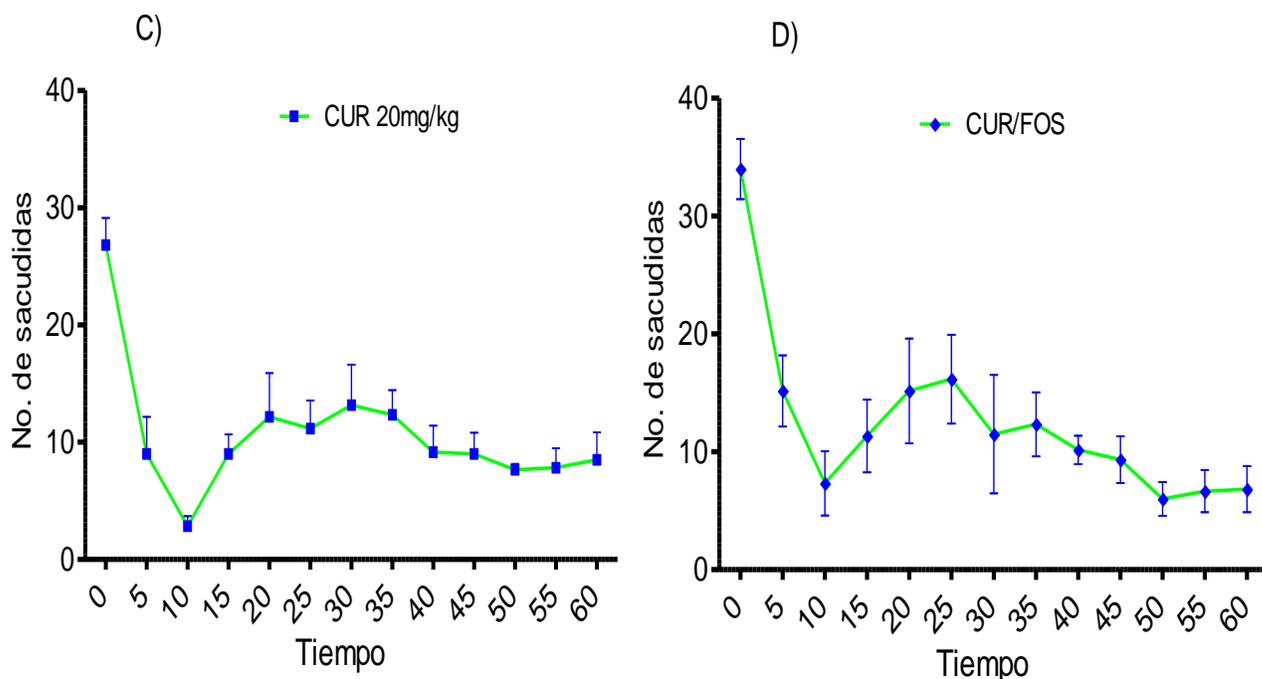


Fig. 20. Comportamiento de pataleo observado después de la inyección intraplantar de formalina al 1% en la planta de la pata derecha de ratas Wistar A) grupo control de formalina, B) grupo control de CMC, C) grupo tratado con CUR a 20mg/kg y D) grupo tratado con CUR-FOS.

Efecto de la curcumina y la curcumina-fosfatidilcolina en la segunda fase de la prueba de formalina.

La administración por vía oral de CUR y CUR-FOS veinte minutos antes de la inyección subcutánea de formalina al 1% en la pata derecha de la rata disminuyó no significativamente el comportamiento nociceptivo durante la segunda fase de la prueba (figura 21).

Las ratas tratadas con CUR y CUR-FOS mostraron un aumento significativo con respecto al grupo CMC en el porcentaje de antinocicepción llegando a 35% de antinocicepción (figura 21).

El propósito del presente trabajo fue la comparación del efecto antinociceptivo entre la CUR y la CUR-FOS mediante el modelo de la formalina. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre ambos grupos.

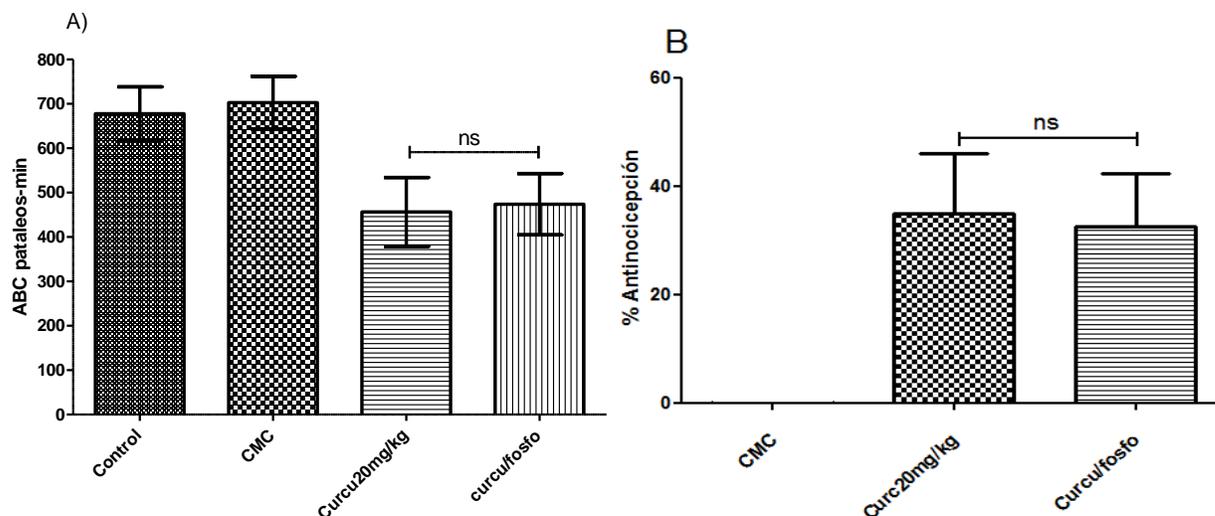


Fig. 21. Área bajo la curva y porcentaje de antinocicepción en ratas tratadas mediante el modelo de formalina. La figura A muestra el área bajo la curva del número de pataleos contra el tiempo de la segunda fase del modelo de la formalina en los grupos control (formalina), CMC, CUR Y CUR-FOS. La figura B muestra el porcentaje de antinocicepción observado en la segunda fase del modelo de la formalina en los grupos CMC, CUR y CUR-FOS. Cada barra representa el promedio de cada grupo +/- error estándar. "ns" indica $p > 0.05$.

7.2 Modelo de daño hepático agudo.

Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina y gamma-glutamil transpeptidasa.

La enzima ALT es un marcador de daño hepático que indica necrosis y su actividad se ve aumentada en el daño hepático. En la figura 22 se observan los resultados de la determinación de la actividad de la ALT; el daño con 200mg/ kg de TAA, dosis única vía ip., la administración de este hepatotóxico tuvo como resultado un incremento significativo en la actividad de la ALT de casi el triple comparado con el control (CMC), la administración de CUR y CUR-FOS no previno de manera significativa el aumento en la actividad de la ALT. Cuando la CUR y la CUR-FOS es administrada sola no se aprecian cambios en la actividad de dicha enzima.

En esta misma gráfica se muestra la actividad plasmática de la FA que indica colestasis. El tratamiento con 200 mg/ kg de TAA, dosis única vía ip., tuvo como resultado un incremento significativo en la actividad de esta enzima con respecto

al grupo control. La CUR y la CUR-FOS previnieron dicho incremento ya que redujo la actividad de la FA a valores muy semejantes a los del control. La administración de CUR y la CUR-FOS solas no muestra cambio en la actividad de la FA (figura 22).

En cuanto a la enzima γ -GTP (otro marcador de colestasis), con la administración de 200 mg/kg de TAA, dosis única vía ip., se incrementó significativamente la actividad de esta enzima de casi el doble con respecto al control, la administración de CUR y CUR-FOS no previno de manera significativa el aumento en la actividad de γ -GTP. La CUR y la CUR-FOS solas no produjeron cambios en la actividad de la γ -GTP (figura 22).

En cuanto al propósito del presente trabajo que fue la comparación entre la CUR y la CUR-FOS, los resultados obtenidos en la actividad de las enzimas ALT, FA y γ -GTP muestran que no hay diferencia significativa entre ambos grupos.

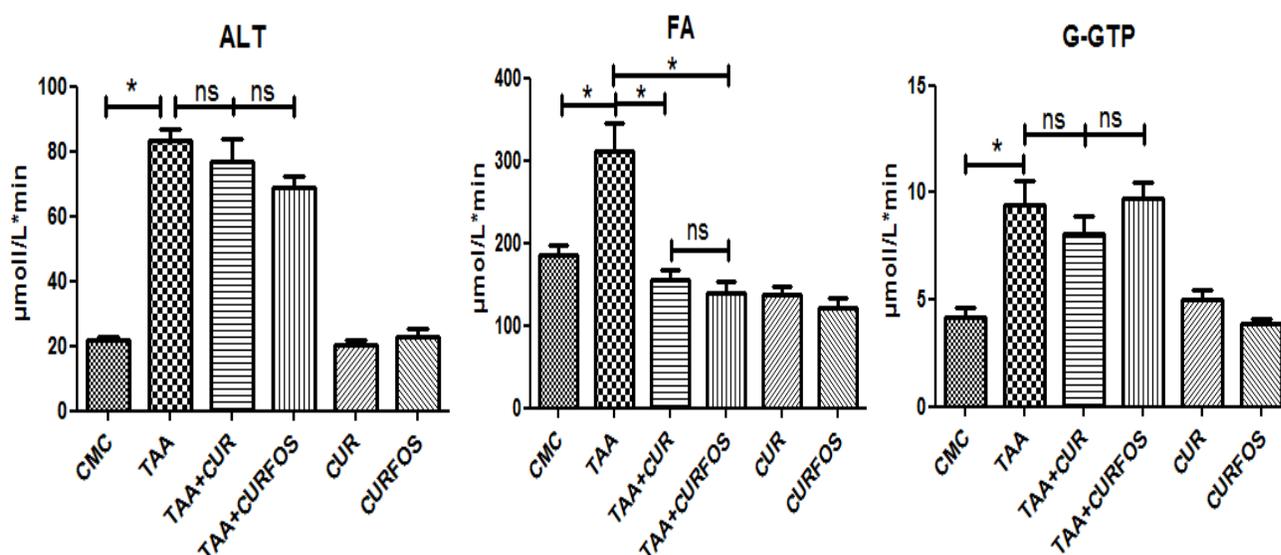


Fig. 22. Determinación de la actividad enzimática de ALT, FA, y γ -GTP en suero de ratas tratadas con CMC, TAA, TAA+CUR, TAA+CUR-FOS, CUR, CUR-FOS. Cada barra representa el promedio de cada grupo +/- error estándar. “*” indica $p < 0.05$, “ns” indica $p > 0.05$.

Determinación del glutatión reducido, glucógeno y peroxidación lipídica.

Se cuantificó el GSH en hígado (figura 23), marcador de estrés oxidativo que se ve disminuido en el daño hepático. Este antioxidante endógeno disminuyó significativamente al administrar 200 mg/ kg de TAA, dosis única vía ip., con respecto al grupo control (CMC).

En el grupo tratado con CUR y CUR-FOS, los niveles de GSH aumentaron pero no significativamente respecto al grupo de daño, por lo que los tratamientos con CUR y CUR-FOS, no previnieron la disminución del GSH hepático. La CUR y la CUR-FOS por si solas no produjeron cambios en este marcador de estrés oxidativo.

El glucógeno hepático (figura 23), se cuantificó en las ratas administradas con 200mg/ kg de TAA, decreciendo considerablemente, indicando que la capacidad biosintética hepática ha sido afectada.

Al tratar a las ratas con CUR y CUR-FOS, no se previno el decremento en la cantidad de glucógeno hepático. La administración de CUR y la CUR-FOS solas no muestran cambios en la cantidad de glucógeno hepático

En esta misma figura se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la peroxidación lipídica (MDA), un metabolito final de dicho proceso. El tratamiento con TAA aumentó los niveles de MDA a casi el doble con respecto al control, lo que es un indicativo del desarrollo de la peroxidación lipídica. El tratamiento con CUR no mostró prevención en el aumento de la peroxidación lipídica, por otro, lado el tratamiento con CUR-FOS previno el aumento del MDA. La CUR y la CUR-FOS solas no causaron cambios en la peroxidación lipídica.

En cuanto a la comparación entre la CUR y la CUR-FOS, los resultados obtenidos en la determinación de GSH y glucógeno muestran que no hay diferencia significativa entre ambos grupos, sin embargo, en la determinación de la

peroxidación lipídica, la CUR-FOS fue significativamente mejor que la CUR para prevenir al aumento en el MDA.

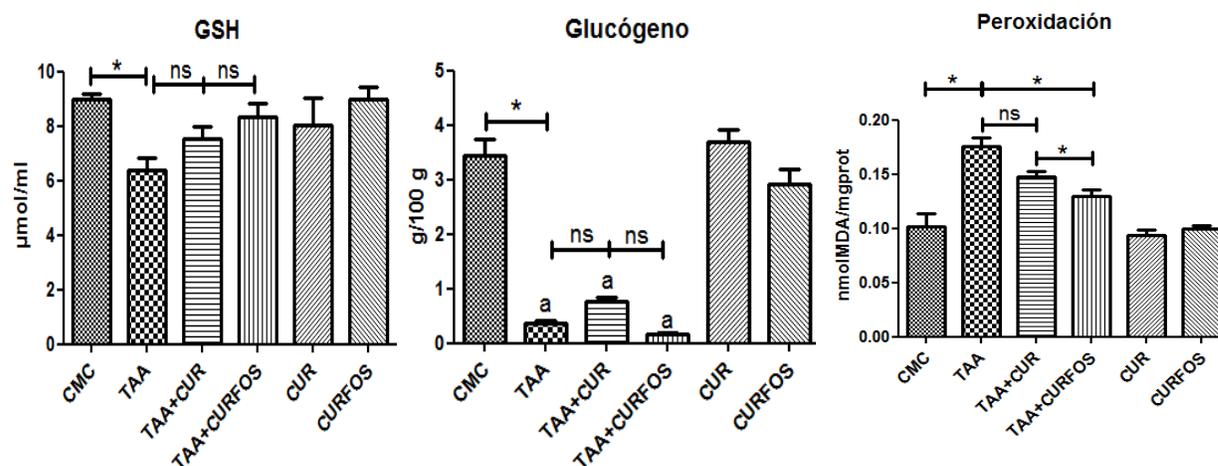


Fig. 23. Determinación hepática de los niveles de glutatión reducido, peroxidación lipídica y glucógeno en ratas tratadas con CMC, TAA, TAA+CUR, TAA+CURFOS, CUR, CURFOS. Cada barra representa el promedio de cada grupo +/- error estándar. “*” indica $p < 0.05$, “ns” indica $p > 0.05$.

8. DISCUSIÓN

El dolor es un mal que aqueja a las personas en muchas partes del mundo, es causado por diversos factores y puede ser un signo o la enfermedad en sí mismo, a pesar de ser un padecimiento común y que en general, existen tratamientos para él; es su presencia tan frecuente lo que preocupa, ya que no padecer dolor es un derecho de los pacientes.

Uno de los principales tratamientos contra el dolor consiste en la administración de AINEs; sin embargo, tienen las desventajas de actuar solamente a nivel de la síntesis de prostaglandinas, además de generar reacciones adversas como problemas de gastritis, enteropatías e incluso llegar a provocar úlceras gástricas; es por ello que se deben buscar otras alternativas farmacológicas para el tratamiento del dolor, alternativas que sean más seguras, eficaces y potentes. En este sentido, la CUR ofrece, su alta seguridad y antecedentes que demuestran, en diferentes modelos de dolor, que tiene propiedades de analgesia. Desafortunadamente, su baja biodisponibilidad ha limitado su uso; es por ello que en este trabajo, uno de los objetivos fue evaluar y comparar la eficacia analgésica del complejo CUR-FOS contra la CUR libre en el modelo de dolor causado por la inyección de formalina en la pata de ratas.

La nocicepción inducida por formalina consiste en dos diferentes estados nociceptivos: la nocicepción aguda (fase 1) se debe a la activación directa de los nociceptores sensoriales periféricos causado por la irritación química, a esto le sigue un estado de dolor inflamatorio (fase 2), esta fase refleja un dolor de origen inflamatorio, reflejo de la liberación de mediadores proinflamatorios y con una importante contribución de una sensibilización central (Tjølsen et al., 1992).

El modelo de formalina fue establecido exitosamente ya que en la figura 20, se observan las dos fases características, la nociceptiva y la inflamatoria; por otro lado, en la figura 21 se observa que la CUR y CUR-FOS solamente tienen una tendencia a disminuir el número de sacudidas (ABC) de la fase dos del modelo de

de la formalina, a esta tendencia hay que sumar el hecho de que no hay diferencia significativa entre los resultados de CUR y CUR-FOS. Por otro lado, en la gráfica 6 se muestra el porcentaje de antinocicepción que produjeron la CUR y CUR-FOS respecto a su vehículo, el cual fue del 35 por ciento, pero no hubo diferencia significativa entre los dos tipos de CUR.

Los resultados obtenidos muestran que pese a los antecedentes, el grupo CUR + formalina no mostró diferencia significativa respecto al grupo de formalina sola, esto se puede explicar observando la tabla 4, en la que se muestran trabajos donde evaluaron el efecto analgésico de la CUR libre en modelos de formalina (De Paz-Campos et al., 2012; Mittal et al., 2009; Tajik et al., 2008); en éstos, se probaron varias dosis de CUR libre, donde 10 mg/kg fue la dosis mínima que mostró un efecto analgésico ya que hubo una diferencia significativa respecto al grupo de formalina (De Paz-Campos et al., 2012); sin embargo, en otro estudio del mismo grupo de trabajo (De Paz-Campos et al., 2014), se encontró que la dosis mínima para causar analgesia fue de 31 mg/kg; e incluso, se ha demostrado que una dosis mucho mayor (100 mg/kg) es la adecuada para producir analgesia.

Los resultados obtenidos en este trabajo son producto de una dosis baja (20 mg/kg) de CUR; de hecho, en la figura 21 se puede mostrar una tendencia alta hacia el efecto deseado.

En este sentido, para encontrar una dosis adecuada, solamente se tendrían que probar varias dosis y encontrar la adecuada de CUR libre, para que, en base a ella, se establezca la dosis de CUR-FOS y poder hacer la comparación entre ambas, ya que si no se utiliza una dosis tal de CUR libre que produzca analgesia, no se podría establecer la dosis de CUR-FOS.

Tabla 4. Comparación de dosis de curcumina utilizadas por diferentes autores.

Modelo de dolor	Dosis de CUR libre	Dosis mínima efectiva	Referencia
Formalina	400 mg/kg v.o.		(Nurullahoglu et al., 2014)
Formalina	3.1-100 mg/kg v.o.	31 mg/kg v.o	(De Paz-Campos et al., 2014)
Formalina	25, 50, 100, 200, 400 and 600 mg/kg i.p.	25 mg/kg i.p.	(Mittal et al., 2009)
Formalina	25, 50, 100, 200 mg/kg	100 mg/kg	(Tajik et al., 2008)

Otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar y comparar la eficacia hepatoprotectora del complejo CUR-FOS contra la CUR libre en un modelo de daño hepático agudo provocado por la administración de TAA en ratas.

Después de la administración de TAA, ésta se bioactiva por el CYP2E1, produciéndose TASO que es un radical libre, a su vez puede seguir reaccionando produciendo TASO₂, ambos metabolitos, alteran la integridad de los hepatocitos, induciendo necrosis y la generación de ROS que finalmente producirán daño hepático (Chilakapati et al., 2007).

Los resultados muestran que el daño hepático agudo por TAA fue reproducido exitosamente ya que las enzimas hepáticas FA, γ -GGT y ALT fueron incrementadas significativamente respecto al control, así como la peroxidación lipídica; por otro lado, el glucógeno y el GSH fueron disminuidos respecto al grupo control. Sin embargo, las propiedades hepatoprotectoras de la CUR y CUR-FOS solamente se pudieron observar en la disminución de FA y la peroxidación lipídica, así como una tendencia a disminuir la actividad de ALT y para aumentar el contenido del GSH. En cuanto a la actividad de γ -GGT y el contenido de glucógeno, la CUR y la CUR-FOS no mostraron efectos hepatoprotectores, al no disminuir la actividad de la γ -GGT ni aumentar el contenido de glucógeno.

El uso de la CUR libre en el tratamiento del daño hepático agudo no ha sido estudiado a profundidad ya que solamente se han publicado dos artículos, el de

(Reyes-Gordillo et al., 2007) y (Shapiro et al., 2006); por otro lado, se han publicado varios artículos que estudian el efecto hepatoprotector de la CUR libre sobre el daño hepático crónico inducido por TAA. Hablando sobre la dosis de TAA necesaria para causar daño hepático, parece ser que la utilizada en este trabajo fue adecuada, ya que se tienen reportes (Abdou et al., 2012; Ali et al., 2014; Bruck et al., 2007; Shapiro et al., 2006; Wang et al., 2012) que la TAA causa intoxicación hepática en un intervalo de 100 mg/kg-300 mg/kg y la que se utilizó en el presente trabajo fue de 200 mg/kg en dosis única.

En cuanto a la CUR libre, las dosis utilizadas por Shapiro et al. (2006) fueron de 200 y 400 mg/kg y la dosis con mejor resultado fue la de 400mg/kg. En el trabajo de Reyes-Gordillo et al., 2007, se indujo el daño agudo con CCl₄ y la dosis de curcumina utilizada fue de 200 mg/kg con buenos resultados, en los modelos crónicos varía la dosis de CUR libre y va desde 300 mg/kg hasta 500 mg/kg (tabla 5).

Tabla 5. Comparación de dosis de tioacetamida y curcumina utilizadas por diferentes autores.

Hepatotóxico	Curso del daño	Dosis hepatotóxico	Dosis de curcumina	Referencia
TAA	Agudo	Dos administraciones ip. 300 mg/kg con intervalos de 24 hrs. entre cada una.	200 y 400 mg/kg por día durante tres días. Dosis con mejor resultado: 400mg/kg.	(Shapiro et al., 2006)
CCl ₄	Agudo	4 g/kg v.o. dosis única.	200mg/kg 2 horas antes y dos horas después de la administración del CCl ₄	(Reyes-Gordillo et al., 2007)
TAA	Crónico	100 mg/kg ip. tres veces por semana durante 8 semanas.	300 mg/kg tres veces por semana durante 8 semanas.	(Wang et al., 2012)
TAA	Crónico	200 mg/kg, ip. dos veces por semana por 12 semanas.	300 mg/kg por durante 12 semanas	(Bruck et al., 2007)
TAA	Crónico	250 mg/kg ip. tres veces por semana durante 8 semanas	500 mg/kg por día durante 8 semanas.	(Abdou et al., 2012)
TAA	Crónico	200 mg/kg ip. tres veces por semana durante 7 semanas.	400 mg/kg por día durante 7 semanas	(Ali et al., 2014)

En este sentido, la dosis de CUR libre utilizada en este trabajo (200mg/kg) no fue la adecuada para causar hepatoprotección y se necesitaría aumentarla para que su efecto se produzca y en base a eso calcular la dosis equivalente para CUR-FOS y así poder hacer la comparación entre CUR libre y CUR-FOS.

La pobre biodisponibilidad oral de polifenoles como la CUR, se puede mejorar utilizando PHYTOSOMES[®], que son un tipo de formulación que mejora la tasa y el grado de solubilización en los fluidos intestinales acuosos y la capacidad de cruzar las biomembranas. Los fosfolípidos muestran afinidad por los polifenoles y forman aductos supramoleculares que tienen una estequiometría definida. La fosfatidilcolina es una molécula anfipática, uno de los principales componentes de las membranas celulares, un compuesto miscible en agua y en lípidos, se absorbe bien por vía oral y tiene el potencial para actuar como un acompañante de polifenoles, acompañándolos a través de membranas biológicas (Semalty et al., 2010).

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar y comparar la eficacia hepatoprotectora y analgésica del complejo CUR-FOS contra la CUR libre en un modelo de daño hepático agudo provocado por TAA y en el modelo de dolor causado por la inyección de formalina en la pata de la rata ya que uno de los principales problemas que presenta la CUR libre es su baja biodisponibilidad por su baja absorción, rápido metabolismo y su probable rápida eliminación, es por ello que echando mano de la tecnología farmacéutica, se han desarrollado formulaciones como el curcuVET[®] (CUR-FOS) que prometen mejorar la biodisponibilidad de la CUR.

El complejo CUR-FOS es una fórmula farmacéutica en la cual, la curcumina y lecitina de soya se formulan en una proporción de peso 1: 2 y luego se añaden dos partes de celulosa microcristalina para mejorar la fluidez, con un contenido total de curcumina en el producto final de alrededor de 20% con lo que se trata de mejorar la biodisponibilidad de la CUR (Kidd, 2009; Semalty et al., 2010).

No existen estudios donde se compare la biodisponibilidad de la CUR respecto a la CUR-FOS (curcuVET[®]), solamente hay un único reporte con el análogo de uso humano Meriva[®] (el curcuVET[®] es de uso veterinario) (Thorne Research, 2015). Los niveles plasmáticos máximos y el ABC de la CUR y de Meriva[®] fueron valoradas; después de la administración de Meriva[®] se encontraron valores cinco veces superior a los valores equivalentes vistos después de la administración de CUR no formulada. Del mismo modo, los niveles en el hígado de CUR fueron más altos después de la administración de Meriva[®] en comparación con la CUR no formulada. En contraste, las concentraciones de CUR en la mucosa del tracto gastrointestinal después de la ingestión del Meriva[®] fueron inferiores a las observadas después de la administración de la CUR no formulada, lo que sugiere que Meriva[®] proporciona mayores niveles sistémicos que la CUR no formulada (Marczylo et al., 2007).

Sin embargo, en el presente estudio se observó que la farmacodinamia de las dos CUR es igual y que la tecnología farmacéutica utilizada, no mejora los efectos de la CUR. Esto puede ser debido a que como se mencionó anteriormente solo hay un artículo en el que se compara la farmacocinética de la CUR libre contra la CUR-FOS y se utilizó el producto comercial Meriva[®]. El producto comercial con el que se trabajó en esta tesis fue el curcuVET[®], que según (Thorne Research, 2015) es lo mismo que el Meriva[®]. El problema con el curcuVET[®] es que no ha sido tan estudiado como el Meriva[®] ya que la mayoría de los estudios que se han realizado utilizan Meriva[®], solamente dos investigaciones han utilizado curcuVET[®] (Farinacci et al., 2009, 2010), estas investigaciones destacan la propiedad anti-inflamatoria del compuesto y lo sugieren para el tratamiento de desórdenes osteoarticulares, sin embargo, como se menciona en líneas anteriores no hay estudios farmacocinéticos en los cuales se compare el curcuVET[®] contra la CUR libre ni tampoco hay comparaciones entre Meriva[®] y el curcuVET[®].

Por lo mencionado anteriormente, se propone un estudio farmacocinético en donde se comparen la CUR libre, y la CUR-FOS en los dos productos comerciales: el curcuVET[®] y el Meriva[®], para poder identificar si la

biodisponibilidad de la CUR mejora por igual en los dos productos comerciales o si alguna diferencia en cuanto a su farmacocinética pudiera explicar los resultados obtenidos en la presente tesis.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo donde se comparan los efectos antinociceptivos y hepatoprotectores de la CUR-FOS contra la CUR en un modelo de dolor causado por la administración de formalina y en un modelo de daño hepático agudo causado por la administración de TAA, llevan a las siguientes conclusiones:

- a) La inducción de dolor y daño hepático fueron claramente establecidos mediante el modelo de la formalina y el modelo de TAA, respectivamente.
- b) La CUR y la CUR-FOS disminuyen parcialmente el comportamiento de pataleo de la rata en el modelo de formalina, presentan un porcentaje de antinocicepción a una dosis de 20 mg/kg de aproximadamente el 35 por ciento.
- c) No hay diferencia significativa entre el grupo de CUR respecto al grupo CUR-FOS en el área bajo la curva de los pataleos contra el tiempo, ni en el porcentaje de antinocicepción.
- d) La CUR y la CUR-FOS previenen el incremento de la actividad enzimática de FA, pero no de ALT ni de γ -GTP, tampoco mejoraron los niveles del glucógeno y del GSH hepático después del daño, por lo que no se puede hablar de un efecto hepatoprotector.
- e) La CUR-FOS previene el estrés oxidativo a nivel membranal (peroxidación lipídica).
- f) En el único marcador de daño hepático en el que fue mejor la CUR-FOS respecto a CUR fue en la peroxidación lipídica, probablemente se deba a que la fosfatidilcolina aumenta la afinidad de la CUR por la membrana, contribuyendo así al efecto antioxidante a nivel membranal.

Por lo que de manera general se concluye que:

No se encontró diferencia significativa entre la curcumina libre y el producto comercial curcuVET[®] en la mayoría de los parámetros estudiados, lo que sugiere que la asociación de la curcumina con fosfatidilcolina no mejora la farmacodinamia del compuesto.

APÉNDICE. Curvas de calibración.

FOSFATASA ALCALINA

Para realizar la curva estándar de calibración se prepararon las siguientes disoluciones:

- a) **Disolución estándar de p-nitrofenol (10 μ moles/mL).** Se pesaron 34.78 mg de p-nitrofenol y se aforaron con agua destilada en un matraz volumétrico de 25 mL.
- b) **Disolución 2.** Se tomaron 0.5 mL de la disolución anterior y se aforaron a 100 mL con NaOH 0.02 N.
- c) **Disolución de hidróxido de sodio 0.02 N,** en adelante referida como disolución.

En la tabla 6 se muestran las cantidades añadidas de cada una de las disoluciones a fin de obtener distintas concentraciones del producto de la reacción (p-nitrofenol).

Tabla 6. Curva estándar de FA.

TUBO	Disolución 2 (mL)	Disolución 3 (mL)	Sustrato hidrolizado (μ moles)
1	0.0	5.5	0.0
2	0.5	5	0.025
3	1.0	4.5	0.050
4	2.0	3.5	0.100
5	3.0	2.5	0.150
6	4.0	1.5	0.200
7	5.0	0.5	0.250

Después de adicionar las disoluciones, los tubos se agitaron por inversión y las absorbancias se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro.

A cada valor de concentración correspondió un valor de absorbancia, con lo cual se construyó una ecuación de la forma $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m y b a la pendiente de la recta y ordenada al origen, respectivamente, y x corresponde al valor de concentración desconocido.

GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA

Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se aforaron a 250 mL con ácido acético 1.5 M para preparar la disolución 1. En la tabla 7 se especifican la cantidad de agua destilada y disolución 1 añadidas a cada tubo de reacción.

Tabla 7. Curva de calibración de γ -GTP.

TUBO No.	Disolución 1 (μ L)	H ₂ O (μ L)	Producto nmoles/mL	Producto μ moles/mL
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.75
6	500	1500	100	0.10
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

Después de adicionar las disoluciones, los tubos se agitaron por inversión y las absorbancias se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro.

De manera análoga a la curva estándar de ALP, para este caso se obtuvo una ecuación de la forma $y = mx + b$ para conocer la concentración de producto obtenido y dicho valor se empleó para reportar la actividad enzimática como μ mol/L.min.

ALANINA AMINOTRANSFERASA

En la tabla 8 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida de producto) se realizó por duplicado.

Tabla 8. Curva de calibración de ALT.

Reactivos	No. de tubo						
	1	2	3	4	5	6	7
Disolución sustrato (μL)	250	225	200	175	150	125	100
Disolución estándar de piruvato (μL)	----	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μL)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μL)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4 N (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Piruvato (μmoles)	----	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Después de adicionar los reactivos referidos en la tabla 8 los tubos se mezclaron vigorosamente en un agitador vórtex y se leyeron las absorbancias a 515 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201. A partir de los valores de concentración y absorbancia se construyó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta del tipo $y = mx + b$. Con base en los datos de la ecuación, se calcularon las concentraciones (valor de x en la ecuación) a partir de las absorbancias obtenidas para las muestras de plasma.

A continuación, se describe la preparación de los reactivos utilizados en la presente técnica y que son referidos en la tabla 8.

- Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4:** Se mezclaron 840 mL de disolución 0.1 M de fosfato disódico con 160 mL de disolución 0.1 M de fosfato monopotásico.
- Disolución de sustrato:** Se disolvieron 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido α -oxoglutarico en disolución buffer y se añadieron 0.5 mL de hidróxido

de sodio 1 N. La disolución se aforó a 100 mL con disolución buffer. Una vez utilizado, el sustrato se conservó a 4 °C hasta su siguiente uso.

- c) **Disolución estándar de piruvato (1 $\mu\text{mol/mL}$):** la disolución se preparó el mismo día en que fue utilizada, el volumen restante fue desechado. Para prepararla se pesaron 11 mg de piruvato sódico y se mezclaron con 100 mL de disolución buffer.
- d) **Reactivo Cromógeno:** Se agregaron 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina a HCl 1 N caliente hasta disolverse. Finalmente, la disolución se aforó a un litro con HCl 1 N.

GLUTATIÓN REDUCIDO

A continuación se describe la preparación de las disoluciones empleadas para elaborar la curva de calibración.

- a) **Disolución patrón de glutatión reducido (1 nmol/mL):** se disolvieron 30.733 mg de GSH con disolución de fosfatos 0.3 M hasta completar un volumen de 100 mL.
- b) **Disolución de fosfatos:** 42.6 g de Na_2HPO_4 se disolvieron con agua destilada. La disolución se aforó a 1 L, para obtener una concentración final de 0.3 M.
- c) **Reactivo de Ellman:** se pesaron 40 mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzoico (DTNB) y se disolvieron con 100 mL de una disolución de citrato de sodio al 1%

Tabla 9. Curva de calibración de GSH.

Tubo	Disolución patrón de GSH (μL)	Disolución de fosfatos (mL)	Reactivo de Ellman (mL)	GSH (nmol)
1	0	2.2	0.25	0
2	10	2.19	0.25	10
3	50	2.15	0.25	50
4	100	2.10	0.25	100
5	250	1.95	0.25	250
6	450	1.75	0.25	450
7	650	1.55	0.25	650
8	850	1.35	0.25	850

Los tubos se agitaron por inversión y a partir de las absorbancias obtenidas a 412 nm y la concentración conocida de GSH (tabla 9) se calculó la ecuación de la recta. De manera análoga a las determinaciones de actividad enzimática, los valores de la pendiente, ordenada al origen y las absorbancias para cada muestra (**m**, **b** e **y**, respectivamente), se calcularon los valores de concentración de GSH en los homogeneizados de hígado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90, 643–653.
- Abdou, S., Taha, N., Mandour, A., Lebda, M., Hofi, H., ElMorshedy, A., 2012. Antifibrotic effect of curcumin on thioacetamide induced liver fibrosis. *Alexandria J. Vet. Sci.* 45, 43.
- Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B., 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 40–59.
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H., 2007. Curcumin: The Indian solid gold. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 1–75.
- Ali, S.O., Darwish, H.A.E., Ismail, N.A.E., 2014. Modulatory effects of curcumin, silybin-phytosome and alpha-R-lipoic acid against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Chem. Biol. Interact.* 216, 26–33.
- Amaya, F., Izumi, Y., Matsuda, M., Sasaki, M., 2013. Tissue injury and related mediators of pain exacerbation. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 592–597.
- Ammon, H.P., Wahl, M. a, 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 57, 1–7.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R. a., Aggarwal, B.B., 2007. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm.* 4, 807–818.
- Bataller, R., Brenner, D., 2005. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 115, 209–218.

- Berger, L., and Rudolph, G.N. (1963). Alkaline phosphatase. In *Standards Method of Clinical Chemistry*. Vol. 5, Ed. by Meites Academic Press, New York. 211-221.
- Bernabé, A., Navarro, J., Pallarés, F., 2008. *Citología e histología veterinaria*. Open courseware, Univ. Murcia 1, 1–5.
- Binshtok, A.M., 2011. Mechanisms of nociceptive transduction and transmission: a machinery for pain sensation and tools for selective analgesia. *Int. Rev. Neurobiol.* 97, 143-77.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bruck, R., Ashkenazi, M., Weiss, S., Goldiner, I., Shapiro, H., Aeed, H., Genina, O., Helpern, Z., Pines, M., 2007. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. *Liver Int.* 27, 373–83.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation, methods in enzymology. 53, 302-310.
- Chainani-Wu, N., 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: A component of tumeric (*curcuma longa*). *J. Altern. Complement. Med.* 9, 161–168.
- Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C., Hsieh, C.Y., 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21, 2895–900.

- Chilakapati, J., Korrapati, M.C., Hill, R. a, Warbritton, A., Latendresse, J.R., Mehendale, H.M., 2007. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology*. 230, 105–16.
- Connolly, M.K., Bedrosian, A.S., Malhotra, A., Henning, J.R., Ibrahim, J., Vera, V., Cieza-Rubio, N.E., Hassan, B.U., Pachter, H.L., Cohen, S., Frey, A.B., Miller, G., 2010. In hepatic fibrosis, liver sinusoidal endothelial cells acquire enhanced immunogenicity. *J. Immunol*. 185, 2200–8.
- De Paz-Campos, M.A., Chávez-Pina, A.E., Ortiz, M.I., Castañeda-Hernández, G., 2012. Evidence for the participation of ATP-sensitive potassium channels in the antinociceptive effect of curcumin. *Korean J. Pain*. 25, 221–227.
- De Paz-Campos, M.A., Ortiz, M.I., Chávez Piña, A.E., Zazueta-Beltrán, L., Castañeda-Hernández, G., 2014. Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine*. 21, 1543–8.
- Dubin, A.E., Patapoutian, A., 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest*. 120, 3760–3772.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161–74.
- Farinacci, M., Colitti, M., Stefanon, B., 2009. Modulation of ovine neutrophil function and apoptosis by standardized extracts of *Echinacea angustifolia*, *Butea frondosa* and *Curcuma longa*. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 128, 366–373.
- Farinacci, M., Gaspardo, B., Colitti, M., Stefanon, B., 2010. Dietary administration of Curcumin modifies transcriptional profile of genes involved in inflammatory cascade in horse leukocytes. *Ital. J. Anim. Sci*. 1, 84.

- Glossmann, H., Neville, D.M., 1972. γ -Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 19, 340–344.
- Hernández-Aquino, E., 2013. “Evaluación de los posibles efectos hepatoprotectores de la naringenina en un daño hepático experimental.” Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Kidd, P.M., 2009. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern. Med. Rev.* 14, 226–246.
- Kisseleva, T., Brenner, D. a., 2007. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 73-78.
- Kohli, K., Ali, J., Ansari, M.J., Raheman, Z., 2005. Curcumin: A natural antiinflammatory agent Curcumin : *Indian J. Pharmacol.* 37, 141–147.
- Kolios, G., Valatas, V., Kouroumalis, E., 2006. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol.* 12, 7413–20.
- KuKanich, B., 2013. Outpatient oral analgesics in dogs and cats beyond nonsteroidal antiinflammatory drugs. An evidence-based approach. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 43, 1109–1125.
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain.* 10, 895–926.
- Lautt, W.W., 2009. Hepatic circulation. *Colloq. Ser. Integr. Syst. Physiol. From Mol. to Funct.* 1, 1–174.

- MacFarlane, P.D., Tute, S., Alderson, B., 2014. Therapeutic options for the treatment of chronic pain in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 55, 127–34.
- Marczylo, T.H., Verschoyle, R.D., Cooke, D.N., Morazzoni, P., Steward, W.P., Gescher, A.J., 2007. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60, 171–177.
- Mesa M., Ramírez-Tortosa MC., Aguilera CM., Ramírez-Boscá A., Gil A. (2000) Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica.* 41: 307-321.
- Mittal, N., Joshi, R., Hota, D., Chakrabarti, A., 2009. Evaluation of antihyperalgesic effect of curcumin on formalin-induced orofacial pain in rat. *Phyther. Res.* 23, 507–512.
- Molina, D.K., DiMaio, V.J.M., 2012. Normal organ weights in men: Part II-the brain, lungs, liver, spleen and kidneys. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 33, 368–72.
- Monteiro-Steagall, B.P., Steagall, P.V.M., Lascelles, B.D.X., 2013. Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1011–1019.
- Muriel, P., Rivera-Espinoza, Y., 2008. Beneficial drugs for liver diseases. *J. Appl. Toxicol.* 28, 93–103.
- Nakatani, K., Kaneda, K., Seki, S., Nakajima, Y., 2004. Pit cells as liver-associated natural killer cells: Morphology and function. *Med. Electron Microsc.* 37, 29–36.

- Nurullahoglu, K.E., Okudan, N., Belviranlı, M., Oz, M., 2014. The comparison of preemptive analgesic effects of curcumin and diclofenac. *Bratisl. Lek. Listy* 115, 757–60.
- Olaso, E., Friedman, S.L., 1998. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J. Hepatol.* 29, 836–847.
- Pan, M.H., Huang, T.M., Lin, J.K., 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* 27, 486–494.
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., 2012. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S26.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56–63.
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Vergara, P., Moreno, M.G., Muriel, P., 2007. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1770, 989–996.
- Riehle, K.J., Dan, Y.Y., Campbell, J.S., Fausto, N., 2011. New concepts in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 203–12.
- Rivera-Espinoza, Y., Muriel, P., 2009. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver Int.* 29, 1457–66.
- Schaub, N.A., 2002. Skin changes in liver diseases. *Praxis (Bern. 1994).* 91, 1037–1041.

- Schiødt, F. V., Atillasoy, E., Shakil, A.O., Schiff, E.R., Caldwell, C., Kowdley, K. V., Stribling, R., Crippin, J.S., Flamm, S., Somberg, K.A., Rosen, H., McCashland, T.M., Hay, J.E., Lee, W.M., 1999. Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transpl. Surg.* 5, 29–34.
- Semalty, A., Semalty, M., Rawat, M.S.M., Franceschi, F., 2010. Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: the PHYTOSOME strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia* 81, 306–14.
- Shapiro, H., Ashkenazi, M., Weizman, N., Shahmurov, M., Aeed, H., Bruck, R., 2006. Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 358–66.
- Sharkey, M., 2013. The challenges of assessing osteoarthritis and postoperative pain in dogs. *AAPS J.* 15, 598–607.
- Sharma, R. a., Steward, W.P., Gescher, A.J., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 453–470.
- Sharma, S., Kulkarni, S.K., Agrewala, J.N., Chopra, K., 2006. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 536, 256–61.
- Shishodia, S., Sethi, G., Aggarwal, B.B., 2005. Curcumin: Getting back to the roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056, 206–217.
- Srinivas, L., Shalini, V.K., Shylaja, M., 1992. Turmerin: A water soluble antioxidant peptide from turmeric *Curcuma longa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 617–623.
- Tajik, H., Tamaddonfard, E., Hamzeh-Gooshchi, N., 2008. The effect of curcumin (active substance of turmeric) on the acetic acid-induced visceral nociception in rats. *Pakistan J. Biol. Sci.* 11, 212-314.

- Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.
- Wang, M.-E., Chen, Y.-C., Chen, I.-S., Hsieh, S.-C., Chen, S.-S., Chiu, C.-H., 2012. Curcumin protects against thioacetamide-induced hepatic fibrosis by attenuating the inflammatory response and inducing apoptosis of damaged hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1352–66.
- Yaksh, T.L., Ozaki, G., McCumber, D., Rathbun, M., Svensson, C., Malkmus, S., Yaksh, M.C., 2001. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. *J. Appl. Physiol.* 90, 2386–402.
- Yeon, K.Y., Kim, S. a, Kim, Y.H., Lee, M.K., Ahn, D.K., Kim, H.J., Kim, J.S., Jung, S.J., Oh, S.B., 2010. Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *J. Dent. Res.* 89, 170–174.
- Yin, C., Evason, K.J., Asahina, K., Stainier, D.Y.R., 2013. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 1902–1910.
- Zhao, X., Xu, Y., Zhao, Q., Chen, C.R., Liu, A.M., Huang, Z.L., 2012. Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: Descending monoamine system and opioid receptors are differentially involved. *Neuropharmacology* 62, 843–854.
- Zimmermann, M., 1986. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol. Scand.* 554, 221–233.

Referencias de internet.

Gracia, S.G., consultado el día once de noviembre del 2015. ¿Qué es la sensibilización periférica y sus implicaciones clínicas? Página de consulta: <https://soypacientedesamu.wordpress.com/2014/09/16/que-es-la-sensibilizacion-periferica-y-sus-implicaciones-clinicas/>.

Mach, M. F., consultado el día once de noviembre del 2015. Fisiopatología del dolor. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. Página de consulta: <http://www.scartd.org/arxius/fisiodolor06.pdf>

Thorne research., consultado el día once de noviembre del 2015. curcuVET[®] curcumin phytosome for enhanced bioavailability. Página de consulta: http://www.luckyvitamin.com/images/brochures/thorne_research_curcuvet0001.pdf