



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Caracterización de la eficacia analgésica y seguridad  
gastrointestinal de combinaciones entre curcumina y AINEs”**

Tesis que presenta

**M. en C. Marco Antonio De Paz Campos**

Para Obtener el Grado de

**Doctor en Ciencias**

En la Especialidad de

**FARMACOLOGÍA**

**Directores de la Tesis:**

**Dr. Gilberto Castañeda Hernández**

**Dr. Mario Isidoro Ortíz Ramírez**

México, Distrito Federal.

JULIO, 2014.

**El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. Gilberto Castañeda Hernández. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio 34 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.**

## **Dedicatorias**

**A Estela, por alentarme y animarme a continuar en los momentos difíciles, eres el amor de mi vida.  
Por todo lo que ha sido: ¡Gracias!...A todo lo que será: ¡Sí!.**

**A Marijose y Andrea, su alegría por la vida me llena en todo momento, son mi motivo y mi razón hijas.**

**A mis padres, gracias por la vida, la infancia y el ejemplo.  
Este logro es resultado de su apoyo incondicional.**

**A mis hermanas, por todo lo que compartimos y lo que falta.**

**A mi suegra, gracias por toda su ayuda**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández , por su confianza, sus enseñanzas científicas y de vida , pero sobre todo por su paciencia.**

**Al Dr. Mario Ortiz Ramírez por su interés, su asesoría y aportaciones en la realización del presente trabajo, responsable en gran medida de este logro.**

**A los miembros del comité revisor, sus valiosas aportaciones enriquecieron este trabajo.**

**A la QFB Lourdes Gonzáles Flores por su asistencia técnica, por las cosas que me enseñó y por su preocupación. El “curcumino” siempre te estará agradecido.**

**A la QFB Patricia González García por su asistencia técnica y su ayuda incondicional en la elaboración del proyecto.**

**A amigos del laboratorio: Orlando, Rodrigo, Olivid y Abdiel.**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para la realización de este proyecto.**

<b>ÍNDICE</b> .....	I
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VI
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VIII
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	XI
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	3
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
3.1. Dolor.....	5
3.1.1 Generalidades.....	5
3.1.2 Fisiopatología.....	5
3.1.2.1 Transducción.....	6
3.1.2.2 Conducción.....	9
3.1.2.3 Transmisión.....	9
3.1.2.4 Proyección.....	12
3.1.2.5 Percepción.....	13
3.1.2.6 Modulación.....	13
3.1.3 Vía Óxido Nítrico-GMPc Canales de potasio dependientes de ATP y analgesia.....	16
3.1.3.1 Canales de potasio y antinocicepción.....	16
3.1.3.2 Vía óxido nítrico-GMPc-Canales $K_{ATP}$ .....	18
3.1.4 Clasificación del dolor.....	19
3.1.5 Tratamiento farmacológico del dolor.....	22

3.1.5.1 Generalidades.....	22
3.1.5.2 Anti-inflamatorios no esteroidales (AINEs).....	23
3.1.5.2.1 Selectividad de los AINEs.....	23
3.1.5.2.2 Toxicidad gástrica de los AINEs.....	25
3.1.5.2.3 Diclofenaco.....	27
3.1.5.2.4 Indometacina.....	29
3.2. Curcumina.....	30
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
6.1. Objetivo General.....	35
6.2. Objetivos Particulares.....	35
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
7.1. Animales de Experimentación.....	36
7.2. Fármacos y reactivos.....	36
7.3. Equipo.....	37
7.3.1 Modelo de Formalina.....	37
7.3.2 Modelo de daño gástrico y entérico.....	37
7.4. Diseño experimental.....	37
7.4.1 Evaluación de la actividad antinociceptiva de la Curcumina.....	37
7.4.2 Participación de la vía ON-GMPc-K <sub>ATP</sub> en la actividad antinociceptiva de la Curcumina.....	39

7.4.3 Determinación de la interacción farmacológica de la actividad antinociceptiva entre curcumina y AINEs.....	40
7.4.4 Establecimiento de la actividad gastroprotectora de la Curcumina.....	43
7.4.4.1 Determinación del efecto gástrico generado por diferentes dosis de curcumina, indometacina, diclofenaco y sus combinaciones.....	43
7.4.4.2 Determinación de la actividad gastroprotectora de la curcumina contra el daño generado por indometacina y diclofenaco.....	44
7.4.5 Establecimiento de la actividad enteroprotectora de la curcumina.....	44
7.5. Análisis de datos.....	45
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
8.1 Actividad antinociceptiva de la curcumina.....	47
8.2 Participación de la vía ON-GMPc-K <sub>ATP</sub> en la actividad antinociceptiva de la curcumina.....	48
8.2.1 Efecto de la administración de L-NAME en la actividad antinociceptiva de la curcumina.....	48
8.2.2 Efecto de la administración de ODQ en la actividad antinociceptiva de la curcumina.....	49
8.2.3 Efecto de la administración de glibenclamida en la actividad antinociceptiva de la curcumina.....	50
8.3 Interacción farmacológica de la actividad antinociceptiva entre curcumina y AINEs...51	51
8.3.1 Curvas dosis-efecto de curcumina, diclofenaco e indometacina.....	51
8.3.2 Establecimiento de la dosis efectiva teórica 30 (DE <sub>30</sub> T).....	53
8.3.3 Efecto antinociceptivo de las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina.....	53



8.3.4 Establecimiento de la Dosis Efectiva 30 Experimental (DE <sub>30E</sub> ).....	55
8.3.5 Índice de interacción.....	56
8.3.6 Isobogramas de la interacción antinociceptiva entre las combinaciones curcumina- diclofenaco y curcumina-indometacina.....	56
8.3.7 Curva dosis-efecto antinociceptivo normalizada de AINEs, curcumina y sus combinaciones.....	58
<b>8.4 Seguridad gástrica de la curcumina.....</b>	<b>58</b>
8.4.1 Efecto gástrico generado por curcumina, diclofenaco e indometacina .....	58
8.4.2 Daño gástrico generado por las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina.....	60
8.4.3 Actividad gastroprotectora de la Curcumina contra el daño generado por diclofenaco e indometacina.....	61
8.4.4 Curva dosis-efecto deletéreo normalizada de AINEs, curcumina y sus combinaciones.....	62
<b>8.5 Seguridad entérica de la curcumina.....</b>	<b>63</b>
8.5.1 Distribución del daño generado por diclofenaco e indometacina en el intestino delgado.....	63
8.5.2 Efecto enteroprotector de la curcumina contra diclofenaco e indometacina.....	64
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
9.1 Actividad antinociceptiva de la curcumina y participación de la vía ON-GMPc-K <sub>ATP</sub> .....	65
9.2 Interacción entre curcumina y AINEs.....	68
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
10.1 Conclusión General.....	73

10.2 Conclusiones Particulares.....	73
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>74</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

5HT	5-Hidroxitriptamina
AAS	Ácido acetil salicílico
ABC	Área bajo la curva
AINEs	Antiinflamatorios no esteroidales
AMPA	Ácido- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4 propiónico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
Canales $k^+_{ATP}$	Canales de potasio sensibles a ATP
CFTR	Canal de cloro regulador transmembrana de fibrosis quística
cmc	Carboximetilcelulosa
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
COX	Ciclo-oxigenasa
DE <sub>30</sub>	Dosis efectiva 30
DE <sub>30E</sub>	Dosis efectiva 30 experimental
DE <sub>30T</sub>	Dosis efectiva 30 teórica
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ee	Error estándar
GABA	Ácido gamma amino butírico
GMP <sub>C</sub>	Guanosín monofosfato cíclico
GCp	Guanilato ciclasa particulada
Gcs	Guanilato ciclasa soluble
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje
L-Name	NG-L-nitroarginina metil ester

LOX	Lipooxigenasa
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ -B
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Óxido nítrico
SON	Sintasa de óxido nítrico
ODQ	1H-(1,2,4)-oxadiazol-(4,2-a) quinoxalin-1-ona
MMP	Metaloproteinasas de matriz
p.o.	<i>per os</i> (po vía oral)
PG	Prostaglandina
PRGC	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
SUR	Subunidad de receptor sulfonilurea
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Terminación de las fibras aferentes en el asta posterior de la médula espinal.....	10
Figura 2	Sistema de control de compuerta del dolor.....	15
Figura 3	Estructura molecular de los canales $K_{ATP}$ .....	17
Figura 4	Vía Óxido Nítrico-GMPc Canales de potasio dependientes de ATP .....	19
Figura 5	Opciones farmacológicas para el tratamiento del dolor.....	22
Figura 6	Estructura química del diclofenaco.....	27
Figura 7	Estructura química de la indometacina.....	29
Figura 8	Estructura química de la curcumina y otros curcuminoides.....	31
Figura 9	Administración de curcumina en la prueba de la Formalina al 1%.....	38
Figura 10	Nivel de Interrupción de la vía ON-GMPc- $K_{ATP}$ por L-NAME, ODQ y glibenclamida.....	40
Figura 11	Método para establecer el tipo de interacción farmacológica entre dos fármacos.....	42
Figura 12	Isoblograma.....	43
Figura 13	Estratificación del intestino delgado de la rata para su análisis.....	45
Figura 14	Efecto antinociceptivo de la curcumina en la prueba de formalina al 1%...47	
Figura 15	Efecto de la administración de L-NAME sobre el efecto antinociceptivo de la curcumina.....	48

Figura 16	Efecto de la administración de ODQ sobre el efecto antinociceptivo de la curcumina.....	49
Figura 17	Efecto de la administración de glibenclamida sobre el efecto antinociceptivo de la curcumina.....	50
Figura 18	Curvas dosis-efecto antinociceptivo del diclofenaco, indometacina y curcumina en la segunda fase del modelo de formalina.....	52
Figura 19	Curvas dosis-efecto antinociceptivo de las combinaciones de AINEs y curcumina.....	55
Figura 20	Isobogramas de la interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva de las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina.....	57
Figura 21	Curva dosis-efecto antinociceptivo normalizada de los AINEs, la curcumina y sus combinaciones.....	58
Figura 22	Daño gástrico generado por curcumina, diclofenaco e indometacina.....	59
Figura 23	Daño gástrico generado por las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina.....	60
Figura 24	Actividad gastroprotectora de la curcumina contra el daño generado por Diclofenaco e Indometacina.....	61
Figura 25	Curva normalizada dosis efecto deletéreo en la mucosa gástrica por AINEs, curcumina y sus combinaciones.....	62

Figura 26	Distribución del daño generado por diclofenaco e indometacina en el intestino delgado.....	63
Figura 27	Efecto enteroprotector de la curcumina contra diclofenaco e indometacina.....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Canales iónicos expresados en las neuronas sensoriales implicados en la nocicepción.....	7
Tabla 2	Principales sustancias algógenas que estimulan a los nociceptores.....	8
Tabla 3	Cálculo para la obtención de las diferentes dosis de los fármacos a usar en las combinaciones.....	41
Tabla 4	Dosis utilizadas en las combinaciones curcumina-diclofenaco y Curcumina-indometacina para establecer las DE <sub>30</sub> E.....	54
Tabla 5	Índice de interacción en las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina.....	56
Tabla 6	Fármacos que abren directamente los canales K <sub>ATP</sub> .....	67
Tabla 7	Variedades identificadas de canales K <sub>ir6</sub> .....	67
Tabla 8	Comparativo entre dosis, grados de antinocicepción y daño gástrico generados por los AINEs, la Curcumina y sus combinaciones.....	7



## 1. RESUMEN

### Introducción

El dolor es una experiencia física y emocional que tiene una función de alarma y protección del cuerpo, pero bajo ciertas circunstancias, especialmente en condiciones crónicas pierde su función y se convierte en una enfermedad. El dolor crónico disminuye la calidad de vida de quien lo padece y produce importantes pérdidas económicas, por lo que siempre debe ser tratado.

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son fármacos ampliamente usados en el control del dolor, sin embargo producen efectos adversos, resaltando en este sentido las alteraciones gastrointestinales, que limitan su uso clínico a largo plazo y en algunos grupos poblacionales. Lo anteriormente expuesto resalta la necesidad de contar con analgésicos eficaces y seguros a largo plazo, en este contexto, la curcumina se perfila como una alternativa real, aun cuando sus mecanismos de antinocicepción no se han esclarecido por completo y su baja biodisponibilidad oral limita su uso en la clínica.

### Material y métodos

Para investigar la participación de la vía Óxido nítrico-GMP cíclico-Canales de potasio dependientes de ATP (ON-GMP<sub>c</sub> –canales K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>) en la actividad antinociceptiva de la curcumina se usaron ratas sometidas a la prueba de formalina al 1%, que permite evaluar la nocicepción generada por un estímulo moderado y continuo resultado de daño tisular semejante al daño clínico.

Por otro lado, también se utilizó el método del isoblograma para conocer el tipo de interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva entre la curcumina y diversos AINEs como diclofenaco e indometacina. Finalmente, en otra serie de experimentos se indagó sobre el impacto de la curcumina en la disminución del daño generado a nivel gástrico e intestinal por los AINEs.

## Resultados

En el presente trabajo encontramos que existe una participación de los canales  $K^+_{ATP}$  en la actividad analgésica de la curcumina, no así de la vía ON-cGMP; se discuten y proponen posibles mecanismos de activación de dichos canales. Los resultados isoblográficos indicaron que la interacción farmacológica nociceptiva entre la curcumina y los AINEs es de sinergia, lo que permite utilizar dosis más bajas de AINEs con la subsecuente disminución en la presentación de úlceras gastrointestinales, aumentando la actividad antinociceptiva. Esta sinergia, también brinda a la curcumina un aumento en su potencia lo que podría considerarse un enfoque novedoso para resolver la limitante de la baja biodisponibilidad de este fármaco.

Por último, se demostró que la curcumina es capaz de disminuir el daño gástrico generado por la indometacina pero no por el diclofenaco, mientras que a nivel intestinal la curcumina nuevamente se muestra más eficaz para evitar el daño generado por indometacina, lo que pone de manifiesto la existencia de mecanismos diferentes en la generación de úlceras gastrointestinales por los diversos AINEs.

## Conclusiones

En conclusión el presente trabajo contribuye a dilucidar los mecanismos analgésicos de la curcumina y pone de manifiesto la conveniencia de su uso en conjunto con AINEs.

## 2. ABSTRACT

### Introduction

Pain is a common experience that has an alarm function and protect the body, but under certain circumstances the pain loses its function and becomes a disease, especially in chronic conditions, reducing the quality of life of the sufferer and producing significant economic losses. The anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are drugs widely used in pain management, but adverse effects, emphasizing in this regard the gastrointestinal disorders, limit their long-term and clinical use in some population groups. The need for safe and effective analgesic long-term has done is to investigate new drugs with those characteristics, in this context, the curcumin is emerging as a real alternative, however its mechanisms of antinociception, though it is believed to be multimodal, not yet completely clarified.

### Material and methods

In this paper we use rats in the formalin test 1 %, which allows to evaluate the nociception generated by a stimulus moderate and continuous result of tissue damage similar to clinical pain, to investigate the role played by the via ON-cGMP -  $K^+$  ATP channels in antinociceptive activity of curcumin.

Furthermore, the drug interaction between antinociceptive activity of curcumin and various NSAIDs such as diclofenac and indomethacin was also investigated. In another series of experiments we search the impact of curcumin in reducing the gastric and intestinal damage caused by diclofenac and indomethacin.

### Results

The results, while unexpected, are interesting to demonstrate the participation of the  $K^+$  ATP channels, but not the way ON-cGMP in the analgesic activity of curcumin, in this work we discuss and propose possible mechanisms of activation of these channels.

Drug interaction in the antinociceptive activity between NSAIDs and curcumin turned out to be synergy, allowing use lower doses of NSAIDs with the subsequent reduction in the presentation of gastrointestinal ulcers, increasing the antinociceptive activity. This synergy, also provides an increase in the curcumin potency what could be considered a novel approach to resolve the limitation of the low bioavailability of this drug.

Finally, we demonstrated that curcumin is able to reduce the gastric damage generated by indomethacin but not by diclofenac, while at the intestinal level curcumin again shown more effective to prevent the damage generated by indomethacin, which shows the existence of different mechanisms in the generation of gastrointestinal ulcers by NSAIDs.

#### Conclusions

In conclusion, the present study contribute to elucidate mechanisms of curcumin analgesics and highlights the potential for their use in conjunction with NSAIDs.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Dolor**

##### **3.1.1 Generalidades**

El dolor, es un mecanismo de alarma mediante el cual el organismo reacciona ante un estímulo nocivo, retirando la zona expuesta; tiene también una función de protección al minimizar el movimiento y contacto de la región lesionada favoreciendo la recuperación (Julius y Basbaum, 2001). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP por sus siglas en inglés) lo define como una experiencia sensorial (componente objetivo) y emocional (componente subjetivo) desagradable, asociada o no con daño tisular presente o potencial, o descrito en términos de tal daño (Kelly *et al.*, 2001).

Pese a que el dolor es necesario para la supervivencia y la conservación de la integridad del organismo, algunas veces atenta en contra de la calidad de vida de quien lo padece, en especial cuando se torna persistente, ya que genera ansiedad, depresión e incapacidad trascendiendo la esfera individual para convertirse en un problema de salud pública con importantes implicaciones socio-económicas.

##### **3.1.2 Fisiopatología**

La nocicepción es el proceso neuronal mediante el que se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos a los tejidos (Loeser y Treede, 2008), dicho de otra forma, es la actividad aferente producida en el sistema nervioso central y periférico por los estímulos que tienen el potencial para dañar los tejidos. La nocicepción activa diversas respuestas autónomas que conducen a la experiencia del dolor en los seres vivos que tienen un sistema nervioso. Los mecanismos que conforman la nocicepción son: transducción, conducción, transmisión, proyección, percepción y modulación.

### 3.1.2.1 Transducción

Es la conversión de los estímulos nocivos (punción, presión, gradientes de temperatura, luz, etc.) en señales eléctricas por los nociceptores que se localizan en las terminaciones nerviosas de las fibras aferentes primarias. Los nociceptores se caracterizan por tener un umbral de excitación alto que los distingue de otras fibras nerviosas sensitivas (Woolf, 2004). Además, la mayoría de ellos responde a estímulos químicos, mecánicos y de temperatura, por lo que son considerados polimodales (Yunjong *et al.*, 2005). Recientemente se han identificado plenamente los canales iónicos expresados en las terminales axonales sensoriales y en el soma, relacionados con la transducción de estímulos nociceptivos a potenciales eléctricos (**Tabla 1**). Las corrientes iónicas entrantes o salientes que se generan al activarse los canales iónicos, producen una despolarización de la membrana con el subsecuente incremento en la excitabilidad neuronal (Yunjong *et al.*, 2005). En condiciones patológicas, la inflamación es capaz de activar varios tipos de canales iónicos (Yunjong *et al.*, 2005).

Canal iónico	Efecto de la activación/sensibilidad	Corriente iónica
Na <sup>+</sup>	-Generación del potencial de acción. -Relacionados con la generación y mantenimiento del dolor neuropático.	Entrada masiva del ion sodio
Ca <sup>2+</sup>	-Liberación de neurotransmisores (sustancia P y PRGC) -Expresión de genes -Despolarización neural	Incremento de las concentraciones intracelulares de Ca <sup>2+</sup>
K <sup>+</sup>	-Estabilización de la membrana al producir hiperpolarización.	Corriente de salida de K <sup>+</sup>
RPTV1	Sensibles a capsaicina, calor (> 43 °C), ácido, productos de las prostaglandinas (12-HPETE)	Flujos de entrada de cationes no selectivos
RPTV2	Sensibles a calor (> 52°C)	Flujos de entrada de cationes no selectivos
RPTV3	Sensibles a temperaturas medias (31°C).	Flujos de entrada de cationes no selectivos
RPTV4	Sensor de hipotonicidad, temperatura media. Relevante en nocicepción térmica y mecánica	Flujos de entrada de cationes no selectivos
RPTM8	Sensor de frío (23-26°C) y de agentes “refrescantes” como el mentol	Flujos de entrada de cationes no selectivos
RPTA1	Sensor de frío (< 17 °C) Interviene en la mecanotransducción	Flujos de entrada de cationes no selectivos
CISA	Sensible al ácido extracelular	Flujos de entrada de cationes no selectivos
P2X	Sensible a ATP Relacionado con dolor neuropático	Flujos de entrada de cationes no selectivos
R-5HT3	Sensible a serotonina Relacionado con dolor neuropático	Flujos de entrada de cationes no selectivos

**Tabla 1.** Canales iónicos expresados en las neuronas sensoriales implicados en la nocicepción. RPT Receptor de potencial transitorio ; RPTV Receptor de potencial transitorio relacionado con los receptores vaniloideos; CISA canal iónico sensor de ácido; P2X receptor purinérgico subtipo X; PRGC Péptido relacionado al gen de la calcitonina.

Se sabe que algunos nociceptores son capaces de sintetizar, almacenar y liberar neurotransmisores como la neurocinina A, sustancia P, péptido relacionado con el gen de

la calcitonina (PRGC) y glutamato. Por lo tanto, la sensibilización de los nociceptores proviene en parte del propio nociceptor, fenómeno conocido como inflamación neuropática, que también es capaz de estimular a células no neurales (plaquetas, neutrófilos, mastocitos, fibroblastos) que se encuentran en el sitio dañado (Zhang y Strong, 2008).

Existe una serie de mediadores químicos que modulan positivamente la actividad de los nociceptores (**Tabla 2.**) conformando la llamada “sopa inflamatoria” (Rang *et al.*, 2004):

Sustancia	Fuente	Enzima implicada	Inducción de dolor
Potasio	células dañadas	---	++
Serotonina	trombocitos	triptófano hidroxilasa	++
Bradiquinina	kininógeno (plasma)	kalikreína	+++
Histamina	mastocitos	---	+
ATP	células dañadas	---	+
H <sup>+</sup>	células dañadas / células inflamatorias	---	+/-
Prostaglandinas	ácido araquidónico (células dañadas)	ciclooxigenasa	+/-
Leucotrienos	ácido araquidónico (células dañadas)	5-lipooxigenasa	+/-
Sustancia P	terminaciones libres de aferencias primarias	---	+/-
PRGC	terminaciones libres de aferencias primarias	---	+/-

**Tabla 2.** Principales sustancias algógenas que estimulan a los nociceptores (Rang *et al.*, 2004)



### 3.1.2.2 Conducción

La conducción se define como el paso de potenciales de acción de las terminaciones periféricas a través de los axones hacia los nociceptores centrales terminales en el sistema nervioso central (Torres-Huerta y Tenopala-Villegas, 2009).

Las fibras aferentes primarias pueden ser de dos tipos (Julius y Basbaum, 2001):

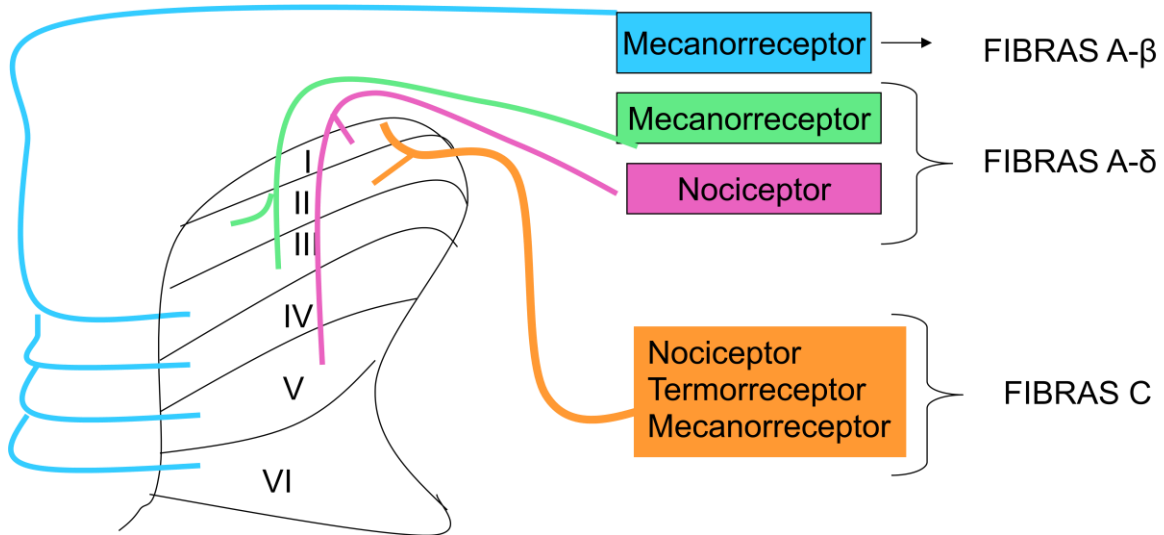
- ❖ Fibras A $\delta$ : Se hallan ligeramente mielinizadas, 25% del total de estas fibras tienen la capacidad para transmitir impulsos nociceptivos y lo hacen en un rango de velocidad de 5-30 m/s. son de mediano diámetro (3mm) y en el dolor somático son las encargadas del dolor primario, de aparición inmediata y bien localizado. Están relacionadas a nociceptores mecánicos de alto umbral y los mecanotérmicos.
- ❖ Fibras C: del total de estas fibras, el 50% están capacitadas para transmitir información nociceptiva, son pequeñas (1mm), no mielinizadas, y son responsables del dolor secundario somático y del dolor visceral de características quemantes y de ubicación difusa. Su velocidad de transmisión es de 0.5 a 2 m/s. Se asocian a nociceptores denominados polimodales, en virtud que responden a estímulos nocivos térmicos, eléctricos, mecánicos y/o químicos. Algunas de estas fibras están capacitadas para liberar mediadores como sustancia P, PRGC y neurocinina A, tanto en las terminaciones periféricas como en las centrales, desempeñando una función importante en el origen del dolor.

### 3.1.2.3 Transmisión

La transmisión es la transferencia sináptica y modulación del potencial de entrada de una neurona a otra (Torres-Huerta y Tenopala-Villegas, 2009).

Las fibras aferentes primarias llegan a la médula espinal (**Figura 1**), que es el punto donde la información nociceptiva puede tomar dos rumbos: es conducida a los centros

superiores para su interpretación como dolor o es inhibida por los sistemas descendentes (Rang *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Terminación de las fibras aferentes en el asta posterior de la médula espinal (Rang *et al.*, 2004)

Las fibras nociceptoras hacen sinapsis con neuronas que se encuentran en la sustancia gris de la médula espinal, la cual, se divide en láminas (láminas de Rexed) de la I a la X, las más importantes con respecto a la conducción de la información nociceptiva son las láminas I, II y V que se hallan en el asta dorsal (Woolf, 2004). Las terminales centrales del nociceptor básicamente expresan los mismos receptores que en la terminal periférica (Basbaum y Woolf, 1999). El glutamato juega un papel preponderante como neurotransmisor de la información nociceptiva a nivel central, en general, sus acciones se producen al actuar sobre cuatro receptores (Rang *et al.*, 2004):

- ❖ N-metil-D-aspartato (NMDA): también sensible a otro aminoácido excitador, el aspartato, se encuentra a nivel posináptico y mediante un mecanismo efector de

canal de cationes controlado por ligando con cinética lenta y alta permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$ , generan potenciales postsinápticos excitadores lentos.

- ❖  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-hidroxi-5-metil-4-isoxazolproionato (AMPA): Ubicados ampliamente a nivel postsináptico actúa mediante un canal de cationes controlado por ligando. Es de cinética rápida y se encargan de la transmisión rápida de la información nociceptiva.
- ❖ Kainato: Tienen ubicación tanto presináptica como postsináptica, aunque no son tan numerosos. Actúan mediante un canal de cationes controlado por ligando de cinética rápida y baja permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$ . Generan transmisión rápida de la información nociceptiva.
- ❖ Metabotropos: Existen tanto a nivel presináptico como postsináptico, su mecanismo efector es acoplado a proteína G (formación de trifosfato de inositol y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Su acción no es de transmisión sino de modulación sináptica.

En general, se considera que las terminaciones de las fibras nerviosas del dolor tipo A $\delta$  secretan glutamato a nivel de la médula espinal, generando una conducción rápida de la información nociceptiva, mientras que las fibras de tipo C, aparte de producir glutamato, producen también péptidos como el PRGC, sustancia P responsables del dolor tardío (Guyton y Hall, 2001). Estos neurotransmisores producen una excitación de las neuronas de segundo orden incrementando el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular lo que desencadena activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, SON y diferentes cinasas. Existe evidencia de la presencia constitutiva de la COX-2 a este nivel, sin embargo su actividad funcional se altera en forma importante por diferentes eventos sinápticos. Las PGs y el ON son de esta manera formados y liberados, estos agentes difunden extracelularmente y facilitan la liberación de más neurotransmisores como el glutamato y la sustancia P de las fibras aferentes nociceptivas, ya sea por una acción celular directa, como en el caso de ON o mediante interacción con receptores específicos (receptores a prostaglandinas) (Wilcox y Seybold, 1997).

#### 3.1.2.4 Proyección

Después de la integración en el asta dorsal de la médula espinal, la información nociceptiva se conduce, vía las neuronas de proyección, a centros superiores en el cerebro. Desde el punto de vista neuroanatómico, hay dos tipos de vías ascendentes (Millan, 1999):

a) Las vías monosinápticas. Se proyectan directamente hacia los centros nerviosos superiores. Forman parte de este grupo los tractos:

- espinotalámico
- trigeminotalámico
- espinorreticular
- espinomesencefálico
- espinoparabraquiales
- espinohipotálamico.

Por su relevancia en la transmisión de impulsos nociceptivos destaca el tracto espinotalámico y espinohipotálamico. El espinorreticular, probablemente esté involucrado en los aspectos emocionales del dolor (Millan, 1999).

El tracto espinotalámico se origina a partir de las neuronas medulares de las láminas I, V, VII y VIII. Las neuronas que se encuentran en este tracto se dividen en *neuronas que se proyectan hacia el tálamo lateral*, involucradas en los aspectos sensoriales y discriminativos del dolor y *neuronas que se proyectan hacia el tálamo medial*, relacionadas con las respuestas reflejas autónomas, el estado de excitación y aspectos emocionales del dolor (Millan, 1999).

b) Las vías polisinápticas. La diferencia entre las vías polisinápticas con las monosinápticas es que tienen una estación de relevo en su acceso a centros superiores. Las dos rutas polisinápticas que lo integran son la vía espino-cervical, la cual proyecta al núcleo lateral cervical a nivel de la C2-C3 y la vía de la columna dorsal postsináptica, la cual proyecta al núcleo cuneiforme y grácil de la columna dorsal (Millan, 1999).

### 3.1.2.5 Percepción

La integración y ulterior proceso del estímulo doloroso, se lleva a cabo en los centros supraespinales que se encuentran constituidos por (Woolf, 2004):

-Formación reticular. Mediador en funciones motoras, sensitivas y autonómicas, involucrado con impulsos de aversión y aspectos afectivo-emocionales del dolor.

-Tálamo. Hace conscientes los estímulos cutáneos finos relacionados con dolor. Importante función discriminativa de dolor (diferencia entre quemadura, parestesias y cambios térmicos). Actúa como centro de relevo para los estímulos nociceptivos aferentes.

-Hipotálamo. Integra y regula la respuesta neuroendócrina y del sistema nervioso autónomo, organiza la respuesta somática y visceral por la presencia de dolor.

-Sistema límbico. Reacciones de estado anímico y emocional.

-Corteza cerebral. Las áreas somatosensoriales interpretan la información dolorosa, importante en la discriminación y localización del dolor.

La percepción del dolor es individual y contribuyen aspectos como la experiencia previa, componentes afectivos, cognitivos y socioculturales.

### 3.1.2.6 Modulación

Existen estructuras cerebrales que modulan el paso de la información nociceptiva a nivel del asta dorsal de la médula espinal a través de las vías descendentes que suprimen la transmisión nociceptiva. Las vías descendentes inhibitorias más estudiadas son la vía noradrenérgica proveniente del locus coeruleus que genera efectos antinociceptivos a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , la vía serotoninérgica que se origina del núcleo de rafé magno, desde el cual las neuronas que contienen serotonina y encefalinas emiten proyecciones a la sustancia gelatinosa del asta posterior donde ejercen una influencia inhibitoria sobre la transmisión. Por último, la vía dopaminérgica originada de la sustancia gris compacta y del núcleo paraventricular del hipotálamo tiene la capacidad de generar antinocicepción estimulando receptores dopaminérgicos  $D_2$  en la

médula espinal, mientras que la activación de receptores D<sub>1</sub> produce nocicepción (Loeser y Melzack, 1999).

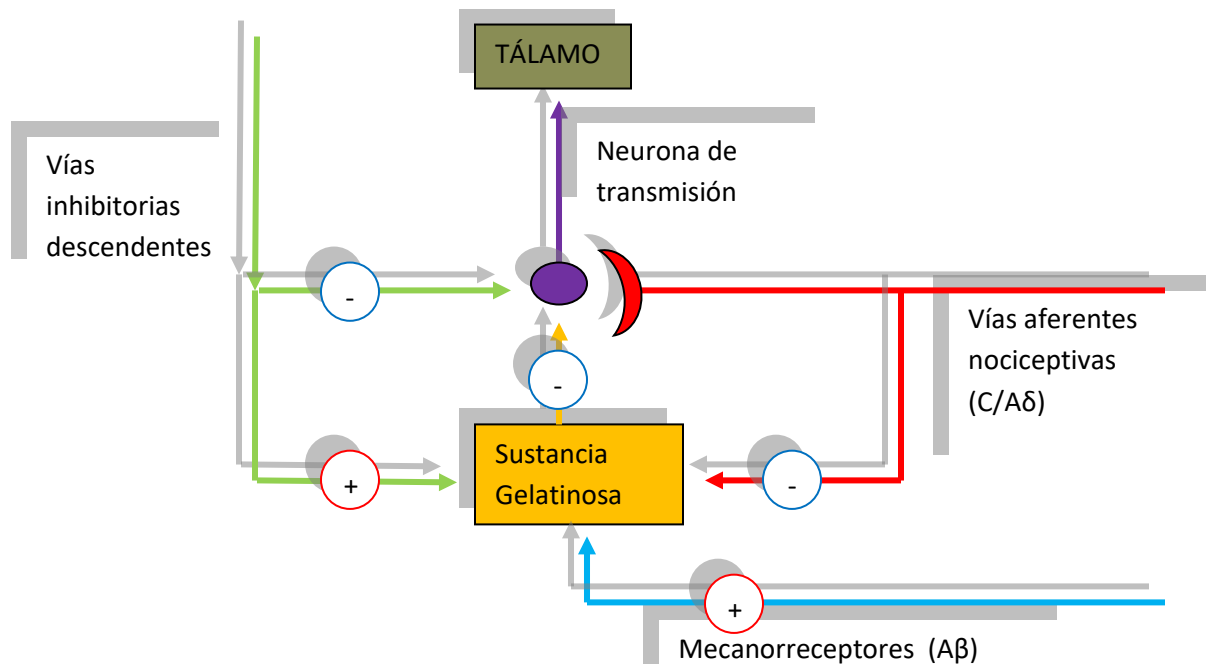
Las sustancias mediadoras neuroquímicas implicadas en la modulación pueden ser excitatorias al favorecer la transmisión nociceptiva como los neuropéptidos (Sustancia P, PRGC, neurocinina A) con un inicio de acción lento y efecto más prolongado y los neurotransmisores (glutamato y aspartato) caracterizados por un inicio rápido de la acción y corta duración. Mientras que dentro de los neuromediadores inhibitorios destacan los opiáceos endógenos (encefalina, dinorfina, endorfina), somatostatina, noradrenalina, serotonina y ácido gamma amino butírico (GABA).

#### Teoría del control de la compuerta

La idea básica plantea que la continuidad del mensaje nociceptivo que debe ser relevado en el asta dorsal medular, puede ser permitida o interrumpida gracias a la aplicación paralela de otros estímulos (no nocivos) , en particular aquellos que logren activar fibras gruesas de conducción más rápida que las fibras A $\delta$  y C. Además, la entrada de aferencias nociceptivas puede ser igualmente modulada por el aporte de las vías inhibitorias descendentes. El balance final de todas estas influencias hace posible que las neuronas de relevo que proyectan en sentido ascendente posean un tono particular de excitabilidad y que por ello permitan o no, la transmisión del mensaje nociceptivo.

Las células de la lámina II del asta posterior (sustancia gelatinosa) son, en su mayor parte interneuronas inhibitorias cortas que se proyectan a las láminas II y V y que regulan la transmisión en la primera sinapsis de la vía nociceptiva, entre las fibras aferentes primarias y las neuronas de transmisión del haz espinotalámico. La teoría de la compuerta establecida por Melzack y Wall en 1965 propone que las células de la sustancia gelatinosa responden tanto a la actividad de las fibras aferentes que entran en la médula como a la actividad de las vías descendentes, así, las neuronas inhibidoras descendentes o los impulsos aferentes no nociceptivos activan a las neuronas inhibitorias de la sustancia gelatinosa, mientras que los impulsos nociceptivos provocan su inhibición. Por otro lado, una actividad persistente de las fibras nociceptivas facilitará la excitación de las células de

transmisión por los impulsos tanto nociceptivos como no nociceptivos. La sensibilización de las terminaciones nerviosas nociceptivas periféricas y la facilitación central de la transmisión en el asta posterior y el tálamo provocan que un estímulo nocivo leve provoque una respuesta de mayor duración e intensidad (hiperalgesia), los campos receptivos aumentan de tal manera que se puede provocar dolor activando áreas alejadas del sitio de daño (hiperalgesia secundaria) y el umbral de disparo de las neuronas se reduce de tal manera que los estímulos de baja intensidad ahora provocan dolor (alodinia) (Dickenson, 2002) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Diagrama esquemático del sistema de control de compuerta del dolor (Dickenson, 2002).

### 3.1.3 Vía óxido Nítrico-GMPc-Canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) y analgesia

#### 3.1.3.1 Canales de potasio y antinocicepción

Los canales de potasio neuronales generan una salida de este ión, con la consecuente hiperpolarización de la célula y una disminución en la transmisión del impulso nociceptivo. En las neuronas, se han identificado cuatro familias de canales de potasio, con diferentes estructuras, características funcionales y sensibilidad farmacológica (Ocaña *et al.*, 2004):

- ❖ Dependientes de voltaje (Kv1 a Kv12).
- ❖ Dependientes de calcio (big, Bk; intermediate, Ik; small Sk).
- ❖ Rectificación interna ( $K_{ir1}$  a  $K_{ir7}$ ).
- ❖ Dos poros.

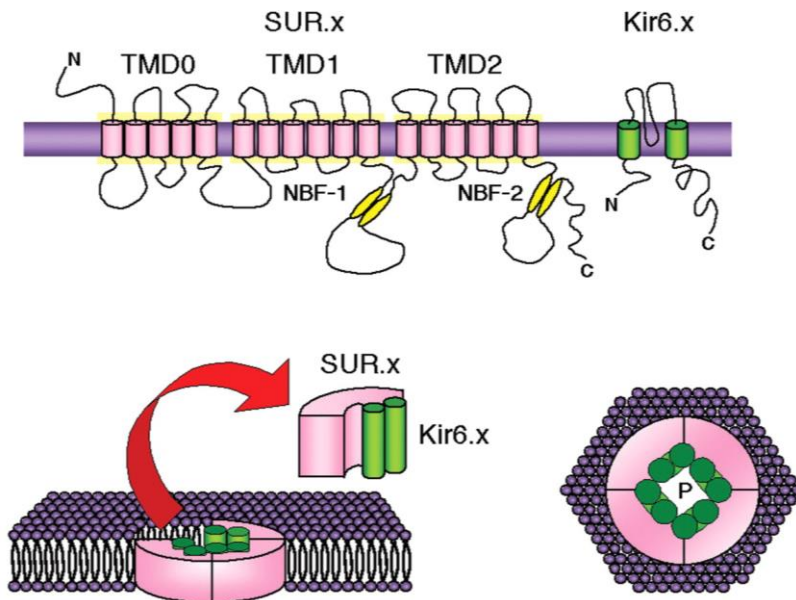
El canal de potasio  $K_{ir6}$ , pertenece a la superfamilia de rectificación interna y es también llamado canal de potasio sensible a ATP ( $K_{ATP}$ ) ya que la concentración interna de ATP genera cierre de los canales (Ocaña *et al.*, 2004). Este canal está situado en las neuronas del sistema nervioso central (espinal y supraespinal) y periférico.

Numerosos estudios han demostrado que la apertura de estos canales juega un papel importante en la antinocicepción inducida por agonistas de receptores acoplados a proteínas G como los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ , adrenorreceptores  $\alpha_2$ , receptores GABA<sub>B</sub>, muscarínicos M<sub>2</sub>, adenosina A<sub>1</sub>, serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y receptores canabinoides. También se ha encontrado que estos canales pueden ser abiertos por algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), antidepresivos tricíclicos y algunos productos naturales (Ocaña *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2002a).

Molecularmente el canal  $K_{ATP}$  está conformado por un tetrámero compuesto de cuatro subunidades  $K_{ir6}$ , rodeado de cuatro subunidades de receptor sulfonilurea (SUR) (**Figura 3**). La subunidad SUR determina la especificidad y selectividad de los agonistas y antagonistas de los canales  $K_{ATP}$  (Liu *et al.*, 2001), su apertura se da por sustancias endógenas (neurotransmisores, hormonas y otros mediadores) produciendo un



mecanismo inhibitorio reconocido. Sin embargo también se han reconocido algunos agentes exógenos (pinacidil, minoxidil, nicorandil, cromalcalim, etc.) que disminuyen la excitabilidad celular, debido a la hiperpolarización de las membranas celulares después de la apertura de canales de  $K^+$  (Lawson, 2000). La salida de los iones de  $K^+$  por la apertura de los canales es un mecanismo que utilizan las células para mantener o restablecer un estado de reposo o para atenuar el nivel de los efectos de despolarización producido por las corrientes de excitación, constituyendo de esta forma, un medio fundamental para la reversión fisiológica o la prevención de la actividad de despolarización de la membrana (Lawson, 2000).



**Figura 3.** Estructura molecular de los canales  $K_{ATP}$ . Están compuestos por dos subunidades: una es un receptor con alta afinidad a las Sulfonilureas (subunidad SUR) con tres dominios transmembrana (TMD) y dos sitios de unión a nucleótidos (NBF). La otra subunidad es un canal de potasio con rectificación entrante (subunidad  $K_{ir6}$ ). Ambas subunidades se organizan en un octámero donde cuatro subunidades del canal  $K_{ir6}$  forman el canal y se asocian a cuatro subunidades del receptor SUR que regulan dicho canal (Lawson 2000).

Otros canales de potasio cuya apertura también se ha vinculado con efectos antinociceptivos son los canales  $K_{ir3}$  (a nivel espinal) y los dependientes de calcio Sk y BK (Ocaña *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2002a).

### 3.1.3.2 Vía Óxido Nítrico-GMPc-Canales K<sub>ATP</sub>

El óxido nítrico se sintetiza a partir de L- arginina y O<sub>2</sub> molecular por la sintasa de óxido nítrico (SON), existen dos clases de SON: formas inducibles (iSON), y constitutivas (cSON) las cuales son continuamente producidas e incluyen dos isoformas, una sintetizada por células endoteliales (eSON), presente también en plaquetas y otra producida por células neuronales (nSON) (Mayer y Hemmens, 1997). Las formas constitutivas son activadas por CA<sup>2+</sup>-Calmodulina y tienden a mediar respuestas celulares a través de receptores celulares con una respuesta inmediata, mientras que la forma inducida es producida por células inflamatorias como macrófagos, neutrófilos y células de Kupffer , después de su exposición a citocinas o lipopolisacáridos bacterianos. La producción de ON por la iSON requiere síntesis de nuevas proteínas, lo que se demora un periodo de algunas horas (Moncada *et al.*, 1991).

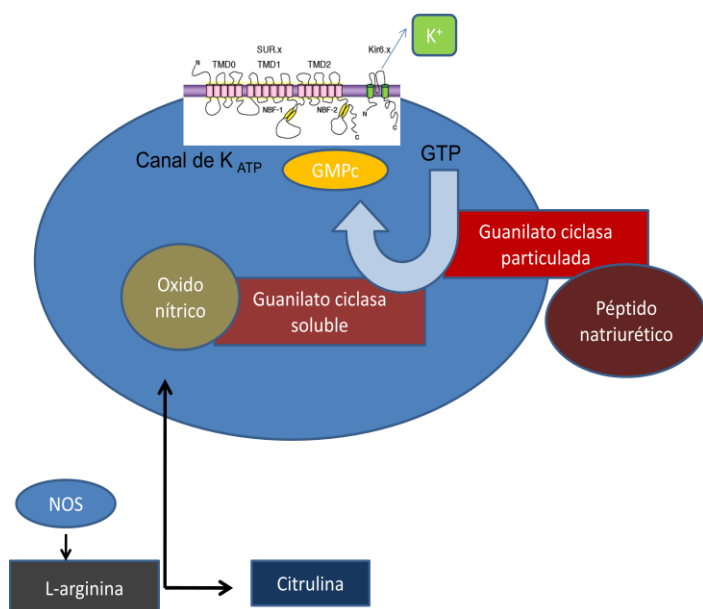
El ON es una molécula de señalización clave en los sistemas nervioso, cardiovascular y cumple una función en la defensa del huésped (Moncada *et al.*, 1991). El ON es el activador endógeno de la guanilato ciclasa soluble (GCs) que se encuentra inmersa en el citoplasma, ésta tiene un grupo hemo a donde se une el ON y es considerada el único receptor conocido del ON (Ignarro, 1990). También existe la guanilato ciclasa particulada (GCp), con siete isoformas distintas identificadas en los mamíferos (GCp-A a la GCp-G), la cual se encuentra asociada a la membrana plasmática. Las tres primeras isoformas tienen ligandos conocidos: diferentes péptidos natriuréticos, enterotoxina termoestable bacteriana y la guanilina; El resto de las GCp son receptores huérfanos ya que se desconoce sus ligandos (Lucas *et al.*, 2000).

La función bioquímica que caracteriza a ambas guanilatos ciclasas, es la transformación de nucleótidos trifosfato (GTP) en nucleótidos monofosfato cíclicos (GMPc). La vía de transmisión de señales que el GMPc emplea dentro de la célula no está bien caracterizada pero se han identificado proteínas Kinasas dependientes de GMPc (Lohmann *et al.*, 1997) y canales iónicos operados por GMPc (Zagota y Siegelbaum, 1996).

Los niveles de GMPc se regulan a nivel intracelular por la actuación de las fosfodiesterasas, que lo degradan rápidamente. De las siete familias conocidas de

fosfodiesterasas, tres son reguladas alostéricamente por GMPc y una es inhibida por la unión de GMPc en su centro catalítico (Degerman *et al.*, 1997).

El GMPc genera apertura de canales de potasio sensibles a ATP (**Figura 4**) con la subsecuente salida de este ion e hiperpolarización de la célula. Se conoce también, que algunos AINES (ketorolaco, diclofenaco y rofecoxib) así como el opioide morfina inducen antinocicepción que involucra la vía ON-GMPc (Ocaña *et al.*, 2004).



**Figura 4.** Vía óxido Nítrico-GMPc Canales de potasio dependientes de ATP. Tanto la guanilato ciclasa particulada, que se halla anclada en la membrana, como la guanilato ciclasa soluble en el citoplasma logran abrir los canales por incremento en las concentraciones de GMPc .

### 3.1.4 Clasificación del dolor

La clasificación de dolor puede realizarse en base a diferentes características (Ito *et al.*, 2001; Loeser y Melzack, 1999; Woolf *et al.*, 1998).

Dependiendo de su duración:

- ❖ Dolor agudo: dura de segundos hasta días, desaparece cuando remite la afección que lo genera, existe una respuesta simpática y neuroendócrina aumentada y cumple una función de alarma e incapacidad funcional que favorece la recuperación. Puede tener dos orígenes
  - Postraumático
  - Perioperatorio
- ❖ Dolor crónico: persiste por meses o años, algunos autores consideran que pasa a ser crónico después de cuatro semanas. Este dolor persiste incluso, después de la remisión de la patología que lo generó. La respuesta simpática y neuroendócrina están disminuidas, este dolor no cumple ninguna función biológica y en él los factores afectivos emocionales juegan un papel preponderante. Se puede subdividir en:
  - Dolor crónico no maligno: Incluye patologías como osteoartritis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor lumbar, neuropatías de diferentes orígenes y cefaleas.
  - Dolor crónico oncológico: Relacionado con procesos neoplásicos, varían en cuanto a estadio de la enfermedad y tipo de tumor, considerándose más dolorosos los que afectan hueso, páncreas y estómago; los linfomas o leucemias causan menos dolor.

Dependiendo de su fisiología:

- ❖ Dolor nociceptivo: Se presenta a nivel somático o visceral.
  - Dolor fisiológico: este dolor se origina por una estimulación directa de los receptores del dolor (nociceptores) por el agente nocivo.
  - Dolor inflamatorio: es el resultado de una lesión tisular que produce liberación y producción de mediadores químicos, los cuales estimulan a los nociceptores.
- ❖ Dolor no nociceptivo:

- Neuropático: generado por una disfunción en el sistema nervioso que involucra un incremento en la actividad aferente y un deterioro en la inhibición segmentaria. Se presenta en ausencia de daño tisular concurrente y puede manifestarse en diferentes grados de intensidad
  - Psicogénico: aparece cuando no es posible identificar un mecanismo nociceptivo o neuropático pero aparecen suficientes síntomas psicológicos que satisfacen los criterios de afección somatoforme .
- ❖ Dolor mixto: coincidencia topográfica y cronológica de más de un síndrome doloroso

Dependiendo de su localización:

- ❖ Dolor somático: Es producido por la activación de los nociceptores en piel, músculos, ligamentos, articulaciones y huesos. Es un dolor bien localizado, y tiene dos componentes dependiendo de las fibras aferentes estimuladas; un componente primario que se presenta rápido después de la lesión de carácter punzante y un componente secundario retardado difuso que se encarga del mantenimiento del estímulo doloroso.
- ❖ Dolor visceral: está ocasionado por la activación de nociceptores mediante infiltración, compresión, distensión, tracción o isquemia de vísceras pélvicas, abdominales o torácicas. Se trata de un dolor difuso ya que se extiende a zonas alejadas del órgano lesionado. Es descrito a menudo como profundo y opresivo, se acompaña frecuentemente por una intensa respuesta refleja motora y autonómica (náuseas, vómitos, sudoración, taquicardia y aumento de la presión arterial). A diferencia del dolor somático no existe componente primario.

Dependiendo de su presentación:

- ❖ Dolor continuo: perdura sin períodos de remisión.

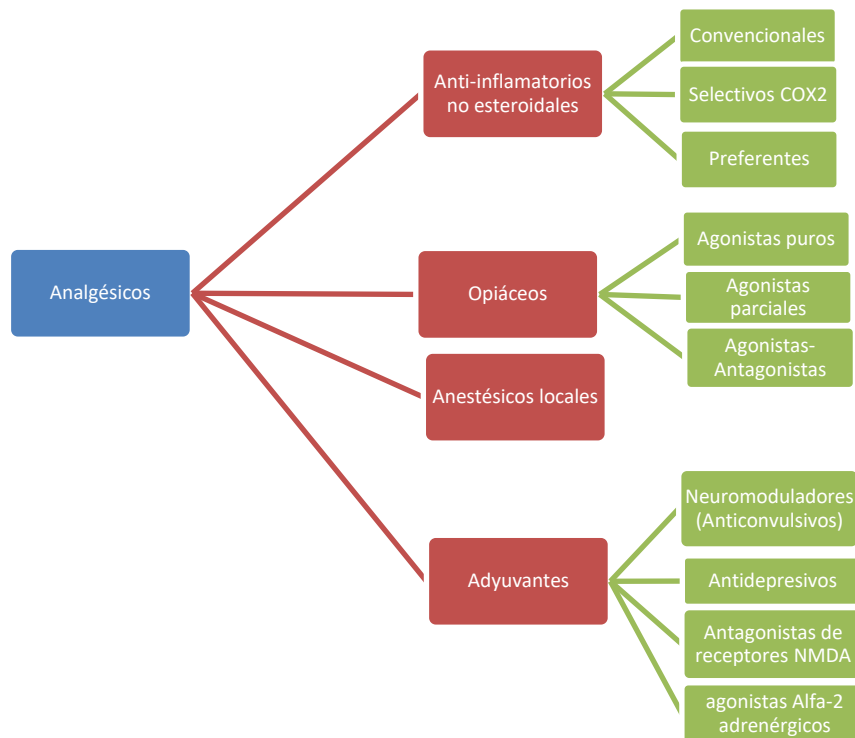
- ❖ Dolor intermitente: aparece y después de un período de duración variable tiene un intervalo de remisión total para aparecer nuevamente.
- ❖ Dolor subintrante: intercala períodos de dolor intenso e intolerable con períodos de dolor moderado.

### 3.1.5 Tratamiento farmacológico del dolor

#### 3.1.5.1 Generalidades

El alivio del dolor es considerado un derecho humano fundamental; para su correcto manejo se debe identificar el tipo de dolor y determinar el grado que sufre cada paciente, con la finalidad de implementar las medidas farmacológicas y no farmacológicas más adecuadas.

Los fármacos comúnmente usados en el manejo del dolor se mencionan en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Opciones farmacológicas para el tratamiento del dolor.

### 3.1.5.2 Anti-inflamatorios No Esteroidales (AINEs)

Los AINEs, constituyen la herramienta clínica más usada para el control del dolor y la inflamación, de hecho, se estima que son los fármacos más prescritos anualmente a nivel mundial (Tamblyn *et al.*, 1997).

Los AINEs forman un grupo numeroso de fármacos que comparten acciones terapéuticas y efectos adversos. No producen depresión respiratoria y no inducen tolerancia ni dependencia física. Su eficacia analgésica es limitada (efecto techo) y no dependiente de la dosis (el incremento de la dosis puede prolongar el efecto, pero no produce más analgesia y aumenta la incidencia de efectos secundarios). Son efectivos para el tratamiento del dolor leve-moderado, y en algunos casos pueden controlar el dolor intenso de componente inflamatorio, postquirúrgico y cólico (Rivera-Ordóñez, 2006). Sus efectos adversos más comunes son la ulceración gástrica, toxicidad renal, hepatotoxicidad y mielotoxicidad, se consideran causa importante de hospitalización y muerte (Tamblyn *et al.*, 1997).

#### 3.1.5.2.1 Selectividad de los AINEs

A principios de los noventa, se identificaron dos isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX) que intervienen en la cascada del ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas. En ese momento se estableció que la COX-1 era constitutiva en la mayoría de los tejidos y la COX-2 inducida en la inflamación, fundamentando la teoría de las prostaglandinas resultantes de la COX-1 como vigilantes que salvaguardan la integridad de la mucosa gástrica y el funcionamiento renal, mientras que las prostaglandinas resultantes de la COX-2 como responsables del dolor y la inflamación (Vane y Botting, 1998). Este punto de vista alentó a las compañías farmacéuticas a invertir un importante capital y trabajo en desarrollar fármacos con una alta selectividad para la COX-2, con la esperanza de encontrar un antiinflamatorio efectivo con alto margen de seguridad que pudiera ser usado por períodos prolongados y en pacientes sensibles o con alteraciones gástricas y renales. De esta forma, surgieron los llamados “coxibs” como celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, etoricoxib y lumiracoxib que fueron rápidamente introducidos al

mercado dentro de la medicina humana (Hawkey, 1999; Donnelly y Hawkey 1997). Estos fármacos bloquean selectivamente la isoenzima COX-2, sin embargo, cada uno lo hace en diferente proporción (Coruzzi *et al.*, 2007).

Recientemente se ha demostrado una participación importante de la COX-1 en la respuesta inflamatoria y una actividad biológica de la COX-2 que contribuye a mantener la homeostasis del organismo, de hecho entre sus funciones se encuentra una participación relevante en la cicatrización de úlceras gastrointestinales (Langenbach *et al.*, 1995; Morham *et al.*, 1995).

Numerosos estudios han confirmado que los inhibidores selectivos de COX-2 se asocian con menor riesgo de daño gastrointestinal en comparación con los AINES convencionales (Cryer, 2003), demostrándose que para que ocurra el daño debe haber un bloqueo concurrente de la COX-1 y la COX-2, ya que nunca un inhibidor selectivo COX-1 o COX-2 produjo daño (Wallace *et al.*, 2000). Sin embargo, en ciertos casos el rofecoxib produjo efectos cardiovasculares adversos, algunas veces mortales (Chin y Commerford, 2007) lo que desencadenó su retiro del mercado junto con el valdecoxib. Los efectos cardiovasculares adversos, se explican como una pérdida del equilibrio, al disminuir las cantidades de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) proagregante plaquetario y vasoconstrictor resultado del efecto de la COX-1 sobre el ácido araquidónico y aumentar la prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), con efecto antiagregante y vasodilatadora obtenida gracias a la COX-2. De esta forma, el bloqueo selectivo de COX-2 promueve la prevalencia del TXA<sub>2</sub> sobre la PGI<sub>2</sub> aumentando el riesgo de trombosis (Bannwarth, 2005).

Por lo expuesto anteriormente, la búsqueda de AINEs más seguros y eficaces para el control del dolor y la inflamación continúa y se centra en dos posturas (Coruzzi *et al.*, 2007):

a) Definir nuevas estrategias terapéuticas en el complejo proceso de la inflamación como en el caso de los inhibidores duales de la COX y 5- lipooxigenasa (5-LOX) y las lipoxinas sintéticas.



b) Modificar los AINES clásicos adicionándoles químicamente grupos funcionales que al liberarse ejercen un efecto protector sobre la mucosa gástrica, tal es el caso de los AINES liberadores de ON y los AINES liberadores de sulfuro de hidrógeno.

#### 3.1.5.2.2. Toxicidad Gástrica-duodenal de los AINES

Del 1-4% de los pacientes con tratamientos crónicos con AINES desarrollará ulceración y /o sangrado gastroduodenal (Silverstein *et al.*, 2000) este porcentaje aumenta en pacientes con factores de riesgo como historia de úlceras pépticas, administración concomitante de anticoagulantes, glucocorticoides y edad avanzada (Laine *et al.*, 2002). En un estudio se obtuvo que en los pacientes con factores de riesgo, el uso por seis meses de AINES convencionales produjo en un 17.1% úlceras clínicamente significativas, mientras que el uso de AINES selectivos COX<sub>2</sub> lo hizo en un 16.5% (Scheiman *et al.*, 2006).

Endoscópicamente, las lesiones producidas por los AINES incluyen hemorragias subepiteliales, erosiones y úlceras, habiéndose establecido una frecuencia doble de úlcera gástrica frente a la de úlcera duodenal (Gay, 2000).

Los mecanismos para el desarrollo de la úlcera son:

a) Mecanismos locales (tópicos):

-Acción citotóxica directa (particularmente AINES de naturaleza ácida):

- ❖ Inducción de lisis osmótica subsecuente a la difusión de AINES en las células epiteliales (Schoen y Vender, 1989)
- ❖ Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las células epiteliales (Somasundaram *et al.*, 1995)
- ❖ Reducción del moco, bicarbonato y disrupción de la capa de fosfolípidos de superficie activos en la mucosa gástrica, mediante una actividad independiente la síntesis de prostaglandinas, haciendo a la mucosa susceptible al ácido luminal (Jaworski *et al.*, 2005)

-Disminución en el índice de reparación epitelial por inhibición de las vías de señalización del factor de crecimiento epidermal (Kajanne *et al.*, 2007).

Los efectos tópicos se ven favorecidos a nivel intestinal por la recirculación entero-hepática de algunos AINEs que aumentan la exposición de las células epiteliales. (Reuter *et al.*, 1997)

b) Mecanismos sistémicos:

La naturaleza de la acción tóxica sistémica, consecuencia de la administración de AINEs se relaciona con la inhibición temporal que producen en la síntesis de PG. Las acciones biológicas de las PG en el tracto digestivo son (Gay, 2000):

- Incremento de la secreción de moco.
- Incremento de producción de bicarbonato.
- Estimulan la síntesis de fosfolípidos de membrana.
- Estimulan la reparación celular.
- Estimulan transporte activo.
- Aumentan el flujo sanguíneo mucoso.
- Disminución de la secreción ácida.
- Prevención de la ruptura de la barrera mucosa.

El estudio histológico de las úlceras producidas por indometacina indica que éstas se localizan fundamentalmente a nivel de la capa mucosa. En los bordes de la lesión, concretamente en la submucosa próxima, puede observarse la inducción de la proteína COX-2, fácilmente correlacionable con el infiltrado inflamatorio presente y que juega un papel crítico en la reparación de las úlceras (Gay, 2000).

Otros mecanismos sistémicos involucrados en la producción de úlceras sangrantes, se asocian a un bloqueo en la producción de los tromboxanos, secundario al bloqueo de la COX1 (Wallace, 2008). También se ha encontrado que los AINEs son capaces de incrementar la producción de ácido gástrico y que producen una contracción gástrica

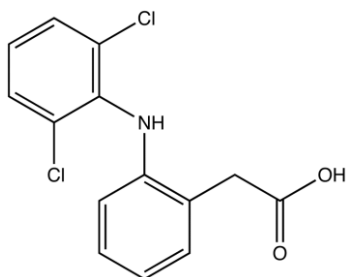
que favorece la aparición de lesiones, sin conocerse exactamente el mecanismo exacto (Mersereau *et al.*, 1988).

c) Mecanismo vascular

Después de la administración de un AINE, aparecen pequeñas lesiones isquémicas y daño endotelial, observándose la formación de pequeños “trombos blancos” que detienen el flujo sanguíneo de la microcirculación y favorecen el desarrollo posterior de lesiones hemorrágicas (Kitahora y Guth, 1987). Algunos estudio soportan la idea de que este trombo estaba conformado por el incremento y adhesión de neutrófilos, (Wallace *et al.*, 1991) sin embargo, determinados autores en estudios experimentales con ratas, llegaron a la conclusión, que la lesión isquémica es anterior a la infiltración de leucocitos, lo que parece es una consecuencia y no una causa. (Gay, 2000).

### 3.1.5.2.3 Diclofenaco

El diclofenaco es un AINE introducido al mercado en 1973; químicamente es el ácido 2-[2-{{2,6-diclorofenil} amino } fenil] acético (**Figura 6**).



**Figura 6.** Estructura química del diclofenaco. (Insel, 1996)

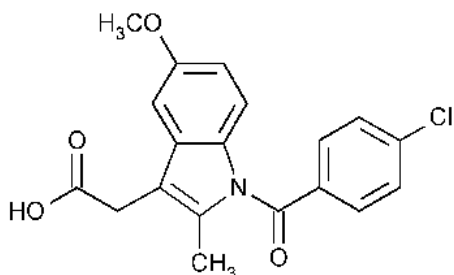
Tiene una constante de acidez de 4 y un coeficiente de partición de 13.4 (Sallman, 1986). Sufre un metabolismo extenso por conjugación directa, hidroxilación aromática y posterior conjugación. En ratas se presenta recirculación enterohepática que no se ha reportado en humanos (Peris-Ribera *et al.*, 1991). En ratas, el diclofenaco por vía oral se

absorbe rápidamente y en gran cantidad pero sufre un metabolismo de primer paso que reduce su biodisponibilidad del 30 al 40% (Willis *et al.*, 1980). El diclofenaco se usa ampliamente para el tratamiento sintomático a largo plazo de artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante, aunque también ha mostrado utilidad por breves lapsos en lesiones musculoesqueléticas agudas, dolor postoperatorio y dismenorrea (Insel, 1996). El diclofenaco ha demostrado poseer múltiples mecanismos por los cuales ejercen su efecto antinociceptivo, como la inhibición en la síntesis de prostaglandinas en el tejido dañado y a nivel del sistema nervioso central (Vane y Botting, 1998; Vanegas, 2002; Warner *et al.*, 1999). Sin embargo, también se han postulado mecanismos independientes a las prostaglandinas mediados por las vías de inhibición descendentes de serotonina, opioides y otros neurotransmisores que interfieren con la señal nociceptiva a nivel espinal (Björkman, 1995). Recientemente, se ha reportado que el diclofenaco aumenta la concentración de Kinurenato, un antagonista endógeno de los receptores de NMDA, lo que previene la actividad pronociceptiva del glutamato a nivel espinal y supraespinal (Edwards *et al.*, 2000). Otro mecanismo de acción que muestra el diclofenaco es la desensibilización del nociceptor a través de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMP cíclico (Tonussi y Ferreira, 1994) lo que promueve la apertura de los canales de potasio (Ortiz *et al.*, 2003).

El diclofenaco produce efectos adversos en el 20% de los pacientes siendo los efectos gastrointestinales los más habituales, produce hemorragia, úlcera o perforación de la pared intestinal. En humanos con el uso crónico se observa un incremento moderado de la aminotransferasa en plasma que suele ser reversible y sólo en contadas ocasiones se acompañan de manifestaciones clínicas de hepatopatía. Otras respuestas adversas reportadas son erupciones cutáneas, reacciones alérgicas, edema y trastornos de la función renal (Insel, 1996).

#### 3.1.5.2.4 indometacina

Su nombre químico es 1H-Indol-3-ácido acético,1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1-(p-Clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-acido acético (**Figura 7**)



**Figura 7.** Estructura química de la indometacina.

La indometacina se absorbe de manera rápida ( $t_{m\acute{a}x} = 2$  horas) y casi completa (90%) en 4 horas por vía oral, y se une en un 90% a las proteínas del plasma sanguíneo. Presenta un importante fenómeno de recirculación enterohepática, lo que explica la variabilidad de su vida media plasmática (1-6 horas). Por vía rectal la absorción es igualmente rápida, pero se evita el primer paso hepático. El metabolismo hepático incluye O-desmetilación (50%), N-desacilación y conjugación con ácido glucurónico (10%). El 10-20% se elimina sin metabolizar por secreción tubular activa. Se distribuye por todo el organismo y en el líquido sinovial alcanza concentraciones similares a las del plasma sanguíneo en 5 horas.

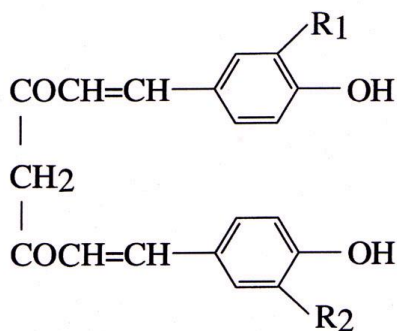
Es considerado un AINE “puro” cuyo mecanismo de acción es únicamente a través del bloqueo de la síntesis de prostaglandinas mediante el bloqueo de las isoenzimas COX -1 y COX-2 de la ciclooxigenasa a nivel central como periférico (Vane y Botting, 1998; Warner *et al.*, 1999). Se considera 20 veces más potente que el ácido acetil salicílico para inhibir la síntesis de prostaglandinas. También desacopla la fosforilación oxidativa e inhibe la agregación plaquetaria con el subsecuente aumento en el tiempo de sangrado (Takeuchi, 2012).

Está indicada para neuralgia del trigémino, dolor e inflamación moderada a intensa en las enfermedades reumáticas y otros procesos de inflamación osteoarticular, gota aguda, dismenorrea, cierre del conducto arterioso y como tocolítico (Abramovici, 2012).

### 3.2 Curcumina

El turmérico o cúrcuma (*Cúrcuma longa*) es una planta herbácea que se cultiva en regiones tropicales de Asia (Ammon y Walh, 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 (diferulioilmetano) (Srinivas *et al.*, 1992). Este polifenol es insoluble en agua e inestable a pH básico (se transforma a feruloilmetano y ácido felúrico). Tiene una biodisposición oral baja eliminándose un 40-60% 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 (1%). La absorción puede ser en su forma natural como curcumina o como sus metabolitos dihidrocurcumina y tetrahydrocurcumina 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 curcumina 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 curcumina (500 mg/kg) la concentración máxima ( $C_{max}$ ) fue de  $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  y el tiempo para alcanzar dicha concentración máxima ( $T_{max}$ ) fue de  $41.7 \pm 5.4$  min. La vida media de eliminación ( $t_{1/2, \beta}$ ) fue de  $28.1 \pm 5.6$  horas (Sharma *et al.*, 2007). Químicamente la curcumina es una dicetona-B enol con dos fenoles metoxilados (**figura 8**).



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Curcumina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Demetoxicurcumina	H	OCH <sub>3</sub>
Bisdemetoxicurcumina	H	H

**FIGURA 8.** Estructura química de la Curcumina y otros Curcuminoides (Mesa *et al.*, 2000).

La curcumina 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 oral, tópica e inhalada (Chainani-Wu, 2003). En la medicina tradicional China el principal uso es para tratar enfermedades relacionadas con dolores abdominales e ictericia (Ammon y Walh, 1991).

Actualmente, se desarrollan numerosos estudios que han destacado las propiedades farmacológicas de la curcumina como antiinflamatorio, (Chainani-Wu, 2003; Kohli *et al.*, 2005) antioxidante, inmunomodulador (Mesa *et al.*, 2000), antineoplásico (Aggarwal y Harikumar, 2009) hipolipidémico, antiviral, antiprotozoárico, antifúngico y antibacteriano (Kohli *et al.*, 2005). Debido a este amplio espectro de actividad, el uso de la curcumina ha sido exitoso en el tratamiento experimental de algunas enfermedades como carcinoma

epidermoide, carcinoma de colon, neoplasias hepáticas, varios tipos de neoplasias de mama, 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, lesiones hepáticas (hepatoprotector), entre otras (Shishodia *et al.*, 2005).

La actividad antinociceptiva de la curcumina 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 en ratas (Mittal *et al.*, 2009) y en un modelo de nocicepción visceral inducido por ácido acético en ratas (Tajik *et al.*, 2008) lo que demuestra que la curcumina es capaz de producir antinocicepción en distintas condiciones patológicas de dolor, incluyendo dolor inflamatorio y neuropático. Recientemente, también se demostró su efecto antihiperalgésico en un modelo de dolor posoperatorio en la rata (Zhu *et al.*, 2014) y se estableció un efecto preventivo para disminuir la hiperalgesia mecánica provocada por daño neuropático inducido en la rata (Jeon *et al.*, 2013). En adición, un estudio controlado usando la curcumina en pacientes con osteoartritis demostró una reducción en el dolor y un mejoramiento en el movimiento después de ocho meses de tratamiento al mismo tiempo que reducían los marcadores séricos de inflamación (Sahbaie *et al.*, 2014).

Los blancos moleculares de la actividad antiinflamatoria de la curcumina, entre los cuales se encuentran la inhibición de factores de transcripción (NF- $\kappa$ B), de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-5, IL6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ), de enzimas (Cox2, Lox, iSON) y de moléculas de adhesión (Aggarwal *et al.*, 2007) podrían explicar su actividad antinociceptiva. No obstante, recientemente se identificó que el antagonismo del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) por la curcumina produce un efecto antihiperalgésico (Yeon *et al.*, 2010) y otro reporte asocia la actividad antinociceptiva de la curcumina a la inhibición de los astrocitos y la vía de señalización extracelular regulada por quinasa (ERK)



en el asta dorsal de la médula espinal en un modelo de dolor crónico inducido por constricción en la rata (Ji *et al.*, 2013).

Una de las características más interesantes de la curcumina es la ausencia de efectos adversos graves a dosis terapéuticas, reportándose sólo irritación gástrica (Cheng *et al.*, 2001). En general, la curcumina ha sido catalogada como “reconocida generalmente como segura” por la Food and Drug Administration 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. 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).

El extracto del turmérico y la curcumina han sido probados con la prueba de Ames, demostrando que no son mutagénicos, sin embargo, existe un reporte de embriotoxicidad y teratogenicidad en embriones de pez cebra (Wu *et al.*, 2007). No se recomienda en pacientes con colelitiasis porque genera contracción de la vesícula biliar (Rasyid y Lelo, 1999).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El dolor es considerado un problema de salud pública a nivel mundial que reduce la calidad de vida de quien lo padece y ocasiona importantes repercusiones económicas y sociales, sin embargo, no existe hasta la fecha un tratamiento que brinde eficacia y seguridad a largo plazo. Los Anti-inflamatorios no esteroideos son ampliamente prescritos y utilizados, no obstante, presentan efectos adversos frecuentemente, representando las alteraciones gastrointestinales una limitante para su uso en algunos grupos de enfermos y generando un riesgo potencial con el empleo crónico. De esta manera, resulta evidente la necesidad de buscar alternativas seguras, eficaces y de fácil disponibilidad, dentro de este contexto la curcumina, constituye una opción prometedora al existir gran variedad de estudios que resaltan su actividad, anti-inflamatoria y antioxidante a la par de carecer de efectos adversos relevantes, aunque sus propiedades analgésicas permanecen sin ser dilucidadas por completo.

Los estudios han mostrado que la principal limitante de la curcumina es su baja biodisponibilidad, por lo que se han establecido diferentes estrategias farmacéuticas para aumentarla, la interacción sinérgica con otros fármacos analgésicos es un enfoque diferente para aumentar la potencia de la curcumina.

#### 5. HIPÓTESIS

- ❖ La combinación de curcumina y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) produce una potencialización en el efecto antinociceptivo, al mismo tiempo que disminuye la severidad de las lesiones gástricas y entéricas.
- ❖ La curcumina posee un mecanismo de acción analgésico que involucra la vía ON-GMPc-Canales  $K_{ATP}$

## 6. OBJETIVOS

### 6. 1. Objetivo general

- ❖ Determinar el tipo de interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva y seguridad gastrointestinal de la combinación entre curcumina y AINEs

### 6.2. Objetivos particulares

- ❖ Establecer la participación de la vía  $ON-GMPC-K_{ATP}$  en la actividad antinociceptiva sistémica de la curcumina mediante el uso de un inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico (L-NAME), un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (ODQ) y un bloqueador de los canales de potasio sensibles a ATP (glibenclamida) en la prueba de formalina al 1%, en la rata.
- ❖ Categorizar la interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva de la curcumina con diclofenaco y curcumina con indometacina, mediante el método del isobolográfico.
- ❖ Determinar si la curcumina disminuye el daño gástrico y entérico generado por los AINEs

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 6 a 8 semanas de edad y un peso de 180 a 200 g. Los animales se mantuvieron en cajas con libre acceso al agua y un ayuno de alimento de 18 a 20 horas, excepto para la evaluación del daño intestinal que fueron alimentados a libre acceso. Los ciclos de luz-oscuridad 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, 1983) y 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”.

### **7.2 Fármacos y reactivos**

El diclofenaco fue donado por Novartis Farmacéutica, México D.F., y se disolvió en solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). La curcumina, indometacina, glibenclamida, NG-L-nitroarginina metil ester (L-NAME) y el 1 H-(1,2,4)-oxadiazol- (4,2-a) quinoxalin-1-ona (ODQ) fueron comprados a Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA). La curcumina fue suspendida en carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5%, la indometacina en bicarbonato, la glibenclamida se disolvió en la siguiente proporción: 15% bicarbonato al 1%, 65% de agua destilada y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) puro, el L-NAME fue disuelto en solución salina fisiológica y el ODQ en DMSO 20%. La formalina se preparó a partir del formaldehído al 37% diluido en solución salina al 0.9% hasta alcanzar el 0.37%.

## **7.3 Equipo**

### **7.3.1 Modelo de la formalina**

1. Cilindros transparentes de acrílico de 20 cm de diámetro por 40 cm de altura.
2. Dos espejos de 40 por 40 cm para cada cilindro.
3. Cronómetro.
4. Termómetro.
5. Calentador ambiental.
6. Jeringas y agujas.
7. Cánula para sondeo orogástrico

### **7.3.2 Modelo de daño gástrico y entérico**

1. Regla.
2. Lámpara.
3. Tijeras.
4. Lupa
5. Navaja de bisturí
6. Tijeras

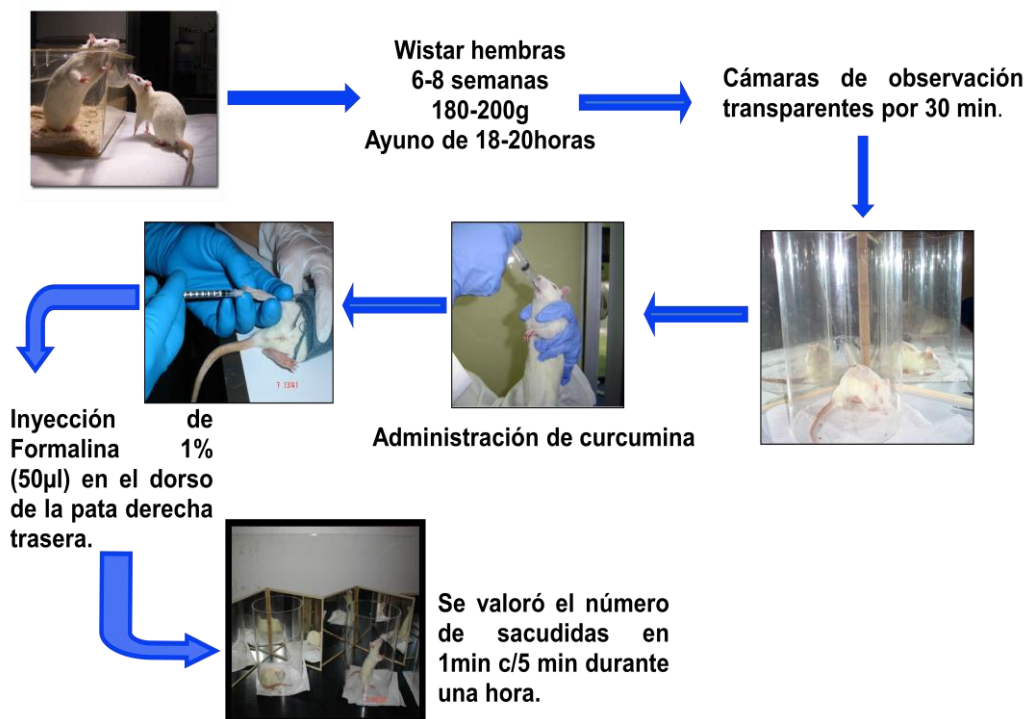
## **7.4 Diseño Experimental**

### **7.4.1 Evaluación de la actividad antinociceptiva de la curcumina**

La antinocicepción fue determinada utilizando la prueba modificada de formalina al 1% Dubuisson y Dennis (1977). Las ratas fueron colocadas 30 minutos antes de la realización del experimento en cámaras de observación de plexiglass transparentes para permitir su adaptación, posteriormente se les administró vía subcutánea 50 microlitos de formalina al

1% en la superficie dorsal de la extremidad pélvica derecha. Los animales fueron regresados a las cámaras y se colocaron espejos detrás de cada una de éstas para facilitar la observación del comportamiento nociceptivo, el cual fue cuantificado como el número de sacudidas de la extremidad inyectada durante períodos de un minuto, cada cinco minutos a lo largo de una hora después de la inyección (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 2000) (**Figura 9**). Las sacudidas fueron caracterizadas como un movimiento rápido de flexión o retirada en la extremidad inyectada. Al finalizar el experimento los animales fueron sacrificados en cámaras de CO<sub>2</sub>.

Para determinar la actividad antinociceptiva de la curcumina, ésta fue preparada e inmediatamente administrada mediante sonda gástrica a diferentes grupos de ratas, se usaron dosis de 3.1, 10, 31 y 100 mg/kg de peso corporal, una hora antes de la inyección de formalina. El grupo control recibió únicamente el vehículo (CMC 0.5%) una hora antes de la formalina. La administración de la curcumina o vehículo fue hecha en un volumen constante de 1 ml para cada rata.

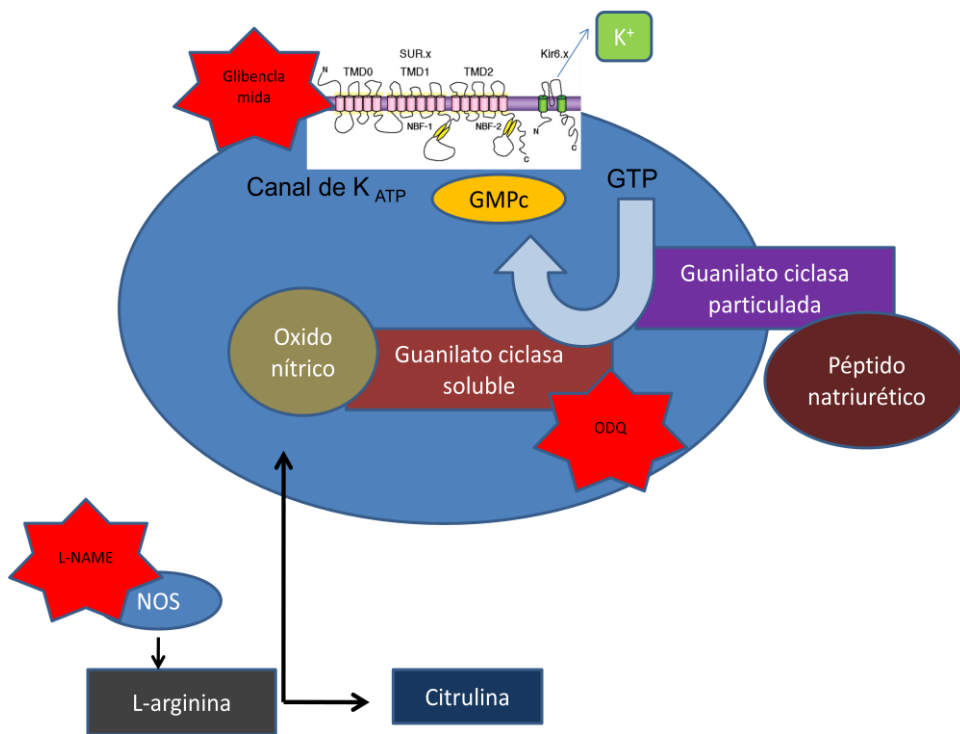


**Figura 9.** Administración de curcumina en la prueba de la Formalina al 1%

#### 7.4.2 Participación de la vía ON-GMPc-K<sub>ATP</sub> en la actividad antinociceptiva de la curcumina.

Para conocer la participación de la vía ON-GMPc-canales K<sub>ATP</sub> en la actividad antinociceptiva de la curcumina, se realizó lo siguiente: 50 minutos después de recibir por sonda gástrica 100 mg/kg de curcumina o vehículo, las ratas fueron inyectadas en la superficie dorsal de la extremidad pélvica derecha con L-NAME, un inhibidor de la sintasa de ON (Rees *et al.*, 1990), a dosis de 10, 30 y 100 µg/pata, en otro grupo se inyectó ODO, un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble sensible a ON (Moro *et al.*, 1996), a dosis de 10, 30 y 100 µg/pata y en el último grupo se administró glibenclamida, bloqueador específico de los canales K<sub>ATP</sub> (Edwards y Weston, 1993) a dosis de 10, 30 y 100 µg/pata. Diez minutos después de esta inyección, es decir, una hora después de la administración de la curcumina, se inyectó la formalina al 1% en la misma extremidad. La formalina, los inhibidores y el bloqueador fueron inyectados en un volumen constante de 50 µl, (**Figura 10**)

Las dosis y los fármacos fueron seleccionados basándonos en reportes previos (Ocaña *et al.*, 1990; Ortiz *et al.*, 2003; Rodrigues y Duarte, 2000; Soares y Duarte, 2001; Soares *et al.*, 2000) y en experimentos piloto realizados en el laboratorio.



**Figura 10.** Nivel de interrupción de la vía ON-GMPc-K<sub>ATP</sub> por L-NAME (inhibidor de la sintasa de ON), ODQ (Inhibidor de la guanilatociclasa soluble sensible a ON) y glibenclamida (bloqueador específico de los canales K<sub>ATP</sub>).

### 7.4.3 Determinación de la interacción farmacológica de la actividad antinociceptiva entre curcumina y AINEs.

Se determinó el tipo de interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva entre la curcumina y el diclofenaco y entre curcumina e indometacina mediante el método isobolográfico.

En primer lugar, se utilizaron diferentes grupos de animales (n=6) para caracterizar 3 diferentes curvas dosis-efecto (indometacina, diclofenaco y curcumina) mediante la prueba de formalina al 1%. La indometacina se administró a dosis de 1, 3.1, 10 y 31 mg/kg, p.o. 1 hora antes de formalina. La curcumina se administró una hora antes de la formalina a dosis de 3.1, 10, 31, y 100 mg/kg, p.o. y el diclofenaco se administró 20 minutos antes a



dosis de 1, 3.1, 10 y 31 mg/kg, p.o. Los horarios y dosis anteriores fueron establecidos tomando en cuenta estudios previos en el laboratorio.

A partir de las curvas dosis-efecto de los fármacos individuales y mediante regresión lineal se obtuvo la dosis que produce un 30% de efecto antinociceptivo ( $DE_{30}$ ) para cada fármaco, en base a éstas, se establecieron las dosis efectivas teóricas 30 ( $DE_{30T}$ ) de las diferentes combinaciones:

$$DE_{30T} = DE_{30} \text{ curcumina}/2 + DE_{30} \text{ diclofenaco o indometacina}/2$$

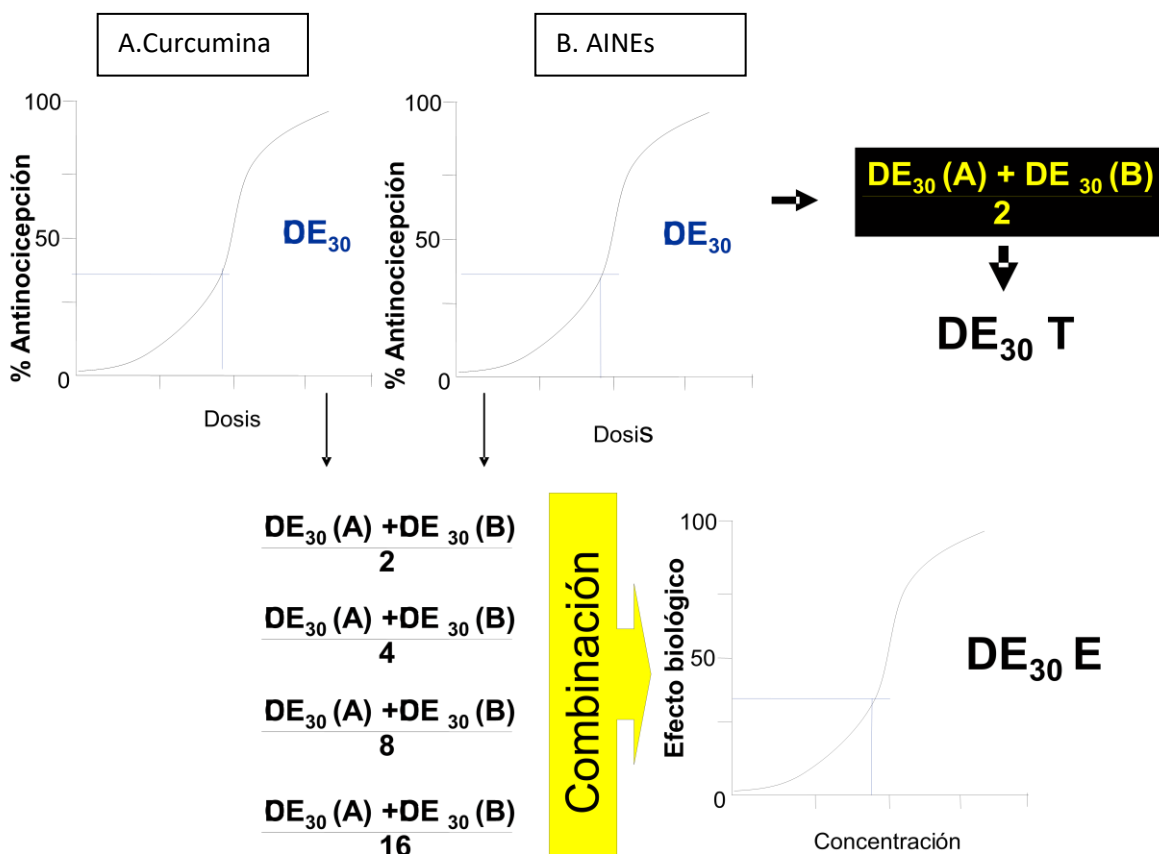
Asimismo, se establecieron las diferentes dosis para cada fármaco en las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina según el método de análisis isobolográfico (Tallarida y Raffa, 1996):

<b>Combinación Curcumina+AINEs</b>
$DE_{30}+DE_{30}$
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{2}$
4
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{4}$
8
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{8}$
16

**Tabla 3.** Cálculo para la obtención de las diferentes dosis de los fármacos a usar en las combinaciones. Las dosis se obtienen sumando las dosis efectivas 30 ( $DE_{30}$ ) de ambos fármacos y dividiéndolas en una progresión geométrica de razón  $1/2$

Posteriormente, se obtuvieron las curvas dosis-efecto antinociceptivo de las mezclas de curcumina con diclofenaco y curcumina con indometacina. Mediante regresión lineal se

calcula la  $DE_{30}$  de cada mezcla, a este valor se le conoce como  $DE_{30}$  experimental ( $DE_{30E}$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Método para establecer el tipo de interacción farmacológica entre dos fármacos.  $DE_{30T}$ : dosis efectiva 30 teórica;  $DE_{30E}$  dosis efectiva 30 experimental.

Al contar con ambos valores, la  $DE_{30E}$  y la  $DE_{30T}$ , se realizó una comparación estadística entre estos puntos mediante una prueba t-Student para encontrar el tipo de interacción farmacológica existente en las combinaciones:

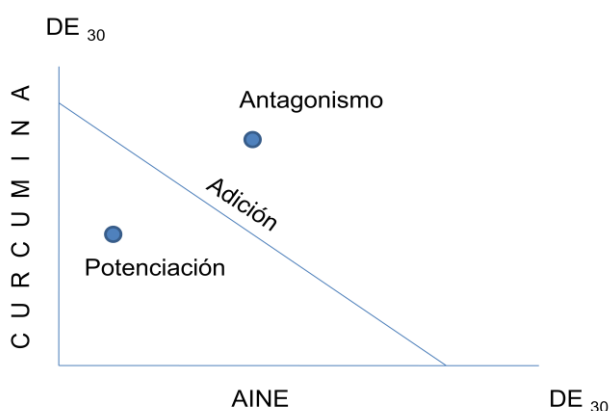
- Si  $DE_{30E} < DE_{30T}$  Potenciación
- Si  $DE_{30E} = DE_{30T}$  Adición
- Si  $DE_{30E} > DE_{30T}$  Antagonismo

Para describir la magnitud de la interacción, se calculó el valor del índice de interacción ( $\gamma$ ) que es una medida cuantitativa de la interacción entre dos fármacos y se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{\text{DE experimental}}{\text{DE teórica}}$$

El índice de interacción describe la  $DE_{30}E$  como una fracción de la  $DE_{30}T$ . Valores de  $\gamma$  igual o cercanos a 1 indican interacción aditiva, valores más grandes que 1 implican una interacción antagonista y valores menores que 1 señalan una sinergia.

Por último la interacción se representa gráficamente con la elaboración de los isobogramas correspondientes (**Figura 12**).



**Figura 12.** Isoblograma. Muestra gráficamente el tipo de interacción farmacológica entre dos fármacos.

#### **7.4.4 Establecimiento de la actividad gastroprotectora de la curcumina.**

##### **7.4.4.1 Determinación de los efectos gástricos generados por diferentes dosis de curcumina, indometacina, diclofenaco y sus combinaciones.**

Para determinar el grado de daño gástrico generado por los diferentes fármacos y sus combinaciones se utilizó el método propuesto por Wallace *et al.*, 2000. El cual consiste en administrar el fármaco a animales con 18-20 horas de ayuno, tres horas después

sacrificarlos mediante cámara de CO<sub>2</sub>, ya que después de este período es cuando se genera el grado máximo de lesión y los mecanismos de reepitelización aún no han iniciado. Posteriormente se remueve el estómago y se incide siguiendo la curvatura menor, para exponer la mucosa estomacal y determinar mediante observación macroscópica la extensión de las lesiones hemorrágicas en milímetros, la suma de éstas indicará el grado de daño en cada estómago. Este procedimiento se aplicó para caracterizar el daño generado a diferentes dosis de curcumina (3.1, 10, 31 y 100 mg/kg), indometacina (1, 3.1, 10 y 31 mg/kg), diclofenaco (1, 3.1, 10 y 31 mg/kg); Las mismas ratas utilizadas en la determinación de la DE<sub>30</sub> E se utilizaron para conocer el impacto a nivel gástrico de las combinaciones de fármacos (**Tabla 4**).

#### **7.4.4.2 Determinación de la actividad gastroprotectora de la curcumina contra el daño generado por indometacina y diclofenaco**

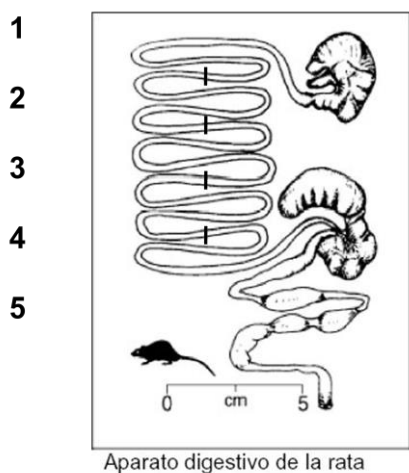
Para conocer si la curcumina tiene un efecto de protección de la mucosa gástrica contra los anti-inflamatorios no esteroideos se realizó el siguiente experimento:

Se usaron dosis fijas de 50 mg de indometacina o diclofenaco junto con dosis crecientes de curcumina en ratas con ayuno de 18-20 horas, se realizó el sacrificio de los animales tres horas después y se evaluó macroscópicamente el daño en la mucosa gástrica, representado por lesiones hemorrágicas, punctatas y lineales, obteniendo un promedio de lesiones en milímetros por cada grupo.

#### **7.4.5 Establecimiento de la actividad enteroprotectora de la curcumina**

Para realizar estos estudios se ocupó una modificación del modelo de Treinen-Moslen (Ramírez-Alcántara *et al.*, 2005). Este modelo, consiste en la administración, mediante sondeo orogástrico, de 50 mg/kg de indometacina o diclofenaco a ratas mantenidas bajo alimentación a libre acceso, al mismo tiempo y por la misma vía se suministraron

diferentes dosis de curcumina (30, 100 y 300 mg/kg). Pasadas 24 horas se sacrificaron a los animales y se extrajo el intestino delgado, el cual es abierto longitudinalmente a través del borde antimesentérico y enjuagado con solución PBS fría, posteriormente, es fijado en formol al 10% durante 24 horas, pasadas las cuales se evalúa y cuantifica el número de úlceras estratificando el intestino delgado en cinco porciones de la misma longitud (15 cm aproximadamente) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Estratificación del intestino delgado de la rata para su análisis. La porción 1ª corresponde al duodeno, la 2ª, 3ª y 4ª al yeyuno, mientras que la porción 5ª es el íleon.

### 7.5 Análisis de datos

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar (ee) de grupos de 6 animales. El curso temporal de las respuestas nociceptivas resultantes de la administración de los fármacos individuales y sus combinaciones se expresa mediante las sacudidas en función del tiempo. Las áreas bajo las curvas resultantes (ABC) se calcularon utilizando la regla de los trapezoides. El ABC se calculó para las dos fases de la prueba de formalina y el porcentaje de antinocicepción para cada fase fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Ortiz y Castañeda-Hernández., 2008):
$$\left[ \frac{ABC_{\text{vehículo}} - ABC_{\text{post-fármaco}}}{ABC_{\text{vehículo}}} \right] \times 100.$$

Las curvas dosis respuesta se construyeron utilizando una regresión lineal de mínimos cuadrados.

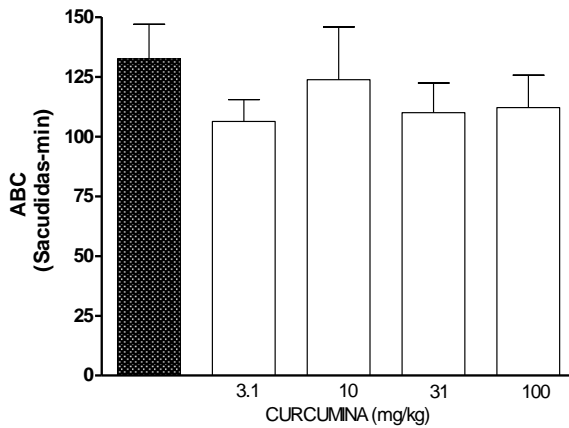
Para comparar la diferencia entre tratamientos se utilizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's. Se consideró una diferencia con significancia estadística cuando  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

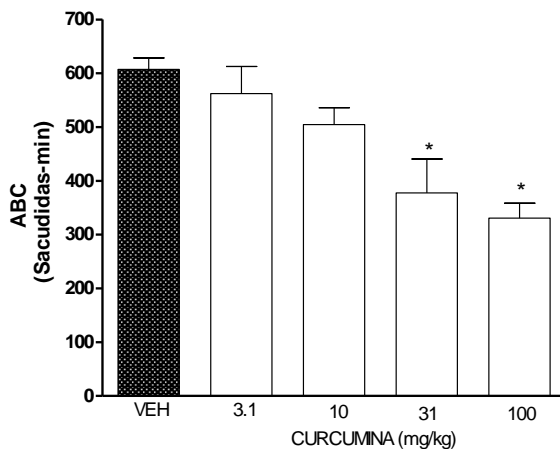
### 8.1 Actividad antinociceptiva de la curcumina

La inyección local de formalina al 1% produjo un comportamiento típico de sacudidas de tipo bifásico. La administración oral de la curcumina redujo significativamente el comportamiento nociceptivo, caracterizado por las sacudidas de la extremidad, después de la administración de la formalina únicamente en la segunda fase de la prueba (**Fig.14**).

Fase 1



Fase 2

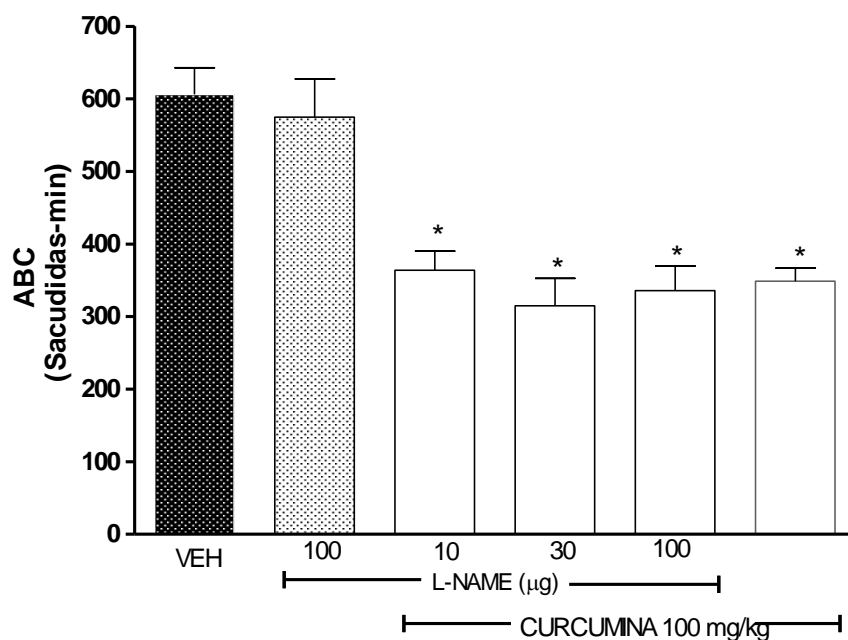


**Figura 14.** Efecto antinociceptivo de la curcumina en la prueba de formalina al 1%. Los datos están expresados como el área bajo el número de sacudidas contra la curva del tiempo (AUC), correspondiente a la primera fase (panel superior) y segunda fase (panel inferior) de la prueba de formalina. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ) según fue determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.

## 8.2 Participación de la vía ON-GMPc-K<sub>ATP</sub> en la actividad antinociceptiva de la curcumina

### 8.2.1 Efecto de la administración de L-NAME en la actividad antinociceptiva de la curcumina

La administración en la superficie dorsal de la extremidad pélvica derecha, del inhibidor de la SON, L-NAME, a diferentes dosis no produjo alteraciones en el efecto antinociceptivo de la curcumina en la segunda fase del modelo de formalina. La curcumina se administró previamente por vía oral a una dosis constante de 100 mg/kg. La administración de L-NAME (100 µg/pata) en ausencia de curcumina tampoco tuvo ningún efecto (**Figura 15**).

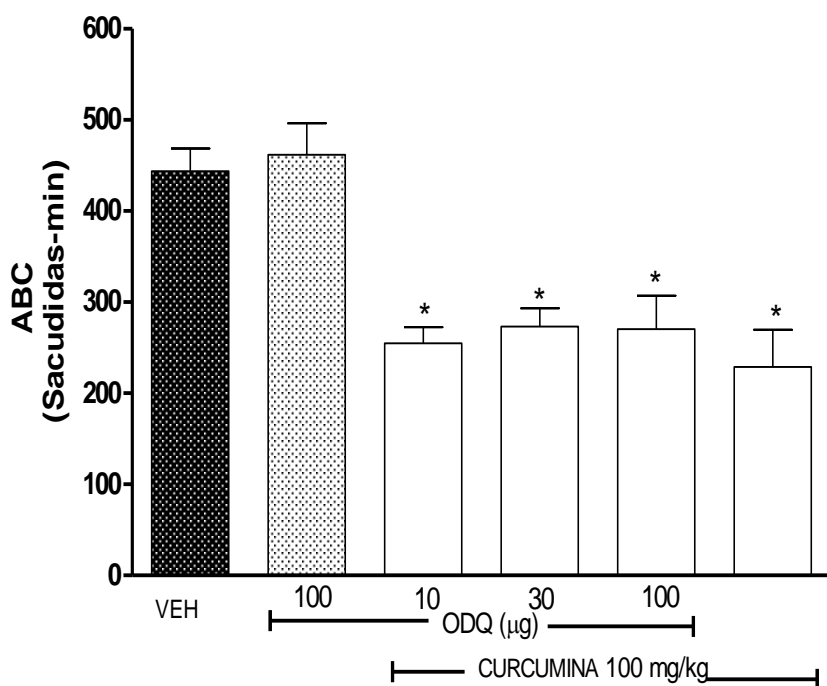


**Figura 15.** Efecto de la administración de L-NAME sobre el efecto antinociceptivo de la curcumina. Los datos están expresados como el área bajo el número de sacudidas contra la curva del tiempo (ABC), correspondiente a la segunda fase de la prueba de formalina. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ), según fue determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.



## 8.2.2 Efecto de la administración de ODQ en la actividad antinociceptiva de la curcumina

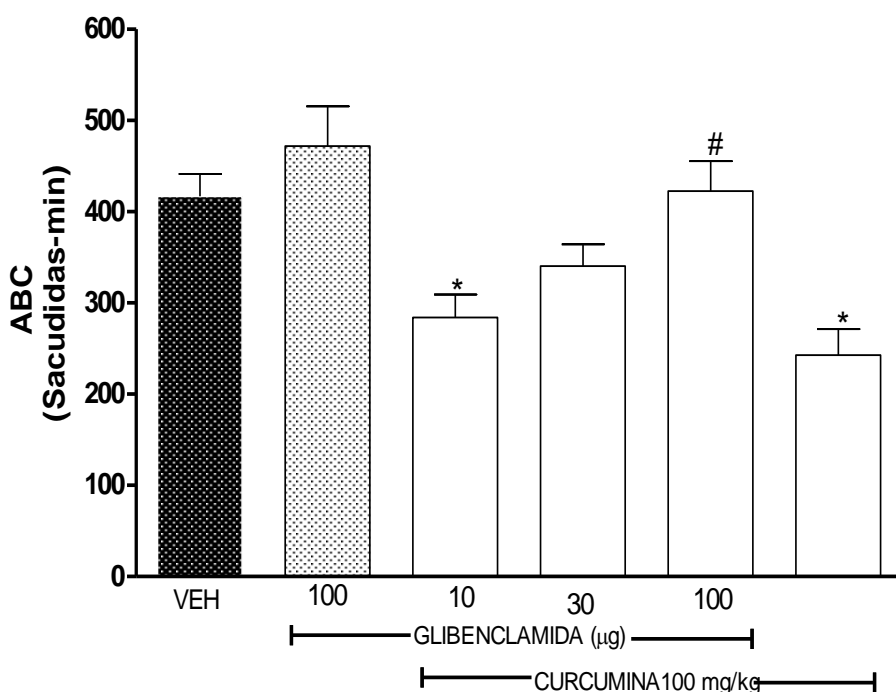
La administración en la superficie dorsal de la extremidad pélvica derecha, del inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, ODQ, a diferentes dosis tampoco produjo alteraciones en el efecto antinociceptivo de la curcumina en la segunda fase del modelo de formalina. La curcumina se administró previamente por vía oral a una dosis constante de 100 mg/kg. La administración de ODQ (100 µg/pata) en ausencia de curcumina no tuvo ningún efecto (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de la administración de ODQ sobre el efecto antinociceptivo de la curcumina. Los datos están expresados como el área bajo el número de sacudidas contra la curva del tiempo (ABC), correspondiente a la segunda fase de la prueba de formalina. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ), según fué determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.

### 8.2.3 Efecto de la administración de glibenclamida en la actividad antinociceptiva de la curcumina

La administración en la superficie dorsal de la extremidad pélvica derecha, del bloqueador de los canales de potasio sensibles a ATP, glibenclamida, revirtió el efecto antinociceptivo de la curcumina, cuando se utilizó a dosis de 30 y 100  $\mu\text{g/pata}$ , en la segunda fase del modelo de formalina. La curcumina se administró previamente por vía oral a una dosis constante de 100 mg/kg. La administración de glibenclamida (100  $\mu\text{g/pata}$ ) en ausencia de curcumina no tuvo ningún efecto (Figura 17).



**Figura 17.** Efecto de la administración de glibenclamida en la actividad antinociceptiva de la curcumina. Los datos están expresados como el área bajo el número de sacudidas contra la curva del tiempo (ABC), correspondiente a la segunda fase de la prueba de formalina. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ) y # diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la curcumina, según fué determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.

### 8.3 Interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva entre curcumina y AINEs

#### 8.3.1 Curvas dosis-efecto de curcumina, diclofenaco e indometacina

La inyección de formalina al 1% en la superficie dorsal de la extremidad pélvica derecha, produjo el comportamiento bifásico típico para esta prueba, la administración oral previa de diclofenaco, indometacina y curcumina disminuyeron el comportamiento nociceptivo, caracterizado por sacudidas de la pata, únicamente en la segunda fase. La administración de los fármacos no modificó la actividad motora ni a los reflejos pineal y corneal.

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

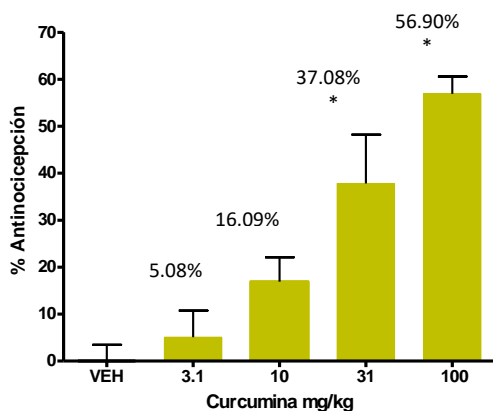
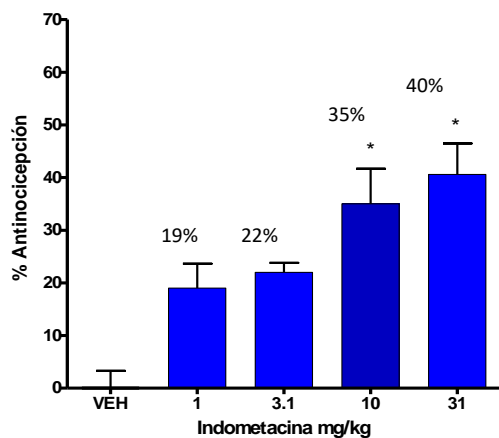
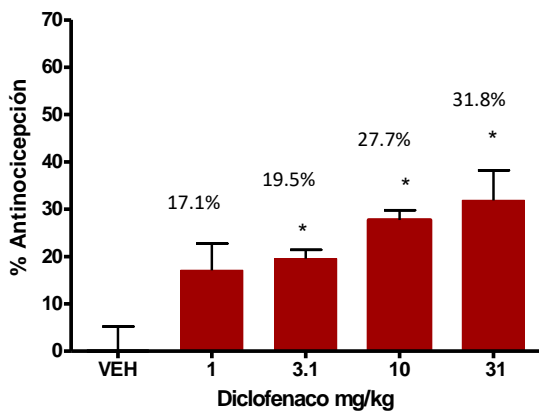
$$\% \text{ Antinocicepción} = \left[ \frac{\Sigma \text{ de sacudidas sin fármaco} - \Sigma \text{ desacudidas con fármaco}}{\Sigma \text{ sacudidas sin fármaco}} \right] * 100$$

Con estos datos se construyeron las curvas dosis-efecto antinociceptivo (**Figura 18**) y mediante una regresión lineal se obtuvieron los valores DE<sub>30</sub> de los fármacos administrados individualmente, las cuales fueron:

DE<sub>30</sub> diclofenaco= 19.8 mg/kg (e.e 4.5 mg/kg)

DE<sub>30</sub> indometacina= 6.2 mg/kg (e.e 1.3 mg/kg)

DE<sub>30</sub> curcumina= 18.6 mg/kg (e.e 2.0 mg/kg)



**Figura 18.** Curvas dosis-efecto antinociceptivo del diclofenaco (panel superior), indometacina (Panel intermedio) y curcumina (panel inferior) en la prueba de formalina al 1% correspondiente a la segunda fase de la prueba. Las barras indican el promedio  $\pm$  S.E. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ) según lo determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.

### 8.3.2 Establecimiento de la dosis efectiva teórica 30 (DE<sub>30</sub> T)

Una vez establecidas la DE<sub>30</sub> para los fármacos individuales se procedió a establecer la DE<sub>30</sub> T de las combinaciones:

- DE<sub>30</sub>T curcumina- diclofenaco:

$$DE_{30}T = \frac{DE_{30} \text{ curcumina}}{2} + \frac{DE_{30} \text{ diclofenaco}}{2}$$

$$DE_{30}T = \frac{18.6}{2} + \frac{19.8}{2} = 19.2$$

DE<sub>30</sub>T Curcumina-diclofenaco = 19.2 mg/kg (± e.e 2.4 mg/kg)

- DE<sub>30</sub>T curcumina-Indometacina:

$$DE_{30}T = \frac{DE_{30} \text{ curcumina}}{2} + \frac{DE_{30} \text{ indometacina}}{2}$$

$$DE_{30}T = \frac{18.6}{2} + \frac{6.2}{2} = 12.4$$

DE<sub>30</sub>T curcumina-indometacina = 12.4 mg/kg (± e.e 1.2 mg/kg)

### 8.3.3 Efecto antinociceptivo de las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina.

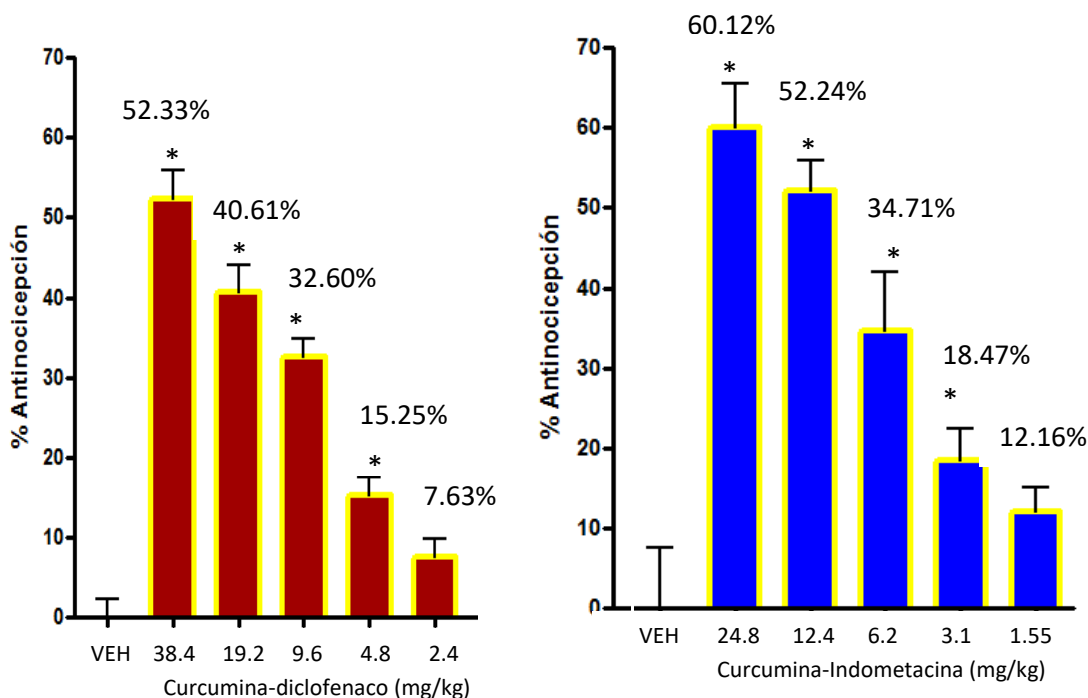
Basándonos en los valores de la DE<sub>30</sub> de los fármacos individuales, se diseñaron las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina manteniendo proporciones constantes de los dos fármacos en cada combinación (**Tabla 4**).

COMBINACIÓN	CURCUMINA EN LA COMBINACIÓN (mg/kg)	DICLOFENACO EN LA COMBINACIÓN (mg/kg)	DOSIS TOTAL DE LA COMBINACIÓN (mg/kg)
DE <sub>30</sub> +DE <sub>30</sub>	18.6	19.8	38.4
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{2}$	9.3	9.90	19.2
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{4}$	4.65	4.95	9.6
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{8}$	2.3	2.48	4.8
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{16}$	1.16	1.24	2.4

COMBINACIÓN	CURCUMINA EN LA COMBINACIÓN (mg/kg)	INDOMETACINA EN LA COMBINACIÓN (mg/kg)	DOSIS TOTAL DE LA COMBINACIÓN (mg/kg)
DE <sub>30</sub> +DE <sub>30</sub>	18.6	6.2	24.8
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{2}$	9.3	3.1	12.4
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{4}$	4.65	1.55	6.2
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{8}$	2.3	0.78	3.1
$\frac{DE_{30}+DE_{30}}{16}$	1.16	0.39	1.55

**Tabla 4.** Dosis utilizadas en las combinaciones curcumina-diclofenaco (panel superior) y curcumina indometacina (Panel inferior).

La administración de las combinaciones redujo el comportamiento nociceptivo únicamente en la segunda fase de la prueba de formalina. Se realizó la curva dosis-efecto antinociceptivo de ambas combinaciones. (Figura 19)



**Figura 19.** Curvas dosis-efecto antinociceptivo de las combinaciones de AINEs y curcumina. La combinación curcumina-diclofenaco (derecha) y la combinación curcumina- indometacina (izquierda) en la segunda fase de la prueba de formalina al 1%. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ) según lo determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's. v.-vehículo; DE.- combinación de dosis efectiva 30; DE2.-combinación de dosis efectiva 30 entre dos; DE4.-combinación de dosis efectiva 30 entre cuatro; DE8.-combinación de dosis efectiva 30 entre 8; DE16.- combinación de dosis efectiva 30 entre dieciséis.

### 8.3.4 Establecimiento de la dosis efectiva experimental 30 (DE<sub>30</sub>E)

Con estos datos y mediante una regresión lineal se obtuvieron los valores DE<sub>30</sub> E de las combinaciones, las cuales fueron:

DE<sub>30</sub>E curcumina con diclofenaco= 9.8 mg/kg (e.e.  $\pm$  0.7 mg/kg)

DE<sub>30</sub>E curcumina con indometacina= 4.6 mg/kg (e.e.  $\pm$  0.5 mg/kg)

### 8.3.5 Índice de interacción

Al contar con las DE<sub>30</sub> T y DE<sub>30</sub> E es posible obtener el índice de interacción (**Tabla 5**):

Combinación de fármacos	DE30 T (mg/kg)	DE30 E (mg/kg)	Índice de interacción
curcumina-diclofenaco	19.2	9.8	0.51 (e.e. 0.08)
curcumina-Indometacina	12.4	4.6	0.37 (e.e. 0.05)

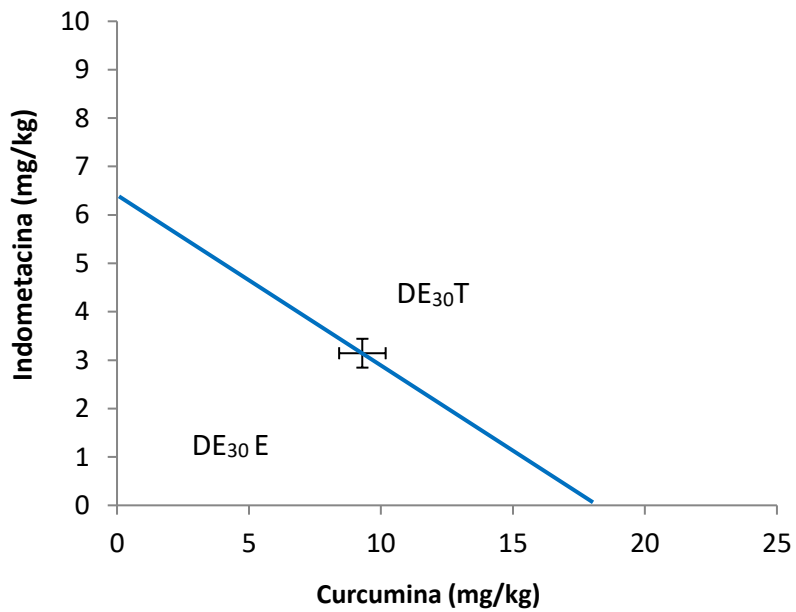
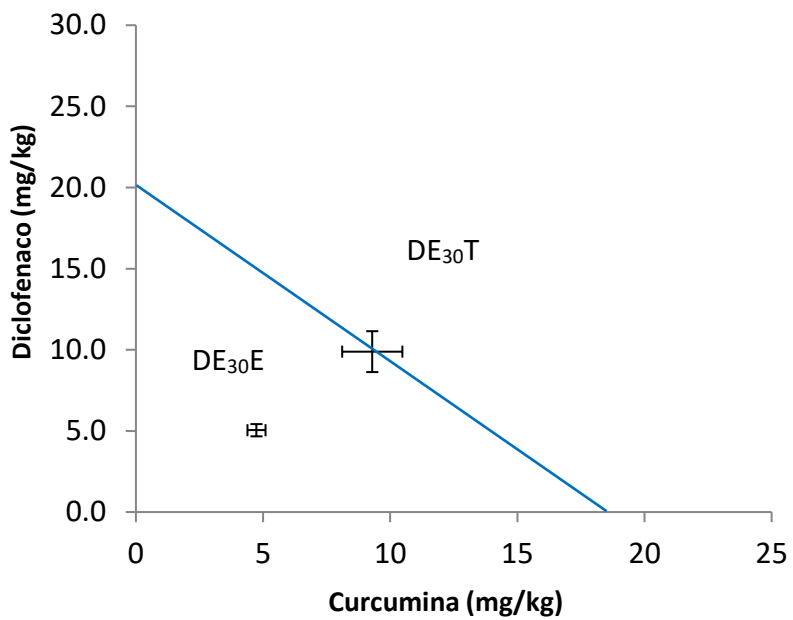
**Tabla 5.** Índice de interacción en las combinaciones Curcumina-diclofenaco y Curcumina-Indometacina

El índice de interacción en ambas combinaciones es menor que 1, lo que demuestra una interacción farmacológica de sinergia en la actividad nociceptiva, más evidente en la combinación curcumina-indometacina.

### 8.3.6 Isobogramas de la interacción antinociceptiva entre las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina

La representación de la interacción entre curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina se puede observar claramente en los isobogramas (**Figura 20**), en ambos casos el punto experimental cae por debajo de la línea de aditividad o isobola, indicando la presencia de una interacción sinérgica.

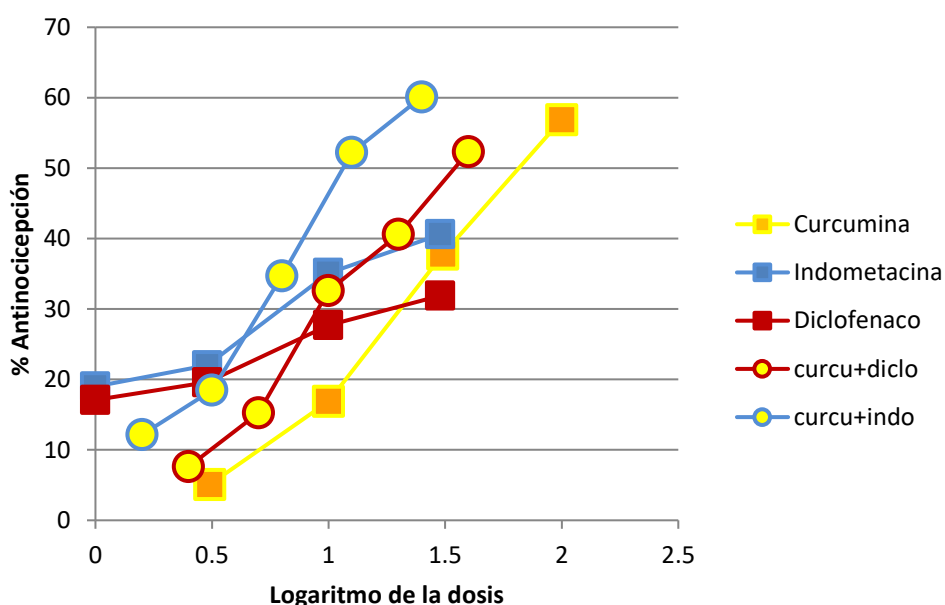




**Figura 20.** Isobogramas de la interacción farmacológica en la actividad antinociceptiva de las combinaciones curcumin-diclofenaco (Arriba) y curcumin-Indometacina (Abajo). Los valores de DE<sub>30</sub> individual para AINEs y curcumin son graficados en los ejes x-y respectivamente. La línea recta que conecta ambas DE<sub>30</sub> contiene todas las posibles combinaciones que producen una sumación entre estos fármacos.

### 8.3.7 Curva dosis-efecto antinociceptivo normalizada de AINEs, curcumina y sus combinaciones

En la curva normalizada dosis efecto antinociceptivo de la curcumina, diclofenaco, indometacina y sus combinaciones es posible observar un aumento en la eficacia de los AINEs y el aumento en la potencia de la curcumina dentro de las combinaciones con respecto a la administración individual de los fármacos (**Figura 21**).



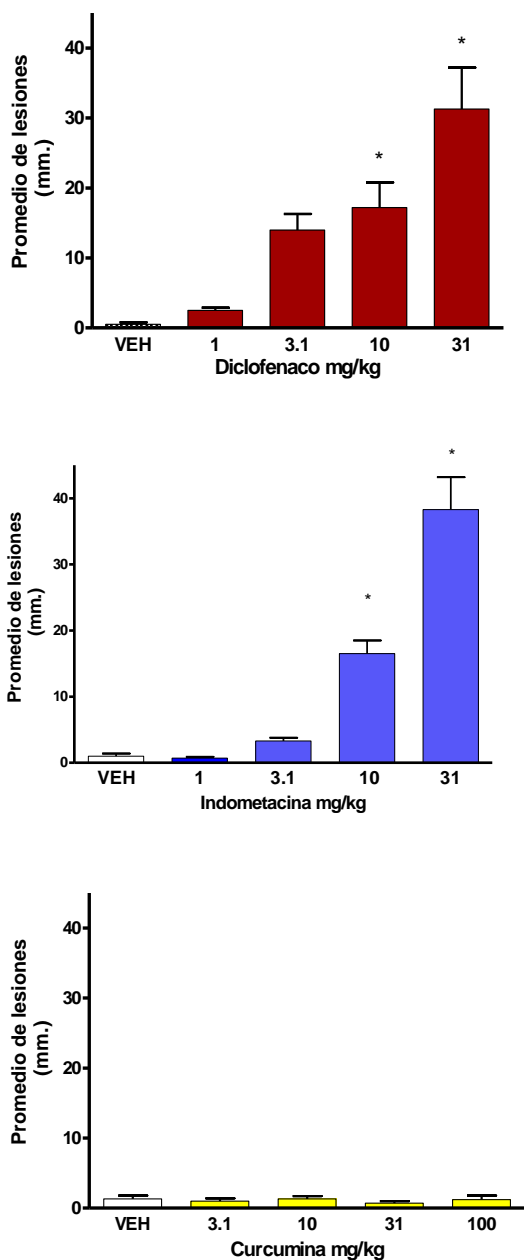
**Figura 21.** Curva dosis-efecto antinociceptivo (%) normalizada de los AINEs, la Curcumina y sus combinaciones. Cada punto representa la media de 6 ratas.

## 8.4 Seguridad gástrica de la curcumina

### 8.4.1 Efecto gástrico generado por curcumina, diclofenaco e indometacina

La curcumina, diclofenaco e indometacina fueron administrados a dosis crecientes por vía oral en ratas con 18-20 horas de ayuno, tres horas posterior a la administración se realizó el sacrificio y extracción de los estómagos. Se contabilizó el daño en milímetros (mm). En las gráficas es posible observar que la generación del daño es dosis dependiente en ambos

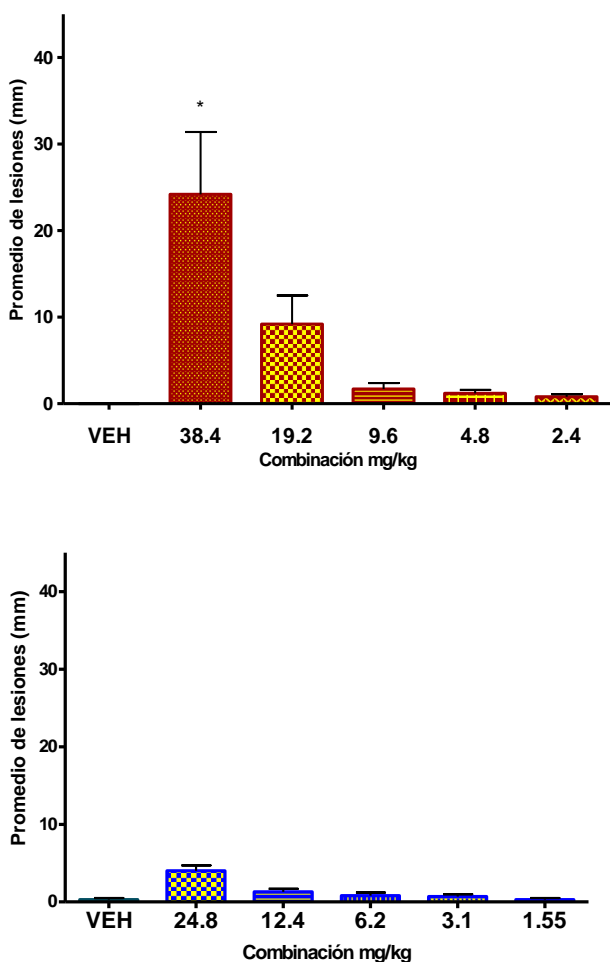
AINEs empezando a mostrar diferencia con respecto del vehículo a partir de 10 mg/kg, se consideró no sobrepasar la dosis de 31 mg/kg en los AINEs por la severidad de las lesiones, mientras que la curcumina no produjo ningún daño incluso a dosis altas (100 mg/kg) (Figura 22).



**Figura 22.** Daño gástrico generado por diclofenaco (arriba), indometacina (en medio) y curcumina (abajo). Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ), según lo determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.

#### 8.4.2 Daño gástrico generado en las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina

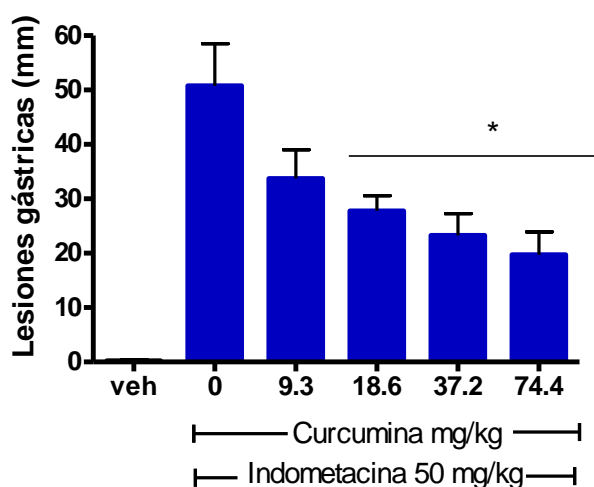
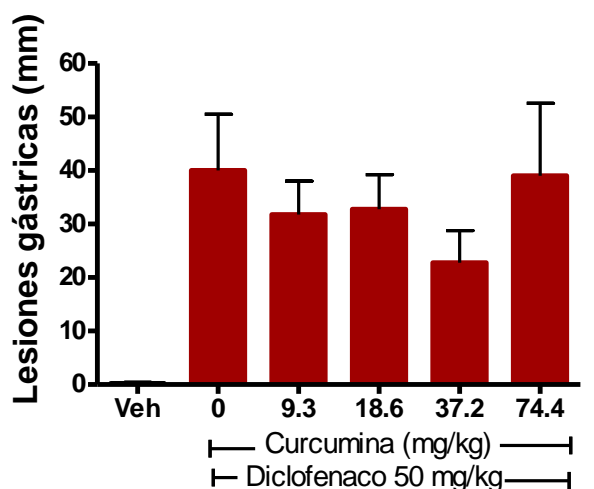
Las combinaciones curcumina-diclofenaco y curcumina-indometacina utilizadas fueron las mismas establecidas para determinar la DE<sub>30</sub> E de la interacción antinociceptiva (Tabla 4). Los resultados muestran que solo la dosis más alta de la combinación curcumina-diclofenaco produjo daño estadísticamente significativo, mientras que hay una ausencia de daño en las combinaciones curcumina-indometacina en todas las dosis utilizadas (Figura 23).



**Figura 23.** Daño gástrico generado por las combinaciones curcumina-diclofenaco (arriba) y curcumina-indometacina (abajo). Las combinaciones fueron administradas por vía oral y tres horas después examinados los estómagos. Se contabilizó el daño en milímetros (mm). Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ), según lo determinado por un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey's.

### 8.4.3 Actividad gastroprotectora de la curcumina contra el daño generado por diclofenaco e indometacina

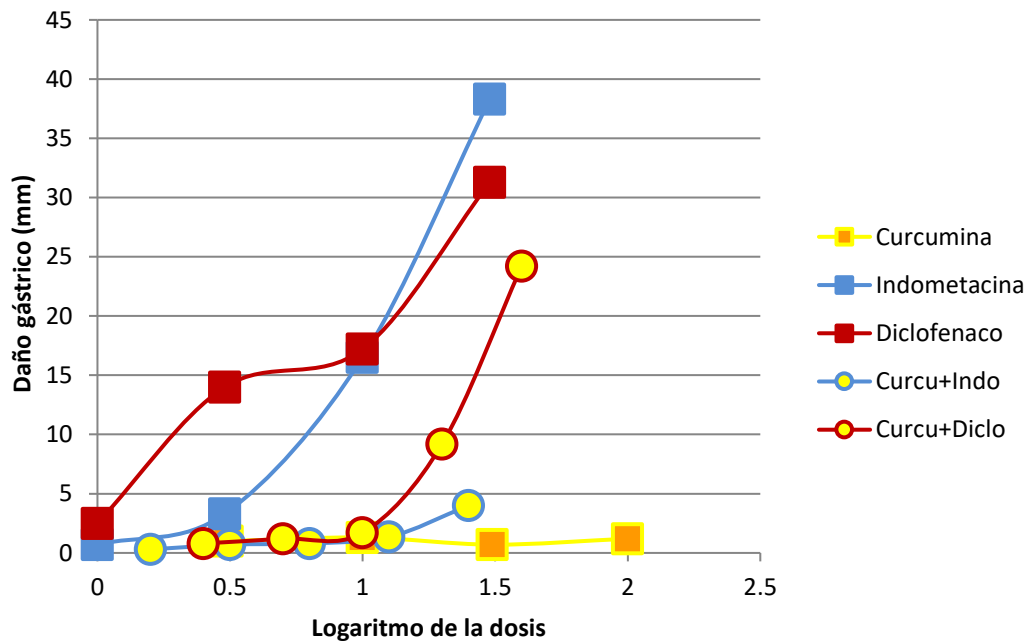
Se usaron dosis fijas de diclofenaco e indometacina (50 mg/kg) con dosis crecientes de curcumina. Las gráficas obtenidas demuestran que el daño gástrico producido por el diclofenaco se presentó en la misma magnitud aún en presencia de curcumina, en cambio, las lesiones disminuyeron en forma significativa cuando se utilizó indometacina con curcumina a partir de la dosis de 18.6 mg/kg (**Figura 24**).



**Figura 24.** Actividad gastroprotectora de la curcumina contra el daño generado por diclofenaco (arriba) e indometacina (abajo). Los datos están expresados como el área de daño determinada en milímetros (mm) tres horas después de la administración. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto del grupo sin curcumina ( $p < 0.05$ ).

#### 8.4.4 Curva dosis-efecto deletéreo normalizada de AINEs, curcumina y sus combinaciones

En la curva normalizada dosis efecto deletéreo en la mucosa gástrica de la curcumina, diclofenaco, indometacina y sus combinaciones es posible observar que el AINE más agresivo para la mucosa gástrica es la indometacina, sin embargo, la combinación curcumina-indometacina es la que genera menos daño. Destaca también la ausencia de daño gástrico de la curcumina (**Figura 25**).

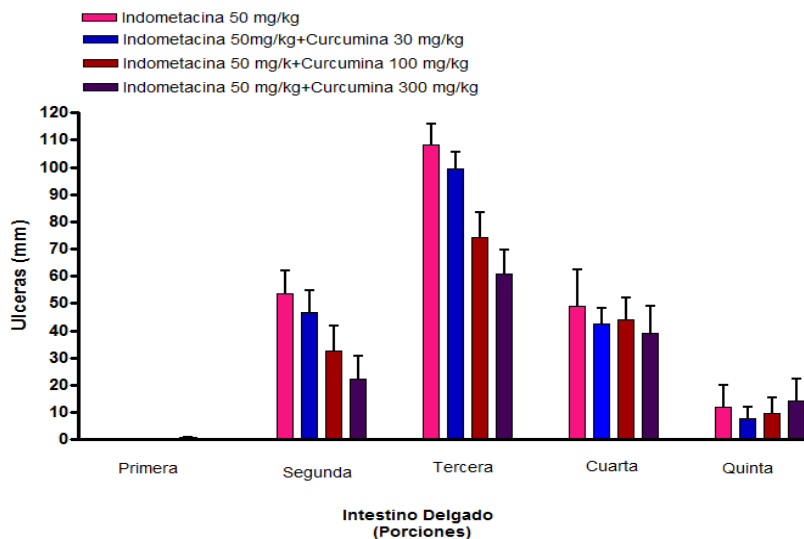
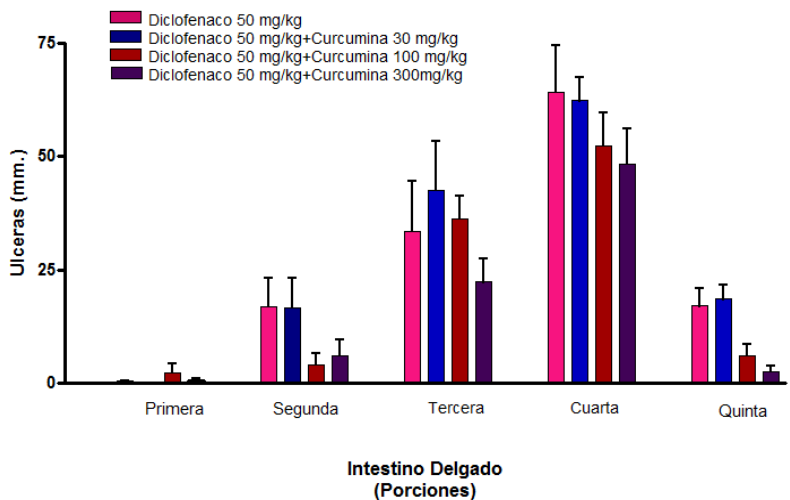


**Figura 25.** Curva Dosis-efecto deletéreo en la mucosa gástrica (extensión en mm.) normalizada, de los AINEs, la curcumina y sus combinaciones.

## 8.5 Seguridad entérica de la curcumina

### 8.5.1 Distribución del daño generado por diclofenaco e indometacina en el intestino delgado

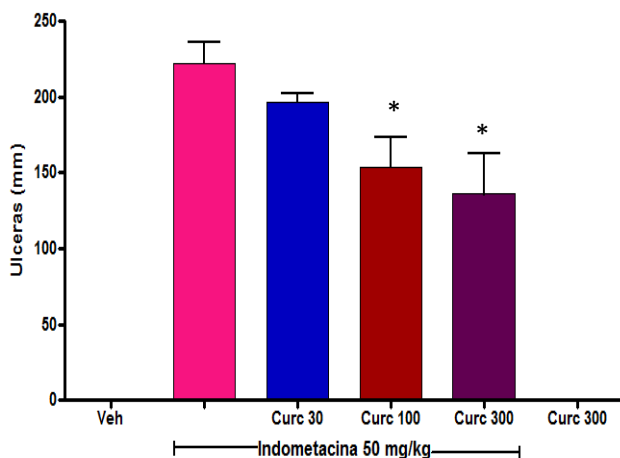
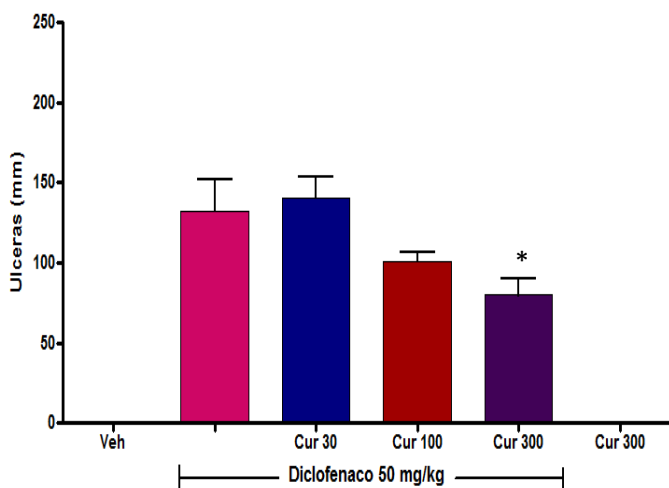
La administración de indometacina produjo mayor cantidad de úlceras que el diclofenaco a la misma dosis (50 mg/kg). Se observó también que en el caso del diclofenaco el número de úlceras va incrementando de la primera a la cuarta porción para disminuir en la quinta porción del intestino delgado, mientras que en la indometacina el máximo aumenta se logra en la tercera porción para descender en la cuarta y quinta (Figura 26).



**Figura 26.** Distribución de úlceras en intestino delgado generado por diclofenaco (arriba) indometacina (abajo). Los fármacos fueron administrados por vía oral y 24 horas después se evaluó el daño presente en el intestino delgado, dividiéndolo en cinco porciones de la misma extensión. Se contabilizó el daño en milímetros (mm). Las barras indican el promedio  $\pm$  S.E. de seis ratas.

### 8.5.2 Efecto enteroprotector de la curcumina contra diclofenaco e indometacina

La curcumina fue capaz de reducir el daño entérico de los AINEs, administrados a dosis fijas de 50 mg/kg, en forma estadísticamente significativa a una dosis 300 mg/kg en el caso del diclofenaco y a partir de los 100 mg/kg en el caso de la indometacina (**Figura 26**)



**Figura 27.** Actividad enteroprotectora de la Curcumina contra el daño generado por diclofenaco (arriba) e indometacina (abajo). La curcumina fue usada en dosis crecientes (30, 100, 300 mg/kg) en presencia de dosis fijas (50 mg/kg) de diclofenaco e Indometacina por vía oral. Los datos están expresados como el área de daño determinada en milímetros (mm) 24 horas después de la administración. Las barras indican el promedio  $\pm$  e.e. de seis ratas. \*Diferencia significativa con respecto al grupo sin curcumina ( $p < 0.05$ ).



## 9. Discusión

### 9.1 Actividad antinociceptiva de la curcumina y participación de la vía

#### ON-GMPc-K<sub>ATP</sub>

En el presente estudio no se observó efecto antinociceptivo de la curcumina en la primera fase de la prueba de formalina al 1%, en donde el dolor es generado por una estimulación directa de la formalina a las fibras C de los nociceptores aferentes primarios (Tjolsen *et al.*, 1992). Esta fase es inhibida farmacológicamente con anestésicos locales y analgésicos opioides (Le Bars *et al.*, 2001)

El efecto antinociceptivo de la curcumina se demostró en la segunda fase de la prueba, lo que coincide con otros estudios (Lee *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2009) esta fase está relacionada con una sensibilización central (Le Bars *et al.*, 2001). Las dosis de 3.1 y 10 mg/kg no evidenciaron ningún cambio con respecto al grupo control cuando, lo que se podría relacionar con la pobre absorción de la curcumina en el tracto digestivo y en consecuencia la baja biodisponibilidad que presenta cuando se administra por vía oral (Anand *et al.*, 2007), sin embargo, las dosis de 31 y 100 mg mostraron una disminución estadísticamente significativa del comportamiento relacionado con el dolor, lo que se relaciona con actividad antinociceptiva.

El efecto antinociceptivo de la curcumina mostrado a 100 mg/kg fue bloqueado en forma dosis dependiente con la inyección previa local de glibenclamida, un bloqueador específico de los canales K<sub>ATP</sub> sin efecto en los canales de potasio dependientes de Ca<sup>2+</sup> o de voltaje (Amoroso *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 1991; Edwards and Weston, 1993), a dosis de 30 y 100 µg, sugiriendo la activación de los canales K<sub>ATP</sub> en la actividad antinociceptiva de la curcumina. Cabe mencionar que el uso de la glibenclamida sola no modificó el comportamiento de sacudidas con respecto a los grupos controles, esta falta de efecto es

consistente con estudios anteriores en la prueba de formalina (Ortiz *et al.*, 2003) y excluye la posibilidad de que genere algún efecto nociceptivo.

La curcumina (100 mg/kg) mantuvo su disminución en el comportamiento nociceptivo de las ratas aún después de la inyección previa de ODQ, inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (GCs), o L-NAME, inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, lo que demuestra farmacológicamente que ni el óxido nítrico ni la guanilato ciclasa soluble intervienen en la actividad antinociceptiva de la curcumina.

Estos datos analizados en conjunto evidencian que la vía ON-GMPc-canales  $K_{ATP}$  no está involucrada en la antinocicepción que provee la curcumina, sin embargo, señalan la participación de los canales  $K_{ATP}$ .

Se puede hipotetizar acerca de los probables mecanismos por los cuales puede llevarse a cabo la activación de los canales  $K_{ATP}$  sin involucrar la vía NO-GMPc, una alternativa consiste en la activación, por parte de la curcumina de la guanilato ciclasa particulada (GCp) que cataliza la síntesis del GMPc y éste a su vez modula directa o indirectamente varios canales iónicos, entre los que se encuentran los canales  $K_{ATP}$  (Kourie y Rive, 1999). En este sentido, el comportamiento mostrado por la curcumina en estos experimentos es similar al mostrado por el péptido natriurético auricular (PNA), un ligando de la guanilato ciclasa particulada, en un estudio desarrollado en la prueba de formalina en donde el PNA generó disminución de la conducta nociceptiva y dicho efecto fue bloqueado por la glibenclamida y no por el L-NAME (Ortiz *et al.*, 2002b).

Otra opción es que la curcumina pueda actuar estimulando a receptores acoplados a proteínas G que abren los canales  $K_{ATP}$  induciendo antinocicepción, entre los que se encuentran receptores opioides  $\mu$ , adrenorreceptores  $\alpha$ -2, receptores  $5HT_{1A}$ , receptores de adenosina  $A_1$  y receptores muscarínicos  $M_2$  (Ocaña *et al.*, 2004). Apoyando esta teoría, un estudio revela que el sistema monoamina descendente (asociado a receptores  $5HT_{1A}$ ) está involucrado en la actividad antinociceptiva de la curcumina en un modelo de dolor

neuropático y revela la participación de receptores opiodes delta y Mu como blancos intermedios (Zhao *et al.*, 2012).

Por último se mencionará que existen algunas sustancias capaces de interactuar directamente con los canales  $K_{ATP}$ , para generar su apertura, tal es el caso del pinacidil, diazoxido y cromakalim, los cuales tienen especificidad por algunos canales  $K_{ATP}$  (Campbell y Welch, 2001; ) (**Tabla 6**).

<b>Fármaco</b>	<b>Canal <math>K_{ATP}</math> cardíaco</b>	<b>Canal <math>K_{ATP}</math> músculo liso vascular</b>	<b>Canal <math>K_{ATP}</math> pancreático</b>
Pinacidil	Abre	Abre	Abre, baja potencia
Cromakalim	Abre	Abre	Sin efecto
Diazoxido	Sin efecto	Abre, baja potencia	Abre

**Tabla 6.** Fármacos que interactúan directamente con los canales  $K_{ATP}$  generando su apertura.

Esta especificidad se debe a que se han encontrado diversas variedades de canales  $K_{ATP}$  con diferencias en la subunidad SUR (Aguilar-Bryant *et al.*, 1998) (**Tabla 7**), por lo que resultaría interesante estudiar si la curcumina interactúa directamente con el tipo de canal de potasio que se encuentra en sistema nervioso y las implicaciones que puede tener sobre otros canales de la misma familia debido al amplio papel que desempeñan y a su ubicuidad dentro del organismo.

<b>Tipo de canal</b>	<b>Localización</b>
$K_{ir} 6.2+ SUR1$	Páncreas
$K_{ir} 6.2+SUR2A$	Corazón
$K_{ir} 6.1+SUR2B$	Músculo liso vascular
$K_{ir} 6.2+SUR2B$	
$K_{ir} 6.2c26$	
$K_{ir} 6.2C26+SUR1$	

**Tabla 7.** Variedades identificadas de canales  $K_{ir} 6$  también denominados  $K_{ATP}$ , y su localización dentro del organismo

En este sentido cabe destacar que hay múltiples investigaciones que señalan que la curcumina es un potente bloqueador de los canales Kv, reduciendo las corrientes de salida en las células musculares lisas de la arteria coronaria del conejo (HongDa *et al.*, 2013) y de células T Jurkat (Shin *et al.*, 2011). Así mismo, inhiben el canal KV 1.3 en células T efectoras de memoria (Lian *et al.*, 2013) y bloquean los canales Kv 11.1 en células de líneas THP-1 (Banderali *et al.*, 2011) y en células HEK293 (Choi *et al.*, 2013). Los estudios no han establecido claramente los mecanismos inhibitorios sobre los canales Kv, pero se sugiere que actúan de forma directa sobre éstos (Choi *et al.*, 2013; HongDa *et al.*, 2013; Lian *et al.*, 2013). Por otra parte la curcumina ha demostrado abrir los canales de potasio en la arteria ruminal de cabras, induciendo una vasorelajación producida, al menos en parte, por una activación directa sobre la guanilato ciclasa soluble (sGC) (Dash y Parija, 2013). Dado los diversos efectos regulatorios de la curcumina en múltiples blancos, no debe sorprender que la curcumina participe en diferentes vías produciendo diferentes acciones fisiológicas de los canales de potasio (Zhang *et al.*, 2014).

Con el presente estudio, se establece que la curcumina podría tener un mecanismo antinociceptivo multifactorial conformado por sus actividades antiinflamatorias, antioxidantes y su capacidad para abrir los canales  $K_{ATP}$ , además provee las bases para nuevos estudios que demuestren mediante qué mecanismos lo hacen.

## **9.2 Interacción entre curcumina y AINEs**

La interacción demostrada de sinergia en la actividad antinociceptiva de la curcumina y el diclofenaco es mencionada también en el modelo de dolor orofacial inducido por formalina en la rata, donde se encontró un efecto antinociceptivo del diclofenaco usado en combinación con curcumina a dosis subterapéuticas (Mittal *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos por los cuáles es generada dicha sinergia permanecen sin establecerse.

Se ha encontrado que el sinergismo entre algunos AINES como diclofenaco, ketoprofeno, meloxicam, metamizol, paracetamol y piroxicam con morfina, se debe a la inhibición de

diversas vías de transmisión del dolor, independientes al bloqueo de prostaglandinas (Miranda *et al.*, 2004). Lo que es más, en la prueba de la formalina la disminución en la nocicepción generada por los opioides y algunos AINES como el metamizol y el diclofenaco, se debe en parte a la activación de la vía óxido nítrico-GMP cíclico-canales de potasio (Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 1999); de la misma forma otros estudios refuerzan el hecho de que la combinación de indometacina, que no activa la vía, con codeína produjo únicamente una interacción aditiva (Arredondo-Garza *et al.*, 2007).

Este estudio pone de manifiesto que la sinergia entre la curcumina y los AINES es, al menos en parte, generada por la actividad bloqueadora de prostaglandinas por parte de los AINES, ya que la presencia de sinergia apareció con el diclofenaco (diversos mecanismos de acción antinociceptiva) y con la indometacina (bloqueador puro de prostaglandinas como mecanismo antinociceptivo), al respecto existe un reporte que menciona a la curcumina como capaz de potencializar la actividad anti-inflamatoria de inhibidores de la ciclooxigenasa aspirina y rofecoxib en el modelo de granuloma (Nandal *et al.*, 2009) sin embargo, otro estudio demuestra que la curcumina sola es más eficaz que la combinación de curcumina-diclofenaco para controlar el dolor crónico producido por osteoartritis pacientes (Chandran y Goel, 2012).

Esta sinergia, si bien requiere ser completamente clarificada resulta muy conveniente para la aplicación clínica ya que logra aumentar la eficacia de los AINES usados en forma aislada, al mismo tiempo que aumenta la potencia de la curcumina (**Figura 21**). Si consideramos que dentro las limitantes del uso de la curcumina se encuentra su baja biodisponibilidad que ha motivado diversos estudios para aumentarla, implementando estrategias como el uso con coadyuvantes (piperina), curcumina liposomal ,nanopartículas de curcumina, análogos estructurales de la curcumina, complejo curcumina-fosfolipido entre otros (Anand *et al.*, 2007), el uso sinérgico con AINES podría ser estudiado como un método novedoso de librar esta dificultad.

Por otro lado la combinación de ambos fármacos permite el uso de dosis menores de ambos componentes lo que reduce en gran medida la formación de lesiones gástricas generadas por los AINEs sin sacrificar eficacia analgésica (**Tabla 8**).

Fármaco	Log. dosis	Antinocicepción %	Lesión gástrica (mm)
Curcumina	1.49	37.8	0.7
Diclofenaco	1.49	31.9	31.3
Indometacina	1	35.1	16.5
Curcumina + Indometacina	0.8	34.71	0.8
Curcumina + Diclofenaco	1	32.6	1.7

**Tabla 8.** Comparativo entre dosis, grados de antinocicepción y daño gástrico generados por los AINEs, la Curcumina y sus combinaciones. Nótese que la combinación Curcumina Indometacina guarda la mejor proporción entre dosis, efecto antinociceptivo y daño generado .

La mayoría de autores atribuyen propiedades gastroprotectoras a la curcumina a través de mecanismos como la inhibición de IL-8 producida por *Helicobacter pylori* que juega un papel importante en el desarrollo de úlceras y gastritis (Foryst-Ludwig *et al.*, 2004), incremento en la secreción de mucina (Rafatullah *et al.*, 1990), disminución en la producción de ácido gástrico al bloquear receptores de histamina H<sub>2</sub> (Kim *et al.*, 2005), regulación a la baja de la expresión de las metaloproteinasas de matriz 9 y 2 (Swarnakar *et al.*, 2005), así como la prevención en la actividad de la peroxidasa lo que disminuye la producción de radicales libres; sin embargo, otros autores reportan actividad ulcerogénica por disminución en la secreción de mucina y aumento en la secreción de ácido gástrico y/o pepsina (Gupta *et al.*, 1980).

En el presente estudio demostramos que la curcumina tiene un efecto gastroprotector contra el daño generado por la indometacina lo que concuerda con otros reportes de protección por curcumina contra indometacina a nivel gástrico (Thong-Nagam *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Chattopadhyay *et al.*, 2006; Swarnakar *et al.*, 2005) y de intestino delgado (Menozzi *et al.*, 2009. Sivalingam *et al.*, 2008) pero falla al generar protección contra diclofenaco sódico a nivel gástrico y muestra menos potencia a nivel entérico.

Este hecho pone de manifiesto que, aunque se espera que ambos fármacos compartan el mecanismo de inhibición de las prostaglandinas para generar daño gastroentérico, existen mecanismos que pueden llevarse a cabo en diferente grado o incluso ser particulares para los diferentes AINEs. En este sentido, se encontró que los metabolitos glucurónidos del diclofenaco se unen mediante enlaces covalentes (aducción) a macromoléculas como las proteínas (Hoffmann *et al.*, 2000). Estos complejos denominados “aductos” juegan un papel importante en la generación de úlceras intestinales sin haberse esclarecido completamente su mecanismo de lesión (Atchison *et al.*, 2000), mientras que para la indometacina se ha establecido un daño a través de múltiples mecanismos como lesión a la microvasculatura (Takeuchi *et al.*, 1990), daño a la matriz extracelular aumentando la actividad de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) y disminuyendo la MMP-2 (Swarnakar *et al.*, 2005), desbalance del óxido nítrico, generación de radicales libres de oxígeno y apoptosis (Souza *et al.*, 2004; Piotrowsky *et al.*, 1999; Fuji *et al.*, 2000 ), peroxidación lipídica de la membrana, oxidación de la proteína y disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa gástrica (Chattopadhyay *et al.*, 2006 ).

En lo que respecta al daño intestinal, la distribución de la lesión provocada por indometacina fue mayor en la tercera porción del intestino y por el diclofenaco en la cuarta porción, lo que anatómicamente corresponde al yeyuno, siendo casi inexistente en el duodeno (primera porción) y muy baja a nivel de ileon (quinta porción). Esta información concuerda con hallazgos encontrados por otros autores (Ramírez-Alcántara *et al.*, 2005).

Si bien todos los reportes concuerdan en la eficacia de la curcumina para disminuir las lesiones generadas por la indometacina a nivel gástrico y entérico, el mecanismo por el cual lo hacen no está del todo esclarecido y existe información opuesta. Algunos autores señalan a las propiedades antioxidantes de la curcumina como responsables en la prevención del daño al inactivar las peroxidasas y barrer los radicales libres (Chattopadhyay *et al.*, 2006), disminuir el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Sivalingam *et al.*, 2008) o inhibir la transcripción del factor Nuclear  $\kappa\beta$  con la subsecuente disminución en la expresión de ICAM-1, FNT-  $\alpha$ , iNOS, IL-1B moléculas que favorecen la adhesión y agregación de neutrófilos y por ende la producción de especies libres de oxígeno (Thong-Nagam *et al.*, 2012). En contraste en otro artículo los autores no encuentran una disminución en la mieloperoxidasa ni en la peroxidación lipídica generadas por la indometacina, por lo que concluyen que la actividad anti-inflamatoria y antioxidante no es la responsable de los efectos benéficos de la curcumina (Menozzi *et al.*, 2009). Otros autores atribuyen la regulación en la expresión y actividad de la metaloproteinasas de matriz dos (MPP2) y MPP9 como las responsables de la prevención y recuperación de las úlceras gástricas inducidas por indometacina (Swarnakar *et al.*, 2005), lo que concuerda con lo encontrado en otro trabajo, donde el aumento en la expresión de MPP-2, TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promueve la angiogénesis y restauración de las fibras de colágeno dañadas por la indometacina contribuyendo a la curación de la úlcera (Sivalingam *et al.*, 2008).

El presente trabajo es el primero en demostrar que el efecto gastroprotector de la curcumina no se presenta con el diclofenaco y se presenta en forma menos potente en el intestino delgado en comparación con la indometacina, lo que abre nuevas perspectivas de análisis y estudio.



## 10. Conclusiones

### 10.1 Conclusión General

- El presente trabajo brinda evidencias del beneficio de la combinación entre curcumina y AINEs, produciendo una sinergia en la actividad antinociceptiva, lo que permite a su vez reducción en las dosis de AINEs y disminución del daño gastroentérico, a la vez que incrementa la potencia de la curcumina favoreciendo su administración.

### 10.2 Conclusiones Particulares

- La Combinación curcumina-indometacina resultó más ventajosa que la combinación curcumina- diclofenaco al producir menor daño gástrico y mayor efecto antinociceptivo.
- El mecanismo antinociceptivo de la curcumina no está revelado por completo, pero en este trabajo se demostró que involucra a los canales  $K_{ATP}$ , sin intervención de la vía  $ON-GMPC-K_{ATP}$ .
- La capacidad de la curcumina para generar protección gástrica y entérica es distinta entre diclofenaco e indometacina.
- El presente estudio sienta las bases para establecer nuevos estudios que respondan a diferentes interrogantes sobre la combinación entre curcumina-AINEs, por ejemplo, conocimiento exacto de los mecanismos de acción involucrados en la sinergia, el uso de esta combinación en el dolor crónico, en el dolor neuropático, la interacción con otros AINEs y fármacos relacionados (paracetamol), entre otras.

## 11. Bibliografía

Aguilar-Bryan L., Clement J.P., Gonzalez G., Kunjilwar K., Babenko A., Bryan J. (1998) Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol. Rev.* 78: 227– 245.

Abramovici A., Cantu J., Jenkins SM. (2012) Tocolytic therapy for acute preterm labor. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 39: 77-87.

Aguirre-Bañuelos P., Granados-Soto V. (1999) Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. *J Pharmacol Toxicol Methods* 42: 79-85.

Aguirre-Bañuelos P., Granados-Soto V. (2000) Evidence for the participation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 395: 9–13.

Aggarwal BB., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H. (2007) Curcumin: The Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 595:1-75.

Aggarwal BB., Harikumar KB. (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.

Ammon HP., Walh MA. (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 57: 1-7.

Amoroso S., Schmid-Antomarch H., Fosset M., Ladzunky M. (1990) Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Sci* 247: 852– 854.

Anand P., Kunnumakkara AB., Newman RA., Aggarwal BB. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.*4: 807-818.

Arredondo-Garza T., Lozano-Cuenca J., Jiménez-Andrade M., Castañeda-Hernández G. (2007) Additive, but not synergistic antinociceptive effect of codeine and indomethacin combinations in the formalin test in the rat. *Proc West Pharmacol Soc.* 50: 78-81.

Atchison CR., West AB., Balakumaran A., Hargus SJ., Pohl LR., Daiker DH., Aronson JF., Hoffmann WE., Shipp BK., Treinen-Moslen M. (2000) Drug enterocyte adducts: possible causal factor for diclofenac enteropathy in rats. *Gastroenterology.* 119: 1537-1547.

Banderali U., Belke D., Singh A., Jayanthan A., Giles WR., Narendran A. (2011). Curcumin blocks Kv11.1 (erg) potassium current and slows proliferation in the infant acute monocytic leukemia cell line THP-1. *Cell. Physiol. Biochem.* 28: 1169–1180.

Bannwarth B. (2005) Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors have a future?. *Drug Saf.* 28: 183-189.

Basbaum AI., Woolf CJ. (1999) Pain. *Curr Biol.* 9: R429-R431.

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

Campbell VC., Welch SP. (2001) The role of minoxidil on endogenous opioid peptides in the spinal cord: a putative co-agonist relationship between K-ATP openers and opioids. *Eur. J. Pharmacol.* 417: 91–98.

Chainani-Wu N. (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). J Altern Complement Med. 9: 161–168.

Chandran B., Goel A. (2012) A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. Phytother Res. 26: 1719-1725.

Chattopadhyay I., Bandyopadhyay U., Biswas K., Maity P., Banerjee RK. (2006) Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. Free Radic Biol Med. 40: 1397-1408.

Cheng AL., Hsu CH., Lin JK., Hsu MM., Ho YF., Shen TS., Ko JY., Lin JT., Lin BR., Ming-Shiang W., Yu HS., Jee SH., Chen GS., Chen TM., Chen CA., Lai MK., Pu YS., Pan MH., Wang YJ., Tsai CC., Hsieh CY. (2001) Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent in patients with high-risk or pre-malignant lesions. Anticancer Res. 21: 2895–2900.

Chin A., Commerford P. (2007) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. S Afr Med J. 97: 500-503.

Choi SW., Kim KS., Shin DH., Yoo HY., Choe H., Ko TH., Youm JB., Kim WK., Zhang YH., Kim SJ. (2013). Class 3 inhibition of hERG K(+) channel by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and curcumin. Pflugers Arch. 465: 1121–1134.

Coruzzi G., Venturi N., Spaggiari S. (2007) Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal anti-inflammatory drugs: selective Cox-2 inhibitors and beyond. Acta Biomed. 78: 96-110.

Cryer B. (2003) The role of cyclooxygenase selective inhibitors in the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep.* 5: 453-458.

Dash J., Parija S. (2013). Spasmolytic effect of curcumin on goat ruminal artery is endothelium independent and by activation of sGC. *Res. Vet. Sci.* 95: 588–593.

Degerman E., Belfrage P., Manganiello VC. (1997) Structure, localization and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272: 6823-6826.

Davies N.W., Standen N.B., Stanfield PR. (1991) ATP-dependent K<sup>+</sup> channels of muscle cells: their properties, regulation, and functions. *J Bioenerg Biomembr.* 23: 509–535.

Dickenson AH. (2002) Gate Control Theory of pain stands the test of time. *Br J Anaesth.* 88: 755-57.

Donnelly MT., Hawkey CJ. (1997) COX-II inhibitors a new generation of safer NSAIDs? *Aliment Pharmacol Ther.* 11: 227-236.

Dubuisson D., Dennis SG. (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.

Edwards G., Weston AH. (1993). The pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33: 597– 637.

Edwards SR., Mather LE., Lin Y., Power I., Cousins MJ. (2000) Glutamate and kynurenate in the rat central nervous system following treatments with tail ischaemia or diclofenac. *J Pharm Pharmacol.* 52: 59-66.

Foryst-Ludwig A., Neumann M., Schneider-Brachert W., Naumann M. (2004) Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in Helicobacter pylori-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 316: 1065-1072.

Fuji Y., Matsura T., Kai M., Kawasaki H., Yamada K. (2000) Protection by polaprezinc, an anti-ulcer drug, against indomethacin-induced apoptosis in rat gastric mucosal cells. *Jpn J Pharmacol.* 84: 63-70.

Gay ML. (2000) Gastropatía por AINES: lesión gástrica, incidencia y mecanismos. [en línea]. IV reunión de la sociedad española del dolor.

Dirección: URL: <http://www.sedolor.es/ponencia.php?id=233> [Consulta: 13 de enero 2008].

Gupta B., Kulshrestha VK., Srivastava RK., Prasad DN. (1980) Mechanism of curcumin induced gastric ulcer in rats. *Indian J Med Res.* 71: 806-814.

Guyton CG., Hall JE. (2001) Tratado de fisiología médica. Décima edición. McGraw-Hill Interamericana. México D.F.

Hawkey CJ. (1999) COX-2 inhibitors. *Lancet* 353: 307-314.

Hoffmann WE., Shipp BK., Treinen-Moslen M. (2000) Drug enterocyte adducts: possible causal factor for diclofenac enteropathy in rats. *Gastroenterology* 119: 1537-1547.

HongDa H., Son YK., Choi IW., Park WS. (2013).The inhibitory effect of curcumin on voltage-dependent K(+) channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430: 307–312.

Ignarro LJ. (1990) Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cGMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signalling. *Pharmacol Toxicol.* 67: 1-7.

Insel PA. (1996) Analgésicos-antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos antigotosos. pp. 661-706. En Hardman JG., Limbird LE. (ed.). *Goodman and Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 9ª. edición. McGraw-Hill interamericana. México, D.F.

Ito S., Okuda-Ashitaka E., Minami T. (2001) Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res.* 41: 299-232.

Jaworski T., Sarosiek I., Sostarich S., Roeser K., Connor M., Brotze S., Wallner G., Sarosiek J. (2005) Restorative impact of rabeprazole on gastric mucus and mucin production impairment during naproxen administration: its potential clinical significance. *Dig Dis Sci.* 50: 357–365.

Jeon Y., Kim CE., Jung D., Kwak K., Park S., Lim D., Kim S., Baek W. (2013) Curcumin could prevent the development of chronic neuropathic pain in rats with peripheral nerve injury. *Curr Ther Res Clin Exp.* 74: 1-4.

Ji FT., Liang JJ., Liu L., Cao MH., Li F. (2013) Curcumin exerts antinociceptive effects by inhibiting the activation of astrocytes in spinal dorsal horn and the intracellular extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in rat model of chronic constriction injury. *Chin Med J (Engl).* 126: 1125-1131.

Julius D., Basbaum AI. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413: 203-210.

Kelly DJ., Ahmad M., Brull SJ. (2001) Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. *Can J Anesth.* 48: 1000-1010.

Kajanne R., Leppä S., Luukkainen P., Ustinov J., Thiel A., Ristimäki A., Miettinen PJ. (2007) Hydrocortisone and indomethacin negatively modulate EGF-R signaling in human fetal intestine. *Pediatr Res.* 62: 570–575

Kim DC., Kim SH., Choi BH., Baek NI., Kim D., Kim MJ., Kim KT. (2005) *Curcuma longa* extract protects against gastric ulcers by blocking H2 histamine receptors. *Biol Pharm Bull.* 28: 2220-2224.

Kitahora T., Guth PH. (1987) Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. *Gastroenterology.* 93: 810–817.

Kohli K., Ali J., Ansari MJ., Raheman Z. (2005) Curcumin: A natural antiinflammatory agent. *Indian J Pharmacol.* 37: 141-147.

Kourie JI., Rive MJ. (1999) Role of natriuretic peptides in ion transport mechanisms. *Med Res Rev.* 19: 75-94.

Laine L., Bombardier C., Hawkey CH., Davis B., Shapiro D., Brett C., Reicin A. (2002) Stratifying the risk of NSAID-related upper gastrointestinal clinical events: results of a double-blind outcomes study in patients with rheumatoid arthritis. *Gastroenterology.* 123: 1006–1012.



Langenbach R., Morham SG., Tiano HF. (1995) Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*. 83: 483-492.

Lawson K. (2000) Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int*. 57: 838-845.

Le Bars D., Gozariu M., Cadden SW. (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 53: 597-652.

Lee JY., Shin TJ., Choi JM., Seo KS., Kim HJ., Yoon TG., Lee YS., Han H., Chung HJ., Oh Y., Jung SJ., Shin KJ. (2013) Antinociceptive curcuminoid, KMS4034, effects on inflammatory and neuropathic pain likely via modulating TRPV1 in mice. *Br J Anaesth*. 111: 667-672.

Lian YT., Yang XF., Wang ZH., Yang Y., Shu YW., Cheng LX., Liu k. (2013) Curcumin serves as a human Kv1.3 blocker to inhibit effector memory T Lymphocyte activities. *Phytother. Res*. 27: 1321–1327.

Liu H., Danthi SJ., Enyeart JJ. (2006) Curcumin potently blocks Kv1.4 potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 344: 1161–1165.

Liu Y., Ren G., O'Rourke B., Marban E., Seharaseyon J. (2001) Pharmacological Comparison of Native Mitochondrial  $K_{ATP}$  Channels with Molecularly Defined Surface  $K_{ATP}$  Channels. *Mol Pharmacol*. 59: 225–230.

Loeser JD., Melzack R. (1999) Pain: an overview. *Lancet*. 352: 1607-1609.

Loeser JD., Treede RD. (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain. 137: 473-477.

Lohmann SM., Vaandrager AB., Smolenski A., Walter U., De Jonge HR. (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. Trends Biochem Sci. 22: 307-312.

Lucas KA., Pitari GM., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Cheperik KP., Waldman SA. (2000) Guanylyl cyclases and signalling by cGMP. Pharmacol Rev 52: 375-414.

Mayer B y Hemmens B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends Biochem Sci 22: 477-81

Melzack R., Wall PD. (1965) Pain mechanisms: a new theory. Science. 150: 971-979.

Menzio A., Pozzoli C., Poli E., Martelli M., Martelli L., Zullian C., Bertini S. (2009) Effects of oral curcumin on indomethacin-induced small intestinal damage in the rat. Drug Discov Ther. 3: 71-76.

Mersereau W., Lehotay DC., Hinchey EJ. (1988) Relative roles of acid and mucosal compression in ulcerogenesis in indomethacin-insulin-treated rat. Dig Dis Sci. 33: 1454-1458.

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.

Millan MJ. (1999) The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol. 57: 1-164.

Miranda HF., Silva E., Pinardi G. (2004) Synergy between the antinociceptive effects of morphine and NSAIDs. *Can J Physiol Pharmacol.* 82: 331-338.

Mittal N., Joshi R., Hota D., Chakrabarti A. (2009) Evaluation of antihyperalgesic effect of curcumin on formalin-induced orofacial pain in rat. *Phytother Res.* 23: 507–512.

Morham SG., Langenbach R., Loftin CD. (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell.* 83: 473-482.

Moncada S., Palmer RM., Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 109-142.

Moro MA., Russel RJ., Celtek S., Lizasoain I., Su Y., Darley-Usmar VM., Radomski MW., Moncada S. (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 1480– 1485.

Nandal S., Dhir A., Kuhad A., Sharma S., Chopra K. (2009) Curcumin potentiates the antiinflammatory activity of cyclooxygenase inhibitors in the cotton pellet granuloma pouch model. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 31: 89-93.

Ocaña M., Cendán CM., Cobos EJ., Entrena JM., Baeyens JM. (2004) Potassium channels and pain: present realities and future oportunitetes. *Eur J Pharmacol.* 500: 203-19.

Ocaña M., Del Pozo E., Barrios M., Baeyens JM. (1990) An ATP-dependent K<sup>+</sup> channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur J Pharmacol.* 186: 377–378.

Ortiz MI., Castañeda-Hernández G. (2008) Examination of the interaction between peripheral lumiracoxib and opioides on the 1% formalin test in rats. *Eur J Pain*. 12: 233-41.

Ortiz MI., Granados-Soto V., Castañeda-Hernández G. (2003) The NO-cGMP-K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav*. 76: 187-97.

Ortiz MI., Torres-López JE., Castañeda-Hernández G., Rosas R., Vidal-Cantú GC., Granados-Soto V. (2002a) Pharmacological evidence for the activation of K (+) channels by diclofenac. *Eur J Pharmacol*. 438: 85-91.

Ortiz MI., Torres-López JE., Castañeda-Hernández G., Rosas R., Vidal-Cantú GC., Granados-Soto V. (2002b). Role of the nitric oxide-cyclic GMP-K<sup>+</sup> channel pathway in the antinociception induced by atrial natriuretic peptide (ANP) and diclofenac. *Proc West Pharmacol Soc*. 45: 174-177.

Pan MH., Huang TM., Lin JK. (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*. 27: 486-94.

Peris-Ribera JE., Torres-Molina F., García-Carbinell MA., Aristorena JC., Pladelfina JM. (1991) Pharmacokinetics and bioavailability of diclofenac in the rat. *J Pharmaco Biopharm*. 6: 647-65.

Piotrowski J., Slomiany A., Slomiany BL. (1999) Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in gastric mucosal injury induced by indomethacin. *Scand J Gastroenterol*. 34: 129-134.

Rafatullah S., Tariq M., Al-Yahya MA., Mossa JS., Ageel AM. (1990) Evaluation of turmeric (*Cúrcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. J Ethnopharmacol. 29: 25-34.

Ramírez-Alcántara V., Castañeda- Hernández G., Rampy BA., Aronson JF., Treinen-Moslen M. (2005) Attenuated gastropathy but not enteropathy of diclofenac-cholestyramine complex in rats. Drug Development Research. 64: 19-27.

Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Moore PK. (2004) Analgésicos. pp. 562-584. En: GEA Consultoría Editorial (ed.) Farmacología. 5a. edición. Elsevier. Madrid, España.

Rasyid A., Lelo A. (1999) The effect of curcumin and placebo on human gall-bladder function: An ultrasound study. Aliment Pharmacol Ther. 13: 245–9.

Rees DD., Palmer RMS., Schulz R., Hodson HF., Moncada S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br J Pharmacol. 101: 746–52.

Reuter BK., Davies NM., Wallace JL. (1997) Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation. Gastroenterology. 112: 109–117.

Rivera-Ordoñez A. (2006). AINES. Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. Rev Mex Anest. 29: 36-40.

Rodrigues AR., Duarte ID. (2000) The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Br J Pharmacol. 129: 110–114.

Sahbaie P., Sun Y., Liang DY., Shi XY., Clark JD. (2014) Curcumin treatment attenuates pain and enhances functional recovery after incision. *Anesth Analg.* 118: 1336-1344.

Sallman RA. (1986) The history of diclofenac. *Am J Med.* 80 (Suppl 4B): 29-32.

Scheiman JM., Yeomans ND., Talley NJ., Vakil N., Chan FKL., Tulassay Z., Rainoldi JL., Szczepanski L., Ung KA., Kleczkowski D., Ahlbom H., Naesdan J., Hawkey CJ. (2006) Prevention of ulcers by esomeprazole in at-risk patients using non-selective NSAIDs and COX-2 inhibitors. *Am J Gastroenterol.* 101: 701–710.

Schoen RT., Vender RJ. (1989) Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med.* 86: 449–458.

Sharma AV., Ganguly K., Paul S., Maulik N., Swarnakar S. (2012) Curcumin heals indomethacin-induced gastric ulceration by stimulation of angiogenesis and restitution of collagen fibers via VEGF and MMP-2 mediated signaling. *Antioxid Redox Signal.* 16: 351-362.

Sharma S., Kulkarni SK., Agrewala JN., Chopra K. (2006) Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 536: 256–261.

Sharma RA., Steward WD., Gesche AJ. (2007) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 595: 453-470.

Shin DH., Seo EY., Pang B., Nam JH., Kim HS., Kim WK., Kim SJ. (2011) Inhibition of Ca (2+) release-activated Ca (2+) channel (CRAC) and K(+) channels by curcumin in Jurkat-Tcells. *J. Pharmacol. Sci.* 115: 144–154.

Shishodia S., Sethi G., Aggarwal BB. (2005) Curcumin: Getting back to the roots. *Ann NY Acad Sci.* 1056: 206-217.

Silverstein FE., Faich G., Goldstein JL., Simon LS., Pincus T., Whelton A., Makuch R., Eisen G., Agrawal NM., Stenson WF., Burr AM., Zhao WW., Kent JD., Lefkowitz JB., Verburg KM., Geis GS. (2000) Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *JAMA.* 284: 1247–1255.

Sivalingam N., Basivireddy J., Balasubramanian KA., Jacob M. (2008) Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch Toxicol.* 82: 471-481.

Soares AC., Duarte ID. (2001) Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2- induced hyperalgesic paw. *Br J Pharmacol.* 134: 127– 131.

Soares AC., Leite R., Tatsuo MA., Duarte ID. (2000) Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol.* 400: 67–71.

Somasundaram S., Hayllar H., Rafi S., Wrigglesworth JM., Macpherson AJ., Bjarnason I. (1995) The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand J Gastroenterol.* 30: 289–299.

Souza MHL P., Lemos HP., Oliviera RB., Cunha FQ. (2004) Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumor necrosis factor receptor 1 (TNRF-1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut*. 53: 791-796.

Srinivas L., Shalini VK., Shylaja M. (1992) Turmerin: a water soluble antioxidant peptide from turmeric (*Curcuma longa*). *Arch Biochem Biophys*. 292: 617-623.

Swarnakar S., Ganguly K., Kundu P., Banerjee A., Maity P., Sharma AV. (2005) Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J Biol Chem*. 280: 9409-9415.

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. *Pak J Biol Sci*. 11: 312-314.

Takeuchi K. (2012) Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World J Gastroenterol*. 18: 2147-2160.

Takeuchi K., Okada M., Ebara S., Osano H. (1990) Increased microvascular permeability and lesion formation during gastric hypermotility caused by indomethacin and 2-deoxy-D-glucose in rat. *J Clin Gastroenterol*. 12 (Suppl. 1): S76-S84.

Tallarida RJ., Raffa RB. (1996) Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: replacing the isobologram. *Life Sci*. 58: 23-28.



Tamblyn R., Berkson L., Dauphinee WD., Gayton D., Grad R., Huang A., Isaac L., McLeod P., Snell L. (1997) Unnecessary prescribing of NSAIDs and the management of NSAID-related gastropathy in medical practice. *Ann Intern Med.* 127: 429-438.

Thong-Ngam D., Choochuai S., Patumraj S., Chayanupatkul M., Klaikeaw N. (2012) Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in rats. *World J Gastroenterol.* 18: 1479-1484.

Tjolsen A., Berge OG., Hunnskaar S., Rosland JH., Hole K. (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51: 5-17.

Tonussi CR., Ferreira SH. (1994) Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol.* 251: 173-179.

Torres-Huerta JC., Tenopala-Villegas S. (2009) Dolor somático pp. 64-68. En: Sara Bistre Cohen (ed.) *Dolor: cuidados paliativos, diagnóstico y tratamientos.* Trillas. México D.F.

Vane JR., Botting RM. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med.* 104: 2-8.

Vanegas H. (2002) Bases for a spinal analgesic action of cyclooxygenase inhibitors. *Proc West Pharmacol Soc.* 45: 225-227.

Wallace JL. (2008) Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself. *Physiol Rev.* 88: 1547-1565.

Wallace JL., Arfors KE., McKnight GW. (1991) A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology.* 100: 878-883.

Wallace JL., McKnight W., Reuter BK., Vergnolle N. (2000) NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*. 119: 706-14.

Warner TD., Giuliano F., Vojnovic I., Bukasa A., Mitchell JA., Vane JR. (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 7563-7568.

Wheeler-Aceto H., Cowan A. (1991) Standardization of the rat paw formalin test for evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*. 104: 35– 44.

Wilcox GL., Seybold VS. (1997) Pharmacology of spinal afferent processing. pp. 557-576. *In: Yaksh TL., Lynch C., Zapol WM., Maze M., Biebuyck JF. (Editor). Anesthesia: Biologic Foundations. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA.*

Willis JV., Kendall MJ., Jack BD. (1980) A study of the effect of aspirin on the pharmacokinetics of oral and intravenous diclofenaco sodium. *Eur J Clin Pharmacol*. 18: 415-18.

Woolf CJ. (2004) Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacology Management. *Ann Intern Med*. 140: 441-51.

Woolf CJ., Bennet GJ., Doherty M., Dubner R., Kidd B., Koltzenburg M., Lipton R., Loeser JD., Payne R., Torebjork E. (1998) Towards a mechanisms-based classification of pain? *Pain*. 77: 227-229.

Wu JY., Lin CY., Lin TW., Ken CF., Wen YD. (2007) Curcumin affects development of zebra fish embryo. *Biol Pharm Bull.* 30: 1336-1339.

Yeon KY., Kim SA., Kim YH., Lee MK., Ahn DK., Kim HJ., Kim JS., Jung SJ., Oh SB. (2010) Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *J Dent Res* 89: 170-174.

Yunjong L., CHang-Hun L., Uhtaek O. (2005) Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells.* 20: 315-324.

Zagota WN., Siegelbaum SA. (1996) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci.* 19: 235-263.

Zhang JM., Strong JA. (2008). Recent evidence for activity- depend initiation of sympathetic sprouting and neuropathic pain. *Shen Lixve Bao.* 60: 617-27.

Zhang X., Chen Q., Wang Y., Peng W., Cai H. (2014) Effects of curcumin on ion channels and transporters. *Front Physiol.* 5: 94.

Zhao X., Xu Y., Zhao Q., Chen CR., Liu AM., Huang ZL. (2012) Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: descending monoamine system and opioide receptors are differentially involved. *Neuropharmacology.* 62: 843-854.

Zhu Q., Sun Y., Yun X., Ou Y., Zhang W ., Li JX. (2014) Antinociceptive effects of curcumin in a rat model of postoperative pain. *Sci Rep.* 4: 4932

Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16: 109–110.

## 12. ANEXOS

## Evidence for the Participation of ATP-sensitive Potassium Channels in the Antinociceptive Effect of Curcumin

Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico, DF, \*Laboratory of Pharmacology, Institutional Program in Molecular Biomedicine, National School of Medicine and Homeopathy, National Polytechnic Institute, Mexico, DF, †Academic Area of Medicine and Health Sciences, Autonomous University of the State of Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, Mexico

Marco Antonio De Paz-Campos, MEd, Aracely Evangelina Chávez-Piña, PhD\*,  
Mario I Ortiz, PhD<sup>†</sup>, and Gilberto Castañeda-Hernández, PhD

### Background:

It has been reported that curcumin, the main active compound of *Curcuma longa*, also known as turmeric, exhibits antinociceptive properties. The aim of this study was to examine the participation of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$  channels) and, in particular, that of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP- $K_{ATP}$  channel pathway, in the antinociceptive effect of curcumin.

### Methods:

Pain was induced by the intraplantar injection of 1% formalin in the right hind paw of Wistar rats. Formalin-induced flinching behavior was interpreted as an expression of nociception. The antinociceptive effect of oral curcumin was explored in the presence and absence of local pretreatment with L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, ODQ, an inhibitor of soluble guanylyl cyclase, and glibenclamide, a blocker of  $K_{ATP}$  channels.

### Results:

Oral curcumin produced a dose-dependent antinociceptive effect in the 1% formalin test. Curcumin-induced antinociception was not altered by local L-NAME or ODQ, but was significantly impaired by glibenclamide.

### Conclusions:

Our results confirm that curcumin is an effective antinociceptive agent. Curcumin-induced antinociception appears to involve the participation of  $K_{ATP}$  channels at the peripheral level, as local injection of glibenclamide prevented its effect. Activation of  $K_{ATP}$  channels, however, does not occur by activation of the L-arginine-nitric oxide-cGMP-  $K_{ATP}$  channel pathway. (Korean J Pain 2012; 25: 221-227)

### Key Words:

antinociception, *Curcuma longa*, curcumin, potassium channels, turmeric.

Received July 19, 2012. Revised August 31, 2012. Accepted September 4, 2012.

Correspondence to: Gilberto Castañeda-Hernández, PhD

Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico, DF, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico

Tel: +52-55-5747-3305, Fax: +52-55-5747-3800 ext. 5415, E-mail: gcastane@cinvestav.mx

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © The Korean Pain Society, 2012

## INTRODUCTION

Curcumin is the main compound obtained from the rhizoma of *Curcuma longa*, also known as turmeric [1]. Curcumin displays a vibrant yellow color and thus is widely used as an additive in Indian food [2]. *Curcuma longa* has been used in Asian traditional medicine in the treatment of a variety of inflammatory disorders [3]. Furthermore, it has also been reported that curcumin exhibits antitumor, antioxidant, and antimicrobial activities [4]. It has been observed that curcumin is well tolerated after long-term use and at high doses [3,5]. However, adequately designed clinical studies specifically addressing curcumin safety are still lacking [6].

There is evidence that curcumin also appears to be an effective analgesic agent [7]. It has recently been reported that curcumin reduces pain and fatigue in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy [8]. Animal studies have confirmed the efficacy of curcumin in pain relief. Systemic administration of curcumin induces significant antinociception in experimental models of neuropathic pain [9,10], acetic acid-induced visceral nociception [11], capsaicin-induced thermal hyperalgesia [12], and the formalin-induced orofacial pain test [13]. Several mechanisms of action have been proposed for the antinociceptive effects of curcumin, including suppression of brain nitrite and TNF $\alpha$  levels [9], activation of the descending monoamine system [10], blockade of TRPV1 activation [12], and desensitization of TRPA1 [14]. These hypotheses notwithstanding, however, the mechanism of antinociceptive action of curcumin has not yet been fully elucidated.

It has been reported that activation of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$  channels) antagonizes nociceptive responses evoked by noxious stimuli, dampening the hyperexcitability of the nociceptors [15]. There is evidence that the opening of  $K_{ATP}$  channels participates in the analgesic effect of the non-steroidal anti-inflammatory drugs ketorolac [16] and diclofenac [17, 18], but not in that of indomethacin [17]. There is also evidence that  $K_{ATP}$  channels play a role in the analgesic effect of a variety of agents such as morphine [19], clonidine [20] and 5-HT1 agonists [21], atrial natriuretic peptide (ANP) [17], and pregabalin [22]. Therefore, it appears that the opening of  $K_{ATP}$  channels is a common mechanism of antinociception.

There are several intracellular pathways that lead to the opening of  $K_{ATP}$  channels and to analgesia. Nitric oxide

donors, such as sodium nitroprusside, activate the soluble form of guanylyl cyclase, resulting in the synthesis of cyclic GMP (cGMP), which in turn results in the opening of  $K_{ATP}$  channels and analgesia [23]. Ketorolac [16] and diclofenac [17] are able to produce antinociception by activation of the L-arginine-nitric oxide-cGMP- $K_{ATP}$  channel pathway. On the other hand, ANP activates the particulate form of guanylyl cyclase [24], resulting in cGMP synthesis, which leads to  $K_{ATP}$  channel opening and antinociception [17]. There is also evidence that compounds that are able to directly open  $K_{ATP}$  channels, such as cromakalim [25] and piroxicam [17], result in pain relief. It is therefore possible that  $K_{ATP}$  channels are involved in the antinociceptive effect of curcumin. Hence, the purpose of this study was to examine whether  $K_{ATP}$  channel opening, and, in particular, the activation of the L-arginine-nitric oxide-cGMP- $K_{ATP}$  channel pathway, is involved in curcumin-induced pain relief.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Animals

Female Wistar rats aged 8–9 weeks (weight range 200–220 g) from our own breeding facilities were used in this study [17,18]. The animals had free access to drinking water and were fasted for 18–20 hours before experiments. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Rats were used one time only. At the end of the experiments, the rats were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber. All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals [26] and the protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico, DF).

### 2. Drugs

Curcumin, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ) and glibenclamide were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Curcumin was suspended in carboxymethylcellulose (0.5% CMC). Glibenclamide and ODQ were dissolved in 20% dimethyl sulfoxide and L-NAME in isotonic saline.

### 3. Measurement of antinociceptive activity

Antinociception was assessed using the formalin test.

Rats were placed in open Plexiglas observation chambers for 30 min. to allow them to accommodate to their surroundings; they were then removed for formalin administration. Fifty microliters of diluted formalin (1%) were injected subcutaneously into the dorsal surface of the right hind paw with a 30-gauge needle. Animals were then returned to the chambers and nociceptive behavior was observed immediately after formalin injection. Mirrors were placed behind each chamber to enable unhindered observation of the formalin-injected paw. Nociceptive behavior was quantified as the numbers of flinches of the injected paw during 1 min. periods every 5 min. for up to 60 min. after injection [25–28]. Flinching was readily identified and characterized as a rapid and brief withdrawal or flexing of the injected paw. Formalin-induced flinching behavior is biphasic [17,27–29]. The initial acute phase (0–10 min.) is followed by a relatively short quiescent period, which is then followed by a prolonged tonic response

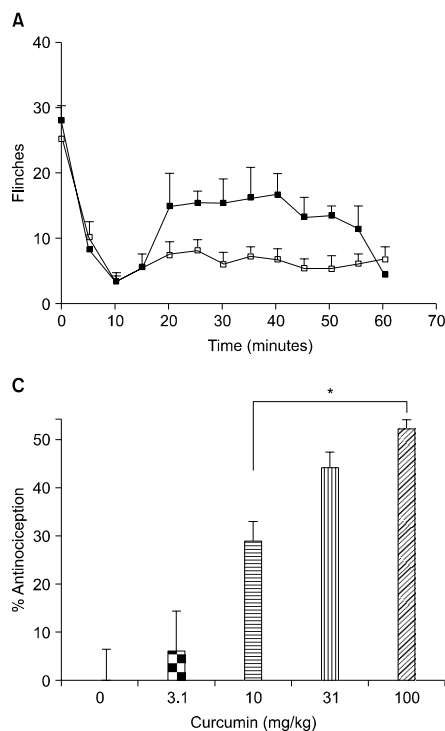
(15–60 min.). At the end of the experiment, the animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber.

#### 4. Study design

Rats received vehicle or increasing oral doses of curcumin (3.1–100 mg/kg) by gavage 60 min. before formalin injection. In order to examine the participation of the NO-cGMP-K<sub>ATP</sub> channel pathway in the antinociceptive effect of oral curcumin, rats were pretreated locally with L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, ODQ, an inhibitor of soluble guanylyl cyclase, or glibenclamide, a blocker of K<sub>ATP</sub> channels [17,28,29]. Blockers dissolved in a volume of 50 µl were injected in the paw that was to be injured 10 min. before the insult, as described previously [17].

#### 5. Data analysis and statistics

All results are presented as mean ± SEM. Curves were made by plotting the number of flinches against time. The



**Fig. 1.** (A) Flinching behavior observed after the intraplantar injection of 1% formalin in the right hind paw of Wistar rats in absence (black symbols) or in presence (open symbols) of 100 mg/kg oral curcumin. (B) Area under the number of flinches-against-time curve of the second phase of the formalin test observed in Wistar rats in presence of increasing doses of oral curcumin. (C) Percent of antinociception observed in the second phase of the formalin test in presence of increasing doses of oral curcumin. Data are presented as mean ± SEM of six animals. \*Denotes a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) with respect to the effect observed in absence of curcumin.



area under the number of flinches against time curves (AUC) was calculated by the trapezoidal rule [17,28–30]. AUC was calculated for the two phases of the assay, and the percent of antinociception for each phase was calculated according to the following equation [30]:

$$\text{Percent of antinociception} = \frac{[AUC_{\text{vehicle}} - AUC_{\text{post compound}}]}{AUC_{\text{vehicle}}} \times 100.$$

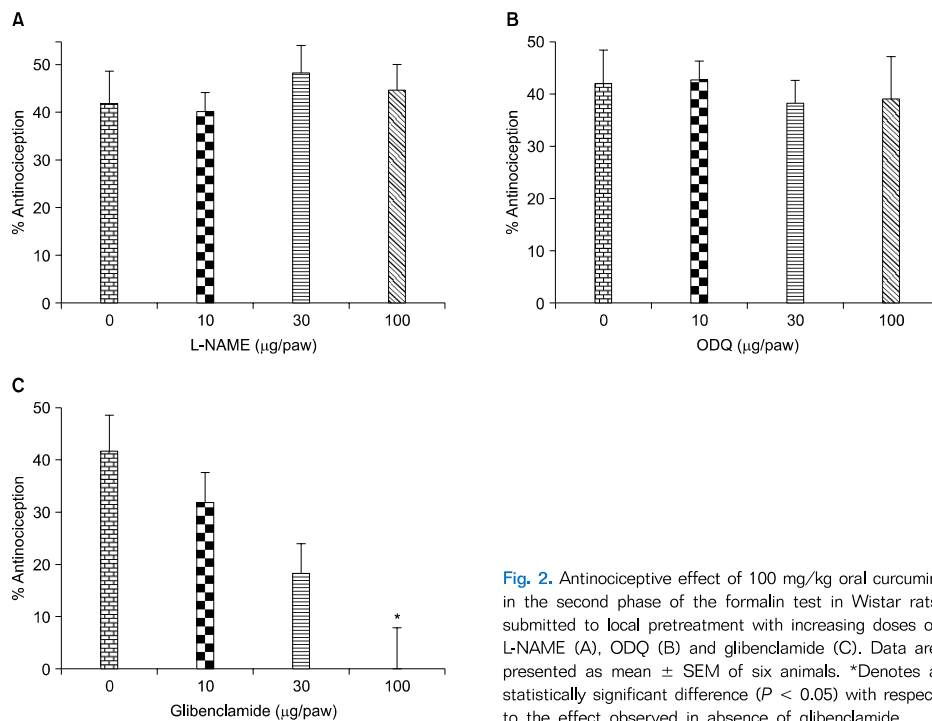
Analysis of variance followed by Tukey's test was used to compare the differences between treatments. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Local injection of 1% formalin produced a typical biphasic flinching behavior. The first phase was characterized by an immediate increase in flinching followed by

a gradual decrease, to reach near-zero values after 10 min. A second flinching phase then occurred, being observed from 15 min. to 60 min. Oral curcumin administration did not have any significant effect on formalin-induced nociception during phase 1, but significantly reduced flinching during phase 2 (Fig. 1A). Therefore, only data from phase 2 were submitted for further analysis. Curcumin produced a dose-dependent reduction in the AUC of phase 2 (Fig. 1B). The effect of curcumin on the second phase of the formalin test can also be expressed as a dose-dependent increase in the percent of antinociception (Fig. 1C).

In an additional experimental series, it was observed that pretreatment with local injection of L-NAME or ODQ did not produce any significant change in oral curcumin-induced antinociception (Figs. 2A and 2B), while pretreatment with glibenclamide resulted in a dose-dependent reduction in the antinociceptive effect of 100 mg/kg oral



**Fig. 2.** Antinociceptive effect of 100 mg/kg oral curcumin in the second phase of the formalin test in Wistar rats submitted to local pretreatment with increasing doses of L-NAME (A), ODQ (B) and glibenclamide (C). Data are presented as mean  $\pm$  SEM of six animals. \*Denotes a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) with respect to the effect observed in absence of glibenclamide.

curcumin (Fig. 2C).

## DISCUSSION

Curcumin, the main active ingredient of turmeric, exhibits several pharmacological actions [1–5]. It has been documented that curcumin exhibits a significant antinociceptive effect in a variety of experimental pain models [9–13]. Moreover, it has recently been reported that curcumin is effective in postsurgical pain [8] and therefore exhibits true potential as an analgesic agent in clinical practice [7]. Several mechanisms have been proposed to explain the antinociceptive effect of curcumin, including suppression of brain nitrite and TNF $\alpha$  levels [9], activation of the descending monoamine system [10], blockade of TRPV1 activation [12], and desensitization of TRPA1 [14]. However, the exact mechanism of action remains controversial [12]. Moreover, it is possible that the overall antinociceptive effect of curcumin involves multiple mechanisms of action, as is the case for several analgesic agents, such as diclofenac [31].

It is now well documented that the opening of  $K_{ATP}$  channels plays a role in the antinociceptive effect of a number of agents, including ketorolac [16], diclofenac [17,18], morphine [19], clonidine [20], 5-HT1 agonists [21], ANP [17], and pregabalin [22]. It is known that activation of  $K_{ATP}$  channels antagonizes nociceptive responses evoked by noxious stimuli, dampening the hyperexcitability of the nociceptors [15]. However,  $K_{ATP}$  channel opening is not a universal mechanism of antinociception. Several agents, such as indomethacin [17], acetaminophen [32], and kappa opioid receptor agonists [33] induce a significant antinociceptive effect which does not involve the participation of  $K_{ATP}$  channels. In this study, we demonstrate that the activation of  $K_{ATP}$  channels is involved in the antinociceptive effect of curcumin.

$K_{ATP}$  channels can be activated by several pathways. Compounds that directly open the channels, such as diazoxide [34], pinacidil [17], and cromakalim [33] produce a significant antinociceptive effect.  $K_{ATP}$  channel opening also occurs as a consequence of activation of Gi/o proteins, as is the case for  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid agonists [33]. Moreover, an increase in intracellular cGMP also results in  $K_{ATP}$  channel opening and analgesia. This is observed after administration of dibutyryl-cGMP [34,35] or by activation of cGMP-generating pathways. ANP, which directly activates

the particulate form of guanylyl cyclase, results in significant antinociception [17]. It is also well documented that activation of the L-arginine-nitric oxide-cGMP- $K_{ATP}$  channel pathway results in antinociception. Administration of nitric oxide donors, such as sodium nitroprusside [23], induces a significant antinociceptive effect.  $K_{ATP}$  channel opening and antinociception is also induced by hydrogen sulfide [36].

Local administration of L-NAME, ODQ, or glibenclamide does not induce any significant alteration in formalin-induced nociception, suggesting that these compounds are devoid of any pro- or antinociceptive effects by themselves, although they can interfere with the antinociceptive action of several drugs [17,18,29]. In the present study, we observed that glibenclamide, but not L-NAME or ODQ, impairs the antinociceptive effect of oral curcumin. These results suggest that activation of  $K_{ATP}$  channels, but not by the L-arginine-nitric oxide-cGMP- $K_{ATP}$  channel pathway, is involved in the antinociceptive effect of curcumin. Hence, curcumin may be directly stimulating  $K_{ATP}$  channels, activating Gi/o proteins, stimulating the particulate form of guanylyl cyclase, or acting through the hydrogen sulfide- $K_{ATP}$  channel pathway. Further research is needed to fully elucidate this issue.

The local injection of glibenclamide in the same site as the formalin insult was able to significantly reduce the antinociceptive effect of oral curcumin. There is evidence that glibenclamide is able to block drug-induced antinociception after local and spinal administration [17,29], but also after systemic administration [18]. Hence, our results provide evidence that curcumin-induced antinociception involves the participation of  $K_{ATP}$  channels at the peripheral level, although additional systemic mechanisms of action may also be involved.

Recently, Han and coworkers reported that intrathecal administration of curcumin produces antinociception in the formalin test [37], demonstrating that this agent is also able to produce antinociception by central mechanisms. There is evidence that curcumin is able to pass through the blood-brain barrier [38]. Therefore, it is likely that the overall antinociceptive effect of curcumin after systemic administration involves both peripheral and central actions, as is the case for non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids [31]. Furthermore, for several agents, such as diclofenac [28] and lumiracoxib [29], we have shown that both the peripheral and central actions include the partic-

ipation of  $K_{ATP}$  channels.

In summary, the present results confirm that curcumin is an effective antinociceptive agent. Our data provide evidence for the participation of peripheral mechanisms, including  $K_{ATP}$  channel opening, in addition to other mechanisms of action. The complete elucidation of the mechanisms of action of the antinociceptive effect of curcumin will certainly bolster its potential as an analgesic agent in clinical practice.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Cinvestav and by the National Polytechnic Institute, grant SIP20121164, Marco Antonio De Paz Campos y a fellow of the National Council for Science and Technology (CONACYT).

#### REFERENCES

- Rivera-Espinoza Y, Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver Int* 2009; 29: 1457–66.
- Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 2011; 16: 4567–98.
- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curcumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 787–809.
- Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 85–94.
- Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 2003; 9: 161–8.
- Burgos-Morón E, Calderón-Montaño JM, Salvador J, Robles A, López-Lázaro M. The dark side of curcumin. *Int J Cancer* 2010; 126: 1771–5.
- Kapoor S. Curcumin and its emerging role in pain modulation and pain management. *Korean J Pain* 2012; 25: 202–3.
- Agarwal KA, Tripathi CD, Agarwal BB, Saluja S. Efficacy of turmeric (curcumin) in pain and postoperative fatigue after laparoscopic cholecystectomy: a double-blind, randomized placebo-controlled study. *Surg Endosc* 2011; 25: 3805–10.
- Sharma S, Kulkarni SK, Agrewala JN, Chopra K. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2006; 536: 256–61.
- Zhao X, Xu Y, Zhao Q, Chen CR, Liu AM, Huang ZL. Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: descending monoamine system and opioid receptors are differentially involved. *Neuropharmacology* 2012; 62: 843–54.
- Tajik H, Tamaddonfard E, Hamzeh-Gooshchi N. The effect of curcumin (active substance of turmeric) on the acetic acid-induced visceral nociception in rats. *Pak J Biol Sci* 2008; 11: 312–4.
- Yeon KY, Kim SA, Kim YH, Lee MK, Ahn DK, Kim HJ, et al. Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *J Dent Res* 2010; 89: 170–4.
- Mittal N, Joshi R, Hota D, Chakrabarti A. Evaluation of antihyperalgesic effect of curcumin on formalin-induced orofacial pain in rat. *Phytother Res* 2009; 23: 507–12.
- Leamy AW, Shukla P, McAlexander MA, Carr MJ, Ghatta S. Curcumin ((E,E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) activates and desensitizes the nociceptor ion channel TRPA1. *Neurosci Lett* 2011; 503: 157–62.
- Du X, Wang C, Zhang H. Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. *Mol Pain* 2011; 7: 35.
- Lázaro-Lbáez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive  $K^{+}$  channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 39–44.
- Ortiz MI, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G. The NO-cGMP- $K^{+}$  channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76: 187–95.
- León-Reyes MR, Castañeda-Hernández G, Ortiz MI. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. *J Pharm Pharm Sci* 2008; 11: 68–76.
- Ocaña M, Del Pozo E, Barrios M, Robles LI, Baeyens JM. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur J Pharmacol* 1990; 186: 377–8.
- Ocaña M, Baeyens JM. Differential effects of  $K^{+}$  channel blockers on antinociception induced by alpha 2-adrenoceptor, GABAB and kappa-opioid receptor agonists. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1049–54.
- Robles LI, Barrios M, Del Pozo E, Dordal A, Baeyens JM. Effects of  $K^{+}$  channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; 295: 181–8.
- Kweon TD, Kim JY, Kwon IW, Choi JB, Lee YW. Participation of  $K(ATP)$  channels in the antinociceptive effect of pregabalin in rat formalin test. *Korean J Pain* 2011; 24: 131–6.
- Soares AC, Leite R, Tatsuo MA, Duarte ID. Activation of ATP-sensitive  $K^{+}$  channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 67–71.
- White RE, Lee AB, Shcherbatko AD, Lincoln TM, Schonbrunn

- A, Armstrong DL, Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation, *Nature* 1993; 361: 263–6.
25. Ocaña M, Barrios M, Baeyens JM, Cromakalim differentially enhances antinociception induced by agonists of alpha(2)-adrenoceptors, gamma-aminobutyric acid(B), mu and kappa opioid receptors, *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 1136–42.
  26. Zimmermann M, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 1983; 16: 109–10.
  27. Jeong HJ, Lee SH, Cho SY, Lee CS, Jeong CW, Yoon MH, et al, Roles of serotonergic and adrenergic receptors in the antinociception of selective cyclooxygenase-2 inhibitor in the rat spinal cord, *Korean J Pain* 2011; 24: 179–84.
  28. Ortiz MI, Lozano-Cuenca J, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G, Additive interaction between peripheral and central mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 91: 32–7.
  29. Lozano-Cuenca J, Castañeda-Hernández G, Granados-Soto V, Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib, *Eur J Pharmacol* 2005; 513: 81–91.
  30. Ortiz MI, Ramírez-Montiel ML, González-García MP, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Carriño-Cortés R, The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats, *Arch Pharm Res* 2010; 33: 1691–7.
  31. Jiménez-Andrade JM, Ortiz MI, Pérez-Urizar J, Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G, Synergistic effects between codeine and diclofenac after local, spinal and systemic administration, *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76: 463–71.
  32. Gil-Flores M, Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Chávez-Piña AE, Acemetacin antinociceptive mechanism is not related to NO or K+ channel pathways, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2010; 32: 101–5.
  33. Ocaña M, Cendán CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM, Potassium channels and pain: present realities and future opportunities, *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 203–19.
  34. Alves DP, Soares AC, Francischi JN, Castro MS, Perez AC, Duarte ID, Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K+ channels, and sodium nitroprusside and dibutyryl-cGMP, *Eur J Pharmacol* 2004; 489: 59–65.
  35. Soares AC, Duarte ID, Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw, *Br J Pharmacol* 2001; 134: 127–31.
  36. Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, et al, Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels, *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 325–35.
  37. Han YK, Lee SH, Jeong HJ, Kim MS, Yoon MH, Kim WM, Analgesic effects of intrathecal curcumin in the rat formalin test, *Korean J Pain* 2012; 25: 1–6.
  38. Tsai YM, Chien CF, Lin LC, Tsai TH, Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration, *Int J Pharm* 2011; 416: 331–8.