

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO,
ANTINEUROPÁTICO Y ANTIINFLAMATORIO DE LA
COMBINACIÓN DE DICLOFENACO-ÁCIDO FÓLICO EN
MODELOS EXPERIMENTALES DE DOLOR EN RATAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

LIC. JUAN JOSE MARISCAL RUIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ DE JESÚS MANRIQUEZ TORRES

TIJUANA, B.C., MÉXICO

DICIEMBRE, 2021

DEDICATORIA

Lleno de alegría dedico este trabajo a mi padre Jose Francisco Mariscal que desde el cielo se que estara feliz de verme culminar este trabajo, se que me guiara siempre en mi camino.

A mi madre Ana Maria Ruiz que ha sabido formarme con sus consejos y valores, a ella que siempre me apoya y ayuda a seguir adelante en momentos dificiles, le estare eternamente agradecido por todo.

A mis hermanos Ana y Jose Mariscal, ellos son mi motivación para nunca rendirme en mis estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ellos, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Medicina y Psicología, unidad otay, campus Tijuana por su apoyo y las facilidades para la realización de la investigación.

A la Dra. Ana Laura Martínez Martínez mi directora de Tesis por su guía continua, por el tiempo y dedicación, en la formación de un nuevo maestro.

A el Dr. José de Jesús Manriquez Torres co-director de tesis por sus consejos y tiempo invertido en mi.

A el Dr. Jose Manuel Cornejo Bravo por sus consejos y paciencia en mis revisiones. A los sinodales por toda su asesoría y sugerencias para la realización de esta tesis.

Al cuerpo docente que integra el programa de Maestria en Ciencias Medicas, de la Facultad de Medicina y Psicología por participar en la formación de los nuevos maestros compartiendo su conocimiento y experiencia.

A mis maestros quienes me dieron las cartas de recomendación para ingresar hace dos años a esta maestria:

Al Dr. Anzony Arturo Cruz Gonzalez, a la Dra. Paris Astrid Mier Maldonado, y al Dr. Edgar Ramiro Mendez Sanchez quienes depositaron su confianza al extenderme dicha recomendación, les estare infinitamente agradecido.

A mis amigos y familiares quienes aportaron apoyo y consejos en momentos difíciles.

Abreviaturas	6
Índice de Tablas	9
Índice de Figuras	10
Resumen	12
Abstract	14
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	16
1.1 Antecedentes	20
1.2 Justificación	28
1.3 Hipótesis	29
1.4 Objetivo general	29
1.5 Objetivos particulares	29
CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL	31
El dolor	32
Nocicepción	34
Nociceptores	36
Clasificación del dolor	39
Tratamiento del dolor	41
Anti-inflamatorios no esteroides (AINEs)	44
Mecanismo de acción de los AINEs	45
Efectos adversos de los AINEs.	47
Diclofenaco	48
Ácido fólico	49
Ácido fólico y dolor	51
CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL	53
Fármacos	54
Animales	54
Diseño experimental	55
Determinación del efecto antinociceptivo	55
Determinación del efecto antineuropático	56
Determinación del efecto anti-inflamatorio	57
Análisis de la interacción diclofenaco-ácido fólico	58
Evaluación del daño gástrico	62

Análisis del mecanismo de acción antinociceptivo de la combinación de diclofenaco-ácido fólico en la prueba de la formalina	62
Análisis estadístico	63
CAPÍTULO IV RESULTADOS	64
Evaluación del efecto antinociceptivo de la administración individual diclofenaco y ácido fólico y en combinación en la prueba de la formalina.	65
Evaluación del efecto antiinflamatorio de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en el edema inducido por carragenina.	71
Evaluación del efecto antineuropático de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico.	72
Evaluación del daño gástrico producido por las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico.	72
Análisis del mecanismo de acción antinociceptivo de la combinación de diclofenaco-ácido fólico en la prueba de la formalina	75
CAPÍTULO V DISCUSIÓN	77
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES	82
Bibliografía	84

Abreviaturas

μl	Microlitros
5-HT	5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
ABC	Área Bajo la Curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fólico
AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
AMPA	Receptor del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARN	Ácido ribonucleico
ASIC	Acid Sensing Ion Channels (Canales Iónicos Sensibles a Ácido)
ATC	Antidepresivos tricíclicos
Cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenasa
CYP450	Citocromo P450
D	Diclofenaco
DE ₃₀	Dosis efectiva treinta
DE ₅₀	Dosis efectiva media
EUA	Estados Unidos de América
EVA	Escala Visual Análoga
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
G	Gramos
GABA	Ácido gamma amino butírico

GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
H	Horas
IASP	International Association for the Study of Pain (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor)
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IRSN	Inhibidores de la recaptura de serotonina-norepinefrina
K _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio
Kg	Kilogramos
K _V	Canales de potasio controlados por voltaje
K _{2P}	Canales de potasio de doble dominio
mGluR	Receptor glutamatérgico
Min	Minutos
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinasas de matriz
Mn	Milnewton
NF- κ B	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NMDA	Receptor de N-metil-D-aspartato
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico

p.o.	Vía oral
PCFT	Transportador de folato acoplado a protones
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
PIB	Producto Interno Bruto
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma
PX2	Receptor purinérgico PX2
RAPG	Receptores Acoplados a Proteínas G
RFC1	Acarreador 1 de folato reducido
s.c.	Vía subcutánea
s.s.	Solución salina
SDRC	Síndrome doloroso regional
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TrkA	Receptor de tropomiosina 2
TRP	Transient receptor potential (Receptores de Potencial Transitorio)
TTX	Tetrodotoxina
TXA2	Tromboxano A2
VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
WRD	Wide Dynamic Range (Amplio Espectro Dinámico)
Zadd	Combinación aditiva simple
Zexp	Efecto experimental

Índice de Tablas

- Tabla 1 Dosis de diclofenaco en combinación con ácido fólico usadas para la construcción del isoblograma.
- Tabla 2 Comparación del daño gástrico producido por la administración de indometacina (20 mg/kg,p.o.) y las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en ratas.

Índice de Figuras

- Figura 1. Nocicepción
- Figura 2. Los diferentes nociceptores detectan diferentes tipos de dolor.
- Figura 3. Clasificación del dolor
- Figura 4. Tratamiento del dolor
- Figura 5. Mecanismo de acción de los AINEs
- Figura 6. Isoblograma
- Figura 7. Efecto de la administración de diclofenaco (10-316.2 mg/kg, p.o.) en la nocicepción inducida por formalina 1% en ratas.
- Figura 8. Efecto de la administración de ácido fólico (3.2-56.2 mg/kg, p.o.) en la nocicepción inducida por formalina 1% en ratas.
- Figura 9. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de diclofenaco y ácido fólico en la prueba de formalina al 1% en ratas.
- Figura 10. Efecto antinociceptivo de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en la prueba de formalina al 1% en ratas, expresado como ABC.
- Figura 11. Isoblograma de la interacción de la combinación de diclofenaco y ácido fólico en el efecto antinociceptivo en la prueba de formalina en ratas.
- Figura 12. Efecto antiinflamatorio de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en la prueba de carragenina al 1% en ratas.

Figura 13. Curso temporal de (A) la alodinia y (B) la hiperalgesia medida como el número de retiros de la extremidad posterior derecha (0-10) después de la inyección de formalina a 5% en ratas.

Figura 14. Efecto de la combinación de diclofenaco 30.87 mg/kg con ácido fólico 11.62 mg/kg, p.o. en presencia de naloxona (1 mg/kg, s.c) en la nocicepción inducida por formalina al 1% en ratas.

Resumen

El dolor es la tercera causa más frecuente de atención médica. Aunque el manejo farmacológico del dolor ofrece un alivio significativo, en el caso de algunas enfermedades crónicas que cursan con dolor inflamatorio y dolor neuropático el tratamiento con este tipo de fármacos no es completamente exitoso y los efectos adversos asociados a éstos, y su elevado costo limitan su uso. Es por estas razones, que es necesario continuar con la búsqueda de alternativas terapéuticas novedosas que no solo resuelvan el problema del dolor, sino que también minimicen la presencia de efectos adversos y su costo. Una opción viable es combinar fármacos empleados para el tratamiento del dolor y la inflamación. La lógica que subyace a esta estrategia se basa en dos consideraciones. En primer lugar, los fármacos individuales no siempre proporcionan un alivio satisfactorio: la combinación de fármacos que actúan por diferentes mecanismos puede aumentar su eficacia. En segundo lugar, los fármacos individuales que proporcionan un alivio satisfactorio pueden causar, al mismo tiempo, efectos adversos. La combinación de fármacos puede permitir la reducción en la cantidad de los componentes individuales para lograr el mismo efecto con una menor incidencia de efectos adversos. Claramente, esto es cierto si la interacción de los fármacos es a favor del efecto deseado, en lugar de la toxicidad. Este estudio se centró en la evaluación del efecto antinociceptivo, antineuropático y antiinflamatorio de la combinación de diclofenaco-ácido fólico en modelos experimentales en ratas. El análisis isobolográfico mostró que la combinación de diclofenaco y ácido fólico produce un efecto antinociceptivo sinérgico en la prueba de la formalina en ratas. La potencia de la combinación fue aproximadamente 4 veces mayor que la esperada de la adición de los efectos individuales de los fármacos. Por otra parte, la administración de la combinación de 30.87 mg/kg de diclofenaco más 11.62 mg/kg de ácido fólico produce un efecto antiinflamatorio significativo en el edema inducido por carragenina y un efecto antialodínico y antihiperálgico en ratas. Este efecto sinérgico podría resultar de utilidad en la clínica debido a que se potencia la eficacia terapéutica sin la exacerbación de los efectos adversos característicos del diclofenaco, ya que la

combinación de ambos fármacos no produce daño a la mucosa gástrica. Adicionalmente, en este estudio se encontró que en el efecto antinociceptivo producido por la combinación de diclofenaco y ácido fólico participan los receptores opioides. En conclusión, la combinación de diclofenaco y ácido fólico podría resultar en una buena estrategia farmacológica para combatir el dolor inflamatorio y el dolor neuropático.

Palabras clave: ácido fólico, diclofenaco, antinociceptivo, antineuropático, anti-inflamatorio

Abstract

Pain is the third most common cause of medical care. Although the pharmacological management of pain offers significant relief, in some chronic diseases that occur with inflammatory pain and neuropathic pain, treatment with this type of drugs is not completely successful and the adverse effects associated with them, and their high cost limit its use. It is for these reasons that it is necessary to continue with the search for novel therapeutic alternatives that not only solve the problem of pain, but also minimize the presence of adverse effects and their cost. A viable option is to combine drugs used to treat pain and inflammation. The logic that underlies this strategy is based on two considerations. First, individual drugs do not always provide satisfactory relief: the combination of drugs that act by different mechanisms can increase their effectiveness. Second, individual drugs that provide satisfactory relief can cause adverse effects at the same time. The combination of drugs may allow the reduction in the amount of individual components to achieve the same effect with a lower incidence of adverse effects. Clearly, this is true if the interaction of drugs is in favor of the desired effect, rather than toxicity. This study aims to assess the antinociceptive, antineuropathic and anti-inflammatory effect of the diclofenac-folic acid combination in experimental models in rats. Isobolographic analysis showed that diclofenac and folic acid combination produces a synergistic antinociceptive effect in the formalin test in rats. Potency of the combination was approximately 4 times greater than expected from the addition of individual drug effects. On the other hand, administration of 30.87 mg/kg of diclofenac plus 11.62 mg/kg of folic acid produces a significant anti-inflammatory effect on carrageenan-induced edema and an anti-allodynic and antihyperalgesic effect in rats. This synergistic effect could be useful clinically because therapeutic efficacy is enhanced without exacerbating the adverse effects of diclofenac, since the combination of both drugs does not damage gastric mucosa. Additionally, in this study it was found that opioid receptors participate in the antinociceptive effect produced by diclofenac and folic acid combination. In conclusion, diclofenac and folic acid combination could result in a good pharmacological strategy to treat inflammatory pain and neuropathic pain.

Key words: folic acid, diclofenac, antinociceptive, antineurophatic, anti-inflammatory

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

El dolor es una percepción sensorial y emocional desagradable (Merskey, 2012) que suele ser, pero no siempre, el resultado de una patología tisular subyacente. A menudo es el síntoma inicial que lleva al paciente al consultorio médico, representando un desafío tanto a nivel diagnóstico como a nivel terapéutico para el proveedor de atención primaria. La percepción del dolor no es simplemente el resultado de una estimulación sensorial anormal que causa una sensación desagradable, sino más bien una combinación del reconocimiento del malestar somático en asociación con una respuesta emocional a esa incomodidad. La percepción del dolor, el grado de angustia y la discapacidad puede variar según la experiencia previa, los antecedentes culturales, los factores situacionales y la comorbilidad de enfermedad psiquiátrica. Si bien el dolor agudo suele ser el resultado de un daño tisular, no siempre es así, como lo demuestran los trastornos de cefalea primarios. Por otra parte, el dolor crónico puede ser el resultado de una lesión, una enfermedad subyacente irreversible o condiciones clínicas como la fibromialgia (Wang y Mullally, 2020).

El dolor se considera la tercera causa más frecuente de atención médica y constituye un problema clínico, social y económico en todas las edades, con estimaciones de la prevalencia mensual que varían desde el 1,0% hasta más del 60,0%. Además, el dolor parece tener un gran impacto negativo en la calidad de vida en comparación con otros problemas de salud, y es el que más contribuyen a la discapacidad en todo el mundo. El impacto económico del dolor es enorme, con

un costo total estimado en hasta el 3.0% del Producto Interno Bruto (PIB). (Henschke y col., 2015).

El manejo farmacológico del dolor (uso de fármacos analgésicos, anti-inflamatorios y coadyuvantes) ofrece un alivio significativo, en el caso de algunas enfermedades crónicas que cursan con dolor inflamatorio (artritis reumatoide) y dolor neuropático (polineuropatía diabética, neuralgia post-herpética o radiculopatía lumbar); sin embargo, el tratamiento con este tipo de fármacos no es completamente exitoso y los efectos adversos asociados a éstos, y su elevado costo limitan su uso (Vardeh y col., 2016). Es por estas razones, que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que no solo resuelvan el problema del dolor y la discapacidad, sino que también minimicen la presencia de efectos adversos y su costo.

Aunque el dolor es descrito comúnmente por los pacientes en términos de su grado (es decir, leve, moderado, severo), la comprensión del dolor ha evolucionado y actualmente considera los procesos fisiológicos subyacentes, o en algunos casos los procesos fisiopatológicos (Marchand, 2008; Vardeh y col., 2016). Ahora se reconoce que diferentes tipos de dolor involucran múltiples mediadores y, además, pueden progresar en el tiempo ("cronificación") y pueden cambiar ("plasticidad") de una forma (por ejemplo, dolor nociceptivo agudo) a otra (por ejemplo, crónico neuropático) (May, 2008).

Actualmente, se sabe que el dolor es de naturaleza "multimodal", y parece lógico pensar que un analgésico que se limita a un único mecanismo de acción

analgésica ("monomodal") estaría intrínsecamente limitado en su capacidad para aliviar la mayoría de los tipos de dolor. Por el contrario, una combinación de múltiples mecanismos en un mismo fármaco o en una combinación de fármacos parecería inherentemente más efectivo. Los efectos analgésicos de las combinaciones de fármacos con acción similar e independiente pueden ser subaditivos, aditivos o supraaditivos (sinérgico), dependiendo de la proporción de la combinación. No todas las combinaciones resultan superiores respecto al efecto individual y no todas las proporciones de combinaciones beneficiosas son igualmente buenas. Cada combinación y cada proporción necesita ser evaluada tanto en su eficacia como en los efectos secundarios (Raffa y col., 2012).

Con base en la información presentada, existe una necesidad de continuar con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático. Una estrategia ampliamente utilizada para el tratamiento del dolor es el uso de combinaciones. Es por ello que en el presente proyecto de investigación se evalúo el efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio de la combinación de diclofenaco y ácido fólico en ratas, para establecer al menos una posible combinación de los fármacos de estudio que pueda ser de utilidad clínica en el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático.

1.1 Antecedentes

A nivel mundial, se estima que 1 de cada 5 adultos sufre de dolor y que 1 de cada 10 adultos es diagnosticado con dolor crónico cada año (). El dolor afecta a toda la población sin importar la edad, sexo, ingresos, raza/etnia o geografía. Las personas que padecen dolor pueden experimentar dolor agudo, crónico o intermitente, o la combinación de los tres. Las principales causas de dolor son cáncer, osteoartritis y artritis reumatoide, operaciones y lesiones, y problemas de columna, lo que hace que la etiología del dolor sea un asunto complejo y transdisciplinario. El dolor tiene múltiples secuelas graves que incluyen, depresión, incapacidad para trabajar, relaciones sociales interrumpidas y pensamientos suicidas (). Además, el dolor constituye un fuerte cargo económico para las familias.

El dolor es una experiencia multimodal compleja que implica múltiples sitios neuronales, incluidos los nervios periféricos, la médula espinal y centros cerebrales superiores. Las propiedades receptivas específicas de los nociceptores mielinizados (fibra A- δ) y amielínicos (fibra C) están determinadas por canales iónicos unidos a la membrana, que son controladas por temperatura, estímulos químicos o fuerzas mecánicas, y tras su activación transducen el estímulo externo en un cambio en el potencial de membrana por la apertura de canales de sodio/calcio o el cierre de canales de potasio (Costigan y col. 2009). Algunos ejemplos de receptores transductores son los receptores TRPV1 para calor, canales

iónicos sensibles a ácido (ASIC) para protones libres y el canal iónico mecanosensible Piezo2 para las sensaciones mecánicas (Gangadharan y Kuner, 2013). La modificabilidad del contacto sináptico entre los nociceptores y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, así como la modulación de las señales nociceptivas en el SNC mediada por las células inmunitarias, las interneuronas locales, las vías descendentes del cerebro y tronco encefálico y componentes cognitivos/afectivos, determinan el complejo y dinámico fenotipo de dolor individual (Kuner, 2010).

Existen numerosos criterios de clasificación del dolor, con base en sus características neurofisiológicas el dolor puede clasificarse en: a) dolor nociceptivo el cual es producido bajo condiciones fisiológicas sólo por estímulos nocivos que activan nociceptores periféricos de alto; b) dolor inflamatorio el cual se produce cuando ocurre daño tisular (por ejemplo; trauma, cirugía, o enfermedades inflamatorias) lo que resulta en una compleja serie de eventos bioquímicos y celulares que conduce a la producción y liberación de numerosos mediadores químicos que provocan un aumento de la permeabilidad capilar, facilitan la salida de células desde los vasos sanguíneos y activan varios sistemas de proteínas pro-inflamatorias y c) dolor neuropático que se origina por una actividad neuronal anormal debido a una lesión del sistema nervioso central (SNC) o periférico (Woolf, 2004).

El dolor inflamatorio es el resultado de la activación y sensibilización de los nociceptores por mediadores inflamatorios. El daño tisular produce la liberación

local del contenido intracelular de las células lesionadas y de moléculas de señalización de las células inmunes, como prostaglandinas, factores de crecimiento (p. ej., factor de crecimiento nervioso [NGF]) y citocinas (IL-6, IL-1 β , TNF- α) (Gold y Gebhart, 2010). A pesar de que algunas de estas moléculas activan directamente las terminales de los nociceptores a través de la activación de receptores transductores (p. ej., el ATP que actúa sobre receptores P2X3), los mediadores inflamatorios también conducen a cambios postraduccionales y transcripcionales en los receptores transductores (p. ej., el NGF produce una disminución en el umbral y un aumento en la expresión del canal TRPV1) (Costigan y col., 2009; Gangadharan y Kuner, 2013). Cuando los canales iónicos transductores se activan por un estímulo adecuado, los canales de sodio dependientes de voltaje expresados en los nociceptores, como Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, son responsables para amplificar la corriente inicial del transductor y desencadenar un potencial de acción y, por lo tanto, juegan un papel clave en la determinación de la excitabilidad y la señalización de las neuronas sensoriales. Los mediadores inflamatorios pueden cambiar en tráfico, la expresión de la superficie celular y las propiedades de activación de estos canales, lo que resulta en una mayor excitabilidad (Chahine y O'Leary, 2014).

La inflamación periférica induce no solo cambios en el nociceptor sino también en el SNC. Por ejemplo, hay un marcado aumento de COX-2 en las neuronas de la médula espinal después de inflamación periférica en respuesta a citocinas que actúan sistémicamente como IL1- β y esto parece clave para el desarrollo de hiperalgesia mecánica en el área anatómica inflamada, mientras que la expresión local de COX-2 en el sitio inflamado lleva a la hipersensibilidad

térmica.¹⁴⁸ Los inhibidores de la COX-2 que penetran la barrera hematoencefálica (p. ej., celecoxib) (Dembo y col., 2005) podrían por tanto ser más eficaz en condiciones de dolor inflamatorio con una marcada hipersensibilidad mecánica.

Por otra parte, el dolor neuropático se define como "el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial" (Jensen y col., 2011). Puede ser causado por lesión en el nervio, la médula espinal o el cerebro (incluido el accidente cerebrovascular) o puede estar asociado con diabetes, virus de inmunodeficiencia humana/SIDA y neuropatías posherpéticas, o con esclerosis múltiple (Treede et al., 2008) o cáncer, y/o los efectos tóxicos de los agentes quimioterapéuticos (Xiao et al., 2007; Schmidt et al., 2010). Las diversas manifestaciones del dolor neuropático son notoriamente resistentes a las acciones de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y opioides (Yekkirala y col., 2017). Un metaanálisis reciente de datos de ensayos clínicos (Finnerup y col., 2015) sustenta el uso de antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptura de serotonina-noradrenalina como duloxetina y gabapentinoides, pregabalina (PGB) y gabapentina (GBP) como tratamientos de primera línea. El tramadol y los opioides de liberación controlada se recomiendan como tratamientos de segunda línea; los cannabinoides como tratamientos de tercera línea y la metadona, lamotrigina, lacosamida, tapentadol y toxina botulínica como tratamientos de cuarta línea (Moulin y col., 2014). Otros fármacos de uso clínico actual incluyen a la carbamazepina, el parche de lidocaína, el parche de capsaicina y ziconotida.

El dolor neuropático es una respuesta desadaptativa del daño al sistema nervioso. Los signos y síntomas incluyen alodinia (dolor en respuesta a un estímulo inocuo), hiperalgesia (aumento de la respuesta al dolor ante un estímulo nocivo), dolor espontáneo (dolor tipo descarga eléctrica o dolor punzante) y, ocasionalmente, causalgia o dolor ardiente incesante (Costigan y col., 2009b). Algunos pacientes experimentan anestesia dolorosa o pérdida de sensación, pero persistencia del dolor en el lugar de la lesión (Wall y col., 1979). El dolor neuropático se caracteriza por cambios en la señalización sensorial normal a nivel de la periferia, médula espinal y cerebro (tálamo y corteza) que ocurren en el transcurso de semanas o meses. Esto conduce a alteraciones en la expresión genómica y diferencias en estructuras corticales (Costigan et al., 2009b).

El dolor crónico y agudo tienen un impacto socioeconómico importante. Para ayudar a los médicos a elegir el fármaco apropiado, especialmente para el dolor causado por cáncer, la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló en 1986 una "escalera" analgésica de tres pasos para el alivio del dolor causado por cáncer en adultos. Posteriormente el uso de la escalera analgésica se ha extendido para el tratamiento del dolor agudo y el dolor crónico no relacionado con el cáncer. En el paso I se consideran los AINEs con o sin adyuvantes, en el paso II se sugiere el uso de opioides débiles para el dolor leve-moderado, con o sin AINEs y adyuvante, mientras que el paso III se reserva para los opioides fuertes para el dolor moderado-severo con o sin no opioides o adyuvantes. En las últimas dos décadas, un mejor conocimiento de la fisiopatología ha mejorado el manejo del dolor, cambiando nuestra visión de la escalera del dolor, en la que los medicamentos se seleccionan

no solo en función de la intensidad del dolor, sino principalmente de acuerdo con los mecanismos subyacentes al tipo dolor, que incluyen sensibilización periférica y espinal que es el principal desencadenante del dolor crónico. El mejor abordaje farmacológico se ha convertido en multimodal, en el que deben combinarse fármacos pertenecientes a diferentes escalones, haciendo coincidir los mecanismos de acción con el tipo de dolor. Un corolario importante de combinar medicamentos analgésicos con diferentes mecanismos de acción es que la combinación adecuada logra el mismo efecto con dosis más bajas o mejores resultados y menos efectos adversos (Fornasari y col., 2017).

En relación al uso clínico de combinaciones de fármacos para el tratamiento del dolor postoperatorio agudo, dolor musculoesquelético crónico, dolor neuropático y dolor oncológico, diversos ensayos clínicos aleatorizados y controlados, así como revisiones sistemáticas han evidenciado un efecto analgésico superior con el uso de combinaciones de fármacos en comparación con el uso individual de fármacos (Curatolo y Svetlicic, 2002).

En el caso del dolor postoperatorio la combinación de opioides con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para producir analgesia sistémica ha mostrado una reducción en las puntuaciones del dolor o en la disminución de los efectos secundarios. Por ejemplo, el efecto analgésico producido por la administración de tramadol y paracetamol fue superior al producido por cualquiera de los fármacos individuales (Edwards y col., 2002). También, la combinación de paracetamol con AINEs produce un efecto analgésico mayor al efecto producido por la administración

individual de paracetamol (Rømsing y col., 2002). Por otro lado, para el tratamiento del dolor neuropático un meta-análisis mostró que la combinación de gabapentina con opioides produce una eficacia significativamente superior en comparación con la administración individual de gabapentina (Chaparro y col., 2012). En cuanto al dolor musculoesquelético la combinación de ibuprofeno con el relajante muscular ciclobenzaprina mejora la rigidez matutina en pacientes con fibromialgia (Fossaluzza y De Vita, 1992), de igual forma la combinación de ibuprofeno con alprazolam produjo un mayor efecto en comparación con la administración de los fármacos individuales (Russell y col., 1991). Para el tratamiento del dolor oncológico, la adición de ibuprofeno a la combinación de oxicodona/paracetamol (Stambaugh y Drew , 1988) o metadona (Ferrer-Brechner y Ganz, 1984) reduce significativamente la puntuación del dolor sin aumento en los efectos secundarios. En adición a la combinación de diferentes tipos de fármacos analgésicos, la combinación de vitaminas con fármacos analgésicos también ha mostrado mejorar los efectos analgésicos. Recientemente, una revisión sistemática y metanálisis, mostraron que la combinación de diclofenaco y vitaminas B (tiamina, piridoxina y cianocobalamina) tienen un efecto analgésico superior para el tratamiento del dolor lumbar (Calderon-Ospina y col., 2020). También, se reportado el efecto analgésico producido por la combinación de pregabalina y metilcobalamina en pacientes con el síndrome de dolor crónico postoracotomía mostro ser más efectiva que diclofenaco (Metin y col., 2016)

A nivel preclínico, diferentes investigaciones han mostrado los efectos benéficos de diferentes combinaciones de fármacos analgésicos en varios modelos

de dolor en roedores. Por ejemplo, la combinación de metamizol con morfina mostro un mejor efecto analgésico en un modelo de dolor artrítico tipo gota, PIFIR (por sus siglas en inglés, pain-induced functional impairment in the rat) en comparación con la administración individual de los fármacos, además se redujo la tolerancia al efecto analgésico cuando los fármacos fueron administrados de forma crónica (Carrillo-Calzadilla y col., 2017). Por otra parte, la combinación de tramadol con gabapentina produjo un efecto analgésico en un modelo de dolor por cáncer en ratas (Corona-Ramos y col., 2017). Asimismo, la administración de la combinación de morfina y gabapentina (De la O-Arciniega y col., 2009) o la administración de amitriptilina y paracetamol (Garrido-Suárez y col., 2021) en un modelo de dolor neuropático inducido por la constricción crónica del nervio ciático en ratas, CCI (por sus siglas en inglés, chronic constriction injury) produjo un efecto antineuropático sinérgico. Otro estudio reciente mostro un efecto antinociceptivo sinérgico y una menor incidencia de daño gástrico cuando se administró la combinación dexketoprofenotapentadol en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético en ratones (Franco de la Torre y col., 2021). Respecto a la combinación de vitaminas con fármacos analgésicos, la administración de gabapentina o carbamazepina con cianocobalamina en ratas con dolor neuropático produjo un efecto antialodínico sinérgico (Mixcoatl-Zecuatl y col., 2008). Además, la administración de vitaminas B aumenta el efecto antinociceptivo de ketorolaco (Medina-Santillán y col., 2004) y diclofenaco (Rocha-González y col., 2004) en la prueba de la formalina en ratas. Igualmente, la combinación de aspirina y gamma-tocoferol produce un efecto antiinflamatorio superior al producido por la administración individual de aspirina y alfa-

tocoferol, así como la atenuación de los efectos adversos inducidos por la aspirina (Jiang y col., 2009).

1.2 Justificación

Con base en los antecedentes presentados existe una necesidad de continuar con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático. Una estrategia ampliamente utilizada para el tratamiento del dolor es el uso de combinaciones. La lógica que subyace a la práctica de combinar los fármacos empleados para el tratamiento del dolor y la inflamación se basa principalmente en dos consideraciones. En primer lugar, los fármacos individuales no siempre proporcionan un alivio satisfactorio: la combinación de fármacos que actúan a diferentes mecanismos puede aumentar su eficacia. En segundo lugar, los fármacos individuales que proporcionan un alivio satisfactorio pueden causar, al mismo tiempo, efectos secundarios inaceptables. Por lo tanto, las combinaciones de fármacos pueden permitir la reducción en la cantidad de los componentes individuales para lograr el mismo efecto con una menor incidencia de efectos secundarios. Claramente, esto en cierto sí la interacción de los fármacos es a favor del efecto deseado, en lugar de la toxicidad. Es por ello que en el presente proyecto de investigación se evaluó el efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio de la combinación de diclofenaco y ácido fólico en ratas, para establecer al menos una posible combinación de los fármacos de estudio que pueda ser de utilidad clínica en el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático.

1.3 Hipótesis

El diclofenaco en combinación con ácido fólico tiene efecto antinociceptivo, antineuropático y anti-inflamatorio en modelos experimentales de dolor en ratas.

1.4 Objetivo general

- Evaluar el efecto antinociceptivo, antineuropático y anti-inflamatorio de la combinación de diclofenaco y ácido fólico en modelos experimentales de dolor en ratas, para establecer una combinación óptima que pueda ser de utilidad clínica en el tratamiento del dolor.

1.5 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto antinociceptivo de diclofenaco y ácido fólico administrados de manera individual y en combinación utilizando la prueba de la formalina en ratas.
- Determinar el efecto antineuropático en la alodinia e hiperalgesia mecánica inducida por formalina en ratas.

- Evaluar el efecto anti-inflamatorio de diclofenaco y ácido fólico administrados de manera individual y en combinación utilizando el modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas.
- Cuantificar el área de daño gástrico como posible efecto adverso producido por la administración individual de diclofenaco y ácido fólico o en combinación.
- Analizar el posible mecanismo de acción antinociceptivo de la combinación de diclofenaco-ácido fólico en la prueba de la formalina.

CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL

El dolor

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial. No solamente se involucra el proceso fisiológico de estimulación de *nociceptores*, sino que abarca también un componente afectivo importante. Esto es lo que hace al dolor un fenómeno tan complejo, personal e intransferible. El dolor es parte de nuestras vidas desde el momento mismo que nacemos, incluso antes, (Merskey, 2012)

De esta definición se desprenden varios conceptos importantes. El primero, que el dolor es una experiencia subjetiva y por tanto diferente para cada individuo; el segundo es la existencia o no de una lesión tisular real, es decir no es necesaria la presencia de una lesión morfológica que justifique la presencia de dolor en un paciente; La experiencia del dolor se ha dividido en dos componentes (Melzack y Katz, 2006):

1. Un componente localizante y discriminativo, que informa al paciente sobre la naturaleza, intensidad, duración y localización del dolor, que proporciona claves para el diagnóstico del estado patológico que lo causa y;
2. Un componente afectivo y de alerta, que demanda la atención del individuo provocando una sensación desagradable que motiva al aprendizaje de la percepción dolorosa, con el fin de suprimir las conductas que lo causaron (Melzack

y Katz, 2006): Este componente es responsable de la respuesta conductual al dolor (Casey, 2000) y está asociado con los reflejos motores de evitación (Woolf, 2004).

El componente afectivo y de alerta se considera subjetivo ya que se ha observado experimentalmente que la gente reporta dolor en ausencia de daño a tejidos u otra causa patológica (Forth y col. 1995).

La capacidad para experimentar dolor tiene un papel protector, ya que el detectar estímulos dolorosos es esencial para la supervivencia y bienestar de los organismos (Basbaum y col., 2009). El dolor puede ser una sensación adaptativa, un sistema de alarma temprano que se dispara en situaciones de peligro para proteger al cuerpo de daño tisular. Debido a la generación de hipersensibilidad ante un estímulo normalmente inocuo (alodinia) o ante un estímulo nocivo (hiperalgesia), el dolor también puede ser una extensión del proceso curativo que ayuda a la reparación del tejido después de sufrir daño tisular. Por ejemplo, una quemadura produce sensibilización temporal del área dañada, consecuentemente estímulos normalmente inofensivos como el tacto ligero, se perciben como dolorosos, esto genera una conducta protectora contra este tipo de estímulos promoviendo el resguardo del área dañada hasta que se resuelva la lesión (Basbaum y col., 2009). Cuando la hipersensibilidad generada por una lesión tisular no se resuelve, el dolor también puede ser mal adaptado, reflejando una función patológica del sistema nervioso, en este caso el dolor sobrepasa su función y se transforma en una enfermedad (Scholz y Woolf, 2002; Woolf, 2004).

Nocicepción

Hay una diferencia entre los términos nocicepción y dolor. La palabra nocicepción deriva de la raíz latina *nocere* que significa daño o lesión. La nocicepción es el proceso por el cual estímulos térmicos, mecánicos o químicos intensos son detectados por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, llamadas nociceptores (Basbaum y Jessell,

2000). En tanto que el término dolor involucra la percepción de un estímulo aversivo, lo

cual requiere de la capacidad de abstracción y la elaboración de impulsos sensoriales (Millan, 1999).

La nocicepción involucra la activación de los nociceptores y comprende los procesos de

transducción, conducción, transmisión y percepción (Woolf, 2004) (Fig. 1):

1. La transducción es la conversión de los estímulos nocivos térmicos, químicos y mecánicos en actividad eléctrica por las terminales de las fibras aferentes periféricas (nociceptores). Los estímulos nocivos son transformados en actividad eléctrica por los receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés transient receptor potential) y los canales purinérgicos, esta actividad eléctrica es amplificada por canales de sodio que inducen potenciales de acción (Kuner, 2010).

2. La conducción es el paso de los potenciales de acción desde la terminal periférica a lo largo de los axones hasta la terminal central de los nociceptores en el sistema nervioso central (SNC). Las fibras aferentes nociceptivas llevan esta información periférica a través de sinapsis glutamatérgicas hasta neuronas de segundo orden principalmente en las láminas superficiales I y II del asta dorsal de la médula espinal (Kuner, 2010).

3. La transmisión es la transferencia sináptica de la información sensorial desde las fibras primarias a través del asta dorsal de la médula espinal, hasta estructuras cerebrales. En el asta dorsal de la médula espinal ocurre la integración y el procesamiento de la información sensorial entrante, mientras que la información sensorial saliente de las redes espinales es enviada a través de diferentes vías a sitios de proyección en el cerebro. Por ejemplo, el tracto espinotálmico lateral proyecta información sensorial multimodal de neuronas de amplio espectro dinámico (WRD, del inglés wide dynamic range) hacia el tálamo lateral y ha sido involucrado en el procesamiento del aspecto sensorial y discriminativo del dolor. En contraste, el tracto medial espinotálmico y el tracto espinoparabraquial proyectan al tálamo medial y estructuras límbicas, las cuales se cree median el componente emocional y aversivo del dolor (Kuner, 2010).

4. La percepción se refiere al proceso por el cual los procesos anteriores interaccionan con la psique del individuo, para crear la experiencia emocional y; como tal subjetiva que se percibe como dolor (Rang y col., 1994; Woolf, 2004).

La experiencia dolorosa es percibida en la corteza, en consecuencia la información es enviada a la médula espinal para producir que un reflejo produzca el retiro del estímulo nocivo (Kuner, 2010).

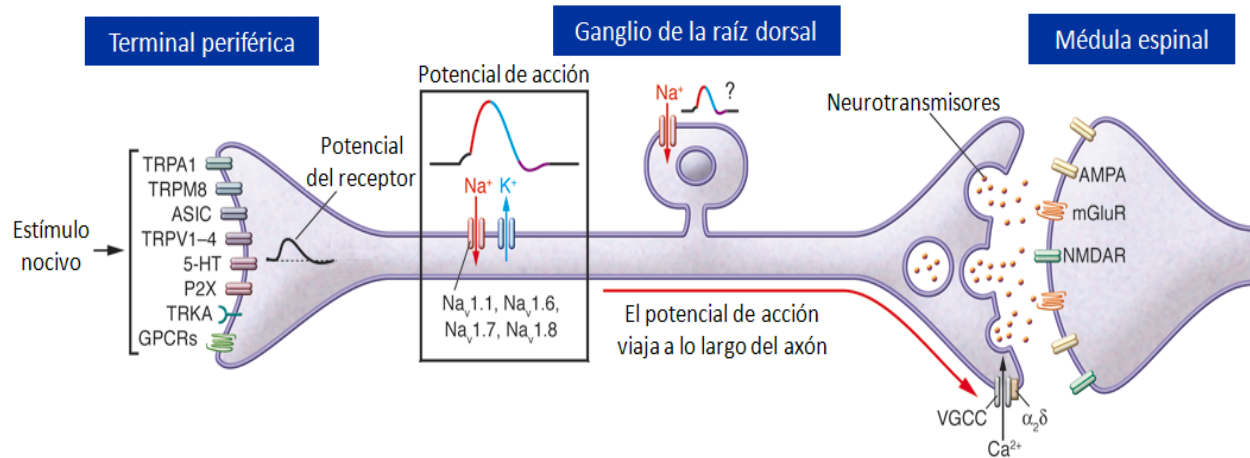


Figura 1. Nocicepción. Los cuerpos celulares de los nociceptores se encuentran dentro del ganglio de la raíz dorsal y terminan como terminales libres en los tejidos periféricos. Las terminales periféricas responden a estímulos nocivos o cuando se produce daño al tejido, a través de receptores y canales iónicos incluyendo canales TRP, canales iónicos sensibles a ácido (ASIC), receptores de serotonina (5-HT), receptores de ATP (P2X), receptores con actividad de tirosina-cinasa A (TrkA) y numerosos receptores acoplados a proteínas G que indirectamente activan canales iónicos. Los receptores en las terminales periféricas responden a estímulos nocivos térmicos, mecánicos y químicos. Cuando el umbral de despolarización es alcanzado, los canales de sodio dependientes de voltaje son activados y se genera un potencial de acción. El potencial de acción es propagado a lo largo del axón hacia las terminales presinápticas de la sinapsis con neuronas de segundo orden en el asta dorsal. El influxo de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) induce la liberación de neurotransmisores como glutamato de la terminal presináptica. El glutamato activa a los receptores ionotrópicos AMPA, NMDA y a los receptores metabotrópicos (mGluR) de glutamato en las terminales postsinápticas en la médula espinal, así la información sensorial es transmitida a través de vías ascendentes a centros superiores en el cerebro (Modificado de Raouf y col., 2010).

Nociceptores

Los nociceptores son una clase especializada de fibras aferentes primarias que responden a estímulos nocivos intensos. Los nociceptores se encuentran

extensamente distribuidos en la piel, mucosas, membranas, facias profundas, tejido conectivo de órganos viscerales, ligamentos y cápsulas articulares, periostio, músculos, tendones y vasos arteriales (Basbaum y Jessell, 2000).

Al igual que todas las neuronas sensoriales primarias del sistema somatosensorial, los cuerpos celulares de los nociceptores que inervan el cuerpo están localizados en el ganglio de la raíz dorsal, mientras que los cuerpos celulares de los nociceptores que inervan la cara se encuentran en el ganglio trigeminal, de los cuerpos celulares se origina un axón que se bifurca en ramas periféricas que inervan el órgano blanco y en ramas centrales que inervan la médula espinal para hacer sinapsis en neuronas nociceptivas de segundo orden (Woolf y Ma, 2007).

Los nociceptores son activados sólo cuando la intensidad del estímulo alcanza un rango nocivo, sugiriendo que ellos poseen propiedades biofísicas y moleculares que los hacen capaces de detectar y responder selectivamente a estímulos potencialmente dañinos. Los nociceptores tienen esta capacidad de distinguir, ya que poseen un alto umbral de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo detectado (Bessou y Perl, 1969).

Existen dos clases principales de nociceptores (Meyer y col., 2008). La primera incluye a las fibras aferentes mielinizadas de diámetro mediano (fibras A δ), las cuales median el “primer dolor” o dolor rápido, el cual se caracteriza por ser un dolor agudo y bien localizado. Estas fibras difieren considerablemente de las fibras de

diámetro grande y conducción rápida (fibras A β), las cuales responden a estímulos mecánicos inocuos (ej. tacto ligero). La segunda clase de nociceptores incluye a fibras no mielinizadas de diámetro pequeño (fibras C), las cuales transmiten el “segundo dolor” o dolor lento, el cual se caracteriza por ser pobremente localizado (Fig. 2).

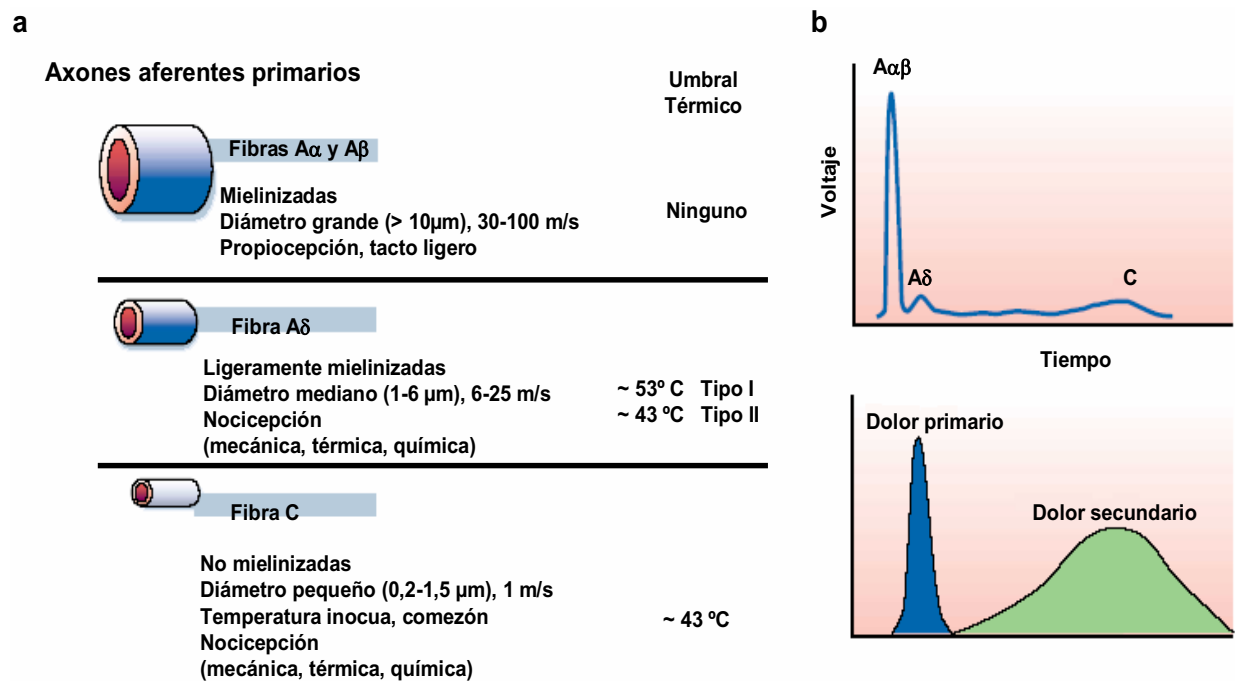


Figura 2. Los diferentes nociceptores detectan diferentes tipos de dolor. **a.** Los nervios periféricos incluyen las fibras mielinizadas de diámetro pequeño (A δ) y las fibras de diámetro mediano a grande (A α , β), así como también a las fibras no mielinizadas de diámetro pequeño (C) **b.** La velocidad de conducción está directamente relacionada con el diámetro de las fibras como se ha mostrado en los registros de potenciales de acción de los nervios periféricos. Las fibras A δ y C contribuyen al dolor primario y secundario, respectivamente en respuesta a una lesión. Modificado de (Julius y Basbaum, 2001).

Clasificación del dolor

Existen numerosos criterios de clasificación, acuerdo a sus características neurofisiológicas el dolor puede clasificarse en (Fig. 3):

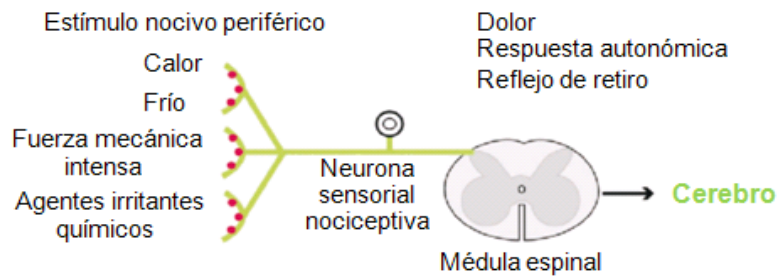
a) Dolor nociceptivo: Es producido bajo condiciones fisiológicas sólo por estímulos nocivos que activan nociceptores periféricos de alto umbral que traducen esta señal en impulsos electroquímicos que se transmiten al SNC. Se caracteriza por ser un dolor transitorio en respuesta a un estímulo nocivo, por lo tanto, es una sensación fisiológica vital ya que es un sistema de alarma temprano que anuncia la presencia de un estímulo potencialmente dañino y cumple con una función protectora porque evita la generación de daño físico en los tejidos (Woolf, 2004). Este tipo de dolor se puede subclasificar en dolor somático: originado en la piel y en el aparato locomotor, se caracteriza por estar bien localizado y en dolor visceral: originado en las vísceras, se caracteriza por estar mal localizado y referido a zonas cutáneas a veces alejadas de la lesión.

b) Dolor inflamatorio: Si ocurre daño tisular a pesar del papel defensivo del sistema nociceptivo (por ejemplo; trauma, cirugía, o enfermedades inflamatorias) el papel protector del dolor contra estímulos nocivos cambia para promover la curación del tejido dañado. Este dolor es usado para cumplir este objetivo. El dolor inflamatorio es el resultado de una compleja serie de eventos bioquímicos y celulares, que son activados en respuesta a daño tisular o a la presencia de sustancias extrañas. Se presenta una respuesta vascular que ocurre alrededor de los tejidos que han sido

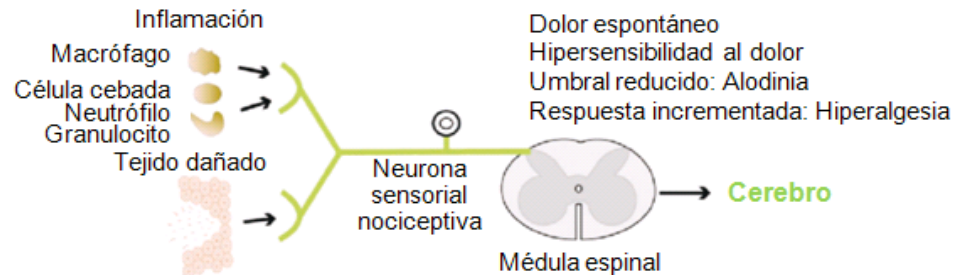
dañados y consiste en la producción de numerosos mediadores químicos que provocan un aumento de la permeabilidad capilar, facilitan la salida de células desde los vasos sanguíneos y activan varios sistemas de proteínas pro-inflamatorias. (Levine, 1994).

c) Dolor neuropático: se origina por una actividad neuronal anormal por lesión del sistema nervioso central o periférico; Es prolongado, severo, quemante, constante con paroxismos. Existen tres subgrupos de dolor neuropático: 1) el generado por lesiones del sistema nervioso periférico como la polineuropatía diabética, neuralgia postherpética, las radiculopatías cervical o lumbar, las lesiones de los nervios espinales y las plexopatías braquial o lumbosacra, 2) el generado por lesiones del SNC ya sea a nivel de la médula espinal o a un nivel superior, con en el caso de la esclerosis múltiple o accidente cerebrovascular y 3) el síndrome doloroso regional complejo (SDRC), denominado previamente distrofia simpática refleja o causalgia; En este tipo de dolor el sistema nociceptivo se comporta de forma anormal, existiendo una falta total de relación causal entre lesión tisular y el dolor. Entre sus principales características se encuentran la presencia de dolor espontáneo, hiperalgesia y alodinia (Woolf, 2004).

a) Dolor nociceptivo



b) Dolor inflamatorio



c) Dolor neuropático

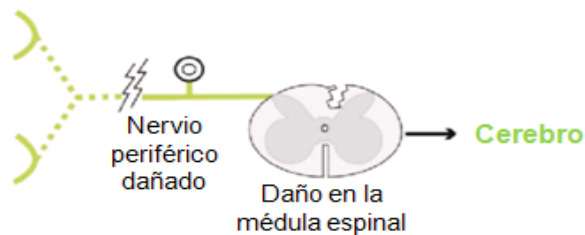


Figura 3. Clasificación del dolor. Modificado de Woolf, 2004.

Tratamiento del dolor

Existen diferentes terapias para aliviar el dolor entre ellos se encuentran, el tratamiento quirúrgico, la estimulación eléctrica y el tratamiento farmacológico;

El tratamiento farmacológico es la estrategia terapéutica más utilizada para el tratamiento del dolor, e involucra el uso de fármacos que tienen la capacidad de aliviar el dolor sin alterar otro tipo de sensaciones, estos fármacos se denominan

analgésicos. El tipo de analgésico empleado dependerá del origen, intensidad y evolución del dolor. Esta terapia se basa en el uso de analgésicos y adyuvantes según la escalera analgésica de tres pasos desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La escalera analgésica fue propuesta en 1986, para proporcionar un alivio adecuado del dolor a los pacientes con cáncer. Esta escalera analgésica, ha sufrido varias modificaciones a lo largo de los años y actualmente se aplica para el manejo del dolor oncológico, pero también de condiciones dolorosas agudas y crónicas no oncológicas debidas a un espectro más amplio de enfermedades como los trastornos degenerativos, enfermedades musculoesqueléticas, dolor neuropático y otros tipos de dolor crónico. Con dicha escalera se puede obtener un buen control del dolor en cerca del 80% de los casos. Existen ciertos criterios para el uso de la escalera analgésica: 1. La cuantificación de la intensidad del dolor es esencial en el manejo y seguimiento del dolor. Para ello, generalmente se utilizan escalas unidimensionales como la escala verbal numérica o la escala visual análoga (EVA). 2. La subida de escalón depende de la falla en la eficacia terapéutica de los fármacos utilizados en el escalón anterior.

La escalera original constaba principalmente de tres escalones:

- Primer escalón: Dolor leve: analgésicos no opioides como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) o acetaminofén con o sin adyuvantes.
- Segundo escalón: Dolor moderado: opioides débiles (hidrocodona, codeína, tramadol) con o sin analgésicos no opioides y con o sin adyuvantes

- Tercer escalón: Dolor intenso y persistente: opioides potentes (morfina, metadona, fentanilo, oxicodona, buprenorfina, tapentadol, hidromorfona, oximorfona) con o sin analgésicos no opioides y con o sin adyuvantes.

El término adyuvante se refiere a un amplio conjunto de fármacos de diferentes clases. Aunque su administración es típicamente para indicaciones distintas al tratamiento del dolor, estos medicamentos pueden ser de especial ayuda en diversas condiciones dolorosas. Los adyuvantes, también llamados co-analgésicos, incluyen antidepresivos tricíclicos (ATC) como amitriptilina y nortriptilina, inhibidores de la recaptura de serotonina-norepinefrina (IRSN) como duloxetina y venlafaxina, anticonvulsivos como gabapentina, anestésicos tópicos y pregabalina, terapias tópicas (p. ej., capsaicina), corticosteroides, bifosfonatos y cannabinoides (Anekar y Casella; 2021). Los co-analgésicos aumentan la eficacia analgésica, se utilizan en el manejo de los síntomas que exacerban el dolor y para tipos específicos de dolor como el neuropático. Se indican en cualquier escalón si el tipo de dolor lo precisa.

Los enfermos con dolor leve deben ser tratados con fármacos como el paracetamol, ácido acetilsalicílico u otros AINEs (primer escalón). Estos fármacos presentan techo terapéutico, una vez alcanzada la dosis máxima recomendada, el incremento de la dosis no produce mayor analgesia. El dolor moderado se debe tratar con opioides débiles (segundo escalón) como la codeína, éstos se utilizan conjuntamente con analgésicos no opioides, ya que pueden producir efectos aditivos o sinérgicos. Los pacientes con dolor severo deben ser tratados con opioides potentes como la morfina, fentanilo y la oxicodona de liberación retardada

(tercer escalón). Los agonistas puros (morfina, metadona y fentanilo) no presentan techo analgésico a diferencia de los agonistas parciales (buprenorfina).

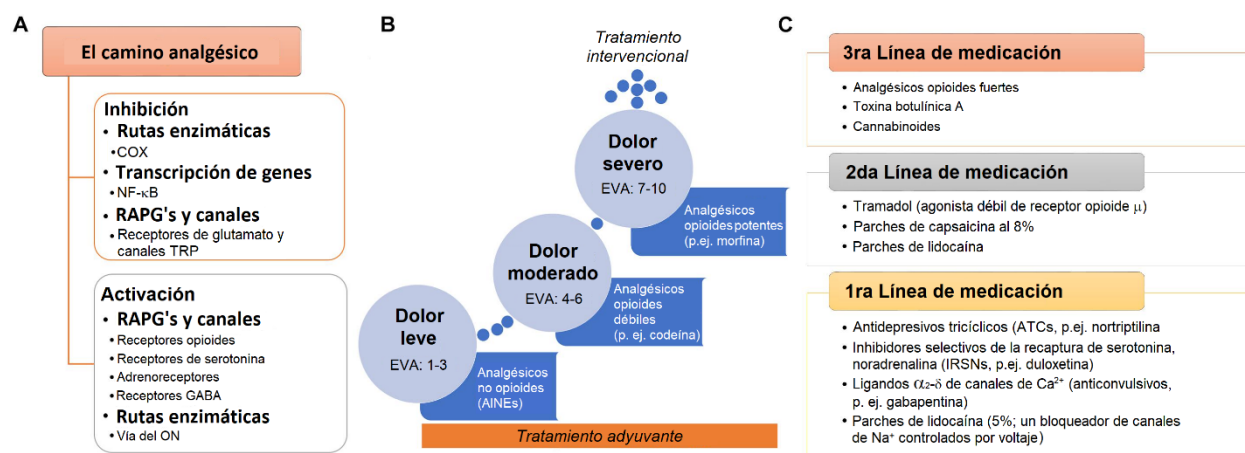


Figura 4. Tratamiento del dolor. (A) Principales vías por las que los analgésicos inducen el alivio del dolor a nivel periférico, espinal y supraespinal. (B) Escalera analgésica propuesta por la OMS. (C) Tratamiento del dolor neuropático. Modificado de Guerrero-Alba et al., 2019.

Anti-inflamatorios no esteroides (AINEs)

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son los fármacos más prescritos y más utilizados en el manejo del dolor, especialmente en el dolor asociado a condiciones inflamatorias. (Burian,2005) También son efectivos en el tratamiento del dolor leve-moderado de origen somático y en enfermedades como la artritis reumatoide. (Hardman et al, 2001)

Este tipo de fármacos incluye a diversos compuestos que casi nunca presentan una relación química, pero comparten algunas propiedades terapéuticas como la actividad antipirética, analgésica y anti-inflamatoria y un perfil cualitativamente

similar de efectos adversos. El fármaco prototipo es el ácido acetilsalicílico (aspirina), que no ha demostrado tolerancia y tiene un efecto analgésico, por lo que, aunque se incremente la dosis por encima de la dosis efectiva 50 (DE_{50}), no se obtiene mayor analgesia y sí se potencian sus efectos tóxicos.

Los AINEs son en su mayoría ácidos orgánicos que se absorben rápida y completamente desde el tracto gastrointestinal, la presencia de comida tiende a retrasar su absorción. La mayoría de los AINEs se unen a proteínas plasmáticas (95-99%), principalmente a la albúmina; son biotransformados por metabolismo hepático mediante enzimas de la súper familia del citocromo P450 (CYP450), específicamente las isoformas CYP3A o CYP2C y son eliminados principalmente por el riñón, aunque también se excretan por la bilis (Furst, 2001).

Mecanismo de acción de los AINEs

Los principales efectos terapéuticos de los AINEs se deben a su capacidad para inhibir de manera no selectiva a la enzima ciclooxigenasa (COX); existen al menos dos isoenzimas de la COX: la COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células y es la principal fuente (pero no exclusiva) de PGs (prostaglandinas) para las funciones fisiológicas, tales como la citoprotección gástrica y renal, y hemostasis (Fig.5). Por el contrario, la COX-2 es inducida por estímulos inflamatorios, tales como citocinas, tensión de cizallamiento y promotores

de tumores, y es la fuente más importante para la síntesis de PGs que contribuyen al dolor y la inflamación (Grosser, et al, 2011).

La inhibición de la COX-2 media en gran parte, las acciones terapéuticas de los AINEs, mientras que la inhibición simultánea de la COX-1 explica en gran medida, pero no exclusivamente, los efectos adversos no deseados en el tracto gastrointestinal que complican la terapia crónica con AINEs (Grosser, et al, 2011).

Los AINEs también poseen mecanismos de acción independientes de la inhibición de ambas isoformas de COX, tales como la interferencia con factores de transcripción (Tegeder et al., 2001), modulación de varios canales iónicos (Lee, et al, 2003), activación de la vía L-arginina-óxido nítrico (ON)-guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Déciga y Lopez, 2004), activación de la transmisión serotoninérgica (Pini, et al , 1996), activación de la transmisión adrenérgica (miranda, et al, 2001), activación de la transmisión opioidérgica (Tortorici, 1994) y disminución de citocinas (Berg, et al, 1999), entre otros mecanismos. Es importante destacar que no todos los AINES actúan a través de todos los mecanismos mencionados anteriormente; Con el fin de tener AINEs con un menor potencial ulcerogénico se diseñaron fármacos con mayor selectividad por COX-2 y prácticamente sin efectos sobre COX-1, tales como rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etoricoxib y lumiracoxib conocidos como coxibs. En general estos fármacos poseen efectos anti-inflamatorios similares a los de los AINEs típicos, pero con menor irritación de la mucosa gástrica (Burke, et al, 2005).

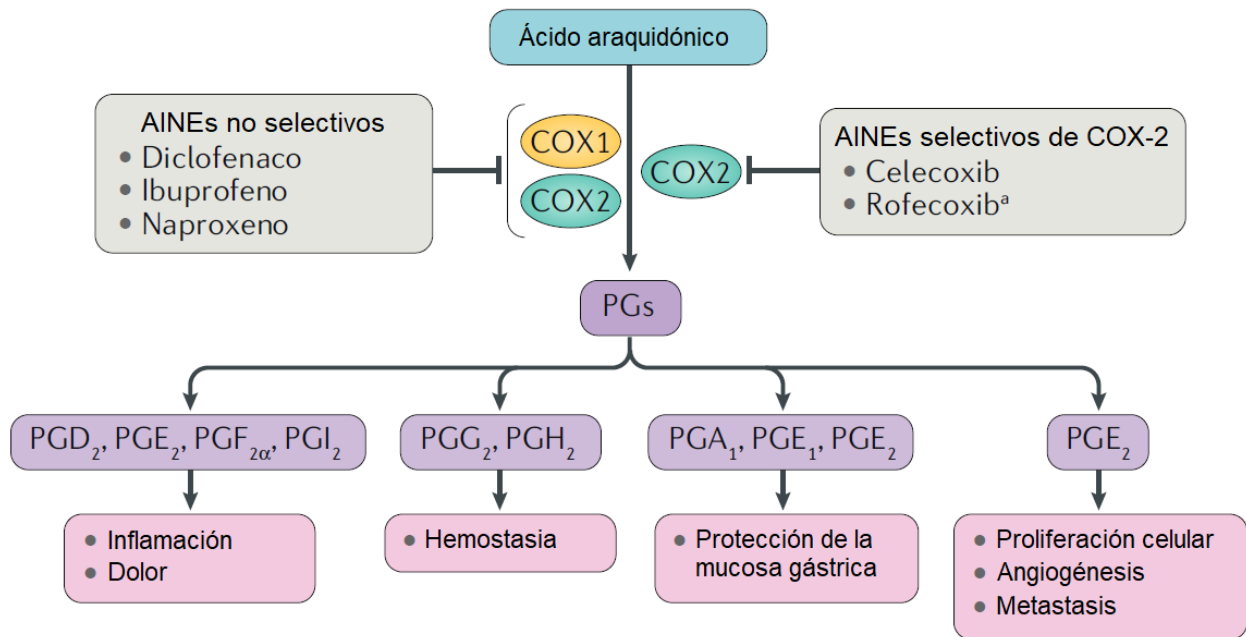


Figura 5. Mecanismo de acción de los AINEs. Los AINEs inhiben las isoenzimas COX1 and COX2 con grados variables de especificidad por la isoforma COX2. Como resultado, la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas (PGs) es inhibida. Los principales efectos de las prostaglandinas en el cuerpo son enlistados. ^aRetirado del mercado. Modificada de Schjerning et al, 2020).

Efectos adversos de los AINEs.

Los AINEs presentan varios efectos adversos, el más frecuente es la inducción de úlceras gástricas o intestinales, que a veces se acompañan de anemia por la pérdida hemática resultante y de síntomas como anorexia, náuseas, dispepsia, dolor abdominal y diarrea (Burke, et al, 2005). Otros efectos adversos incluyen el bloqueo de la agregación plaquetaria, la prolongación de la gestación o del trabajo de parto espontáneo, cambios en la función renal (de importancia en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva o nefropatías crónicas) y reacciones de hipersensibilidad (Grosser,2011).

Aunque los inhibidores selectivos de la COX-2 no afectan el tiempo de sangrado, la inhibición selectiva de la COX-2 induce un desbalance entre la producción del antitrombótico prostaciclina (PGI₂) y el protrombótico tromboxano A₂ (TXA₂), lo que desencadena problemas cardiovasculares de tipo trombótico (Lizarraga, et al, 2002).

Diclofenaco

Diclofenaco es el AINE más recetado en todo el mundo (McGettigan, 2013). Más de 10 millones de prescripciones de productos farmacéuticos de diclofenaco se dispensaron en EUA en el 2012 (FDA, 2014). El diclofenaco es un derivado del ácido fenilacético con propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas. A diferencia de la acción de muchos AINEs tradicionales, el diclofenaco inhibe la COX-2 con mayor potencia que a la COX-1. El grado de selectividad de diclofenaco por la COX-2 es comparable al de celecoxib (Grosser, et al, 2006). Los efectos adversos gastrointestinales, cardiovasculares y renales producidos por diclofenaco son dependientes de la dosis (Altman, et al, 2015).

Después de su administración oral, el diclofenaco se absorbe de forma rápida y proporcional a la dosis. La velocidad de absorción del diclofenaco puede variar dependiendo de la sal, composición farmacéutica y el momento de la administración en relación con la ingesta de alimentos. Aproximadamente el 60% del diclofenaco

intacto alcanza la circulación sistémica debido al efecto de primer paso. El principal metabolito, 4'-hidroxiclofenaco, mantiene una escasa actividad anti-inflamatoria y analgésica (Fowler, 1983). Siguiendo su biotransformación a glucoroconjugados y metabolitos de sulfatación, el diclofenaco es excretado en la orina (Davies, 1997). Diferentes estudios han indicado que además de la inhibición de COX, diclofenaco produce su efecto analgésico a través de otros mecanismos de acción tales como la activación de la transmisión adrenérgica (Pinardi, 2002), activación de la transmisión colinérgica (Pinardi, 2003) activación de la transmisión opioidérgica (Björkman, et al, 1990), la activación de la vía óxido nítrico-GMPc. Además, se ha demostrado que diclofenaco inhibe las corrientes rápidas de Na⁺ sensibles a tetrodotoxina (TTX) y las corrientes lentas de Na⁺ resistentes a TTX en neuronas del ganglio de la raíz dorsal en ratas (Lee, 2003). Por otra parte, diclofenaco previene la expresión de canales iónicos sensibles a ácido (ASIC, del inglés, Acid Sensing Ion Channel) inducida por inflamación en las neuronas sensoriales y también inhibe directamente las corrientes generadas por los canales ASIC (Voilley, et al, 2001).

Ácido fólico

El ácido fólico/folato (pteroil-L-ácido glutámico o pteroil-L-glutamato) es una vitamina soluble en agua que pertenece a la familia de vitaminas B. En animales, el folato no puede ser sintetizado *de novo* y es obtenido de la dieta en forma de dihidrofolato, tetrahydrofolato o 5-metiltetrahydrofolato, los cuales están naturalmente presentes

en una variedad de alimentos (vegetales verdes frescos, leguminosas, frutas cítricas e hígado) o como ácido fólico o folínico sintético adicionado a alimentos fortificados (Lewis, et al, 1999). El folato es necesario para proporcionar un grupo carbono para las reacciones de metilación y la síntesis de las bases nitrogenadas de los nucleótidos, y por lo tanto indispensable para la replicación y reparación del ADN, así como para la síntesis de ARN (Figueiredo, et al, 2009).

El folato también está involucrado en la metilación de las histonas y ADN, la producción de metionina y las reacciones de remetilación de homocisteína (Stover, 2009). Así, los folatos son especialmente importantes durante la embriogénesis, la cual se caracteriza por una rápida división celular. Además, el folato es necesario para el metabolismo de los aminoácidos y la biosíntesis de neurotransmisores y fosfolípidos (Desai, et al, 2016).

La captación celular de folatos involucra a tres sistemas de transporte: el transportador de folato acoplado a protones (PCFT), el acarreador 1 de folato reducido (RFC1) y los receptores de folato o también llamados proteínas de unión a folato (FOLRs) (Zhao, 2007).

Desde hace más de 50 años se ha reconocido el papel crucial del ácido fólico en el desarrollo del sistema nervioso, por lo que su eficacia y seguridad en este contexto ya ha sido explorada. Numerosos estudios clínicos y preclínicos han establecido una correlación entre bajos niveles de folato y un incremento en el riesgo de defectos en el tubo neural (anencefalia, espina bífida) (Wallingford, et al, 2013), desórdenes cardiovasculares (Wang, et al, 2007), disfunción cognitiva (demencia) (Mitchell, 2014), depresión (Bottiglieri, et al, 2000), mielopatía (Okada, et al, 2014),

neuropatía periférica (Botez, et al, 1978) y ciertos tipos de cáncer (Johansson, et al, 2008).

Otros estudios, también han encontrado que el folato está involucrado en la señalización aguda en las neuronas. El folato induce actividad epileptiforme cuando es aplicado en rebanadas de cerebro de ratón y ratas (Hill, et al, 1974), y aumenta la excitabilidad neuronal en la corteza cerebral del gato (Davies, 1973).

La administración aguda de folato en rebanadas de hipocampo de rata inhibe la transmisión GABAérgica, aumenta la excitación a través del bloqueo de la respuesta postsináptica a GABA, así como también por la inhibición presináptica de los receptores GABA en el núcleo cuneado en la rata (Hill, et al, 1974). También se ha asociado la deficiencia de folato y el exceso de homocisteína con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson en adultos (Miranda, et al, 2017).

Ácido fólico y dolor

Se ha descrito que la deficiencia de ácido fólico se asocia con el desarrollo de neuropatía periférica. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son endopeptidasas dependientes de zinc, ampliamente conocidas por desempeñar un papel en la degradación de la matriz extracelular, respuesta inmune, inflamación, señalización celular, migración celular, remodelación y reparación de tejidos (Esposito, et al,

2008). Se ha demostrado que la inducción de las MMP2 y MMP9 después de la lesión en la médula espinal limita el funcionamiento y la recuperación (Buss, et al, 2007).

También se ha reportado la generación de inflamación y dolor neuropático después de la producción de daño a nervios periféricos (Kawasaki, et al, 2008). Por otra parte, varios estudios han demostrado una relación entre la metilación del ADN y la expresión de MMP y la presencia de dolor neuropático después de daño en el SNC (Schomberg, et al, 2015). Además, se ha demostrado que la inhibición de la MMP2 y MMP9 disminuye significativamente el dolor neuropático después de la ligadura de nervios espinales (Kawasaki, et al, 2008).

En un modelo de lesión por contusión de médula espinal, se encontró una sobrerregulación de la MMP2. Conjuntamente, se demostró que la MMP2 interfiere con la recuperación funcional y que contribuye al desarrollo de dolor neuropático (Miranpuri, et al, 2016). Por otra parte, el tratamiento con folato redujo la expresión de MMP2 a través de la metilación de su promotor, disminuyendo el dolor neuropático e incrementando la recuperación funcional después de contusión de la médula espinal (Mirampuri, et al, 2017).

CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL

Fármacos

La formalina y la carragenina fueron diluidas en solución salina isotónica (s.s., 0.9%). El diclofenaco y el ácido fólico se resuspendieron en el vehículo (tween 80 al 0.2% en s.s.). Todos los fármacos fueron preparados antes de cada experimento y se obtuvieron de Sigma-Aldrich, México. Los fármacos se administraron por vía oral (p.o.) en un volumen de 0.2 ml/100 g de peso corporal de las ratas por medio de una cánula gástrica rígida para animales de laboratorio.

Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal de 180-200 g. Los animales de experimentación fueron mantenidos a una temperatura de $25^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h con libre acceso al alimento y agua (*ad libitum*). Todos los protocolos experimentales se realizaron siguiendo las recomendaciones de la Guía de los Estándares Éticos de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983) y la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se hicieron todos los esfuerzos por minimizar el número de animales usados, así como su sufrimiento. Cada animal fue usado una sola vez y al finalizar el experimento fueron sacrificados en una cámara de CO₂. Para cada procedimiento experimental los grupos experimentales consistieron de al menos seis ratas.

Diseño experimental

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, antineuropática y anti-inflamatoria las ratas fueron administradas con el vehículo o con dosis crecientes de diclofenaco (10, 31.6, 100, 177.8 y 316.2 mg/kg, p.o.) o ácido fólico (1, 3.2, 5.6, 10 y 31.6 mg/kg) 30 min antes de la administración de formalina o carragenina, respectivamente.

Determinación del efecto antinociceptivo

El efecto antinociceptivo se determinó mediante la prueba de la formalina. La prueba de la formalina es un modelo experimental ampliamente aceptado como un modelo químico para inducir dolor inflamatorio. La inyección de formalina diluida en la extremidad posterior de las ratas produce una respuesta nociceptiva bifásica dosis-dependiente que consta de un componente inmediato (primera fase) y un componente tónico (segunda fase) (Dubuisson y Dennis, 1977; Hunskaar et al, 1985; Sugimoto et al, 1986; Murray et al, 1988; Ohkubo et al, 1990). El comportamiento evocado en la prueba de la formalina es útil porque puede proporcionar una idea del procesamiento de la información sensorial a nivel periférico y a nivel de la médula espinal. La conducta generada en la primera fase representa la activación de todo tipo de fibras aferentes primarias en el sitio de la inyección (Puig y Sorkin, 1996). Mientras que la actividad conductual en la segunda fase requiere de la participación de la periferia (Taylor et al., 1997) y es acompañada

por la liberación de mediadores inflamatorios en la médula espinal (Malmberg y Yaksh 1992; Svensson y Yaksh 2002).

Antes del experimento, las ratas fueron ambientadas en cilindros individuales de Plexiglass (25 x 40 cm) durante 30 minutos. Para inducir la nocicepción, los animales se inyectaron subcutáneamente con 50 μ l de formalina al 1 % en la superficie dorsal de la extremidad posterior derecha. El comportamiento nociceptivo fue observado inmediatamente después de la administración de formalina. Se colocó un espejo detrás del cilindro para facilitar la observación. La conducta nociceptiva fue cuantificada como el número de sacudidas de la extremidad inyectada durante periodos de 1 min cada 5 min hasta 60 min después de la inyección.

Las sacudidas fueron fácilmente identificables y se caracterizaron por un retiro rápido y corto o flexión de la extremidad inyectada. El número de sacudidas fue registrado en dos fases: Fase 1: 0-10 minutos inmediatamente después de la administración de formalina y Fase 2: 10-60 minutos después de la inyección de formalina.

Determinación del efecto antineuropático

Para evaluar el efecto antineuropático fue inducida alodinia e hiperalgesia de larga duración en ratas a través de la administración subcutánea de formalina al 5% en el

dorso de la extremidad posterior derecha (Salinas-Abarca et al., 2017). Después de 7 días de la inducción, se administraron los tratamientos y se evaluó la alodinia e hiperalgesia mecánica mediante la medición de la frecuencia de respuesta a la estimulación con los filamentos de von Frey (Aesthesio®, Ugo Basile, Italia). Para minimizar la ansiedad, los animales fueron colocados en separadores de acrílico montados sobre la plataforma de estimulación durante 30 min. Se realizaron 10 estimulaciones con una fuerza de 1g (10 mN) y 26 g (250 mN) en la superficie plantar de la base del tercer dedo de la extremidad ipsilateral. Una fuerza de 1 g no activa los nociceptores cutáneos en ratas naïve y no por lo tanto no conduce al retiro de la pata. Por lo tanto, una respuesta a este estímulo fue una indicación de la presencia de alodinia. Del mismo modo, una fuerza de 26 g o más se considera un estímulo nocivo (Leem et al. 1993) por lo tanto se produjo hiperalgesia cuando hubo una respuesta incrementada a éstos (Salinas-Abarca et al., 2017)

Determinación del efecto anti-inflamatorio

Para inducir la inflamación las ratas fueron inyectadas por vía intraplantar en la extremidad posterior derecha con 100 µL de carragenina al 1%. El grado de inflamación se determinó a través de la cuantificación del incremento en el volumen de la extremidad posterior derecha de los animales con ayuda de un pletismómetro (Modelo LE7500; Panlab, España).

La evaluación se realizó antes de la administración de carragenina (valor basal) y cada hora a partir de la administración de carragenina y hasta las 6 h. Con los valores obtenidos se calculó el % de inflamación de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inflamación} = \left(\frac{a - x}{b - y} \right) \times 100$$

donde 'x' y 'a' son los valores promedio del volumen de las extremidades posteriores de los animales administrados con los diferentes tratamientos antes y después de la administración de carragenina, respectivamente. Mientras que 'y' y 'b' corresponden a los valores promedio del volumen de las extremidades posteriores de los animales del grupo tratado con el vehículo antes y después de la administración de carragenina, respectivamente.

Análisis de la interacción diclofenaco-ácido fólico

Para caracterizar la interacción producida por la combinación de diclofenaco con ácido fólico se utilizó el análisis isoblográfico de acuerdo a Tallarida (2000). Esta herramienta proporciona una representación gráfica de la naturaleza de la interacción de dos fármacos. De acuerdo a este método, solo se consideraron las dosis equiefectivas correspondientes a la dosis efectiva treinta (DE₃₀) obtenidas de las curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo producido por la administración individual de los fármacos en la segunda fase de la prueba de la

formalina. La DE_{30} de cada fármaco, así como sus límites de confianza al 95% se obtuvieron a través de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

El isoblograma se construyó graficando las dosis equiefectivas (DE_{30}) de cada fármaco sobre los ejes X y Y. En x se graficó la DE_{30} de diclofenaco y en y la DE_{30} de ácido fólico. La línea que se forma de la unión de las DE_{30} de los fármacos corresponde a la línea de aditividad (isobola).

La isobola, en este caso es el lugar geométrico de los puntos (pares de dosis) que producen el 30% de efecto en una combinación aditiva simple (Z_{add}). Esta línea de aditividad permite una comparación con el par de dosis reales que producen el 30% de efecto experimentalmente (Z_{exp}). La sinergia, aditividad o antagonismo está indicada cuando Z_{exp} se encuentra debajo, sobre o encima de la línea, respectivamente (Fig. 5).

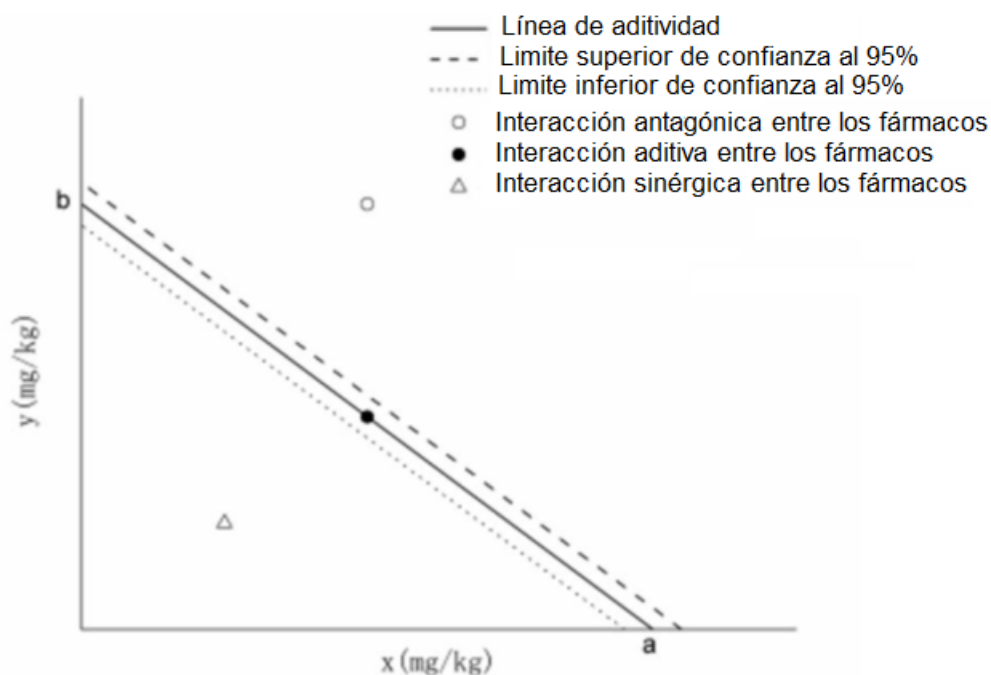


Figura 6. Isobolograma. Modificado de Huang et al., 2019.

Las interacciones entre diclofenaco y ácido fólico en una proporción 1:1 se caracterizaron asumiendo que la combinación comprendía dosis equivalentes de los fármacos individuales (DE_{30}).

La dosis aditiva teórica (Z_{add}) y su error estándar de la media (SEM) para la combinación en la misma proporción de componentes se calculó a partir de las DE_{30} resultantes para cada fármaco utilizando la siguiente ecuación:

$$Z_{add} = fA + (1 - f) B,$$

donde A es la DE_{30} del diclofenaco y B es la DE_{30} del ácido fólico. Para una relación fija de 1:1, el valor de f es 0.5 y (1 - f) es 0.5.

El valor experimental DE_{30} (Z_{exp}) (y su límite de confianza al 95%) se determinó a partir de la respectiva curva de dosis-respuesta de la combinación de los fármacos a través de un análisis de regresión lineal de la curva logarítmica, y los límites de confianza al 95% se transformaron posteriormente en SEM. Para construir las curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo experimental de las combinaciones, cada grupo de ratas recibió uno de los fármacos a las dosis indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Dosis¹ de diclofenaco en combinación con ácido fólico usadas para la construcción del isoblograma.

No. Combinación	Diclofenaco (mg/kg)	Ácido fólico (mg/kg)
5	30.87	11.62
4	15.44	5.81
3	7.72	2.90
2	3.86	1.45
1	1.93	0.73

¹Las dosis corresponden a una fracción de 0.5 de las DE_{30} de cada fármaco.

Evaluación del daño gástrico

Se obtuvieron los estómagos de las ratas al final de los experimentos y se diseccionaron desde el esófago hasta la porción pilórica y fueron rellenos con 10 ml de formaldehído al 4% durante 15 min para fijar las capas gástricas interna y externa. Se realizó una incisión a lo largo de la curvatura mayor para examinar la presencia de úlceras. Se realizaron fotografías de las lesiones hemorrágicas para medirlas usando una cuadrícula milimétrica. El daño gástrico fue determinado como el área de úlcera en mm².

Análisis del mecanismo de acción antinociceptivo de la combinación de diclofenaco-ácido fólico en la prueba de la formalina

Para evaluar el posible mecanismo de acción del efecto antinociceptivo producido por la combinación de diclofenaco-ácido fólico se examinó la participación de los receptores a opioides. Para ello, se administró naloxona, un antagonista competitivo de los receptores opioides, (1 mg/kg, s.c.). Después de 15 min, todos los animales recibieron la dosis de la combinación diclofenaco-ácido fólico de mayor eficacia.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se construyeron los gráficos de curso temporal y posteriormente se obtuvo el área bajo la curva por el método de los trapezoides (ABC) para construir la curvas dosis-respuesta. Para determinar la dosis efectiva 30 (DE_{30}), el ABC del efecto producido en cada rata fue transformada a porcentaje de antinocicepción. Los valores de DE_{30} con los intervalos de confianza del 95% para cada fármaco fueron calculados usando regresión lineal de mínimos cuadrados según Tallarida (2000). Para comparar las diferencias entre tratamientos se usó análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey. Las comparaciones estadísticas entre los valores de Zadd y Zexp fueron realizadas utilizando la prueba t de Student de acuerdo con los procedimientos previamente descrito por Tallarida (2000). Los valores de Zexp que fueron menores que el valor de Zadd, con diferencias con $p < 0.05$ tanto en X como en Y se interpretaron como interacciones sinérgicas significativas. Los valores de Zexp superiores a los valores de Zadd, con diferencias $p < 0.05$ en las direcciones X y Y, se interpretaron como interacciones antagónicas significativas. La ausencia de una diferencia significativa entre los valores de Zexp y Zadd se interpretó como sin interacción, y se estableció como una relación aditiva (aditividad) en la combinación. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico Graphpad Prism® versión 5.0 para Windows.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Evaluación del efecto antinociceptivo de la administración individual diclofenaco y ácido fólico y en combinación en la prueba de la formalina.

La administración subcutánea de formalina al 1% produjo una conducta de sacudida, indicativo de la presencia de nocicepción. Esta conducta nociceptiva mostro un comportamiento bifásico característico (Fig. 7A). La administración de diclofenaco produce una disminución significativa y dosis-dependiente en la respuesta al estímulo químico durante la segunda fase de la prueba, en comparación con el vehículo (s.s.) (Fig. 7A). Este efecto fue significativo a las dosis de 100 y 316.2 mg/kg ($p \leq 0.05$) (Fig. 7B), sugiriendo que el efecto antinociceptivo posiblemente está asociado a un efecto antiinflamatorio. Adicionalmente, la administración oral 31.6 y 56.2 mg/kg de ácido fólico también produce una reducción en el número de sacudidas de la extremidad administrada con formalina en comparación con el grupo tratado con s.s. (Fig. 8A). El efecto antinociceptivo producido por la administración de ácido fólico resulto significativo y dosis dependiente en la segunda fase de la prueba de la formalina (Fig. 8B). Los valores calculados para la DE_{30} del efecto antinociceptivo de diclofenaco y ácido fólico con sus intervalos de confianza al 95% en la segunda fase de la prueba de la formalina fueron 61.74 [28.41-134.19] mg/kg y 23.23 [13.57-39.76] mg/kg, respectivamente (Fig. 9).

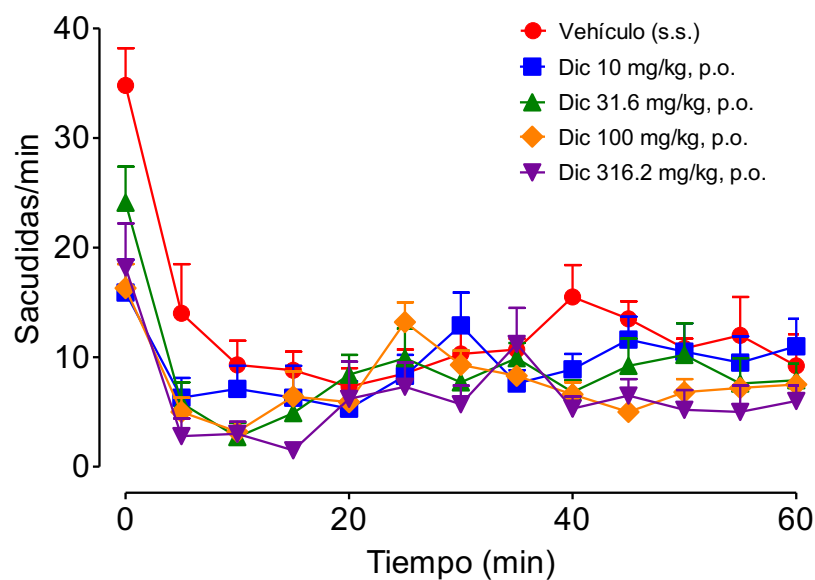
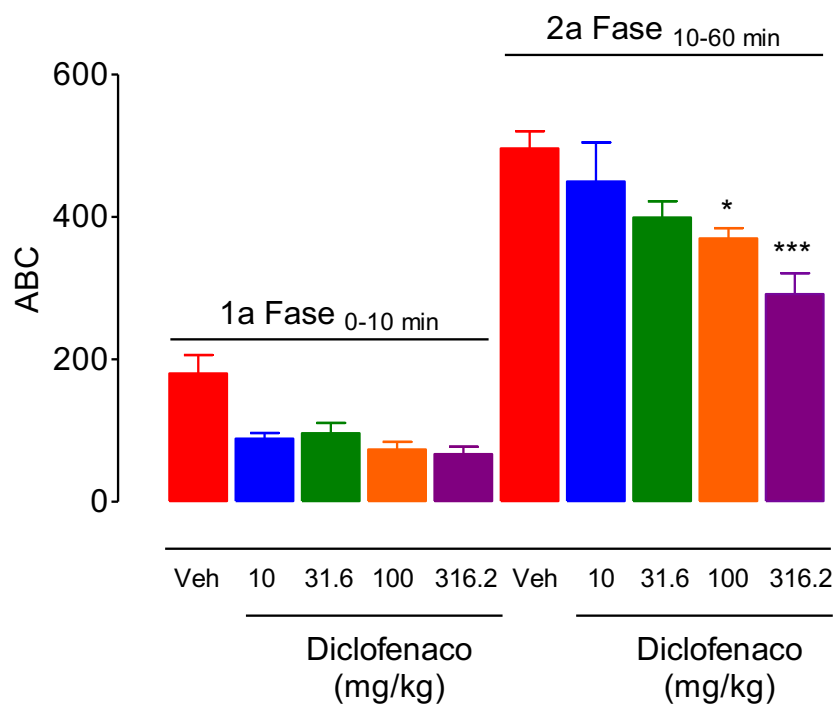
A**B**

Figura 7. Efecto de la administración de diclofenaco (10-316.2 mg/kg, p.o.) en la nocicepción inducida por formalina 1% en ratas. **A)** Curso temporal (0-60 min) del efecto antinociceptivo de diclofenaco en comparación con el vehículo (s.s.). **B)** Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de diclofenaco expresado como ABC. Cada punto o barra representa el promedio + E.E.M de 6-8 animales. *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

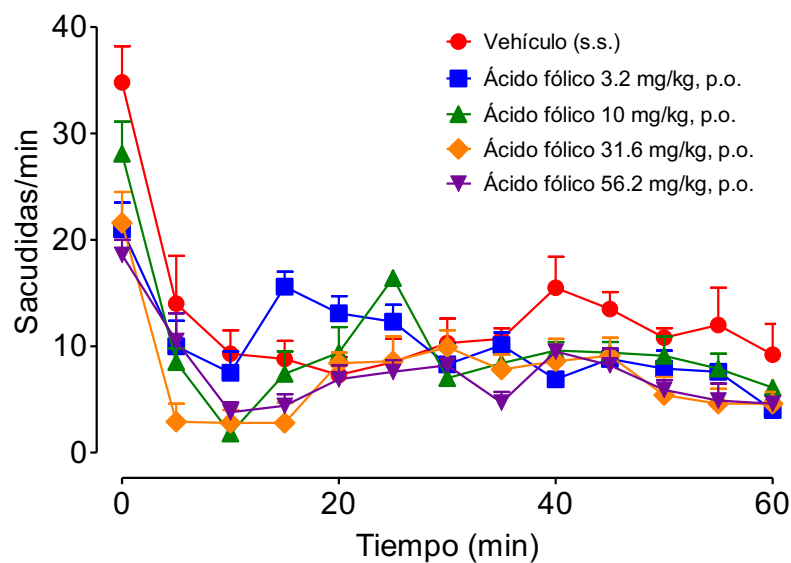
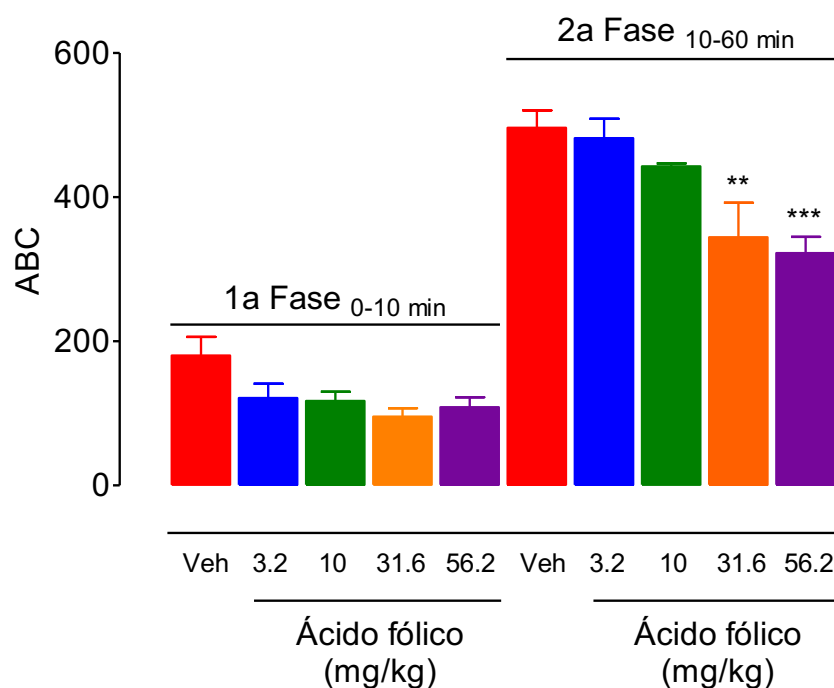
A**B**

Figura 8. Efecto de la administración de ácido fólico (3.2-56.2 mg/kg, p.o.) en la nocicepción inducida por formalina 1% en ratas. **A)** Curso temporal (0-60 min) del efecto antinociceptivo de ácido fólico en comparación con el vehículo (s.s.). **B)** Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de ácido fólico expresado como ABC. Cada punto o barra representa el promedio $\pm$ E.E.M de 6-8 animales. *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

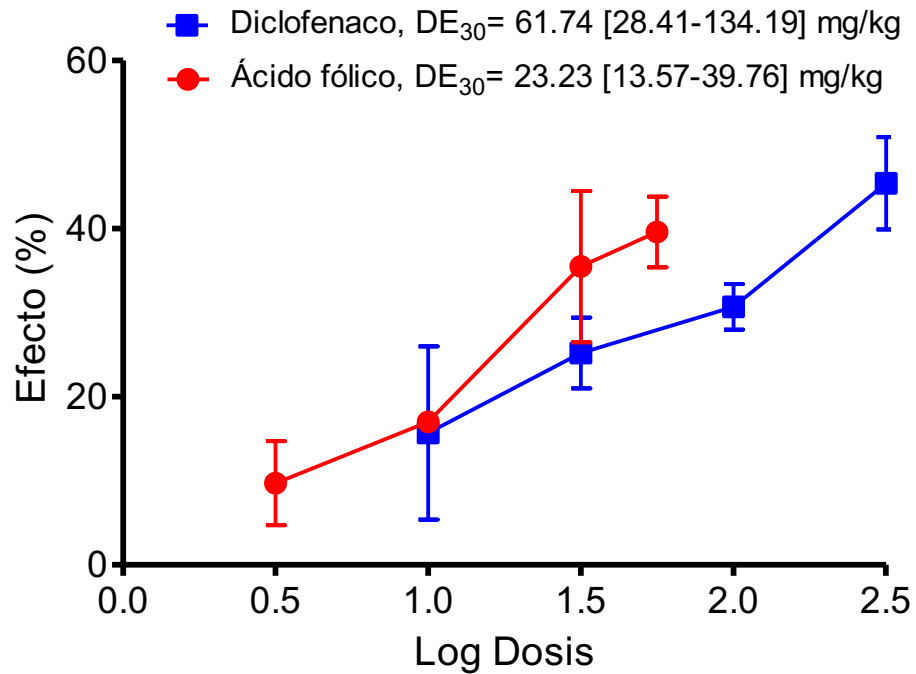


Figura 9. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de diclofenaco y ácido fólico en la prueba de formalina al 1% en ratas. Cada punto corresponde al porcentaje de antinocicepción en la segunda fase de prueba de la formalina $\pm$ E.E.M de 6-8 animales.

Por otra parte, la administración oral de la combinación de ambos fármacos (Tabla 1) en una proporción fija 1:1, produce un efecto antinociceptivo significativo ($p \leq 0.05$) en la segunda fase de la prueba de la formalina (Fig. 10).

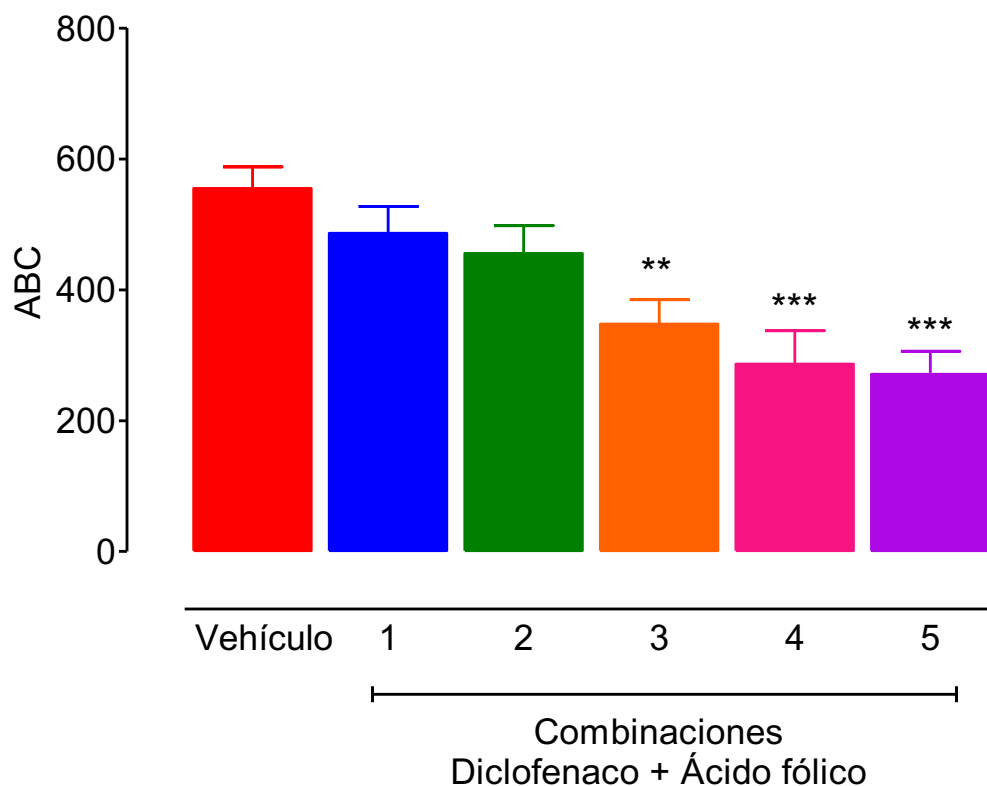


Figura 10. Efecto antinociceptivo de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en la prueba de formalina al 1% en ratas, expresado como ABC. Cada barra representa el promedio $\pm$ E.E.M de 6-8 animales. *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

El análisis isoblográfico muestra que la combinación de ambos fármacos produce un efecto sinérgico ($p \leq 0.05$). En este caso, la DE_{30} experimental fue de 10.32 ± 2.10 mg/kg, un valor menor que la DE_{30} teórica 42.49 ± 5.53 m/kg, este sinergismo se puede apreciar claramente (Fig.11) ya que el DE_{30} experimental se encuentra debajo de la línea de aditividad. Además, el análisis fraccional de la combinación demostró que la relación $a/A + b/B$ (índice de interacción) fue significativamente menor de 1.0 ($p < 0.05$) ya que el valor obtenido fue de 0.2 para la combinación de

diclofenaco y ácido fólico en una proporción 1:1, lo que indica una interacción superaditiva o sinérgica para esta combinación de fármacos.

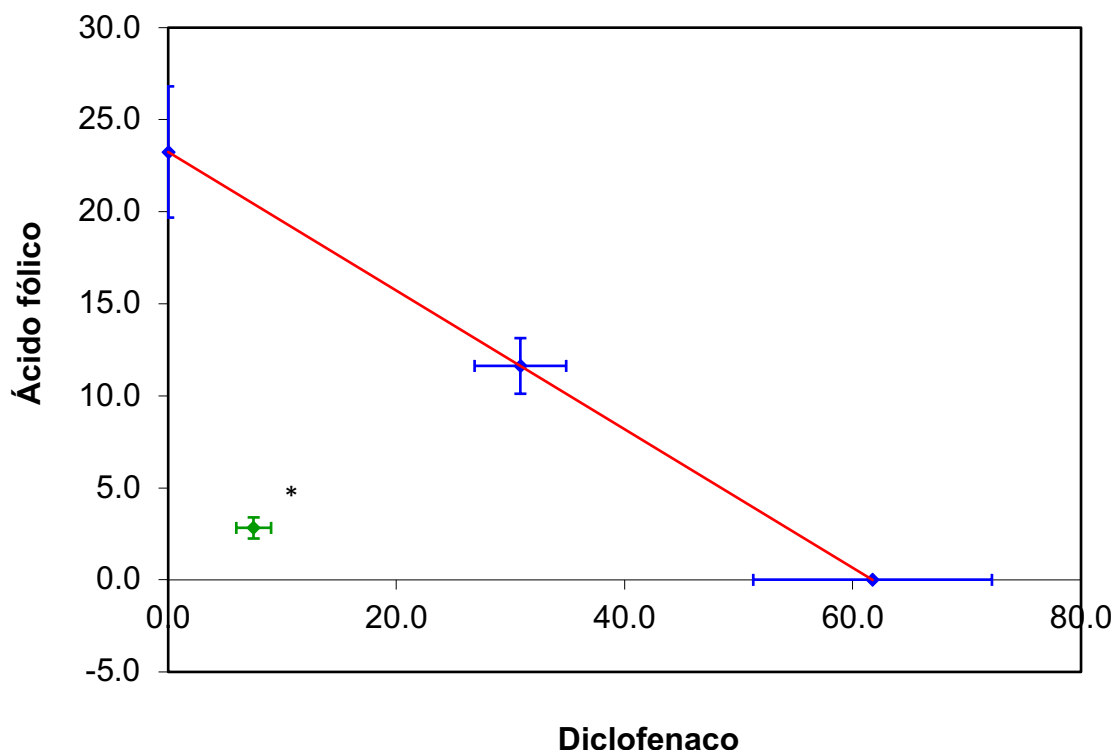


Figura 11. Isobolograma de la interacción de la combinación de diclofenaco y ácido fólico en el efecto antinociceptivo en la prueba de formalina en ratas. Los valores de DE₃₀ para los fármacos con sus respectivos errores estándar, después de la administración individual son graficados en los ejes X y Y, respectivamente. La línea recta que conecta las DE₃₀ de los fármacos, contiene todas las posibles combinaciones entre estos dos fármacos que solamente producen un efecto de adición (isobola). El punto azul corresponde a la DE₃₀ teórica para este estudio. El punto verde corresponde a la DE₃₀ experimental de las combinaciones y en este caso está por debajo de la isobola, indicando una interacción sinérgica entre diclofenaco y ácido fólico. * $p < 0.05$, t de Student.

Evaluación del efecto antiinflamatorio de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en el edema inducido por carragenina.

La administración subcutánea de carragenina produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) del volumen de la extremidad posterior de las ratas (edema). El tratamiento con las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico produjo un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis (Fig. 12).

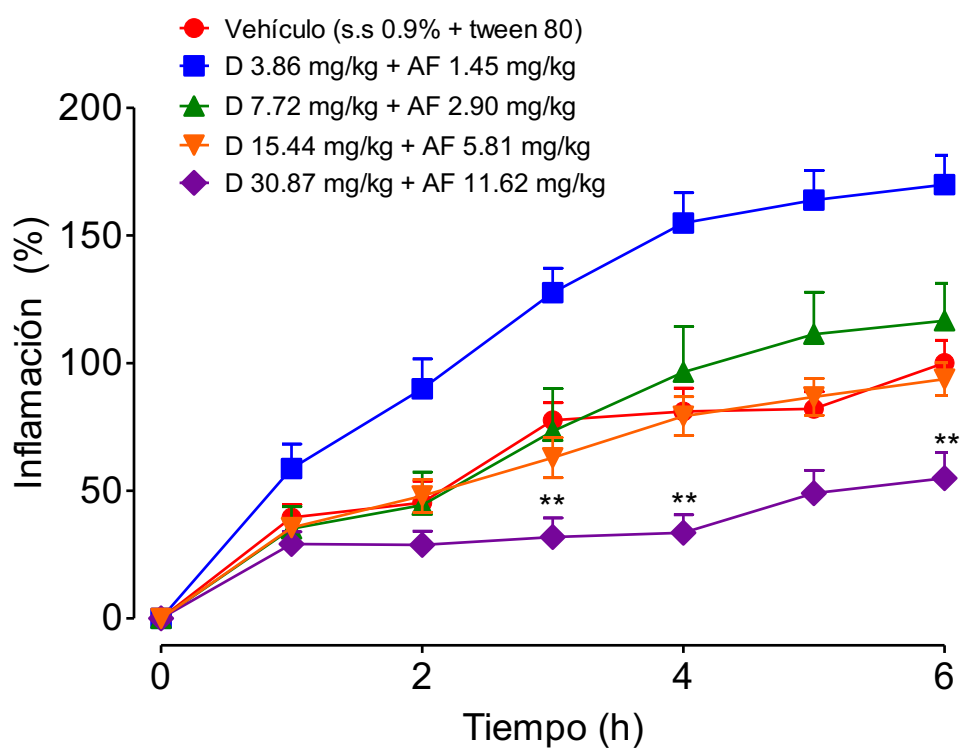


Figura 12. Efecto antiinflamatorio de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en la prueba de carragenina al 1% en ratas. Cada punto representa el promedio $\pm$ E.E.M de 6-8 animales. *** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni.

Evaluación del efecto antineuropático de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico.

La inyección subcutánea de formalina al 5% produjo alodinia e hiperalgesia mecánica en ambas extremidades posteriores de las ratas. La administración oral de las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico revierte de manera significativa la alodinia e hiperalgesia mecánicas inducidas por la administración de formalina, sugiriendo un efecto antineuropático (Fig. 13).

Evaluación del daño gástrico producido por las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico.

La administración oral de diclofenaco en combinación con ácido fólico no produce daño a la mucosa gástrica (Tabla 2), lo que sugiere que su uso es seguro ya que se potencia el efecto terapéutico sin un incremento en los efectos adversos.

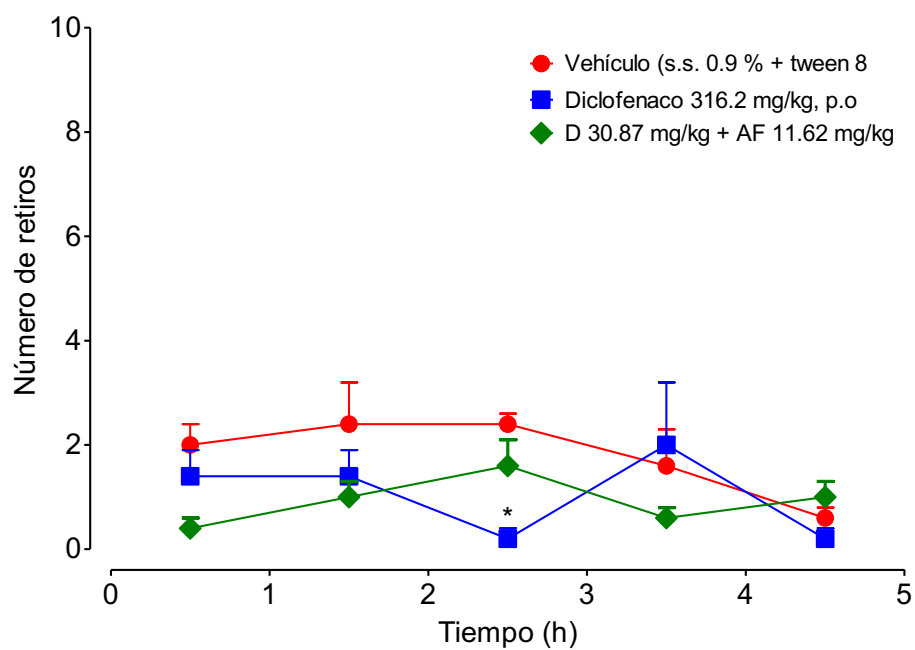
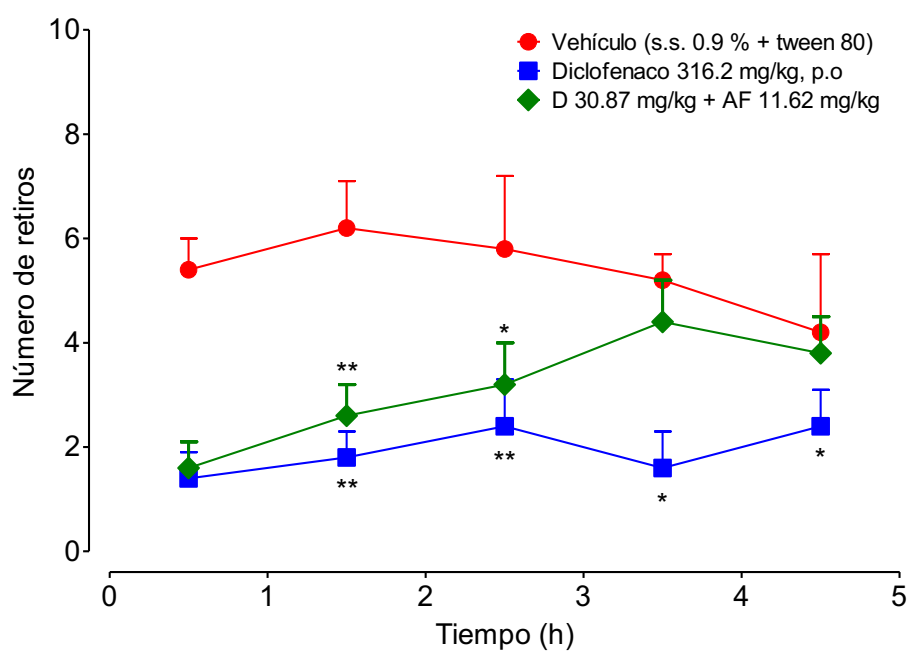
A**B**

Figura 13. Curso temporal de (A) la alodinia y (B) la hiperalgesia medida como el número de retiros de la extremidad posterior derecha (0-10) después de la inyección de formalina al 5% en ratas. Cara punto representa la media $\pm$ S.E.M. de 6-8 animales.*** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni.

Tabla 2. Comparación del daño gástrico producido por la administración de indometacina (20 mg/kg,p.o.) y las combinaciones de diclofenaco y ácido fólico en ratas.

Tratamiento	Úlceras (mm ²)	Daño gástrico (%)
Sol. salina 0.9%	0	0
Indometacina 20 mg/kg	29.8 $\pm$ 8.9	100
D 3.86 mg/kg + AF 1.45 mg/kg	0.2 $\pm$ 0.04	0.6 $\pm$ 0.1
D 7.72 mg/kg + AF 2.90 mg/kg	2.0 $\pm$ 0.4	6.6 $\pm$ 1.4
D 15.44 mg/kg + AF 5.81 mg/kg	1.5 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.8
D 30.87 mg/kg +AF 11.62 mg/kg	11.6 $\pm$ 0.4	38.9 $\pm$ 1.3

Análisis del mecanismo de acción antinociceptivo de la combinación de diclofenaco-ácido fólico en la prueba de la formalina

El pretratamiento con 1 mg/kg de naloxona, un antagonista de los receptores opioides, revierte el efecto antinociceptivo producido por la combinación de diclofenaco 30.87 mg/kg con ácido fólico 11.62 mg/kg (Fig. 14).

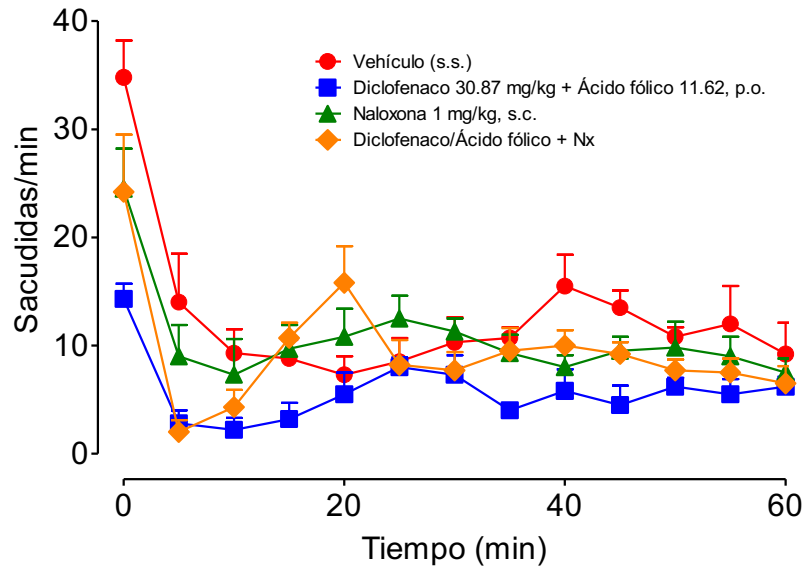
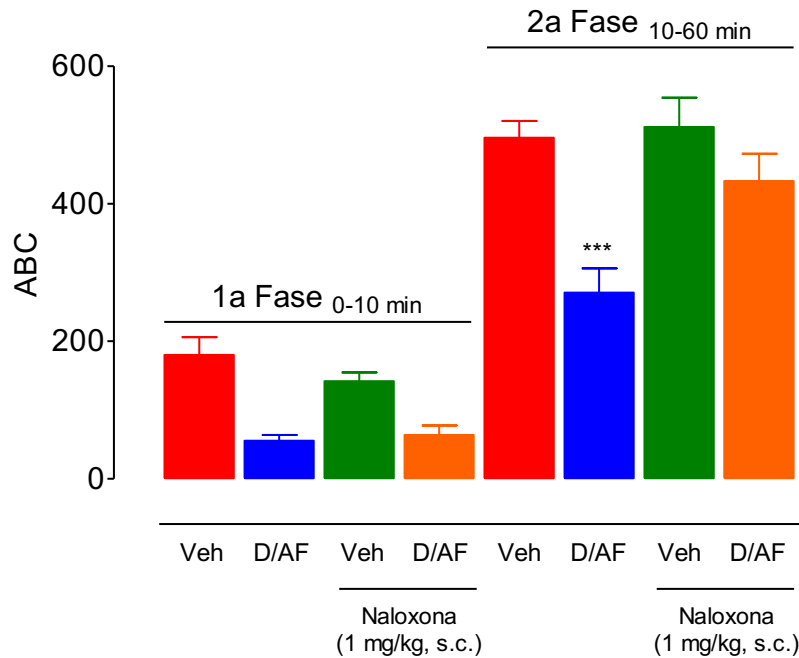
A**B**

Figura 14. Efecto de la combinación de diclofenaco 30.87 mg/kg con ácido fólico 11.62 mg/kg, p.o. en presencia de naloxona (1 mg/kg, s.c) en la nocicepción inducida por formalina al 1% en ratas. **A)** Curso temporal (0-60 min) y **B)** Curva dosis-respuesta expresado como ABC. Cada punto o barra representa el promedio $\pm$ E.E.M de 6-8 animales. *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

CAPÍTULO V DISCUSIÓN

El uso clínico de la combinación de fármacos con propiedades antiinflamatorias y analgésicas para el manejo del dolor agudo y crónico ha aumentado significativamente en los últimos años. El propósito de combinar este tipo de fármacos es disminuir las reacciones adversas y aumentar la eficacia terapéutica (Varrassi et al., 2017). En el presente estudio, se analizó el tipo interacción producida por la combinación de diclofenaco y ácido fólico en modelos experimentales de nocicepción e inflamación.

La administración oral de diclofenaco produjo una disminución significativa en la respuesta al estímulo químico durante la segunda fase de la prueba de la formalina, en comparación con el vehículo. Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo producido por diclofenaco está relacionado con un efecto antiinflamatorio que previene la sensibilización central de las fibras sensoriales primarias. Este resultado concuerda con estudios previos en donde se ha demostrado el efecto antinociceptivo de diclofenaco en la prueba de la formalina (Miranda-Lara et al., 2018). Por otra parte, existe evidencia que indica que la segunda fase de la prueba de la formalina es producida por la liberación local de mediadores inflamatorios como bradisinina y prostaglandinas (Shibata et al., 1989). Además, se ha observado que durante la segunda fase se produce sensibilización central mediada por la activación de los receptores de glutamato y sustancia P (Sawynok y Liu, 2004). Se sabe que el mecanismo de acción del diclofenaco es la inhibición de la COX-2 con mayor potencia que la inhibición de COX-1, lo cual se asocia fuertemente a su potente efecto antiinflamatorio debido a la inhibición de la

síntesis de la PGE_2 (Ku et al., 1986). El grado de selectividad de diclofenaco por la COX-2 es comparable al de celecoxib (Grosser et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que, en adición a la inhibición de la COX, el diclofenaco produce una regulación funcional a la baja de los nociceptores sensibilizados, como resultado de la estimulación de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc- K^+ sensibles a ATP (Tonussi y Ferreira, 1994; Ortiz et al., 2003).

Adicionalmente, estudios en animales y humanos sugieren que, al menos en parte, el diclofenaco puede actuar directa o indirectamente a través de la modulación los procesos nociceptivos en el SNC. Se ha observado un efecto dosis dependiente en la reducción de las contorsiones abdominales inducidas por ácido etacrínico en ratones cuando el diclofenaco fue inyectado en diferentes áreas del cerebro en un rango de dosis de 1 a 10 ng. Otro estudio mostró que el efecto antinociceptivo central producido por diclofenaco en ratas fue parcialmente revertido por el antagonista de los receptores opioides; naloxona, lo que sugiere un posible papel de las vías opioides centrales (Bjorkman et al., 1992). Por otra parte, diclofenaco ha demostrado ser un agonista selectivo para el receptor $PPAR\gamma$. También, se ha demostrado que en células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide existe una correlación entre la capacidad del diclofenaco para aumentar la actividad de $PPAR\gamma$ y para reducir la proliferación celular al disminuir la viabilidad celular e inducir apoptosis (Yamazaki et al., 2002). Diclofenaco, ha demostrado activar canales de potasio (K_{Ca} , K_v y K_{2P}) (Ortiz et al., 2005; Veale et al., 2014) y bloquear

canales iónicos activados por protones (ASIC3) (Voilley, 2004) y receptores NMDA (Dong, 2009).

En relación al efecto antinociceptivo significativo producido por la administración de ácido fólico en la prueba de la formalina, los resultados concuerdan con reportes previos en donde la administración de ácido fólico reduce el dolor asociado a daño en nervios periféricos. Un estudio mostró que, en la lesión crónica de nervio periférico, como el síndrome del túnel carpiano, que es el tipo más común de neuropatía por compresión de nervios periféricos, el ácido fólico combinado con monofosfato de uridina y vitamina B12 redujo la puntuación del dolor, la intensidad y caracterización del dolor y los síntomas asociados (Negrão et al., 2016). También, se ha demostrado que el ácido fólico puede proteger a las ratas diabéticas contra la neuropatía periférica diabética al reducir los niveles de malondialdehído y regular la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) (Yilmaz et al., 2016). En adición, en la lesión aguda de nervio periférico, se demostró que el ácido fólico mejoró la curación del nervio periférico y aumentó la mielinización del axón en un modelo de lesión del nervio ciático en rata (Harma et al. (2015).

En relación al efecto antiinflamatorio y antineuropático producido por la combinación de diclofenaco con ácido fólico en este estudio, recientemente otro estudio mostró que la combinación de melatonina y ácido fólico es capaz de mejorar la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica, así como el estrés oxidativo y nitrosativo, la

infiltración de mastocitos, la sobreexpresión de mediadores inflamatorios y la activación de la microglia inducida por la inyección de reserpina, un modelo de fibromialgia en ratas, con más eficacia que la administración por separado de ambos fármacos (Fusco y col., 2019). Desde hace varios años se ha demostrado que el ácido fólico puede mejorar la función del sistema inmunológico y además posee importantes propiedades antioxidantes (Stanhewicz y Kenney, 2017), lo que puede contribuir al efecto antiinflamatorio y antineuropático observados. Adicionalmente, diversas evidencias muestran que el ácido fólico es importante para la reparación de los nervios periféricos (Harma et al. (2015). Los resultados del efecto antinociceptivo de la combinación de diclofenaco y ácido fólico obtenidos en este estudio demostraron que el valor de la DE₃₀ teórica para la combinación fue mayor que el valor experimental observado, indicando la presencia de una interacción sinérgica entre diclofenaco y ácido fólico. La potencia de la combinación fue aproximadamente 4 veces mayor que la esperada de la adición de los efectos individuales de los fármacos. Este efecto sinérgico podría resultar de utilidad en la clínica debido a que se potencia la eficacia terapéutica sin la exacerbación de los efectos adversos característicos del diclofenaco, ya que la combinación de ambos fármacos no produce daño a la mucosa gástrica. La interacción sinérgica de la combinación diclofenaco-ácido fólico puede ser debido a los diferentes mecanismos de acción de estos dos compuestos. En este estudio el bloqueo de los receptores opioides reduce de manera significativa el efecto antinociceptivo de la combinación de diclofenaco y ácido fólico, lo que concuerda con un reporte previo en donde se observó que el efecto antinociceptivo central producido por diclofenaco en ratas fue parcialmente revertido por naloxona (Bjorkman et al., 1992).

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la combinación de diclofenaco y ácido fólico en administración aguda produce un efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina en ratas, así como un efecto antiinflamatorio en el edema inducido por carragenia y antineuropático en ratas. El análisis isobolográfico mostró que el valor calculado para la DE_{30} teórica obtenido para la combinación de ambos fármacos en una proporción 1:1 fue mayor que el valor experimental observado, indicando la presencia de una interacción sinérgica entre diclofenaco y ácido fólico. La potencia de la combinación fue aproximadamente 4 veces mayor a la esperada de la adición de los efectos individuales de los fármacos. Este efecto sinérgico podría resultar de utilidad en la clínica debido a que se potencia la eficacia terapéutica sin la exacerbación de los efectos adversos característicos del diclofenaco, ya que la combinación de ambos fármacos no produce daño a la mucosa gástrica. Adicionalmente, en este estudio se encontró que en el efecto antinociceptivo producido por la combinación de diclofenaco y ácido fólico participa el sistema opioide. La combinación de diclofenaco y ácido fólico podría resultar en una buena estrategia farmacológica para combatir el dolor inflamatorio y el dolor neuropático.

Bibliografía

Altman R, Bosch B, Brune K, Patrignani P, Young C. (2015). Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs*. 75(8):859-877.

Anekar, A.A., Cascella, M. WHO Analgesic Ladder. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

Baron, R. (2000). Neuropathic Pain: From Mechanism to Symptoms. *The clinical Journal of Pain*, 16, S12-S20.

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 139(2):267-284.

Basbaum, A.I., Jessell, T.M. 2000. The perception of pain. En: Kandel E.R., Schwartz, J.H y Jessell, T.M. (Eds). *Principles of Neuroscience*. 4th ed. New York. McGraw-Hill. pp. 472-491.

Baxter MG, Miller AA, Webster RA. (1973). Some studies on the convulsant action of folic acid. *Br J Pharmacol*. 48:350P-351P.

Berg J, Fellier H, Christoph T, Graup J, Stimmeder C. (1999). The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in Vitro. *Inflamm Res*. 48(7):369-379.

Bermúdez-Ocaña, D. Y., Aguilar-Mariscal, H., Frías, T. R., Blé-Castillo, J. L., Flores-Murrieta, F. J., Díaz-Zagoya, J. C., Granados-Soto, V., & Juárez-Rojop, I. E. (2011). Proglumide enhances the antinociceptive effect of cyclooxygenase inhibitors in diabetic rats in the formalin test. *European journal of pharmacology*, 664(1-3), 8–13.

Bessou, P., Perl, E.R. 1969. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol.* 32:1025-1043.

Bjorkman R, Hallman KM, Hedner J, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug modulation of behavioral responses to intrathecal N-methyl-D-aspartate, but not to substance P and amino-methyl-isoxazole-propionic acid in the rat. *J Clin Pharmacol* 1996;36:20S-26S

Björkman R, Hedner J, Hedner T, Henning M. (1990). Central, naloxone-reversible antinociception by diclofenac in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 342(2):171-176.

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

Botez MI, Peyronnard JM, Bachevalier J, Charro (1978). Polyneuropathy and folate deficiency. *Arch Neurol.* 35: 581-584.

Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH. (2000). Homocysteine, folate, methylation and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 69:228-232.

Burian M, Geisslinger G. (2005). COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther.* 107:139-154.

Burke A, Smyth E, FitzGerald GA. (2005). Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. En: Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L. (Eds). *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics.* 11th edition, New York. McGraw Hill.

Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, Brook GA. (2007). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurol.* 7: 17.

Calderon-Ospina, C. A., Nava-Mesa, M. O., & Arbeláez Ariza, C. E. (2020). Effect of Combined Diclofenac and B Vitamins (Thiamine, Pyridoxine, and Cyanocobalamin) for Low Back Pain Management: Systematic Review and Meta-analysis. *Pain medicine (Malden, Mass.)*, 21(4), 766–781.

Carrillo-Calzadilla, P. E., López-Muñoz, F. J., Moreno-Rocha, L. A., Medina-López, J. R., Cortés-Arroyo, A. R., & Domínguez-Ramírez, A. M. (2017). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metamizol in co-administration with morphine under acute and chronic treatments in arthritic rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 69(6), 642–651.

Casey, K.I. 2000. The imaging of pain: background and rationale. En: Casey, K. L., Bushnell, M. C. (Eds.), *Pain Imaging*. pp. 1-29.

Chahine, M., O'Leary, M.E. (2014). Regulation/modulation of sensory neuron sodium channels. *Handb Exp Pharmacol*, 221, 111-135.

Chernov AV, Strongin AY. (2011). Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer. *Biomol Concepts*. 2:135-147.

Corona-Ramos, J. N., Déciga-Campos, M., Romero-Piña, M., Medina, L. A., Martínez-Racine, I., Jaramillo-Morales, O. A., García-López, P., & López-Muñoz, F. J. (2017). The Effect of Gabapentin and Tramadol in Cancer Pain Induced by Glioma Cell in Rat Femur. *Drug development research*, 78(5), 173–183.

Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C.J. (2009). Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 32, 1-32.

Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C.J. (2009). Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 32,1-32.

Davies J, Watkins JC. (1973). Facilitatory and direct excitatory effects of folate and folinate on single neurones of cat cerebral cortex. *Biochem Pharmacol*. 22:1667-1668.

Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33(3):184–213.

de Castro RC Jr, Burns CL, McAdoo DJ, Romanic AM. Metalloproteinase increases in the injured rat spinal cord. *Neuroreport*. 2000; 11:3551–3554.

De la O-Arciniega, M., Díaz-Reval, M. I., Cortés-Arroyo, A. R., Domínguez-Ramírez, A. M., & López-Muñoz, F. J. (2009). Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 92(3), 457–464.

Déciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. J. (2004). Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *European Journal of Pharmacology*, 193-199.

Dembo, G., Park, S.B., Kharasch, E.D. (2005). Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans. *Anesthesiology*, 102,409-415.

Desai A, Sequeira JM, Quadros EV. 2016. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* 126:31–42.

Dong X-D. The analgesic action of topical diclofenac may be mediated through peripheral NMDA receptor antagonism. *Pain* 2009;147:36-45

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, 161–174.

Edwards, J. E., McQuay, H. J., & Moore, R. A. (2002). Combination analgesic efficacy: individual patient data meta-analysis of single-dose oral tramadol plus acetaminophen in acute postoperative pain. *Journal of pain and symptom management*, 23(2), 121–130.

Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. Melatonin regulates matrix metalloproteinases after traumatic experimental spinal cord injury. *J Pineal Res* 2008; 45: 149–156.

FDA. Briefing Documents for FDA Joint Meeting of the Arthritis Advisory Committee (AAC) and Drug Safety and Risk Management Advisory Committee (DSARM). Iroko Pharmaceuticals, LLC: Silver Spring; 2014.

Ferrer-Brechner, T., & Ganz, P. (1984). Combination therapy with ibuprofen and methadone for chronic cancer pain. *The American journal of medicine*, 77(1A), 78–83.

Figueiredo JC, Grau MV, Haile RW, Sandler RS, Summers RW, Bresalier RS, Burke CA, et al. 2009. Folic acid and risk of prostate cancer: Results from a randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 101:432–435.

Fornasari, D., Allegri, M., Gerboni, S., & Fanelli, G. (2017). A "novel" association to treat pain: tramadol/dexketoprofen. The first drug of a "new pharmacological class". *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 88(1), 17–24.

Forth, W., Martin, E. y Peter, K. Dolor. 1995. En: *El alivio del dolor*. Ed. Hoechst S.A. México. 1-20

Fossaluzza, V., De Vita, S. (1992). Combined therapy with cyclobenzaprine and ibuprofen in primary fibromyalgia syndrome. *International journal of clinical pharmacology research*, 12(2), 99–102.

Fowler PD, Shadforth MF, Crook PR, John VA. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983;25(3):389–94.

Franco de la-Torre, L., Alonso-Castro, Á. J., Zapata-Morales, J. R., Rivas-Carrillo, J. D., Vidaurrezaga-Lugo, J., Partida-Castellanos, E. M., Granados-Soto, V., & Isiordia-Espinoza, M. A. (2021). Antinociception and less gastric injury with the dexketoprofen-tapentadol combination in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 35(2), 371–378.

Furst, D. E., & Munster, T. (2001). Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, and Drugs Used in Gout. En B. G. Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology* (págs. 596-623). McGraw-Hill.

Fusco, R., Siracusa, R., D'Amico, R., Peritore, A. F., Cordaro, M., Gugliandolo, E., Crupi, R., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., & Di Paola, R. (2019). Melatonin Plus Folic Acid Treatment Ameliorates Reserpine-Induced Fibromyalgia: An Evaluation of Pain, Oxidative Stress, and Inflammation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(12), 628.

Gan, T. J. (2010). Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26, 1715–1731.

Gangadharan, V., Kuner, R. (2013). Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Dis Model Mech*, 6, 889-895.

Garrido-Suárez, B. B., Garrido, G., Bellma Menéndez, A., Merino, N., Valdés, O., Delgado-Hernández, R., & Granados-Soto, V. (2021). Synergistic interaction between amitriptyline and paracetamol in persistent and neuropathic pain models: An isobolographic analysis. *Neurochemistry international*, 150, 105160.

Gold, M.S., Gebhart, G.F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*, 16, 1248-1257.

Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*. 2006;116(1):4–15

Grosser, T., Smyth, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. En L. Laurence Brunton, B. Chabner, & B. Knollman, Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics (págs. 959-992). Colombia: McGraw-Hill.

Guerrero-Alba, R., Barragán-Iglesias, P., González-Hernández, A., Valdez-Moráles, E.E., Granados-Soto, V., Condés-Lara, M., Rodríguez, M.G., Marichal-Cancino, B.A. (2019). Some Prospective Alternatives for Treating Pain: The Endocannabinoid System and Its Putative Receptors GPR18 and GPR55. *Front Pharmacol*.

Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., & Ruddon, R. W. (2001). En Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics (págs. 631-632). Nueva York: McGraw-Hill.

Harma A, Sahin MS, Zorludemir S. Effects of intraperitoneally administered folic acid on the healing of repaired tibial nerves in rats. *J Reconstr Microsurg*. 2015;31:191–197

Henschke, N., Kamper, S. J., Maher, C. G. (2015). The epidemiology and economic consequences of pain. *Mayo Clinic proceedings*, 90(1), 139–147.

Henschke, N., Kamper, S. J., Maher, C. G. (2015). The epidemiology and economic consequences of pain. *Mayo Clinic proceedings*, 90(1), 139–147.

Hill RG, Miller AA. 1974. Antagonism by folic acid of presynaptic inhibition in the rat cuneate nucleus. *Br J Pharmacol*. 50:425–427.

Hill RG, Miller AA. 1974. Antagonism by folic acid of presynaptic inhibition in the rat cuneate nucleus. *Br J Pharmacol*. 50:425–427.

Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. *J. Neurosci. Methods* 14, 69–76.

Hyman, S.E., Cassem, N.H. 1995Hobbs, A.J., Ignarro, L. J. 1996. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol*. 269:134-148.

Insel, P. A. (1996). Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In Harman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon. R. W., Gilman, A. G. (eds). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York. McGraw-Hil. pp. 617-634.

Jiang, Q., Moreland, M., Ames, B. N., & Yin, X. (2009). A combination of aspirin and gamma-tocopherol is superior to that of aspirin and alpha-tocopherol in anti-inflammatory action and attenuation of aspirin-induced adverse effects. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(11), 894–900.

Johansson M, Appleby PN, Allen NE, Travis RC, Roddam AW, Egevad L, Jenab M, et al. 2008. Circulating concentrations of folate and vitamin B12 in relation to prostate

cancer risk: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:279–285.

Julius, D., Basbaum A.I. 2001. Molecular Mechanisms of nociception. *Nature*. 413:203-210.

Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR: Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*. 2008; 14: 331-336.

Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR: Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*. 2008; 14: 331-336.

Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*, 16, 1258-1266.

Kuner, R. 2010. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. 16(11):1258-1266.

Lee, H. M., Kim, H. I., Shin, Y. K., Lee, C. S., Park, M., Song, J. H. (2003). Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*. 992:120-127

Leem, J.W., Willis, W.D., Weller, S.C., Chung, J.M., 1993. Differential activation and classification of cutaneous afferents in the rat. *J. Neurophysiol*. 70, 2411–2424.

Levine, J.D., Taiwo, Y.O. 1994. En: *Textbook of Pain*. Wall, P.D., Melzack, R. (Eds.). Churchill Livingstone. New York. pp. 45-46.

Lewis CJ, Crane NT, Wilson DB, Yetley EA. 1999. Estimated folate intakes: Data updated to reflect food fortification, increased bioavailability, and dietary supplement use. *Am J Clin Nutr* 70:198–207.

Lim, R. K. (1967). Pain mechanisms. *Anesthesiology*, 106-110.

- Lizárraga, I., Sumano, H., & Castillo, F. (2002). Inibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2: Usos potenciales en perros. *Veterinaria México*, 285-307.
- Malmberg AB, Yaksh TL. 1992. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263(1):136–146.
- Marchand, S. (2008). The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. *Rheum Dis Clin North Am*, 34(2), 285-309.
- Mattson MP, Shea TB. 2003. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26:137–146.
- May, A. (2008). Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain*, 137(1), 7-15.
- McGettigan P, Henry D. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS Med*. 2013;10(2):e1001388.
- Melzack, R. y Katz, J. (2006). Pain assessment in adult patients. En P. D. Wall y R. Melzack (Eds.), *Textbook of pain*. 5th edition (pp. 291-304). Edinburgh, UK: Elsevier Churchill Livingstone.
- Melzack, R., Casey, K.L. 1968. Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. En: *The skin senses*. Kenshalo, D, (Ed.). Charles C Thomas. Springfield Ill. pp. 423-443.
- Merskey H, Bogduk N. *Classification of chronic pain*. Seattle: IASP Press, 2012.
- Metin, S. K., Meydan, B., Evman, S., Dogruyol, T., & Baysungur, V. (2017). The Effect of Pregabalin and Methylcobalamin Combination on the Chronic

Postthoracotomy Pain Syndrome. *The Annals of thoracic surgery*, 103(4), 1109–1113.

Meyer, R.A., Ringkamp M., Campbell, J.N., Raja, S.N. 2008. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. En: Wall and Melzack's Textbook of Pain, S.B. McMahon y M. Koltzernburg (Eds). Philadelphia. Elsevier, pp. 3-34.

Millan, M.J. 1999. The induction of pain: An integrative review. *Prog Neurobiol*. 57:1-164.

Miranda, H. F., Sierralta, F., Pinardi, G. (2001). An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesth Analg*. 93(2):430-435.

Miranda-Lara CA, Ortiz MI, Rodríguez-Ramos F, Chávez-Piña AE. Synergistic interaction between docosahexaenoic acid and diclofenac on inflammation, nociception, and gastric security models in rats. *Drug Dev Res*. 2018 Aug;79(5):239-246.

Miranda-Morales E, Meier K, Sandoval-Carrillo A, Salas- Pacheco J, Vazquez CP, Arias CO. 2017. Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci* 10:225.

Miranpuri GS, Meethal SV, Sampene E, Chopra A, Buttar S, Nacht C, Moreno N, Patel K, Liu L, Singh A, Singh CK, Hariharan N, Iskandar B, Resnick DK. Folic Acid Modulates Matrix Metalloproteinase-2 Expression, Alleviates Neuropathic Pain, and Improves Functional Recovery in Spinal Cord-Injured Rats. *Ann Neurosci*. 2017 May;24(2):74-81.

Miranpuri GS, Schomberg DT, Alrfaei B, King KC, Ryneerson B, Wesley VS, Khan N, Obiakor K, Wesley UV, Resnick DK: Role of matrix metalloproteinases 2 in spinal cord Injury-induced neuropathic pain. *Ann Neurosci*. 2016; 23: 25–32.

Mitchell ES, Conus N, Kaput J. 2014. B vitamin polymorphisms and behavior: Evidence of associations with neurodevelopment, depression, schizophrenia, bipolar disorder and cognitive decline. *Neurosci Biobehav Rev.* 47C:307–320.

Mixcoatl-Zecuatl, T., Quinonez-Bastidas, G. N., Caram-Salas, N. L., Ambriz-Tututi, M., Araiza-Saldana, C. I., Rocha-Gonzalez, H. I., Medina-Santillan, R., Reyes-Garcia, G., & Granados-Soto, V. (2008). Synergistic antiallodynic interaction between gabapentin or carbamazepine and either benfotiamine or cyanocobalamin in neuropathic rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 30(6), 431–441.

Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 558-564.

Murray CW, Porreca F, Cowan A. 1988. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. *J. Pharmacol. Methods* 20, 175–186.

Negrão L, Nunes P Portuguese Group for the Study of Peripheral Neuropathy. Uridine monophosphate, folic acid and vitamin B12 in patients with symptomatic peripheral entrapment neuropathies. *Pain Manage.* 2016;6:25–29.

Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci* 2002; 22: 7526–7535.

NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.* 22 de agosto de 2001. México.

Ohkubo T, Shibata M, Takahashi H, Inoki R. 1990. Roles of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 1261–1268.

Okada A, Koike H, Nakamura T, Watanabe H, Sobue G. Slowly progressive folate-deficiency myelopathy: report of a case. *J Neurol Sci* 2014; 336:273–275.

Ortiz, M. I., Castañeda-Hernández, G., Granados-Soto, V. (2005). Pharmacological evidence for the activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels by meloxicam in the formalin test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81, 725–731.

Ortiz, M. I., Granados-Soto, V., Castañeda-Hernández, G. (2003). The NO-cGMP- K^{+} channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76, 187–195.

Pérez-Cajaraville J., Abejón D., Ortiz J. R., Pérez J. R El dolor y su tratamiento a través de la historia. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 2005, 12(6): 373-384.

Pinardi G, Sierralta F, Miranda HF. Adrenergic mechanisms in antinociceptive effects of non steroidal anti-inflammatory drugs in acute thermal nociception in mice. *Inflamm Res.* 2002 May;51(5):219-22.

Pinardi G, Sierralta F, Miranda HF. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003 Feb;74(3):603-8.

Pini, L. A., Sandrini, M., Vitale, G. (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 308:31-40.

Puebla Díaz F. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S.: Dolor iatrogénico. *Oncología (Barc.)* 2005; 28(3):33-37.

Puig S, Sorkin LS. 1996. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64(2):345–355.

Raffa, R. B., Tallarida, R. J., Taylor, R., Jr, Pergolizzi, J. V., Jr. (2012). Fixed-dose combinations for emerging treatment of pain. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 13(9), 1261–1270.

Rang, H.P., Bevan, S., Dray, A. 1994. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. En: *Textbook of pain*. Wall, P. D., Melzack, R. (Eds). Churchill Livingstone, New York. pp. 57-78.

Raouf, R., Quick, K., Wood, J.N. 2010. Pain as a channelopathy. *J Clin Invest*. 120(11):3745-3752.

Rømsing, J., Møiniche, S., & Dahl, J. B. (2002). Rectal and parenteral paracetamol, and paracetamol in combination with NSAIDs, for postoperative analgesia. *British Journal of Anaesthesia*, 88(2), 215–226.

Russell, I. J., Fletcher, E. M., Michalek, J. E., McBroom, P. C., & Hester, G. G. (1991). Treatment of primary fibrositis/fibromyalgia syndrome with ibuprofen and alprazolam. A double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis and rheumatism*, 34(5), 552–560.

Salinas-Abarca AB, Avila-Rojas SH, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Granados-Soto V. Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity Kuhar, M. J., & Pasternak, G. W. (1984). *Analgesics: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives*. Nueva York: Raven Press. Drucker Colín, R., & Anías, C. J. (2005). En R. Drucker Colín, *Fisiología médica* (págs. 751-774). México: El manual moderno.

Scholz, J., Woolf, C.J. 2002.Can we conquer pain?. Nat Neurosci. 5 Suppl:1062-1067.

Schomberg D, Miranpuri G, Duellman T, Crowell A, Vemuganti R, Resnick D. Spinal cord injury induced neuropathic pain: molecular targets and therapeutic approaches. Metab Brain Dis. 2015; 30: 645–658.

Spector RG. 1972. Influence of folic acid on excitable tissues. Nat New Biol 240:247–249.

Stambaugh, J. E., Jr, & Drew, J. (1988). The combination of ibuprofen and oxycodone/acetaminophen in the management of chronic cancer pain. Clinical pharmacology and therapeutics, 44(6), 665–669.

Stanhewicz, A.E., & Kenney, W.L. (2017). Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function. Nutr. Rev. 75, 61–70.

Stover PJ. 2009. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. J Nutr 139:2402-2405.

Sugimoto M, Kuraishi Y, Satoh M, Takagi H. 1986. Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain. Neuropharmacology 25, 481–485.

Svensson CI, Yaksh TL. 2002. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. Annu Rev Pharmacol Toxicol 42:553–583.

Tallarida RJ. (2000). Drug synergism and dose-effect data analysis. CRC Press.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. 1997. Early nociceptive events influence the temporal profile, but not the magnitude, of the tonic response to subcutaneous formalin: effects with remifentanyl. *J Pharmacol Exp Ther* 280(2):876–883.

Tortorici V, Vanegas, H. (1994). Putative role of medullary off- and on-cells in the antinociception produced by dipyrone (metamizol) administered systemically or microinjected into PAG. *Pain*. 57(2):197-205.

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW et al. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, 2008;70(18):1630-1635.

Vardeh, D., Mannion, R. J., Woolf, C. J. (2016). Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. *The journal of pain*, 17(9 Suppl), T50–T69.

Varrassi, G., Hanna, M., Macheras, G., Montero, A., Montes Perez, A., Meissner, W., Scarpignato, C. (2017). Multimodal analgesia in moderate-to-severe pain: A role for a new fixed combination of dexketoprofen and tramadol. *Current Medical Research and Opinion*, 33, 1165–1173.

Veale, E. L., Al-Moubarak, E., Bajaria, N., Omoto, K., Cao, L., Tucker, S. J., Mathie, A. (2014). Influence of the N terminus on the biophysical properties and pharmacology of TREK1 potassium channels. *Molecular Pharmacology*, 85, 671–681.

Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci*. 2001; 21(20):8026-33.

Voilley, N. (2004). Acid-sensing ion channels (ASICs): New targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 3, 71–79.

Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, Finnell RH. 2013. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science* 339:1222002.

Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, Sun N, et al. 2007. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: A meta-analysis. *Lancet* 369:1876-1882.

Wang Y, Liu C, Guo QL, Yan JQ, Zhu XY, Huang CS, Zou WY. Intrathecal 5-azacytidine inhibits global DNA methylation and methyl- CpG-binding protein 2 expression and alleviates neuropathic pain in rats following chronic constriction injury. *Brain Res*. 2011; 1418: 64-69.

Wang, V. C., Mullally, W. J. (2020). Pain Neurology. *The American journal of medicine*, 133(3), 273–280.

Woolf, C.J. 2004. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann Intern Med*.140:441-451.

Yilmaz M, Aktug H, Oltulu F, Erbas O. Neuroprotective effects of folic acid on experimental diabetic peripheral neuropathy. *Toxicol Indust Health*. 2016;32:832–840.

Zhao R, Goldman ID. 2007. The molecular identity and characterization of a Proton-coupled Folate Transporter-PCFT; biological ramifications and impact on the activity of pemetrexed. *Cancer Metastasis Rev* 26:129-139.

Zimmermann M. 1983. The guidelines on ethical standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain*. 16:109-110.