

División Académica de Ciencias de la Salud



“EFECTO ANTIALODÍNICO DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS COMBINADOS CON UN ANTAGONISTA DE COLECISTOCININA (PROGLUMIDA) EN NEUROPATÍA DIABÉTICA EN RATA”

**Tesis que para obtener el diploma de la:
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas**

Presenta:

María Elena de la O de la O

Director:

Dra. en C. Isela Esther Juárez Rojop

Dra. en C. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura del
Área de Estudios
de Posgrado



Of. No. 0598/DACS/JAEP
02 de octubre de 2019

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

C. María Elena De la O De la O
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dra. Mirian Carolina Martínez López, M. en C. Crystell Guadalupe Guzmán Priego, Dr. Jorge Luis Blé Castillo, Dra. Alejandra Anlehu Tello y la Dra. Isela Esther Juárez Rojop, impresión de la tesis titulada: **"EFECTO ANTIALODÍNICO DE ANTIINFLAMTORIO NO ESTEROIDEOS COMBINADOS CON UN ANTAGONISTA DE COLECISTOCININA (PROGLUMIDA) EN NEUROPATÍA DIABÉTICA EN RATA"**, para sustento de su trabajo recepcional de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, donde fungen como Directoras de Tesis la Dra. Isela Esther Juárez Rojop y la Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña.

Atentamente



Dra. Mirian Carolina Martínez López
Directora

C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop.- Directora de Tesis
C.c.p.- Dra. Deysi Yadira Bermúdez ocaña.- Directora de Tesis
C.c.p.- Dra. Mirian Carolina Martínez López.- Sinodal
C.c.p.- M. en C. Crystell guadalupe Guzman Priego.- Sinodal
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- sinodal
C.c.p.- Dra. Alejandra Anlehu Tello.- Sinodal
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop.- Sinodal

C.c.p.- Archivo
DC'MCML/MO'MACA/lkrd*



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura del
Área de Estudios
de Posgrado



ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de **Villahermosa Tabasco**, siendo las **12:30** horas del día **19** del mes de **septiembre** de **2019** se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la **División Académica de Ciencias de la Salud** para examinar la tesis de grado titulada:

"EFECTO ANTIALODÍNICO DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS COMBINADOS CON UN ANTAGONISTA DE COLECISTOCININA (PROGLUMIDA) EN NEUROPATÍA DIABÉTICA EN RATA"

Presentada por el alumno (a):

De la O	De la O	María Elena
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)
Con Matricula		


1	0	2	E	1	9	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:

Maestro en Ciencias en Básicas Biomédicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

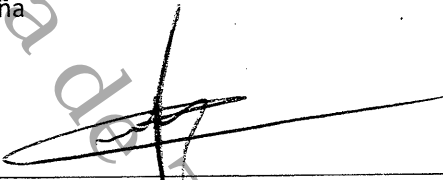
COMITÉ SINODAL



Dra. Isela Esther Juárez Rojop
Dra. Deysi Yadira Bermúdez Ocaña
Directora de Tesis



Dra. Mirian Carolina Martínez López




M. en C. Crystell Guadalupe Guzmán Priego



Dr. Jorge Luis de Castillo



Dra. Alejandra Anlehu Tello



Dra. Isela Esther Juárez Rojop

C.c.p.- Archivo
DC'MCML/MO'MACA/lkrd*



Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 12 del mes de septiembre del año 2019, el que suscribe, María Elena de la O de la O, alumna del programa de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, con número de matrícula 102E19006 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: "EFECTO ANTIALODÍNICO DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS COMBINADOS CON UN ANTAGONISTA DE COLECISTOCININA (PROGLUMIDA) EN NEUROPATÍA DIABÉTICA EN RATA", bajo la Dirección de la Dra. en C. Isela Esther Juárez Rojop Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31. El alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: ele_dela_o@hotmail.com. Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Elena de la O de la O

Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS DE LA SALUD



JEFATURA DEL ÁREA DE
ESTUDIOS Sello

ÍNDICE	PÁGINA
ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE GRÁFICAS	
LISTA DE TABLAS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1. Dolor.....	3
2.1.2. Nocicepción.....	3
2.1.2.3. Transmisión nociceptiva.....	4
2.2. Sensibilización.....	6
2.3. Clasificación del dolor.....	10
2.3.1. Dolor neuropático.....	10
2.3.1.1. Etiología del dolor neuropático.....	11
2.4. Diabetes.....	12
2.4.1. Neuropatía diabética.....	12
2.4.1.1. Vía del poliol.....	13
2.4.1.2. Productos de glicación avanzada.....	13
2.4.1.3. Receptores de AGEs	14
2.4.1.4. Proteína cinasa C	14
2.5. Colecistocinina (CCK).....	15
2.5.1. Distribución anatómica de la CCK.....	16
2.5.2. Papel pronociceptivo de la CCK.....	17
2.5.3. Relación del receptor CCK con la diabetes.....	18
2.6. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).....	18
2.6.1. Ketorolaco.....	20
2.6.1.1. Ketorolaco y dolor neuropático	20
2.6.2. Celecoxib.....	21
2.6.2.1. COX-2 y neuropatía diabética.....	21

3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. Objetivo General.....	25
5.2. Objetivos Específicos.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1. Animales de Experimentación.....	26
6.2. Fármacos.....	26
6.3. Inducción de diabetes.....	26
6.4. Diseño experimental.....	27
6.5. Análisis estadístico.....	33
7. RESULTADOS	
7.1. Inducción de la diabetes.....	34
7.2. Evaluación de la conducta dolorosa en la neuropatía diabética.....	34
7.3. Efecto antialodínico de ketorolaco en ratas con neuropatía diabética.....	35
7.4. Efecto antialodínico de celecoxib en ratas con neuropatía diabética.....	37
7.5. Efecto antialodínico de proglumida en ratas con neuropatía diabética.....	39
7.6.1. Dosis efectiva 30 (DE ₃₀) de ketorolaco y proglumida en ratas con neuropatía diabética.....	41
7.6.2. Combinaciones diseñadas para evaluar la interacción ketorolaco-proglumida en relación 1:1.....	42
7.6.3. Efecto antialodínico de la interacción ketorolaco-proglumida.....	43
7.6.4. Análisis estadístico.....	45
7.7.1. Dosis efectiva 30 (DE ₃₀) de celecoxib y proglumida en ratas con neuropatía diabética.....	46
7.7.2. Combinaciones diseñadas para evaluar la interacción celecoxib-proglumida.....	47
7.7.3. Efecto antialodínico de la interacción celecoxib-proglumida.....	48
7.7.4. Análisis estadístico.....	50
8. DISCUSIÓN	
8.1. Inducción de diabetes con STZ.....	52

8.2. Evaluación de la conducta dolorosa en ratas con neuropatía diabética.....	52
8.3. Efecto antialodínico de ketorolaco en ratas con neuropatía diabética.....	53
8.4. Efecto antialodínico de celecoxib en ratas con neuropatía diabética.....	54
8.6. Efecto antialodínico de la combinación ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética.....	56
8.7. Efecto antialodínico de la combinación celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética.....	57
9. CONCLUSIÓN.....	59
10. BIBLIOGRAFÍA.....	60

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
%A	Porcentaje de antinocicepción
%EMP	Porcentaje de efecto máximo posible
ABC	Área bajo la curva
ADA	Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association)
AGE	Productos finales de la glicosilación avanzada
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
AMPA	D-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propiónico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Ca ²⁺	Ión calcio
CDR	Curva dosis respuesta
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CLX	Celecoxib
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CREB (cAMP)	Monofosfato de adenosina cíclico

D	Diabéticas
DRG	Dorsal Root Ganglia. Ganglio de la raíz dorsal
e.e.	Error estándar
EP	Receptor a prostaglandina
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
FNT	Factor de necrosis tumoral
FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
g	Gramos
GABA	Ácido γ -amino butírico
GABA-R	Receptor a ácido γ -amino butírico
H ⁺	Ión hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Organización Internacional para el estudio del dolor (<i>International Association for the Study of Pain</i>)
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
K ⁺	Ión potasio
kDa	Kilo Daltons
Kg	Kilogramo
Log	Logaritmo
M3G	Morfina 3 glucorónido
M6G	Morfina 6 glucorónido
MAPK	Proteín cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-

	Activated Protein Kinases)
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
mg/dL	Miligramo por decilitro
Min	Minuto
mGluR	Receptor para Glutamato metabotrópico
NA ⁺	Ión Sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ND	No diabéticas
NK-1	Neurokinina 1
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPD	Neuropatía Diabética
NTX	Naltrexona
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PGA	Prostaglandina A
PGE ₂	Prostaglandina E 2
pH	Potencial de hidrógeno
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
RVM	Médula rostral ventromedial
SON	Sintasa del óxido nítrico
SNC	Sistema nervioso central

SNS/SNS2	Canales de sodio resistentes a tetrodotoxina
SNP	Sistema nervioso periférico
STZ	Estreptozotocina
TrkA	Tirosincinasa A
TrkB	Tirosincinasa B
VEH	Vehículo
VR1	Receptor vanilloide 1

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema del sistema de transmisión de los mensajes nociceptivos o dolorosos.	4
Figura 2. Representación de los mediadores químicos periféricos que participan en el daño tisular.	5
Figura 3. Esquema de la liberación de mediadores químicos y sus receptores específicos que participan en la sensibilización periférica.	7
Figura 4. Esquema de los mediadores químicos y sus receptores que participan en la sensibilización central.	9
Figura 5. Mecanismos por los cuales los AGEs causan disfunción neuronal.	15
Figura 6. Esquema de la estructura de pre-colecistocinina	16
Figura 7. Síntesis de prostaglandinas y prostaciclina a partir de ácido araquidónico	19
Figura 8. Estructura química del ketorolaco	20
Figura 9. Estructura química de celecoxib	21
Figura 10. Diseño experimental de la curva dosis respuesta por AINEs y un antagonista de CCK	28
Figura 11. Diseño experimental de la curva dosis respuesta de la DE ₃₀ del antagonista CCK (proglumida) combinado con las DE ₃₀ de cada AINE empleado	30
Figura 12. Isoblograma	32

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Conducta alodínica	27
Gráfica 2. Curso temporal de la conducta alodínica en ratas con neuropatía diabética.	34
Gráfica 3. Área bajo la curva (ABC) de la conducta alodínica en el modelo de neuropatía diabética.	35
Gráfica 4. Curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.p. de ketorolaco (10mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética.	36
Gráfica 5. Curva dosis respuesta del efecto antialodínico de Ketorolaco.	36
Gráfica 6. Porcentaje de máximo efecto posible (%EMP) de las dosis empleadas de ketorolaco.	37
Gráfica 7. Curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.p. de celecoxib (30mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética.	38
Gráfica 8. Área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de celecoxib en ratas con neuropatía diabética.	38
Gráfica 9. Porcentaje de máximo efecto posible (%EMP) de las dosis empleadas de celecoxib.	39
Gráfica 10. Curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.p. de proglumida (160mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética.	40
Gráfica 11. Área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de proglumida en ratas con neuropatía diabética.	40
Gráfica 12. Porcentaje de máximo efecto posible (%EMP) de las dosis empleadas de proglumida.	41
Gráfica 13. Curva dosis respuesta de ketorolaco y proglumida versus el logaritmo de la dosis.	42

Gráfica 14	Área bajo la curva (ABC) de la combinación ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	43
Gráfica 15	Curso temporal del efecto antialodínico de la co-administración de ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	44
Gráfica 16	Efecto antialodínico de la combinación ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	44
Gráfica 17	Curva dosis respuesta de la combinación ketorolaco-proglumida versus el logaritmo de la dosis.	45
Gráfica 18	Isoblograma que muestra la aditividad de ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	46
Gráfica 19	Curva dosis respuesta de Celecoxib y proglumida versus el logaritmo de la dosis.	47
Gráfica 20	Curso temporal del efecto antialodínico de la co-administración de celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	48
Gráfica 21	Área bajo la curva (ABC) de la combinación celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	49
Gráfica 22	Porcentaje de máximo efecto posible (%EMP) de las combinaciones Celecoxib-Proglumida.	49
Gráfica 23	Curva dosis respuesta de la combinación celecoxib-proglumida versus el logaritmo de la dosis.	50
Gráfica 24	Isoblograma que muestra la actividad sinérgica de celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética.	51

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Causas y subtipos de dolor neuropático.	11
Tabla 2	DE ₃₀ calculadas para ketorolaco y proglumida.	41
Tabla 3	Dosis obtenidas para el estudio de la interacción de la combinación ketorolaco-proglumida.	42
Tabla 4	Análisis estadístico de la interacción de ketorolaco-proglumida.	45
Tabla 5	DE ₃₀ calculadas para celecoxib y proglumida.	46
Tabla 6	Dosis obtenidas para el estudio de la interacción de la combinación ketorolaco-proglumida.	47
Tabla 7	Análisis estadístico de la interacción de celecoxib-proglumida.	50

RESUMEN

La neuropatía diabética es una complicación de la diabetes se define como el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial. Los analgésicos convencionales que alivian el dolor agudo no son efectivos en el dolor neuropático (Verdu *et al.* 2008). Este tipo de dolor se caracteriza por hiperalgesia (dolor aumentado a un estímulo doloroso) y alodinia (dolor a un estímulo inocuo). Estudios indican que ketorolaco y celecoxib reducen la nocicepción en dolor tipo inflamatorio y produce un efecto antialodínico en ratones diabéticos. Por otra parte, un antagonista de CCK disminuye la conducta de dolorosa en el dolor inflamatorio. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la combinación de celecoxib o ketorolaco con proglumida en ratas diabéticas. La experimentación se realizó en ratas Wistar macho de 280-320 g de peso. La diabetes se indujo con la administración de estreptozotocina (60 mg/Kg i.p.), tres días después se midió el nivel de glucosa sanguínea. Después, de la inducción de la diabetes se midió el umbral de retiro de la pata de la rata. La alodinia fue considerada en aquellos animales con valores de umbral de retiro de 4 g excluyendo aquellas con umbral mayor a este. Posterior a la determinación de alodinia. Se administró por vía i.p. celecoxib (0.3, 3, 10 y 30 mg/dl) y ketorolaco (0.3, 1, 3 y 10 mg/kg) o el antagonista de CCK (20, 40, 60 y 180 mg/kg) en la segunda parte de la investigación se administraron las combinaciones de cada uno de los AINEs con el antagonista de proglumida por vía i.p. celecoxib-proglumida (3.62, 7.25, 14.51 y 29.03 mg/kg) y ketorolaco-proglumida (3.77, 7.54, 15.08 y 30.17 mg/kg) en ratas diabética. Nuestros resultados sugieren que la administración sistémica de celecoxib, ketorolaco y proglumida redujeron la conducta dolorosa en ratas con neuropatía diabética, así como las combinaciones entre AINEs y proglumida.

1. INTRODUCCIÓN

La neuropatía diabética es una complicación de la diabetes se define como el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, IASP; 2011). Este tipo de dolor no tiene un tratamiento efectivo, por lo que los fármacos comúnmente prescritos como AINES, por sí solos o combinados con opioides, no son eficaces (Verdu et al. 2008). Además, el dolor neuropático se caracteriza por hiperalgesia y alodinia táctil. En modelos experimentales de diabetes se ha observado una disminución del umbral de retiro de la pata (por estimulación mecánica) (Mert T *et al.* 2009). Asimismo, se ha descrito que el aumento en la conducta dolorosa en ratas diabéticas es multifactorial, entre los cuales se proponen una disminución en la actividad del sistema gabaérgico, opiodérgico (Malcangio y Tomlinson, 1998; Torres-López 2007) y un aumento en el sistema CCKérgico, los cuales inducen la hiperalgesia en ratas mediados por dos receptores CCK1 y CCK2, localizados en el tubo digestivo y sistema nervioso central. Diversos estudios indican un aumento en la expresión del receptor CCK2 en el dolor neuropático, en condiciones de daño al nervio periférico (Kurrikoff et al., 2004). Existen evidencias farmacológicas de que los diabéticos con neuropatía dolorosa crónica son considerados refractarios al tratamiento con AINEs u opiáceos (Calcutt, 2002). Sin embargo, no existen suficientes datos experimentales que reporten el efecto de algunos AINES (ketorolaco y celecoxib) en combinación con inhibidores antagonista de CCK (proglumide) en dolor crónico producido en diabetes, como fármacos alternos para la disminución de la alodinia en dolor neuropático en ratas, lo cual puede ser de utilidad en el tratamiento del dolor en esta patología. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la combinación de celecoxib o ketorolaco con proglumida en ratas diabéticas. La experimentación se realizó en ratas Wistar macho de 280-320 g de peso. La diabetes se indujo con la administración de estreptozotocina (60 mg/Kg i.p.), tres días después se midió el nivel de glucosa sanguínea. Después, de la inducción de la diabetes se midió el umbral de retiro de la pata de la rata. La alodinia fue considerada en aquellos animales con valores de umbral de retiro de 4

g excluyendo aquellas con umbral mayor a este. Posterior a la determinación de alodinia se administró por vía i.p. celecoxib (0.3, 3, 10 y 30 mg/dl) y ketorolaco (0.3, 1, 3 y 10 mg/kg) o el antagonista de CCK (20, 40, 60 y 180 mg/kg). Por otra parte, se administraron las combinaciones de cada uno de los AINEs con el antagonista proglumida por vía i.p. celecoxib-proglumida (3.62, 7.25, 14.51 y 29.03 mg/kg) y ketorolaco-proglumida (3.77, 7.54, 15.08 y 30.17 mg/kg) en ratas diabética. Nuestros resultados sugieren que la administración sistémica de celecoxib, ketorolaco y proglumida redujeron la conducta dolorosa en ratas con neuropatía diabética. Además las combinaciones ketorolaco-proglumida y celecoxib-proglumida presentaron efecto antialodínico, sin embargo, solo se observó un sinergismo con celecoxib-proglumida.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2. ANTECEDENTES

2.1. Dolor.

El dolor es un indicativo normal de daño agudo al tejido, pero la intensidad del dolor que se experimenta a menudo no refleja la extensión real del daño (Wagner *et al.* 2013). Clínicamente se convierte en un síntoma que permite detectar e incluso determinar el grado de evolución de diferentes enfermedades. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *International Association for the Study of Pain*) define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede describirse en términos de la magnitud del daño (IASP, 1986).

2.1.2. Nocicepción.

El componente sensorial del dolor se denomina nocicepción y consiste de 4 procesos fisiológicos: transducción, transmisión, modulación y percepción (Figura 1) (Sorkin, 1997).

1. Transducción. Es la conversión de estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminaciones nerviosas periféricas.
2. Transmisión. Es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas.
3. Modulación. Alteración de las señales nociceptivas dentro del asta dorsal de la médula espinal. En ella se entrecruzan terminaciones nerviosas de diversos tipos que liberan neurotransmisores que inhiben, amplifican o alteran la señal sensorial.
4. Percepción. Es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor.

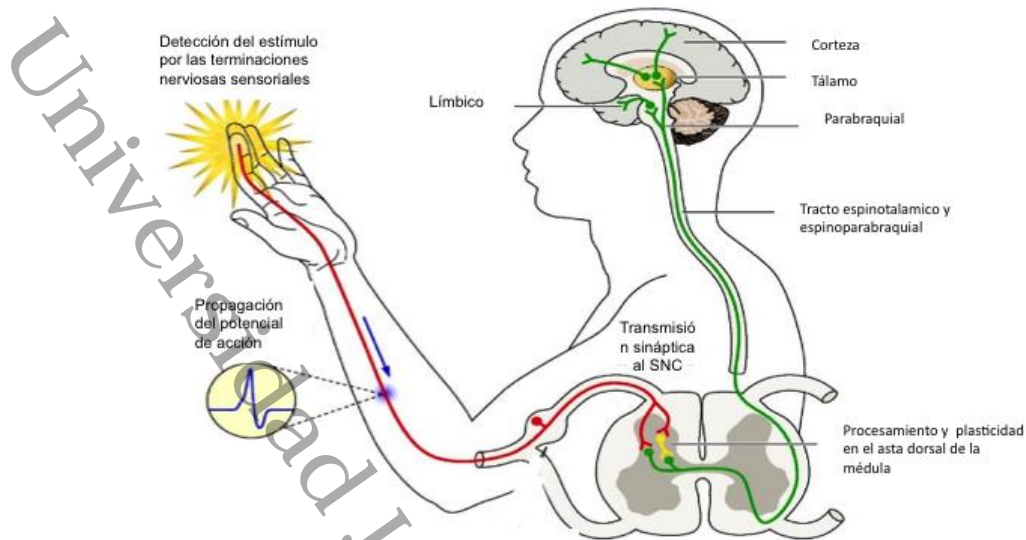


Figura 1. Esquema del sistema de transmisión de los mensajes nociceptivos o dolorosos.

2.1.2.3. Transmisión nociceptiva.

En condiciones fisiológicas cuando un organismo sufre una lesión, el estímulo nocivo o el daño tisular, induce la liberación de mediadores químicos que activan a los receptores específicos o canales iónicos que se localizan en la terminal periférica. Dentro de los mediadores químicos que se liberan se encuentran los iones H^+ y K^+ , aminas (serotonina, noradrenalina, histamina), citosinas (IL1, IL6), eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), cininas (bradicinina), en su conjunto se les denomina sopa inflamatoria (Figura 2). Asimismo, se liberan péptidos (sustancia P, somatostatina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina CGRP; por sus siglas en inglés) en la terminal periférica. Estas moléculas se sintetizan en las fibras aferentes primarias (Costigan M. y Wolf C., 2000). Además, la neurona aferente primaria contiene vesículas que almacenan aminoácidos excitatorios (aspartato, glutamato) y neuropéptido (galanina, somatostatina, colecistocinina) que se liberan después de un estímulo nocivo (Ferreira y Lorenzetti, 1996).

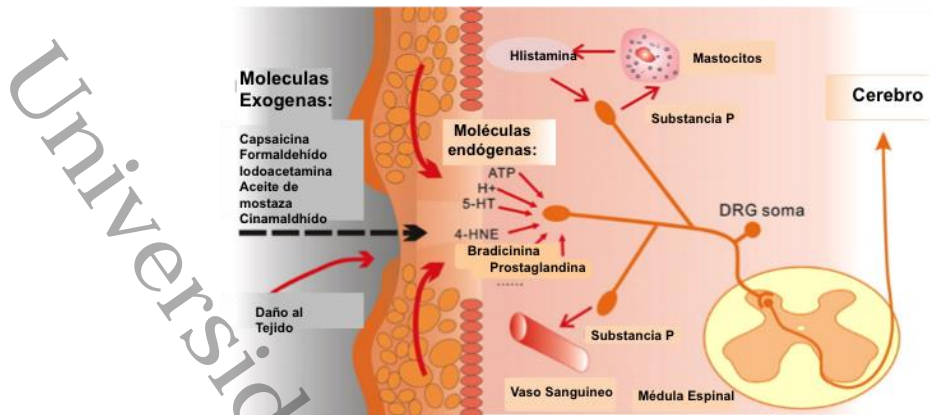


Figura 2. Representación de los mediadores químicos periféricos que participan en el daño tisular. NGF, factor neurotrófico; 5-HT, serotonina; ATP, trifosfato; CGRP, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Tomado de Julius y Basbaum, 2001).

Los mediadores químicos actúan directamente o indirectamente activando a sus receptores específicos localizados sobre la membrana del nociceptor. Otros mediadores se unen a receptores acoplados al sistema de proteínas G, este proceso activa a PKC y PKA y la liberación de segundos mensajeros ocasionando cambio en el potencial de membrana, generando una despolarización que se manifiesta con la presencia de potenciales de acción (excitabilidad) (Costigan *et al.* 2000; Julius y Basbaum, 2001).

La información nociceptiva se transmite de las neuronas aferentes primarias al asta dorsal de la médula espinal. En este sitio los axones penetran por la división lateral de la raíz dorsal, se bifurcan y ascienden o descienden por el fascículo de Lissauer. En el asta dorsal de la médula espinal (sustancia gris) la información hace relevo con interneuronas que convergen a través de cinco vías ascendentes principales o tractos: espinotalámico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotálamico y espinohipotálamico. Posteriormente, la información nociceptiva se transmite hacia áreas límbicas, talámicas y corticales para dar como resultado la percepción y conciencia de dolor (Besson, 1999; Millan, 1999; Scholz y Woolf, 2002).

También, la transmisión nociceptiva viaja de centros supraespinales hacia la médula espinal y luego a la periferia a través de la vía descendente inhibitoria y la vía descendente facilitatoria, la información se transmite hacia la médula espinal por el funículo dorsolateral y ventrolateral funicular. Se sabe que la médula espinal juega un papel importante en el control inhibitorio en el que se activan fibras A α y A β así como también interneurona GABAérgicas y opioidérgicas (Melzack y Wall, 1965; Hammond, 1997). En el efecto inhibitorio también participan regiones supraespinales como el hipotálamo, el núcleo parabraquial, el núcleo del tracto solitario, el núcleo del Rafé, la sustancia gris periacueductal y la médula rostroventromedial. De tal forma que las tres estructuras finales, participan de forma activa en la modulación del procesamiento nociceptivo mediante la activación de vías serotoninérgicas, noradrenérgicas, GABAérgicas, glutamatérgicas y CCKérgicas (Millan, 2002).

2.2. Sensibilización.

Una de las propiedades del sistema nervioso es la *Plasticidad* que consiste en la modificación de funciones, del perfil bioquímico o de estructura de acuerdo a las diferentes condiciones. La plasticidad es fundamental para el desarrollo de la hipersensibilidad al dolor, la cual se determina por los patrones particulares de activación, modulación y modificación (Kidd y Urban, 2001). La activación se refiere a la acción directa sobre el nociceptor, la modulación y la modificación involucran a otros componentes de la respuesta inflamatoria (Millan, 1999; Woolf y Salter, 2000).

La activación implica una despolarización rápida del nociceptor seguido por la inducción de potenciales de acción que da como resultado la modificación de la conductancia iónica del nociceptor.

Los mediadores químicos son capaces de estimular y sensibilizar al nociceptor (disminución del umbral). Se sabe que los mediadores químicos activan directamente a los nociceptores periféricos lo que genera un dolor espontáneo. Así

como otros actúan indirectamente en las células inflamatorias mediante la liberación de agentes que inducen dolor (algógenos) (Julius y Basbaum, 2001; Kidd y Urban, 2001).

El complejo mediador químico-receptor, mediante la activación de proteincinasas (PKC; PKA), tirosincinasa (TrkA) y de segundos mensajeros (aumento de calcio intracelular), modifican el umbral del nociceptor. Esto conduce a un aumento de las corrientes de Na^+ (Costigan *et al.* 2000; Bolay y Moskowitz, 2002). La sensibilización de la terminal periférica induce a un aumento en la expresión de canales de sodio SNS/SNS" y de receptores VR1, NK_1 , TrkB, GABA-R (cambios postrascricpcionales), así como también facilita la información en neuronas del asta dorsal a nivel presináptico generando el aumento de la liberación de neurotransmisores (Glutamato, GABA) y neuromoduladores (sustancia P, dinorfina, encefalina y BDNF; figura 4) (Woolf y Sater, 2000; Costigan *et al.* 2000).

Los cambios producidos en la terminal periférica por la sensibilización en su conjunto aumentan la excitabilidad de la neurona y facilitan la alteración en las corrientes iónicas, amplificando los potenciales de acción nociceptivos (sensibilización periférica) (Figura 3) (Costigan *et al.* 2000).

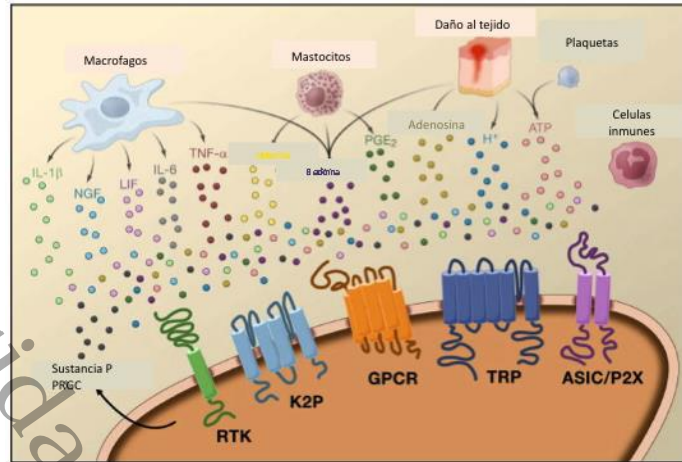


Figura 3. Esquema de la liberación de mediadores químicos y sus receptores específicos que participan en la sensibilización periférica. TNF, factor neurotrófico; IL6, interleucina 6; 5HT, serotonina PGE₂, prostaglandina E₂; IL1β, interleucina-1 beta; NGF, factor de crecimiento neural; ATP, adenosintrifosfato; H⁺ hidrogeniones; VR1, receptor vanilloide-1; H1, receptor a histamina-1; EP, receptor a prostaglandina E₂; B1/B2, receptor a bradicinina 1 y 2; IL1-R, receptor a interleucina-1; TrkA, receptor a tirocin cinasa A; P2X, receptores purinérgicos; ASIC, canal de ion sodio sensible a ácidos; Ca⁺², calcio; PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa A; TTXr, canales de sodio resistentes a tetrodotoxina; Sub P, sustancia P; TTXs, canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (Tomado de Costigan *et al.* 2000).

La modulación representa los cambios reversibles en la excitabilidad en las neuronas primarias, así como también en las neuronas secundarias. La modificación se refiere a las alteraciones en la expresión de neuronas nociceptivas en el asta dorsal que tienen la capacidad de responder con mayor intensidad a otro impulso proveniente de las fibras Aδ y C (Woolf y Salter; 2000).

La evidencia experimental sugiere que en condiciones de inflamación o daño al nervio el estímulo nocivo es permanente (duración e intensidad constante), lo cual genera un aumento en la capacidad de respuesta de las neuronas centrales que participan en la vía de transmisión del dolor (hipersensibilidad).

La sensibilización central se caracteriza por presentar un estado de sensibilidad elevada de las neuronas del asta dorsal, reduciendo el umbral de activación y aumentando su respuesta a la entrada sináptica después del daño del nervio (Woolf y Salter, 2000).

La hiperexcitabilidad en la médula espinal está caracterizada principalmente por la participación de glutamato (GLU) y sustancia P. El glutamato se une principalmente a sus receptores postsinápticos de tipo AMPA (α-amino 3 hidroxil-5metil-4-isoxasol-propiónico) y tipo kainato; produciendo potenciales rápidos postsinápticos excitatorios lo que induce a despolarizaciones rápidas a nivel central (Costigan *et al.* 2000; Bolay y Moskowitz, 2002). Además, el glutamato posee otros receptores, receptor Glu_m (glutamato tipo metabotrópico) y el receptor tipo NMDA (N-Metil-D-aspartato). En condiciones normales, la unión glutamato receptor a NMDA está obstaculizada por el magnesio. La activación de los receptores a NMDA y receptores Glu_m inducen potenciales lentos postsinápticos excitatorios, lo cual despliega un tipo de respuesta más prolongada (Figura 4) (Woolf y Salter, 2000; Costigan *et al.* 2000; Bolay y Moskowitz, 2002).

En la sensibilización central también participan los receptores peptidérgicos (NK1), receptores a prostaglandina E_2 (EP) y receptores a tirosincinasa (Trk), los cuales convergen en la activación de la vía PKC y en el aumento del calcio intracelular lo que genera un gradiente en la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal (Woolf *et al.* 2000).

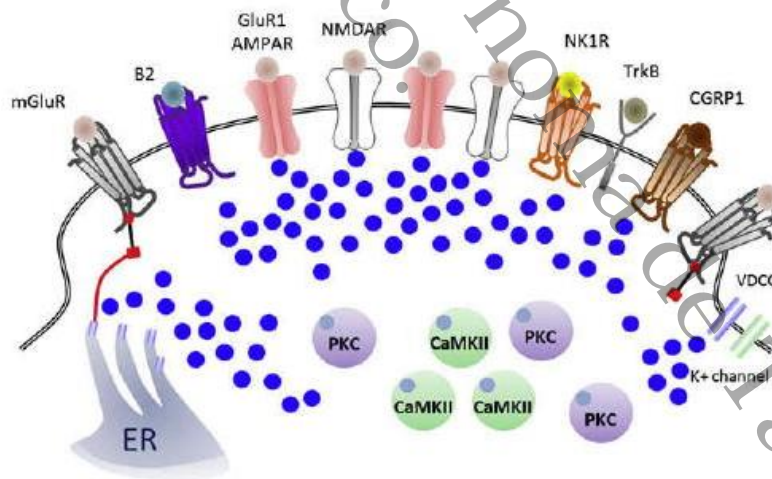


Figura 4. Esquema de los mediadores químicos y sus receptores que participan en la sensibilización central. Glut, glutamato; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; Ca^{2+} . Ión calcio, MAPK, mitogeno activado por proteína cinasa; Trk, receptor a tirosincinasa; IP3, fosfatidilinositol; PKC, proteína cinasa C; GLY, glicina; P2X, receptores purinérgicos; NMDA, (N-Metil-D-aspartato) (Modificado de Woolf y Salter, 2000).

La hipersensibilidad se manifiesta como una respuesta a un estímulo inocuo el cual puede ser percibido como doloroso (alodinia) y la respuesta exagerada a un estímulo nocivo produciendo un dolor mayor y persistente (hiperalgesia) (Merskey y Bogduk, 1994; Payne, 1986).

2.3. Clasificación del dolor

El dolor puede clasificarse en varios tipos: nociceptivo, inflamatorio, funcional y neuropático.

1. Nociceptivo: Ocurre en respuesta a un estímulo nocivo, es un dolor transitorio en respuesta a estímulos nocivos (Torres *et al.* 2006).
2. Inflamatorio: Que ocurre como consecuencia de daño tisular y la subsecuente respuesta inflamatoria; se caracteriza por hipersensibilidad al dolor (Costigan *et al.* 2009)
3. Funcional: Hipersensibilidad a dolor que es resultado de procesamiento central anormal.
4. Neuropático: Dolor espontáneo e hipersensibilidad a dolor en asociación con daño o lesión del sistema nervioso.

2.3.1. Dolor neuropático

El dolor neuropático es un dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial de acuerdo con IASP (2011). Las características clínicas del dolor neuropático pueden ser difíciles de reconocer en algunas de las polineuropatías dolorosas ya que el dolor puede ser generalizado e indistinto. Una característica común de dolor neuropático es la presencia de exacerbaciones episódicas de dolor como "tiro", "eléctrica" o "punzante"; pueden ser espontáneos o pueden ser desencadenados por ciertos estímulos, como el tacto, el movimiento o el frío (Scholz y Woolf, 2002; Bennett MI *et al.* 2005). El dolor neuropático se caracteriza por irregularidades sensoriales como sensaciones anormales y desagradables (disestesia), un incremento en la respuesta a estímulos dolorosos (hiperalgesia) y

dolor en respuesta a estímulos que normalmente son inocuos (alodinia) (Adams, 2012).

2.3.1.1. Etiología del dolor neuropático

Los mecanismos y la sintomatología del dolor neuropático es difícil establecer con la etiología, dado que hay varias causas y subtipos (Woolf, C.J. y Mannion, R.J., 1999) (Tabla 1).

Tabla 1. Causas y subtipos de dolor neuropático.

CLASE	SUBTIPO
<i>Lesión mecánica traumática</i>	Transección del nervio Causalgia Daño de la médula espinal Dolor post-quirúrgico Dolor de miembro fantasma Formación de una cicatriz
<i>Nutricional o metabólico</i>	Neuropatía alcohólica Beriberi Síndrome del pie quemante Diabetes
<i>Neurotoxicidad</i>	Vincristina Cisplatino Taxol Talio Arsénico Terapia con radiación
<i>Viral</i>	Neuralgia post-herpética Dolor por SIDA/VIH
<i>Función de los neurotransmisores</i>	Dolor por síndrome regional complejo
<i>Isquemia</i>	Síndrome talámico Dolor post-infarto
<i>Enfermedad (no viral)</i>	Esclerosis múltiple Neuralgia trigéminal Síndrome de Guillan-Barre Enfermedad de Fabrí Enfermedad Tangier Amiloide/Idiopático

2.4. Diabetes

La diabetes es un desorden metabólico que se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglicemia) debido a una deficiencia en la secreción, acción de la insulina o ambas (American Diabetes Association, 2016). Las dos clases principales de diabetes son la diabetes tipo 1: la cual es el resultado de la destrucción de las células β pancreáticas que lleva a una deficiencia absoluta de insulina y diabetes tipo 2: resulta de un déficit progresivo en la secreción de insulina que conlleva a una resistencia. La prevalencia mundial de esta enfermedad ha incrementado en los últimos años, afecta aproximadamente al 5% de la población mundial y se considera un problema de salud pública, ya que las complicaciones de la enfermedad limitan la calidad de vida de los pacientes que la padecen. En México, de cada 100 personas con diabetes, 14 presentan nefropatía, 10 neuropatía, 10 pie diabético, una de cada 3 termina en amputación, y 5 en ceguera. Además, las personas con diabetes tienen 3 veces más riesgo de cardiopatía, enfermedad cerebrovascular y trastorno depresivo, así como cambios de personalidad (De la Cruz-Cano y cols. 2015). Los pacientes con diabetes pueden presentar complicaciones como resultado de interacciones entre las anomalías metabólicas sistémicas como hiperglicemia, dislipidemia, moduladores genéticos y epi-genéticos y respuestas tisulares locales a metabolitos tóxicos (Geraldine y King, 2010), las complicaciones más comunes son retinopatía, nefropatía y neuropatía (American Diabetes Association, 2016).

2.4.1. Neuropatía diabética

Una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes es la neuropatía y está definida como signos y síntomas de disfunción del nervio periférico. Los estudios retrospectivos y prospectivos en pacientes han sugerido una relación entre la hiperglucemia, el desarrollo y la severidad de la neuropatía diabética (Vinik y Mehrabyan, 2004). La duración de la diabetes y el control metabólico son los dos principales predictores del desarrollo de la neuropatía y determinante de su gravedad. Los diferentes mecanismos para la patogénesis se dividen en dos

grandes subgrupos: anomalías que sugieren una etiología metabólica y una etiología vascular. A la fecha las hipótesis acerca de la patogénesis de la neuropatía diabética son la vía del poliol, PKC, productos de glicación avanzada y estrés oxidativo.

2.4.1.1. Vía del poliol

La vía del poliol está basada en una familia de enzimas aldosa reductasa. La glucosa es convertida a sorbitol por la enzima aldosa reductasa este a su vez es oxidado a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH), con NAD^+ como un cofactor. La aldosa reductasa es fundamental en tejidos como nervios, retina, lentes, glomérulos y célula vascular. En la mayoría de estos tejidos, el consumo de glucosa es mediada por GLUTs independiente de insulina incrementándose las concentraciones de glucosa intracelular en paralelo con la hiperglicemia (Giacco y Brownlee, 2011).

Existen evidencias que el incremento del estrés oxidativo debido al consumo de NADPH induce a la sobre expresión de aldosa reductasa en humanos aumentando la aterosclerosis en ratones diabéticos y reduciendo la expresión de genes que regulan la regeneración del glutatión (Vikramadithyan RK *et al.* 2005). La activación de la vía del poliol determina la acumulación intracelular de sorbitol, causando daño osmótico a las células vasculares (Stirban *et al.* 2008; Giacco y Brownlee, 2011).

2.4.1.2. Productos de glicación avanzada

La producción acelerada de productos de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés) en los tejidos causa daños como en los nervios periféricos. La producción intracelular de precursores de productos de la glicación avanzada daña las células a través de 4 mecanismos: (1) las proteínas intracelulares, incluyendo las proteínas involucradas en la regulación de la transcripción genética son modificadas; (2) los precursores AGEs salen de las células por difusión y modifican las moléculas de la matriz extracelular, estos cambios en la matriz provocan disfunción celular; (3) los precursores AGEs escapan del ambiente

intracelular, modificando las proteínas circulantes del flujo sanguíneo, alterando su función; y finalmente (4) las proteínas modificadas circulantes (de origen extra o intracelular) se pueden unir y activar a los receptores AGEs alterando la producción de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento que se vuelven responsables del daño celular y tisular (Stirban *et al.* 2008) (Figura 5).

2.4.1.3. Receptores de AGEs

Los AGEs interactúan con los receptores de la superficie celular induciendo una cascada de señalización intracelular. Los RAGEs están presentes en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), nervios periféricos, células de Schwann y fibras epidérmicas en roedores (Toth C *et al.* 2007). Los RAGEs son multiligandos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, son receptores de superficie celular que señalan a través de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3K), Ki-Ras activada por la vía mitógeno de proteína cinasa (MAPK) (Lukic IK *et al.* 2008). La activación transitoria de las vías PI-3K, AKT y MAPK conducen a la translocación nuclear de NF- κ B (Lukic IK *et al.* 2008; Vincent AM *et al.* 2007) responsable de la expresión de diferentes clases de genes, incluyendo citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α elevadas en el nervio ciático de ratones diabéticos y contribuyen al estado proinflamatorio de la neuropatía diabética (Bierhaus A *et al.* 2005). Los RAGEs también estimulan la NAD(P)H oxidasa, especies reactivas de oxígeno (ROS) que alteran a proteínas, lípidos y el ADN ocasionando daños a la neurona periférica (Vincent AM *et al.* 2007).

2.4.1.4. Proteína cinasa C

Las proteínas cinasas (PKC) son una familia de al menos 11 isoformas que están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. La actividad de las isoformas clásicas depende tanto de iones Ca^{2+} y fosfatidilserina, y es mucho mayor por diacilglicerol (DAG). La persistente activación de isoformas de PKC participa como una tercera vía mediando el daño al tejido inducido por las ROS inducidos por la diabetes. Dando como resultado un incremento de la síntesis de DAG a partir de glucosa a través de triosa fosfato, cuya disponibilidad se

incrementa porque el aumento de ROS inhibe la actividad de la enzima glicolítica GAPDH, aumentando los niveles intracelulares de los DAG precursores de triosa fosfato (Inoguchi T *et al.* 1992; Scivittaro V *et al.* 2000).

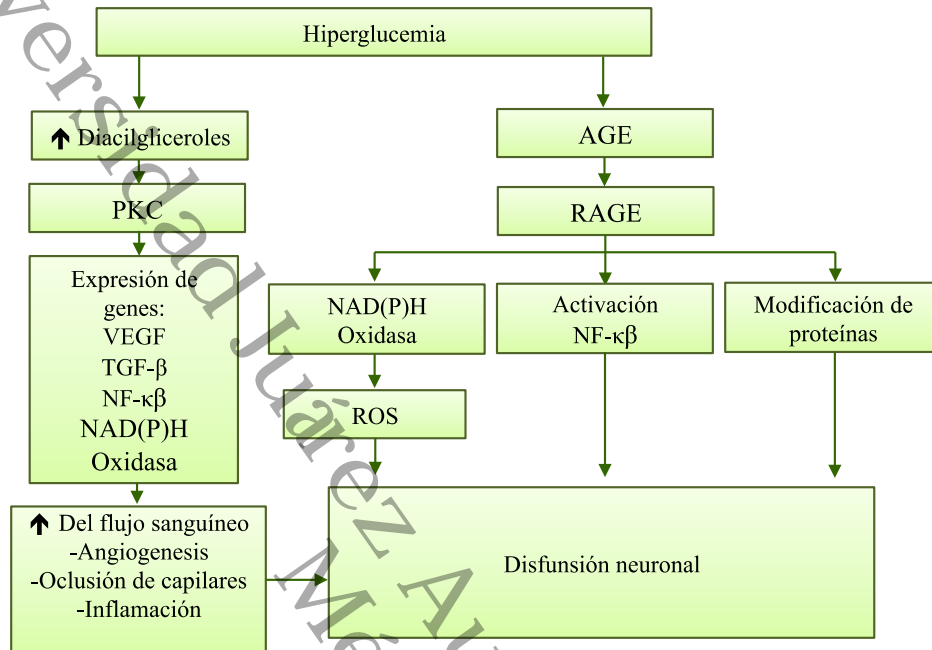


Figura 5. Mecanismos por los cuales los AGEs causan disfunción neuronal.

2.5. Colecistocinina (CCK)

La CCK es un neuropeptido inicialmente caracterizado como un péptido de 33 aminoácidos que están presentes en una variedad de formas moleculares biológicamente activas. La forma bioactiva de CCK tiene 83 aminoácidos la cual produce fragmentos bioactivos: CCK-58, CCK-33, CCK-22, CCK-8, CCK-7, CCK-5 y CCK-4, todas derivan de un precursor (pro CCK) constituido por 115 aminoácidos (Figura 6) (Rehfeld y Hansen, 1986).

En el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos se encuentra CCK-8 predominando la forma sulfatada CCK-8s (Asp-Tyr (SO₃H)-Met-Gly-Trp Met-Asp-Phe-NH₂). CCK está presente en muchas áreas del sistema nervioso central y es conocida por reducir la eficacia antinociceptiva de los opioides (Junesun Kim *et al.* 2015). La acción biológica de CCK está mediada por dos receptores distintos, originalmente denominados por su distribución anatómica CCK_A (alimentary),

CCK_B (brain) o bien CCK₁ y CCK₂, se sitúan en el tubo digestivo y en el SNC respectivamente (Moran y *et al.* 1986; Dourish y cols., 1990; Noble *et al.* 1999).

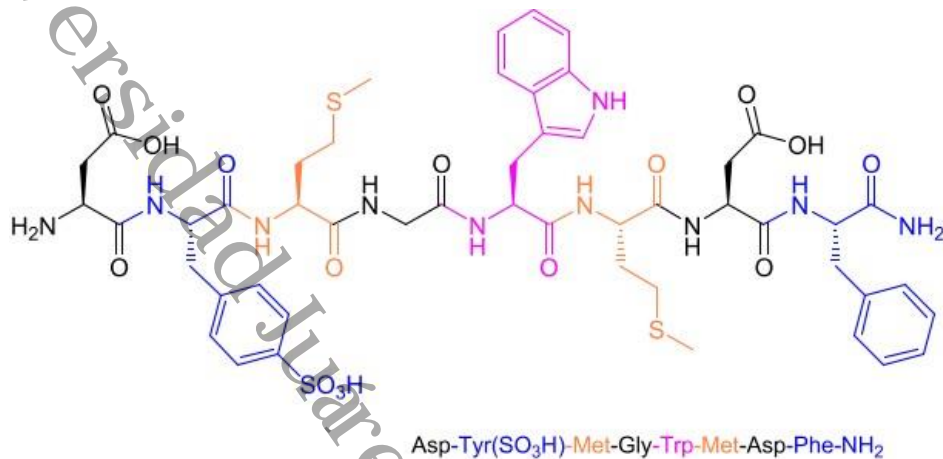


Figura 6. Esquema de la estructura de pre-colecistocinina

El receptor CCK₂ pertenece a la familia de rodopsina que están acoplados a proteínas G (Archer y cols., 2003). Este receptor CCK₂ activa a proteínas Gq/11 y consecuentemente a fosfolipasa C lo que produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol. Estos a su vez generan la liberación de Ca²⁺ intracelular y la activación de proteína cinasa C, disminuyendo la conductancia de canales de K⁺ y aumentando la entrada de Ca²⁺ (Fukazawa et al, 2007; Berridge y Irving, 1989), lo que produce una despolarización en la neurona e induce a la generación de aumento en los potenciales de acción (Kelly y Larkman, 1989).

2.5.1. Distribución anatómica de la CCK

La distribución anatómica de CCK se distribuye a nivel supraespinal en neuronas de la sustancia gris periacueductal, tálamo, corteza cerebral y amígdala (Williams *et al.* 1987; Schiffmann *et al.* 1991). En la médula espinal CCK se localiza en el

asta dorsal proveniente de interneuronas de la lámina II y III (Skirboll *et al.* 1983; Maciewicz *et al.* 1984; Dickenson, 1997; Noble y Roques, 1999). La CCK a nivel periférico se localiza en fibras aferentes primarias después de un proceso inflamatorio (Schäfer *et al.* 1998), por lo que es probable que la CCK se sintetice en las neuronas aferentes primarias y células inmunes que participan en la inflamación (Antunes *et al.* 1999). En condiciones normales, la CCK endógena sigue una distribución anatómica similar al sistema opioide desde sitios supraespinales, asta dorsal y nivel periférico (Crawley y Corwin, 1994; Millan, 2002) hasta el sistema gastrointestinal (Bing Cao *et al.* 2012). Existen evidencias que CCK participa activamente en el dolor en condiciones de daño al nervio ya que su expresión se eleva bajo estas condiciones (Junesun Kim *et al.* 2015).

2.5.2. Papel pronociceptivo de la CCK

Además de la función de CCK como antiopioide, posee acción como pronociceptivo, debido a que contribuye al aumento de la conducta nociceptiva en ratas evaluadas con diferentes modelos de dolor (Ossipov *et al.* 2003).

Existen estudios farmacológicos que demuestran que la administración de CCK a nivel espinal y supraespinal en ratas sanas produce hiperalgesia térmica y táctil, lo que sugiere que la conducta hiperalgésica inducida por CCK puede ocurrir mediante la activación del receptor CCK₂ y además activa la vía facilitatoria descendiente del dolor de la médula rostroventromedial (Timothy M. Marshall *et al.* 2012; Kovelowski *et al.* 2000; Xie *et al.* 2005).

Se sabe que CCK contribuye en el aumento de la conducta hiperalgésica en modelos de dolor inflamatorio, dolor neuropático y neuropatía diabética (Coudare-Civiale *et al.* 2000; Friedich y Gebhart, 2003). Y de manera similar en condiciones de daño al nervio existe una sobre expresión de la CCK y una activación de los receptores CCK₂, lo que conduce a un aumento en la conducta dolorosa (hiperalgesia térmica y alodinia táctil) (Xu *et al.* 2001). Por otra parte, se conoce que CCK participa en el dolor neuropático, en el dolor inflamatorio y en el estrés,

debido a que induce cambios en los niveles y síntesis del receptor a opioides μ (Wiertelak *et al.* 1992; Schäfer *et al.* 1998; Millan, 2002), dicho aumento es capaz de bloquear el control del sistema opioide endógeno y exógeno (efecto antiopioide; McNally, 1999).

2.5.3. Relación del receptor CCK con la diabetes

Diversos estudios muestran que existe un aumento en la expresión del receptor CCK₂ en condiciones de daño al nervio periférico, en el dolor neuropático en ratas con mononeuropatía (Antunes *et al.* 1999; Coudare-Civiale *et al.* 2000) y en la génesis del dolor neuropático en la diabetes. Las evidencias experimentales indican que la administración de antagonistas de CCK2 a nivel supraespinal, espinal y sistémica aumenta el efecto antinociceptivo de morfina, en cambio, dicho efecto no se modifica con antagonistas del receptor del CCK1 (Yamamoto *et al.* 1996; Koveloski *et al.* 2000; Yaguo *et al.* 2009). Tales evidencias proponen que la interacción CCK-opioide está mediada por el receptor CCK2 (Noble y Roques, 1999).

Por otra parte, la co-administración de antagonistas del receptor CCK2 y morfina en el dolor neuropático y la neuropatía diabética, aumenta el efecto antinociceptivo de morfina y reduce la conducta hiperalgésica (Courtiex *et al.* 1994; Courtiex *et al.* 1997; Idäpään-Heikkilä *et al.* 1997; Coudare-Civiale *et al.* 2000). También, algunos estudios proponen que la administración de antagonistas de CCK2 por vía intratecal e intracerebroventricular en ratas diabéticas disminuye de manera significativa la hiperalgnesia y la alodinia (Coudare-Civiale *et al.* 2000; Kamei *et al.* 2001).

2.6. Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs)

Los AINEs tienen su origen en los extractos de plantas (entre ellas el árbol de sauce) que contienen salicilato, al que se le atribuyen propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias (Pountos *et al.* 2011). Su modo de acción fue descubierto hasta la década de 1970, cuando Sir John Vane demostró la inhibición

de la producción enzimática de prostaglandinas por los AINEs (Puzas JE et al. 2003) catalizando la conversión de ácido araquidónico a activos biológicos (prostaglandinas y troboxanos) (B. F. Mcadam et al. 1999) principal mecanismo de acción de las ciclooxigenasa-1 y 2 (COX-1 y COX-2 respectivamente) (Figura 7). Actualmente se considera que COX-1 es constitutiva en muchas células normales (Kim HS et al. 2013) y está presente en la mayoría de los tejidos, es responsable de algunos procesos como la regulación homeostática celular y la regulación del tono vascular. COX-2 se expresa mediante la liberación de citocinas inflamatorias (Kellog et al. 2008). Se sabe que COX-3 posee una alta sensibilidad al acetaminofén; además, recientemente se reportó que hay una mayor expresión de COX-3 en el cerebro y el corazón (Zarghi y Arfaei, 2011). Aunque los AINEs tienen estructuras químicas distintas, algunos tienen efectos terapéuticos similares (Rainsford KD., 1999).

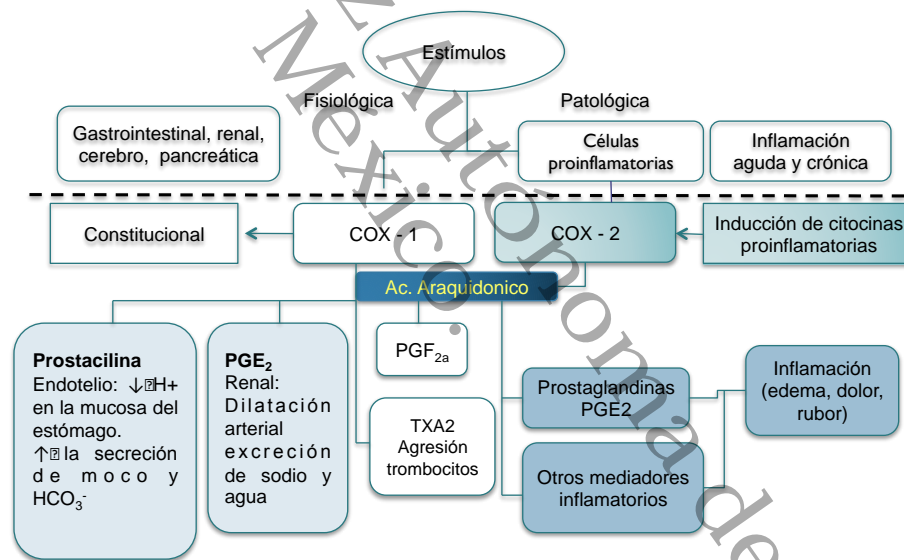


Figura 7. Síntesis de prostaglandinas y prostacilinas a partir de ácido araquidónico.

Las estructuras proteicas de COX-1 y COX-2 tienen una homología de aproximadamente 60% en su secuencia de aminoácidos (Smith *et al.* 1996). La diferencia estructural entre los sitios activos de COX-1 y COX-2 es una sustitución del aminoácido valina en la COX-2 por isoleucina en la COX-1 en la posición 523. La presencia de valina en la COX-2, con su cadena lateral más pequeña, forma

una bolsa lateral donde se pueden acomodar compuestos que poseen una cadena lateral voluminosa como la de los inhibidores de dicha enzima (Celecoxib, Refecoxib, Meloxicam, etc.) (Simmons *et al.* 2004; Smith *et al.* 1996).

2.6.1. Ketorolaco

El ketorolaco es un derivado del ácido 5-bencil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-carboxílico. Es una mezcla racémica de una relación equimolar de estereoisómeros R (+) y S (-) (Figura 8). (R. E. Kauffman cols., 1999) La actividad farmacológica de ketorolaco reside casi exclusivamente en el estereoisómero S(-) (W. H. Rooks II *et al.* 1982).

El ketorolaco es un AINE, potente analgésico con actividad inhibitoria preferente de COX-1 que ha sido desarrollado para uso oral y parenteral.

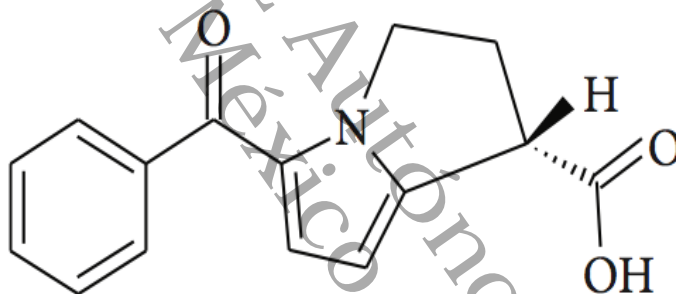


Figura 8. Estructura química del Ketorolaco

2.6.1.1. Ketorolaco y dolor neuropático

Existen evidencias que sugieren que ketorolaco tiene efecto antinociceptivo. La administración de ketorolaco por vía intraperitoneal disminuyó el comportamiento nociceptivo en un modelo de dolor inflamatorio orofacial en ratas (Padi 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la inyección de ketorolaco por vía intratecal disminuye la dimensión del daño al nervio espinal en un modelo de isquemia de medula espinal en ratas (Hsieh YC *et al.* 2005). Además, se ha utilizado en modelos neuropatía por constricción del nervio (Ma *et al.* 2003) y en el dolor neuropático por cáncer de mama (Kausar *et al.* 2006).

2.6.2. Celecoxib.

El celecoxib es un miembro de la familia de los Coxib caracterizado por una estructura tridimensional de moléculas para proporcionar selectividad a COX-2 su compuesto 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1il]bencenosulfonamida (Figura 9). Celecoxib el cual inhibe selectivamente a COX-2 se desarrolló principalmente por su eficacia como antiinflamatorio y para reducir el riesgo de lesiones gastrointestinales en pacientes que requieren alivio del dolor y la inflamación (Afshin Zarghi y Sara Arfaei, 2011).

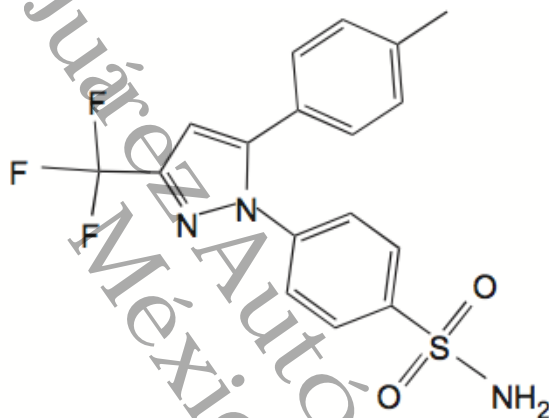


Figura 9. Estructura química de celecoxib

2.6.2.1. COX-2 y neuropatía diabética

Alteraciones en la actividad de la ciclooxigenasa están implicadas en la patogénesis de la neuropatía diabética experimental (Pop-Busui *et al.* 2002). Las prostaglandinas generadas por COX-2 en la médula espinal contribuyen al mantenimiento de la hiperalgesia, ya que los prostanoides sensibilizan las terminales nerviosas periféricas (Durrenberger *et al.* 2006). Estudios indican que la interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6 y el factor de necrosis tumoral- α (FNT- α) inducen hiperactividad de las neuronas del asta dorsal que conduce a la hipersensibilidad. La administración intratecal de IL-1 β produce un incremento en los niveles de

ARNm de COX-2 en la médula espinal. La perfusión espinal de IL-1 β , IL-6, FNT- α también activa la producción del factor CREB (del inglés cAMP response element-binding), el cual es crítico para la transcripción de genes pronociceptivos en las neuronas del asta dorsal (Yeong-Ray *et al.* 2011).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es un desorden metabólico que constituye un problema de salud pública. Se estima que 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. En 2015 la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes (Organización Mundial de la Salud, 2005; Asociación Americana de Diabetes, 2016). En México se alcanzó un índice de fallecimiento a causa de la diabetes mellitus de 105, 574 en el 2016 (INEGI, 2016). En el 2017 el INEGI señala como tercera causa de muerte en Tabasco las enfermedades cardiovasculares entre las que destaca la diabetes mellitus. Aproximadamente el 50% de los pacientes diabéticos manifiestan sensaciones dolorosas anormales (dolor espontáneo, parestesias, disestesias, hiperalgesia o alodinia) hasta que se establece la neuropatía. Incluso en aquellos que toman las dosis máximas de moduladores de dolor y analgésicos, el alivio del dolor es usualmente incompleto (Morales-Vidal *et al.* 2012). Actualmente en el manejo del dolor neuropático se utilizan coadyuvantes como antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos o la combinación con medicamentos indicados para el dolor agudo (AINEs). Por lo tanto, las investigaciones en el campo del dolor están dirigidas a la búsqueda de fármacos o combinaciones de los mismos cuya acción contribuya a la disminución del dolor crónico. En los últimos años, las evidencias farmacológicas, han mostrado que CCK participa en la diabetes a nivel supraespinal, espinal y periférico a través de su receptor CCK₂. Por otra parte, ketorolaco se ha utilizado en modelos neuropatía por constricción del nervio (Ma y Eisenach, 2003) y en el dolor neuropático por cáncer de mama (Kausar y cols., 2006). Además, se sabe que el Celecoxib es un inhibidor selectivo de ciclooxigenasa-2 (COX-2) disminuye el dolor neuropático en ratas diabéticas. Sin embargo, investigaciones que involucren las combinaciones de proglumida con ketorolaco o celecoxib no han sido realizadas. En este estudio se evaluará el efecto antialodínico de proglumida, ketorolaco y celecoxib, además de las combinaciones ketorolaco-proglumida y celecoxib-proglumida y sus interacciones en ratas con neuropatía diabética.

4. HIPOTESIS

La combinación de AINES (ketorolaco, celecoxib) con el antagonista de receptores CCK (proglumida) reduce la alodinia en ratas con neuropatía diabética.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antialodínico de la combinación de AINES (ketorolaco, celecoxib) y el antagonista de CCK (proglumida) en ratas con neuropatía diabética.

5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto antialodínico de la administración intraperitoneal de ketorolaco y celecoxib en ratas con neuropatía diabética.
2. Evaluar el efecto antialodínico de la administración intraperitoneal del antagonista CCK (proglumida) en ratas con neuropatía diabética.
3. Evaluar el efecto antialodínico de la co-administración intraperitoneal de ketorolaco y celecoxib con el antagonista CCK (proglumida) en ratas con neuropatía diabética.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales de Experimentación

Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso de 200 – 250 g provenientes del bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales permanecieron en condiciones ambientales estándares del bioterio con temperatura entre 20 – 22 ° C, ciclo 12 horas luz/ oscuridad, con acceso libre a la comida y agua. Las ratas se utilizaron una sola vez y al término del experimento se sacrificaron en una cámara saturada con CO₂. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos para el cuidado de animales de laboratorio y las guías éticas para la investigación del dolor experimental en animales conscientes (Zimmermann, 1983).

6.2. Fármacos

Los fármacos empleados en este trabajo se seleccionaron mediante lo descrito en la literatura relacionado con la conducta nociceptiva. La Estreptozotocina (STZ), ketorolaco y el antagonista del receptor a CCK (proglumide) se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO, USA). El celecoxib fue adquirido en Merck (Merck. S.A de C.V. México D.F.).

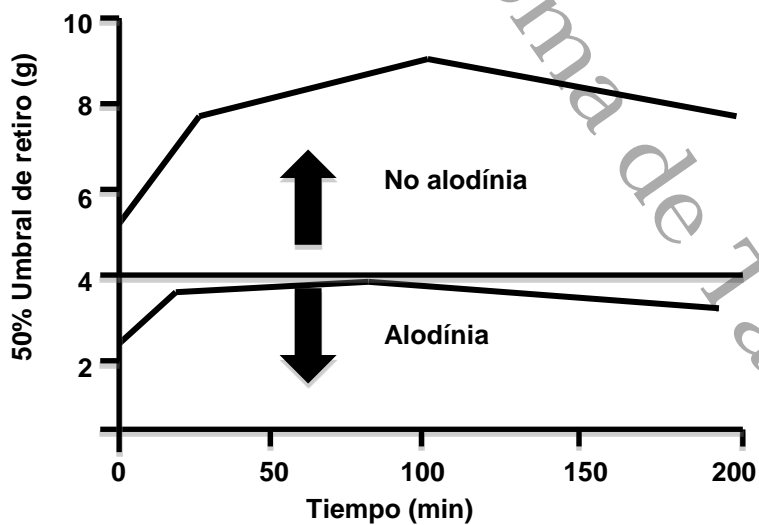
6.3. Inducción de diabetes

La diabetes se indujo mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ, 60mg /Kg) a un pH de 3.5. Al cuarto día de la administración de STZ se determinó el nivel de glucosa en sangre, que se extrajo por punción directa de la vena caudal con un glucómetro ACCU-CHEK® Performa (Roche, México). Las ratas que presentaron niveles de glucosa igual o mayor de 250mg/dl, (14 mM) se consideraron diabéticas, de acuerdo a lo reportado por

Courteix *et al.* 1993. El nivel de glucosa se midió cada semana durante 4 semanas después de la administración de STZ.

6.4. Diseño experimental

En este estudio se utilizaron 2 grupos principales: ratas diabéticas y no diabéticas. En las ratas diabéticas se evaluaron las curvas dosis respuesta para los fármacos, administrados intraperitoneal (i.p.) ketorolaco (0.3, 1, 3 y 10 mg/kg), celecoxib (0.3, 3, 10 y 30 mg/kg) y proglumida (20, 40, 80, 160 mg/kg). Las ratas no diabéticas fueron evaluadas para la obtención de controles. Asimismo, para comprobar que los vehículos solución salina (s.s) y polietilenglicol no modifican *per se* la conducta dolorosa, en el modelo de neuropatía diabética se administró a un grupo de ratas diabéticas polietilenglicol (300µL) y a otro s.s por vía i.p. (300µL), y un grupo de ratas diabéticas a las que no se le administró ningún fármaco. En el tiempo cero o previo a la administración de los fármacos, se evaluó la conducta alodínica mediante una serie de respuestas positivas y negativas a través de la estimulación mecánica con filamentos de Von Frey (Gráfica 1), se consideró a esta evaluación como la respuesta dolorosa basal. Después de 30 minutos de la administración de los fármacos se evaluó la conducta dolorosa durante un periodo de 210 minutos, cada 30 minutos. Se utilizaron por lo menos 6 ratas por cada dosis (Figura 10).



Gráfica 1. Conducta alodínica.

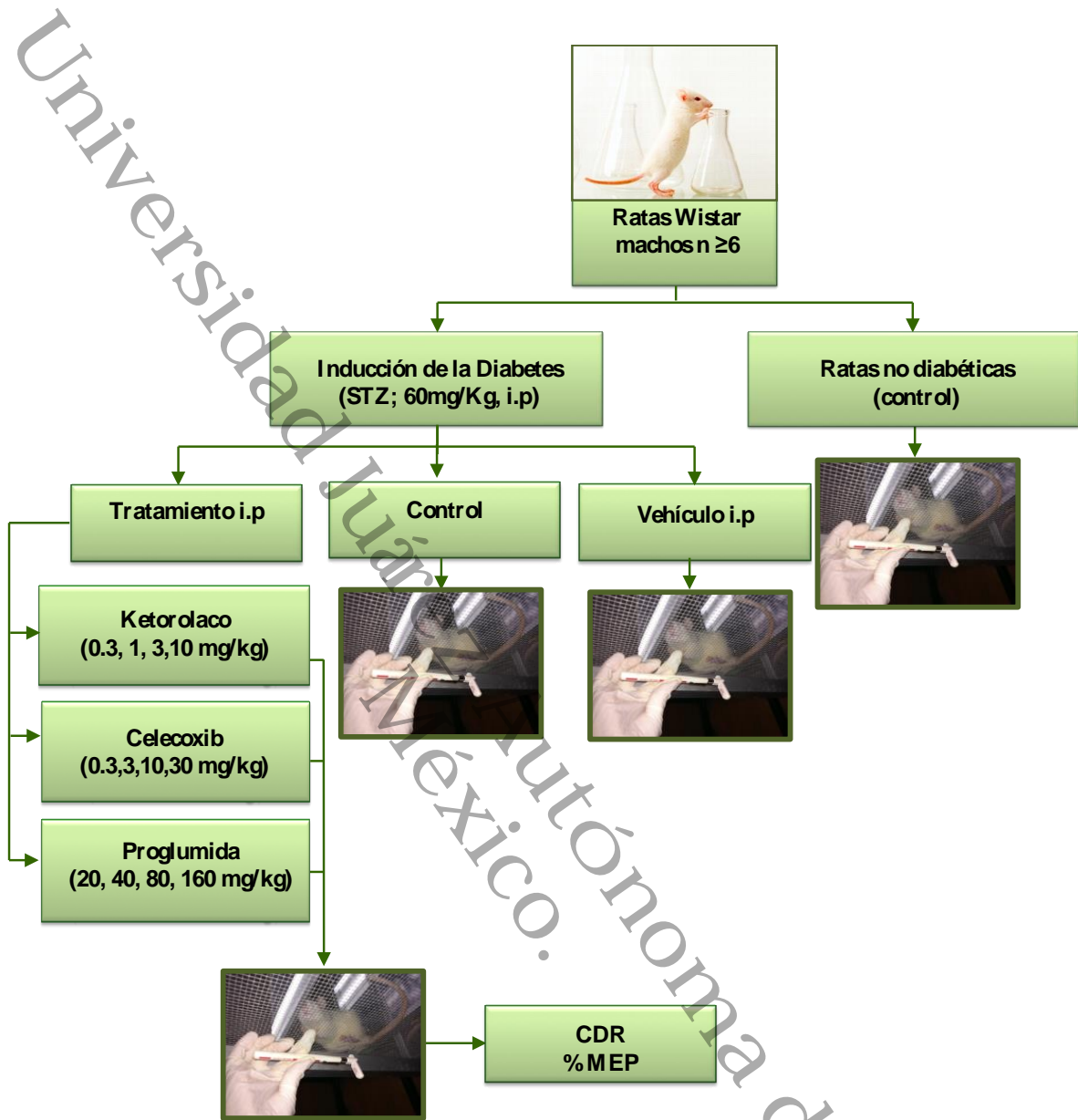


Figura 10. Diseño experimental de las curvas dosis respuesta por AINEs y un antagonista de CCK

En la segunda parte de la investigación para demostrar una posible interacción entre el ketorolaco – proglumida y celecoxib - proglumida, se realizó el análisis isoblográfico, que inicia con la utilización del % del máximo efecto posible (%EMP) de cada uno de los fármacos administrados, obtenidos de la CDR de

cada AINEs (ketorolaco, celecoxib) con la dosis del antagonista del receptor de CCK (Proglumida) por vía i.p.

El efecto antialodínico fue expresado como el porcentaje del efecto máximo posible (%MEP) y calculado como:

$$\% \text{ MPE} = \left[\frac{\text{ABC}_{\text{fármaco}} - \text{ABC}_{\text{vehículo}}}{\text{ABC}_{\text{ND}} - \text{ABC}_{\text{vehículo}}} \right] * 100$$

Se calculó la dosis efectiva 30% de máximo efecto antialodínico posible mediante el análisis de regresión lineal de las curvas dosis respuesta. Se empleó la DE₃₀ para los fármacos ketorolaco y el celecoxib. Con la finalidad de evaluar la vía CCK en adicional al efecto que tengan los AINEs en estos modelos de dolor neuropático para lo que se utilizaron ratas diabéticas. Después de cada combinación administrada se esperó 30min previo a la evaluación de la conducta alodínica. Se utilizaron por lo menos 6 ratas por combinación (Figura 11).

Para determinar el efecto antialodínico de la combinación ketorolaco-proglumida se utilizaron cuatro grupo de ratas diabéticas (n=6) de igual forma se utilizó cuatro grupo de ratas para la evaluación de la combinación celecoxib-proglumida por vía i.p. en orden crecientes.

De los datos obtenidos de la combinación se construyeron gráficas de curva dosis respuesta y se calculó el valor de la DE₃₀ de la combinación (DE₃₀ experimental) y la DE₃₀ teórica conforme a lo reportado por Tallarida (2000).

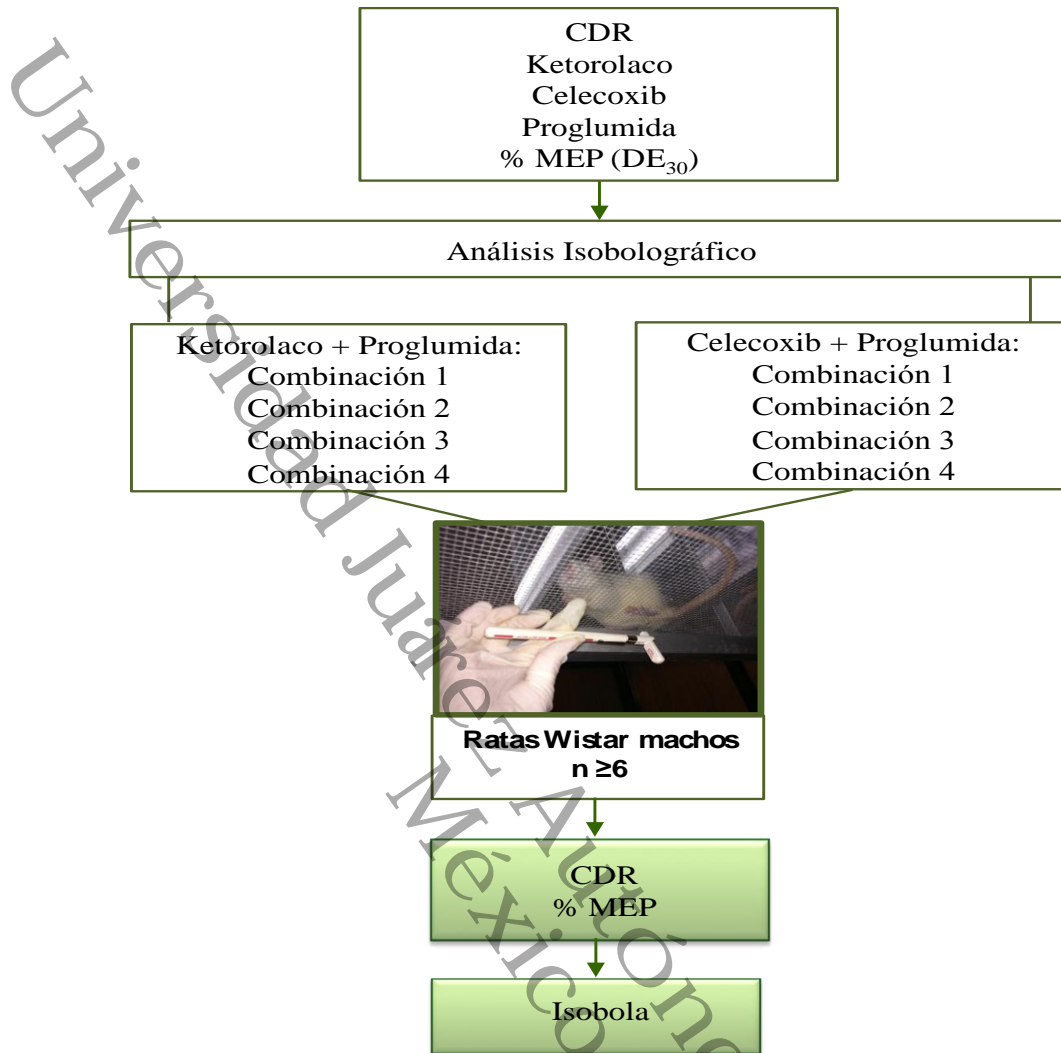


Figura 11. Diseño experimental de las curvas dosis respuesta de las DE_{30} del antagonista CCK (proglumida) combinado con las DE_{30} de cada AINE empleado.

6.6. Análisis de datos

En todos los casos los datos se representan como el valor de la media \pm el error estándar de una muestra para cada grupo experimental ($n=6$).

Análisis de alodinia táctil

Se determinó el 50% de umbral de retiro empleando el método de Dixon (1980). Este valor se define como la intensidad de estímulo requerido para producir el

50% de las aplicaciones para cada animal. En el paradigma arriba abajo, la prueba se inició con el filamento de 4.31g, de Von Frey con incrementos logarítmicos de rigidez o dureza; ascendiendo o descendiendo en función de la respuesta del animal (Dixon, 1980; Chaplan *et al.* 1994).

Se midió el umbral de retiro tomando como respuesta positiva el retiro de la pata estimulada en un lapso de 20 segundos, denotándose con un símbolo “x”. La respuesta negativa es aquella en la que al estimular la pata esta no es retirada y fue registrada con un símbolo “o”. Después del primer cambio se llevó a cabo la estimulación otras 4 veces, tomando una serie de 6 patrones de respuestas y el último filamento utilizado. La estimulación se llevó a cabo a tiempos de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos después de administrar los fármacos (Figura 11). Los patrones de resultado de respuesta se tabularon y el 50% de umbral de respuesta se calculó usando la fórmula:

$$50\% \text{ Umbral (g)} = 10 [Xf+k\delta]/10,000$$

Xf: Valor del último filamento de Von Frey usado (unidades logarítmicas).

k: Valor tabulado con base en el patrón de respuestas positivas y negativas.

δ: Diferencias de promedio entre estímulos (unidades logarítmicas).

Análisis isobolográfico

Una herramienta importante para discernir el tipo de interacción presente en las concentraciones es el isoblograma (Tallarida, 2000). Este es un método gráfico que recurre al empleo de pares de dosis equiefectivas para obtener un determinado nivel de efecto (isobolas) y ofrece una evaluación visual del comportamiento de la combinación al establecer una línea de aditividad que surge del nivel de efecto determinado para cada fármaco individual en el presente trabajo el nivel elegido fue el de 30%, por lo que las DE₃₀ tanto de ketorolaco, celecoxib y proglumida se determinaron a través de curvas dosis respuesta.

Posteriormente se crea una curva dosis respuesta experimental que contiene combinaciones de ambos fármacos en la proporción establecida y se calcula la dosis correspondiente al valor determinado del 30% (DE_{30E}), que luego se compara con la DE_{30T} . El isoblograma muestra los resultados en una gráfica cuyas coordenadas representan la contribución de cada fármaco (Figura 12). La línea que conecta todas las combinaciones aditivas posibles y el centro de dicha línea corresponde a la DE_{30T} de la combinación, también denominado punto de aditividad. Si la DE_{30} obtenida experimentalmente tiene coordenadas que no difieren significativamente de la línea de aditividad, entonces la combinación evaluada se considera aditiva. Un punto significativamente situado afuera de la línea puede denotar un comportamiento superaditivo (sinérgico) o subaditivo, dependiendo si la DE_{30E} se encuentra por debajo o por encima de la línea, respectivamente. Para determinar el tipo de interacción que presenta la combinación ya que las diferencias deben ser establecidas tras una prueba estadística.

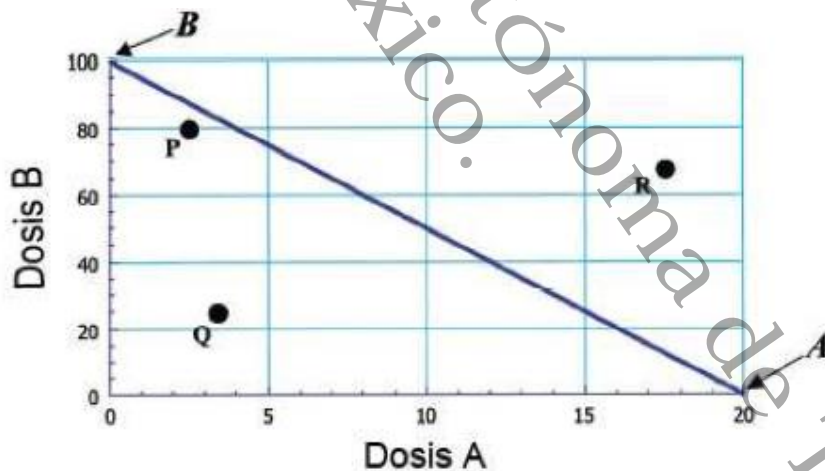


Figura 12. Isoblograma. (Tomado de Tallarida, 2000).

Para describir la magnitud del sinergismo se calculó el índice de interacción, que indica la proporción de la DE₃₀ de los fármacos administrados de manera individual que corresponde a la DE₃₀ en la combinación, en otras palabras describe la DE₃₀ experimental como una fracción de la DE₃₀ teórica aditiva.

Índice de interacción (γ)= DE₃₀ experimental de la combinación / DE₃₀ teórica de la combinación

Si:

(γ)= 1, indica una interacción aditiva

(γ)> 1, hay una interacción antagónica

(γ)< 1, ocurre una interacción sinérgica

Análisis estadístico

Se construyeron cursos temporales de la respuesta dolorosa, posteriormente y para un mejor análisis de los resultados se calculó el área bajo la curva (ABC) mediante el método de los trapezoides. Con el ABC se construyó la curva dosis respuesta para las diferentes dosis de cada fármaco y sus combinaciones. Todos los datos se compararon con sus respectivos controles por un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Tukey (comparaciones múltiples entre los tratamientos). Una P<0,05 se consideró significativa. Los datos de % EMP se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey para comparar tres o más grupos. Se utilizó una prueba de "t" de Student para determinar la diferencia estadística entre la DE₃₀ teórica y la DE₃₀ experimental. Una P<0,05 se consideró significativa.

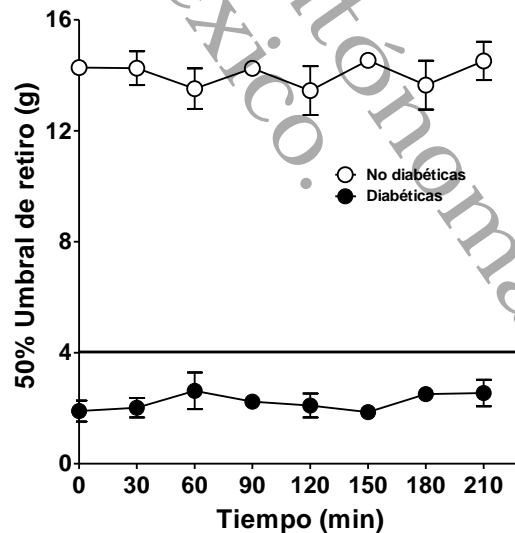
7. RESULTADOS

7.1. Inducción de la diabetes

La inducción de diabetes se realizó con la administración STZ (60 mg/kg) 4 días posteriores a la administración de STZ se midió el nivel de glucosa en ayunas, mediante punción en la vena caudal de la cola de la rata; se observó que la concentración sanguínea de glucosa fue de 432.2 ± 17.65 mg/dL, a estas ratas se les consideró diabéticas. Las ratas que recibieron la inyección de solución salina presentaron niveles de glucosa sanguínea en ayunas de 93.38 ± 0.72 mg/dL.

7.2. Evaluación de la conducta dolorosa en la neuropatía diabética

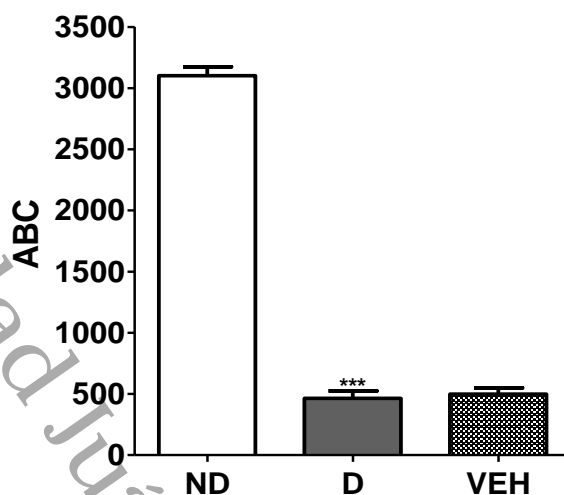
La evaluación de la conducta dolorosa se realizó a las cuatro semanas de la administración de STZ y se observó una conducta alodinia. La evaluación de la conducta alodínica se llevó a cabo estimulando con filamentos de Von Frey, la pata trasera izquierda del animal, cuantificando el 50% de umbral de retiro. La neuropatía diabética produjo alodinia táctil en comparación con animales no diabéticos (Gráfica 2).



Gráfica 2. Curso temporal de la conducta alodínica en ratas con neuropatía diabética. Las ratas diabéticas (D) se representan en círculos rellenos y las no diabéticas (ND) en círculos vacíos.

Para disolver el ketorolaco y proglumida se utilizó solución salina, celecoxib se disolvió en polietilenglicol. La administración de los vehículos no modificó el comportamiento de los animales en el curso temporal del 50% de umbral de retiro

de la pata estimulada y el umbral de alodinia fue de aproximadamente 2,5 g (Gráfica 3).

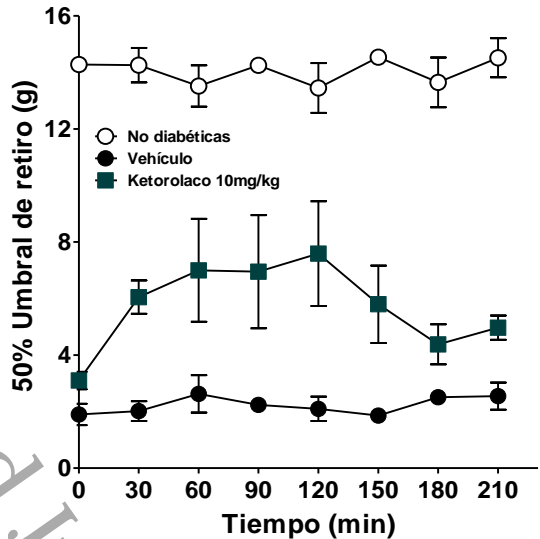


Gráfica 3. Área bajo la curva (ABC) de la conducta alodínica en el modelo de neuropatía diabética. Los datos se expresan como el ABC (promedio ± error estándar de al menos 6 ratas). La barra vacía representa el grupo de ratas ND, la barra rellena representa el grupo de ratas D y la barra punteada representa al grupo de ratas D con vehículo. *** ($P < 0,001$) se observó diferencia significativa del grupo de ratas D en comparación con el grupo de ratas ND, determinado por la prueba de t Student.

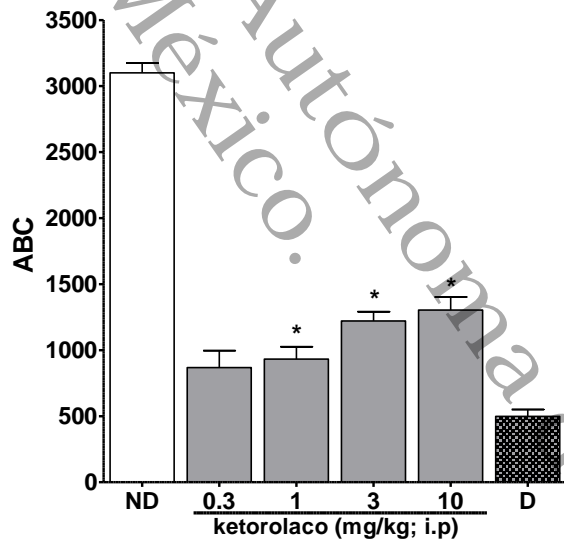
7.3. Efecto antialodínico de ketorolaco en ratas con neuropatía diabética

La administración i.p. de ketorolaco (0.3, 1, 3, 10, mg/kg) en ratas con neuropatía diabética, indujo un efecto antialodínico de manera dependiente de la dosis (Gráfica 5). El efecto de las dosis de ketorolaco administradas se prolongó durante tres horas. En la gráfica 4 se muestra el curso temporal del efecto de la administración de la dosis mayor de ketorolaco (10mg/Kg), en el que se observa un incremento en el umbral de retiro de la pata de la rata.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

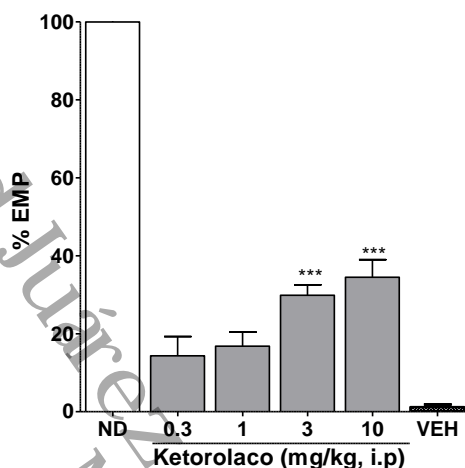


Gráfica 4. Curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.p. de ketorolaco (10mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética. Las ratas tratadas con ketorolaco se representan en cuadrados rellenos, las ratas D en círculos rellenos y ND en círculos vacíos. El ketorolaco se administró 30 min antes de la evaluación de la alodinia que duró 3 horas y media. Los resultados se expresaron como el 50% umbral de retiro (promedio ± error estándar, n≥ 6 ratas).



Gráfica 5. Curva dosis respuesta del efecto antialodínico de ketorolaco. Se representa el área bajo la curva de cada grupo (n≥6 ratas, promedio ± error estándar). Las barras azul oscuro muestran el promedio ± error estándar de al menos 6 ratas por cada columna. * (P<0,05) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

Utilizando las ABC de la curva dosis-respuesta del efecto antialodínico de ketorolaco se calculó el porcentaje de efecto máximo posible (%EMP) el cual se incrementó de manera dosis dependiente (Gráfica 6).

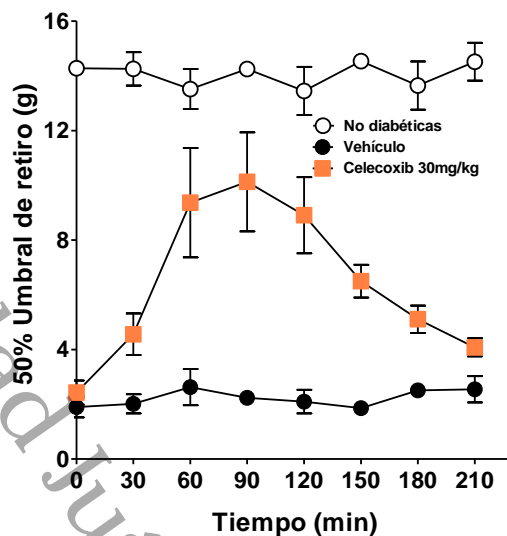


Gráfica 6. Porcentaje de efecto máximo posible (%EMP) de las dosis empleadas de ketorolaco. Los datos son expresados en porcentaje de efecto antialodínico máximo posible. Las barras rellenas muestran el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales por cada columna ***($P < 0,001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de Tukey.

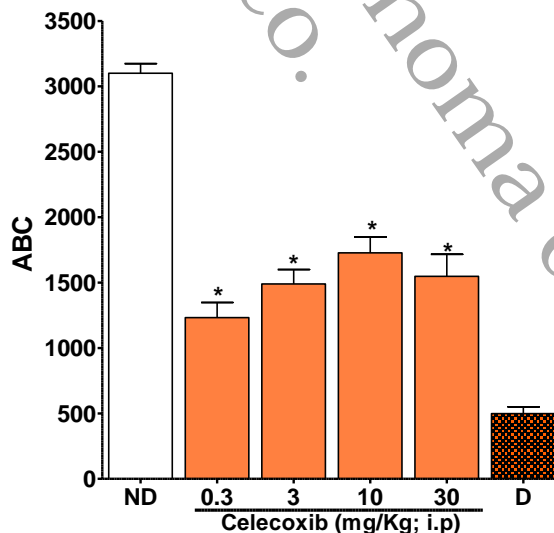
7.4. Efecto antialodínico de celecoxib en ratas con neuropatía diabética

La administración intraperitoneal de celecoxib (0.3, 3, 10, 30 mg/kg) en ratas con neuropatía diabética, indujo un efecto antialodínico (Gráfica 8). En la gráfica 7 se muestra el curso temporal del efecto de la administración de la dosis mayor de Celecoxib (30 mg/Kg), en el que se observa un incremento en el umbral de retiro de la pata derecha. El efecto de las dosis de celecoxib administradas se prolongó durante tres horas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

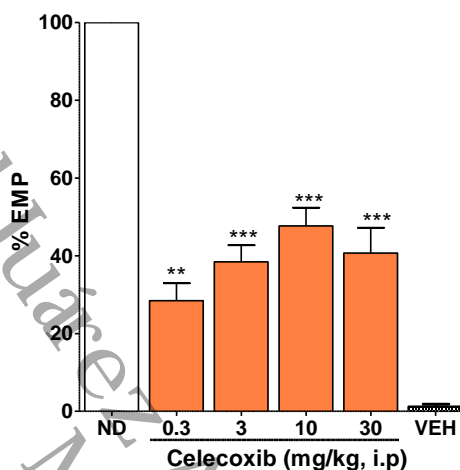


Gráfica 7. Curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.p. de celecoxib (30mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética. Las ratas tratadas con celecoxib se representan en cuadrados naranjas, las ratas D con vehículo en círculos rellenos negros y ND en círculos vacíos. El celecoxib se administró 30min antes de la evaluación de la alodinia que duró 3 horas y media. Los resultados se expresaron como el 50% umbral de retiro (promedio \pm error estándar, $n \geq 6$ ratas).



Gráfica 8. Área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de celecoxib en ratas con neuropatía diabética. Se representa el área bajo la curva de cada grupo ($n \geq 6$ ratas, promedio \pm error estándar). * Indica la significancia estadística $p < 0.05$ mediante ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey.

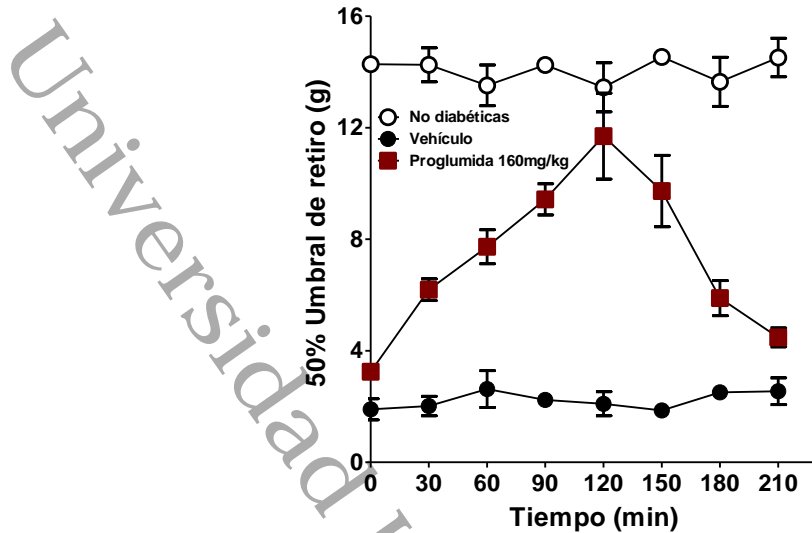
De la misma manera que se hizo con ketorolaco, se calculó el %EMP para celecoxib y se observó que dicho porcentaje incrementó con respecto a la dosis administrada de celecoxib (Gráfica 9).



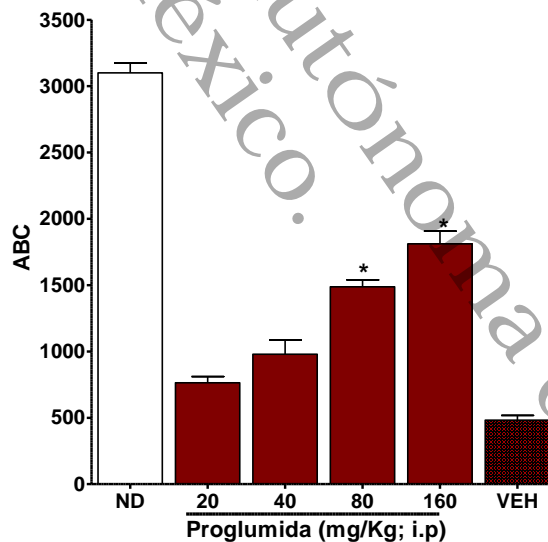
Gráfica 9. Porcentaje de máximo efecto posible (%EMP) de las dosis empleadas de celecoxib. Los datos son expresados en porcentaje de efecto antialodínico máximo posible. Las barras anaranjado muestran el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales por cada columna **($P < 0,01$) ***($P < 0,001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de Tukey.

7.5. Efecto antialodínico de proglumida en ratas con neuropatía diabética

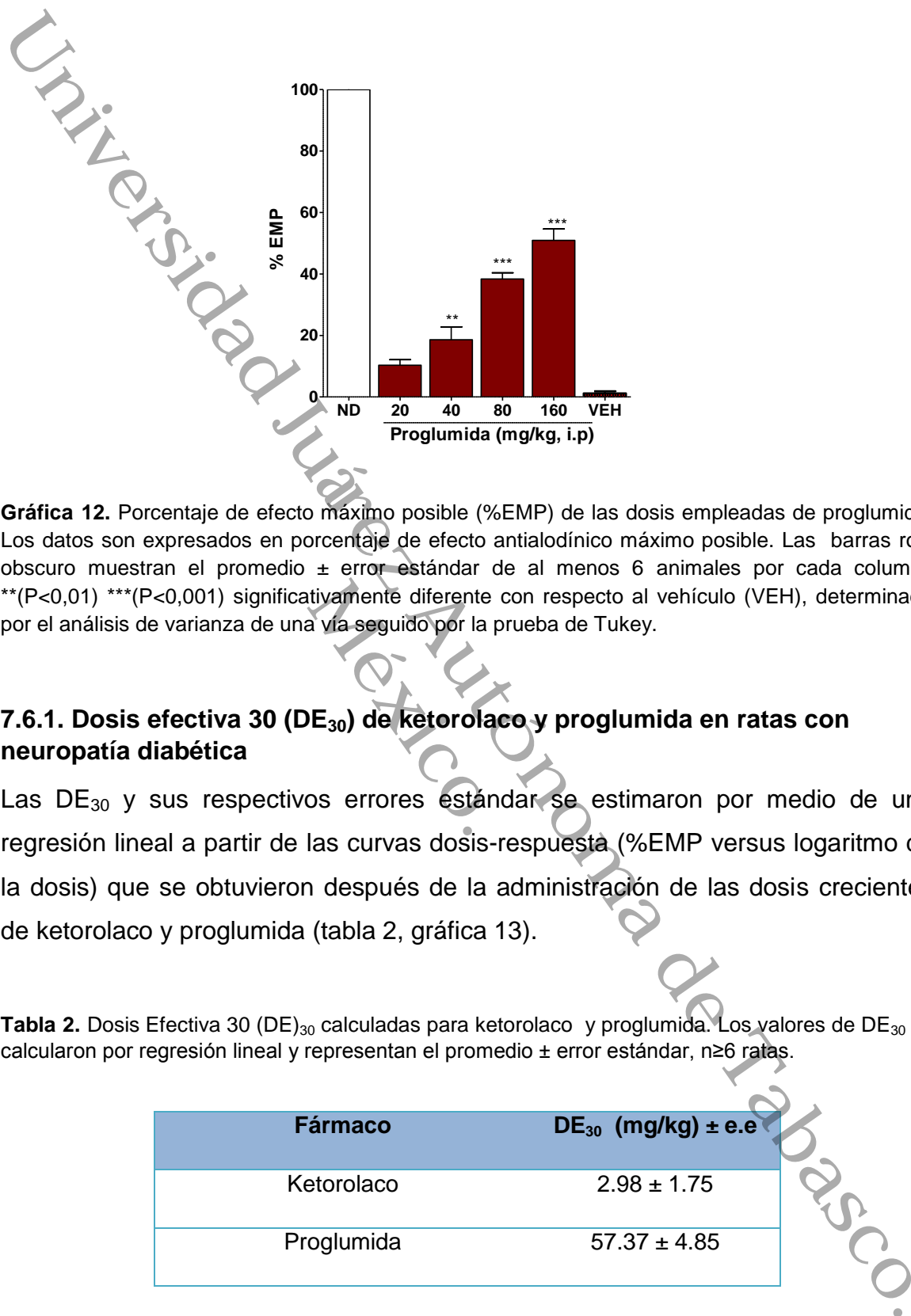
La inyección intraperitoneal de proglumida (20, 40, 80 y 160mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética, indujo efecto antialodínico de manera dependiente de la dosis (Gráfica 11). El efecto de proglumida se prolongó durante dos horas y media. En la gráfica 10 se muestra el curso temporal de la administración de la dosis mayor de Proglumida (160 mg/Kg), en el que se observa un incremento en el umbral de retiro de la pata derecha. A partir de estos datos se calculó y graficó el %EMP, en la gráfica 12 se observa que el porcentaje aumenta a la par de la dosis empleada.



Gráfica 10. Curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.p. de proglumida (160mg/Kg) en ratas con neuropatía diabética. Las ratas tratadas con proglumida se representan en cuadrados rojo obscuro, las ratas D con vehículo en círculos rellenos negros y ND en círculos vacíos. Proglumida se administró 30 min antes de la evaluación de la alodinia que duró 3 horas y media. Los resultados se expresaron como el 50% umbral de retiro (promedio \pm error estándar, $n \geq 6$ ratas).



Gráfica 11. Área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de proglumida en ratas con neuropatía diabética. Se representa el área bajo la curva de cada grupo ($n \geq 6$ ratas, promedio \pm error estándar). * Indica la significancia estadística $p < 0.05$ mediante ANOVA de una vía con prueba post-hoc Tukey.



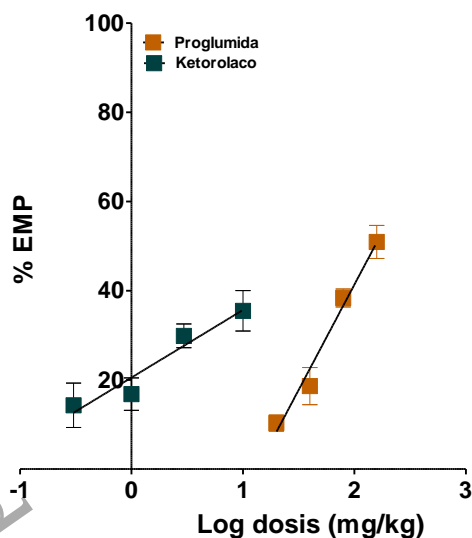
Gráfica 12. Porcentaje de efecto máximo posible (%EMP) de las dosis empleadas de proglumida. Los datos son expresados en porcentaje de efecto antialodínico máximo posible. Las barras rojo oscuro muestran el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales por cada columna **($P < 0,01$) ***($P < 0,001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de Tukey.

7.6.1. Dosis efectiva 30 (DE_{30}) de ketorolaco y proglumida en ratas con neuropatía diabética

Las DE_{30} y sus respectivos errores estándar se estimaron por medio de una regresión lineal a partir de las curvas dosis-respuesta (%EMP versus logaritmo de la dosis) que se obtuvieron después de la administración de las dosis crecientes de ketorolaco y proglumida (tabla 2, gráfica 13).

Tabla 2. Dosis Efectiva 30 (DE_{30}) calculadas para ketorolaco y proglumida. Los valores de DE_{30} se calcularon por regresión lineal y representan el promedio \pm error estándar, $n \geq 6$ ratas.

Fármaco	DE_{30} (mg/kg) \pm e.e
Ketorolaco	2.98 \pm 1.75
Proglumida	57.37 \pm 4.85



Gráfica 13. Curva dosis respuesta de ketorolaco y proglumida versus el logaritmo de la dosis. Los datos están expresados como el porcentaje del efecto antialodínico máximo posible (%EMP). Cada punto es el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales por grupo.

7.6.2. Combinaciones diseñadas para evaluar la interacción ketorolaco-proglumida en relación 1:1

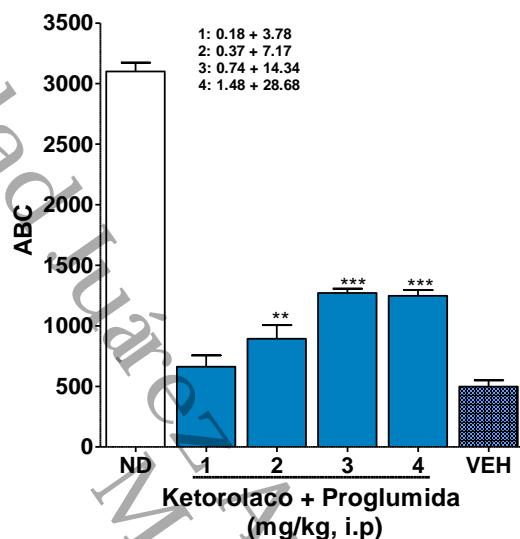
La tabla 3 muestra las combinaciones diseñadas mediante el análisis isoblográfico de la interacción de ketorolaco-proglumida (en relación 1:1) a partir de los valores DE_{30} de cada uno de los fármacos.

Tabla 3. Dosis obtenidas para el estudio de la interacción de la combinación ketorolaco – proglumida.

Combinaciones	Ketorolaco en la combinación (mg/kg)	Proglumida en la combinación (mg/kg)	Dosis total de la combinación (mg/kg)
1	0.19	3.58	3.77
2	0.37	7.17	7.54
3	0.74	14.34	15.08
4	1.49	28.68	30.17

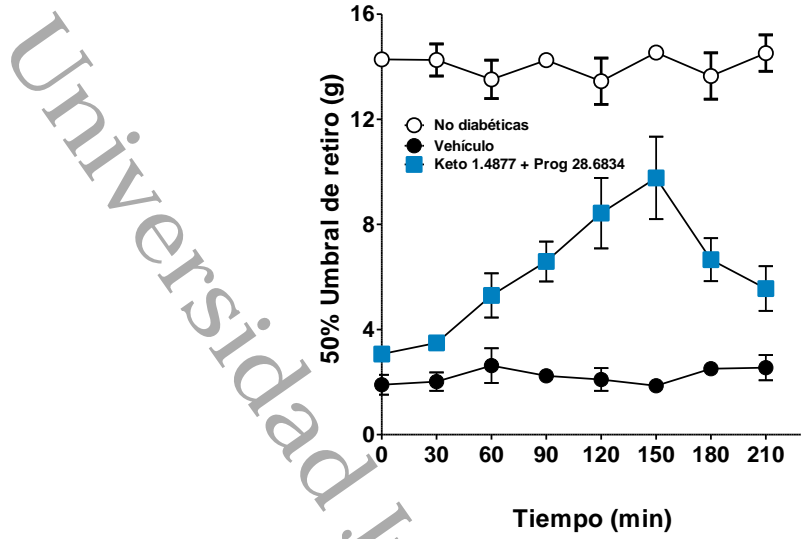
7.6.3. Efecto antialodínico de la interacción ketorolaco-proglumida

La administración de las combinaciones 2, 3 y 4 de ketorolaco-proglumida por vía i.p. redujo de manera significativa la alodinia táctil en ratas con neuropatía diabética (gráfica 14).

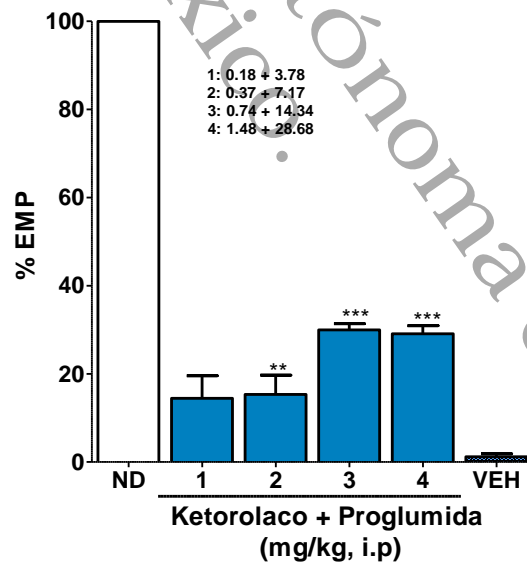


Gráfica 14. Área bajo la curva (ABC) de la combinación ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética. Las barras azules muestran el promedio \pm error con una $n \geq 6$ ratas por combinación. ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

En la gráfica 15 se muestra el comportamiento de la dosis mayor de la combinación (1.4877+28.6834 mg/kg) durante tres horas y media mostrando un efecto antialodínico a partir de los sesenta minutos de la administración. El efecto antialodínico de la co-administración de estos fármacos se observó mejor cuando se graficó el %EMP versus logaritmo de la dosis (Gráfica 16).

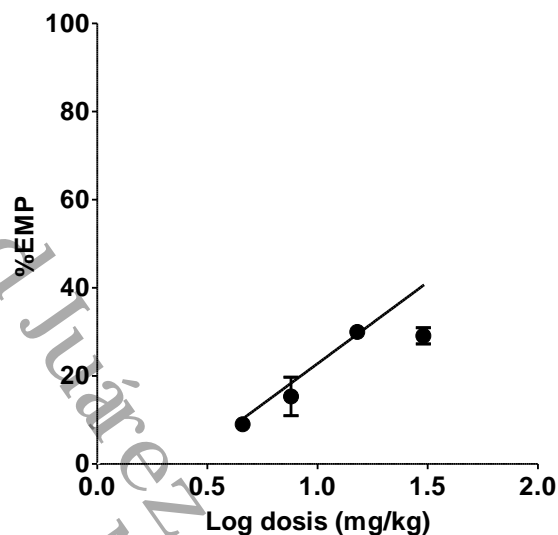


Gráfica 15. Curso temporal del efecto antialodínico de la co-administración de ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética. (1.4877+28.6834 mg/kg) Las ratas tratadas con la combinación se representan en los cuadrados azules, las ratas D con vehículo en círculos rellenos negro y ND en círculos vacíos. Los resultados se expresaron como el 50% umbral de retiro (promedio \pm error estándar, $n \geq 6$ ratas).



Gráfica 16. Efecto antialodínico de la combinación ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética. Las barras azules muestran el promedio \pm error estándar, $n \geq 6$ ratas por combinación. ** ($P < 0.01$); *** ($P < 0.001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

La tendencia del efecto antialodínico de la combinación de ketorolaco-proglumida se aprecia en una curva dosis-respuesta logarítmica (gráfica 17).



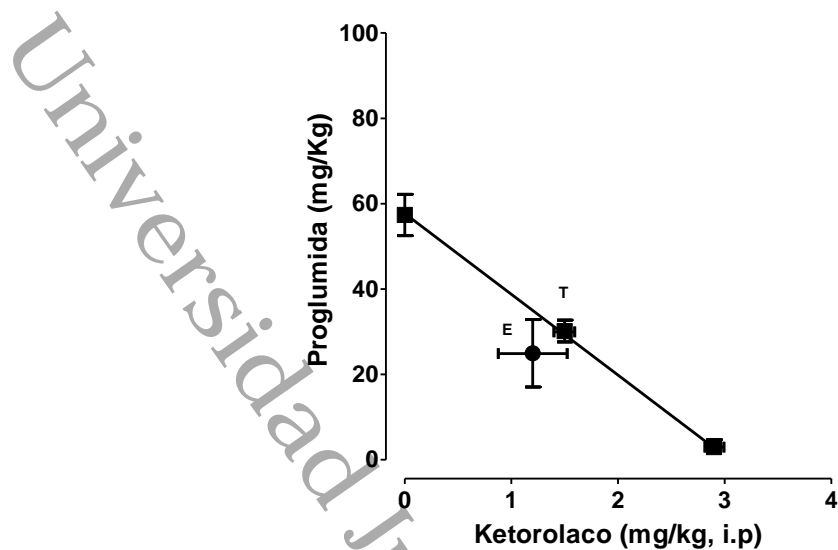
Gráfica 17. Curva dosis respuesta de la combinación ketorolaco-proglumida versus el logaritmo de la dosis. Los datos están expresados como el porcentaje del efecto antialodínico máximo posible (%EMP). Cada punto es el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales por grupo.

7.6.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico y el isoblograma de la administración i.p. de la combinación ketorolaco-proglumida en relación 1:1 muestran que no hay una interacción sinérgica entre ambos fármacos (tabla 4 y gráfica 18).

Tabla 4. Análisis estadístico de la interacción de ketorolaco-proglumida.

DE ₃₀ Experimental de la combinación	DE ₃₀ Teórica de la combinación	Índice de interacción
24,96 \pm 7.90	30,17 \pm 2.58	0,83 \pm 0.27



Gráfica 18. Isoblograma de la combinación ketorolaco-proglumida en ratas con neuropatía diabética. La línea oblicua entre el eje X y eje Y es la línea de aditivos teórico. El punto en el centro de esta línea es el punto teórico de aditivos (T) calculada a partir de los valores separados de DE₃₀. El punto experimental (E) se encuentra por debajo de la línea de aditivos, lo que indica que no hay sinergia ($P < 0,05$), según lo determinado por la prueba t Student.

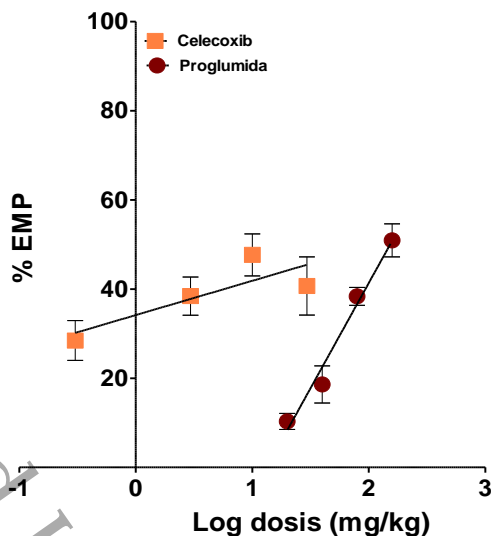
7.7.1. Dosis efectiva 30 (DE₃₀) de celecoxib y proglumida en ratas con neuropatía diabética

Las DE₃₀ y sus respectivos errores estándar se estimaron por medio de una regresión lineal a partir de las curvas dosis-respuesta (%EMP versus logaritmo de la dosis) que se obtuvieron después de la administración de las dosis crecientes de celecoxib y proglumida (tabla 5 y gráfica 19).

Tabla 5. Dosis efectiva 30 (DE₃₀) calculadas para celecoxib y proglumida. Los valores de DE₃₀ se calcularon por regresión lineal y representan el promedio \pm error estándar de 6 evaluaciones

Fármaco	DE ₃₀ (mg/kg) \pm e.e
Celecoxib	0.28 \pm 0.43
Proglumida	57.79 \pm 4.66

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco



Gráfica 19. Curva dosis respuesta de celecoxib y proglumida versus el logaritmo de la dosis. Los datos están expresados como el porcentaje del efecto antialodínico máximo posible (%EMP). Cada punto es el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales por grupo.

7.7.2. Combinaciones diseñadas para evaluar la interacción celecoxib-proglumida

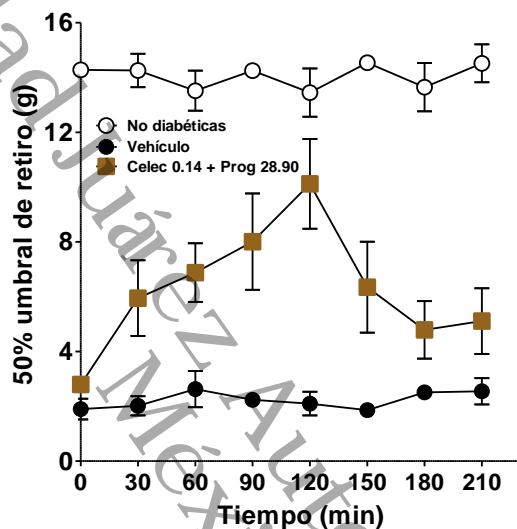
La tabla 6 muestra las combinaciones diseñadas mediante el análisis isoblográfico de la interacción de celecoxib-proglumida (en relación 1:1) a partir de los valores DE_{30} de cada uno de los fármacos.

Tabla 6. Dosis obtenidas para el estudio de la interacción de la combinación ketorolaco-proglumida.

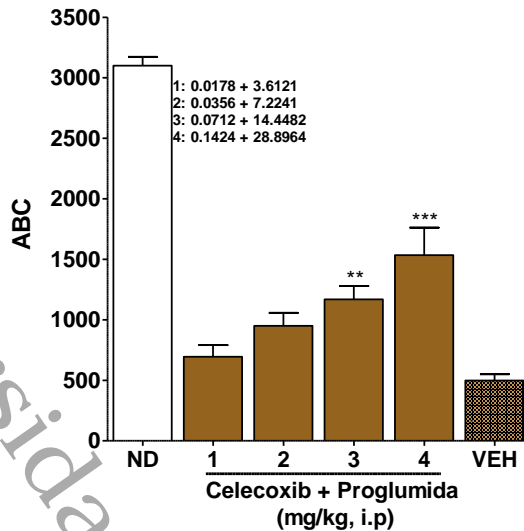
Combinaciones	Celecoxib en la combinación (mg/kg)	Proglumida en la combinación (mg/kg)	Dosis total de la combinación (mg/kg)
1	0.018	3.61	3.63
2	0.036	7.22	7.26
3	0.071	14.45	14.52
4	0.1424	28.90	29.04

7.7.3. Efecto antialodínico de la interacción celecoxib-proglumida.

La administración de las combinaciones de celecoxib-proglumida por vía i.p. redujo de manera significativa la alodinia táctil en ratas con neuropatía diabética de manera dosis-dependiente (gráfica 21). Se observó un aumento en el umbral de retiro de la pata de la rata que se prolongó durante 3 horas (gráfica 20).

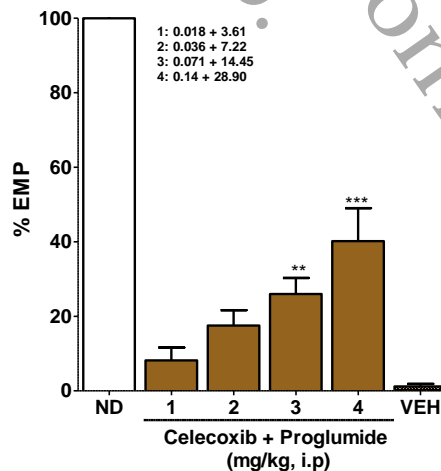


Grafica 20. Curso temporal del efecto antialodínico de la co-administración de celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética. (0.14+28.9 mg/kg) Las ratas tratadas con la combinación se representan en cuadrados café, las ratas con vehículo en círculos rellenos negros y ND en círculos vacíos. Los resultados se expresaron como el 50% umbral de retiro (promedio ± error estándar de al menos 6 ratas).



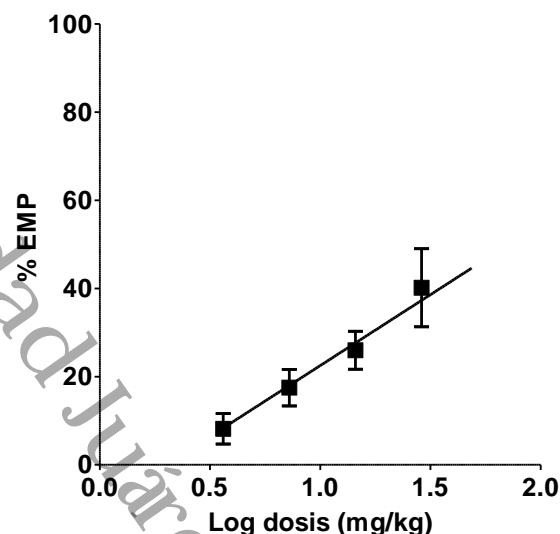
Gráfica 21. Área bajo la curva (ABC) de la combinación celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética. Las barras oliva muestran el promedio \pm error estándar de al menos 6 ratas por cada columna. ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

Para observar mejor el efecto antialodínico producido por la administración i.p. de las diferentes combinaciones de celecoxib-proglumida, se calculó el %EMP para cada combinación. Los valores fueron representados en la gráfica 22 muestra que el %EMP se incrementa conforme a la combinación empleada.



Gráfica 22. Porcentaje de efecto máximo posible (%EMP) de las combinaciones celecoxib-proglumida. Las barras oliva muestran el promedio \pm error estándar de al menos 6 ratas por cada columna. ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$) significativamente diferente con respecto al vehículo (VEH), determinado por el análisis de varianza de una vía seguida por la prueba de Tukey.

La interacción de celecoxib y proglumida se observó mejor cuando se graficó el %EMP versus logaritmo de la dosis (gráfica 23).



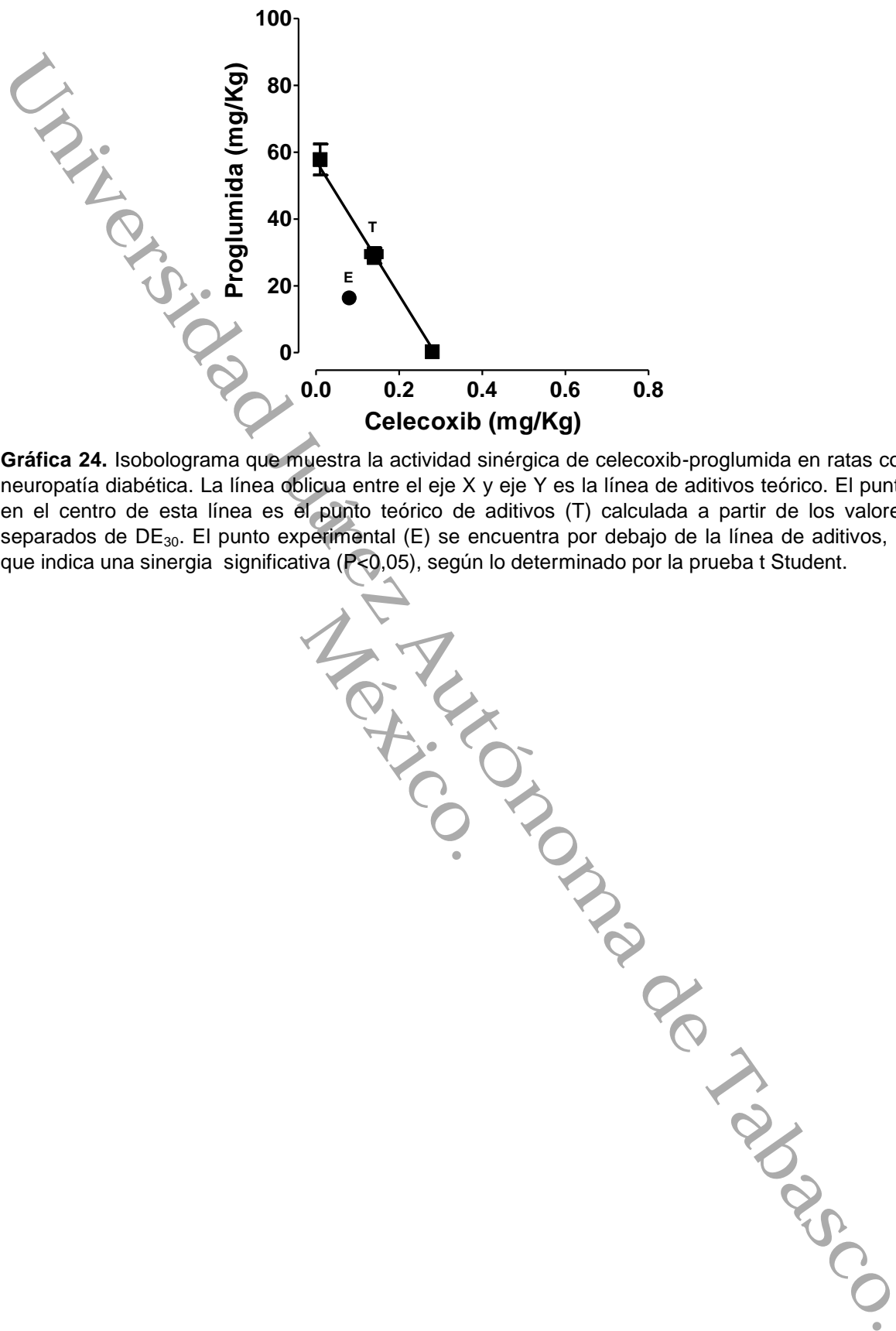
Gráfica 23. Curva dosis respuesta de la combinación celecoxib-proglumida versus el logaritmo de la dosis. Los datos están expresados como el porcentaje del efecto antialodínico máximo posible (%EMP). Cada punto es el promedio \pm error estándar de al menos 6 animales en el modelo de neuropatía diabética.

7.7.4. Análisis estadístico

Con los datos de la curva dosis respuesta de la administración individual de los fármacos y de las combinaciones, se realizó el análisis estadístico y el isoblograma de la administración i.p. de la combinación celecoxib-proglumida en relación 1:1 (tabla 7 y gráfica 24) los cuales muestran una interacción sinérgica entre ambos fármacos.

Tabla 7. Análisis estadístico de la interacción de celecoxib-proglumida.

DE ₃₀ Experimental de la combinación	DE ₃₀ Teórica de la combinación	Índice de interacción
16.41 \pm 1.18	29.039 \pm 2.34	0.565 \pm 0.06



Gráfica 24. Isoblograma que muestra la actividad sinérgica de celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética. La línea oblicua entre el eje X y eje Y es la línea de aditivos teórico. El punto en el centro de esta línea es el punto teórico de aditivos (T) calculada a partir de los valores separados de DE₃₀. El punto experimental (E) se encuentra por debajo de la línea de aditivos, lo que indica una sinergia significativa ($P < 0,05$), según lo determinado por la prueba t Student.

8. DISCUSIÓN

8.1. Inducción de diabetes con STZ

La administración intraperitoneal de STZ (60 mg/kg) en ratas Wistar indujo diabetes tipo I. Estos resultados son similares a otros reportes que utilizan el mismo modelo de inducción de diabetes, en los cuales las ratas desarrollan diabetes tipo I (Cegielska-Perun *et al.* 2012; Aubel *et al.* 2004).

Diversos reportes sugieren que el modelo de diabetes tipo I inducido con STZ es el más aceptado para evaluar la conducta dolorosa en diferentes modelos de dolor y el modelo de neuropatía diabética (Chauhan *et al.* 2012; Juárez Rojop *et al.* 2006). La mayoría de los reportes revelan que en las ratas diabéticas se presenta la alodinia táctil a las 4 semanas después de la administración de STZ; del mismo modo se ha reportado que la alodinia persiste durante al menos 12 semanas (Calcutt y Chaplan, 1997; Wodarski *et al.* 2009).

8.2. Evaluación de la conducta dolorosa en ratas con neuropatía diabética

La medida del umbral de retiro con filamentos de Von Frey representa una herramienta poderosa para analizar los efectos del estado de dolor neuropático (Chaplan *et al.* 1994). En las ratas diabéticas se encontró una disminución en el umbral de retiro de la pata con un valor aproximado de 2,5 g mostrando una conducta alodínica. Estos resultados son similares a lo reportado por otros autores que utilizan ratas con neuropatía diabética (Calcutt y Chaplan, 1997; Araiza-Saldaña *et al.* 2010); neuropatía con ligadura de los nervios espinales izquierdos L5 y L6 (modelo de Chung; Mixcoatl-Zecuatl 2008; Ortega-Varela *et al.* 2009) y neuropatía con ligadura parcial del nervio ciático (modelo de Seltzer; Kim *et al.* 2009). En la neuropatía diabética la alodinia táctil se presenta como una sensación anormal de dolor ocasionada por el daño estructural en terminales nerviosas periféricas. En ese sentido, existen evidencias experimentales en ratas diabéticas de una disminución de la velocidad de conducción motora y sensitiva, cambios estructurales en los nervios, reducción del calibre axonal, degeneración de la mielina en la raíz nerviosa y cambios ultraestructurales en las terminales nerviosas periféricas y centrales que representan signos tempranos de axonopatía

distal (Van Dam *et al.* 2013). Además, existen evidencias bioquímicas que señalan una reducción de las concentraciones de mioinositol en el nervio, generando una cascada de cambios a través de la reducción de la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{-K}^+$, lo que provoca una disfunción axoglial, inflamación paranodal, atrofia axonal y degeneración de la fibra nerviosa (Romanovsky *et al.* 2007).

8.3. Efecto antialodínico de ketorolaco en ratas con neuropatía diabética

Las prostaglandinas a nivel espinal son factores críticos en los cambios (excitabilidad sináptica central y la sensibilización neuronal) que conducen a la alodinia, señalando que la COX-1 es constitutiva en la médula espinal y cataliza la síntesis de prostaglandinas inmediatamente después de la ligadura al nervio L5 y L6 (Hefferan M.P *et al.* 2003). Algunos reportes indican que el uso de ketorolaco administrado de manera subcutánea, ha tenido resultados positivos en el manejo del dolor relacionado con el cáncer óseo, el dolor visceral y el dolor neuropático (Ripamonti *et al.* 1996; Gillis *et al.* 1997); sin embargo, ketorolaco no es usualmente utilizado para tratar el dolor neuropático (Hudson *et al.* 2006). En nuestro estudio observamos que la administración intraperitoneal de ketorolaco produjo una reducción de la alodinia táctil de manera dosis dependiente en ratas con neuropatía diabética. Similar a nuestros resultados, se ha reportado la disminución de la conducta dolorosa en ratas diabéticas con la administración periférica local de ketorolaco (Bermúdez-Ocaña *et al.* 2011). Por otro lado, reportes indican que indometacina, un AINE preferencial de COX-1, reduce la nocicepción en ratas y ratones con neuropatía diabética inducida por estreptozotocina (Bujalska *et al.* 2008). Además, utilizando el modelo de constricción del nervio, se observó que la administración intratecal de un inhibidor selectivo de COX-1 produjo una disminución de la hipersensibilidad en ratas. Estos datos sugieren que COX-1 es importante en el mantenimiento de la hipersensibilidad después del daño al nervio, pues se ha reportado que en ratas con constricción del nervio, existe un incremento en las células inmuno-reactivas a COX-1 en la lámina superficial ipsilateral comparado con el control Sham (Xiaoying Zhu *et al.* 2003). Así mismo, la administración de ketorolaco disminuye

la hiperalgesia térmica y la alodinia inducida por el frío en ratas con daño en el nervio ciático (Parris WC *et al.* 1996) además, revierte la alodinia táctil inducida por ligación parcial del nervio ciático (Ma W *et al.* 2002).

8.4. Efecto antialodínico de celecoxib en ratas con neuropatía diabética

Se sabe que COX-2 y las prostaglandinas participan en la sensibilización periférica y central en el dolor de tipo inflamatorio y neuropático. Por lo que el uso y la eficacia de los AINEs, principalmente los inhibidores preferenciales de COX-2, son de utilidad contra el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia en ratas diabéticas (Matsunaga *et al.* 2007; Bujalska *et al.* 2008). Evidencias señalan que las prostaglandinas funcionan como mediadores importantes en el desarrollo de la sensibilización central y cuando se administran en la médula espinal producen un efecto alodínico e hiperalgésico (Baba *et al.* 2001). Existen reportes de una sobrerregulación de la expresión de COX-2 después del daño en el sistema nervioso periférico e inflamación periférica en la medula espinal y el ganglio de la raíz dorsal, esto conlleva al incremento de niveles de PGE2 así como de los receptores EP en modelos de dolor neuropático (Ma y Eisenach, 2003), sugiriendo que las prostaglandinas influyen en la liberación de neurotransmisores desde las terminales aferentes primarias. El uso de celecoxib en el tratamiento de la neuropatía diabética es controversial. Estudios sugieren que rofecoxib (inhibidor selectivo de COX-2) e ibuprofeno (inhibidor no selectivo de COX) dosificadas por vía oral de manera crónica no atenúa la alodinia mecánica en ratas con constricción crónica del nervio ciático (Zhao *et al.* 2007). En el presente estudio se observó que la administración de celecoxib disminuye la conducta alodínica en ratas con neuropatía diabética. Estos datos son congruentes con los obtenidos por Schäfer y colaboradores (2004) sugiriendo que la administración oral crónica de celecoxib e ibuprofeno son efectivos contra la alodinia mecánica en ratas con constricción crónica del nervio ciático. También, Mi y colaboradores (2013) observaron una disminución de la alodinia después de la administración intraplantar de celecoxib. Además, se reportó que ratas con dolor neuropático debido a la ligadura de los nervios L5 y L6 (modelo de Chung; Takeda *et al.* 2005)

mostraron reducción en la conducta alodínica con la administración intratecal de meloxicam de manera dependiente de la dosis. Asimismo, Kimura y Kontani (2009) reportaron que la administración i.p. de meloxicam en ratones con neuropatía diabética ejerce un efecto antialodínico. Finalmente, Juárez-Rojop *et al.* (2015) reportaron que celecoxib reduce la alodinia táctil y la hiperalgesia en ratas con neuropatía diabética.

8.5. Efecto antialodínico de proglumida en ratas con neuropatía Diabética

Estudios sugieren que en el dolor neuropático puede ocurrir una reducción en receptores opioides (Ossipov *et al.* 1995) y un incremento en péptidos anti-opioides como es la CCK (Heinricher *et al.* 2004). Este tipo de dolor puede estar relacionado con los mecanismos facilitatorios descendentes de algunas áreas del cerebro, entre ellas la médula rostral ventromedial. Muchos estudios sugieren que la CCK activa las vías facilitatorias descendentes del dolor, desde la médula rostral ventromedial. Se sabe también que CCK puede tener efectos pronociceptivos y antiopioides (Marshall *et al.* 2012). Yamamoto y Nozaki-Taguchi (1995) reportaron que el dolor neuropático puede disminuir bloqueando la acción de CCK en ratas. En el presente estudio la administración sistémica del antagonista del receptor CCK, proglumida produjo un efecto antialodínico en ratas con neuropatía diabética de manera dosis dependiente. Asimismo, Kovelowski *et al.* (2000) demostró que la microinyección de antagonista del receptor CCK₂ en la médula rostral ventromedial revierte la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica después de la lesión al nervio espinal. De igual forma CI-988 (antagonista del receptor CCK₂) redujo la alodinia mecánica después de la lesión a la médula espinal (Kim *et al.* 2009). Existen otras evidencias que a nivel espinal y supraespinal la inyección de antagonista de CCK₂ reducen el dolor en condiciones de daño al nervio y neuropatía (Verge *et al.* 1993; Stanfa *et al.* 1994; Urban y Gebhart, 1999).

8.6. Efecto antialodínico de la combinación Ketorolaco-Proglumida en ratas con neuropatía diabética

En este estudio la inyección intraperitoneal de la combinación ketorolaco-proglumida produjo un efecto antialodínico en ratas diabéticas inducidas con STZ. Se sabe que la administración periférica local de la CCK-8 aumenta la conducta nociceptiva en ratas diabéticas (Juárez-Rojop *et al.* 2006). Además, se ha sugerido que la hiperalgesia o alodinia inducida por la diabetes podría deberse al aumento en la liberación de CCK en la médula espinal de ratones (Kamei y Zushida, 2001). Por otro lado, después de una lesión al nervio, los niveles de ARNm que codifican para los receptores de CCK aumentan en el ganglio de la raíz dorsal; esta sobre regulación puede llevar a la alodinia observada en la diabetes. (Kim *et al.* 2009; Verge., 1993; Xu *et al.* 1993) (Antunes Bras *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1993). Además, CCK revierte el efecto analgésico de los opioides y se ha reportado que la coadministración de un antagonista de CCK y morfina evita el desarrollo de tolerancia a morfina en ratas (Kellstein *et al.* 1991). Así mismo, existen reportes que proglumida aumenta el efecto antinociceptivo de agonistas opioides en ratas sometidas a la prueba de formalina (Baber *et al.* 1989) y en humanos, potencia la analgesia inducida por morfina (Bernstein *et al.* 1998). El mecanismo por el cual proglumida aumenta el efecto antialodínico de inhibidores de la ciclooxigenasa en ratas diabéticas aún no es claro. Sin embargo, existen evidencias que la CCK periférica aumenta el factor de necrosis tumoral alfa, interleucina-1 beta y la interleucina-6 (Cunningham *et al.* 1995; Orikawa *et al.* 2010). Por otra parte, existen pruebas de que interleucina-1 beta induce la expresión de genes de efrina B1 en el ganglio de la raíz dorsal. Efrina B1 aumenta la fosforilación de la tirosina de las Subunidades NR2B de los receptores NMDA a través de la vía de los receptores Eph B que conduce a dolor (Orikawa *et al.* 2010). Por lo tanto, se propone que proglumida puede aumentar el efecto antinociceptivo de los inhibidores de ciclooxigenasa en las ratas diabéticas, reduciendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias como consecuencia del bloqueo de los receptores de CCK. En conjunto, estos resultados sugieren que el bloqueo de CCK en el tratamiento del dolor, puede valorarse clínicamente ya sea

para aumentar el efecto analgésico de los AINEs o hacer posible una reducción de la dosis de los AINEs y disminuir los efectos secundarios. Sin embargo, no se encontró una interacción sinérgica en la combinación ketorolaco-proglumida, esto podría deberse, en parte, a que en estados de dolor neuropático la mayoría de los AINEs tiene un acceso limitado al SNC. La concentración de los AINEs a nivel de SNC es del 1-5% del total de la concentración plasmática, dado que éstos circulan en el plasma con mayor afinidad por la albúmina sérica, reduciendo así la fracción libre. La fracción restante circula como aniones orgánicos de modo que la entrada de dichos aniones está restringida por el pequeño número de transportadores aniónicos que se expresan en la barrera hematoencefálica. Por otro lado, existen evidencias que reportan que la administración de AINEs por vía epidural o intratecal en humanos y animales disminuye el dolor crónico (Marshall *et al.* 2012). Muchos factores pueden contribuir a la falta de eficacia de los AINEs preferentes de COX-1, sin embargo, los avances en el desarrollo de compuestos selectivos nos han proporcionado fármacos de utilidad selectivos de COX-2, los cuales limitan los efectos secundarios y logran eficazmente inhibir la acción de COX-2.

8.7. Efecto antialodínico de la combinación celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética

Algunos reportes indican un incremento en la expresión y actividad de COX-2 en los nervios periféricos y en el ganglio de la raíz dorsal, lo que afecta la producción y función de las prostaglandinas y la subsecuente activación de la cascada inflamatoria en la neuropatía diabética (Kellogg *et al.* 2008). Nuestros datos mostraron que la administración intraperitoneal de la combinación celecoxib-proglumida tuvo efecto antialodínico y además una interacción sinérgica. La actividad antialodínica de celecoxib ha sido reportada con anterioridad, Takeda y colaboradores (2005) reportaron que ratas con dolor neuropático debido a la ligadura de los nervios L5 y L6 mostraron reducción en la conducta alodínica con la administración intratecal de meloxicam. Por otro lado, Mi y colaboradores (2013) observaron una disminución de la alodinia después de la administración

intraplantar de celecoxib. Estudios recientes sugieren que la actividad analgésica de celecoxib involucra al sistema opioide endógeno. Juárez-Rojop y colaboradores (2015) reportaron que la analgesia ejercida por celecoxib fue revertida por inhibidores específicos de los receptores opioides (μ , δ y κ) en ratas sanas y con neuropatía diabética. Por otro lado, se sabe que proglumida antagoniza a CCK y potencia el efecto de fármacos opioides (Bernstein *et al.* 1998; Kellstein *et al.* 1991). El análisis isoblográfico de los datos obtenidos demostró una interacción sinérgica en la combinación celecoxib-proglumida en ratas con neuropatía diabética. El índice de interacción proporciona una medida del grado de sinergismo (Tallarida, 2000). El índice de interacción de la combinación celecoxib-proglumida fue de 0.565 lo que implica que la dosis experimental (DE30E) es dos veces más efectiva que la dosis teórica. La interacción de estos fármacos no se ha evaluado con anterioridad; sin embargo, proglumida aumenta la antinocicepción de meloxicam en ratas diabéticas (Bermúdez-Ocaña *et al.* 2011). El mecanismo de la interacción sinérgica proglumida-celecoxib aún no ha sido descrito, sin embargo el sinergismo observado es consistente con la idea de que proglumida antagoniza el efecto anti-opioide de CCK y puede aumentar el efecto antialodínico de celecoxib que involucra al sistema opioide en ratas diabéticas. Este mecanismo puede ser la base de la interacción sinérgica de estos dos fármacos.

Con los datos obtenidos nosotros sugerimos que la combinación celecoxib-proglumida presentó sinergismo con respecto a la combinación ketorolaco-proglumida. Dilucidar los mecanismos por los cuales celecoxib y proglumida ejercen su acción analgésica podría mejorar la utilidad clínica que se les da a estos fármacos, con ello reducir las dosis empleadas en pacientes con neuropatía y producir un mayor efecto en el alivio del dolor neuropático con una disminución de reacciones adversas (Williams *et al.* 2008).

9. CONCLUSIÓN

1. Ketorolaco, celecoxib y el antagonista de CCK producen una disminución *per se* de la respuesta dolorosa en ratas con neuropatía diabética en comparación con el control de ratas diabéticas.
2. El análisis isoblográfico realizado entre la combinación de ketorolaco-proglumida en relación 1:1 produjo un efecto de aditividad.
3. El análisis isoblográfico realizado entre la combinación de celecoxib-proglumida en relación 1:1 produjo un efecto sinérgico.
4. Se sugiere la participación de las ciclooxigenasas y colecistocinina en la neuropatía diabética en rata.

10. BIBLIOGRAFÍA

American Diabetes Association. (2016). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 29(1).

American Diabetes Association. (2013). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 36(1), 11–66.

Antunes Bras J. N. Laporte AM, Benolier JJ, Borgoin S, Mauborgne A, Hamon M, Cesselin F, Pohl M. (1999). Effects of peripheral axotomy on cholecystokinin neurotransmission in the rat spinal cord. *J of Neurochem*. 2, 858-867.

Araiza-Saldaña CI, Rocha-González HI, Ambriz-Tututi M, Castañeda-Corral G, Caram-Salas NL, Hong E, Granados-Soto V. (2010). Sildenafil and glyceryl trinitrate reduce tactile allodynia in streptozotocin-injected rats. *Eur J Pharmacol*. 10;631(1-3), 17-23.

Archer, E., Maigret, B., Escrieut, C., Pradayrol, L. Fourmy, D. (2003). Rhodopsin Crystal: New Template Yielding Realistic Models Of G-Protein-Coupled Receptors? *Trends Pharmacol. Sci*. 24, 36–40.

Aubel B, Kayser V, Mauborgne A, Farré A, Hamon M, Bourgoin S. (2004). Antihyperalgesic effects of cizolirtine in diabetic rats: behavioral and biochemical studies. *Pain*. 110(1-2), 22-32.

Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. (2001). Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci*. 21(5), 1750-6.

Baber NS, Dourish CT, Hill DR. (1989). The role of CCK caerulein, and CCK antagonists in nociception. *Pain*. 39(3), 307-28.

Bennett MI, Smith BH, Torrance N & Potter J. (2005). The s-lanss score for identifying pain of predominantly neuropathic origin: validation for use in clinical and postal research. *Journal of Pain*. 6(3), 149 - 158.

Bermúdez-Ocaña DY, Aguilar-Mariscal H, Frías TR, Blé-Castillo JL, Flores-Murrieta FJ, Díaz-Zagoya JC, Granados-Soto V, Juárez-Rojop IE. (2011). Proglumide enhances the antinociceptive effect of cyclooxygenase inhibitors in diabetic rats in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 664(1-3), 8-13.

Besson JM. (1999). The neurobiology of pain. *Lancet.* 8, 353(9164):1610-5.

Berridge MJ, Irvine RF. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 341, 197-205.

Bernstein ZP, Yucht S, Battista E, Lema M, Spaulding MB. (1998). Proglumide as a morphine adjunct in cancer pain management. *J Pain Symptom Manage.* 15(5), 314-20.

Bierhaus A, Haslbeck KM, Humpert PM, et al. (2005). Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest.* 114, 1741-51.

Bolay H, Moskowitz MA. (2002). Mechanisms of pain modulation in chronic syndrome. *Neurology.* 59, 2-7.

Bujalska M, Tatarkiewicz J, de Cordé A, Gumulka SW. (2008). Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on streptozotocin-induced hyperalgesia in rats. *Pharmacology.* 81(2), 151-7.

Calcutt Nigel A. (2002). Potential Mechanisms of Neuropathic pain in diabetes. *International Review of Neurobiology.* 50, 205-227.

Calcutt NA, Chaplan SR. (1997). Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 122(7), 1478-82.

Cao B, Zhang X, Yan N, Chen S, Li Y. (2012). Cholecystinin enhances visceral

pain-related affective memory via vagal afferent pathway in rats. *Mol Brain*. 9(5), 19.

Chaplan SR¹, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 53(1), 55-63.

Chauhan N, Taliyan R, Sharma PL. (2012). Effect of dipyron and thalidomide alone and in combination on STZ-induced diabetic neuropathic pain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 385(5), 527-38.

Crawley JN, Corwin RL. (1994). Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*. 15, 731-755.

Cegielska-Perun K, Bujalska-Zadrożny M, Makulska-Nowak HE. (2012). Modification of morphine analgesia by venlafaxine in diabetic neuropathic pain model. *Pharmacol Rep*. 64(5), 1267-75.

Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. (1994). Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther*. 269(3), 1117-23.

Costigan M, Befort K, Karchewski L, Griffin RS, D'Urso D, Allchorne A, Sitarski J, Mannion JW, Pratt RE, Woolf CJ. (2002). Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci*. 25, 3:16.

Costigan M, Woolf C. (2000). Pain: molecular mechanisms. *J Pain*. 3, 35-44.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. (2009). Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu. Rev. Neurosci*. 32, 1-32.

Coudoré-Civales M.A, Courteix M., Boucher M., Meen M. J. Fialip., Eschalier A., Ardid D. (2000). Potentiation of morphine and clomipramine analgesia by cholecystokinin-B antagonist CI-988 in diabetic rats. *Neuroscience Letters*. 286, 37-

40.

Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. (1993). Streptozocin induced diabetic rats: Behavior evidence for a model of chronic pain. *Pain*. 53, 81-88.

Courteix C, Bardin M, Chantelauze C, Lavarene J and Eschalier A. (1994). Study of the sensivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain*. 57, 153-160.

Courteix C, Coudaré-Civiales MA, Eschalier A, Fialip J, Zajac JM, Lavarenne J. (1997). CI-988 an antagonist of cholecystokinin type B receptor and LDME analogue of neuropeptide FF enhance the analgesic effect of morphine in diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 122, 355-359.

Cunningham ME, Shaw-Stiffel TA, Bernstein LH, Tinghitella TJ, Claus RE, Brogan DA, McMillen MA. (1995). Cholecystokinin-stimulated monocytes produce inflammatory cytokines and eicosanoids. *Am J Gastroenterol*. 90(4), 621-6.

Dickenson AH, Chapman V, Green GM. (1997). The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol*. 28, 633-638.

Dixon WJ. (1980). Efficient analysis of experimental observation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 20, 441-462.

Durrenberger PF, Facer P, Casula MA, Yiangou Y, Gray RA, Chessell IP, Day NC, Collins SD, Bingham S, Wilson AW, Elliot D, Birch R, Anand P. (2006). Prostanoid receptor EP1 and Cox-2 in injured human nerves and a rat model of nerve injury: a time-course study. *BMC Neurol*. 4, 6:1.

Federación Mexicana de Diabetes. (2009).

Ferreira SH, Lorenzetti BB. (1996). Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm Res*. 45(10), 499-502.

Friedrich AE, Gebhart GF. (2003). Modulation of visceral hypersalgesia by morphine and cholecystokinin from the rat rostroventral medial medulla. *Pain*. 104, 93-101.

Fukazawa Y, Maeda T, Kiguchi N, Tohya K, Kimura M, Kishioka S. (2007). Activation of Spinal Cholecystokinin and Neurokinin-1 Receptors Is Associated With the Attenuation of Intrathecal Morphine Analgesia Following Electroacupuncture Stimulation in Rats. *J Pharmacol Sci*. 104, 159 – 166.

Geraldes P, King GL.(2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010. 30, 106(8):1319-31.

Giacco F, Brownlee M. (2011). Oxidative stress and diabetic complications
Circ Res. 107(9), 1058–1070.

Gillis JC, Brogden RN. (1997). Ketorolac. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management. *Drugs*. 53(1), 139-88.

Hammond DL, Donahue BB, Stewart PE. (1997). Role of spinal delta 1 and delta 2 opioid receptors in the antinociception produced by microinjection of L-glutamate in the ventromedial medulla of the rat. *Brain Res*. 765, 177-181.

Hefferan MP, O'Rielly DD, Loomis CW. (2003). Inhibition of spinal prostaglandin synthesis early after L5/L6 nerve ligation prevents the development of prostaglandin-dependent and prostaglandin-independent allodynia in the rat. *Anesthesiology*. 99(5), 1180-8.

Heinricher MM, Neubert MJ. (2004). Neural basis for the hyperalgesic action of cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol*. 92(4), 1982-9.

Hoffmann T, Sauer SK, Horch RE, Reeh PW. (2008). Sensory transduction in peripheral nerve axons elicits ectopic action potentials. *J. Neurosci*. 28, 6281–84.

Hsieh YC, Liang WY, Tsai SK, Wong CS. (2005). Intrathecal ketorolac pretreatment reduced spinal cord ischemic injury in rats. *Anesth Analg.* 100(4), 1134-9.

Hudson CA, Christophi GP, Cao L, Gruber RC, Massa PT. (2006). Regulation of avoidant behaviors and pain by the anti-inflammatory tyrosine phosphatase SHP-1. *Neuron Glia Biol.* 2(4), 235-46.

Idänpään-Heikkilä JJ, Perrot S, Guilbaud G, Kayser V. (1997). In mononeuropathic rats, the enhancement of systemic morphine and stimulus characteristics. *Eur J Pharmacol.* 325, 155-164.

Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 11059–63.

Juárez-Rojop IE, Granados-Soto V, Díaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Torres-López JE. (2006). Involvement of cholecystinin in peripheral nociceptive sensitization during diabetes in rats as revealed by the formalin response. *Pain.* 122(1-2), 118-25.

Juárez-Rojop IE, Morales-Hernández PE, Tovilla-Zárate CA, Bermúdez-Ocaña DY, Torres-Lopez JE, Ble-Castillo JL, Díaz-Zagoya JC, Granados-Soto V. (2015). Celecoxib reduces hyperalgesia and tactile allodynia in diabetic rats. *Pharmacol Rep.* 67(3), 545-52.

Julius D, Basbaum AI. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 13;413(6852), 203-10.

Kamei J, Zushida K, Nagase H. (2001). Role of cholecystinin in the reduction of endomorphin-2-induced antinociception in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 416, 95-99.

Kantharidis P, Wang B, Carew RM, Lan HY. (2011). Diabetes complications: the

microRNA perspective. *Diabetes*. 60(7), 1832-7.

Kausar F, Davis MP. (2006). Ketorolac in neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage*. 32(3), 202-4.

Kellogg AP¹, Cheng HT, Pop-Busui R. (2008). Cyclooxygenase-2 pathway as a potential therapeutic target in diabetic peripheral neuropathy. *Curr Drug Targets*. 9(1), 68-76.

Kellstein DE, Mayer DJ. (1991). Spinal co-administration of cholecystokinin antagonists with morphine prevents the development of opioid tolerance. *Pain*. 47(2), 221-9.

Kelly JS, Larkman P. (1989). Increased neuronal excitability: how unique is the action of CCK? The neuropeptide cholecystokinin. *Ellis Horwood*. 181-185.

Kidd BL, Urban LA. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 87, 3-11.

Kim HS, Kim T, Kim M, Suh D, Chung H, Song Y. (2013). Cyclooxygenase-1 And -2: Molecular Targets For Cervical Neoplasia. *Journal of Cancer Prevention*. 18(2), 123-134.

Kimura S, Kontani H. (2009). Demonstration of antiallodynic effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on established diabetic neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Sci*. 110(2), 213-7.

Kovelowski CJ, Ossipov MH, Sun H, Lai J, Mala TP, Porreca F. (2000). Supraspinal cholecystokinin may drive tonic descending facilitation mechanism to maintain neuropathic pain in the rat. *Pan*. 87, 265-273.

Kurrikoff K, Köks S, Matsui T, Bourin M, Arend A, Aunapuu M, Vasar E. (2004). Deletion of the CCK2 receptor gene reduces mechanical sensitivity and abolishes the development of hyperalgesia in mononeuropathic mice. *Eur J Neurosci*. 20(6), 1577-86.

Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A. (2008). The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci.* 1126, 76–80.

Maciewicz R, Phipps BS, Grenier J, Poletti CE. (1984). Edinger-Westphal nucleus: cholecystokinin immunocytochemistry and projection to spinal cord and trigeminal nucleus in the cat. *Brain Res.* 299, 139-145.

Malcangio M, Tomlinson DR. (1998). A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain.* 76, 151-157.

Ma W, Eisenach JC. (2002). Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance P, calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation. *Neuroscience.* 121(3), 681-90.

Ma W, Hatzis C, Eisenach JC. (2003). Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation. *Brain Res.* 24,988(1-2), 97-104.

Marshall TM, Herman DS, Largent-Milnes TM, Badghisi H, Zuber K, Holt SC, Lai J, Porreca F, Vanderah TW. (2012). Activation of descending pain-facilitatory pathways from the rostral ventromedial medulla by cholecystokinin elicits release of prostaglandin-E₂ in the spinal cord. *Pain.* 153(1), 86-94.

Matsunaga A, Kawamoto M, Shiraishi S, Yasuda T, Kajiyama S, Kurita S, Yuge O. (2007). Intrathecally administered COX-2 but not COX-1 or COX-3 inhibitors attenuate streptozotocin-induced mechanical hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 554(1), 12-7.

McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;96(1), 272-7.

McNally GP. (1999). Pain facilitatory circuits in the mammalian central nervous system: their behavioral significance and role in morphine analgesic tolerance. *Neurosci Biohev Rev.* 8, 1059-1078.

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

Mert T, Gunay I, Isil Ocal, Guzel AI, Inal TC, Sencar L, Polat S. (2009). Macrophage depletion delays progression of neuropathic pain in diabetic animals. *Archives of Pharmacology.* 379, 445-452.

Merskey H. (1994). Logic truth language in concepts of pain. *Qua Life Res.* 3, 69-76.

Mi Y, Zhang X, Zhang F, Qi J, Gao H, Huang D, Li L, Zhang H, Du X. (2013). The role of potassium channel activation in celecoxib-induced analgesic action. *PLoS One.* 8(1), 54797.

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

Millan MJ. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neur.* 66, 355-474.

Mixcoatl-Zecuatl T, Quinonez-Bastidas GN, Caram-Salas NL, Ambriz-Tututi M, Araiza-Saldana CI, Rocha-Gonzalez HI, 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 Find Exp Clin Pharmacol.* 30(6), 431-41.

Morales-Vidal S, Morgan C, McCoyd M, Hornik A. (2012). Diabetic peripheral neuropathy and the management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Postgrad Med.* 124(4), 145-53.

Moreno-Altamirano L, Limón-Cruz D. (2009). Panorama general y factores asociados a la diabetes. *Rev Fac Med UNAM*. 52(5), 219-223.

Noble F, Roques BP. (1999). CCK-B receptor: chemistry, molecular biochemistry and pharmacology. *Prog Neurobiol* 58, 349-379.

Orikawa Y, Kato H, Seto K, Kobayashi N, Yoshinaga K, Hamano H, Hori Y, Meyer T, Takei M. (2010). Z-360, a novel therapeutic agent for pancreatic cancer, prevents up-regulation of ephrin B1 gene expression and phosphorylation of NR2B via suppression of interleukin-1 β production in a cancer-induced pain model in mice. *Mol Pain*. 6, 72.

Ossipov MH, Lopez Y, Nichols ML, Bian D, Porreca F. (1995). Inhibition by spinal morphine of the tail-flick response is attenuated in rats with nerve ligation injury. *Neurosci Lett*. 199(2), 83-6.

Ossipov MH, Lai J, Vanderah TW, Porreca F. (2003). Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. *Life Sci*. 27;73(6), 783-800.

Ortega-Varela LF, Herrera JE, Caram-Salas NL, Rocha-Gonzalez HI, Torres-López JE, Granados-Soto V. (2009). Synergistic antiallodynic interaction of the metamizol-gabapentin combination. *Drug development Research*. 70, 386-394.

Padi SS, Naidu PS, Kulkarni SK. (2006). Involvement of peripheral prostaglandins in formalin-induced nociceptive behaviours in the orofacial area of rats. *Inflammopharmacology*. 14(1-2), 57-61.

Parris WC, Janicki PK, Johnson B Jr, Horn JL. (1996). Intrathecal ketorolac tromethamine produces analgesia after chronic constriction injury of sciatic nerve in rat. *Can J Anaesth*. 43(8), 867-70.

Payne R. (1986). Neuropathy pain syndromes with special reference to causalgia and reflex sympathetic dystrophy. *Clin J Pain*. 2, 59-73.

Pop-Busui R, Marinescu V, Van Huysen C, Li F, Sullivan K, Greene DA, Larkin D, Stevens MJ. (2002). Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl-L-carnitine administration. *Diabetes*. 51(8), 2619-28.

Pountos I, Giannoudis PV, Jones E, English A, Churchman S, Field S, Ponchel F, Bird H, Emery P, McGonagle D. (2011). NSAIDs inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man. *J Cell Mol Med*. 15(3), 525-34.

Puzas JE, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Zhang X. (2003). Pharmacologic modulators of fracture healing: the role of cyclooxygenase inhibition. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 3(4), 308-12.

Rainsford KD. (1999). Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med*. 107, 27S-35.

R. E. Kauffman, M. W. Lieh-Lai, H. G. Uy, and M. K. (1999). Aravind, "Enantiomer-selective pharmacokinetics and metabolism of ketorolac in children,". *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 65(4), 382-388.

Ripamonti C, Ticozzi C, Zecca E, Rodriguez CH, De Conno F. (1996). Continuous subcutaneous infusion of ketorolac in cancer neuropathic pain unresponsive to opioid and adjuvant drugs. A case report. *Tumori*. 82(4), 413-5.

Romanovsky D, Moseley AE, Mrak RE, Taylor MD, Dobretsov M. (2007). Phylogenetic preservation of alpha3 Na⁺,K⁺-ATPase distribution in vertebrate peripheral nervous systems. *J Comp Neurol*. (6), 1106-16.

Rooks WH 2nd, Tomolonis AJ, Maloney PJ, Wallach MB, Schuler ME. (1982). The analgesic and anti-inflammatory profile of (+/-)-5-benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[1,2a]pyrrole-1-carboxylic acid (RS-37619). *Agents Actions*. 12(5-6), 684-90.

Schafer M, Zhou L, Stein C. (1998). Cholecystokinin inhibits peripheral opioid analgesia in inflamed tissue. *Neurosci.* 82, 603-611.

Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. (2000). AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- beta (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol.* 278, 676-83.

Scholz J, Woolf CJ. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci.* 5, 1062-1067.

Schiffmann SN, Teugts E, Halleux P, Menu R, Vanderhaeghen JJ. (1991). Cholecystokinin mRNA detection in rat spinal cord motoneurons but not in dorsal root ganglia neurons. *Neurosci Lett.* 123, 123-126.

Scholz J, Woolf CJ. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci.* 5, 1062-1067.

Skirboll L, Hokfelt T, Dockray G, Rehfeld J, Brownstein M, Cuello AC. (1983). Evidence for periaqueductal cholecystokinin-substances P neurons projecting to spinal cord. *J Neurosci.* 3, 1151-1157.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 56(3), 387-437.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 271(52), 33157-60.

Sorkin L.S. (1997). Mecanismos nociceptivos y neuropaticos con correlaciones Clínicas. *Farmacología y Fisiología básica del dolor agudo. Clínicas de Anestesiología de Norteamérica.* 2, 245-259.

Stanfa L, Dickenson AH, Xu Xj, Wiesenflod-Hallin Z. (1994). Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme. *Trends Pharmacol.* 15, 65-66.

Stirban A, Rösen P, Tschoepe D. (2008). Complications of type 1 diabetes: new molecular findings. *Mt Sinai J Med.* 75(4), 328-51.

Storz P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 10, 1881-1896.

Takeda K, Sawamura S, Tamai H, Sekiyama H, Hanaoka K. (2005). Role for cyclooxygenase 2 in the development and maintenance of neuropathic pain and spinal glial activation. *Anesthesiology.* 103(4), 837-44.

Tallarida RJ. (2000). Drug synergism and dose effect data analysis. NY. *Chapman & Hall/CRC.* 1-72.

Torres-López JE, Juárez-Rojop IE, Granados-Soto V, Diaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Ortiz-López JU, Cruz-Vera J. (2007). Peripheral participation of cholecystokinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats. *Neuropharmacology.* 52(3), 788-95.

Toth C, Martinez J, Zochodne DW. (2007). RAGE, diabetes, and the nervous system. *Curr Mol Med.* 7, 766–76.

Urban MO, Gebhart GF. (1999). Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 96, 7687-7692.

Vane J. (2000). Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax.* 55, 3–9.

Verge VM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T. (1993). Cholecystokinin in mammalian primary sensory neurons and spinal cord: in situ hybridization studies in rat and monkey. *Eur J Neurosci.* 5(3), 240-50.

Verdu B., Decosterd I, Buclin T, Stiefel F, Berney A. (2008). Antidepressants for the treatment of chronic pain. *Drugs.* 68(18), 2611-2632.

Vikramadithyan RK, Hu Y, Noh HL, Liang CP, Hallam K, Tall AR, Ramasamy R, Goldberg IJ. (2005). Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest.* 24, 34–43.

Vinik, A. I. Mehrabyan, A. (2004). Diabetic neuropathies. *Med. Clin. N. Am.* 88, 947-999.

Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, et al. (2007). Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology.* 148, 548–58.

Wiertelak EP, Maier SF, Watkins LR. (1992). Cholecystokinin anti-analgesic: safety cues abolish morphine analgesia. *Science.* 256, 830-833.

Williams RG, Dimaline R, Varro A, Isetta AM, Trizio D, Dockray GJ. (1987). Cholecystokinin octapeptide in rat central nervous system: Immunocytochemical studies using a monoclonal antibody that does not react with CGRP. *Neurochem Int.* 11(4), 433-42.

Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malcangio M. (2009). Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain.* 13(8), 807-11.

Woolf CJ, Salter MW. (2000). Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science.* 288, 1765– 1769.

Woolf, C.J. and Mannion, R.J., (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management, *Lancet.* 353, 1959-1964.

Xie JY, Herman DS, Stiller CO, Gardell LR, Ossipov MH, Lai J, Porreca F, Vanderah TW. (2005). Cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *J Neurosci.* 12;25(2), 409-16.

Xu XJ, Puke MJ, Verge VM, Wiesenfeld-Hallin ZA, Hughes J, Hokfelt T. (1993). Up-regulation of cholecystokinin in primary sensory neurons is associated with morphine insensitivity in experimental neuropathic pain in the rat. *Neurosci Lett.*

152, 129-132.

Xu XJ, Alster P, Wu WP, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z. (2001). Increased level of cholecystokinin in cerebrospinal fluid is associated with chronic pain-like behavior in spinally injured rats. *Peptides*. 22(8), 1305-8.

Xue M, Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase in ageing. (2011). *Semin Cell Dev Biol*. 22, 293–301.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. (1995). Role of cholecystokinin-B receptor in the maintenance of thermal hyperalgesia induced by unilateral constriction injury to the sciatic nerve in the rat. *Neurosci Lett*. 202(1-2), 89-92.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. (1996). Analysis of the effects of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin a non-selective COX inhibitor and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res*. 739, 104-110.

Yaguo Z, Eyup A, Kaleeckal GH, Jessika H, Michael DP, Mary ML, Laurence M. (2009). Induced association of μ opioid (MOP) and type 2 cholecystokinin (CCK 2) receptors by novel bivalent ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. 52, 247-258.

Yeong-Ray Wen, Ping-Heng Tan, Jen-Kun Cheng, Yen-Chin Liu, Ru-Rong Ji. (2011). Role of microglia in neuropathic pain, postoperative pain, and morphine tolerance. *J Formos Med Assoc*. 110(8), 487–494.

Zhang X, Dargerlind A, Elde RP, Castel MN, Broberfer C, Wiesenfeld-Hallin ZA, Hokfelt T. (1993). Marked increase in cholecystokinin B receptors Messenger RNA levels in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. *Neurosci*, 57, 227-233.

Zarghi A, Arfaei S. (2011). Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res*. 10(4), 655-83.

Zhao FY, Spanswick D, Martindale JC, Reeve AJ, Chessell IP. (2007). GW406381, a novel COX-2 inhibitor, attenuates spontaneous ectopic discharge in sural nerves of rats following chronic constriction injury. *Pain*. 128(1-2), 78-87.

Zimmerman M. (1983). Ethical guidelines for investigation on experimental pain in conscious animal. *Pain*. 16, 109-110.

Zhu X, Eisenach JC. (2003). Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. *Anesthesiology*. 99(5), 1175-9.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.