



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Estudio farmacodinámico-farmacocinético  
de la combinación ketorolaco-metileugenol  
en ratas.

Tesis para obtener el grado de  
Químico Farmacéutico Biólogo

**PRESENTA**  
**Alvaro Bouret Araiza**

Directora: Dra. Leticia Cruz Antonio  
Asesora: Dra. Ma. Elena Sánchez Mendoza

Proyecto PAPIIT IN 213918



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Contenido

I.	Introducción.....	1
II.	Marco teórico.....	2
	II.a Dolor.....	2
	II.a1 Biología del dolor.....	2
	II.a2 Transmisión del estímulo doloroso.....	3
	II.a3 Algesia e hiperalgesia.....	5
II.b1	Evaluación experimental del dolor.....	6
II.b2	Manejo farmacológico del dolor.....	6
	II.c Ketorolaco.....	7
II.d	Uso de plantas medicinales en el manejo del dolor.....	8
	II.e <i>Peperomia hispidula</i> .....	8
II.f	Farmacología.....	9
II.f1	Sustancias con actividad farmacológica.....	9
II.f2	Farmacocinética.....	9
II.f3	Análisis Farmacocinético.....	11
II.f4	Farmacodinamia.....	12
II.f5	Análisis farmacodinámico.....	12
II.g	Alteración de la respuesta farmacológica.....	13
II.g1	Análisis matemático de las interacciones farmacológicas.....	14
III.	Planteamiento del problema.....	16
IV.	Hipótesis.....	16
V.	Objetivos.....	16
	V.I Objetivo general.....	16
	V.II Objetivos específicos.....	17
VI.	Material y métodos.....	18
	VI.A Estudio farmacodinámico.....	18
	VI.A1 Determinación de la dosis efectiva ( $DE_{30}$ ).....	18

VI.A2 Determinación de la interacción farmacodinámica.....	21
VI.B Estudio farmacocinético.....	23
VI.B2 Método analítico.....	24
VII. Resultados.....	26
VIII. Análisis de resultados.....	33
IX. Conclusión.....	36
X. Referencias.....	37
Anexo 1: Procedimiento de canulación arterial.....	44
Anexo 2: Validación del método analítico.....	50
Anexo 3. Estudio farmacodinámico.....	56
Anexo 4 Estudio farmacocinético.....	62

Agradecimientos.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA por proporcionar financiamiento a través del programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) IN213918.

A la Dra. Leticia Cruz Antonio, por permitirme colaborar bajo su dirección y por compartir su conocimiento e infinita paciencia, razones que me hacen admirarla como la gran investigadora que es pero también por su gran calidez humana.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo experimental.

A la Dra. Adriana Altamirano y al personal del bioterio de la FES Zaragoza por todo su apoyo durante la realización de esta investigación.

A la Dra. Ma. Elena Sánchez Mendoza y al Dr. Jesús Arrieta Valencia investigadores pertenecientes a la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Al Dr. Eduardo Roa Coria, Investigador del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por su apoyo para la realización de esta investigación.

A mi compañera la Q.F.B Valentina Zamora Xolo, por su valioso apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales. Q.F.B Ma. Elena Flores Ponce, Q.F.B Miriam Hinojosa y M. en C. Alma Elena Ibarra Cázares, por su dedicación.

Dedicatoria.

A mi abuelo, el profesor Alvaro Bouret Fuentes. Quien ha sido un gran consejero y guía durante mi formación académica y personal. Por sus palabras que cada día me ayudan a ser una mejor persona.

A mis padres y a mi hermano, por motivarme a continuar y siempre ser una inspiración para continuar con mi trayectoria académica.

A todos mis profesores, ya que ellos forman parte de todo lo que he logrado, agradezco que hayan compartido sus conocimientos conmigo y que contribuyeran a mi formación.

## I. Introducción

El Ketorolaco, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) es ampliamente usado en la clínica para el tratamiento del dolor agudo. Actúa disminuyendo la síntesis de prostaglandinas por medio de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) la cual tiene dos isoformas (COX-1 y COX-2). Derivado del uso de este, uno de los eventos adversos más frecuentes son las alteraciones del tracto gastrointestinal (TGI). Como una respuesta ante esto, se propuso usar en combinación ketorolaco con metileugenol un componente activo de la planta *Peperomia hispidula*, identificado con propiedades gastroprotectoras y antinociceptivas. Sin embargo, ante la posibilidad de que exista una interacción farmacológica, se decidió estudiar el efecto de la administración de metileugenol sobre la respuesta antinociceptiva y farmacocinética de ketorolaco.

Para ello se caracterizó el perfil farmacodinámico de ambos compuestos, empleando un modelo animal de nocicepción y posteriormente se determinó si existía una interacción farmacodinámica entre ambos compuestos. Hallándose que existe sinergia entre ellos. Para descartar la posibilidad de que hubiera alteraciones en los procesos farmacocinéticos de ketorolaco como resultado de la administración del compuesto, se evaluó el efecto de metileugenol sobre el perfil plasmático de ketorolaco, no encontrándose diferencia significativa entre los parámetros farmacocinéticos evaluados de los grupos analizados.

Como resultado de este trabajo de investigación, se encontró que existe una actividad sinérgica entre ketorolaco y metileugenol a las dosis (1.64/1.9 mg/kg respectivamente) lo que permite administrar una dosis menor de ketorolaco y disminuir la probabilidad de los eventos adversos atribuidos a este, asimismo, la adición de metileugenol no altera el comportamiento farmacocinético de ketorolaco.

## II. Marco teórico

### II.a Dolor

La asociación internacional para el estudio del dolor define el dolor una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial en un tejido.(1)

Existen distintos tipos de dolor: El de tipo nociceptivo, producto de la estimulación breve de los nociceptores pero suficiente para causar la transmisión de un estímulo doloroso, dolor de tipo inflamatorio o hiperalgesia como producto de un daño tisular donde se liberan sustancias algésicas sensibilizantes produciendo una respuesta aumentada del dolor frente a un estímulo que ya era doloroso y el dolor neuropático, donde existe alodinia y hay dolor frente a estímulos que no son dolorosos debido a que el umbral del dolor ha disminuido.(2) como puede observarse en la figura 1.

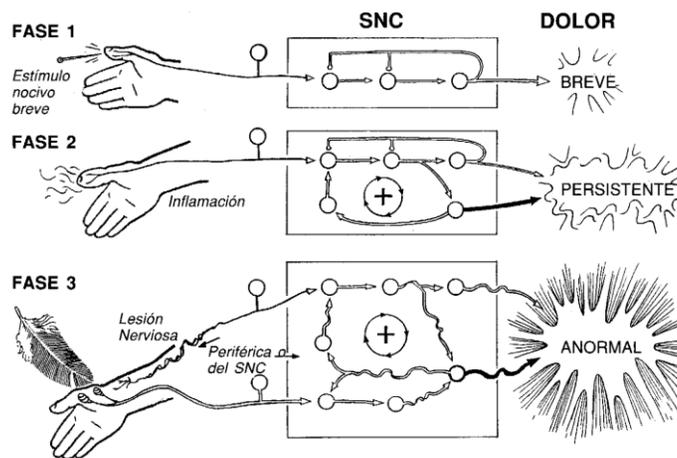


Figura 1: En este esquema se muestran las distintas fases que explican la transmisión del impulso doloroso.(3)

#### II.a1 Biología del dolor

El sistema nervioso cuenta con neuronas aferentes que transmiten información percibida desde el medio ambiente hacia la corteza somatosensorial y desde el sistema nervioso central a la periferia. Las neuronas aferentes son mejor conocidas como neuronas sensoriales las cuales pueden identificarse como: Nociceptores, mecanorreceptores y termorreceptores. También cuenta con neuronas eferentes que envían información desde el sistema nervioso central hacia la periferia. Dependiendo su grado de mielinización, pueden transmitir con mayor rapidez el estímulo doloroso. Los nociceptores cuentan con

fibras A delta y C (figura2), capaces de transmitir un impulso en 30 milisegundos y 0.3 milisegundos respectivamente.(4)

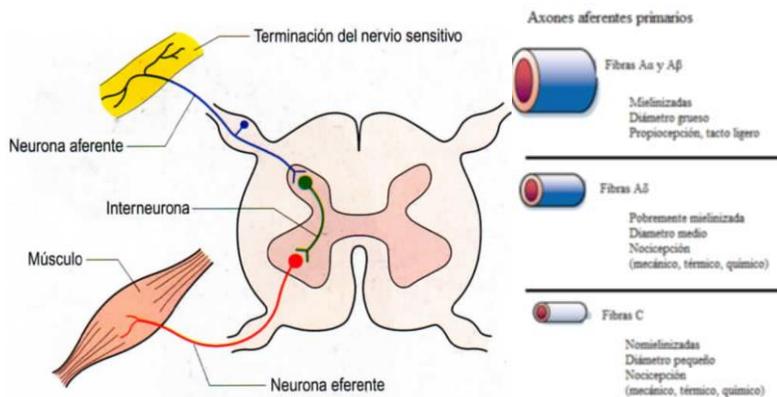


Figura 2 Neuronas aferentes y eferentes del sistema nervioso y grado de mielinización (5)

## II.a2 Transmisión del estímulo doloroso

El dolor es un mecanismo de preservación de la integridad física de los organismos vivos. (6) Por lo que ante una lesión se transmite información acerca del daño recibido y se genera en consecuencia una acción para evitar el daño. La transmisión de dicha información o “estímulo doloroso” consta de 3 fases. Transducción: Ocurre cuando un estímulo doloroso produce una despolarización suficiente de tal manera que se transmitirá un potencial de acción. Posteriormente, este impulso debe ser transmitido a través de la membrana de la neurona aferente, esta neurona se denomina neurona de primer orden, el potencial de acción llega hasta el asta dorsal de la médula espinal, donde la neurona de primer orden hace sinapsis con una neurona de segundo orden. Posteriormente, esta transmite el potencial de acción al tálamo donde una neurona de tercer orden prolonga su axón hasta la corteza somatosensitiva. Es en el tálamo donde se procesa información sobre la nocicepción y se decide si se envía a la corteza somatosensitiva, además, se inicia el proceso de modulación de dolor mediante mecanismos de regulación descendente. (7)

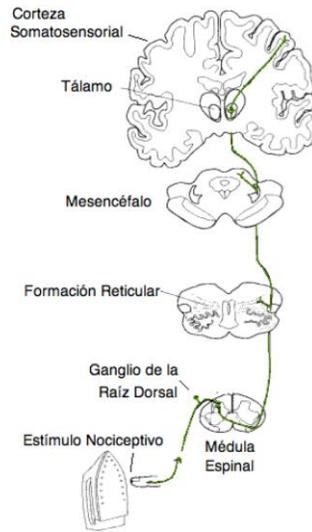


Figura 3 Fisiopatología de la transmisión de un estímulo nociceptivo térmico. (8)

Los procesos de regulación implican cambios en el umbral de excitación de los nociceptores periféricos, cambios a nivel espinal hiperpolarizando neuronas de segundo orden mediante la liberación de endorfinas y opioides endógenos.(3,7)

La fase de modulación permite diferenciar entre 2 etapas de la nocicepción. La primera fase es ocasionada por estímulos nociceptivos cortos y no persistentes. (9)

Posteriormente se observa una disminución en la nocicepción que corresponde a la modulación de esta, si el estímulo nociceptivo continúa, se observa una segunda fase debida a la sensibilización de los nociceptores por sustancias algésicas produciendo hiperalgesia.(3)

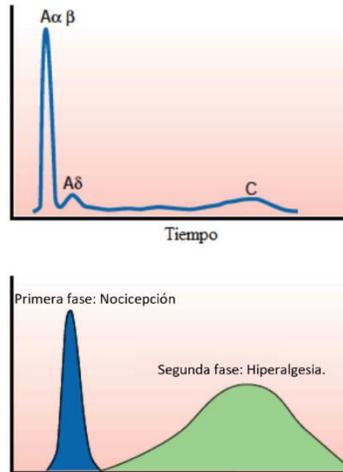


Figura 4 Participación de los distintos tipos de fibras en la transmisión del estímulo doloroso durante la primera y segunda fase del dolor.(9)

### II.a3 Algesia e hiperalgesia

Frente a un daño tisular, se liberan sustancias algésicas como: sustancia P, Acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas, histamina, etc. Las prostaglandinas forman parte de las sustancias llamadas eicosanoides, procedentes del ácido araquidónico. Cuando una membrana celular resulta dañada, se libera fosfolipasa A<sub>2</sub> que hidroliza los fosfolípidos para producir ácido araquidónico, por acción de la ciclooxigenasa, se producen prostaglandinas, cuya función es sensibilizar los axones frente a los estímulos dolorosos como una acción preventiva para no causar más daño y favorecer la recuperación. (10)

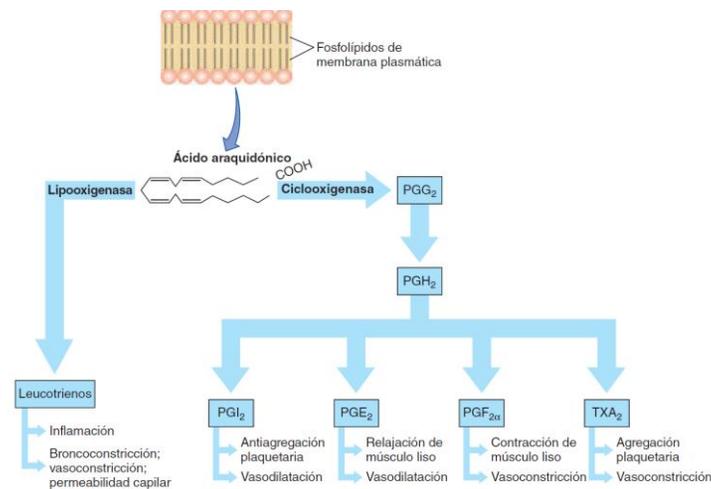


Figura 5 Síntesis de prostaglandinas y funciones fisiológicas (11)

### II.b1 Evaluación experimental del dolor.

Los modelos animales de dolor pueden ser clasificados de acuerdo con la duración del estímulo nocivo, el cual puede ser persistente o momentáneo. También puede ser estudiado desde el punto de vista del tipo de dolor, el cual puede ser nociceptivo, inflamatorio o neuropático. El modelo de formalina es empleado para producir un estímulo nociceptivo intenso y persistente, pero de un intervalo de duración corto. La evaluación de la respuesta es conductual, dependiendo de la especie empleada(12). En los ratones la respuesta conductual es lamer el sitio de inyección de formalina, en cuyo caso el área bajo la curva acotada dentro de un intervalo de tiempo puede ser empleada como una medida de la nocicepción. La respuesta se encuentra dividida en dos fases, una primera fase que corresponde a la nocicepción y una segunda fase correspondiente al dolor inflamatorio o hiperalgesia. Entre ambas fases se encuentra una disminución de la respuesta al estímulo nocivo, que corresponde a la modulación del dolor.(13)

### II.b2 Manejo farmacológico del dolor

Dado que el dolor es una patología de etiología variable, su tratamiento se hace necesario debido a que es una experiencia desagradable y disminuye la calidad de vida cuando éste se hace crónico. Existen dos maneras de abordarlo, mediante tratamientos quirúrgicos invasivos y mediante farmacoterapia, siendo esta una opción que proporciona alivio en la mayoría de los casos.(14,15)

### II.b3 Tratamiento con AINES

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), son un grupo farmacológico con moléculas estructuralmente heterogéneas. Son usados para tratar la inflamación, dolor y fiebre de intensidades leve a moderada. Algunas de sus estructuras comunes son: salicilatos, derivados del ácido propiónico, ácido acético o ácidos enólicos. (16)

### II.b4 Mecanismo de acción de los AINES

El mecanismo de acción de los AINES es debido a que evitan la síntesis de prostanoideos mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, la cual produce al intermediario PGG<sub>2</sub>. Esta enzima tiene dos isoformas, ciclooxigenasa-1 (COX-1) que es constitutiva y ciclooxigenasa-2 (COX-2) que es inducible frente al daño tisular. Esta última (COX-2) es la responsable de la síntesis de PGG<sub>2</sub>, un producto intermedio en la síntesis de prostanoideos

que es peroxidado para producir  $PGH_2$ , el cual es posteriormente transformado por la enzima prostaglandinasintasa. (17)

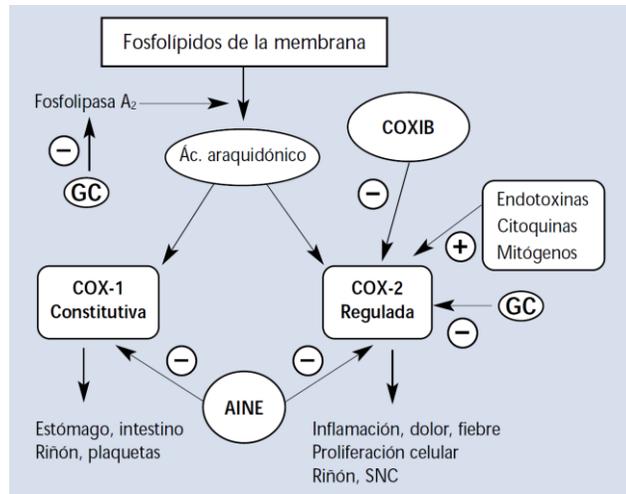


Figura 6 Se muestra el mecanismo de acción de los AINES no selectivos y de los AINES selectivos de la COX-2. (14)

### II.c Ketorolaco

El ketorolaco es un analgésico y antiinflamatorio no esteroideo (AINE), con similitud estructural al ácido acético, tiene una mayor selectividad hacia la COX-1 por lo que tiene mayores efectos secundarios a nivel gastrointestinal y renal.(16) El mecanismo de acción del ketorolaco es similar al de los demás AINES, actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas debido a la interacción no selectiva con la enzima ciclooxigenasa (18), la cual tiene dos isoformas (COX-1 y COX-2), reportándose que la COX-2 produce la  $PGG_2$  cuando existe daño tisular, que posteriormente es transformado en  $PGE_2$  una de las sustancias participantes en la inflamación y dolor patológico. La COX-1, participa en la síntesis de prostaglandinas que intervienen en la secreción de moco gástrico y regulando la resistencia vascular renal. Además, activa de manera indirecta los receptores kappa, modula la producción de óxido nítrico y facilita la entrada de calcio al espacio intracelular. (19) Al ser un fármaco inespecífico, sus efectos tóxicos a nivel renal y gástrico son comunes y frecuentes al ser administrado por periodos de tiempo prolongados, pudiendo producir úlceras gástricas y nefritis intersticial.(20)

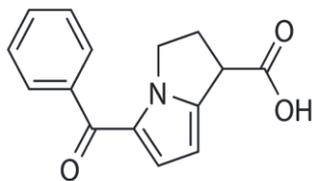


Figura 7 Estructura molecular del ketorolaco

#### II.d Uso de plantas medicinales en el manejo del dolor

México es uno de los países megadiversos, alberga entre 18,000 a 30,000 (21) especies distintas de plantas y aproximadamente 6000 son empleadas con fines medicinales(22). El uso de dichas plantas se remonta a la época prehispánica y forma parte de la cultura mexicana.

Debido a condiciones culturales, económicas o a los efectos secundarios ejercidos por los AINE, muchas personas recurren al uso de remedios herbolarios, como una alternativa con menos efectos adversos o simplemente como un coadyuvante en el manejo del dolor (23) además, se ha encontrado que estos compuestos naturales son efectivos en el manejo del dolor y además ofrecen beneficios como menos efectos secundarios a nivel gastrointestinal.(24,25)

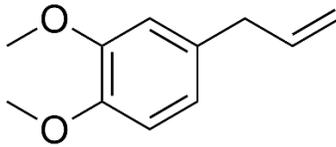
#### II.e *Peperomia hispidula*



Figura 8 *Peperomia hispidula* originaria de Michoacán, México. (26)

*Peperomia hispidula* es una planta usada en la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, específicamente úlceras gástricas, se ha identificado al metileugenol como el compuesto activo de esta planta y se ha referenciado que tiene un mecanismo de gastroprotección inespecífico, ya que no actúa inhibiendo la síntesis prostaglandinas, grupos sulfhidrido u óxido nítrico sintasa. (27) Asimismo, se ha encontrado que esta planta exhibe propiedades analgésicas, uniéndose a los canales de sodio

voltaje dependientes (28) y estabilizando el potencial de membrana dando como resultado la inhibición de la transmisión del estímulo doloroso.(29)



*Figura 9 Estructura molecular del metileugenol.*

## II.f Farmacología

### II.f1 Sustancias con actividad farmacológica

La definición más simple de fármaco es aquella sustancia que mediante la interacción con la biofase causa la modificación de una función fisiológica, ya sea por la interacción con una diana específica como un receptor, en cuyo caso existe un mecanismo definido o por cambio de las condiciones del medio biológico como alteración del pH, teniéndose un mecanismo inespecífico. Al resultado de estas modificaciones se le conoce como efecto fisiofarmacológico. (30)

Para obtener el efecto terapéutico de un fármaco, este tiene que interactuar con el organismo y pasar por diversas etapas hasta ser liberado de la forma farmacéutica en la cual se encuentra. (31) La forma farmacéutica y también la cantidad de fármaco que en ella se encuentre, condicionan la pauta de administración para obtener el efecto terapéutico deseado.

### II.f2 Farmacocinética

La farmacocinética, se encarga de estudiar el curso temporal de los fármacos o sustancias de interés biológico a través del cuerpo analizando la manera en que estas interactúan con el sistema biológico desde el momento en que son administrados hasta su eliminación.

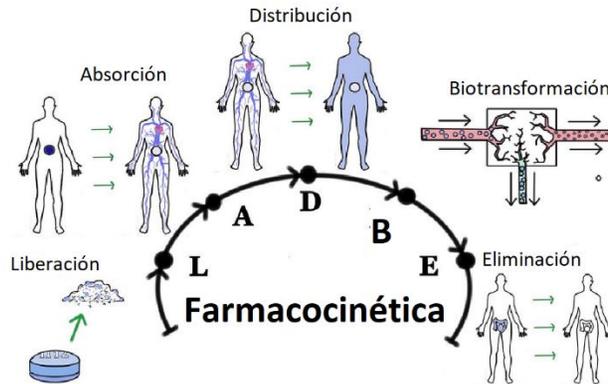


Figura 10 Etapas del curso de un fármaco a través del organismo.

Los procesos farmacocinéticos que describen el curso temporal de un fármaco a través del organismo después de su administración implican primero la liberación del fármaco de la forma farmacéutica en la que se ha dosificado, posteriormente cuando el fármaco se ha liberado, este tiene que ser transportado desde el sitio de administración hacia el torrente sanguíneo mediante diversos procesos de transporte como pueden ser: difusión, transporte activo o pasivo, etc. Cuando el fármaco alcanza el torrente sanguíneo, de manera instantánea comienza a ser distribuido a todo el organismo y sus tejidos hasta que alcanza un estado de equilibrio, dicha distribución depende de las características fisicoquímicas del principio activo y de su afinidad por un cierto tejido. (32) Al mismo tiempo que se está alcanzando el equilibrio, el fármaco es biotransformado en el hígado, ya sea para hacer al compuesto más polar y de este modo sea eliminado a través de la orina o poder ser eliminado por vía hepatobiliar.(33) Posteriormente los compuestos hidrosolubles pueden ser eliminados sin cambios por vía renal, en cuyo caso se habla de excreción o si fueron biotransformados en un compuesto de mayor polaridad son eliminados por vía renal. (34)

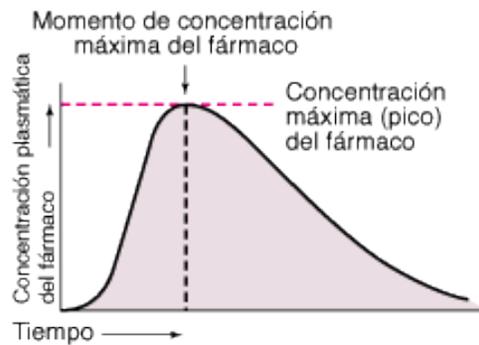


Figura 11 Curso temporal de un fármaco en plasma. (35)

## II.f3 Análisis Farmacocinético.

Los procesos farmacocinéticos pueden ser evaluados mediante parámetros calculados a través de métodos matemáticos. Los más empleados en la práctica suelen ser los siguientes:  $K_e$ ,  $V_d$ ,  $CL$ ,  $AUC$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $T_{m\acute{a}x}$  y  $t_{1/2}$ .

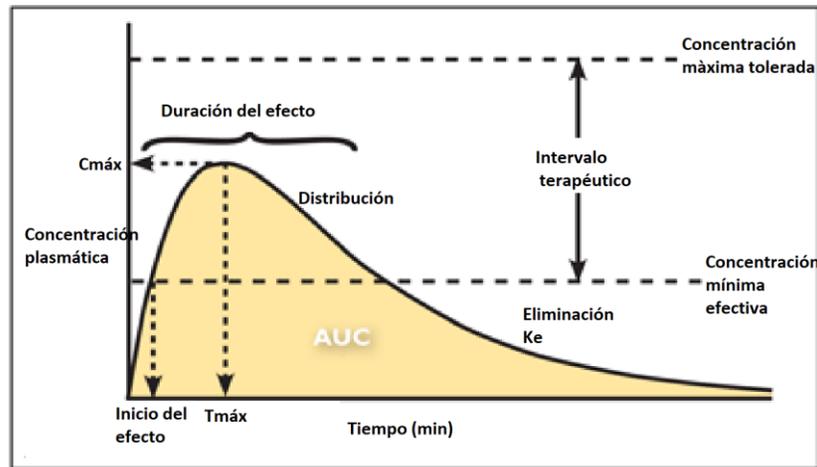


Figura 12 Parámetros farmacocinéticos (36)

Para realizar dichas estimaciones, se tiene que suponer que el organismo es una serie de compartimentos, donde la sangre es el compartimento central y los demás tejidos se comportan como periféricos. La farmacocinética de un compartimento asume que la sangre es el compartimento principal a través del cual el fármaco se distribuye y luego es eliminado. En el caso de que el fármaco sea absorbido desde el compartimento central hacia otro, se tendría una farmacocinética multicompartmental. (37)

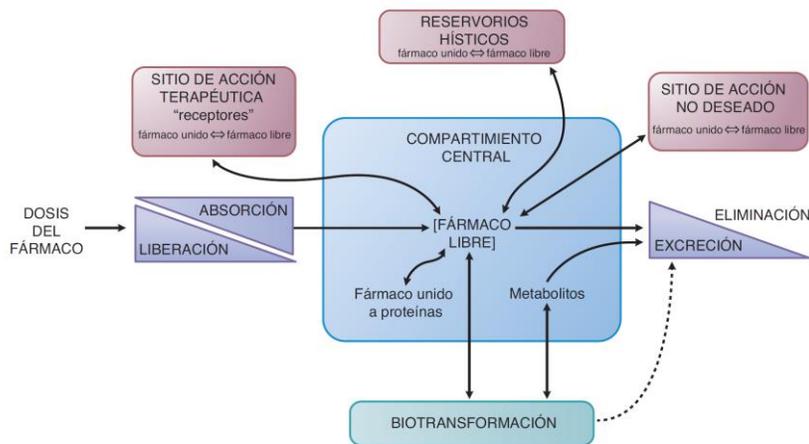


Figura 13 Farmacocinética compartimental (16)

Otro modo de realizar estimaciones de los parámetros farmacocinéticos es emplear el análisis no compartimental. Dado que este requiere de menos asunciones tal y como que el cuerpo está conformado por una serie de compartimentos finitos, en cambio el análisis no compartimental emplea la probabilidad de encontrar el fármaco en un tiempo dado siendo modelo-independiente.(38)

#### II.f4 Farmacodinamia

La farmacodinamia, describe y estudia el efecto fisiofarmacológico de una sustancia biológicamente activa y la manera en la que modifica una función fisiológica (mecanismo de acción). (16) Los fármacos, pueden interactuar con receptores y comportarse como agonistas, es decir, ejercer un efecto ya que mimetizan a una sustancia endógena, actúan también como antagonistas y no ejercen efecto alguno, bloqueando la unión de los mensajeros endógenos con su receptor o diana. Asimismo, hay sustancias con comportamiento de agonismo indirecto, donde producen el aumento de alguna sustancia endógena dando como resultado una respuesta de mayor intensidad. Los efectos de un fármaco se suelen representar en una curva dosis-respuesta. La intensidad del efecto se representa en el eje de ordenadas y la dosis en el de abscisas. La dosis se suele representar en una escala logarítmica. A medida que aumenta la dosis el efecto crece, hasta que alcanza un valor máximo. Para cada dosis, el efecto producido se suele expresar como porcentaje del efecto máximo alcanzable. (16)

#### II.f5 Análisis farmacodinámico.

El efecto farmacológico, puede ser evaluado desde el punto de vista del efecto terapéutico buscado y de este modo, medir el tamaño del efecto producido a distintas dosis. El efecto de un fármaco está condicionado por la dosis y la potencia del compuesto biológicamente activo, además de su afinidad por la diana farmacológica. Es aceptado que la respuesta farmacológica es proporcional a la dosis, sin embargo, esta tiende a alcanzar un punto máximo donde el incremento de dosis no producirá una mayor respuesta.(39) A dicho punto se le conoce como efecto máximo alcanzable. Cuando se alcanza la concentración que produce el efecto máximo, se asume que la mitad de la concentración es la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) que producirá el 50% del efecto terapéutico buscado. (16)

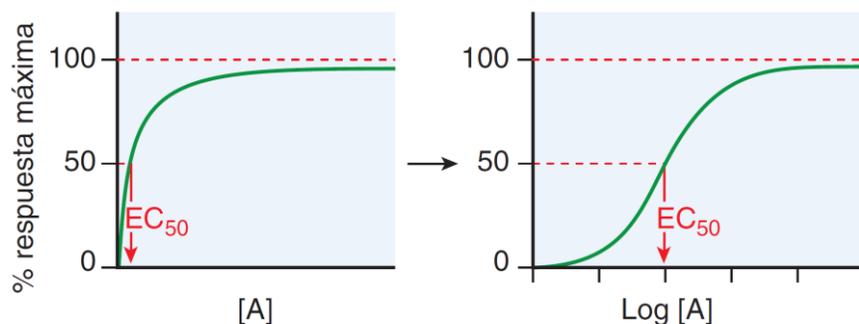


Figura 14 Curvas dosis respuesta gradual. En el eje de las ordenadas se muestra el efecto normalizado de la respuesta. En el eje de las abscisas se muestra la dosis [A] y su logaritmo.

## II.g Alteración de la respuesta farmacológica.

Son diversos los factores que pueden causar alteraciones en la respuesta farmacológica, como son: la anatomía propia de cada individuo, el sitio de administración, el estado de salud, la variabilidad genética, cantidad de enzimas y sustratos, dosis administrada, dosis absorbida, etc. La respuesta farmacológica es directamente proporcional a la cantidad biodisponible que se encuentra libre para ejercer su efecto, esta puede verse alterada debido a interacciones farmacéuticas, farmacocinéticas o farmacodinámicas. (31) Una interacción, se define como la modificación del efecto de una sustancia a causa de la administración de otra.

Las interacciones farmacéuticas ocurren antes de que la sustancia sea administrada o antes de ser absorbida y es debida a la incompatibilidad química o física entre dos o más fármacos o sus excipientes (40). Las interacciones farmacocinéticas, pueden presentarse en cualquiera de las fases durante el curso del fármaco en el organismo, ya sea la absorción, distribución, biotransformación o eliminación y dando como resultado un cambio en la fracción biodisponible, pudiendo tener un efecto intermitente o alcanzar dosis tóxicas.

Las interacciones farmacodinámicas, tienen lugar cuando se modifica el mecanismo de acción de algún fármaco por acción de otro, pudiendo ser este efecto de sumación, potencialización o sinergismo. Este tipo de interacción puede resultar benéfica, como es en el caso de los antibióticos o puede ser fatal si se potencia el efecto depresor del sistema nervioso central como en el caso de los ansiolíticos y el alcohol (16,41).

## II.g1 Análisis matemático de las interacciones farmacológicas

Las interacciones farmacológicas pueden ser evaluadas desde el punto de vista matemático, ya sean estas farmacocinéticas o farmacodinámicas. Cuando se evalúan las interacciones farmacocinéticas, es necesario trazar el perfil plasmático de la sustancia conocida que se desea evaluar, asimismo, evaluar el efecto de la combinación y la manera en la que el perfil plasmático y las constantes farmacocinéticas. Los parámetros a evaluar son los siguientes: Constante de absorción ( $K_a$ ), la interacción puede aumentar o disminuir la velocidad de absorción del compuesto a estudiar por mecanismos inespecíficos tales como la modificación del pH como resultado directo, la concentración máxima ( $C_{máx}$ ) puede verse afectada aumentando o disminuyendo de igual manera, el tiempo para alcanzar dicha concentración puede verse alterado, haciendo que el tiempo para alcanzar el pico máximo plasmático aumente o se retrase. Constante de eliminación ( $k_e$ ) la velocidad de eliminación del fármaco puede verse alterada debido a que el segundo compuesto administrado puede competir con el complejo enzimático encargado de biotransformar al fármaco o por el contrario, ser un inductor de su actividad dando como resultado una mayor velocidad de eliminación, en el caso de fármacos de eliminación o excreción renal puede haber competencia por el transportador encargado de eliminar al fármaco en cuestión haciendo que este se acumule hasta que el de mayor afinidad sea eliminado. Para saber si existen diferencias tras la evaluación de los parámetros farmacocinéticos es necesario emplear pruebas estadísticas que ayuden a inferir si las diferencias halladas son debidas a la variabilidad biológica y a causa del muestreo o si son el resultado del tratamiento administrado.

Las interacciones farmacodinámicas son evaluadas mediante el análisis isoblográfico como lo describe Tallarida (42). Para ello, es necesario conocer las dosis efectivas  $DE_{50}$  de los dos fármacos a estudiar (A y B) en el eje de las ordenadas se coloca el siguiente punto  $(0, DE_{50A})$  y en el eje de las abscisas se coloca el punto  $(DE_{50B}, 0)$ . Ambos puntos son unidos mediante una recta donde el punto medio de ese segmento es la dosis de aditividad teórica de A y B. Para evaluar el efecto de la combinación de fármacos, se determina la dosis de aditividad experimental y se grafica el punto obtenido en el isoblograma. Si el punto de aditividad experimental se sitúa debajo de la línea de aditividad teórica, se concluye que existe una interacción de tipo sinérgico, si cae en el mismo punto se trata de aditividad, es

decir no existe interacción. En caso de situarse por encima de la línea de aditividad teórica, se trata de una interacción de antagonismo entre A y B.

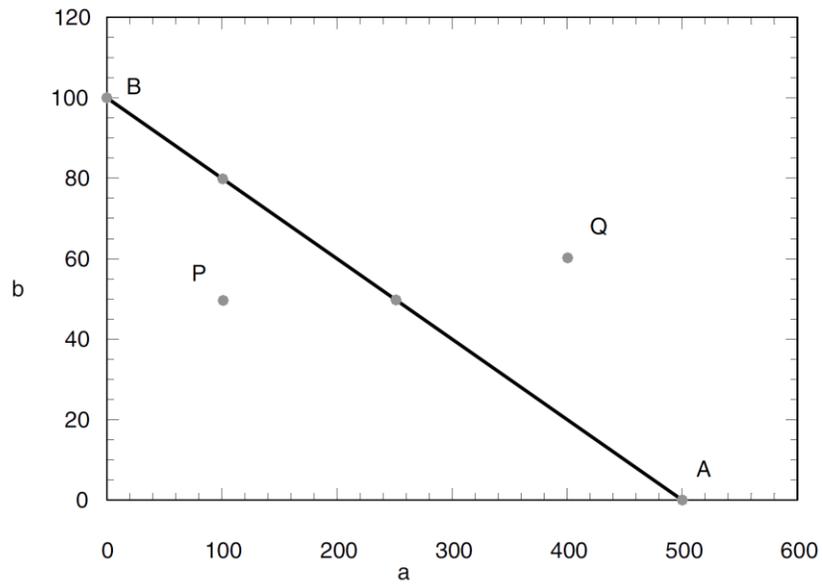


Figura 15 Isobolograma, el punto B representa la DE50 del fármaco B, el punto A representa la DE50 del fármaco A. El punto medio de dicho segmento representa la aditividad teórica. El punto P muestra una interacción sinérgica Q una interacción antagónica. (43)

### III. Planteamiento del problema

El ketorolaco es un medicamento que es utilizado en el tratamiento del dolor e inflamación, sin embargo, su consumo no debe exceder de seis días debido a los efectos adversos que se presentan como son alteraciones gastrointestinales y daño a nivel renal, por lo anterior es evidente la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto existen evidencias de algunas plantas y compuestos que presentan actividad nociceptiva, como es el caso de metileugenol, que es un constituyente de los aceites esenciales de muchas plantas aromáticas. Recientemente, se ha reportado que este compuesto no solo ejerce actividad antinociceptiva, sino que también actúa como gastroprotector. Por otro lado, considerando que en la actualidad es común que la población utilice medicamentos en combinación con remedios herbolarios y que se han reportado algunas interacciones de relevancia clínica del uso concomitante de ellos, en el presente estudio se realizarán evaluaciones farmacodinámicas de la actividad antinociceptiva y farmacocinéticas de la combinación de ketorolaco con metileugenol para conocer el comportamiento que tienen estos fármacos.

### IV. Hipótesis

Ante la evidencia de que metileugenol es un compuesto con actividad antinociceptiva al administrarlo de manera conjunta con ketorolaco, se presentará una interacción farmacológica de tipo farmacodinámica y/o farmacocinética.

### V. Objetivos

#### V.I Objetivo general

Determinar si existe una interacción farmacológica entre ketorolaco y metileugenol administrados por vía oral a través de la caracterización de su perfil farmacodinámico-farmacocinético.

## V.II Objetivos específicos

- Determinar la  $DE_{30}$  del metileugenol y ketorolaco.
- Mediante un análisis isoblográfico, determinar el punto de aditividad teórica de la combinación metileugenol-ketorolaco.
- Evidenciar si existe una interacción farmacodinámica, en un modelo de antinocicepción de formalina a través de un análisis isoblográfico.
- Determinar si existe interacción farmacocinética de la combinación metileugenol-ketorolaco a través de la caracterización de los perfiles plasmáticos de ketorolaco y la combinación metileugenol-ketorolaco.

## VI. Material y métodos

### VI.A Estudio farmacodinámico

#### VI.A1 Determinación de la dosis efectiva ( $DE_{30}$ )

##### Material diverso

- Sonda metálica para administración oral en ratones
- Cilindro de acrílico 15cmx 30cm
- 2 Espejos de 15cm x 15 cm formando un ángulo de 120°
- cronómetro Traceable
- Jeringa 100U/1mL
- Balanza analítica OHAUS Pioneer PX 224/E Analytical Balance
- Micropipetas 0.5-10 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L Eppendorf Research

##### Material biológico

- Ratones macho, cepa CD1 de 25-30g de peso aproximadamente sin tratamiento previo.

##### Sustancias y reactivos

- Ketorolaco. Sigma Aldrich estándar secundario grado farmacéutico 99.9%
- Metileugenol 98% grado reactivo Sigma Aldrich
- Tween 80 Sigma Aldrich
- Formaldehído solución acuosa 37% sigma Aldrich
- Solución salina 0.9% Pisa farmacéutica.

##### Preparación de soluciones

- Formalina al 2.5 %

En 50 mL de solución salina 0.9% adicionar 1.25 mL de formol y agitar suavemente para homogenizar.

- Vehículo

En 100 mL de solución salina 0.9%, adicionar 0.5 mL de Tween 80, y homogenizar por inversión suave cuidando que no se forme espuma.

- Soluciones de ketorolaco.

Solución patrón ketorolaco.

Pesar el equivalente a 100 mg de ketorolaco en un matraz volumétrico de 5 mL y llevar al aforo empleando solución salina al 0.9%. Se obtendrá una concentración de 20mg/mL

Soluciones de ketorolaco para la evaluación biológica.

Preparar las soluciones como se describe en la tabla 1. Tomar el volumen de solución patrón de ketorolaco y completar con el respectivo volumen de solución salina 0.9% para obtener 15mL de solución en concentraciones de 0.04, 0.12, 0.4 y 1.2 mg/mL de ketorolaco respectivamente.

Dosis (mg/kg)	Volumen de solución patrón ( $\mu$ L)	Volumen de solución salina (mL)	Concentración (mg/mL o (mg/100U)
1	30	14.970	0.04
3	90	14.910	0.12
10	300	14.700	0.4
30	900	14.100	1.2

Tabla 1 Preparación de soluciones de ketorolaco (1, 3, 10, 30 mg/kg) para administrar por vía oral.

- Soluciones de metileugenol.

Solución patrón de metileugenol.

Pesar el equivalente a 100 mg de metileugenol en un matraz volumétrico de 5 mL y llevar al aforo empleando vehículo (Tween al 0.5% en solución salina 0.9%). Se obtendrá una concentración de 20mg/mL

Soluciones de metileugenol para la evaluación biológica

Preparar las soluciones como se describe en la tabla 2. Tomar el volumen de solución patrón de metileugenol y completar con el respectivo volumen de solución salina 0.9% para

obtener 15mL de solución en concentraciones de 0.04, 0.12, 0.4 o 1.2 mg/mL de metileugenol respectivamente.

Dosis (mg/kg)	Volumen de solución patrón ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de solución salina (mL)	Concentración (mg/mL o (mg/100U)
1	30	14.970	0.04
3	90	14.910	0.12
10	300	14.700	0.4
30	900	14.100	1.2

Tabla 2 Preparación de soluciones de metileugenol (1, 3, 10 y 30 mg/kg) para administrar por vía oral.

- Evaluación biológica (Modelo de formalina en ratón).

Antes de iniciar la evaluación biológica. Pesar e identificar a cada ratón. Registrar su número de identificación, peso, dosis a administrar y su equivalente en volumen de unidades a administrar empleando una jeringa para insulina de 1mL.

Colocar a los ratones en un cilindro de acrílico de 30 cm de diámetro y dejar a que se habitúen en el cilindro por media hora. En tanto colocar dos espejos en ángulo de 120° fuera del cilindro de acrílico de modo tal que el cilindro quede en la mitad de ambos espejos.

Grupo control.

Administrar 500 $\mu\text{L}$  de vehículo por vía oral, transcurridos 30 minutos, administrar por inyección subcutánea en la parte dorsal de la pata derecha del ratón 20 $\mu\text{L}$  de formalina, teniendo cuidado de no pinchar los vasos sanguíneos y causar sangrado.

Contabilizar el tiempo de lamida del sitio donde se realizó la inyección, en intervalos de 5 minutos hasta completar un tiempo 40 minutos transcurridos desde la administración. Para ello, emplear un cronometro.

Grupos tratamiento.

En función del peso, administrar por vía oral una dosis del compuesto a evaluar (ketorolaco o metileugenol). Dejar transcurrir 30 minutos y administrar por inyección subcutánea en la parte dorsal de la pata derecha del ratón 20  $\mu\text{L}$  de formalina, teniendo cuidado de no pinchar los vasos sanguíneos y causar sangrado.

Contabilizar el tiempo de lamida del sitio donde se realizó la inyección en intervalos de 5 minutos hasta completar un tiempo 40 minutos transcurridos desde la administración.

Realizar el procedimiento anterior por sextuplicado para cada dosis desde 1-30mg/kg de ketorolaco y de igual forma para el metileugenol.

- Presentación de resultados

Construir curvas del número de lamidas por minuto en función del tiempo para cada administración. Los resultados se expresan como el promedio de las determinaciones  $\pm$  error estándar (E.E.) de al menos 6 ratones por grupo. Emplear el tiempo total de lamida de los cursos temporales (0-40min) como una expresión global de la intensidad y duración del efecto. Posteriormente, obtener las curvas dosis vs respuesta de ambos compuestos y determinar la DE<sub>30</sub>. Emplear esas dosis para realizar un análisis isoblográfico teórico para definir la dosis de aditividad entre ketorolaco-metileugenol.

VI.A2 Determinación de la interacción farmacodinámica.

- Preparación de soluciones.

Preparar las soluciones de formalina al 2.5%, vehículo, solución patrón de ketorolaco y solución patrón de metileugenol como se describe anteriormente en el método de determinación de la dosis efectiva (DE).

Preparación de las soluciones de ketorolaco-metileugenol para la determinación de la interacción farmacodinámica.

Preparar las soluciones de ketorolaco como se describe en la tabla 3. Tomar el volumen de solución patrón de ketorolaco y completar con el respectivo volumen de solución salina 0.9% para obtener 15mL de solución en concentraciones de 0.018, 0.0356, 0.0712 y 0.1424 mg/mL de ketorolaco.

Dosis (mg/kg)	Volumen de solución patrón ( $\mu$ L)	Volumen de solución salina (mL)	Concentración (mg/mL o (mg/100U)
0.45	13.5	14.9865	0.018
0.89	26.7	14.9733	0.0356
1.78	53.4	14.9466	0.0712
3.56	106.8	14.8932	0.1424

Tabla 3 Preparación de soluciones de ketorolaco (0.45, 0.89, 1.78 y 3.56 mg/kg) para administración oral en la evaluación biológica de la interacción farmacodinámica.

Preparar las soluciones de metileugenol como se describe en la tabla 4. Tomar el volumen de solución patrón de metileugenol y completar con el respectivo volumen de solución salina 0.9% para obtener 15mL de solución en concentraciones de 0.0208, 0.042, 0.0836 y 0.1672 mg/mL de metileugenol.

Dosis (mg/kg)	Volumen de solución patrón ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de solución salina (mL)	Concentración (mg/mL o (mg/100U)
0.52	15.6	14.9844	0.0208
1.05	31.5	14.9685	0.042
2.09	62.7	14.9373	0.0836
4.18	125.4	14.8746	0.1672

Tabla 4 Preparación de soluciones de metileugenol (0.52, 1.05, 2.09 y 4.18 mg/kg) para administración oral en la evaluación biológica de la interacción farmacodinámica.

- Evaluación biológica (Modelo de formalina en ratón).

Previo a la administración de los compuestos para la evaluación farmacodinámica de la combinación de dosis ketorolaco-metileugenol, proceder como se indica en la evaluación biológica de la determinación de  $DE_{30}$ .

Grupo tratamiento: combinación de compuestos.

Administrar 500 $\mu\text{L}$  de vehículo por vía oral de cada una de la dosis de la combinación a evaluar, transcurridos 30 minutos, administrar por inyección subcutánea en la parte dorsal de la pata derecha del ratón 20 $\mu\text{L}$  de formalina, teniendo cuidado de no pinchar los vasos sanguíneos y causar sangrado.

Contabilizar el tiempo de lamida del sitio donde se realizó la inyección, en intervalos de 5 minutos hasta completar un tiempo 40 minutos transcurridos desde la administración. Para ello, emplear un cronometro.

- Presentación de resultados.

Construir las curvas del número de lamidas por minuto en función del tiempo para cada administración. Los resultados se expresan como el promedio de las determinaciones  $\pm$  error estándar (E.E.) de al menos 6 ratones por grupo. Emplear el tiempo total de lamida de los cursos temporales (0-40min) como una expresión global de la intensidad y duración

del efecto. Construir la curva dosis vs respuesta y realizar nuevamente un análisis isobolográfico para definir la dosis de aditividad experimental entre ketorolaco-metileugenol.

## VI.B Estudio farmacocinético

### Material diverso

- Bomba de vacío Equipar 25222
- Equipo de filtración al vacío Millipore
- Membranas de filtración HPVLC 0.45µm Millipore
- Cronómetro Traceable
- Jeringas 100U/1mL
- Micropipetas 0.5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL. Eppendorf Research
- Trampa inmovilizadora para rata.
- Vórtex Genie 2
- Sonda metálica para administración oral en ratas

### Material biológico

- Ratas macho, cepa Wistar. Con un peso aproximado de 230±40 g y sin tratamiento previo.

### Sustancias y reactivos

- Ketorolaco Sigma Aldrich estándar secundario grado farmacéutico 99.9%
- Metileugenol 98% grado reactivo Sigma Aldrich
- Tween 80 Sigma Aldrich
- Formaldehído solución acuosa 37% sigma Aldrich
- Solución salina 0.9% Pisa farmacéutica.
- Heparina 100UI/ml. Rimbipar laboratorio Rimsa

### Equipo.

- Balanza analítica OHAUS Pioneer PX 224/E Analytical Balance
- Bomba HPLC Waters 600
- Automuestreador Waters plus 717
- Detector ultravioleta longitud de onda dual Waters 2487
- Integrador HP 3396 serie II
- Microcentrífuga Eppendorf 5424
- Parrilla de agitación y calentamiento.

Preparación de soluciones.

- Tween al 0.5% en solución salina (vehículo)

En 100 mL de solución salina 0.9%, adicionar 0.5 mL de Tween 80 y homogenizar por inversión suave cuidando que no se forme espuma.

- Solución de ketorolaco.

Pesar el equivalente a 10.2 mg de ketorolaco y disolver en 17 mL de solución salina al 0.9% para obtener una solución de 0.6 mg/mL o 0.6mg/100U.

- Solución de metileugenol.

Pesar el equivalente a 10.2 mg de metileugenol y disolver en 17 mL de vehículo para obtener una solución de 0.6 mg/mL o 0.6mg/100U

Evaluación farmacocinética.

Pesar e identificar a cada rata con un ayuno previo de mínimo 12 horas, registrar su número de identificación, peso dosis de fármaco a administrar, así como su equivalente de dosis a administrar en unidades empleando una jeringa de insulina de 1mL.

Realizar una cirugía para la colocación de una cánula arterial para la toma de muestras sanguíneas durante el estudio. El procedimiento quirúrgico se describe en el anexo 1.

Grupo control.

Administrar oralmente vehículo 0.1mL/100g. 30 minutos después, administrar ketorolaco por vía oral a razón de 1.64mg/kg empleando la solución de ketorolaco de 0.6mg/mL.

Tomar muestras sanguíneas de 200  $\mu$ L y reponer el volumen empleando solución salina al 0.9% y colocar en un microtubo Eppendorf heparinizado con 20  $\mu$ L de heparina 100UI/mL. Las muestras serán tomadas al tiempo 0 (antes de la administración de ketorolaco) y a los 5,15,30,45, 60, 90,120,180,240 y 360 minutos posteriores a la administración. Tratar como se describe en el apartado de fase preanalítica.

Grupo tratamiento.

Administrar oralmente metileugenol a razón de 1.9 mg/kg. 30 minutos después, administrar ketorolaco por vía oral a razón de 1.64mg/kg empleando la solución de ketorolaco de 0.6mg/mL.

Recolectar muestras sanguíneas de 200  $\mu$ L y reponer el volumen empleando solución salina al 0.9% en los tiempos de muestreo indicado en el grupo control.

Fase preanalítica.

Centrifugar las muestras sanguíneas a 15,000 rpm por 10 minutos. Tomar 100  $\mu$ L de plasma y colocar en tubos Eppendorf previamente identificados. Guardar las muestras en congelamiento a -20°C para su posterior análisis cromatográfico mediante un método analítico por CLAR en fase reversa previamente validado como se describe en el anexo 2.

VI.B2 Método analítico.

Procesamiento de las muestras.

Descongelar las muestras a temperatura ambiente. A 100  $\mu$ L de plasma, adicionar 50  $\mu$ L de fosfato de sodio 0.1M, 140  $\mu$ L de agua grado HPLC y 10  $\mu$ L de estándar interno (concentración 5  $\mu$ g/mL). Adicionar 700  $\mu$ L de acetonitrilo y agitar mecánicamente en vórtex durante un minuto. Centrifugar las muestras por 10 minutos a 15,000 rpm.

Separar el sobrenadante en viales de vidrio para cromatógrafo de 1mL y colocar en el carrusel del automuestreador.

Condiciones cromatográficas

Analizar las muestras a una longitud de onda de 320 nm, a flujo de 1.4 mL/min, empleando como fase móvil una mezcla de fosfatos 0.04M, acetonitrilo y metanol en proporción 60:20:20 v/v/v a una temperatura de 50°C empleando una columna Zorbax Eclipse Plus C18 de 150 mm con un tamaño de partícula de 4.5  $\mu$ m.

Presentación de resultados.

Por medio de las concentraciones plasmáticas determinadas mediante el método analítico, trazar perfiles plasmáticos en función del tiempo para los grupos control y tratamiento. Posteriormente, mediante análisis no compartimental empleando el software Phoenix Winnonlin 8.1, obtener los parámetros farmacocinéticos.

## VII. Resultados.

### Estudio Farmacodinámico

La figura 16, presenta el comportamiento promedio observado en los ratones del grupo control (únicamente administrados con formalina al 2.5 %) en tanto las figuras 17 y 18 presentan los compartimentos promedio (n=6) en la prueba de formalina cuando se administró metileugenol (30 mg/kg) y ketorolaco (30 mg/kg). La inyección subcutánea de formalina en la parte dorsal de la pata trasera de los ratones de los grupos mencionados, así como de las dosis restantes para metileugenol y ketorolaco (1,3 y 10 mg/kg), causó una respuesta conductual similar en los ratones, produciendo lamidas en el sitio de inyección. El número de lamidas acumulado en intervalos de 5 minutos dio como resultado una gráfica bifásica característica del modelo de formalina (44) que consiste en una fase aguda inicial que decrece rápidamente (Fase I, dentro de los 15 minutos posteriores a la inyección de formalina) seguida de un aumento gradual con una duración entre 20 y 40 minutos (fase II). (45)

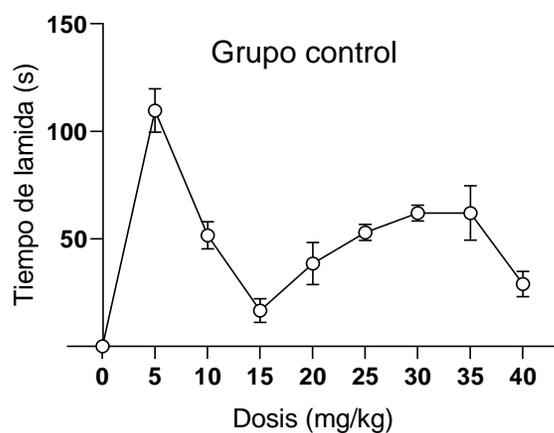


Figura 16 Evaluación conductual de la nocicepción en el grupo control empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5 minutos  $\pm$  E.E durante un periodo de 40 minutos.

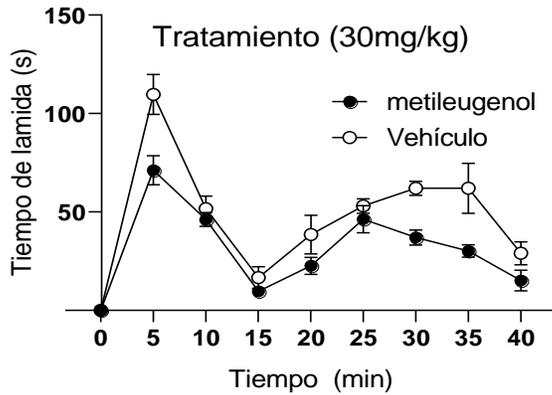


Figura 17 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5 %, en el grupo tratamiento (administración oral de 30 mg/kg de metileugenol). Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5  $\pm$  E.E durante un periodo de 40 minutos.

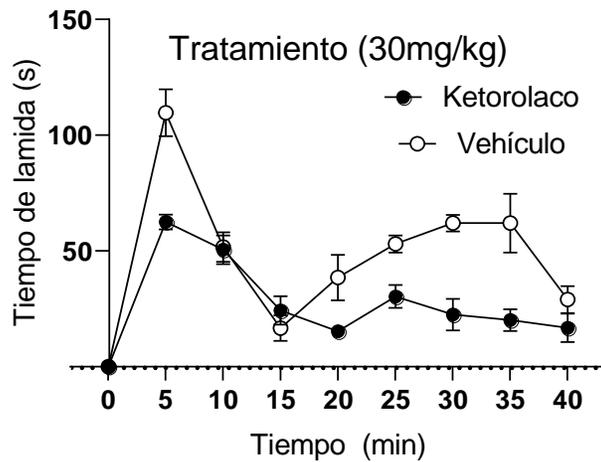


Figura 18 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5 %, en el grupo tratamiento (administración oral de 30 mg/kg de ketorolaco). Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5  $\pm$  E.E durante un periodo de 40 minutos.

En las figuras 19 y 20 se presenta la respuesta (tiempo de lamida acumulado) en función a las dosis obtenidas para la administración de metileugenol y ketorolaco respectivamente, en dosis de 1,3 10 y 30 mg/kg. La tabla 5 presenta la dosis efectiva 30 (DE<sub>30</sub>) obtenida a partir de los datos presentados en las figuras 19 y 20 para el grupo de metileugenol y ketorolaco respectivamente.

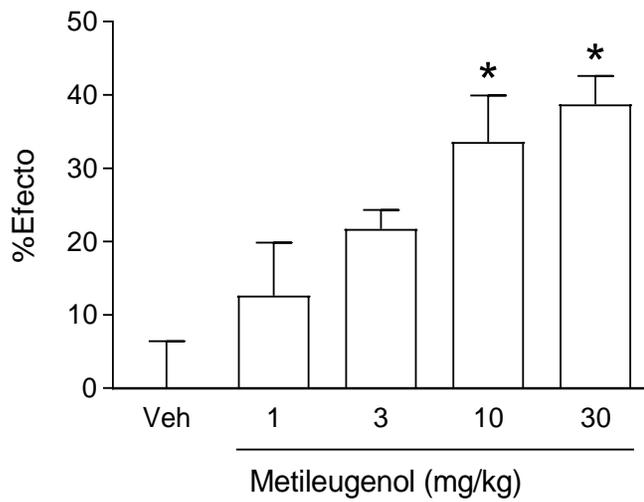


Figura 19 Representación de la dosis-respuesta de metileugenol administrado por vía oral, para la determinación de la  $DE_{30}$ . Se muestra el promedio del porcentaje del efecto obtenido en función de la dosis ( $n=6$ )  $\pm$  E.E.

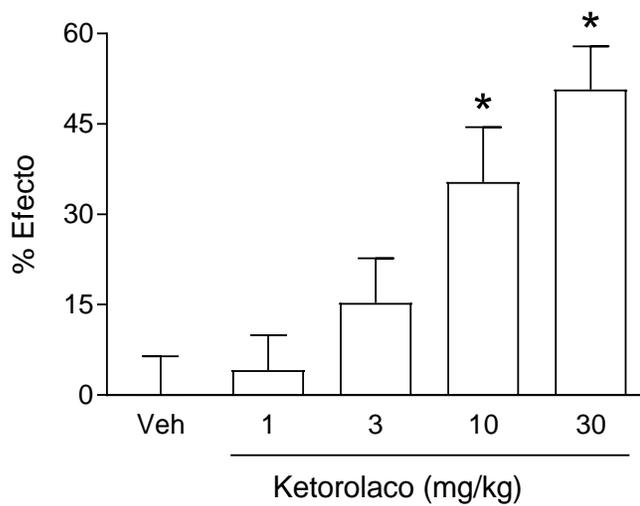


Figura 20 Curva dosis-respuesta de ketorolaco administrado por vía oral para la determinación de la  $DE_{30}$ . Se muestra el promedio del porcentaje del efecto obtenido en función de la dosis ( $n=6$ )  $\pm$  E.E.M

Compuesto	$DE_{30} \pm EE.$ (mg/kg)	$R^2$
Metileugenol	$8.4 \pm 1.0$	0.983
Ketorolaco	$7.1 \pm 0.6$	0.992

Tabla 5 Dosis efectiva 30 de metileugenol y ketorolaco  $\pm$  error estándar (EE) obtenidas mediante regresión lineal.

La representación gráfica de la determinación por análisis isoblográfico de la dosis de aditividad teórica de la combinación metileugenol-ketorolaco a probar experimentalmente, se presenta en la figura 21.

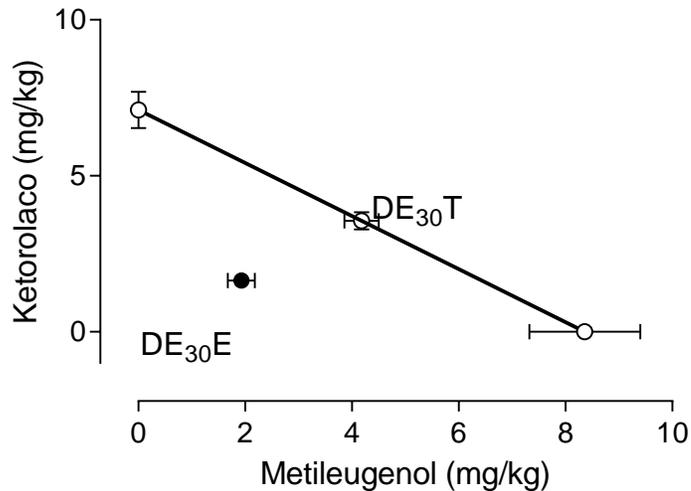


Figura 21 Análisis isoblográfico para determinar la dosis de aditividad teórica de metileugenol-ketorolaco empleando sus respectivas DE<sub>30</sub>. En el eje de las ordenadas se graficó la DE<sub>30</sub> de ketorolaco vs la DE<sub>30</sub> de metileugenol.

El comportamiento promedio de nocicepción obtenido en la prueba de formalina para una de las combinaciones metileugenol-ketorolaco (0.52/0.45, 1.05/0.89, 2.09/1.78 y 4.18/3.56), se observa en la figura 22.

El resultado de la administración experimental de las cuatro combinaciones de dosis de metileugenol-ketorolaco, dio como resultado la representación dosis-respuesta presentada en la figura 23.

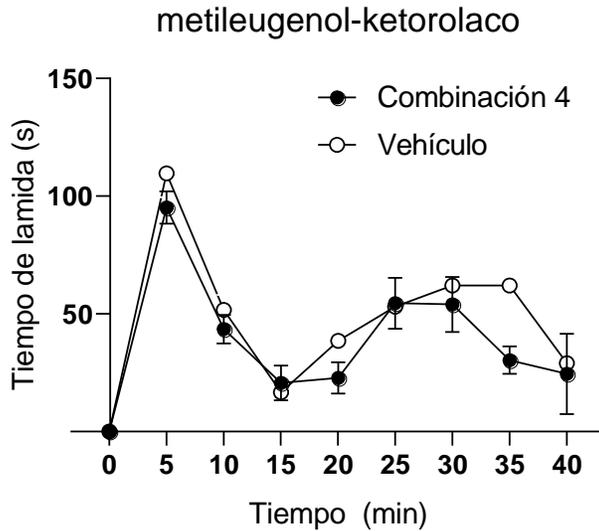


Figura 22 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina, para el grupo tratado con la combinación metileugenol-ketorolaco 4.18/3.56 mg/kg respectivamente. Se muestra el promedio ( $n=6$ ) del tiempo de lamida en intervalos de 5 minutos  $\pm$  E.E por un periodo de 40 minutos.

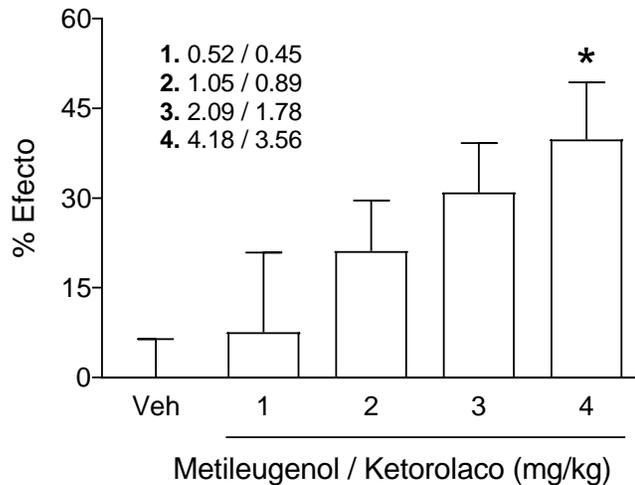


Figura 23 Curva dosis-respuesta de la combinación metileugenol-ketorolaco administrado por vía oral generada de las dosis del punto de aditividad teórica ( $DE_{30}$ ). Se muestra el promedio del porcentaje del efecto obtenido en función de la dosis ( $n=6$ )  $\pm$  E.E.

Los resultados en la figura 24 y tabla 6, indican que la administración conjunta de metileugenol-ketorolaco en cuatro combinaciones diferentes derivadas del punto de aditividad (1: 0.52/0.45, 2: 1.05/0.89, 3: 2.09/1.78 4: 4.18/3.56 mg/kg de metileugenol y ketorolaco respectivamente.) generan una sinergia en el efecto observado.

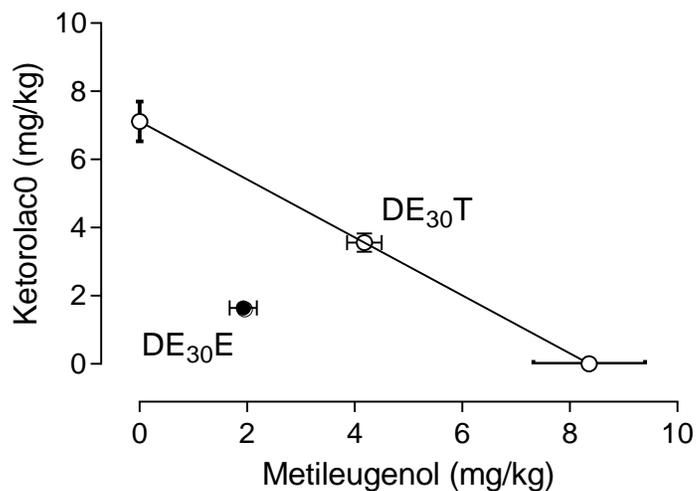


Figura 24 Análisis isoblográfico de la combinación metileugenol-ketorolaco. Se presenta el promedio de las DE<sub>30</sub> (n=6) ± E.E DE<sub>30</sub>T: Dosis de aditividad teórica. DE<sub>30</sub>E: Dosis de aditividad experimental.

Relación de dosis Metileugenol + ketorolaco	DE <sub>30</sub> Teórica ± EE. (IC 90%)	DE <sub>30</sub> Experimental ± EE. (IC 90%)	Índice de interacción ± EE. (IC 90%)
1:1	7.7 ± 0.6 (6.3 – 9.6)	3.6 ± 0.5* (2.0 – 6.2)	0.46 ± 0.07 (0.33 – 0.65)

Tabla 6 DE<sub>30</sub> teórica y DE<sub>30</sub> experimental obtenidas por análisis isoblográfico para la combinación metileugenol-ketorolaco. El valor de índice de interacción indica una actividad sinérgica entre los compuestos.

### Estudio Farmacocinético

El perfil farmacocinético de ketorolaco a dosis 1.64 mg/kg en presencia de metileugenol (1.9 mg/kg) no evidenció cambio alguno en su comportamiento al ser comparado con el grupo control (sin administración previa de metileugenol), no generando cambio significativo en los parámetros farmacocinéticos determinados (figura 25 y Tabla7).

## Perfiles farmacocinéticos

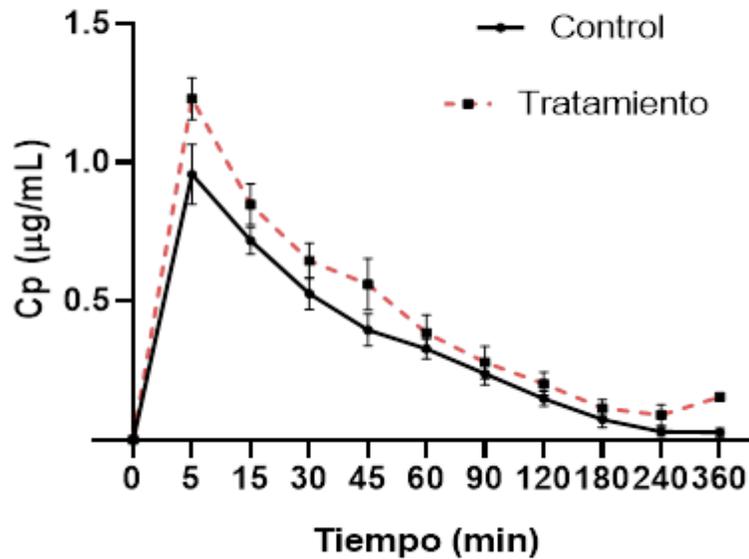


Figura 25 Curso temporal de concentración plasmática de ketorolaco en función al tiempo para el grupo control (línea continua) y el grupo de tratamiento (línea discontinua), cuando se administró ketorolaco solo (1.64 mg/kg) o metileugenol (1.9 mg/kg) previa administración de ketorolaco (1.64 mg/kg). Los datos se presentan como la media de las concentraciones plasmáticas ( $n=6$ )  $\pm$  ee. (error estándar).

parámetro	Unidades	Control	$\pm$ EE	Tratamiento	$\pm$ EE
Ke	min <sup>-1</sup>	0.016	0.003	0.012	0.001
$t_{1/2}$	min	50.82	10.107	59.42	5.375
VD	mL	706.41	79.214	663.30	117.909
CL	mL/min	10.593	1.162	7.500	0.908
AUC (0-360)	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	40.046	4.592	55.195	6.218
AUC (0-8)	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	41.460	5.235	57.552	6.331
C <sub>máx</sub>	$\mu\text{g/mL}$	0.981	0.092	1.230	0.075
T <sub>máx</sub>	min	9.167	4.167	5.000	0.000

Tabla 7 Constantes farmacocinéticas de los grupos control y tratamiento obtenidas mediante análisis no compartimental. Se muestra el promedio de cada parámetro ( $n=6$ )  $\pm$  ee.

## VIII. Análisis de resultados

En la evaluación del perfil farmacodinámico-farmacocinético de la combinación metileugenol-ketorolaco administrados oralmente, se buscó determinar si la presencia de metileugenol causaba algún tipo de interacción farmacológica.

Para estudiar la posible interacción farmacológica del tipo farmacodinámica, se eligió la evaluación experimental del efecto antinociceptivo de estos compuestos, empleando el modelo de formalina en ratones, para recrear un estímulo nociceptivo moderado y continuo durante un lapso de 40 minutos.

Si bien inicialmente el diseño experimental planteaba el uso de ratas Wistar de 250 a 300 gramos aproximadamente. Para la etapa de evaluación farmacodinámica se decidió cambiar y usar ratones macho cepa CD 1, debido al costo (46) y la disponibilidad que tuvo el grupo de trabajo al material biológico (ratones). Es importante resaltar que la respuesta del efecto antinociceptivo en el modelo de formalina usando ratones o ratas, genera respuestas conductuales equivalentes y las diferencias encontradas al usar los mismos, se atribuyen solamente al tratamiento empleado y no a las características morfológicas de los animales. (44)

En el modelo de nocicepción inducida por formalina, la respuesta obtenida es proporcional a la dosis empleada (12), por ello es un modelo útil para determinar dosis efectiva de fármacos en estudios farmacodinámicos, cuando es llevado a cabo bajo condiciones experimentales controladas y fijadas al inicio del experimento. Para determinar el efecto antinociceptivo, se empleó el modelo de formalina usando una concentración de 2.5% de formalina y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L en la zona dorsal de la pata derecha del ratón. Las dosis efectivas 30 de metileugenol y ketorolaco fueron obtenidas empleando las condiciones descritas para ambos compuestos en dosis de 1mg, 3 mg, 10mg y 30 mg para ambos compuestos.

Al obtener la curva dosis-respuesta de ketorolaco, se encontró que está no alcanzaba el efecto máximo y una fase de meseta. El efecto máximo alcanzado fue 50.688% a una dosis de 30mg/kg (figura 20) por lo que se procedió a calcular la  $DE_{30}$  mediante regresión lineal obteniéndose una dosis de  $7.1 \pm 0.6$  (con un  $r^2=0.992$ ). Dicha dosis es similar a la reportada por Bustamante y Paeile (47), empleando un modelo de formalina al 2.5% en un modelo de dolor orofacial. Para metileugenol, se trazó la curva-dosis respuesta, y mediante regresión

lineal también ( $R^2=0.983$ ) se obtuvo su  $DE_{30}$  con un valor de  $8.4 \pm 1.0$ . En 2006, Yano y colaboradores (48), describieron que metileugenol tiene actividad antinociceptiva, empleando una solución de formalina al 5% , indicando que la actividad del metileugenol se encuentra en la fase II de hiperalgesia, donde una dosis de 10mg/kg del compuesto disminuyó la nocicepción de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Con las dosis experimentales obtenidas para metileugenol y ketorolaco, se trazó un isoblograma, como lo describe Tallarida (42) empleando las  $DE_{30}$  de ketorolaco y metileugenol, donde el valor del punto de aditividad teórica fue de  $7.7 \pm 0.6$  mg/kg en una proporción 1:1 donde 4.18 mg/kg corresponden a metileugenol y 3.56 mg/kg a ketorolaco. Derivadas del punto de aditividad teórica, se probó experimentalmente el efecto antinociceptivo de la combinación de los compuestos en el modelo de formalina. Para lo cual se emplearon cuatro dosis: 1) 0.52/0.45, 2) 1.05/0.89, 3) 2.09/1.78 y 4) 4.18/3.56 mg/kg de metileugenol y Ketorolaco respectivamente. Nuevamente se trazó una nueva curva dosis respuesta para determinar la dosis de la combinación que produjo el 30% del efecto como se detalla en la figura 23. Se encontró que existe una interacción farmacodinámica de tipo sinérgico (figura 24, tabla 6), dado que el índice de interacción obtenido ( $0.46 \pm 0.07$ ) fue menor que 1.

Esta disminución en la  $DE_{30}$  experimental de la combinación de los compuestos ( $3.6 \pm 0.5$  mg/kg) y la dosis teórica de combinación ( $7.7 \pm 0.6$  mg/kg) puede ser atribuida al mecanismo de acción de metileugenol, reportado por Wang Z. en 2018 (28). Donde el efecto de metileugenol se atribuye a una inhibición de la transmisión de estímulos por el compuesto, el cual se une al canal de sodio voltaje dependiente estabilizando el potencial de membrana, adicional a esto, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas ejercida por ketorolaco se traduce en un efecto antinociceptivo mayor al que ejercen ambos compuestos de manera individual.

Con la dosis de aditividad experimental de ketorolaco y metileugenol (1.64/1.9 mg/kg) determinada, se procedió a realizar un estudio farmacocinético para descartar que la sinergia farmacodinámica observada en el efecto no fuera atribuible a una alteración en los procesos farmacocinéticos del ketorolaco como resultado de la administración de metileugenol. Para lo cual primeramente se implementó y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, conforme a la NOM-177-SSA1-2013 (descrito en el anexo 2). El cual resultó ser preciso, exacto y reproducible en un intervalo de concentración de 0.05-9  $\mu\text{g/mL}$  (anexo 2). Lo que garantiza que las concentraciones

plasmáticas de ketorolaco determinadas por este método son confiables y los cambios que pudieran observarse en los perfiles plasmáticos obtenidos se pueden atribuir solo a los tratamientos evaluados y no a condiciones no controladas del método analítico. De este modo, se evaluó la farmacocinética de ketorolaco a una dosis de 1.64 mg/kg de manera individual y en combinación con metileugenol (dosis de 1.9 mg/kg).

La administración por vía oral de metileugenol fue 30 minutos antes de administrar ketorolaco, con la finalidad de asegurar la presencia sistémica del metileugenol previa a la del ketorolaco. La recolección de 200 µL de muestras sanguíneas de fueron obtenidas mediante canulación arterial (siguiendo lo indicado en el anexo 1) y reponiendo el volumen extraído empleando solución fisiológica, condiciones que favorecen las evaluaciones farmacocinéticas realizadas, al permitir obtener la caracterización completa de perfil plasmático a partir un solo animal y evitar la alteración en el volumen de distribución.

Los perfiles plasmáticos de los grupos control y tratamiento obtenidos (figura 25), presentan el comportamiento típico a una administración oral, observándose un incremento de concentraciones rápido, un punto máximo y un declive de éstas que denotan el proceso de absorción, la concentración máxima alcanza y el proceso de eliminación respectivamente. Bajo las condiciones realizadas, al comparar visualmente los perfiles plasmáticos del grupo control y del grupo de tratamiento (combinación de dosis metileugenol/ketorolaco), no se percibe un cambio de comportamiento de los perfiles, no obstante, se observan incrementos en las concentraciones plasmáticas con mayor cambio en la  $C_{m\acute{a}x}$  cuando se tiene la presencia de metileugenol. Para confirmar esta observación, se realizó un análisis no compartimental a cada uno de los perfiles obtenidos, empleando el programa Phoenix Winnonlin 8.1. Las constantes farmacocinéticas obtenidas de este análisis y presentadas en la tabla 7, indican un aumento en la concentración máxima en el grupo tratamiento, sugiriendo que metileugenol provocó un cambio en el tracto-gastrointestinal del animal que facilito la absorción de ketorolaco provocando el aumento de la concentración máxima observada, pero no de manera tal para evidenciar una diferencia estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) cuando se comparan ambos grupos. Robles A. en 2017, (49) encontró que metileugenol disminuía la biodisponibilidad de ketorolaco, lo que plantea una posible contradicción a lo encontrado en este estudio, sin embargo, esta discrepancia pudiera atribuirse a la diferencia de dosis de metileugenol usadas en los estudios, (30 mg/kg en el estudio de Robles y de 1.9 mg/kg en el presente estudio). La presencia de metileugenol en el TGI a dosis mayores de 30 mg/kg, pueden causar un aumento en el grosor de la mucosa

gastrointestinal y/o aumentar el pH debido a su efecto gastroprotector (27,48), lo que pudiera dar como resultado una menor absorción de ketorolaco disminuyendo su biodisponibilidad, condiciones que no se tuvieron en el presente estudio. Los restantes parámetros cinéticos obtenidos (Tabla 7), indican que la administración previa de metileugenol por vía oral a dosis de 1.9 mg/kg no produce alteraciones significativas en la farmacocinética de ketorolaco administrado por vía oral a razón de 1.64mg/kg.

#### IX. Conclusión.

La combinación metileugenol-ketorolaco (1.9 mg/kg-1.64 mg/kg) administrada por vía oral, causa una interacción farmacodinámica de tipo sinérgico, mientras que la presencia sistémica de metileugenol (1.9 mg/kg) no causa alteraciones farmacocinéticas en el perfil plasmático de ketorolaco (1.64 mg/kg).

## X. Referencias

1. International Association for the Study of Pain. IASP Terminology [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain>
2. Von-Roenn J., Preodor M., Paice J. Diagnóstico y tratamiento en el dolor. Madrid, España.: McGraw-Hill; 2007.
3. Montes A. Fisiopatología del dolor crónico: de la periferia al cortex cerebral. Vías de transmisión. Sistemas moleculares. Neurotransmisores. Neuromoduladores. Societat Catalana d'Anestesiologia, Reanimació i Terapèutica del Dolor.
4. Collins V. Anestesiología: anestesia general y regional. 3a ed. México: Interamericana- McGraw Hill; 1996.
5. Crossman AR., Neary D. Neuroanatomía texto y atlas. 3a ed. Barcelona, España.: Elsevier Masson; 2007.
6. Cerveró F. Neuroplasticidad y Dolor. *El dolor*. 2008;50:44–8.
7. Zegarra JW. Bases fisiopatológicas del dolor. *Acta Med Per*. 2007;24(2):105–8.
8. Vincetelo PA. Interacción experimental de nortriptilina y ácido valproico en dolor orofacial experimental. [Tesis]. [Chile]: Universidad de Chile;
9. López MG. Evaluación del efecto anti-nociceptivo y anti-alodínico del extracto acuoso de huichin (*Verbesina persicifolia* DC) administrado de forma aguda en ratas macho de la cepa Wistar. [Tesis]. [México.]: Universidad Veracruzana; 2015.
10. Barrett K., Boitano S., Brooks S. Fisiología médica. Ganong. 24a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2013.

11. Fox SI. Fisiología humana. 13a ed. México.: McGraw-Hill; 2011.
12. Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Recognition and alleviation of pain in laboratory animals. USA: The National Academy Press; 2009.
13. Carrillo-Munguía N. Mecanismos opioides que participan a nivel supraespinal en la potenciación del efecto antinociceptivo de la combinación tramadol+Cafeína en el modelo de la Formalina;
14. Flórez J. Fármacos y dolor. Madrid, España: Fundación Instituto Uppsala del Dolor; 2004.
15. Argoff CE. Tratamiento del dolor, secretos. 3a ed. España: Elsevier España; 2011.
16. Goodman L., Gilman A., Bunton L., Chabner B., Knollmann B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill; 2012.
17. Cashman J. NSAIDs in Analgesia. *Drugs*. 5(13).
18. Sandoval H., Fernández de Castro L., Vroman D., Solomon K. A review of the use of ketorolac tromethamine 0.4% in the treatment of post-surgical inflammation following cataract and refractive surgery. *Clin Ophthalmol*. 2007;1(4):9.
19. Jett M., Ramesha C., Brown C., Chiu S., Emmett C., Voronin T., editores. Characterization of the analgesic and anti-inflammatory activities of ketorolac and its enantiomers in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. marzo de 1999;288(3):1288–97.
20. Reinhart D. Minimising the adverse effects of ketorolac. *Drug Saf*. junio de 2000;22(6):487–97.

21. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. La gran familia [Internet]. Biodiversidad mexicana. Disponible en: [https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran\\_familia/planta.html](https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/planta.html)
22. Villareal ML., Cardoso-Taketa A., Ortíz A., Sharma A. Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. 15 [Internet]. 2014 [citado el 17 de febrero de 2019];8. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art62/art62.pdf>
23. Maroon J., Bost J., Maroon A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg Neurol Int.* 2010;(1):80.
24. Rauf A., Jehan A., Ahmad Z. Analgesic Potential of Extracts and Derived Natural Products from Medicinal Plants. En: *Pain Relief - From Analgesics to Alternative Therapies.* Inktech; 2017. p. 339–351.
25. Chatterjee A., Bandyopadhyay S. Herbal Remedy: An Alternate Therapy of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Induced Gastric Ulcer Healing. *Ulcers.* 2014.
26. Salinas MA. *Peperomia hispidula* [Internet]. CONABIO. [citado el 17 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023-Plantas/Plantas/MASM0022%20Peperomia%20hispidula.jpg.info>
27. Sánchez-Mendoza M., Cruz-Antonio L., Arrieta-Baez D., Olivares-Corichi I., Rojas-Martínez R., Martínez-Cabrera D. Gastroprotective Activity of Methyleugenol from *Peperomia hispidula* on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. *Int J Pharmacol.* 11(7):791–9.
28. Wang Z., Tabakoff B., Levinson S., Heinbockel T. Inhibition of Nav1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. *Acta Pharmacol.* 2015;36(7):791–799.
29. Cho J., Kim T., Lim J., Song J. Effects of eugenol on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 2008;3–53.

30. Katzung B., Trevor A., Masters S. Farmacología básica y clínica. 12a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2013.
31. Flórez J., Armijo J., Mediavilla A. Farmacología humana. 6a ed. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2014.
32. Wang B., Siahaan T., Hu L. Drug delivery. Principles and applications. 2a ed. Hoboken, New Jersey: Wiley;
33. Lüllmann H., Hein L., Mohr K., editores. Farmacología. primera. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2010.
34. Hernández A. Farmacología general: Una guía de estudio. 1a ed. México: McGraw-Hill; 2014.
35. Manual MSD. Biodisponibilidad de los fármacos. [Internet]. ESPAÑOL MANUAL MSD Versión para profesionales. [citado el 19 de febrero de 2019]. Disponible en: [https://www.msdmanuals.com/-/media/manual/professional/images/rx\\_plasma\\_concentration\\_time\\_es.gif?la=es&thn=0](https://www.msdmanuals.com/-/media/manual/professional/images/rx_plasma_concentration_time_es.gif?la=es&thn=0)
36. Pierini D., Vogel-Anderson K. How Generic Drugs Are Made. US Pharm. 2013;38(6):26–31.
37. Macheras P., Iliadis A. Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Homogeneous and Heterogeneous Approaches. USA: Springer; 2006. (Interdisciplinary Applied Mathematics).
38. Reisfeld B., Mayeno A. Computational Toxicology. Humana Press; 2013. (Methods in Molecular Biology; vol. 1).
39. Isaza C., Isaza G., Fuentes J., Marulanda T., Buriticá A., Machado J., et al. Fundamentos de farmacología en terapéutica. 6a ed. Colombia.: Celsus; 2014.

40. Muñoz S. Anestesiología, fisiología y farmacología. 1a ed. Cali, Colombia: Universidad del Valle; 2008.
41. Rosenfeld G., Loose, D. Farmacología. 6a ed. Barcelona, España: Wolters Kluwer Health; 20015. (Revisión de temas).
42. Tallarida R. Drug Synergism: Its Detection and Applications. *Pharmacol Exp Ther.* 2001;298(3):865–72.
43. Tallarida R. Drug synergism and dose-effect data analysis. New York, USA.: Chapman and Hall/CRC; 2000.
44. Gong N, Huang Q, Chen Y, Xu M, Ma S, Wang Y-X. Pain Assessment Using the Rat and Mouse Formalin Tests. *BIO-PROTOCOL* [Internet]. 2014 [citado el 20 de mayo de 2019];4(21). Disponible en: <https://bio-protocol.org/e1288>
45. Sufka KJ, Watson GS, Nothdurft RE, Mogil JS. Scoring the mouse formalin test: Validation study. *European Journal of Pain.* el 1 de diciembre de 1998;2(4):351–8.
46. Instituto de Fisiología celular. Precio de venta de animales, 2019 [Internet]. BIOTERIO. 2019. Disponible en: [http://www.ifc.unam.mx/pdf/lista\\_precios\\_bioterio.pdf](http://www.ifc.unam.mx/pdf/lista_precios_bioterio.pdf)
47. Bustamante D, Paeile C. Ketorolac tromethamine: An experimental study of its analgesic effects in the rat. *Gen Pharmac.* mayo de 1993;24(3):693–8.
48. Yano S, Suzuki Y, Yuzurihara M, Kase Y, Takeda S, Watanabe S, et al. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. *European Journal of Pharmacology.* diciembre de 2006;553(1–3):99–103.
49. Robles-Sánchez A. Efecto del metileugenol sobre la farmacocinética del ketorolaco en rata Wistar. [Tesis de licenciatura]. [México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.

50. Granados-Soto V., López-Muñoz F., Hong E., Flores-Murrieta F. Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of ketorolac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(1):252–256.
51. Torres-López J., Lopez-Muñoz F., Castañeda-Hernández G., Flores-Murrieta F., Granados-Soto V. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282(2):685–690.
52. Isiordia E., Pozos A., Aguirre P., Pérez J. Análisis isoblográfico de la combinación analgésica ketorolaco sistémico y tramadol local en el modelo de la formalina en ratones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2010;41(2):42–9.
53. Aguilar-Ros A. *Biofarmacia y farmacocinética.* 1a ed. Barcelona, España.: Elsevier España; 2014.
54. Raffa R., Netter F., Beyzarov E., Rawls S., Puig-Tortosa A., Madero-García S. *Farmacología ilustrada.* 1a ed. Barcelona, España: Elsevier España; 2008.
55. Navarrete A., Oliva I., Sánchez-Mendoza M., Arrieta J., Cruz-Antonio L., Castañeda-Hernández G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate. 2005;12(5):1629–36.
56. Non-compartmental Analysis | SpringerLink [Internet]. [citado el 26 de febrero de 2019]. Disponible en: [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-050-2\\_16](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-050-2_16)
57. Paula-Freire LIG, Andersen ML, Molska GR, Köhn DO, Carlini ELA. Evaluation of the Antinociceptive Activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) Essential Oil and its isolated Active Principles in Mice: ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF *OCIMUM GRATISSIMUM* L. *Phytotherapy Research.* agosto de 2013;27(8):1220–4.

58. Barreras-Espinoza I, Soto-Zambrano JA, Serafín-Higuera N, Zapata-Morales R, Alonso-Castro Á, Bologna-Molina R, et al. The Antinociceptive Effect of a Tapentadol-Ketorolac Combination in a Mouse Model of Trigeminal Pain is Mediated by Opioid Receptors and ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels: TAPENTADOL-KETOROLAC COMBINATION. *Drug Development Research*. 2016;78(1):63–70.
59. Soleyman-Zomalan E, Motov S, Likourezos A, Cohen V, Pushkar I, Fromm C. Patterns of Ketorolac dosing by emergency physicians. *World J Emerg Med*. 2017;8(1):43–6.

## Anexo 1: Procedimiento de canulación arterial

### Método

#### Material diverso

- |   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| 1) Mango de bisturí 4 y hoja para bisturí #20 | 11) Microcentrífuga                   |
| 2) Pinza de disección recta                   | 12) Lámpara de luz blanca.            |
| 3) Pinza Kelly curvas                         | 13) Tabla de disección                |
| 4) Pinza Bakey angulada                       | 14) Cánula de polietileno calibre 10G |
| 5) Tijeras Iris                               | 15) Sutura de hilo seda 4-0           |
| 6) Porta agujas Hegar                         | 16) Gasas estériles                   |
| 7) Pinzas curvas                              | 17) Torundas de algodón               |
| 8) Jeringas para insulina 1 mL                | 18) Compresas de algodón              |
| 9) Microtubos de capacidad 1.5 mL             | 19) Toallas húmedas                   |
| 10) Micropipeta volumen 20-200 $\mu$ L        | 20) Cinta adhesiva                    |

#### Reactivos

- |  |                            |
|--|----------------------------|
| 1) Solución de heparina 100 UI/mL en NaCl 0.9% | 3) Éter etílico            |
| 2) Solución de NaCl 0.9%                       | 4) Hipoclorito de sodio 5% |
|  | 5) Alcohol etílico 70%     |

#### Preparación de la cámara de anestesia.

En un frasco de vidrio de boca ancha, con capacidad de 5 litros aproximadamente, colocar una cama de algodón en el fondo de la cámara, impregnado con 15 mililitros de éter etílico y dejar que la atmósfera se sature de vapor de éter durante 10 minutos.

Adicional a esto, en un frasco de 50 mililitros de capacidad, colocar una cama de algodón en el fondo de esta e impregnar con 5 mililitros de éter etílico, cerrar el frasco o en su defecto colocarlo boca abajo en una superficie plana para dejar que la atmósfera se sature durante 5 minutos. Esta cámara será usada para mantener la anestesia del animal durante el procedimiento quirúrgico.

#### Inducción del estado de anestesia quirúrgica

Antes de colocar al animal en la cámara de anestesia aplicar ungüento oftálmico en ojos y nariz para prevenir la resecaedad e irritación de las membranas mucosas, acto seguido, introducir al espécimen en la cámara y colocar la tapa, esperar a que este comience a relajarse hasta que deje de moverse completamente, pero observando que la frecuencia respiratoria sea constante y no se detenga. Esto toma entre 15 a 25 segundos dependiendo

del peso del animal, así como de la composición corporal de éste (si el animal tiene una gran cantidad de tejido adiposo, alcanzar la anestesia quirúrgica tomará más tiempo, así como el tiempo de recuperación será prolongado). Una vez alcanzado el estado de anestesia, se recomienda pesar al animal en una balanza y registrar el peso. Se tiene aproximadamente un minuto antes de que el animal comience a recuperarse de la anestesia.

### **Preparación del instrumental quirúrgico y del área de trabajo.**

Sobre la mesa quirúrgica se expondrá todo el instrumental descrito anteriormente en materiales, así como gasas, torundas de algodón, las soluciones enlistadas y las jeringas a utilizar para realizar la toma de muestra, para disminuir al mínimo el tiempo del procedimiento, evitar contratiempos y causar el menor estrés posible al animal. Es necesario el uso de una lámpara que permita una adecuada iluminación de la zona donde se encuentre la tabla de disección y donde la luz pueda ser dirigida hacia el sitio donde se realizará la cirugía, a modo de que quien lleve a cabo el procedimiento, pueda visualizar de manera clara las estructuras.

### **Procedimiento quirúrgico**

1. Inducir el estado de anestesia quirúrgica y colocar al animal en posición de decúbito supino sobre la tabla de disección, sujetar las extremidades superiores e inferiores.



2. Sujetar la cola suavemente y colocar en posición recta, colocar cinta adhesiva en la parte distal y proximal al cuerpo de modo tal que esta se encuentre fija.



3. Dirigir la luz de la lámpara hacia la parte media de la cola. Con ayuda de una gasa ligeramente humedecida en agua, limpiar la parte ventral de la cola haciendo un movimiento unidireccional de la parte proximal a la zona distal (cercano al tronco y hacia el final de la cola). Esto ayudará a visualizar la arteria caudal, que corre en la parte central de la cola, en la zona lateral, tanto derecha como izquierda, es posible observar las venas caudales que corren a lo largo de la cola.



4. Con ayuda de un bisturí realizar un corte sagital de una longitud entre 1-1.5 cm, con la presión suficiente para cortar la piel, pero sin llegar a las vértebras de la cola, ya que se corre el riesgo de cortar la arteria.



5. Con las pinzas Kelly curvas, separar la piel donde se realizó el corte, teniendo cuidado de no romper la piel, pero separando lo suficiente para poder visualizar los tendones que forman una cubierta donde se encuentra la arteria.



6. Haciendo uso del bisturí y de la pinza recta de disección, realizar la disección de los tendones hasta visualizar la arteria y tener un fácil acceso a ella. De ser necesario usar una compresa ligeramente humedecida en solución fisiológica, para limpiar la sangre que se encuentre en la zona.



Imagen 6. Disección de tejidos para separación de la arteria caudal.\*

7. Introducir las pinzas Bakey debajo de la arteria y colocar dos tramos de hilo seda, posicionar uno en cada extremo de la arteria y realizar un nudo simple sin cerrarlo, todo con la finalidad de aislar la arteria. Abrir las pinzas 0.5 mm dejando un espacio que delimite la zona de trabajo.



Imagen 7. Asilamiento de arteria caudal.\*

8. Con las pinzas rectas de disección, realizar la disección de la arteria y retirar la túnica adventicia (externa) y la túnica media, (como éstas están compuestas de colágeno y músculo liso respectivamente, tienen un comportamiento elástico) cuando se haya retirado por completo ambas, el grosor de la arteria aumentará debido a la descompresión causada, formándose algo similar a un aneurisma.



Imagen 8. Eliminación de la túnica externa y media para disección la arteria caudal.\*

9. Con las tijeras Iris, hacer un corte sobre la arteria, teniendo cuidado de no seccionar por completo la arteria, aplicar un poco de tracción a la arteria con la pinza Bakey angulada para detener el sangrado, pero sin estirar en demasía la arteria.

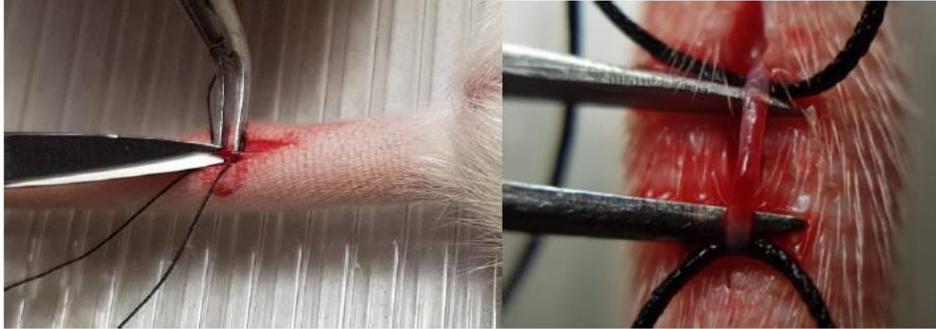


Imagen 9. Corte sobre la parte externa de la arteria caudal.\*

10. Introducir a la arteria aproximadamente 0.5 mm de un catéter de polietileno PE-10 y en el extremo libre un catéter de polietileno PE50 el cual se mantendrá heparinizado para facilitar la toma de muestra. Comprobar que la cánula se encuentre dentro de la arteria extrayendo un poco de sangre, introducir en tramos de 0.5 cm el catéter y comprobar que la cánula sigue dentro de la arteria y existe flujo sanguíneo hasta completar 2 cm.

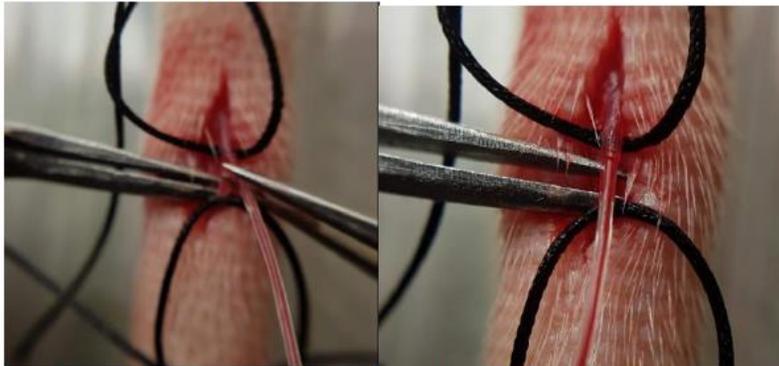


Imagen 10. Introducción de catéter en la arteria caudal.\*

11. Cerrar firmemente el nudo que se encuentra próximo al cuerpo del animal, pero cuidando de no cortar el flujo sanguíneo dentro de la cánula, posteriormente, cerrar el nudo que encuentra en la parte distal al cuerpo para cortar el flujo de la arteria, pero sin sujetar la cánula, posteriormente, sujetar la cánula con un segundo nudo y comprobar que no se ha interrumpido el flujo sanguíneo. Limpiar la vía con heparina.



Imagen 11. Fijación de catéter en la arteria caudal.\*

12. Con ayuda del porta aguja cerrar la incisión quirúrgica por sutura con puntos simples la piel del animal. Una vez terminado el procedimiento, situar un apósito sobre la herida y fijar con cinta adhesiva.



Imagen 12. Sutura de la incisión quirúrgica.\*

## Anexo 2: Validación del método analítico

Para realizar el consecuente análisis de las muestras sanguíneas, se implementó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para 100µL de plasma de rata). El ácido p-aminohipúrico fue seleccionado como estándar interno debido a su estabilidad frente al proceso de extracción y su resolución en respuesta en los cromatogramas obtenidos. El método analítico, una vez logradas las condiciones cromatográficas indicadas en la sección de la metodología VI. B2 fue validado conforme a la NOM-177-SA1-2013, numeral 9 “Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia”. En los siguientes resultados se muestra que el método cumple con los criterios de: Curva de calibración (linealidad), precisión, exactitud y selectividad para cuantificar el ketorolaco en plasma

La representación gráfica de las respuestas obtenidas para cada concentración de ketorolaco (Tabla A2.1) y analizadas por el método propuesto se presenta en la Figura A2.1. En ella se puede observar que la curva de calibración en la matriz biológica, tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones, generando una ecuación del tipo  $y=mx+b$ , donde  $m$  representa la pendiente,  $b$  la ordenada al origen,  $x$  la concentración de ketorolaco y la respuesta cromatográfica representada como: relación de áreas (división entre el área del pico cromatográfico generada por el ketorolaco y el área bajo la curva del pico cromatográfico generado por el estándar interno) es “ $y$ ”.

Curva de calibración en matriz biológica

concentración adicionada	A <sup>2</sup> analito/A <sup>2</sup> EI	F
0.05	0.05	1.03
0.05	0.05	1.09
0.05	0.06	1.17
0.3	0.44	1.46
0.3	0.41	1.36
0.3	0.42	1.39
0.9	1.29	1.44
0.9	1.32	1.47
0.9	1.27	1.41
3	4.65	1.55
3	4.68	1.56
3	4.49	1.5
6	9.30	1.55
6	8.94	1.49
6	9.16	1.53
9	13.53	1.5
9	13.99	1.55
9	13.56	1.51

Tabla A2.1 Curva de calibración en matriz biológica. Se describe la concentración adicionada de un rango 0.05-9 µg/mL, así como el área correspondiente a la señal del EI y del analito. F: factor de respuesta.

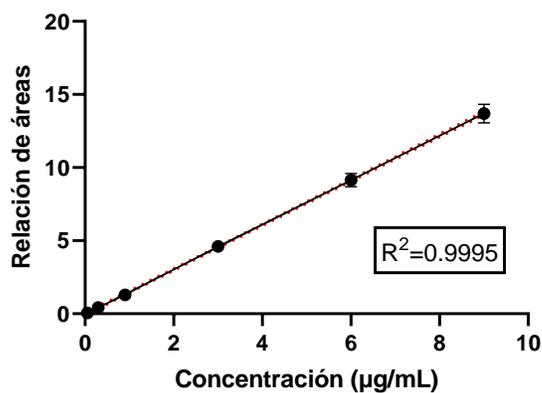


Figura A2.2 Curva de calibración en matriz biológica. Se muestra la concentración en un intervalo 0.05-9 µg/mL, se muestra la relación de áreas (Analito/EI) versus concentración.

Parámetro	Media	EE	IC95%
Ordenada al origen	-0.0308	0.0178	-0.116 a 0.054
Pendiente	1.5270	0.008	1.508 a 1.546

Tabla A2.1. Ecuación de la recta correspondiente las curvas de calibración en matriz biológica (n=3). Se muestra la media, el Error estándar de la media (EEM) y el intervalo de confianza al 95%.

Precisión.

Repetibilidad. Los datos de la Tabla A2.2, presentan la precisión del método evaluada como como repetibilidad. El por ciento del coeficiente de variación obtenido para el límite inferior de cuantificación (LIC), muestra control baja, media y alta (MCB, MCB y MCA respectivamente) para el ketorolaco, analizadas por quintuplicado bajo las mismas condiciones experimentales el en un solo día, cumplió con el criterio de aceptación marcado en la NOM 177-SSA1-2013.

Muestra	concentración adicionada (µg/mL)	A <sup>2</sup> analito/A <sup>2</sup> EI	Concentración recuperada (µg/mL)	% recobro	% desviación
LIC	0.05	0.095	0.04	84.41	15.59
LIC	0.05	0.107	0.05	99.70	0.30
LIC	0.05	0.097	0.04	86.96	13.04
LIC	0.05	0.093	0.04	81.82	18.18
LIC	0.05	0.094	0.04	82.38	17.62
MCB	0.6	0.918	0.58	96.87	3.13
MCB	0.6	0.974	0.62	102.94	-2.94
MCB	0.6	0.994	0.63	105.13	-5.13
MCB	0.6	0.989	0.63	104.53	-4.53
MCB	0.6	0.946	0.60	99.85	0.15
MCM	4	6.642	4.33	108.24	-8.24
MCM	4	7.168	4.67	116.84	-16.84
MCM	4	7.309	4.77	119.14	-19.14
MCM	4	6.456	4.21	105.19	-5.19
MCM	4	7.161	4.67	116.73	-16.73
MCA	8	13.055	8.53	106.61	-6.61
MCA	8	13.197	8.62	107.77	-7.77
MCA	8	12.975	8.48	105.96	-5.96
MCA	8	13.273	8.67	108.40	-8.40

Tabla A2.2 Por ciento del coeficiente de variación obtenido para las muestras, LIC (Límite inferior de cuantificación), Muestra control baja (MCB); Muestra control media (MCM); y Muestra control alta (MCA), para ketorolaco.

Parámetro	LIC	MCB	MCM	MCA
Promedio	0.04	0.61	4.53	8.57
Desv Est	0.004	0.02	0.24	0.08
CV%	8.45	3.40	5.41	0.91

Tabla A2.3 Se muestran los promedios, desviaciones estándar y coeficiente de variación por cada muestra control.

Repetibilidad. La precisión del método evaluada como reproducibilidad se determinó para el LIC y las muestras control, media y alta, en tres días diferentes y bajo las mismas condiciones experimentales de análisis. La Tabla 2A.3, muestra que el valor del por ciento de coeficiente de variación promedio en cada nivel de concentración no fue mayor que el 15%, cumpliendo el criterio normativo.

Muestra	Concentración adicionada (µg/mL)	A <sup>2</sup> analito/A <sup>2</sup> EI	Concentración recuperada (µg/mL)	% recobro	% desviación
LIC	0.05				
LIC	0.05	0.099	0.044	88.89	11.11
LIC	0.05	0.099	0.044	88.93	11.07
LIC	0.05	0.089	0.038	76.77	23.23
LIC	0.05	0.092	0.040	80.67	19.33
MCB	0.6	1.004	0.567	94.44	5.56
MCB	0.6	1.052	0.594	99.00	1.00
MCB	0.6	0.997	0.563	93.75	6.25
MCB	0.6	1.018	0.574	95.72	4.28
MCB	0.6	1.075	0.607	101.20	-1.20
MCM	4	7.093	4.080	101.99	-1.99
MCM	4	6.981	4.015	100.38	-0.38
MCM	4	6.715	3.862	96.54	3.46
MCM	4	7.031	4.044	101.10	-1.10
MCM	4	7.530	4.332	108.30	-8.30
MCA	8	13.409	7.724	96.55	3.45
MCA	8	13.104	7.548	94.35	5.65
MCA	8	13.070	7.529	94.11	5.89
MCA	8	13.711	7.898	98.73	1.27
MCA	8	13.302	7.662	95.78	4.22

Tabla A2.4 Muestras control. LIC: Límite inferior de cuantificación, MCB: Muestra control baja, MCM: Muestra control media, MCA: Muestra control alta. Se muestra el porcentaje de recobro y porcentaje de desviación con respecto a la concentración adicionada.

Parámetro	LIC	MCB	MCM	MCA
Promedio	0.04	0.57	4.11	7.90
Desv Est	0.012	0.04	0.41	0.570
CV	29.92	7.13	10.03	7.21

Tabla A2.5 Se muestran los promedios, desviaciones estándar y coeficiente de variación por cada muestra control.

Exactitud.

La exactitud del método fue determinada como el por ciento del valor nominal del analito obtenido en cada de las muestras control analizadas (LIC, MCB, MCM y MCA). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2A.4, observándose que para todos los casos el valor promedio de las determinaciones está dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal.

Muestra	concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	A <sup>2</sup> analito/A <sup>2</sup> EI	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% recobro	% desviación
LIC	0.05	0.107	0.05	97.65	2.35
LIC	0.05	0.108	0.05	98.61	1.39
LIC	0.05	0.120	0.06	113.06	-13.06
LIC	0.05	0.120	0.06	113.06	-13.06
LIC	0.05	0.096	0.04	84.87	15.13
MCB	0.6	0.939	0.53	88.16	11.84
MCB	0.6	0.924	0.52	86.73	13.27
MCB	0.6	0.926	0.52	86.87	13.13
MCB	0.6	0.925	0.52	86.76	13.24
MCB	0.6	0.966	0.54	90.74	9.26
MCM	4	6.596	3.79	94.82	5.18
MCM	4	6.200	3.56	89.12	10.88
MCM	4	6.232	3.58	89.57	10.43
MCM	4	6.217	3.57	89.36	10.64
MCM	4	6.390	3.67	91.85	8.15
MCA	8	12.779	7.36	92.01	7.99
MCA	8	13.315	7.67	95.87	4.13
MCA	8	13.601	7.83	97.93	2.07
MCA	8	11.544	6.65	83.10	16.90
MCA	8	13.438	7.74	96.76	3.24

Tabla A2.6 Muestras control. LIC: Límite inferior de cuantificación, MCB: Muestra control baja, MCM: Muestra control media, MCA: Muestra control alta. Se muestra el porcentaje de recobro y porcentaje de desviación con respecto a la concentración adicionada.

Parámetro	LIC	MCB	MCM	MCA
Promedio	0.04	0.57	4.08	7.90
Desv Est	0.006	0.04	0.412	0.570
CV	14.01	6.87	10.11	7.21

Tabla A2.7 Se muestran los promedios, desviaciones estándar y coeficiente de variación por cada muestra control.

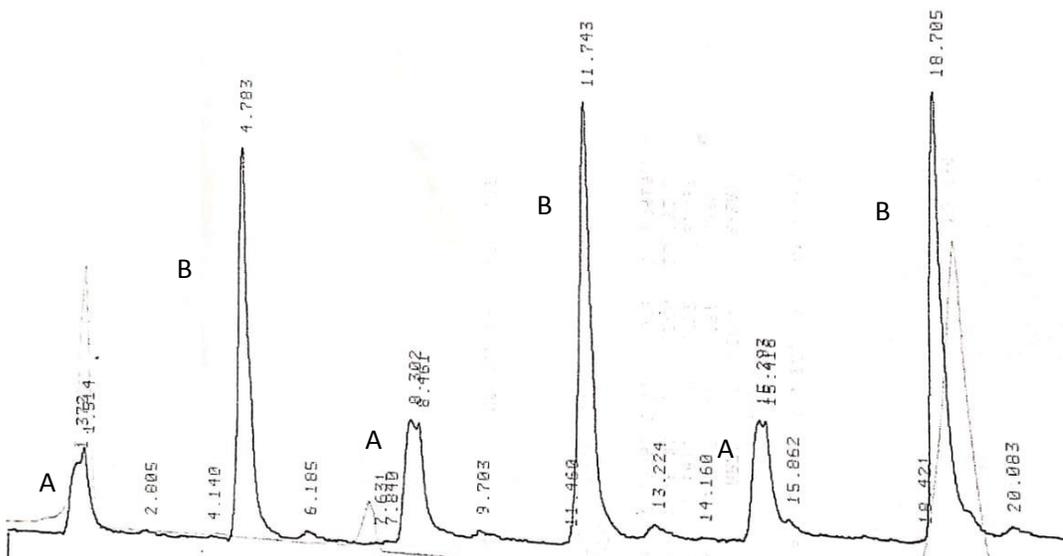


Figura A2.3 Muestras blanco para demostrar la no interferencia de la matriz biológica tiempo de retención del analito (2.1 minutos). A: Compuestos pertenientes a la matriz biológica. B: Estándar interno ácido p-aminohipúrico 5µg/mL

Resumen de los parámetros de validación.

Criterio	Referencia	Resultado
Linealidad	$R^2 \geq 0.99$	$R^2 \geq 0.99$ Para todas las curvas evaluadas.
Precisión Repetibilidad Reproducibilidad	CV <15% CV LIC <20% CV <15%	CV 4% CV LIC 7.15% 8.58%
Exactitud	LIC <20% <15%	8.63% 1.38%
Selectividad	Interferencias < 20%	No hay interferencias cercanas al tiempo de retención del analito.

Tabla A2.8 Resultados de la validación del método analítico conforme a la NOM-177-SSA1-2013.

### Anexo 3. Estudio farmacodinámico

Las siguientes figuras (Figura 3A.1- 3A.4) muestran la evaluación conductual del número de lamidas en intervalos de 5 minutos observado desde 0-40 minutos obtenidas tras la administración oral de metileugenol en el modelo de formalina al 2.5% en ratones donde se probó las dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg para determinar la DE<sub>30</sub> experimental.

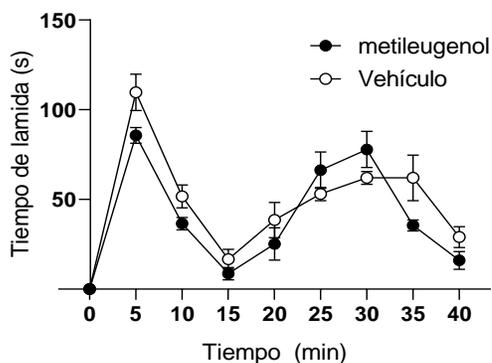


Figura 3A.1. Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5% Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min  $\pm$  E.E observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con metileugenol 1mg/kg.

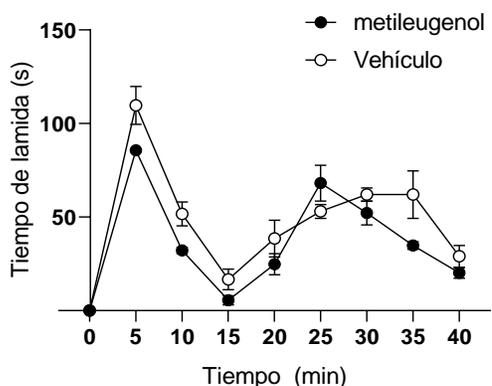


Figura 3A.2. Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5% Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min  $\pm$  E.E. observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con metileugenol 3 mg/kg.

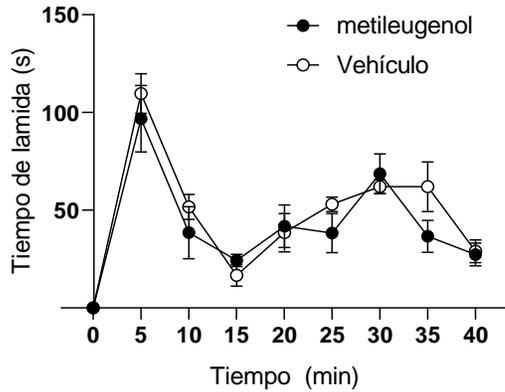


Figura 3A.3 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio ( $n=6$ ) del tiempo de lamida en intervalos de  $5\text{min} \pm \text{E.E.}$  observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con metileugenol 10 mg/kg

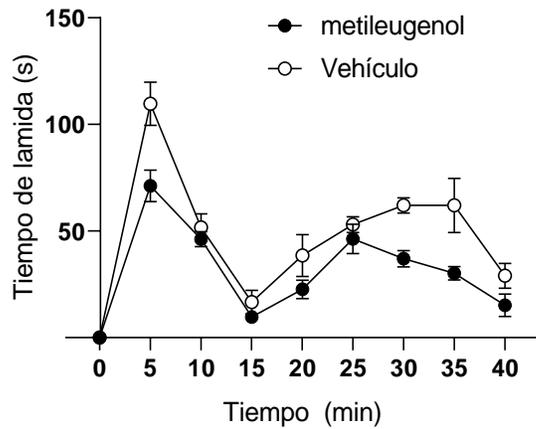


Figura 3A.4 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio ( $n=6$ ) del tiempo de lamida en intervalos de  $5\text{min} \pm \text{E.E.}$  observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con metileugenol 30 mg/kg.

A partir de la Figura 3A.5 hasta la Figura 3A. 6, se presentan las representaciones gráficas de la evaluación conductual promedio del número de lamidas en intervalos de 5 minutos observado desde 0-40 minutos, obtenidas con la administración oral de ketorolaco en el modelo de formalina al 2.5% en ratones, donde se probó las dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg para determinar la DE<sub>30</sub> experimental.

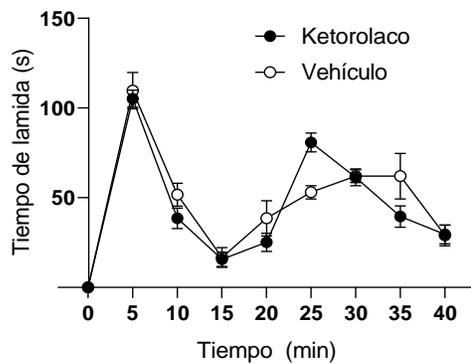


Figura 3A.5 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min ± E.E. observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con ketorolaco 1 mg/kg.

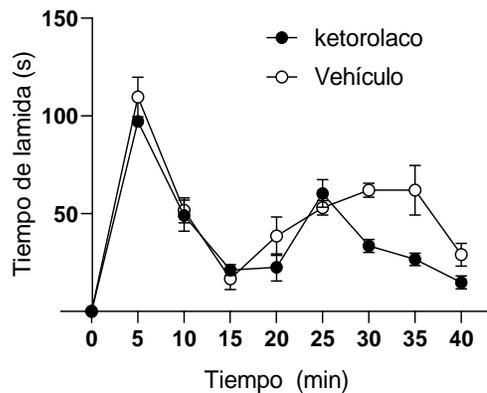


Figura 3A.6 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min ± E.E. observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con ketorolaco 3 mg/kg.

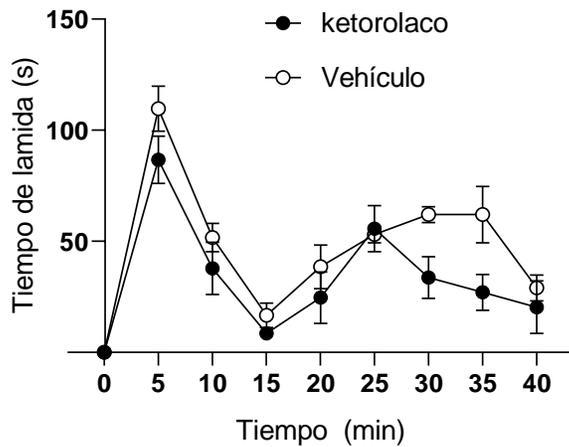


Figura 3A.7 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio ( $n=6$ ) del tiempo de lamida en intervalos de  $5\text{min} \pm \text{E.E}$  observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con ketorolaco 10 mg/kg.

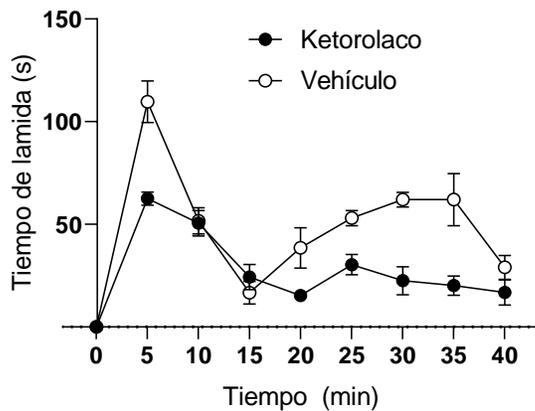


Figura 3A.8 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5%. Se muestra el promedio ( $n=6$ ) del tiempo de lamida en intervalos de  $5\text{min} \pm \text{E.E}$  observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con ketorolaco 30 mg/kg.

Para evaluar el efecto de la administración de metileugenol sobre la farmacodinamia de ketorolaco y determinar si existía una interacción farmacodinámica, se probó 4 distintas dosis de la combinación metileugenol-ketorolaco. Las cuales fueron obtenidas mediante un análisis isoblográfico donde se determinó el punto de aditividad teórica. Las Figuras 3A.9 a 3A.12, muestran las representaciones gráficas de tales evaluaciones.

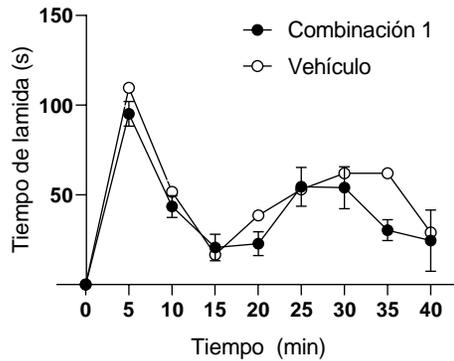


Figura 3.9 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5% Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min  $\pm$  E.E observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con la combinación 1: 0.52/0.45mg/kg metileugenol-ketorolaco respectivamente.

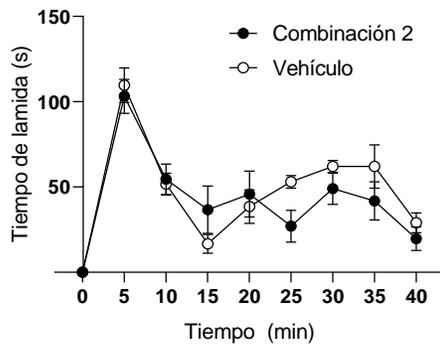


Figura 3.10 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5% Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min  $\pm$  E.E observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con la combinación 2: 1.05/0.89mg/kg. metileugenol-ketorolaco respectivamente.

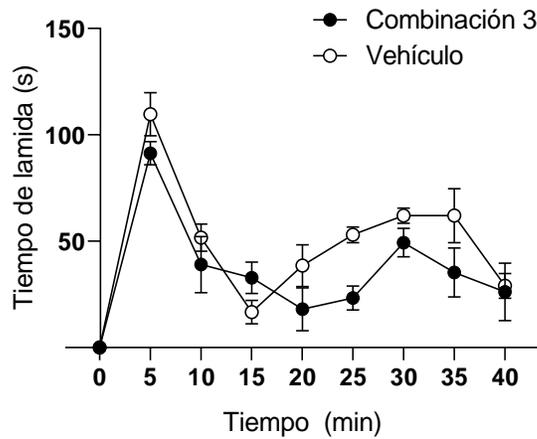


Figura 3.11 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5% Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min ± E.E observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con la combinación 3: 2.09/1.78

mg/kg. metileugenol-ketorolaco respectivamente.

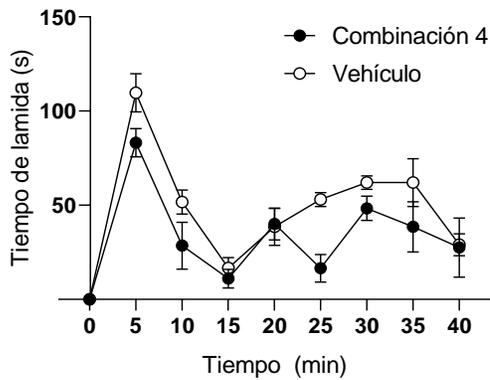


Figura 3.12 11 Evaluación conductual de la nocicepción empleando el modelo de formalina al 2.5% Se muestra el promedio (n=6) del tiempo de lamida en intervalos de 5min ± E.E observado durante 40 minutos en el grupo tratamiento administrado oralmente con la combinación 4: 4.18/3.56mg/kg. metileugenol-ketorolaco respectivamente.

## Anexo 4 Estudio farmacocinético

La tabla 4A.1 y 4A.3 presentan las concentraciones individuales obtenidas en el tiempo muestreo realizado para el grupo control (administración única oral de ketorolaco en dosis de 1.64 mg/Kg) y grupo tratamiento (administración de metileugenol 1.9mg/kg30 minutos antes de una dosis oral de ketorolaco, (1.64mg/kg).

Tiempo (min)	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 5	Control 6	Media	Desv est	EE
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.06	1.25	1.21	0.80	0.82	0.58	0.96	0.26	0.11
15	0.83	0.81	0.80	0.58	0.56	0.73	0.72	0.12	0.05
30	0.66	0.72	0.55	0.40	0.43	0.39	0.53	0.14	0.06
45	0.59	0.51	0.41	0.30	0.36	0.21	0.40	0.14	0.06
60	0.44	0.40	0.32	0.29	0.32	0.19	0.33	0.09	0.04
90	0.34	0.34	0.28	0.14	0.22	0.11	0.24	0.10	0.04
120	0.20	0.17	0.23	0.05	0.13	0.11	0.15	0.07	0.03
180			0.15	0.04	0.08	0.03	0.07	0.06	0.03
240				0.03	0.06	0.00	0.03	0.03	0.02
360				0.01	0.04		0.03	0.02	0.01

Tabla 4A.1. Concentraciones plasmáticas ( $\mu\text{g/mL}$ ) de ketorolaco correspondientes a una administración de ketorolaco 1.64 mg/kg por vía oral en el grupo control.

En las figuras 4A.1 y 4A.2, se puede observar los perfiles farmacocinéticos individuales de ketorolaco obtenidos para el grupo control y grupo tratamiento, a partir de los cuales fueron obtenidos los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos presentados en las tablas 4A.2 y 4A.4

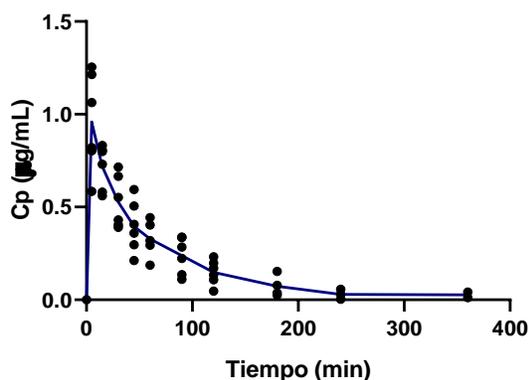


Figura 4A.1. Curso temporal de ketorolaco 1.64mg/kg administrado por vía oral en el grupo control. Los puntos corresponden a la concentración plasmática ( $C_p$ ) obtenida en cada tiempo de muestreo. La curva corresponde a la  $C_p$  promedio ( $n=6$ ).

parametro	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 5	Control 6	media	Desv est	EE
Ke	0.014	0.014	0.014	0.019	0.010	0.019	0.015	0.003	0.001
t½	50.53	48.74	50.51	37.30	66.13	35.62	48.14	11.04	4.51
vd	413.63	430.88	359.57	593.71	647.66	444.08	481.59	112.82	46.06
CL	5.67	6.13	4.93	11.03	6.79	8.64	7.20	2.26	0.92
ABC(0-360)	50.53	58.91	63.68	37.70	51.42	49.95	52.03	8.89	3.63
ABC(0-∞)	74.82	70.92	85.74	39.69	56.81	50.11	63.02	17.13	6.99
Cmáx	1.06	1.25	1.21	0.80	0.82	0.73	0.98	0.23	0.09
Tmáx	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	30.00	9.17	10.21	4.17

Tabla 4A.2. Parámetros farmacocinéticos del grupo control con una administración de 1.64mg/kg. Los parámetros fueron calculados mediante análisis no compartimental

#### Tratamientos

Tiempo (min)	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6	media	desv est	EE
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.41	1.44	1.10	1.20	1.27	0.96	1.23	0.18	0.08
15	0.99	0.99	0.58	0.74	1.02	0.77	0.85	0.18	0.07
30	0.79	0.75	0.37	0.60	0.75	0.62	0.65	0.16	0.06
45	0.83	0.57	0.26	0.52	0.63		0.56	0.21	0.09
60	0.32	0.46	0.17		0.54	0.44	0.39	0.15	0.07
90	0.28	0.32	0.07		0.31	0.41	0.28	0.13	0.06
120	0.12	0.22	0.04	0.30	0.24	0.29	0.20	0.10	0.04
180	0.07	0.05	0.03	0.17	0.17	0.20	0.11	0.07	0.03
240	0.03		0.02	0.15		0.16	0.09	0.07	0.04
360				0.15			0.15		0.00

Tabla 4A.3. Concentraciones plasmáticas de ketorolaco correspondientes a una administración de metileugenol (1.9mg/kg) 30 minutos antes de la administración de ketorolaco (1.64mg/kg) por vía oral en el grupo tratamiento.

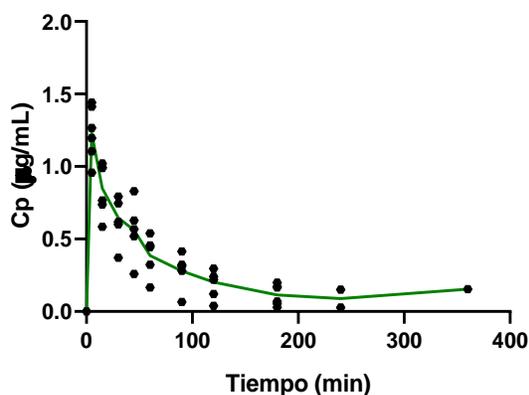


Figura 4A.2. Curso temporal de ketorolaco 1.64mg/kg en presencia de metileugenol 1.9mg/kg administrado por vía oral en el grupo tratamiento. Los puntos corresponden a la concentración plasmática (Cp) obtenida en cada tiempo de muestreo. La curva corresponde a la Cp promedio (n=6).

Parámetro	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6	media	Desv est	EE
Ke	0.018	0.017	0.014	0.018	0.013	0.012	0.015	0.003	0.001
t½	39.02	40.35	50.50	39.02	52.49	58.29	46.61	8.25	3.37
vd	279.30	322.95	799.78	248.13	341.52	361.42	392.18	203.93	83.25
CL	4.96	5.55	10.98	4.41	4.51	4.30	5.78	2.59	1.06
ABC(0-360)	70.51	74.30	34.17	85.40	80.21	85.71	71.72	19.35	7.90
ABC(0-∞)	74.38	77.45	35.85	106.05	104.38	109.51	84.60	28.30	11.55
Cmáx	1.41	1.44	1.10	1.20	1.27	0.96	1.23	0.18	0.08
Tmáx	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	0.00	0.00

Tabla 4A.4. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al grupo tratamiento con una administración de metileugenol 1.9mg/kg, transcurridos 30 minutos, se administró ketorolaco 1.64mg/kg. Los parámetros obtenidos fueron calculados mediante análisis no compartimental.