

00563

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE IBUPROFENO  
Y SU RESPUESTA ANALGÉSICA POTENCIADA POR CAFEÍNA**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN FARMACIA (BIOFARMACIA)**

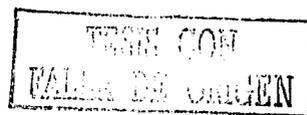
PRESENTA

Q. F. B. JOSÉ RAÚL MEDINA LÓPEZ



TUTORA: DRA. HELGI JUNG COOK AÑO: 2003

A





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## JURADO ASIGNADO

**Presidente:** Dr. Francisco Javier López Muñoz.  
**Vocal:** Dr. Andrés Navarrete Castro.  
**Secretario:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents.  
**Primer suplente:** Dra. Adriana Ganem Rondero.  
**Segundo suplente:** Dra. María Eva González Trujano.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: José Raúl Medina López  
FECHA: 17 de Febrero de 2003  
FIRMA: Medina Raúl

Sitios donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química, UNAM y

Lab. No. 7 "Dolor y Analgesia" Dpto. de Farmacobiología CINVESTAV- IPN.

**Tutora:**



---

Dra. Helgi Jung Cook

**Sustentante:**



---

Q. F. B. José Raúl Medina López

**Agradezco a:**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

por apoyarme con una beca durante mis estudios de posgrado

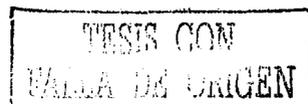
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO**

por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis

*A mi familia con todo cariño*

*por estar a mi lado en todas las cosas que he emprendido*

D

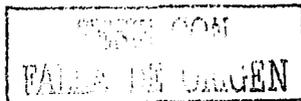


## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN .....	1
CAPÍTULO I Introducción, objetivos e hipótesis .....	3
CAPÍTULO II Generalidades .....	6
2.1. Dolor .....	6
2.1.1. Definición .....	6
2.1.2. Reacción inflamatoria .....	7
2.1.3. Modelos experimentales de inflamación .....	9
2.2. AAINEs .....	10
2.2.1. Clasificación .....	10
2.2.2. AAINEs y CAF .....	12
2.2.3. El papel de la CAF en la antinocicepción .....	12
2.2.4. Mecanismos participantes en la potenciación observada con las combinaciones de AAINEs y CAF .....	13
2.2.4.1. Mecanismos farmacocinéticos .....	13
2.2.4.2. Mecanismos farmacodinámicos .....	14
2.3. Monografías de los fármacos en estudio .....	15
2.3.1. Ibuprofeno .....	16
2.3.1.1. Propiedades físicas .....	16
2.3.1.2. Farmacocinética y metabolismo .....	16
2.3.1.3. Vías de administración y dosis .....	16
2.3.1.4. Efectos tóxicos .....	17
2.3.2. Cafeína .....	17
2.3.2.1. Propiedades físicas .....	18
2.3.2.2. Farmacocinética y metabolismo .....	18
2.3.2.3. Vías de administración y dosis .....	19
2.3.2.4. Efectos tóxicos .....	20
2.4. Modelaje farmacocinético-farmacodinámico .....	20

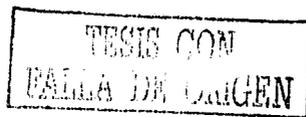
2.4.1. Conceptos .....	20
2.4.2. Modelo lineal .....	21
2.4.3. Modelo log-lineal .....	22
2.4.4. Modelo $E_{max}$ .....	22
2.4.5. Modelo $E_{max}$ sigmoidal .....	23
2.4.6. Modelo $E_{max}$ inhibitorio .....	23
<b>CAPÍTULO III Sección experimental .....</b>	<b>25</b>
3.1. Estudio farmacodinámico .....	25
3.1.1. Compuestos y reactivos biológicos .....	25
3.1.2. Evaluación de la actividad antinociceptiva .....	25
3.1.3. Estudio farmacodinámico preliminar .....	28
3.1.4. Manejo de datos y análisis estadístico .....	28
3.2. Estudio farmacocinético .....	29
3.2.1. Estándares y reactivos .....	29
3.2.2. Material y equipo .....	29
3.2.3. Soluciones .....	30
3.2.4. Método analítico para la determinación de IBU en plasma .....	31
3.2.5. Validación del método analítico .....	31
3.2.5.1. Selectividad .....	31
3.2.5.2. Linearidad del sistema .....	32
3.2.5.3. Linearidad del método .....	32
3.2.5.4. Repetibilidad y reproducibilidad .....	32
3.2.5.5. Exactitud .....	32
3.2.5.6. Recobro absoluto .....	33
3.2.5.7. Estabilidad .....	33
3.2.6. Cirugía .....	33
3.2.7. Estudio farmacocinético preliminar .....	34
3.3. Estudio final de la combinación IBU+CAF .....	34
<b>CAPÍTULO IV Resultados y discusión de resultados .....</b>	<b>35</b>

F



4.1. Estudio farmacodinámico preliminar .....	35
4.1.1. Efecto antinociceptivo de morfina, ácido acetilsalicílico e IBU .....	35
4.1.2. Efecto antinociceptivo de las combinaciones IBU+CAF .....	36
4.2. Estudio farmacocinético .....	41
4.2.1. Validación del método analítico .....	41
4.2.1.1. Selectividad .....	41
4.2.1.2. Linearidad del sistema .....	42
4.2.1.3. Linearidad del método .....	43
4.2.1.4. Repetibilidad y reproducibilidad .....	44
4.2.1.5. Exactitud .....	44
4.2.1.6. Recobro absoluto .....	45
4.2.1.7. Estabilidad .....	46
4.2.2. Estudio farmacocinético preliminar .....	46
4.3. Estudio final de la combinación IBU+CAF .....	49
4.3.1. Etapa farmacocinética .....	49
4.3.2. Etapa farmacodinámica .....	51
4.3.3. Relación: nivel plasmático-efecto terapéutico .....	53
<b>CAPÍTULO V Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Apéndice .....</b>	<b>63</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>66</b>

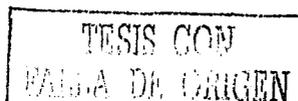
G



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Administración de ácido úrico. ....	27
<b>Figura 2.</b> Colocación de electrodos. ....	27
<b>Figura 3.</b> Registro del índice de funcionalidad. ....	27
<b>Figura 4.</b> Cilindro de acero inoxidable. ....	27
<b>Figura 5.</b> IF antes y después de la administración del analgésico. ....	27
<b>Figura 6.</b> Preparación de la curva patrón de IBU en plasma. ....	31
<b>Figura 7.</b> Colocación del catéter en la arteria caudal. ....	33
<b>Figura 8.</b> Curva dosis-respuesta de morfina, IBU, ácido acetilsalicílico y CAF. ....	35
<b>Figura 9.</b> Curvas dosis-respuesta de IBU solo y combinado con tres dosis de CAF. ....	37
<b>Figura 10.</b> Curso temporal del efecto analgésico de IBU y CAF al administrar 10.0 mg/kg de IBU, 17.8 mg/kg de CAF y la combinación 10.0+17.8 mg/kg de IBU+CAF. ....	39
<b>Figura 11.</b> Curso temporal del efecto analgésico de IBU y CAF al administrar 100.0 mg/kg de IBU, 17.8 mg/kg de CAF y la combinación 100.0+17.8 mg/kg de IBU+CAF. ....	39
<b>Figura 12.</b> Curva dosis-respuesta de morfina, IBU, ácido acetilsalicílico y la combinación IBU+17.8 mg/kg de CAF. ....	40
<b>Figura 13.</b> Plasma de rata libre de fármaco (A). Plasma cargado con IBU (25µg/mL) y ácido mefenámico como estándar interno (B). ....	41
<b>Figura 14.</b> Linearidad del sistema. ....	42
<b>Figura 15.</b> Linearidad del método. ....	43
<b>Figura 16.</b> Exactitud del método. ....	45
<b>Figura 17.</b> Recobro absoluto de IBU. ....	45
<b>Figura 18.</b> Curso temporal de los niveles plasmáticos de IBU después de administrar 17.8 mg/kg de IBU y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF. ....	47
<b>Figura 19.</b> ABC del curso temporal del nivel plasmático y ABC del curso temporal del efecto antinociceptivo de IBU después de administrar 17.8 mg/kg de IBU y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF. ....	48
<b>Figura 20.</b> Cursos temporales del nivel plasmático de IBU después de administrar diferentes dosis de IBU solo (A) y combinado con 17.8 mg/kg de CAF (B). ....	49
<b>Figura 21.</b> ABC del curso temporal del nivel plasmático de IBU en función de la dosis después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. ....	51
<b>Figura 22.</b> Cursos temporales del efecto antinociceptivo de IBU después de administrar diferentes dosis de IBU solo (A) y combinado con 17.8 mg/kg de CAF (B). ....	52

H



<b>Figura 23.</b> ABC del curso temporal del efecto antinociceptivo de IBU en función del logaritmo de la dosis después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. ....	52
<b>Figura 24.</b> Relación entre el IF y las concentraciones plasmáticas de IBU después de administrar 56.2 mg/kg de IBU y la combinación 56.2+17.8 mg/kg de IBU+CAF. ....	53
<b>Figura 25.</b> Fracción de área de los cursos temporales del nivel plasmático y del efecto antinociceptivo de IBU después de administrar 56.2 mg/kg de IBU. ....	54
<b>Figura 26.</b> IF y concentraciones plasmáticas de IBU en función del tiempo después de administrar 56.2 mg/kg de IBU. ....	56
<b>Figura 27.</b> Modelo farmacocinético-farmacodinámico que muestra la unión entre el compartimento central farmacocinético y el compartimento efecto. ....	57
<b>Figura 28.</b> ABC del curso temporal del efecto antinociceptivo en función del logaritmo del ABC del curso temporal del nivel plasmático de IBU después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. ....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estructura química de los precursores de cada familia de AAINEs. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Parámetros farmacodinámicos estimados de las curvas dosis-respuesta de la morfina, el IBU y el ácido acetilsalicílico. ....	36
<b>Tabla 3.</b> Áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo de IBU solo y combinado con: 10.0, 17.8 y 31.6 mg/kg de CAF. ....	37
<b>Tabla 4.</b> Parámetros farmacodinámicos estimados a partir de las curvas dosis-respuesta del IBU combinado con tres dosis de CAF. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Relación de áreas IBU/EI en acetonitrilo para evaluar linealidad del sistema. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Relación de áreas IBU/EI en plasma para evaluar linealidad del método. ....	43
<b>Tabla 7.</b> Relación de áreas IBU/EI para evaluar repetibilidad. ....	44
<b>Tabla 8.</b> Relación de áreas IBU/EI para evaluar reproducibilidad. ....	44
<b>Tabla 9.</b> ANDEVA para evaluar estabilidad. ....	46
<b>Tabla 10.</b> Parámetros farmacocinéticos calculados después de administrar 17.8 mg/kg de IBU y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF. ....	47
<b>Tabla 11A.</b> Parámetros farmacocinéticos determinados después de administrar diferentes dosis de IBU. ....	50
<b>Tabla 11B.</b> Parámetros farmacocinéticos determinados después de administrar diferentes dosis de IBU combinado con 17.8 mg/kg de CAF. ....	50
<b>Tabla 12.</b> Tiempo medio de retardo en el equilibrio del IBU con su sitio receptor después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. ....	54

## RESUMEN

Los conceptos del modelaje farmacocinético-farmacodinámico son importantes en todas las etapas del desarrollo farmacéutico. Sirven como una herramienta para la elaboración de medicamentos innovadores y altamente eficientes. A la fecha, existen productos para combatir la mayor cantidad de enfermedades que aquejan a la población humana. Un común denominador en estas situaciones es el dolor. El dolor es una experiencia subjetiva asociada a estímulos nocivos internos y/o externos. Los fármacos analgésicos-antiinflamatorios no esteroides (AINEs) son una serie de estructuras químicas que presentan –en diferente grado- actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria. El ibuprofeno (IBU) es un fármaco de este tipo. La información farmacocinética-farmacodinámica de estos compuestos es escasa, principalmente, por la falta de modelos farmacológicos que midan o evalúen el dolor de una forma más objetiva y con la menor variabilidad posible. El modelo PIFIR (por sus siglas en inglés: Pain-Induced Functional Impairment model in the Rat) ha mostrado ser adecuado para estudios donde el dolor es un factor a considerar. Un compuesto que se ha adicionado a algunos AINEs para modificar su actividad terapéutica es la cafeína (CAF). La investigación a nivel preclínico entre la asociación IBU+CAF proporciona información útil para las etapas posteriores del desarrollo farmacéutico, por lo que el objetivo de este trabajo fue, determinar la relación entre los niveles plasmáticos de IBU y su respuesta analgésica potenciada por CAF en el modelo experimental PIFIR. El proyecto se realizó en 3 etapas.

La primer etapa consistió en encontrar las combinaciones de IBU+CAF de potenciación antinociceptiva. El IBU y la combinación IBU+CAF se administraron por vía oral a grupos de seis ratas Wistar macho. Se probaron seis dosis de IBU solo: 5.6, 10.0, 17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg y combinado con tres dosis de CAF: 10.0, 17.8 y 31.6 mg/kg. Los resultados señalaron que sólo tres de las 18 combinaciones evaluadas mostraron efectos de potenciación antinociceptiva ( $p < 0.01$ ). Estas combinaciones fueron: 10.0, 17.8 y 56.2 mg/kg de IBU con 17.8 mg/kg de CAF. La CAF permitió además, un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia el lado izquierdo del eje de las abscisas. La  $DE_{50}$  de IBU solo, fue  $26.98 \pm 2.44$  mg/kg y la  $DE_{50}$  de la combinación IBU+31.6 mg/kg de CAF fue  $8.70 \pm 0.63$  mg/kg. Esto significa que es posible administrar una menor dosis de IBU –pero combinado con CAF- para alcanzar los mismos niveles de efecto terapéutico.

En la segunda etapa se adaptó y validó un método analítico para cuantificar IBU en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución. El fármaco fue separado en una columna Symmetry C<sub>18</sub> (Waters) eluida con la fase móvil acetonitrilo:agua:metanol:ácido fosfórico (58:37:5:0.05 v/v/v/v) a una velocidad de flujo de 1.8 mL/min y detección a 196 nm. Los tiempos de retención fueron 1.8 y 2.4 min para el IBU y el estándar interno respectivamente. El método cumplió con los principales criterios de validación: selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, recobro absoluto y estabilidad.

En la tercera etapa se determinó simultáneamente el efecto antinociceptivo y los niveles plasmáticos de IBU después de administrar, a grupos de seis ratas 10.0, 17.8, 31.6, 56.2 y 100.0 mg/kg de IBU solo y estas mismas dosis combinadas con 17.8 mg/kg de CAF. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de IBU, con y sin CAF ( $p > 0.05$ ). Este resultado eliminó la posibilidad de un mecanismo farmacocinético para explicar el incremento de la actividad antinociceptiva observada. El efecto antinociceptivo -expresado como IF%- en función de los niveles plasmáticos presentó un comportamiento de histéresis con sentido contrario a las manecillas del reloj en todos los tratamientos administrados. Este comportamiento sugiere un retardo en el equilibrio del fármaco entre el plasma y el sitio de acción.

Finalmente, los resultados expresados como área bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo ( $ABC_E$ ), en función del logaritmo del área bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático ( $ABC_P$ ), se ajustaron al modelo  $E_{max}$  sigmoideal. La ecuación matemática que describió la relación entre el  $ABC_E$  y el  $ABC_P$  para la combinación IBU+CAF fue:

$$E = \frac{331.12C^{6.27}}{33.64^{6.27} + C^{6.27}}$$

donde:  $E = ABC_E$  y  $C = ABC_P$ . El valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) que mide la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión a los valores observados fue 0.9948

# CAPÍTULO I

## Introducción, objetivos e hipótesis

---

El dolor cumple funciones vitales para la protección de los individuos y la perpetuación de las especies. La definición más aceptada para este fenómeno es la que indica que el dolor es una experiencia subjetiva acompañada de componentes sensoriales y emociones desagradables y que frecuentemente está descrito en función de la magnitud del daño con el que se asocia<sup>1</sup>. El término que involucra al conjunto de mecanismos por los cuales el estímulo nocivo periférico es transmitido al sistema nervioso central se denomina nocicepción<sup>2</sup>.

El sufrimiento experimentado lleva al paciente a tratar de eliminar el dolor, es decir, a buscar analgesia. Los fármacos analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son una clase de compuestos que presentan actividad terapéutica. El Ibuprofeno (IBU) –un compuesto de este género- es un fármaco ampliamente utilizado por sus propiedades analgésicas. Estas cualidades han sido evaluadas por diversos autores tanto en animales como en humanos. Uno de los objetivos en que los investigadores han centrado su atención es en encontrar la relación concentración-efecto útil para la práctica clínica. Esta relación puede llegar a ser difícil de señalar, entre otras cosas, por la falta de modelos farmacodinámicos capaces de producir respuestas biológicas similares con un mínimo de variabilidad y error. Contrario a la versatilidad de los métodos analíticos –especialmente los cromatográficos- que pueden determinar las concentraciones plasmáticas con un mínimo de error y así, evaluar la farmacocinética de los compuestos analgésicos sin mayor problema.

El desarrollo de modelos matemáticos que expliquen las relaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas es fundamental y en años recientes, se ha hecho una recopilación de modelos farmacodinámicos básicos para evaluar el efecto farmacológico<sup>3,4</sup>. Los modelos experimentales en animales comúnmente miden nocicepción –entre otros mecanismos asociados al dolor- e involucran pruebas de reacción de un animal a un estímulo nocivo. En

estos trabajos se ejemplifica cómo las especies animales son útiles en la búsqueda de dosis efectivas clínicas<sup>5</sup>. Algunos autores han descrito correlaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas de IBU -valiéndose de su propiedad analgésica- en pacientes sometidos a cirugía dental<sup>6</sup> o de su propiedad antipirética en niños con fiebre<sup>7</sup>.

Un compuesto que se ha adicionado a los AAINes es la cafeína (CAF)<sup>8,9</sup>. La CAF es un alcaloide de origen natural perteneciente al grupo de las metilxantinas y se encuentra principalmente en el café. La propiedad de la CAF para incrementar la respuesta analgésica no ha sido aceptada universalmente. En algunos estudios clínicos de los años 1960s y 1970s la CAF mostró ser incapaz de incrementar el efecto analgésico de este tipo de compuestos<sup>10,11</sup>. Sin embargo, ahora se acepta que la CAF incrementa en diferente proporción la respuesta analgésica de los AAINes sólo en ciertas combinaciones de dosis y en determinados estados de dolor<sup>12-15</sup>.

Con referencia a la farmacocinética de los analgésicos no esteroideos se reportó que la CAF favoreció el incremento de las concentraciones plasmáticas de acetaminofén cuando se administró la combinación acetaminofén+CAF a ratas<sup>16</sup>. Resultados similares se reportaron para el acetaminofén en humanos<sup>17</sup>. Por otra parte, diversos autores han confirmado la propiedad de la CAF para incrementar significativamente el efecto antinociceptivo de una gran variedad de AAINes sin una modificación significativa de la farmacocinética de este género de compuestos<sup>18-21</sup>.

La información sobre la relación farmacocinética-farmacodinámica de IBU y de la combinación IBU+CAF es escasa debido -como ya se había mencionado- a la falta de metodologías farmacológicas que permitan determinar satisfactoriamente el efecto antinociceptivo. Investigaciones recientes sugieren que el modelo PIFIR (por sus siglas en inglés: Pain-Induced Functional Impairment model in the Rat) es adecuado para este tipo estudios<sup>22-24</sup>. Aunque la acción que la CAF ejerce en el efecto de algunos AAINes ya se conoce, es necesario determinar el grado y naturaleza del cambio que produce la CAF en los compuestos analgésicos no analizados a la fecha.

Los conceptos del modelaje farmacocinético-farmacodinámico pueden ser aplicados a todos los niveles del desarrollo farmacéutico, especialmente en etapas preclínica y clínicas. Se sabe de aplicaciones predictivas y rigurosas implementaciones de estos conocimientos para la elaboración de ensayos clínicos mejor enfocados y por lo tanto de menor costo<sup>25</sup>. Así que, los conceptos farmacocinéticos-farmacodinámicos juegan un papel importante en el conocimiento de los medicamentos para aprovecharlos adecuadamente.

Dado que la investigación sobre la asociación farmacocinética-farmacodinámica de IBU y de la combinación IBU+CAF es insuficiente los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

### **Objetivo general**

Establecer la correlación nivel plasmático-efecto terapéutico de IBU administrado solo y combinado con CAF a nivel preclínico.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la farmacodinamia de IBU en el modelo PIFIR, después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con diferentes dosis de CAF. La respuesta terapéutica será evaluada por la modificación del efecto nocivo provocado en los animales.
2. Determinar la farmacocinética de IBU después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con una dosis de CAF. La determinación de los niveles plasmáticos de IBU se realizará por cromatografía de líquidos de alta resolución.
3. Determinar la influencia que ejerce la CAF en la antinocicepción al administrarse con IBU.

Por la información recopilada hasta el momento sobre los AAINes la **Hipótesis** planteada es: Los niveles plasmáticos y el efecto antinociceptivo de IBU, determinados en el modelo PIFIR, se incrementan en presencia de la CAF.

Los datos de nivel plasmático y de efecto antinociceptivo del fármaco administrado solo y combinado con CAF, permitirán cumplir con los objetivos propuestos y aceptar o rechazar la hipótesis planteada.

# CAPÍTULO II

## Generalidades

---

### 2.1. Dolor

#### 2.1.1. Definición

El *dolor* es una experiencia subjetiva que se interpreta como un síntoma de lesión tisular. El dolor producido por un estímulo interno indica un trastorno patológico, y si es continuo e intenso, demuestra la existencia de algún trastorno grave; por lo que causa miedo y ansiedad. En el hombre, estos son componentes importantes de la percepción del dolor y el tratamiento de la ansiedad puede ser tan importante como el tratamiento del dolor<sup>26</sup>. El dolor producido por un estímulo externo desencadena reacciones de alejamiento; por lo tanto, tiene la función útil de señalar la presencia de un estímulo lesivo (o sea, de función *nociceptiva*) que en particular puede ser mecánico, químico, térmico o eléctrico.

Los fármacos que alivian el dolor y actúan a determinado nivel de los mecanismos de señalamiento se denominan *analgésicos* según la palabra griega que significa “sin dolor”. El tipo de analgésico empleado depende del origen, gravedad e intensidad del dolor. Los analgésicos potentes que actúan sobre la percepción del dolor en el sistema nervioso central se usan principalmente para aliviar el dolor proveniente de vísceras o de lesiones graves, quemaduras o neoplasias; el prototipo de esta clase de compuestos es la *morfina*. Para el dolor músculo esquelético se utilizan analgésicos más débiles, que actúan principalmente por mecanismos periféricos; el prototipo de esta clase de compuestos es la *aspirina*. Además de su acción aliviando el dolor, muchos de los analgésicos más débiles, también disminuyen la temperatura corporal cuando hay fiebre (acción antipirética) y poseen cierta actividad antiinflamatoria. Una tercera clase importante de fármacos que alivian el dolor son los anestésicos locales cuyo prototipo es la *cocaína*. Los anestésicos locales interrumpen la transmisión de impulsos en todas las fibras nerviosas aplicadas localmente a nivel de un tronco nervioso.

La morfina y muchos fármacos de su tipo, tienen el grave inconveniente de originar dependencia. Estos productos suelen llamarse analgésicos narcóticos u opiáceos, el término narcótico proviene del griego y significa “somnolencia” o “estupor”. Los analgésicos de tipo morfina ejercen acción depresora sobre el sistema nervioso central. La aspirina y los analgésicos similares suelen llamarse analgésicos no narcóticos pues no producen sueño ni crean dependencia grave<sup>26</sup>.

### **2.1.2. Reacción inflamatoria**

En ocasiones el dolor es producto de una inflamación. La inflamación es una reacción defensiva contra toda lesión. Los medios y los sistemas que provocan inflamación incluyen traumatismo mecánico (especialmente aplastamiento), radiación (térmica, UV, radiactiva), lesión química directa (productos químicos, cáusticos o corrosivos), lesión secundaria química o bioquímica (inhibidores metabólicos, anoxia), organismos invasores (virus, bacterias, parásitos) y finalmente reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Las reacciones inflamatorias se dividen en dos tipos: agudas y crónicas<sup>26</sup>.

#### **◆ Inflamación aguda**

Los signos clásicos de una reacción inflamatoria aguda son los siguientes: calor, rubor, dolor, tumor y pérdida de función.

Inmediatamente después de la lesión inicial recibida por el tejido puede haber una vasoconstricción pasajera, pero va seguida de una respuesta de vasodilatación local, con el incremento del riego sanguíneo. En tejidos superficiales esto origina enrojecimiento (rubor) y aumento de temperatura. Los mediadores de la dilatación incluyen principalmente a la histamina, las cininas y las prostaglandinas. La lesión de las células cebadas en el tejido libera histamina (y serotonina en algunas especies). En la piel humana la reacción inflamatoria inmediata es de tipo rubor-inflamación-pápula que incluye reflejo axónico. En esta etapa la reacción se suprime o disminuye con antihistamínicos que impiden la dilatación en las primeras etapas de la reacción inflamatoria pero su eficacia va disminuyendo cuando la reacción se ha completado; esto puede depender del decremento del pH en tejidos inflamados. Cuando la reacción se desarrolla, particularmente después de un estímulo inflamatorio intenso, entran en juego otros mediadores fuera de la histamina, que conservan la vasodilatación. A

medida que la respuesta inflamatoria progresa tiene lugar un cierto número de cambios. El endotelio vascular se hincha y aumenta su permeabilidad: la pérdida de líquido plasmático aumenta la viscosidad de la sangre por lo que las plaquetas y leucocitos tienden a fijarse a la pared endotelial alterada. Los eritrocitos se acumulan formando pilas que también incrementan la viscosidad. Las plaquetas se reúnen y pueden iniciar la coagulación local; liberan serotonina y compuestos adenílicos que aumentan su efecto sobre la reacción vascular. Puede depositarse fibrina en los cúmulos plaquetarios y el vaso sanguíneo llega a obstruirse por un trombo. La activación de los factores que intervienen en la coagulación facilita la formación de cininas. En la piel, el desarrollo de la respuesta vascular y el dolor, ocurren al mismo tiempo dando lugar al término eritralgia. La hinchazón proporciona otro estímulo para las terminaciones nerviosas sensitivas y contribuye al dolor. Las prostaglandinas disminuyen el umbral de las terminaciones sensoriales para sustancias que originan dolor. El umbral de dolor en una zona inflamada está disminuido; esto es, existe hiperalgesia. El dolor empeora con el movimiento de la región inflamada y ésta es la causa principal de la pérdida de función<sup>26</sup>.

#### ◆ Inflamación crónica

Si el estímulo inicial de una reacción inflamatoria no se elimina, persiste un estado constante de inflamación. Esta es una situación que tiene lugar en trastornos como la silicosis, la tuberculosis, las enfermedades de la colágena y en particular en trastornos autoinmunes.

De manera característica, hay una abundancia de: tejido granulomatoso exudado, monocitos con muchas células gigantes multinucleares formadas por su fusión, linfocitos y acumulación de células plasmáticas. La invasión de tejido conectivo origina la formación de mucho tejido fibroso. Puede haber hiperplasia del tejido parenquimatoso vecino si el tejido que contiene el foco inflamatorio crónico tiene la capacidad de autorregulación.

Los elementos tisulares que son atacados pueden generar anticuerpos autoinmunes, o bien una respuesta autoinmune mediada por células y las reacciones con los componentes autogénicos de los tejidos aumentan el estímulo inflamatorio. Pueden producirse cambios del cuadro sanguíneo a consecuencia de la reacción inflamatoria crónica: habrá anemia al presentarse pérdida de sangre, linfocitosis (por estímulo inmune), leucopenia (por utilización de los leucocitos) o más generalmente leucocitosis (por los estímulos a la producción de leucocitos) con neutrofilia y eosinofilia. El aumento de la proporción globulina/albúmina (por incremento

de la producción de globulina y pérdida de albúmina en el exudado inflamatorio) produce el aumento de la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos<sup>26</sup>.

### **2.1.3. Modelos experimentales de inflamación**

Para estudiar el dolor se pueden producir respuestas inflamatorias agudas inyectando en animales de laboratorio sustancias como: solución de formaldehído (formalina), clara de huevo, levadura, dextrán o musgo de Irlanda. El efecto puede evaluarse por: la extravasación del colorante marcador unido a la proteína, el aumento de volumen producido por el edema (por ejemplo en el extremo de la pata de una rata), el aumento local de temperatura cutánea o la formación de exudado celular (en las cavidades pleural y peritoneal o por examen histológico en tejidos sólidos). El eritema producido con rayos ultravioleta proporciona un buen modelo de respuesta inflamatoria ligera. Es posible causar reacciones inflamatorias crónicas implantando pequeñas bolitas de algodón debajo de la piel, estas pueden extraerse más tarde y pesarse para determinar la intensidad de la granulación. La inyección de aceite de trementina causa una reacción inflamatoria de larga duración. También puede darse en una bolsa subcutánea, producida inyectando aire debajo de la piel, donde se origina una reacción granulomatosa.

Pueden desarrollarse modelos de trastornos inflamatorios que se parecen mucho a la enfermedad inflamatoria crónica en el hombre con varias reacciones de hipersensibilidad inmunológica como la reacción de Arthus. Un proceso similar a la gota puede lograrse inyectando cristales de ácido úrico en el líquido sinovial de las articulaciones. Los modelos experimentales de inflamación permiten estimar la potencia de compuestos antiinflamatorios para empleo en el hombre y brindan una buena capacidad predictiva siempre que las concentraciones plasmáticas no sean demasiado desiguales por diferencias del ritmo metabólico entre el hombre y la especie animal utilizada para la prueba<sup>26</sup>.

Los modelos farmacodinámicos para experimentar nocicepción e inflamación en la mayoría de los casos son subjetivos y con alta variabilidad. En 1993 se publicó un nuevo modelo para evaluar analgesia: el modelo PIFIR<sup>22</sup>. En este modelo, a los animales utilizados se les provoca una inflamación aguda parecida al cuadro clínico de la gota. Entre las ventajas que este

procedimiento presenta sobre otros protocolos que han tratado de medir el dolor es que las respuestas son reproducibles y con variabilidad menor respecto a la presentada en otros modelos farmacológicos. Se pueden evaluar fármacos solos o combinados como, por ejemplo, dipirona con morfina<sup>24,27</sup> lo que da un amplio espectro de posibilidades que bajo ciertas circunstancias podrían aplicarse directamente en la clínica. En el modelo PIFIR se ha evaluado además, el IBU<sup>28</sup> y la potenciación que ejerce la CAF en el efecto antinociceptivo de aspirina<sup>19</sup>, tolmetina<sup>21</sup> y ketoprofeno<sup>29</sup>. La evaluación del dolor en el modelo PIFIR, paralelo al muestreo sanguíneo en las ratas, es un método útil para determinar la relación farmacocinética-farmacodinámica y es, en especial, una herramienta para caracterizar las interacciones entre fármacos<sup>30</sup>. Con esta ventaja se ha caracterizado la relación concentración-efecto de paracetamol<sup>31</sup>, ketorolaco<sup>32</sup>, diclofenaco<sup>33</sup>; y paracetamol<sup>34</sup> y naproxeno<sup>35</sup> combinados con CAF. Los resultados presentados por Granados Soto y col.<sup>31,34</sup> señalaron que el modelo que mejor describió el comportamiento de los datos de paracetamol fue el modelo  $E_{max}$  sigmoidal.

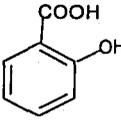
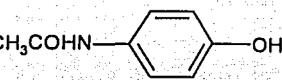
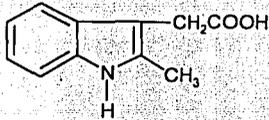
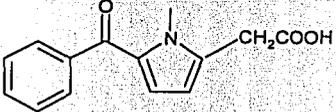
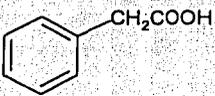
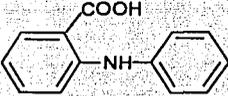
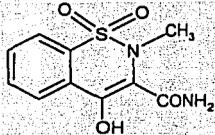
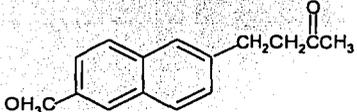
## 2.2. AAINES

### 2.2.1. Clasificación

Los AAINES son una clase de compuestos que presentan tres actividades terapéuticas: analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Químicamente estos fármacos pertenecen a diferentes familias estructurales que no se relacionan entre sí<sup>36</sup>. **Tabla 1.** Frecuentemente son utilizados en el tratamiento del dolor de tipo inflamatorio, en enfermedades músculo esqueléticas y en dolor postoperatorio. Estos analgésicos, aunque pueden generar algunos efectos adversos son muy “seguros” y se usan sin prescripción médica en diferentes lugares del mundo.

Este tipo de fármacos presentan diferente eficiencia con respecto a sus actividades terapéuticas. Se ha observado que algunos de ellos son más eficaces como analgésicos que como antiinflamatorios o viceversa<sup>37</sup>. El hecho sugiere que los efectos analgésicos y antiinflamatorios pueden ser el reflejo de un mecanismo no común. Diversas observaciones

Tabla 1. Estructura química de los precursores de cada familia de AAINES.

PRECURSOR	ESTRUCTURA QUÍMICA	DERIVADOS
Ácido salicílico		Aspirina Salicilato sódico Diflunisal Sulfasalazina Olsalazina
Para-aminofenol	$\text{CH}_3\text{COHN}$ 	Acetaminofén
Indol		Indometacina Sulindac Etodolac
Ácido acético heteroarílico		Tolmetina Diclofenaco Ketorolaco
Ácido arilpropiónico		Ibuprofeno Naproxeno Flurbiprofeno Ketoprofeno Fenoprofeno Oxaprozin
Ácido antranílico		Ácido mefenámico Ácido meclofenámico
Ácido enólico		Piroxicam Tenoxicam Fenilbutazona Oxyfentetrazona
Alcanonas		Nabumetona

TESIS CON  
FALLA DE CARGEN

han llevado a especular que el efecto terapéutico de los AAINes no depende exclusivamente de su efecto antiinflamatorio, sino que estos dos efectos están disociados<sup>38</sup>.

### **2.2.2. AAINes y CAF**

La CAF se ha combinado con AAINes desde inicios del siglo pasado. Las bases reales para realizar esta combinación se desconocen ya que no es sino hasta la década de los años 1980s cuando se acepta formalmente que la CAF puede mejorar el efecto terapéutico de estos compuestos. En 1984, Laska y col.<sup>8</sup> dieron a conocer una serie de estudios clínicos, algunos publicados y otros no, en los que se administró: aspirina+CAF, acetaminofén+CAF o aspirina+acetaminofén+CAF. Estos autores reportaron que el efecto de los analgésicos mejoró cuando se administraron con CAF. Los efectos con dichas combinaciones fueron aproximadamente 1.4 veces más altos comparados con aquellos que se observaron cuando se administró el analgésico solo. Desde entonces nació un interés por las combinaciones de AAINes+CAF.

### **2.2.3. El papel de la CAF en la antinocicepción**

Se ha reportado que la CAF por sí misma ha sido capaz de producir efecto antinociceptivo en algunos modelos animales de dolor<sup>39-42</sup>, pero este resultado se presentó con dosis considerablemente más altas (mayores a 50 mg/kg) que las necesarias para potenciar el efecto antinociceptivo de los AAINes. Por el contrario, en el modelo PIFIR, la CAF sola no modificó el efecto nociceptivo provocado<sup>18,19,21</sup>. Una explicación a estos resultados controvertidos puede ser que los efectos de la CAF varíen con las condiciones experimentales e intensidades de dolor. Los efectos observados en otros modelos experimentales pueden ser falsos positivos, ya que dosis elevadas de CAF provocan una actividad importante en el sistema nervioso central generando un aumento en la actividad espontánea de las ratas, lo que puede ser confundido fácilmente en algunos modelos como una respuesta antinociceptiva. En el modelo experimental PIFIR, la evaluación del efecto nociceptivo es realizada por un sistema computacional que evita la generación de un falso positivo, de esta forma ha logrado detectar que dosis elevadas de CAF no producen realmente un efecto antinociceptivo en este modelo y sí una alteración importante de la conducta animal.

En el humano, se ha observado que la CAF ha sido efectiva contra el dolor de cabeza, pero la respuesta analgésica no puede ser interpretada fácilmente porque este tipo de dolor es

producto de mecanismos que no pueden ser evaluados con los modelos clásicos de dolor<sup>20,43,44</sup>. Tampoco hay evidencia que la CAF en sí sea capaz de producir antinocicepción en el humano.

Actualmente, la utilidad de la CAF como adjuvante analgésico esta bien establecida<sup>8</sup>. En modelos experimentales de dolor que utilizan animales, se han probado combinaciones de CAF con: ketorolaco<sup>45</sup>, tolmetina<sup>21</sup>, aspirina<sup>19</sup> y ketoprofeno<sup>29</sup>. En la práctica clínica, se ha probado la efectividad de mezclas de CAF con: aspirina<sup>12,17</sup>, acetaminofén<sup>14</sup> e IBU<sup>46,47</sup>, entre otros trabajos. Lo que muestra una fuerte evidencia de que la CAF potencia el efecto antinociceptivo de los AAINes.

#### **2.2.4. Mecanismos participantes en la potenciación observada con las combinaciones de AAINes y CAF**

Recientemente se han discutido dos tipos de mecanismos que pueden influir en la potenciación del efecto antinociceptivo que la CAF presenta al combinarse con este tipo de fármacos: Mecanismos farmacocinéticos y mecanismos farmacodinámicos<sup>48</sup>.

##### **2.2.4.1. Mecanismos farmacocinéticos**

Existen reportes donde mencionan que la CAF fue capaz de modificar la acidez gástrica (disminuyó el pH) así como los flujos gástrico y hepático<sup>49,50</sup>. Por lo que se ha sugerido que la CAF aumenta la biodisponibilidad de los AAINes por incrementar su absorción (dado que son ácidos débiles) o retardar su eliminación (por la reducción del flujo sanguíneo hepático). Hay referencias donde mencionan que, en efecto, la CAF sí incrementó las concentraciones plasmáticas de, por ejemplo, aspirina<sup>51,52</sup> y acetaminofén en ratas<sup>16</sup> y en humanos<sup>17</sup>. Sin embargo, también hay reportes donde indican que la CAF redujo las concentraciones plasmáticas de acetaminofén<sup>53</sup> y aspirina<sup>54</sup> en ratas. Los resultados parecen contradictorios pero dependen de los modelos y condiciones experimentales utilizadas.

Por otro lado, diferentes investigadores indican que aunque la CAF fue capaz de incrementar el efecto antinociceptivo de una gran variedad de AAINes, no existió una modificación significativa de la farmacocinética de estos compuestos<sup>18-21</sup>.

Otra posibilidad que puede explicar la amplificación del efecto antinociceptivo radica en el incremento de la biodisponibilidad de la CAF producida con la coadministración de AAINes, dado que la CAF presentó efecto antinociceptivo intrínseco en los modelos de plancha caliente y Randall-Zellito<sup>40,53</sup>. La biodisponibilidad de la CAF ha sido estudiada después de administrarla con este tipo de compuestos en la combinación de dosis que se sabe produce potenciación de la respuesta antinociceptiva y, en todos los casos, la biodisponibilidad de la CAF no se modificó significativamente<sup>20,55</sup>.

Finalmente, los datos disponibles sugieren que la potenciación del efecto antinociceptivo de los AAINes por la CAF no se debe a una interacción farmacocinética, por lo que es probable que la amplificación del efecto analgésico sea producto de un mecanismo de acción farmacodinámico.

#### **2.2.4.2. Mecanismos farmacodinámicos**

La CAF es un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina y en algunos sistemas fisiológicos bloquea los receptores  $A_1$  y  $A_2$ <sup>56</sup>. Hay evidencia de que la adenosina toma parte en la iniciación o amplificación de la información nociceptiva en la periferia<sup>57</sup>, por lo que se sugirió que el incremento en la antinocicepción de los AAINes se debe a un bloqueo de la adenosina. Sin embargo, resultados recientes mostraron que la adenosina no posee ninguna habilidad pronociceptiva por sí misma. Contrariamente a lo esperado, la adenosina fue capaz de facilitar el efecto antinociceptivo del ketorolaco por activación de los receptores  $A_1$  de adenosina, probablemente a nivel central<sup>18</sup>. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Malmberg & Yaksh<sup>58</sup> quienes observaron un sinergismo aditivo con las combinaciones de ketorolaco y L-PIA (L-fenil-isopropil-adenosina) un agonista del receptor  $A_1$  de adenosina.

Evidencias experimentales sugieren que un efecto periférico de la CAF, que también involucra un incremento en el GMPc local, participa en la potenciación del efecto antinociceptivo. Se reportó que la administración local de L-NAME, un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, fue capaz de bloquear la potenciación mostrada por la CAF al combinarse con ketorolaco<sup>45</sup>. Estos resultados sugieren la participación de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc en la antinocicepción.

Otro estudio mostró que la administración local de 8-Br-GMPc en la administración de la combinación ketorolaco y CAF incrementó el efecto antinociceptivo obtenido con la combinación, sin embargo, el compuesto 8-Br-GMPc no potenció el efecto antinociceptivo del ketorolaco solo ni produjo efecto antinociceptivo por sí mismo<sup>18</sup>. Estos últimos resultados pueden explicarse por una rápida degradación del nucleótido. La CAF es un inhibidor no específico de las fosfodiesterasas<sup>59</sup>, así que la administración de 8-Br-GMPc fue efectiva en presencia de CAF porque su degradación fue prevenida. Estos estudios apoyan la teoría de que la CAF activa la vía periférica óxido nítrico-GMPc ya sea de manera directa o indirecta<sup>60</sup>.

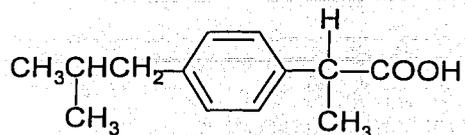
La inducción de la antinocicepción presentada por la CAF depende de la activación colinérgica ya que se ha reportado que esta es antagonizada por los antagonistas muscarínicos atropina y pirenzepina<sup>39</sup>. La activación de vías centrales serotoninérgicas y noradrenérgicas (pero no dopaminérgicas) juegan un papel importante en el efecto antinociceptivo<sup>42,57</sup>. Otros mecanismos de acción propuestos son la estimulación del sistema nervioso central, la movilización intracelular del calcio<sup>61</sup> y las uniones a receptores de benzodiazepinas<sup>62</sup>. Sin embargo, algunos de estos mecanismos son activados a dosis de CAF más altas que las utilizadas como adjuvante.

En resumen, la CAF incrementa la actividad antinociceptiva de los AAINes por múltiples mecanismos farmacodinámicos, probablemente algunos de ellos no descubiertos aún, por lo que es necesario realizar más investigación al respecto.

### 2.3. Monografías de los fármacos en estudio

El IBU es un fármaco analgésico-antiinflamatorio no esteroide derivado del ácido arilpropiónico. Químicamente y clínicamente está relacionado con el ketoprofeno, el naproxeno y el flurbiprofeno. La CAF es un alcaloide perteneciente al grupo de las metilxantinas. Otros compuestos de este grupo son la teofilina y la teobromina. A continuación se menciona información más detallada sobre el IBU y la CAF.

### 2.3.1. Ibuprofeno



Fórmula molecular:  $C_{13}H_{18}O_2$

Peso molecular: 206.3

#### 2.3.1.1. Propiedades físicas

Polvo o cristales blancos con un olor característico. Punto de fusión 75-77°C. Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 1.5 de alcohol, 1 en 1 de cloroformo, 1 en 2 de éter y 1 en 1.5 de acetona; soluble en soluciones alcalinas acuosas y en carbonatos. Tiene un valor aparente de pKa de 4.4<sup>63</sup>.

#### 2.3.1.2. Farmacocinética y metabolismo

El IBU se absorbe con rapidez en el tracto gastrointestinal y las concentraciones plasmáticas máximas ocurren de 1 a 2 h después de su ingestión. La vida media plasmática es de alrededor de 2 h. El IBU se une en forma extensa (99%) a las proteínas plasmáticas, pero sólo ocupa una fracción de todos los lugares de unión con fármacos en las concentraciones habituales. Pasa con lentitud a los espacios sinoviales y puede permanecer allí en concentraciones mayores cuando las concentraciones plasmáticas disminuyen. En los animales de experimentación el IBU y sus metabolitos atraviesan la barrera placentaria con facilidad. La excreción es rápida y completa. Más del 90% de una dosis ingerida se excreta por la orina como metabolitos o sus conjugados. Cerca del 1% es excretado en orina de manera inalterada. Los metabolitos principales son un compuesto hidroxilado y uno carboxilado<sup>64</sup>.

#### 2.3.1.3. Vías de administración y dosis

Para la artritis reumatoide y la osteoartritis es posible administrar hasta 3.2 g de IBU al día por vía oral en dosis divididas, aunque la dosis habitual es de 1.2 a 1.8 g. También puede ser posible reducir la dosis con fines de mantenimiento. Para el dolor leve a moderado, en especial el de la dismenorrea primaria, la dosis habitual es de 400 mg cada 4 a 6 h según sea necesario.

TEXTO CON  
FALLA DE ORIGEN

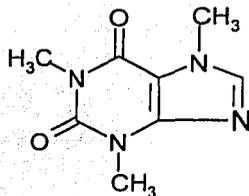
Puede ingerirse con leche o alimentos para minimizar los efectos colaterales gastrointestinales. La seguridad y eficacia del IBU en niños no se ha establecido del todo. También se puede aplicar tópicamente como crema o gel al 5%.

El IBU usualmente se administra como base pero también se utilizan varias sales, ésteres u otros complejos, estos incluyen aluminio, lisina y sales de sodio o guayacol y ésteres de piridoxina. Algunas de las afecciones en donde ha probado su eficacia es en dolor por dismenorrea<sup>65-67</sup>, dolor de cabeza<sup>68,69</sup> y procedimientos dentales<sup>70-72</sup>. También puede reducir los requerimientos de opioides en una cirugía mayor<sup>73</sup> y en pacientes con dolor producido por cáncer<sup>74</sup>.

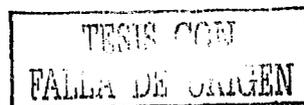
#### 2.3.1.4. Efectos tóxicos

El IBU se ha utilizado en pacientes con ulceración péptica conocida o antecedentes de intolerancia gástrica a otros agentes tipo aspirina. A pesar de ello, suele ser necesario suspender el tratamiento en un 10 a 15% de los pacientes debido a intolerancia al compuesto. De los pacientes que toman IBU un 5 a 15% experimentan efectos colaterales gastrointestinales; los más comunes son epigastralgia, náuseas, pirosis, y sensación de "plenitud" en el tracto gastrointestinal. No obstante, la incidencia de estas acciones colaterales es menor que la ocasionada por la aspirina o la indometacina. Es infrecuente la pérdida oculta de sangre. Se han informado otras acciones colaterales con menor frecuencia que incluyen trombocitopenia, erupciones cutáneas, cefalea, mareos y visión borrosa; en unos pocos casos se presentó ambliopía tóxica, retención de líquido y edema. Los pacientes que desarrollan alteraciones oculares deben de suspender el tratamiento. El IBU no se recomienda en las mujeres embarazadas ni en las que están amamantando<sup>36</sup>.

#### 2.3.2. Cafeína



Fórmula molecular:  $C_8H_{10}N_4O_2$



Peso molecular: 194.2

### 2.3.2.1. Propiedades físicas

Cristales blancos inodoros, sublima fácilmente. Su solubilidad es de 1 en 60 de agua, fácilmente soluble en agua hirviendo y en cloroformo, ligeramente soluble en alcohol y en éter. Se disuelve en soluciones concentradas de benzoatos alcalinos o salicilatos. Es un alcaloide obtenido del té de las hojas secas de *Camellia sinensis*. También se prepara sintéticamente. El punto de fusión está entre los 234-239°C. Cuando se cristaliza en agua, la CAF contiene una molécula de agua de cristalización pero cuando se cristaliza en etanol, cloroformo o éter, es anhidra. Se descompone en soluciones de bases fuertes<sup>75</sup>.

La CAF (trimetilxantina) es un estimulante general de todo el sistema nervioso central. Tiene un efecto antagonista en los receptores centrales de la adenosina. Puede estimular el centro respiratorio incrementando la velocidad y la profundidad de la respiración por lo que en ocasiones se utiliza para tratar la apnea en neonatos. La CAF facilita el desempeño del trabajo muscular. Su acción diurética es más débil que la que presenta la teofilina. En dosis usuales, la CAF actúa principalmente sobre la corteza cerebral, aumentando el estado de alerta y disminuyendo la sensación de fatiga. Posee ligera acción dilatadora sobre arteriolas pero estimula el centro vasomotor del bulbo y el efecto neto sobre la presión arterial resulta muy poco afectado. Se consume principalmente formando parte del té, el café y otras bebidas<sup>26</sup>. Una taza común de café contiene de 85 a 150 mg de CAF<sup>9</sup>, esta bebida se consume por gran parte de la población mundial.

### 2.3.2.2. Farmacocinética y metabolismo

La CAF se absorbe fácilmente después de su administración oral y es ampliamente distribuida a través del cuerpo. Tiene un pKa de 14 y un coeficiente de partición de 0.85. Las concentraciones plasmáticas máximas son observadas aproximadamente de 30 a 60 min después de la administración oral y pueden oscilar de 15 a 120 min por las variaciones en el vaciamiento gástrico<sup>9</sup>.

La CAF se absorbe a través de la piel. La absorción después de la administración rectal de un supositorio puede ser lenta y errática y la absorción después de una inyección intramuscular

puede ser más lenta que la absorción oral. La CAF pasa fácilmente al sistema nervioso central y a la saliva. Se presenta en bajas concentraciones en la leche materna y también cruza la barrera placentaria<sup>9</sup>.

En humanos, el volumen de distribución es de 0.5 a 0.7 L/kg lo que indica que la CAF es ampliamente distribuida y se encuentra principalmente en el agua intracelular. Existe poca evidencia de metabolismo por primer paso, mientras que en ratas, hay evidencia de lo contrario<sup>8</sup>. En adultos la CAF se metaboliza casi completamente vía oxidación, desmetilación y acetilación y se excreta en orina como ácido 1-metilúrico, 1-metilxantina, 7-metilxantina, 1,7-dimetilxantina (paraxantina), 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil y otros metabolitos con cerca de 1% inalterado. Los neonatos tiene una capacidad reducida de metabolizar la CAF y es ampliamente excretada en la orina de manera inalterada hasta que el metabolismo hepático comienza a desarrollarse significativamente, esto es cerca de los 6 meses de edad. En los adultos la vida media de eliminación es de 3-6 h. Estudios sistemáticos han demostrado que la vida media varía en las especies: ratón 0.7 h, rata 0.8 h, conejo 1.6 h y mono 3.2 h<sup>9</sup>.

El metabolismo de la CAF ha mostrado ser dosis dependiente. La depuración baja cuando la dosis se incrementa, lo que sugiere un metabolismo saturable. La vida media disminuye por el consumo de tabaco y por el ejercicio y aumenta por enfermedades hepáticas como la cirrosis y la hepatitis viral y también durante el embarazo. No varía en la edad adulta o por la obesidad. En humanos, la cinética ha sido reportada como lineal a intervalos de dosis en los que se ha trabajado (50 a 750 mg vía oral). En roedores, también ha sido reportada la cinética no lineal en dosis tan bajas como 10 mg/kg<sup>9</sup>.

### **2.3.2.3. Vías de administración y dosis**

La CAF se administra vía oral en dosis de 50 hasta 250 mg. Frecuentemente es incluida en preparaciones analgésicas con aspirina, paracetamol o codeína. El citrato de CAF se ha utilizado de manera similar. La CAF puede incrementar la absorción de ergotamina por lo que a veces se administra con ella para tratar la migraña. Algunos investigadores han reportado que la CAF ofrece pocos beneficios para el tratamiento del dolor<sup>76</sup>.

Para otros, la inclusión de CAF en mezclas con analgésicos-antipiréticos está poco justificada. La CAF contenida en una dosis recomendada probablemente sea demasiado pequeña para que ejerza acción apreciable sobre la mayoría de los adultos que ya han adquirido cierta tolerancia a la CAF por el consumo del café y del té. En un tiempo se admitió que la CAF facilitaba la absorción de analgésicos y antipiréticos, pero el hecho no se ha demostrado. Estas mezclas pueden obtenerse sin receta y mucha gente las consume pensando que son panaceas para cualquier malestar general. Cuando, como ocurre frecuentemente, se toma una dosis mayor que la recomendada con té o café, la dosis combinada de CAF puede ejercer una acción estimulante importante y esto quizá sea un factor para el abuso de los analgésicos. En general, la opinión de los especialistas está en contra del empleo de combinaciones fijas de fármacos en tabletas. Si, por ejemplo, es necesario un tratamiento combinado de aspirina y codeína, es fácil preparar una mezcla extemporánea de estos productos<sup>26</sup>. Por el contrario, otros investigadores han demostrado que el uso adyuvante de CAF puede incrementar la actividad analgésica en ciertos malestares mediante una combinación adecuada<sup>8,9,28,29,69</sup>.

#### 2.3.2.4. Efectos tóxicos

En dosis de 300-600 mg la CAF produce insomnio, inquietud, ansiedad, confusión, palpitaciones, temblor fino, vértigo, trastornos de visión, audición y cefalea. En personas que no suelen tomar bebidas que contienen CAF estos efectos son más notables y se presentan con dosis más bajas que en los que las acostumbran. Las dosis de CAF que ponen en peligro la vida deben estimarse a partir de estudios de toxicidad en animales, ya que se disponen de muy pocos datos en el hombre. Al parecer son cercanas a 100 mg/kg y muy superiores a las que podrían ingerirse con bebidas que contienen CAF. En pruebas *in vitro* la CAF ha probado ser mutágena y en pruebas con animales ha demostrado acción teratógena. Su uso tan amplio no sugiere peligro de este tipo excepto cuando el abuso es considerable<sup>26</sup>.

### 2.4. Modelaje farmacocinético-farmacodinámico

#### 2.4.1. Conceptos

La *farmacocinética* estudia el curso temporal del fármaco administrado con la consecuente absorción, distribución a tejidos corporales, metabolismo y finalmente eliminación.

Usualmente se determinan concentraciones en plasma o suero en función del tiempo para caracterizar estos procesos<sup>77</sup>.

La *farmacodinamia* estudia la relación entre la concentración del fármaco en el sitio de acción y sus efectos resultantes en el organismo<sup>77</sup>.

A menudo no es posible medir la concentración del fármaco en el sitio receptor, por lo que el análisis farmacodinámico requiere asumir que la concentración del fármaco en sangre o en algún otro fluido biológico extraíble está relacionada a la concentración en el sitio receptor. De esta manera se obtiene una gran comprensión de la relación entre la dosis administrada y la magnitud del efecto farmacológico resultante al combinar ambos tipos de datos en modelos matemáticos.

Antes de elegir el modelo más apropiado deben visualizarse las gráficas de efecto contra tiempo de cada sujeto para obtener información preliminar de la relación dosis-respuesta, del curso temporal del efecto después de administrar diferentes dosis del compuesto a evaluar y del desarrollo del sistema en ausencia del fármaco (por ejemplo, después de la administración de un placebo). Tales gráficas pueden revelar características importantes de la relación concentración-efecto como: linealidad, efecto máximo alcanzado, desarrollo de tolerancia, un "lag" entre el pico máximo de la concentración y el pico máximo del efecto y el grado de variabilidad inter-individual en la respuesta. Una vez que se han examinado los datos y tomado algunas decisiones preliminares se puede seleccionar un modelo matemático para explicar la relación concentración-efecto. A continuación se describen brevemente los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos más utilizados<sup>77</sup>.

#### 2.4.2. Modelo lineal

Este modelo se ha utilizado para describir la relación entre la concentración del fármaco y un intervalo de efecto farmacológico para algunos fármacos seleccionados. El modelo toma la forma de la ecuación para una línea recta:

$$E = SC + E_0 \quad [1]$$

donde:

$E$  = intensidad del efecto

$C$  = concentración del fármaco

$S$  = pendiente de la línea

$E_0$  = valor del efecto cuando no hay fármaco presente

Los parámetros para este modelo pueden ser obtenidos por regresión lineal simple. Este modelo es útil porque predice que no hay efecto en ausencia de fármaco, sin embargo, no es capaz de predecir un efecto máximo en fármacos que estimulan una respuesta fisiológica. Otra deficiencia del modelo es que para muchos fármacos la relación entre la concentración y el efecto es lineal sólo en un intervalo medio de concentración de fármaco por lo que a concentraciones bajas o altas el modelo lineal puede predecir inexactamente efectos farmacológicos.

#### 2.4.3. Modelo log-lineal

El modelo log-lineal es una adaptación del modelo lineal:

$$E = S \log C + I \quad [2]$$

donde:

$I$  = constante empírica (no tiene significado fisiológico real)

Al usar el logaritmo de la concentración del fármaco ( $\log C$ ) se estrecha o comprime el eje de las abscisas y hace que el intervalo medio de la curva concentración-efecto sea aproximadamente lineal, por lo que la utilidad más grande de este modelo es la capacidad de predecir el efecto farmacológico entre aproximadamente el 20-80% de la respuesta máxima. Sin embargo, el modelo no tiene la capacidad de predecir un efecto cuando la concentración de fármaco es cero. Tampoco puede predecir un efecto máximo, por lo que, el modelo log-lineal al igual que el modelo lineal no son aptos para un análisis farmacodinámico completo.

#### 2.4.4. Modelo $E_{\max}$

Es el modelo más simple que puede describir adecuadamente la relación concentración-efecto sobre un amplio intervalo de concentración de fármaco:

$$E = \frac{E_{\max} C}{CE_{50} + C} \quad [3]$$

donde:

$E$  = efecto alcanzado por la concentración  $C$

$E_{\max}$  = respuesta máxima posible que puede ser atribuida al fármaco

$CE_{50}$  = concentración que produce el 50% del efecto máximo

Este modelo es útil en situaciones donde el efecto se incrementa cuando aumenta la concentración del fármaco y también predice que cuando la concentración del fármaco es cero no habrá efecto. El modelo  $E_{\max}$  es consistente con lo que a menudo se observa clínicamente: pequeños incrementos en la concentración del fármaco son necesarios para observar grandes incrementos en el efecto hasta alcanzar una asíntota o un punto en el que ya no hay aumento de efecto aunque aumente la concentración de fármaco.

#### 2.4.5. Modelo $E_{\max}$ sigmoidal

El modelo  $E_{\max}$  sigmoidal puede ser usado cuando por simple inspección visual la gráfica de concentración-efecto revela un patrón de respuesta en forma de "S":

$$E = \frac{E_{\max} C^n}{CE_{50}^n + C^n} \quad [4]$$

donde:

$n$  = coeficiente de Hill, constante que describe la pendiente de la curva. Cuando  $n = 1$  el modelo es idéntico al modelo  $E_{\max}$ . Se han hecho algunas propuestas para darle al valor de  $n$  un significado fisiológico en términos de la teoría del receptor pero esto no ha sido del todo probado. Al incorporarse el valor de  $n$  puede, en algunos, casos mejorar substancialmente el ajuste de los datos a este modelo.

#### 2.4.6. Modelo $E_{\max}$ inhibitorio

Como una alternativa para los fármacos inhibitorios se puede usar el modelo  $E_{\max}$  inhibitorio. En este modelo el efecto es sustraído de la respuesta cuando no hay fármaco presente:

$$E = E_0 - \frac{E_{\max} C}{CI_{50} + C} \quad [5]$$

donde:

$E_0$  = efecto observado cuando no hay fármaco presente

$E_{\max}$  = reducción máxima de respuesta debido al fármaco y

$CI_{50}$  = concentración que produce el 50% de inhibición del  $E_{\max}$ .

En este modelo, la forma de la curva es inversa, la pendiente es negativa y el efecto fisiológico máximo es observado cuando la concentración del fármaco es cero. El modelo  $E_{\max}$  inhibitorio puede ser usado en tres diferentes formas: tomando a  $E_0$  como una constante, usando  $E_0$  para calcular el efecto y asumiendo  $E_{\max}$  igual a  $E_0$ . En estos casos la ecuación básica por sí misma permanece inalterada pero las suposiciones usadas en cada uso de la ecuación difieren y dependen en gran parte de la interpretación de la variabilidad observada durante el periodo en el que se administra el placebo.

Finalmente, basados en el examen preliminar de los datos y el hecho de que estas ecuaciones son empíricas por naturaleza, uno debe seleccionar dos o más modelos y comparar los resultados en cada análisis. Para facilitar el análisis de datos es necesario algún programa computacional de ajuste no lineal. La decisión para seleccionar un modelo sobre otro debe basarse en la predicción de parámetros estimados. En algunos casos el mejor modelo es aquel que presenta el valor más pequeño de suma de cuadrados residual, desviación estándar asintótica más pequeña y menores intervalos de confianza al 95% para los parámetros estimados. La comparación de los valores del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es usada especialmente cuando se escoge entre modelos que involucran diferentes magnitudes de números como se observa en el modelo inhibitorio y el modelo  $E_{\max}$  sigmoidal. La gráfica de residuales (que refleja la diferencia entre valores observados y valores estimados) contra, ya sea tiempo o concentración, debe resultar en una distribución aleatoria. La prueba de F y el criterio de Akaike también se han propuesto como herramientas estadísticas para decidir el modelo más adecuado. La decisión dependerá de muchos factores incluyendo: el fármaco utilizado, la respuesta a ser evaluada, el efecto observado después de la administración del fármaco y/o placebo, el grado de linealidad en la curva concentración-efecto y el potencial para alcanzar la máxima respuesta, entre otras cosas. Así que el elegir el modelo farmacocinético-farmacodinámico más adecuado para describir el comportamiento del fármaco debe hacerse por observación directa de los datos junto con procedimientos estadísticos apropiados<sup>77</sup>.

## CAPÍTULO III

### Sección experimental

---

#### 3.1. Estudio farmacodinámico

En esta parte se describe la forma de evaluar el efecto antinociceptivo del IBU y de la combinación IBU+CAF.

##### 3.1.1. Compuestos y reactivos biológicos

Los compuestos IBU, CAF y ácido úrico adquiridos de Sigma Chemical Company (St Louis MO) El IBU y la CAF se suspendieron en carboximetilcelulosa al 0.5%, el ácido úrico en aceite mineral. Los demás reactivos utilizados fueron grado reactivo analítico.

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho de 180 a 200 g de peso. Los procedimientos se ajustaron a las recomendaciones del Comité de Investigación de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor<sup>78</sup> y las Guías en Estándares Éticos para Investigaciones de Dolor Experimental en Animales<sup>79</sup>. Las ratas se colocaron en un cuarto especial para animales a temperatura constante de 22°C con ciclos alternos de 12 h de luz/oscuridad. Doce horas antes de los experimentos se les privó de alimento y tuvieron libre acceso al agua todo el tiempo.

##### 3.1.2. Evaluación de la actividad antinociceptiva

La intensidad y el efecto del analgésico se midió con el modelo PIFIR<sup>22</sup>.

En este modelo los animales recibieron -bajo los efectos de una ligera anestesia con éter- una inyección intraarticular de 0.05 mL de ácido úrico al 30% en la articulación derecha (rodilla) para inducir nocicepción, **Figura 1**.

Inmediatamente después se les adhirió a las patas traseras un electrodo, **Figura 2**.

Una vez que se recuperaron de la anestesia los animales se colocaron en un cilindro de acero inoxidable de 30 cm de diámetro, **Figura 3**.

El cilindro se rotó a 4 rpm. La variable medida fue el tiempo de contacto entre cada pata y el piso del cilindro. Cuando el electrodo colocado en la pata del animal hizo contacto con el piso del cilindro, se cerró un circuito y el tiempo en que el circuito permaneció cerrado se registró en una computadora. Los periodos de rotación fueron de dos minutos y se permitió descansar a la rata por 15 ó 30 min, **Figura 4.**

Después de la administración del ácido úrico las ratas desarrollaron una progresiva disfunción de la articulación, esto se registró como una disminución del tiempo de contacto entre la pata derecha y el cilindro. Los resultados se expresaron como índice de funcionalidad en porcentaje (IF %) que se calculó dividiendo el tiempo de contacto de la pata derecha administrada con ácido úrico entre el tiempo de contacto de la pata izquierda control y el resultado multiplicado por 100.

Aproximadamente después de 2 a 2.5 h de administrado el ácido úrico el índice de funcionalidad fue cero. En este momento los animales recibieron una dosis oral del o los compuestos a utilizar suspendidos en el vehículo adecuado y los registros se llevaron a cabo durante las 4 h siguientes. El recobro del índice de funcionalidad fue considerado como una expresión del efecto analgésico del fármaco o de la combinación de compuestos administrados, **Figura 5.**

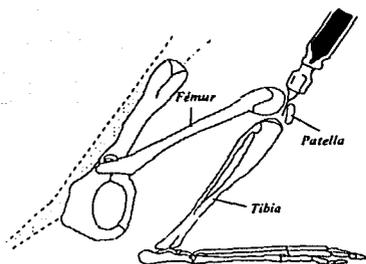


Figura 1. Administración del ácido úrico.



Figura 2. Colocación de los electrodos.

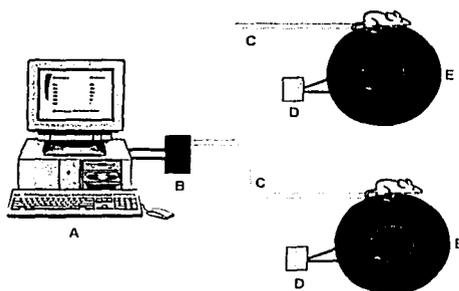
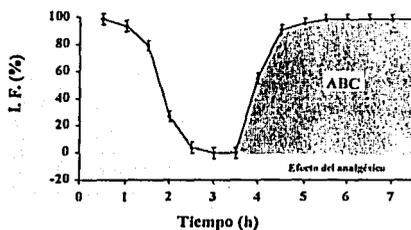


Figura 3. Registro del índice de funcionalidad.  
A. Computadora, B. Interfase, C. Electrodos,  
D. Motor y E. Tambor



Figura 4. Cilindro de acero inoxidable.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. IF antes y después de la administración del analgésico.

### 3.1.3. Estudio farmacodinámico preliminar

El protocolo experimental consistió en grupos de ratas a las que se les administró IBU o la combinación IBU+CAF por vía oral. Las dosis utilizadas de IBU fueron: 5.6, 10.0, 17.8, 31.6, 56.2 y 100.0 mg/kg. Las dosis de CAF fueron: 10.0, 17.8 y 31.6 mg/kg. Estos valores se eligieron con incrementos de 0.25 unidades en escala logarítmica. Se administraron dosis combinadas de IBU+CAF para analizar las posibles interacciones sinérgicas (18 combinaciones en total).

Los tiempos de muestreo farmacodinámico se realizaron a: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 h después de la administración del o los compuestos. También se trabajaron grupos de animales control que sólo recibieron los vehículos correspondientes. En estudios previos en el modelo PIFIR se trabajó con la morfina (compuesto prototipo de los opioides), el ácido acetilsalicílico (analgésico prototipo de los compuestos no esteroides) y la CAF<sup>19,27</sup>. Los datos obtenidos en esos experimentos se utilizaron para ubicar la curva dosis respuesta del IBU. Al término de los experimentos las ratas se sacrificaron por dislocación cervical.

### 3.1.4. Manejo de datos y análisis estadístico

La antinocicepción se estimó como el recobro de la funcionalidad de la articulación o el aumento del IF. El efecto antinociceptivo acumulado durante el periodo completo del experimento se determinó como área bajo la curva del efecto ( $ABC_E$ ) para obtener la curva dosis-respuesta y analizar el efecto antinociceptivo del fármaco solo y combinado con CAF. Las ABC se calcularon por la regla trapezoidal<sup>80</sup>. El valor máximo de  $ABC_E$  (%h) que se puede alcanzar bajo estas condiciones experimentales es de 375 unidades de área. Si el  $ABC_E$  de la combinación IBU+CAF es mayor que la suma algebraica de las correspondientes  $ABC_E$  individuales de IBU y de CAF, el resultado se considera como potenciación. Si el  $ABC_E$  es similar a la suma de las  $ABC_E$  individuales el resultado se considera como efecto antinociceptivo aditivo.

Las curvas dosis-respuesta se ajustaron al modelo  $E_{max}$  sigmoideal mediante el programa de ajuste no lineal WinNonlin V2.0A. La interacción entre IBU y CAF se evaluó con un análisis de varianza de dos factores. Los valores observados de  $ABC_E$  de las combinaciones fueron

comparados con los valores del efecto antinociceptivo de IBU solo, usando la prueba *t* de Student.

### 3.2. Estudio farmacocinético

En esta parte se describe el procedimiento para determinar los niveles plasmáticos de IBU mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

#### 3.2.1 Estándares y reactivos

El IBU fue donado por Upjhon, México. El compuesto presentó 99% de pureza.

El ácido mefenámico, utilizado como estándar interno y la CAF se adquirieron de Sigma Chemical Company (St Louis MO).

El acetonitrilo y metanol grado cromatográfico y el ácido fosfórico al 86% grado reactivo analítico fueron adquiridos de J.T. Baker, Mallinckrodt Baker S.A. de C.V.

Se utilizó agua desionizada obtenida de un sistema Simplicity 185 Millipore.

#### 3.2.2 Material y equipo

Para la determinación analítica de IBU en plasma se utilizó el siguiente equipo:

Cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer Series 200 LC equipado con bomba binaria, inyector manual y detector de UV de longitud de onda variable modelo 785 (Programmable Absorbance Detector) Applied Biosystems. Loop de 20  $\mu$ L. La integración de los picos se realizó en la computadora con el programa PE Nelson-Turbochrom (Perkin Elmer, Norwalk CT).

Columna Symmetry C<sub>18</sub> (Waters) con tamaño de partícula de 3.5  $\mu$ m, medidas de 4.6  $\times$  75 mm y una precolumna Security Guard Phenomenex C<sub>18</sub> (ODS, octadecil) 4 mm L  $\times$  3.0 mm ID.

Baño de ultrasonido 3210 Branson (Branson Ultrasonic Corporation, Eagle Road, Danbury CT)

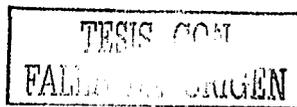
Centrífuga ECMicro-MB Centrifuge (International Equipment Company)

Balanza analítica Mettler AE163

Agitador vórtex Thermolyne Maxi Mix

Estufa EELISA

Micropipetas Pipetman, Wilson.



### 3.2.3. Soluciones

- ◆ Solución patrón de IBU: En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 30 mg del estándar de IBU, se disolvió con acetonitrilo y se aforó con el mismo disolvente. La concentración final de la solución fue de 3 mg/mL.
  
- ◆ Solución de ácido mefenámico (estándar interno): En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 10 mg del estándar de ácido mefenámico se disolvió con acetonitrilo y se aforó con el mismo disolvente. La concentración final de la solución fue de 1 mg/mL. A partir de esta solución se preparó una solución de ácido mefenámico en acetonitrilo a una concentración de 40 µg/mL.
  
- ◆ Fase móvil: La fase móvil que se utilizó fue acetonitrilo:agua:metanol:ácido fosfórico (58:37:5:0.05 v/v/v/v). Antes de utilizar la fase se filtró a través de una membrana de 0.45µm y se desgasificó en baño de ultrasonido durante 10 min.
  
- ◆ Soluciones de IBU en plasma: Las curvas de calibración de IBU en plasma se prepararon con plasma de rata libre de fármaco en un intervalo de concentración de 2.5 a 100 µg/mL de la manera ilustrada en la **Figura 6**.

TESIS CON  
FALLA DE ...EN

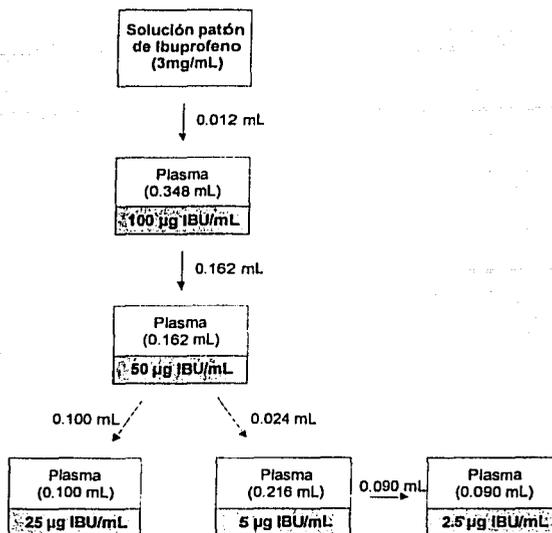


Figura 6. Preparación de la curva patrón de IBU en plasma

### 3.2.4. Método analítico para la cuantificación de IBU en plasma

Las concentraciones plasmáticas de IBU se determinaron empleando un método de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente reportado por Shah y col.<sup>81</sup> con algunas modificaciones. Brevemente el método consistió en que a muestras de 0.05 mL plasma se les agregó 0.100 mL de solución de ácido mefenámico en acetonitrilo (40 µg/mL). Las muestras se agitaron en vórtex a máxima velocidad durante 1 min y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min. Se inyectaron alícuotas de 20 µL de sobrenadante al sistema cromatográfico. La respuesta en todos los casos se determinó por el cociente resultante del área del pico de IBU entre el área del pico del ácido mefenámico.

### 3.2.5. Validación del método analítico

#### 3.2.5.1. Selectividad

La selectividad del método se determinó verificando que los componentes endógenos de la matriz biológica utilizada (el plasma) y la CAF no interfirieran en la determinación del IBU y del estándar interno. Las muestras de plasma de rata libre de fármaco, así como muestras de plasma con el IBU, el ácido mefenámico y la CAF se procesaron en forma individual.

TEXIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2.5.2. Linearidad del sistema

A fin de determinar la linealidad del sistema se prepararon de manera independiente 3 curvas patrón de IBU en acetonitrilo en un intervalo de concentración de 2.5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Se graficó la relación de áreas de los picos de IBU/ácido mefenámico con respecto a la concentración de IBU. Para cada curva se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente ( $b$ ), la ordenada al origen ( $a$ ) y un análisis de varianza para probar que la regresión fue significativa. Este análisis determina si la ecuación de regresión calculada describe adecuadamente la relación entre las dos variables y si puede utilizarse con fines de estimación<sup>82</sup>.

### 3.2.5.3. Linearidad del método

La linealidad del método se determinó preparando de manera independiente 3 curvas patrón de IBU en plasma en un intervalo de concentración de 2.5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Se graficó la relación de áreas de los picos de IBU/ácido mefenámico con respecto a la concentración de IBU. Para cada curva se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente ( $b$ ), la ordenada al origen ( $a$ ) y un análisis de varianza para probar que la regresión fue significativa.

### 3.2.5.4. Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad se evaluó en un mismo día de trabajo bajo condiciones idénticas de equipo, laboratorio y analista. Se prepararon 5 soluciones de IBU en plasma en un intervalo de concentración de 2.5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Cada solución se analizó por sextuplicado y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en porcentaje.

La reproducibilidad se evaluó analizando por sextuplicado 5 soluciones de IBU en plasma en dos días diferentes y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en porcentaje.

### 3.2.5.5. Exactitud

La exactitud se evaluó analizando por sextuplicado 5 soluciones de IBU en plasma con respecto a una curva de calibración en plasma preparada independientemente de las muestras. Se graficaron las concentraciones recuperadas en función de las concentraciones añadidas de fármaco y se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente ( $b$ ), la ordenada al origen

(a), el análisis de varianza de la regresión y el intervalo de confianza al 95% para los valores de la pendiente y la ordenada al origen.

### 3.2.5.6. Recobro absoluto

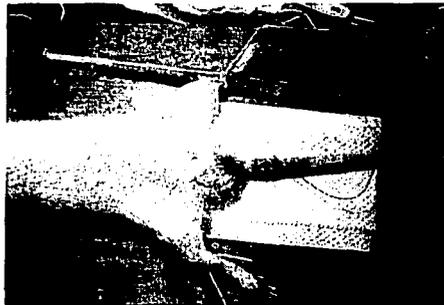
El recobro absoluto se determinó analizando 3 curvas patrón de IBU en plasma y tres curvas patrón de IBU en acetonitrilo preparadas a los niveles de concentración establecidos. Las áreas de los picos de IBU en plasma fueron relacionadas con las áreas de los picos de IBU en acetonitrilo mediante un análisis de regresión lineal simple. La pendiente de la línea de regresión indicó el recobro absoluto del fármaco.

### 3.2.5.7. Estabilidad

Se prepararon soluciones de IBU en plasma a 3 concentraciones (alta, media y baja) y se analizaron por triplicado en un intervalo de tiempo de dos semanas después de ser almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los resultados obtenidos se compararon con un análisis de varianza de dos factores.

### 3.2.6. Cirugía

Para coleccionar muestras de sangre, las ratas se anestesiaron ligeramente con éter y mediante cirugía, se les colocaron catéteres PE (en una combinación de PE-10 y PE-50 con I.D. 0.28 mm, O.D. 0.61 mm y I.D. 0.58 mm, O.D. 0.965 mm respectivamente; Clay Adams, Parsippany, NJ) en la arteria caudal, **Figura 7**.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 7.** Colocación del catéter en la arteria caudal.

### 3.2.7. Estudio farmacocinético preliminar

Una vez validado el método se realizó un estudio preliminar farmacocinético en el cual se administró a un grupo de 6 ratas una dosis de 17.8 mg/kg de IBU y a otro grupo una dosis combinada de 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF. Las dosis a administrar de IBU y de la combinación IBU+CAF se eligieron después de realizar los experimentos farmacodinámicos preliminares. Se tomaron muestras de 0.2 mL de sangre a: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4 h después de administrar el o la combinación de compuestos. El plasma recuperado se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. Se determinó la concentración plasmática máxima, el tiempo al que se presentó la concentración plasmática máxima y el área bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático de IBU. Los datos plasmáticos se ajustaron al modelo farmacocinético abierto de dos compartimentos mediante el programa de ajuste no lineal WinNonlin V2.0A. Con análisis no compartimental se calculó el tiempo medio de residencia. Además mediante un análisis multivariable de medidas repetidas se determinó si los perfiles plasmáticos de IBU fueron similares.

### 3.3. Estudio final de la combinación IBU+CAF

En esta etapa el efecto antinociceptivo del IBU (administrado solo y combinado con CAF) y los niveles plasmáticos del fármaco (en las mismas condiciones) se determinaron simultáneamente en los animales a los tiempos indicados en los experimentos preliminares. Las dosis administradas de IBU fueron: 10.0, 17.8, 31.6, 56.2 y 100.0 mg/kg y la dosis de CAF fue 17.8 mg/kg. Esta dosis de CAF se eligió porque en el estudio preliminar farmacodinámico fue la dosis que mostró potenciación del efecto antinociceptivo del IBU. Inmediatamente después de la determinación del índice de funcionalidad se tomaron muestras de sangre de 0.2 mL y se colocaron en tubos con heparina. Las muestras de plasma se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Para cada tratamiento se determinó el índice de funcionalidad y las concentraciones plasmáticas de IBU en función del tiempo. Con un análisis de varianza de medidas repetidas se compararon por separado, los cursos temporales del efecto antinociceptivo y los perfiles plasmáticos de IBU. Además se calcularon las áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo y del curso temporal del nivel plasmático. Los resultados obtenidos se relacionaron entre sí mediante el modelo  $E_{\max}$  sigmoidal con ayuda del programa WinNonlin V2.0A.

## CAPÍTULO IV

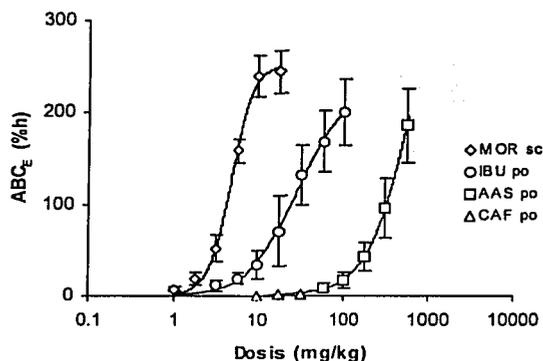
### Resultados y discusión de resultados

#### 4.1. Estudio farmacodinámico preliminar

El ácido úrico indujo una completa disfunción de la articulación derecha de las ratas aproximadamente en 2.5 h. En este momento el índice de funcionalidad fue cero. Los animales que recibieron solo carboximetilcelulosa al 0.5% no mostraron ninguna recuperación significativa del índice de funcionalidad. Las dosis utilizadas de IBU y de CAF no afectaron la habilidad motora de las ratas durante el periodo de evaluación.

##### 4.1.1. Efecto antinociceptivo de la morfina, el ácido acetilsalicílico, el IBU y la CAF

En la **Figura 8** se muestran las curvas dosis-respuesta de la morfina, el IBU, el ácido acetilsalicílico y la CAF obtenidas con las áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo de cada compuesto en función de la dosis. En esta figura se presenta la curva de IBU para ubicar su posición con respecto a las curvas de morfina y del ácido acetilsalicílico.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 8.** Curva dosis-respuesta de morfina (MOR), ibuprofeno (IBU), ácido acetilsalicílico (AAS) y cafeína (CAF) en el modelo PIFIR. Administración subcutánea (sc) y oral (po). Media  $\pm$  EE, n = 6.

En la figura anterior se observa que el IBU fue más potente que el ácido acetilsalicílico y la morfina fue más potente que el IBU. La morfina presentó una tendencia a mayor eficacia que el IBU y el ácido acetilsalicílico. El efecto máximo observado para cada compuesto y la dosis a la cual se presentó el efecto máximo fue: morfina a 17.8 mg/kg:  $244.7 \pm 22.9$  %h, IBU a 100 mg/kg:  $200.4 \pm 35.7$  %h y ácido acetilsalicílico a 562.3 mg/kg:  $186.1 \pm 39.9$  %h. La CAF por sí sola fue inactiva a las 3 dosis utilizadas. Otros parámetros farmacodinámicos determinados por el ajuste no lineal se muestran en la **Tabla 2**. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron al modelo  $E_{max}$  sigmoidal mediante la ecuación [4]:

$$E = \frac{E_{max} D^n}{DE_{50}^n + D^n}$$

donde:

$E$  = efecto alcanzado por la dosis  $D$

$E_{max}$  = efecto máximo posible que puede ser atribuido al fármaco

$DE_{50}$  = dosis que produce el 50% del efecto máximo

$n$  = coeficiente de Hill

**Tabla 2.** Parámetros farmacodinámicos estimados de las curvas dosis-respuesta de la morfina, el ibuprofeno y el ácido acetilsalicílico. Media  $\pm$  EE,  $n = 6$ .

Parámetro	Compuesto		
	Morfina	Ibuprofeno	Aspirina
$E_{max}$ (%h)	$253.66 \pm 8.44$	$223.77 \pm 11.36$	$465.27 \pm 89.60$
$DE_{50}$ (mg/kg)	$4.72 \pm 0.21$	$26.98 \pm 2.44$	$721.3 \pm 150.85$
$n$	$3.21 \pm 0.21$	$1.62 \pm 0.14$	$1.62 \pm 0.10$
$r^2$	0.9965	0.9970	0.9995

#### 4.1.2. Efecto antinociceptivo de las combinaciones IBU+CAF

La **Tabla 3** presenta las áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo de IBU solo y combinado con 10.0, 17.8 y 31.6 mg/kg de CAF. La **Figura 9** muestra de manera gráfica el promedio de estos resultados.

Tabla 3. Áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo de ibuprofeno solo y combinado con cafeína. Media  $\pm$  EE, n = 6.

Dosis de cafeína (mg/kg)	Dosis de ibuprofeno (mg/kg)					
	5.6	10.0	17.8	31.6	56.2	100
0	19.4 $\pm$ 5.5	35.0 $\pm$ 15.3	70.9 $\pm$ 39.9	132.1 $\pm$ 32.8	168.5 $\pm$ 33.2	200.5 $\pm$ 35.7
10.0	22.9 $\pm$ 10.4	55.6 $\pm$ 14.8	152.4 $\pm$ 37.7	202.9 $\pm$ 49.0	208.7 $\pm$ 22.9	246.6 $\pm$ 30.8
17.8	59.3 $\pm$ 16.6	148.8 $\pm$ 23.5	212.8 $\pm$ 29.0	237.2 $\pm$ 26.7	266.0 $\pm$ 11.7	272.4 $\pm$ 15.1
31.6	22.7 $\pm$ 6.4	105.26 $\pm$ 43.3	210.7 $\pm$ 32.4	205.9 $\pm$ 25.8	247.2 $\pm$ 12.2	228.1 $\pm$ 19.7

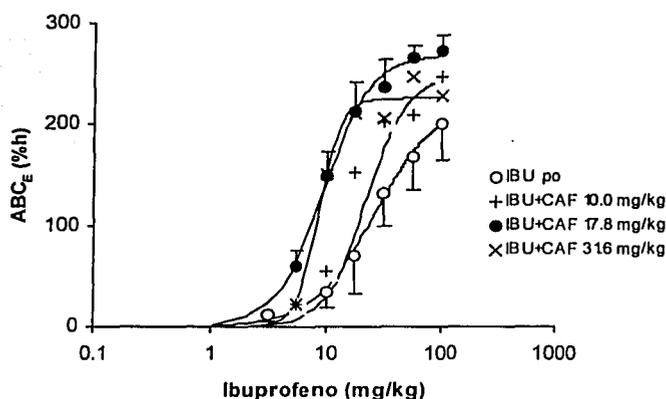


Figura 9. Curvas dosis-respuesta de ibuprofeno (IBU) solo y combinado tres dosis de cafeína (CAF). Las administraciones fueron vía oral (po). Tres de estas combinaciones mostraron efectos de potenciación ( $p < 0.01$ ). Para mayor claridad se omitieron algunas barras de error. Media  $\pm$  EE, n = 6.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El análisis de varianza indicó una interacción entre IBU y CAF ( $p < 0.01$ ). Algunas combinaciones produjeron efectos de mayor magnitud cuando se compararon con los correspondientes efectos producidos por el IBU solo. La prueba *t* de Student indicó que tres combinaciones produjeron efectos de potenciación ( $p < 0.01$ ), estas combinaciones fueron: 10.0, 17.8 y 56.2 mg/kg de IBU combinados con 17.8 mg/kg de CAF. Los efectos analgésicos de las otras 15 combinaciones no fueron estadísticamente mayores de los que presentó el IBU solo. La CAF permitió un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de IBU hacia el lado

izquierdo del eje de las abscisas. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron al modelo  $E_{max}$  sigmoideal y los resultados se presentan en la **Tabla 4**. Los efectos máximos observados se lograron con la combinación 56.2+17.8 mg/kg de IBU+CAF que fue:  $266.0 \pm 11.7$  %h y con la combinación 100+17.8 mg/kg fue:  $272.4 \pm 15.1$  %h. Esto es importante porque se pueden mejorar o superar los efectos “techo” de algunos compuestos al ser administrados en combinación con la CAF.

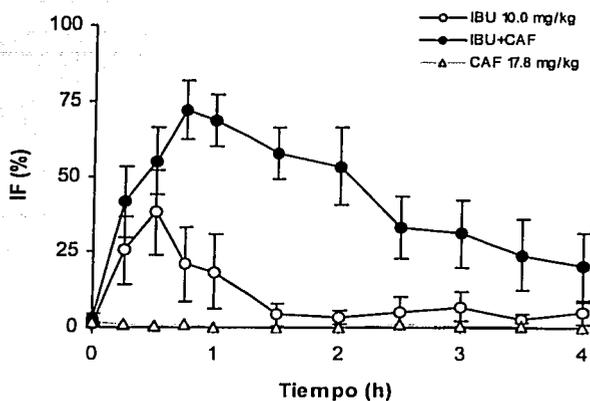
**Tabla 4.** Parámetros farmacodinámicos estimados a partir de las curvas dosis-respuesta de ibuprofeno (IBU) combinado con tres dosis de cafeína (CAF). Media  $\pm$  EE, n = 6.

Parámetro	Dosis de CAF (mg/kg) administradas con IBU		
	10.0	17.8	31.6
$E_{max}$ (%h)	$232.97 \pm 12.62$	$268.72 \pm 7.40$	$225.72 \pm 9.40$
DE <sub>50</sub> (mg/kg)	$14.61 \pm 1.42$	$9.52 \pm 0.53$	$8.70 \pm 0.63$
n	$2.57 \pm 0.54$	$2.13 \pm 0.27$	$4.67 \pm 1.37$
r <sup>2</sup>	0.9831	0.9918	0.9734

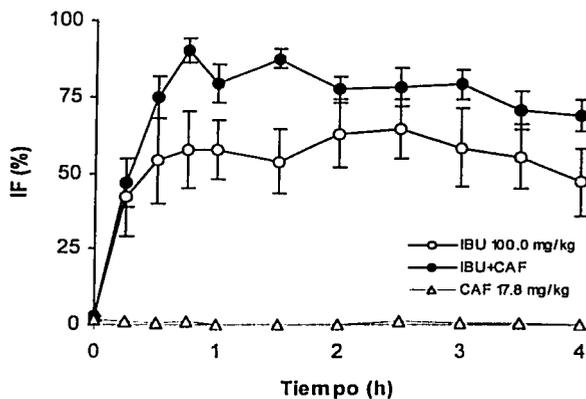
De todos los tratamientos administrados se eligieron dos combinaciones para observar la modificación del curso temporal del efecto analgésico de IBU por la CAF.

En la **Figura 10** se presenta el índice de funcionalidad con respecto al tiempo obtenido con una de las combinaciones en la que se alcanzó potenciación: 10.0+17.8 mg/kg de IBU+CAF. El área bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo de IBU a 10.0 mg/kg fue:  $35.0 \pm 15.3$  %h y esta misma dosis combinada con 17.8 mg/kg de CAF registró un área bajo la curva de:  $148.8 \pm 23.5$  %h, en otras palabras, el efecto analgésico global aumentó 3.25 veces más del presentado por el fármaco solo ( $p < 0.01$ ). El  $E_{max}$  observado cambió de:  $38.13 \pm 14.07$  a  $72.0 \pm 9.76$  %.

En la **Figura 11** se presenta la combinación que produjo el efecto analgésico máximo a las dosis evaluadas: 100.0+17.8 mg/kg de IBU+CAF. El área bajo la curva del curso temporal del efecto fue:  $272.4 \pm 15.1$  %h mientras que la dosis de 100.0 mg/kg de IBU administrado sin CAF presentó un área bajo la curva de:  $200.4 \pm 35.7$  %h. A 45 min de administrados los compuestos el  $E_{max}$  observado cambió de:  $57.5 \pm 12.6$  a  $90.3 \pm 4.1$  %.



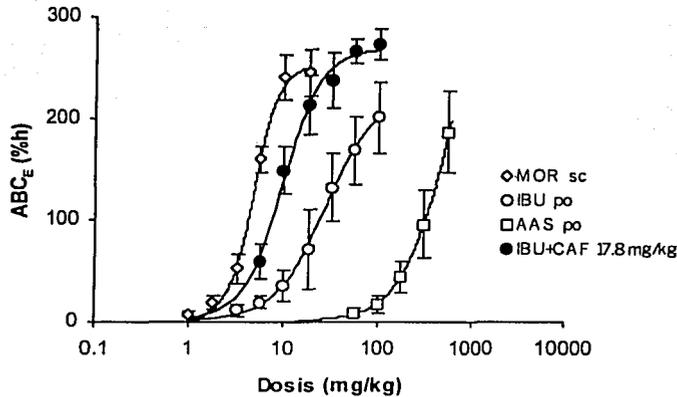
**Figura 10.** Curso temporal del efecto analgésico de ibuprofeno (IBU), de la cafeína (CAF) y de la combinación IBU+CAF a 10.0+17.8 mg/kg. Este es un ejemplo de potenciación analgésica ( $p < 0.01$ ). Media  $\pm$  EE,  $n = 6$ .



**Figura 11.** Curso temporal del efecto analgésico de ibuprofeno (IBU), de la cafeína (CAF) y de la combinación IBU+CAF a 100.0+17.8 mg/kg. Esta combinación modificó el efecto máximo alcanzado por IBU solo. Media  $\pm$  EE,  $n = 6$ .

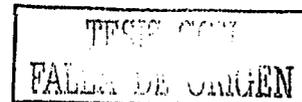
TESIS CON  
VALOR DE ORIGEN

En la **Figura 12** se presentan las curvas dosis-respuesta de la morfina, el IBU solo, el IBU combinado con 17.8 mg/kg de CAF y el ácido acetilsalicílico. La combinación IBU+CAF mostró efectos analgésicos con tendencia a superar los efectos presentados por la morfina. Los efectos máximos alcanzados y las dosis utilizadas para alcanzar estos efectos son las siguientes: para la morfina a 17.8 mg/kg:  $244.7 \pm 22.9$  %h, para la combinación IBU+CAF a 100+17.8 mg/kg:  $272.4 \pm 15.1$  %h, para el IBU a 100 mg/kg:  $200.5 \pm 35.7$  %h y para el ácido acetilsalicílico a 562.3 mg/kg:  $186.1 \pm 39.9$  %h.



**Figura 12.** Curva dosis-respuesta de la morfina (MOR), el ibuprofeno (IBU), el ácido acetilsalicílico (AAS) y la combinación IBU+17.8 mg/kg de CAF. La combinación IBU+CAF fue más potente que IBU solo y AAS, además, en algunas combinaciones, mostró tendencia a superar los efectos de la MOR. Media  $\pm$  EE, n = 6.

Con base en estos resultados preliminares el estudio definitivo se realizó en el intervalo de dosis de 10.0 a 100.0 mg/kg de IBU solo y combinado únicamente con 17.8 mg/kg de CAF, debido a que las combinaciones de IBU+CAF que mostraron potenciación del efecto antinociceptivo, se obtuvieron con esta dosis de CAF. La aplicación práctica de estos resultados permite administrar menos dosis de IBU, pero combinado con CAF, para alcanzar los mismos niveles de efecto terapéutico, disminuyendo así los efectos colaterales que los AAINes presentan.



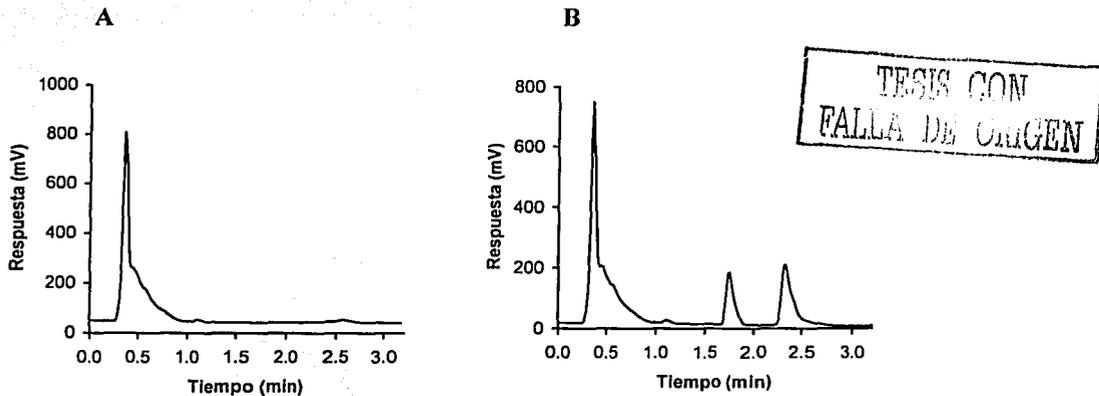
## 4.2. Estudio farmacocinético

### 4.2.1. Validación del método analítico para la cuantificación de IBU en plasma

Los criterios para la validación del método analítico se basaron en las recomendaciones y lineamientos especificados por diferentes organismos<sup>83-87</sup>.

#### 4.2.1.1. Selectividad

En la **Figura 13** se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar una muestra de plasma de rata libre de fármaco (A) así como una muestra de plasma con el IBU a 25 $\mu$ g/mL y el ácido mefenámico como estándar interno (B). Los tiempos de retención fueron 1.7 min para el IBU y 2.4 min para el ácido mefenámico. Los componentes endógenos del plasma no interfirieron en las respuestas producidas por los fármacos. Se observó una buena resolución entre los compuestos. En muestras añadidas con CAF no se observó ninguna respuesta durante 20 min después de iniciada la corrida, por lo que se consideró que el método analítico elegido fue selectivo para la cuantificación de IBU en plasma.



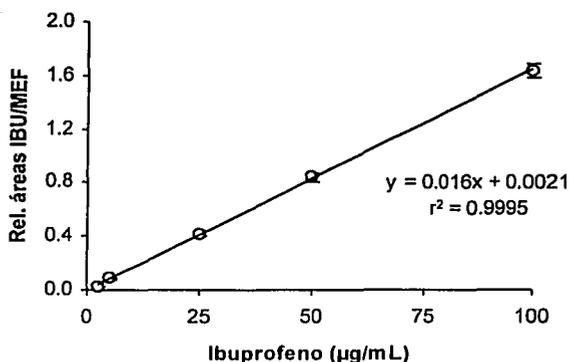
**Figura 13.** Plasma de rata libre de fármaco (A). Plasma cargado con ibuprofeno (25 $\mu$ g/mL) y el ácido mefenámico como estándar interno (B). Tiempos de retención: 1.7 y 2.4 min respectivamente.

#### 4.2.1.2. Linealidad del sistema

En la **Tabla 5** se muestra la relación de área de los picos de IBU/estándar interno obtenidos a partir de 3 curvas de calibración de IBU en acetonitrilo en el intervalo de concentración de 2.5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . En la **Figura 14** se muestra la representación gráfica del promedio de estos resultados. La regresión lineal fue significativa ( $p < 0.05$ ). El  $\text{IC}_{95\%}$  calculado para el intercepto fue:  $-0.0312$  a  $0.0355$ .

**Tabla 5.** Relación de áreas ibuprofeno/estándar interno en acetonitrilo para evaluar linealidad del sistema

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetición			Promedio
	1	2	3	
2.5	0.0262	0.0204	0.0261	0.0242
5	0.0905	0.0814	0.0941	0.0887
25	0.4373	0.3927	0.4348	0.4216
50	0.8331	0.8149	0.8737	0.8406
100	1.6901	1.5716	1.6431	1.6364
a =	-0.0015	-0.0034	0.0114	0.0021
b =	0.0169	0.0159	0.0165	0.0164
r =	0.9998	0.9997	0.9997	0.9998



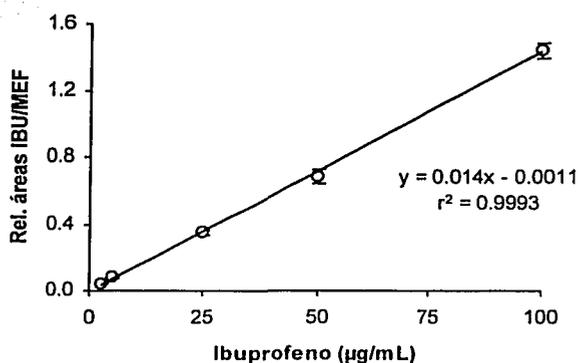
**Figura 14.** Linealidad del sistema. Ibuprofeno (IBU) con ácido mefenámico (MEF) como estándar interno. Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .

#### 4.2.1.3. Linealidad del método

En la **Tabla 6** se muestra la relación de área de los picos de IBU/estándar interno obtenidos a partir de 3 curvas de calibración de IBU en plasma en el intervalo de concentración de 2.5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . En la **Figura 15** se muestra la representación gráfica del promedio de estos resultados. La regresión lineal fue significativa ( $p < 0.05$ ). El  $\text{IC}_{95\%}$  calculado para el intercepto fue:  $-0.0380$  a  $0.0358$ . Los resultados obtenidos cumplen con los criterios establecidos para la linealidad del sistema y la linealidad del método<sup>83-87</sup>.

**Tabla 6.** Relación de áreas ibuprofeno/estándar interno en plasma para evaluar linealidad del método

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetición			Promedio
	1	2	3	
2.5	0.0385	0.0485	0.0452	0.0441
5	0.0743	0.0853	0.0783	0.0793
25	0.3581	0.3322	0.3575	0.3493
50	0.7349	0.6835	0.6505	0.6896
100	1.4793	1.4593	1.3893	1.4426
a =	-0.0029	-0.0049	0.0046	-0.0011
b =	0.0147	0.0144	0.0136	0.0143
r =	0.9999	0.9989	0.9992	0.9996



**Figura 15.** Linealidad del método. Ibuprofeno (IBU) con ácido mefenámico (MEF) como estándar interno. Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .

#### 4.2.1.4. Repetibilidad y reproducibilidad

En la **Tabla 7** se presenta la relación de área de los picos de IBU/estándar interno para evaluar el criterio de repetibilidad al analizar en un mismo día 6 muestras de cada una de las 5 diferentes soluciones de IBU. La tabla presenta los valores promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en porcentaje para cada concentración. Ninguno de los coeficientes fue mayor a 5% por lo que se considera que el método es repetible.

La reproducibilidad se determinó después de analizar por sextuplicado 5 soluciones de IBU durante dos días de trabajo. La **Tabla 8** muestra los valores promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en porcentaje para cada una de las concentraciones evaluadas. El coeficiente de variación para la menor concentración utilizada no fue mayor a 20% y en las concentraciones restantes no superó el 15% (son los límites establecidos).

**Tabla 7.** Relación de áreas ibuprofeno/estándar interno para evaluar repetibilidad. Desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV)

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetición						Promedio	DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6			
2.5	0.0401	0.0299	0.0368	0.0306	0.0316	0.0347	0.0339	0.0016	4.78
5	0.0521	0.0551	0.0569	0.0533	0.0538	0.0558	0.0545	0.0007	1.32
25	0.2930	0.3172	0.3156	0.3078	0.3049	0.3219	0.3101	0.0043	1.38
50	0.5836	0.6205	0.5963	0.5946	0.5803	0.5795	0.5925	0.0063	1.07
100	1.1754	1.1735	1.1585	1.1204	1.1793	1.1122	1.1532	0.0121	1.05

**Tabla 8.** Relación de áreas ibuprofeno/estándar interno para evaluar reproducibilidad ( $n = 12$ ). Desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV)

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio	DE	CV (%)
2.5	0.0402	0.0073	18.27
5	0.0631	0.0093	14.76
25	0.3349	0.029	8.67
50	0.6797	0.0932	13.72
100	1.3365	0.1931	14.45

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.2.1.5. Exactitud

En la **Figura 16** se muestra la representación gráfica de la concentración recuperada en función de la concentración añadida de IBU en 5 soluciones de plasma. El análisis de varianza indicó que la regresión fue significativa ( $p < 0.05$ ) y el intervalo de confianza al 95% para el

valor del intercepto fue  $-0.1920$  a  $0.7920$  y para la pendiente fue  $0.9840$  a  $1.0032$ . Estos resultados apoyan la conclusión de que el método cumple con el parámetro de exactitud.

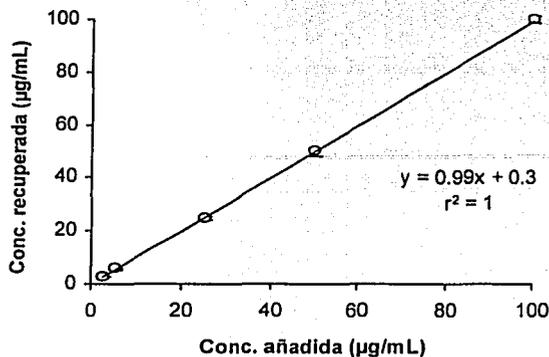


Figura 16. Exactitud del método. Media  $\pm$  DE,  $n = 6$

#### 4.2.1.6. Recobro absoluto

En la Figura 17 se muestra la gráfica del área del pico de IBU en plasma con respecto al área del pico de IBU en acetonitrilo. La pendiente de la línea de regresión indicó una recuperación de IBU del plasma del 101%, por lo que se concluye que el recobro fue completo, dado que el tratamiento de la muestra biológica no requirió de un proceso de extracción con disolventes orgánicos.

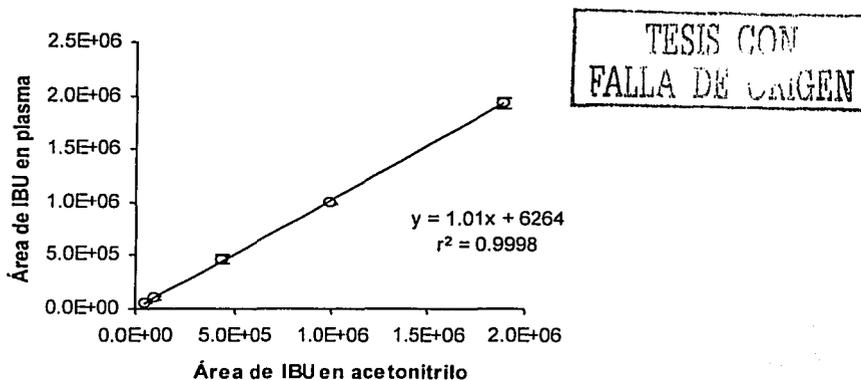


Figura 17. Recobro absoluto de ibuprofeno (IBU). Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .

#### 4.2.1.7. Estabilidad

En la **Tabla 9** se encuentran los resultados del análisis de varianza de dos factores calculado para comparar las respuestas obtenidas al analizar por triplicado 3 soluciones de IBU en plasma (100.0, 25.0 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los resultados obtenidos indicaron que las muestras se pueden guardar en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante dos semanas sin generar diferencias estadísticamente significativas entre las determinaciones ( $p>0.05$ ). Se consideró adecuado evaluar la estabilidad durante dos semanas debido a que durante el estudio, las muestras de plasma se analizaron en este intervalo de tiempo.

**Tabla 9.** Análisis de varianza para evaluar estabilidad

FV	SC	gl	CM	F	p
Muestra	6.0309	2	3.0155	1173.39	$1.73\text{E}^{-14}$
Semanas	0.0094	1	0.0094	3.69	0.078
Interacción	0.0017	2	0.0008	0.33	0.720
Error	0.0308	12	0.0025		
Total	6.0730	17			

$p>0.05$

#### 4.2.2. Estudio farmacocinético preliminar

Como ejercicio preliminar se determinaron los niveles plasmáticos de IBU después de administrar 17.8 mg/kg de IBU y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF a grupos de ratas Wistar. Ésta combinación fue una de las que mostró potenciación del efecto antinociceptivo de IBU en el estudio farmacodinámico previo.

En la **Figura 18** se muestran los niveles plasmáticos de IBU en función del tiempo después de administrar los tratamientos previamente descritos. Los datos se ajustaron al modelo farmacocinético abierto de dos compartimentos<sup>80</sup>. Los resultados se muestran en la **Tabla 10**. El análisis multivariable de medidas repetidas indicó que los perfiles plasmáticos fueron similares ( $p>0.05$ ). El área bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático calculada para el grupo que recibió IBU fue:  $68.81 \pm 10.52 \mu\text{gh}/\text{mL}$  y para el grupo que recibió la combinación IBU+CAF:  $66.68 \pm 7.89 \mu\text{gh}/\text{mL}$ .

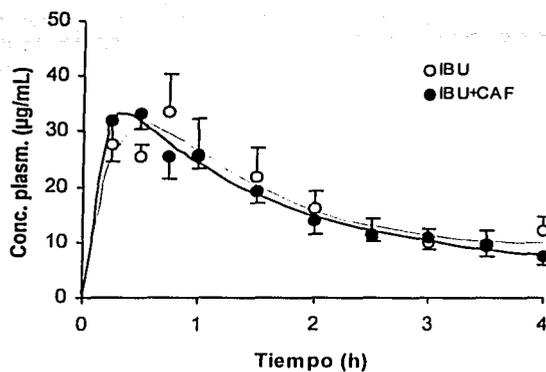
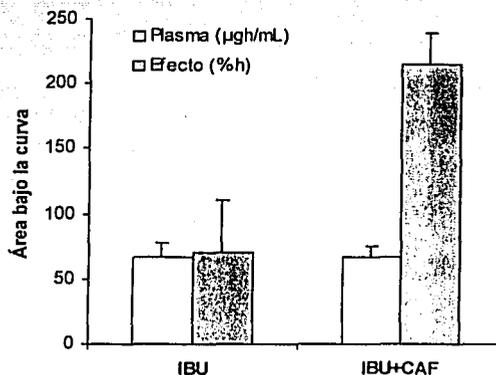


Figura 18. Curso temporal de los niveles plasmáticos de ibuprofeno (IBU) después de administrar 17.8 mg/kg de IBU y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF. Media  $\pm$  EE, n = 6.

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos calculados después de administrar 17.8 mg/kg de ibuprofeno (IBU) y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de IBU+CAF. Los datos se ajustaron al modelo abierto de dos compartimentos. Media  $\pm$  EE, n = 6.

Parámetro	IBU	IBU+CAF
$C_{max}$ (µg/mL)	40.86 $\pm$ 8.33	40.62 $\pm$ 5.92
$T_{max}$ (h)	0.54 $\pm$ 0.14	0.58 $\pm$ 0.13
$ABC_p$ (µgh/mL)	68.81 $\pm$ 10.52	66.68 $\pm$ 7.89
Vd/F	0.28 $\pm$ 0.10	0.34 $\pm$ 0.07
$k_{01}$	17.72 $\pm$ 9.80	9.03 $\pm$ 5.09
$k_{10}$	0.48 $\pm$ 0.21	0.48 $\pm$ 0.11
$k_{12}$	1.54 $\pm$ 0.78	0.94 $\pm$ 0.46
$k_{21}$	0.59 $\pm$ 0.14	0.47 $\pm$ 0.21
$\alpha$	2.34 $\pm$ 0.86	1.77 $\pm$ 0.50
$\beta$	0.28 $\pm$ 0.18	0.13 $\pm$ 0.05
Cl/F	0.10 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.04
TMR (h)	1.65 $\pm$ 0.08	1.54 $\pm$ 0.05

En la **Figura 19** se presentan las áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo de IBU determinado en el estudio preliminar farmacodinámico (reportadas en la sección 4.1.2.) y las áreas bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático (reportadas en esta sección) después de administrar los tratamientos anteriormente descritos. Es preciso hacer notar que las áreas bajo la curva del nivel plasmático se mantuvieron en el mismo nivel mientras que el cambio en las áreas bajo la curva del efecto analgésico fue estadísticamente significativo.



**Figura 19.** Áreas bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático y del curso temporal del efecto antinociceptivo de ibuprofeno (IBU) después de administrar 17.8 mg/kg de IBU y la combinación 17.8+17.8 mg/kg de ibuprofeno+cafeína (IBU+CAF). Los tratamientos se evaluaron en diferentes grupos de animales, Media + EE, n = 6.

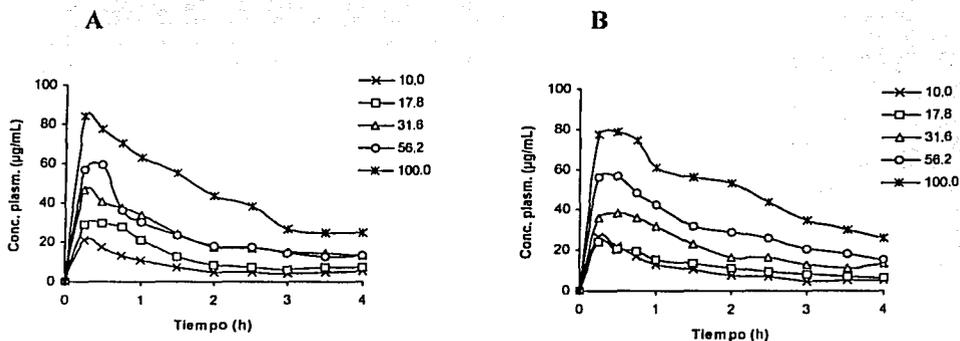
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 4.3. Estudio final de la combinación IBU+CAF

En esta etapa el efecto antinociceptivo y los niveles plasmáticos de IBU se determinaron simultáneamente. Las dosis de IBU utilizadas fueron: 10.0, 17.8, 31.6, 56.2 y 100.0 mg/kg. Se administraron por vía oral solas y combinadas con una dosis de 17.8 mg/kg de CAF a grupos de seis ratas por tratamiento.

#### 4.3.1. Etapa farmacocinética

En la **Figura 20** se muestran los niveles plasmáticos de IBU en función del tiempo después de administrar el IBU y la combinación IBU+CAF. En esta gráfica para mayor claridad se omiten las barras de error. (En el **Apéndice** se presentan por separado los cursos temporales de cada tratamiento con sus respectivos promedios y errores). El análisis estadístico de medidas repetidas indicó que los perfiles plasmáticos de IBU fueron similares después de administrar el IBU con y sin CAF ( $p > 0.05$ ). Los datos se ajustaron al modelo farmacocinético abierto de dos compartimentos. En todos los casos la correlación entre datos observados y estimados fue mayor a 0.98. En las **Tablas 11A** y **11B** se presentan los parámetros farmacocinéticos calculados para estos tratamientos.



**Figura 20.** Cursos temporales del nivel plasmático de ibuprofeno después de administrar diferentes dosis (mg/kg) de ibuprofeno solo (A) y combinado con 17.8 mg/kg de cafeína (B). Media,  $n = 6$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

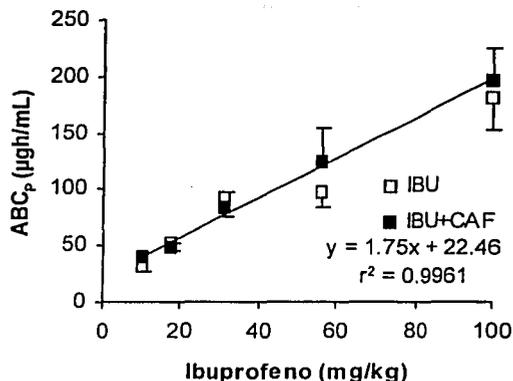
**Tabla 11A.** Parámetros farmacocinéticos determinados después de administrar diferentes dosis de ibuprofeno (IBU). Los datos se ajustaron al modelo abierto de dos compartimentos. Media  $\pm$  EE, n = 6. La tabla cuenta además con dos parámetros farmacodinámicos.

Parámetro	Dosis de IBU (mg/kg)				
	10.0	17.8	31.6	56.2	100.0
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	21.48 $\pm$ 0.39	34.07 $\pm$ 6.99	48.69 $\pm$ 11.41	62.96 $\pm$ 10.12	85.82 $\pm$ 21.68
$T_{max}$ (h)	0.35 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.08
$ABC_P$ ( $\mu\text{gh/mL}$ )	31.50 $\pm$ 3.98	52.41 $\pm$ 6.36	91.69 $\pm$ 16.0	96.70 $\pm$ 12.4	181.88 $\pm$ 28.77
Vd/F	0.23 $\pm$ 0.06	0.37 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.18	0.45 $\pm$ 0.13	0.85 $\pm$ 0.32
$k_{01}$	4.09 $\pm$ 0.20	11.98 $\pm$ 8.60	32.01 $\pm$ 11.65	3.61 $\pm$ 0.51	7.59 $\pm$ 0.51
$k_{10}$	0.02 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.11	0.17 $\pm$ 0.15	0.64 $\pm$ 0.21	0.42 $\pm$ 0.12
$k_{12}$	2.38 $\pm$ 1.07	1.56 $\pm$ 0.31	1.0 $\pm$ 0.08	2.09 $\pm$ 0.39	1.36 $\pm$ 1.25
$k_{21}$	0.31 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.25	0.96 $\pm$ 0.81
A	2.72 $\pm$ 1.03	2.12 $\pm$ 0.29	1.65 $\pm$ 0.23	3.57 $\pm$ 0.52	2.57 $\pm$ 2.13
B	0.0015 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.08
Cl/F	0.0036 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.08
TMR (h)	1.56 $\pm$ 0.16	1.49 $\pm$ 0.11	1.63 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.11	1.62 $\pm$ 0.06
$Emax_{obs}$ (%)	68.82 $\pm$ 11.04	80.13 $\pm$ 6.40	67.94 $\pm$ 15.03	79.77 $\pm$ 11.08	78.11 $\pm$ 9.33
$ABC_E$ (%h)	189.28 $\pm$ 37.60	259.22 $\pm$ 25.56	194.18 $\pm$ 52.70	277.65 $\pm$ 38.29	268.74 $\pm$ 21.26

**Tabla 11B.** Parámetros farmacocinéticos determinados después de administrar diferentes dosis de ibuprofeno (IBU) combinado con 17.8 mg/kg de cafeína (CAF). Los datos se ajustaron al modelo abierto de dos compartimentos. Media  $\pm$  EE, n = 6. La tabla cuenta además con dos parámetros farmacodinámicos.

Parámetro	Dosis de IBU (mg/kg)				
	10.0	17.8	31.6	56.2	100.0
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	33.46 $\pm$ 3.97	26.27 $\pm$ 2.28	45.88 $\pm$ 6.83	59.88 $\pm$ 17.91	93.52 $\pm$ 16.71
$T_{max}$ (h)	0.29 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.27	0.42 $\pm$ 0.08
$ABC_P$ ( $\mu\text{gh/mL}$ )	40.24 $\pm$ 4.20	48.26 $\pm$ 4.06	83.17 $\pm$ 13.41	123.35 $\pm$ 31.12	196.63 $\pm$ 28.19
Vd/F	0.11 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.10	0.45 $\pm$ 0.22	0.68 $\pm$ 0.27	0.81 $\pm$ 0.30
$k_{01}$	17.80 $\pm$ 11.39	7.83 $\pm$ 4.15	3.68 $\pm$ 0.42	4.43 $\pm$ 1.54	4.94 $\pm$ 1.16
$k_{10}$	1.23 $\pm$ 0.74	1.07 $\pm$ 0.54	0.73 $\pm$ 0.37	0.40 $\pm$ 0.25	0.32 $\pm$ 0.16
$k_{12}$	3.71 $\pm$ 1.64	4.53 $\pm$ 3.11	1.55 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.28	1.46 $\pm$ 0.60
$k_{21}$	0.45 $\pm$ 0.24	1.11 $\pm$ 0.29	0.79 $\pm$ 0.31	0.71 $\pm$ 0.27	1.30 $\pm$ 0.86
A	5.30 $\pm$ 2.37	6.48 $\pm$ 3.68	2.82 $\pm$ 0.40	2.14 $\pm$ 0.54	2.97 $\pm$ 1.47
B	0.09 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.13	0.18 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.06
Cl/F	0.08 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.09	0.11 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.11
TMR (h)	1.44 $\pm$ 0.05	1.59 $\pm$ 0.07	1.55 $\pm$ 0.10	1.65 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.07
$Emax_{obs}$ (%)	74.50 $\pm$ 10.20	87.91 $\pm$ 11.88	77.93 $\pm$ 9.21	94.90 $\pm$ 10.98	93.76 $\pm$ 4.54
$ABC_E$ (%h)	249.91 $\pm$ 47.01	299.91 $\pm$ 40.98	254.99 $\pm$ 29.94	334.44 $\pm$ 36.76	327.75 $\pm$ 14.45

En la **Figura 21** se observa el área bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático en función de la dosis de IBU. El incremento en el área bajo la curva fue proporcional a la dosis administrada de fármaco solo y combinado con CAF. El análisis de varianza indicó que la regresión lineal fue significativa ( $p < 0.05$ ). Esto demostró que, en el intervalo de dosis utilizado (10.0 – 100.0 mg/kg), no se alcanzó la saturación en el proceso de absorción del IBU.



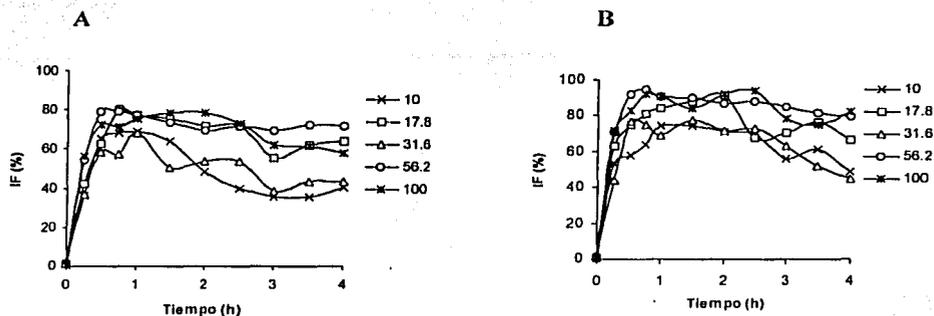
**Figura 21.** Área bajo la curva del curso temporal del nivel plasmático ( $ABC_p$ ) de ibuprofeno (IBU) en función de la dosis, después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de caféina (CAF). Media  $\pm$  EE,  $n = 6$ . Este resultado mostró que el proceso de absorción del IBU no se saturó en el intervalo de dosis evaluadas.

#### 4.3.2. Etapa farmacodinámica

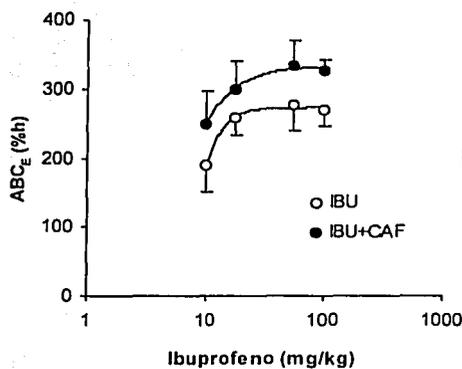
En la **Figura 22** se muestra el efecto antinociceptivo de IBU en función del tiempo después de administrar diferentes dosis de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. En esta gráfica para mayor claridad se omiten las barras de error. (En el **Apéndice** se presentan por separado los cursos temporales de cada tratamiento con sus respectivos promedios y errores). Al igual que en los estudios preliminares el efecto máximo y la duración del efecto se incrementaron con la administración de CAF aunque este aumento no fue significativo. En las **Tablas 11A** y **11B** se presentan, para cada tratamiento, dos parámetros farmacodinámicos importantes: el efecto máximo observado ( $E_{max_{obs}}$  %) y el área bajo la curva del curso temporal del efecto

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

antinociceptivo ( $ABC_E$ ) de IBU. La **Figura 23** muestra el área bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo en función de la dosis de IBU administrado solo y combinado con CAF. La CAF permitió un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de IBU hacia el lado izquierdo del eje de las abscisas.



**Figura 22.** Índice de funcionalidad (IF) con respecto al tiempo después de administrar diferentes dosis (mg/kg) de IBU solo (A) y combinado con 17.8 mg/kg de CAF (B). Media,  $n = 6$ .

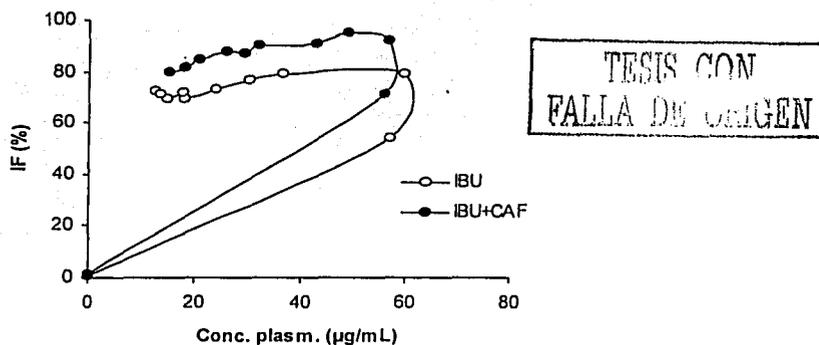


**Figura 23.** Área bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo ( $ABC_E$ ) de ibuprofeno (IBU) solo y combinado con 17.8 mg/kg de cafeína (CAF) en función del logaritmo de la dosis de IBU. Media  $\pm$  EE,  $n=6$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.3.3. Relación: nivel plasmático-efecto analgésico

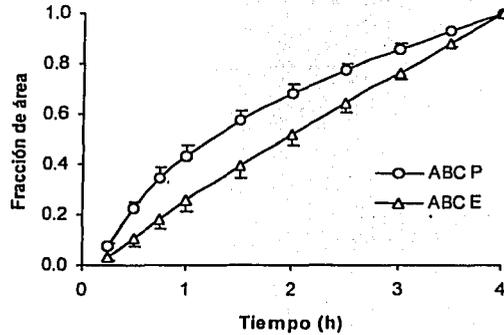
Una vez obtenidos los datos de concentración plasmática y efecto antinociceptivo con la dosis de 56.2 mg/kg se elaboró, relacionando ambos parámetros, la gráfica de la **Figura 24**. En ella se puede observar un “loop” o comportamiento de histéresis con sentido contrario a las manecillas del reloj. Para mayor claridad se omiten las barras de error. Este comportamiento se manifestó también en las dosis de 10.0, 17.8, 31.6 y 100.0 mg/kg de IBU solo y combinado con la dosis de 17.8 mg/kg de CAF. En el **Apéndice** se presentan las gráficas de histéresis obtenidas para todas las dosis.



**Figura 24.** Relación entre el índice de funcionalidad (IF%) y las concentraciones plasmáticas de ibuprofeno (IBU) después de administrar 56.2 mg/kg de IBU y la combinación 56.2+17.8 mg/kg de IBU+CAF. La relación presenta un comportamiento de histéresis con sentido contrario a las manecillas del reloj. Los datos están graficados por orden de incremento del tiempo. Media, n = 6.

En el presente estudio, este tipo de gráficas permitió observar un retardo en el equilibrio del fármaco entre el plasma y el sitio de acción<sup>88</sup>. Dado que el área encerrada en el loop no aportó información cuantitativa acerca de la magnitud del retardo, fue necesario elaborar una gráfica de “fracción de área” para estimar el tiempo medio de retardo (TMRet) en el equilibrio del fármaco con su sitio de acción. Este método modelo independiente<sup>89</sup> emplea la siguiente ecuación:  $TMRet = \frac{ABC \text{ del curso temporal de la fracción de área del efecto antinociceptivo} - ABC \text{ del curso temporal de la fracción de área del nivel plasmático de IBU}}{ABC \text{ del curso temporal de la fracción de área del efecto antinociceptivo}}$

En la **Figura 25** se presenta la gráfica de fracción de área en función del tiempo para la dosis de 56.2 mg/kg de IBU y en la **Tabla 12** se presentan los valores de TMRet calculados para los diferentes tratamientos estudiados. Al hacer el análisis estadístico con una prueba *t* de Student se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores del TMRet entre la administración de IBU y la combinación IBU+CAF ( $p>0.05$ ) a excepción de la dosis de 10.0 mg/kg.

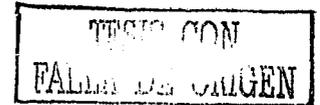


**Figura 25.** Fracción de área de los cursos temporales del nivel plasmático (ABC P) y del efecto antinociceptivo (ABC E) de ibuprofeno en función del tiempo después de administrar 56.2 mg/kg de ibuprofeno. Media  $\pm$  EE,  $n = 6$ .

**Tabla 12.** Tiempo medio de retardo (TMRet) en el equilibrio del ibuprofeno (IBU) con su sitio receptor después de administrar IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de cafeína (CAF). Media  $\pm$  EE,  $n = 6$ .

IBU Dosis (mg/kg)	TMRet (h)	
	sin CAF	con CAF
10.0	0.22 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.12*
17.8	0.49 $\pm$ 0.19	0.40 $\pm$ 0.09
31.6	0.25 $\pm$ 0.17	0.40 $\pm$ 0.08
56.2	0.45 $\pm$ 0.18	0.34 $\pm$ 0.16
100.0	0.35 $\pm$ 0.11	0.33 $\pm$ 0.04

\*  $p<0.05$

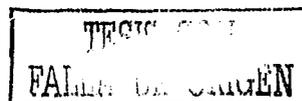


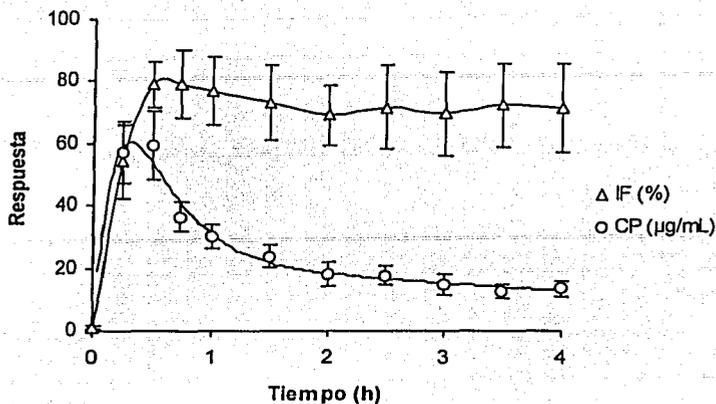
El comportamiento de histéresis podría deberse a:

- ◆ La formación de metabolitos activos.
- ◆ Que la respuesta farmacológica este relacionada a una progresiva serie de eventos que, al pasar el tiempo, reflejen cierta demora en la actividad terapéutica observada.
- ◆ Que al fármaco le tome cierto tiempo para equilibrarse con su sitio receptor<sup>90</sup>.

En el caso de IBU, se descarta la primer propuesta ya que los dos principales metabolitos (uno hidroxilado y otro carboxilado) son inactivos<sup>64</sup>. Dado que la cascada de compuestos y/o eventos farmacológicos que intervienen en el proceso de la inflamación es relativamente conocida, y también los mecanismos farmacodinámicos que desencadenan los fármacos antiinflamatorios no esteroides<sup>91</sup>, se propone que para el IBU el comportamiento de histéresis se debe a un retardo en el equilibrio del fármaco con su sitio de acción.

Con el fin de establecer la relación concentración-efecto en función del tiempo, se elaboró la **Figura 26** que presenta el curso temporal del nivel plasmático y del efecto antinociceptivo después de administrar una dosis de 56.2 mg/kg de IBU a seis ratas. La concentración plasmática máxima fue  $62.96 \pm 10.12$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) y el efecto máximo observado fue  $79.77 \pm 11.08$  (%). La concentración plasmática máxima se alcanzó entre 15 a 30 min y el nivel plasmático se redujo en concentración hasta un valor cercano a  $10 \mu\text{g/mL}$  a 4 h después de administrado el fármaco, mientras que el efecto terapéutico alcanzó su máximo entre 30 a 40 min después de iniciado el tratamiento y aparentemente permaneció constante hasta el término del experimento, lo cual indicó que los niveles plasmáticos del IBU estuvieron fuera de fase con la actividad farmacológica. Este patrón de respuesta se presentó en todos los tratamientos administrados.

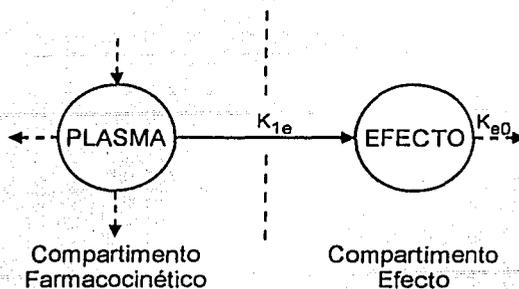




**Figura 26.** Índice de funcionalidad (IF) y concentración plasmática (CP) de ibuprofeno en función del tiempo después de administrar 56.2 mg/kg del fármaco. Media  $\pm$  EE, n = 6.

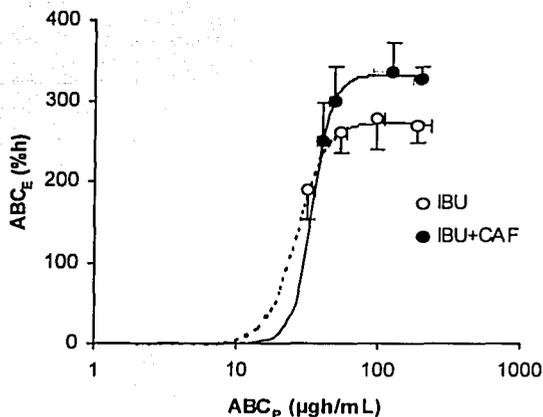
Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la relación concentración plasmática y efecto analgésico del IBU fue diferente al reportado para el paracetamol<sup>31</sup> y el ketorolaco<sup>32</sup>. En estos dos fármacos, el efecto antinociceptivo fue posible relacionarlo con las concentraciones circulantes de los fármacos. Sin embargo, los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado para algunos AAINES en los que el efecto antinociceptivo parece estar relacionado a la concentración del fármaco en el compartimento efecto<sup>33,88,92</sup>. Este concepto fue introducido por Sheiner y Holford<sup>93,94</sup> en el cual, la respuesta farmacológica es relacionada en función de la concentración del fármaco (o del compuesto activo) en un compartimento efecto hipotético. Este compartimento recibe el fármaco del compartimento central farmacocinético por un proceso de primer orden. Además, se asume que el modelo farmacocinético no afecta la cinética del fármaco en el compartimento efecto, ya que el compartimento, recibe una pequeña cantidad de fármaco comparada con la cantidad total circulante en el organismo. En la **Figura 27** se presenta un esquema de la relación entre el compartimento central farmacocinético y el compartimento efecto.

TESIS CON  
FALLA DE CALIBRE



**Figura 27.** Modelo farmacocinético-farmacodinámico que muestra la unión entre el compartimento central de un modelo farmacocinético y el compartimento efecto.  $K_{1e}$  y  $K_{e0}$  representan las microconstantes involucradas.

Asimismo, se calcularon las áreas bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo ( $ABC_E$ ) y curso temporal del nivel plasmático ( $ABC_P$ ) de IBU después de administrar 10.0, 17.8, 56.2 y 100.0 mg/kg del fármaco solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. La **Figura 28** muestra la relación obtenida.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 28.** Área bajo la curva del efecto analgésico ( $ABC_E$ ) en función del logaritmo del área bajo la curva del nivel plasmático ( $ABC_P$ ) de ibuprofeno (IBU) después de administrar 10.0, 17.8, 56.2 y 100.0 mg/kg de IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de cafeína (CAF). Media  $\pm$  EE, n = 6.

Dado que el método analítico sólo permitió medir niveles de IBU en dosis superiores a 10 mg/kg no fue posible contar con la información de la parte inferior de la sigmoide. Es conveniente tener precaución en la interpretación de los valores estimados en esta región.

Los datos se ajustaron al modelo  $E_{\max}$  sigmoide y se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

Para el ibuprofeno:

$$E = \frac{273.35C^{4.25}}{26.03^{4.25} + C^{4.25}} \quad [6]$$

Para la combinación ibuprofeno+cafeína:

$$E = \frac{331.12C^{6.27}}{33.64^{6.27} + C^{6.27}} \quad [7]$$

donde:

$E$  = ABC del curso temporal del efecto antinociceptivo (%h)

$C$  = ABC del curso temporal del nivel plasmático ( $\mu\text{gh/mL}$ )

Los valores calculados de  $r^2$  para las ecuaciones [6] y [7] son 0.9898 y 0.9948 respectivamente. Estas ecuaciones son de tipo predictivo y permiten una mayor comprensión de la acción del IBU. Con una adecuada interpretación de estas relaciones el conocimiento generado podría a futuro apoyar la práctica clínica<sup>5</sup>.

Los valores concentración-respuesta presentados en la **Figura 28** conjuntamente con los datos de las **Figuras 21** y **23** permiten relacionar el efecto antinociceptivo de IBU con los niveles plasmáticos y la dosis. Esto representaría una ventaja sobre el utilizar únicamente la relación dosis-efecto ya que, en la mayoría de los casos, los efectos terapéuticos guardan estrecha relación con los niveles plasmáticos

La curva concentración-respuesta de un AAINÉ depende de la eficacia y la potencia de cada compuesto. A su vez, eficacia y potencia, dependen de la intensidad del estímulo nociceptivo.

La CAF fue capaz de desplazar la curva dosis-respuesta de IBU hacia el lado izquierdo del eje de las abscisas (es decir, aumentó la potencia). La eficacia también se vio favorecida con la combinación, de manera que, el aumento de la eficacia se puede obtener ya sea incrementando la concentración sanguínea de los AAINES por aumento de la dosis administrada o bien, desplazando la relación concentración-efecto mediante la coadministración de CAF. En el caso de los AAINES, al mantener bajos los niveles plasmáticos de estos fármacos, existe la posibilidad de que los efectos colaterales se vean disminuidos.

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que la CAF fue capaz de incrementar el efecto antinociceptivo de IBU solo en algunas combinaciones. El uso de mezclas de AAINES+CAF en ciertas proporciones podría ser adecuado en diferentes intensidades de dolor. El nivel adecuado y la proporción de dosis utilizadas deberán encontrarse para cada estado de dolor. Es preciso hacer notar que hay evidencias que sugieren que la CAF inhibe el desarrollo de daño agudo en la mucosa gástrica asociada al uso de AAINES<sup>95</sup>. En este sentido, el uso de la combinación IBU+CAF podría mejorar significativamente el perfil de seguridad de este compuesto.

Por otra parte, el desarrollo y aplicación de los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos presentan algunos beneficios potenciales:

1. Proveen una exacta y completa caracterización de la relación dosis-concentración-efecto.
2. Proporcionan medidas de potencia y actividad intrínseca basadas en concentraciones plasmáticas y no solamente en dosis como se reporta comúnmente<sup>25</sup>.

Una cuestión importante en la evaluación preclínica de los fármacos es el grado de predictibilidad de la potencia y actividad intrínseca en humanos basada en datos farmacocinéticos-farmacodinámicos obtenidos en estudios con animales. Aunque la variabilidad interindividual en farmacodinamia es generalmente grande<sup>96</sup> se ha demostrado que para numerosos fármacos las concentraciones efectivas son similares en animales y humanos<sup>97</sup>. Por ejemplo, Cox y col.<sup>98</sup> reportaron intervalos similares de CE<sub>50</sub> de varios opioides en ratas y humanos; y Meibohm y col.<sup>99</sup> aplicaron un análisis farmacocinético-farmacodinámico para evaluar la farmacodinamia de un compuesto nuevo: EMD 221 829 en

perros y con ello se estableció la potencia *in vivo* del compuesto, ya que no era posible el estudio en humanos. Adicionalmente a estos métodos farmacocinéticos-farmacodinámicos tradicionales, también se ha usado el análisis poblacional para determinar la farmacología *in vivo* de compuestos utilizados en etapa preclínica<sup>100</sup>.

Los estudios sobre la relación farmacocinética-farmacodinámica de AAINEs son escasos. Esta escasez se debe principalmente a la dificultad en establecer el curso temporal de la respuesta antinociceptiva en modelos experimentales de dolor. El modelo PIFIR proporciona una estimación confiable de este curso temporal. Así, los conceptos farmacocinéticos-farmacodinámicos pueden ser útiles para extrapolar los datos preclínicos determinados en especies animales a humanos. Lieberman y McMichael<sup>101</sup> reportaron para un compuesto (Tacrolimus) el uso de datos farmacocinéticos-farmacodinámicos de inmunoensayos *in vitro* y modelos animales *in vivo* como una guía formal para identificar un intervalo de concentración terapéutica y de dosis efectiva segura para estudios clínicos de fase I.

Otra herramienta utilizada en la transición de datos preclínicos a clínicos es la extrapolación al humano de datos obtenidos en animales por escalamiento alométrico<sup>102</sup>. Por ejemplo, Cosson y col.<sup>103</sup> usaron una combinación de escalas alométricas y modelos de efecto para seleccionar la dosis de Sumatriptan a utilizar en estudios de fase I. Los autores concluyeron que el diseño y eficiencia de subsecuentes estudios clínicos serían beneficiados por la aplicación de estas técnicas. Khor y col.<sup>104</sup> aplicaron ecuaciones alométricas y modelaje farmacocinético-farmacodinámico en la selección de la dosis para ensayos de fase I de un antagonista recombinante selectivo: el compuesto rPSGL-Ig.

Considerando los antecedentes mencionados, es importante establecer la relación farmacocinética-farmacodinámica de IBU tomando en cuenta los mecanismos involucrados en ambas etapas. Por los resultados determinados en este trabajo, en el que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de IBU, entre la administración con y sin CAF, es poco probable que el sinergismo en el efecto antinociceptivo se manifieste por un mecanismo farmacocinético. Por otro lado, uno de los principales mecanismos de acción farmacodinámico de los AAINEs radica en la inhibición de la síntesis

de prostaglandinas<sup>91</sup>. Para el ketoprofeno se ha reportado que mecanismos alternos participantes en la potenciación del efecto antinociceptivo son los opioides endógenos a nivel supraespinal e inhibición de fosfodiesterasas que metabolizan el AMPc a nivel espinal y fosfodiesterasas que metabolizan el GMPc a nivel supraespinal. Dado que el ketoprofeno y el IBU pertenecen a la misma familia química, es muy probable que estos mecanismos se encuentren involucrados en la potenciación del efecto antinociceptivo de la combinación IBU+CAF. Se requiere llevar a cabo estudios dirigidos a esclarecer los mecanismos farmacodinámicos relacionados con la potenciación antinociceptiva que ejerce la CAF al administrarse con IBU.

# CAPÍTULO V

## Conclusiones

En el modelo PIFIR, la CAF permitió un incremento significativo del efecto antinociceptivo de IBU en las dosis: 10.0, 17.8 y 56.2 mg/kg de IBU combinadas con 17.8 mg/kg de CAF y un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia el lado izquierdo del eje de las abscisas. Los niveles plasmáticos de IBU fueron similares entre la administración con y sin CAF, esto permitió descartar la posibilidad de un mecanismo farmacocinético para explicar el incremento de la actividad antinociceptiva. El efecto analgésico de IBU en función de los niveles plasmáticos mostró un comportamiento de histéresis con sentido contrario a las manecillas del reloj, lo que sugiere un retardo en el equilibrio del fármaco entre el plasma y el sitio de acción. Las ABC del nivel plasmático y del efecto antinociceptivo de IBU (utilizando las dosis: 10.0 17.8, 56.2 y 100.0 mg/kg de IBU solas y combinadas con 17.8 mg/kg de CAF) se ajustaron al modelo  $E_{\max}$  sigmoideal. Las ecuaciones matemáticas que describieron estas relaciones fueron:

Para el ibuprofeno:

$$E = \frac{273.35C^{4.25}}{26.03^{4.25} + C^{4.25}}$$

Para la combinación ibuprofeno+cafeína:

$$E = \frac{331.12C^{6.27}}{33.64^{6.27} + C^{6.27}}$$

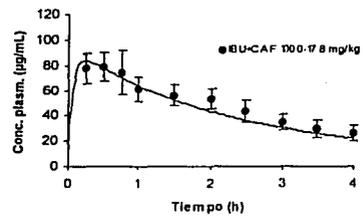
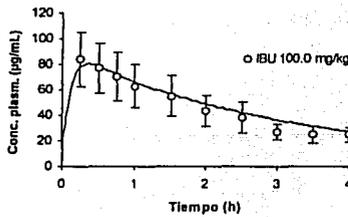
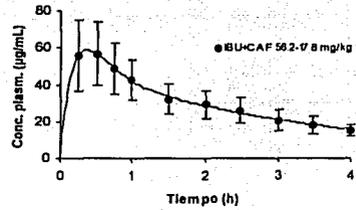
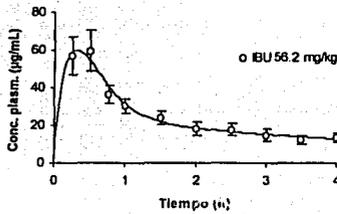
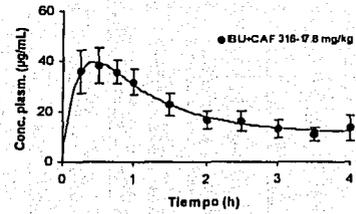
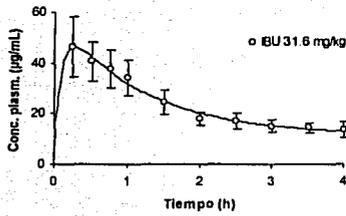
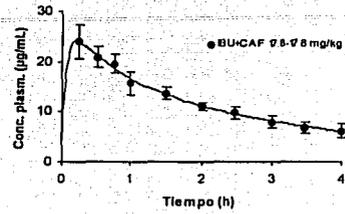
donde:

$E$  = ABC del curso temporal del efecto antinociceptivo (%h)

$C$  = ABC del curso temporal del nivel plasmático de IBU ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

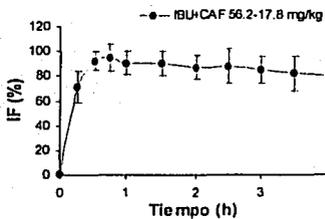
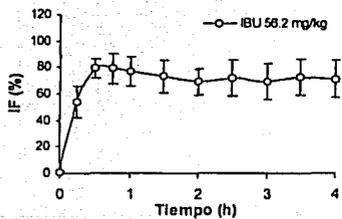
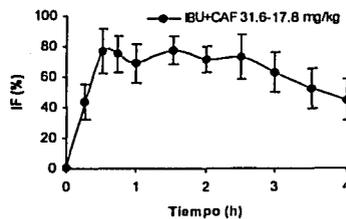
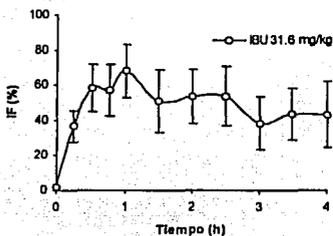
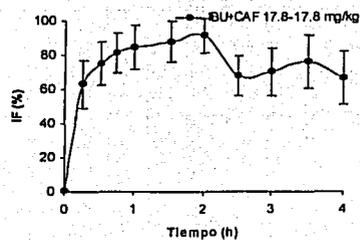
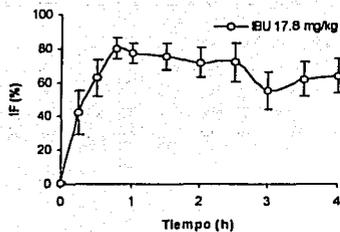
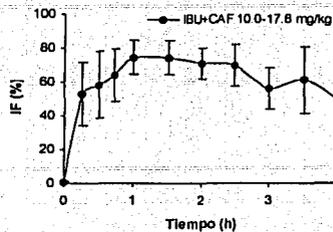
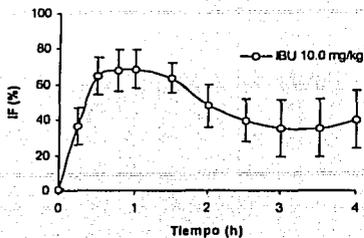
# Apéndice

Cursos temporales del nivel plasmático de IBU determinados después de administrar IBU solo y combinado con CAF. Media  $\pm$  EE, n = 6.

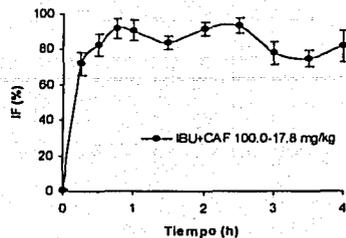
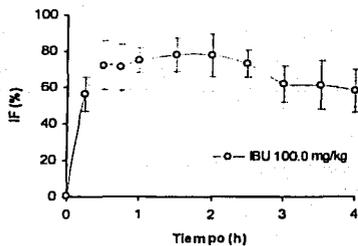


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

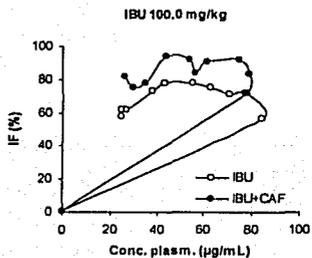
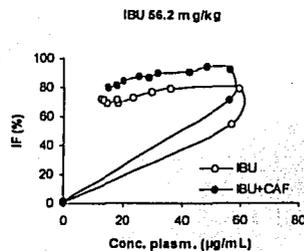
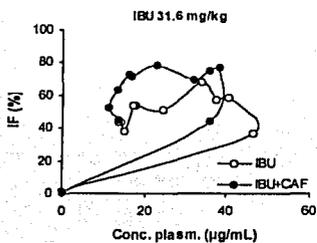
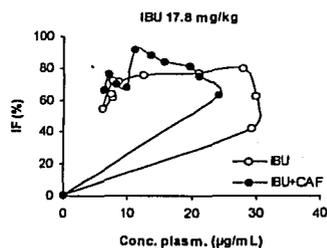
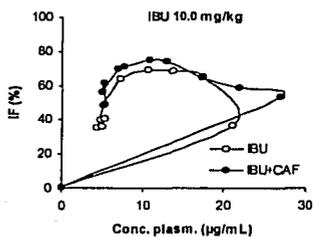
Cursos temporales del efecto antinociceptivo de IBU determinados después de administrar IBU solo y combinado con CAF. Media  $\pm$  EE, n = 6.



TESIS CON  
FALLA LA ORIGEN



Relación entre la concentración plasmática y el índice de funcionalidad (IF) determinado después de administrar IBU solo y combinado con 17.8 mg/kg de CAF. Media,  $n = 6$ . Para mayor claridad se omitieron las barras de error.



TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

## Referencias

---

1. Wall PD, Jones M. Defeating pain. The against a silent epidemic. Ed Plenum Press, New York. 7-10 (1991).
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Gardner P. Analgesic drugs. In Pharmacology. Churchill Livingstone, New York (1995).
3. Dayneka NL, Garg V, Jusko WJ. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J Pharmacokinet Biopharm* 21:457-478 (1993).
4. Jusko WJ, Ko HC. Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. *Clin Pharmacol Ther* 56:406-419 (1994).
5. Otterness IG, Gangs DJ. NSAIDs: An analysis of the relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling. *J Pharm Sci* 77:790-794 (1988).
6. Laska EM, Sunshine A, Marrero I, Olson N, Siegel C, McCormick N. The correlation between blood levels of ibuprofen and clinical analgesic response. *Clin Pharmacol Ther* 40:1-7 (1986).
7. Kelly MT, Walson PD, Edge JH, Cox S, Mortensen ME. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ibuprofen isomers and acetaminophen in febrile children. *Clin Pharmacol Ther* 52:181-189 (1992).
8. Laska EM, Sunshine A, Mueller F, Elvers WB, Siegel C, Rubin A. Caffeine as an analgesic adjuvant. *JAMA* 251:1711-1718 (1984).
9. Sawynok J, Yaksh TL. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanism of action. *Pharmacol Rev* 45:43-75 (1993).
10. Cass IJ, Frederick WS. The augmentation of analgesic effect of aspirin with phenacetin and caffeine. *Curr Ther Res* 4:583-588 (1962).
11. Moertel CG, Ahmann DL, Taylor WF, Schwartz N. Relief of pain by oral medications: a controlled evaluation of analgesic combinations. *JAMA* 229:55-59 (1974).
12. Forbes JA, Jones KF, Kehm CJ, Smith WK, Gongloff CM, Zeleznock JR, Smith JW, Beaver WT, Kroesen M. Evaluation of aspirin, caffeine and their combination in postoperative oral surgery pain. *Pharmacotherapy* 10:387-393 (1990).
13. Forbes JA, Beaver WT. Effect of caffeine on ibuprofen analgesia in postoperative surgery pain. *Clin Pharmacol Ther* 49:674-684 (1991).
14. Laska EM, Sunshine A, Zigelbolm I, Roure C, Marrero I, Wanderling J, Olson N. Effect of caffeine on acetaminophen analgesia. *Clin Pharmacol Ther* 33:498-509 (1983).

15. McQuay HJ, Angell K, Carroll D, Moore RA, Juniper RP. Ibuprofen compared with ibuprofen plus caffeine after third molar surgery. *Pain* 66:247-251 (1996).
16. Seegers JM, Olling M, Jager LP, Van Noorddwijk J. Interactions of aspirin with acetaminophen and caffeine in rat stomach: pharmacokinetics of absorption and cummulation in gastric mucosa. *J Pharm Sci* 69:900-906 (1980).
17. Iqbaq N, Ahmad B, Hussain JK, Hassan GA, Khan NS. The effect of caffeine on the pharmacokinetics of acetaminophen in man. *Biopharm Drug Disp* 16:481-487 (1995).
18. Aguirre BP, Castañeda HG, López FJ, Granados SV. Effect of coadministration of caffeine and either adenosine agonist or cyclic nucleotides on ketorolac analgesia. *Eur J Pharmacol* 377:175-182 (1999).
19. Castañeda G, Castillo MS, López FJ, Granados V, Flores FJ. Potentiation by caffeine of the analgesic effect of aspirin in the pain-induced functional impairment model in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 72:1127-1131 (1994).
20. Engelhardt G, Mauz AB, Pairet M. Role of caffeine in combined analgesic drugs from the point of view of experimental pharmacology. *Arzneimittelforschung* 47:917-927 (1997).
21. Flores DM, Flores FJ, Castañeda G, López FJ. Potentiation of the analgesic effect of tolmetin, a potent non-steroidal anti-inflammatory drug by caffeine in the rat. *Pharm Sci* 1:441-444 (1995).
22. López FJ, Salazar LA, Castañeda G, Villarreal JE. A new model to assess analgesic activity: Pain Induced Functional Impairment In the Rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 28:169-175 (1993).
23. Domínguez AM, Hernández GP, Ventura R, Díaz MI, López FJ. Analgesic efficacy of the combination metamizol+morphine after subchronic treatment in rats. *Drug Dev Res* 51:260-267 (2000).
24. Hernández GP, Ventura R, Díaz MI, Domínguez AM, López FJ. Metamozol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *Eur J Pharmacol* (*in press*).
25. Meibohm B, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development. *J Pharm Sci* 91:18-31 (2002).
26. Bowmand CW, Rand JM. Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas, Aplicaciones clínicas 2ª. Edición, Nueva Editorial Interamericana SA de CV, México (1984).
27. López FJ. Surface of synergistic interaction between dipyron and morphine in the PIFIR model. *Drug Dev Res* 33:26-32 (1994).
28. López FJ, Medina R, Jung H. Potentiation of the analgesic effect of ibuprofen by caffeine in the PIFIR model. In A. Holtz (Ed.), *Advances in the management of acute pain* 218:43-56 London: Royal Society of Medicine Press Ltd. (1996).

29. Díaz MI, Ventura R, Hernández GP, Domínguez AM, López FJ. Effect of caffeine on antinociceptive action of ketoprofen in rats. *Arch Med Res* 32:13-20 (2001).
30. Hoyo C, Pérez J, López FJ. Usefulness of the pain-induced functional impairment model to relate plasma levels of analgesics to their efficacy in rats. *J Pharm Pharmacol* 47:462-465 (1995).
31. Granados V, Flores FJ, López FJ, Salazar LA, Villarreal JE, Castañeda G. Relationship between paracetamol plasma levels and its analgesic effect in the rat. *J Pharm Pharmacol* 44:741-744 (1992).
32. Granados V, López FJ, Hong E, Flores FJ. Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of ketorolac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 272:352-356 (1995).
33. Torres JE, López FJ, Castañeda G, Flores FJ, Granados V. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282:685-690 (1997).
34. Granados V, López FJ, Castañeda G, Salazar LA, Villarreal JE, Flores FJ. Characterization of the analgesic effects of paracetamol and caffeine combinations in the pain-induced functional impairment model in the rat. *J Pharm Pharmacol* 45:627-631 (1993).
35. Hoyo C, Pérez JT, García I, Villalón CM, Terrón JA, López FJ. Relationship between plasma levels of naproxen and analgesic efficacy in rats: synergism with caffeine. *Proc West Pharmacol Soc* 37:91-92 (1994).
36. Insel PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. The pharmacological basis of therapeutics. 9a. Ed. Editado por Hardman JG, Limbird LE, Molonoff PB, Ruddon RW, Goodman A. McGraw-Hill, 647-650 USA (1996).
37. Yaksh TL, Dirig DM, Malmberg AB. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Invest* 16:509-527 (1998).
38. McCormack K, Brune K. Dissociation between the antinociceptive and anti-inflammatory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a survey of their analgesic efficacy. *Drugs* 41:533-547 (1991).
39. Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A. Caffeine induced central cholinergic analgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356:590-595 (1997).
40. Malec D, Michalska E. The effect of methylxanthines on morphine analgesia in mice and rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 40:223-232 (1988).
41. Sawynok J, Reid A. Caffeine antinociception: role of formalin concentration and adenosine A1 and A2 receptors. *Eur J Pharmacol* 298:105-111 (1996).
42. Sawynok J, Reid A, Doak GJ. Caffeine antinociception in the rat hot plate and formaline test and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. *Pain* 61:203-213 (1995).

43. Camman WR, Murria RS, Mushlin PS, Lambert DH. Effects of oral caffeine on postdural puncture headache. *Anesth Analg* 70:181-184 (1990).
44. Ward N, Whiteny C, Avery D, Dunner D. The analgesic effects of caffeine in headache. *Pain* 44:151-155 (1991).
45. López FJ, Castañeda G, Flores FJ, Granados V. Effect of caffeine coadministration and of nitric oxide synthesis inhibition on the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 308:275-277 (1996).
46. Desjardins PJ. Ibuprofen plus caffeine in the management of acute pain. In A. Holtz (Ed.), *Advances in the management of acute pain* 218:73-93 London: Royal Society of Medicine Press Ltd. (1996).
47. Bloomfield SS, Grender JM, Bierer DW, Koochaki PE. Ibuprofen/caffeine for dysmenorrhoea. In A. Holtz (Ed.), *Advances in the management of acute pain* 218:93-104 London: Royal Society of Medicine Press Ltd. (1996).
48. Granados V, Castañeda G. A review of the pharmacokinetic and pharmacodynamic factors in the potentiation of the antinociceptive effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by caffeine. *J Pharmacol Toxicol* 42:67-72 (1999).
49. Debas HT, Cohen MM, Holubitsky IB, Harrison RC. Caffeine stimulated gastric acid and pepsin secretion dose-response studies. *Scand J Gastroenterol* 6:453-457 (1971).
50. Onrot J, Shaeen O, Biaggione I, Goldberg MR, Feely J, Wilkinson GR, Hollister S, Robertson D. Reduction of liver plasma flow by caffeine and theophylline. *Clin Pharmacol Ther* 40:506-510 (1986).
51. Thithapandha A. Effect of caffeine on the bioavailability and pharmacokinetics of aspirin. *J Med Assoc Thai* 72:562-566 (1989).
52. Yoovathaworn KC, Sriwatanakul K, Thithapandha A. Influence of caffeine on aspirin pharmacokinetics. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 11:71-76 (1986).
53. Siegers CP. Effects of caffeine on the absorption and the analgesic effect of paracetamol in rats. *Pharmacology* 10:19-27 (1973).
54. Seegers AJM, Olling M, Jager LP, Noordwijk J. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of non-narcotic analgesic drug mixtures in rats. *Arch Int Pharmacodyn* 251:237-254 (1980).
55. Castañeda G, Estrada T, Pérez J. Caffeine bioavailability after administration with or without nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats. *Pharm Pharmacol Commun* 4:451-453 (1998).
56. Daly JW. Mechanism of action of caffeine. In S. Garattini (Ed.) *Caffeine: Coffee and Health* 97-150 New York: Raven Press.

57. Sawynok J, Reid AR. Neurotoxin-induced lesions to central serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems modify caffeine-induced antinociception in the formalin test and locomotor stimulations in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 27:646-653 (1996).
58. Malmberg AB, Yaksh TL. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA in the formalin test and an isolobographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology* 79:270-281 (1993).
59. Choi OH, Shamin MT, Padgett WL, Daly JW. Caffeine and theophylline analogues: correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci* 43:387-397 (1988).
60. Hatano Y, Mizumoto K, Yoshiyama T, Yamamoto M, Iranimi H. Endothelium-dependent and independent vasodilatation of isolated rat aorta induced by caffeine. *Am J Physiol* 269:H1679-H184 (1995).
61. Cardinali DP. Methylxanthines: possible mechanisms of action in brain. *Trends Pharmacol Sci* 1:405-407 (1980).
62. Boulenger JP, Marangos PJ. Caffeine withdrawal affects central adenosine receptors but not ketorolac analgesia. *J Neural Transm* 78:9-15 (1989).
63. Remington Farmacia, Tomo I, Alfonso R. Genaro, 19ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina (1998).
64. Shah A, Jung D. Dose-dependent pharmacokinetics of ibuprofen in the rat. *Drug Metab Disp* 15:151-154 (1987).
65. Gookin KS. Comparative efficacy of ibuprofen, indomethacin and placebo in the treatment of primary dysmenorrhea. *South Med J* 76:1361-1362 (1983).
66. Roy S. A double-blind comparison of a propionic acid derivative (ibuprofen) and a fenamate (mefenamic acid) in the treatment of dysmenorrhea. *Obstet Gynecol* 61:628-632 (1983).
67. Milsom I, Andersch B. Ibuprofen and naproxen-sodium in the treatment of primary dysmenorrhea: a double-blind cross-over study. *Int J Gynecol Obstet* 23:305-310 (1985).
68. Diamond S. Ibuprofen versus aspirin and placebo in the treatment of muscle contraction headache. *Headache* 23:206-210 (1983).
69. Noyelle RM. Ibuprofen, aspirin and paracetamol compared in a community study. *Pharm J* 238:561-564 (1987).
70. Jain AK. Analgesic efficacy of low-dose ibuprofen in dental extraction pain. *Pharmacotherapy* 6:318-322 (1986).
71. Frame JW. A comparison of ibuprofen and dihydrocodeine in relieving pain following wisdom teeth removal. *Br Dent J* 166:121-124 (1989).

72. Seymour RA. An evaluation of different ibuprofen preparations in the control of postoperative pain after third molar surgery. *Br J Clin Pharmacol* 31:83-87 (1991).
73. Owen H. Ibuprofen in the management of postoperative pain. *Br J Anaesth* 58:1371-1375 (1986).
74. Stambaugh JE, Drew J. The combination of ibuprofen and oxycodone/acetaminophen in the management of chronic cancer pain. *Clin Pharmacol Ther* 44:665-669 (1988).
75. Clark's Isolation and identification of drugs. 2nd Edition, Rittenhouse Book Distributors, UK (2002).
76. Winter L. A double-blind comparative evaluation of acetaminophen, caffeine and the combination of acetaminophen and caffeine in outpatients with post-operative and surgery pain. *Curr Ther Res* 33:115-122 (1983).
77. Schwinghammer TL, Kroboth PD. Basic concepts in pharmacodynamic modeling. *J Clin Pharmacol* 28:388-394 (1988).
78. Covino BG, Dubner R, Gybels J. Ethical standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain* 9:141-143 (1980).
79. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110 (1983).
80. Ritschel WA, Kearns GL. Handbook of basic pharmacokinetics...including clinical applications. Fifth Edition, American Pharmaceutical Association, Washington DC. pp 242-254 (1999).
81. Shah A, Jung D. Improved high-performance liquid chromatographic assay of ibuprofen in plasma. *J Chrom Biom Appl* 344:408-411 (1985).
82. Zar JH. Biostatistical Analysis, 4th Edition, Prentice Hall, USA (1999).
83. Métodos Analíticos, Validación. Comité de colaboradores de guías oficiales de validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. CNQFB México A. C.
84. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 Diario Oficial de la Federación del viernes 7 de Mayo de 1999.
85. Guidance for industry. Bioanalytical methods validation for Human Studies (Draft guidance) U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) December 1998.
86. Rosing H, Man WY, Doyle E, Bult A, Beijnen JH. Bioanalytical liquid chromatographic method validation. A review of current practices and procedures. *J Liq Chrom & Rel Technol* 23(3)329-354 (2000).
87. Shad VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 81(3)309-312 (1992).

88. Holford NHG, Sheiner LB. Kinetics of pharmacologic response. *Pharmacol Ther* 16:143-166 (1982).
89. Upton RN, Doolotte DJ. A quantitative alternative to the hysteresis plot for measurement of drug transit time. *J Pharmacol Tox* 47:45-51 (2002).
90. Campbell DB. The use of kinetic-dynamic interactions in the evaluation of drugs. *Psychopharmacology* 100:433-450 (1990).
91. Cashman JN. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia *Drugs* 52:13-23, Suppl 5 (1996).
92. Flores FJ, Flores Y, Pérez J, Granados V, López FJ, Castañeda G. Relationship between pharmacokinetics and the antinociceptive effect of indomethacin in the rat. *Proc West Pharmacol Soc* 40:111-113 (1997).
93. Sheiner LB, Stansky DR, Vozeh S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: Application to *d*-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 25:358-371 (1979).
94. Holford NHG, Sheiner LB. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling *in vivo*. *CRC Crit Rev Bioengng* 5:273-322 (1981).
95. Koyama R, Kataoka H, Tanaka Y, Nakatsugi S, Furukawa M. Effect of caffeine on ibuprofen-induced gastric mucosal damage in rats. *J Pharm Pharmacol* 51:817-824 (1999).
96. Levy G. Predicting effective drug concentrations for individual patients. Determinants of pharmacodynamic variability. *Clin Pharmacokinet* 34:323-333 (1998).
97. Levy G. The case for preclinical pharmacodynamics. In: Yacobi A, Skelly JP, Shah VP, Benet LZ, editors. The integration of pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicokinetics in rational drug development. New York: Plenum Press. pp 7-13 (1993).
98. Cox EH, Kerbush T, Van der Graaf PH, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effect of synthetic opioids in the rat: Correlation with the interaction at the mu-opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284:1095-1103 (1998).
99. Meibohm B, Brandle M, Fluck M, Kovar A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the novel PDE-5 inhibitor EMD 221 829 in dogs. [abstract] at URL: [http://www.pharmsci.org/scientificjournals/pharmsci/am\\_abstracts/2000/1116.html](http://www.pharmsci.org/scientificjournals/pharmsci/am_abstracts/2000/1116.html)
100. Schwahn M, Nagaraja NV, Derendorf H. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of cetrorelix, a novel LH-RH antagonist, and testosterone in rats and dogs. *Pharm Res* 17:328-335 (2000).
101. Lieberman R, McMichael J. Role of pharmacokinetic-pharmacodynamic principles in rational and cost-effective drug development. *Ther Drug Monit* 18:423-428 (1996).

102. Mahmood I, Balian JD. The pharmacokinetic principles behind scaling from preclinical results to phase I protocols. *Clin Pharmacokinet* 36:1-11 (1999).
103. Cosson VF, Fuseau E, Efthymiopoulos C, Bye A. Mixed effect modeling of sumatriptan pharmacokinetics during drug development. I: Interspecies allometric scaling. *J Pharmacokinetic Biopharm* 25:149-167 (1997).
104. Khor SP, McCarthy K, DuPont M, Murray K, Timony G. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, allometry, and dose selection of rPSGL-Ig for phase I trial. *J Pharmacol Exp Ther* 293:618-624 (2000).