



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**Evaluación del efecto del metileugenol sobre la farmacodinamia del  
diclofenaco en ratones macho**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**CHINAS OROZCO JOYCE**

**Directora de tesis: Dra. Leticia Cruz Antonio**

**Asesor de tesis: Dr. Jesús Arrieta Valencia**

**PAPIIT IN 213918**

**México, Ciudad de México**

**JUNIO 2019**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme las herramientas necesarias para desarrollarme académica y profesionalmente.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por fomentar el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Leticia Cruz Antonio por todas sus enseñanzas, el apoyo, la paciencia y confianza depositada en mí para la realización de este proyecto. Muchas gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con usted.

Al Dr. Jesús Arrieta Valencia por sus conocimientos y recomendaciones para mi proyecto de tesis. Muchas gracias por su apoyo, paciencia y confianza.

Al Dr. Eduardo Roa Coria del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto y por sus enseñanzas.

A los miembros de mi jurado, Dra. Leticia Cruz Antonio, Dr. Jesús Arrieta Valencia, Q.F.B Irma Alejandre Razo, Q.F.B Jacqueline González Cervantes y Mtra. María Dolores Centeotl Castillo Montiel, por todos sus comentarios y aportaciones para enriquecer mi trabajo.

A todos los profesores que a lo largo de mi vida académica me ayudaron a crecer personal y académicamente.

A mi familia y amigos por su apoyo y consejos durante esta maravillosa etapa de mi vida.

## **DEDICATORIA**

A mi madre, María Magdalena Orozco Real, por todo el apoyo, amor y confianza. Por los consejos que me ha brindado a lo largo de mi vida y por siempre alentarme a ser una mejor persona, por ser mi pilar y por todo el sacrificio realizado para que pudiera superarme.

A mis hermanos, Monserrat y Josimar, por estar conmigo siempre en los momentos buenos y malos, por sus consejos y ser cómplices en todas mis decisiones.

A mis mejores amigos, por acompañarme en todos estos años de estudio, pero sobre todo por regalarme momentos inolvidables llenos de aprendizajes, por su apoyo y amistad incondicional.

## Tabla de Contenido

1. Introducción .....	7
2. Marco teórico .....	9
2.1 Dolor .....	9
2.2 Fisiología del dolor.....	9
2.3 Nocicepción .....	10
2.4 Farmacoterapia para el manejo del dolor a través de los AINE's .....	12
2.5 Los AINE's .....	13
2.6 Diclofenaco .....	13
2.7 Interacciones farmacológicas.....	16
2.7.1 Interacciones farmacocinéticas.....	17
2.7.2 Interacciones farmacodinámicas.....	17
2.8 AINE's y plantas medicinales.....	18
2.9 Aceites esenciales y su actividad analgésica.....	20
2.10 Metileugenol.....	23
2.11 Modelos experimentales para el estudio de dolor.....	24
2.12 Análisis isobolográfico .....	26
3. Planteamiento del problema .....	27
4. Hipótesis .....	28
5. Objetivos.....	29
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos específicos .....	29
6. Material y métodos.....	30
6.1 Animales de experimentación.....	30
6.2 Fármacos y reactivos.....	30
6.3 Material .....	30
6.4 Metodología .....	30

7. Resultados .....	35
8. Discusión .....	45
9. Conclusiones .....	48
10. Anexo A .....	49
11. Anexo B .....	50
12. Anexo C.....	51
13. Referencias.....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

El manejo adecuado de diversos padecimientos que progresan con dolor e inflamación como parte de sus síntomas y signos, es una preocupación clínica generalizada que se afronta con el uso de fármacos analgésicos y anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) y esteroideos. Uno de estos AINE's es el diclofenaco sódico, fármaco que posee un amplio margen terapéutico y no requiere de receta médica para su adquisición, aunado al incremento de afecciones dolorosas inflamatorias, ha provocado el incremento del consumo de este fármaco evidenciando una mayor incidencia de eventos adversos. Como una estrategia para afrontar tal situación se ha propuesto la combinación de este tipo de fármaco con la ingesta de plantas medicinales que coadyuven en la actividad anti-inflamatoria de los AINE's y disminuyan sus eventos adversos.

En el presente trabajo están contenidos los estudios realizados para determinar qué tipo de interacción farmacológica puede existir entre el metileugenol (aceite esencial de diversos frutos y plantas medicinales como la *Peperomia hispidula*) y el diclofenaco sódico, ambos administrados por vía oral. Se decidió emplear el metileugenol debido a que existen reportes de que la asociación de extractos de plantas y AINE's pueden aumentar la actividad antinociceptiva de estos fármacos permitiendo el uso de dosis más bajas y limitando sus eventos adversos, además de que metileugenol según otros autores posee actividades antinociceptivas, anti-inflamatorias y anestésicas. Para lo cual, se aplicó la prueba de la formalina a diferentes

grupos de ratones macho. Determinando primeramente la dosis efectiva para cada compuesto de forma individual dentro del intervalo de dosis de 1 a 30 mg/kg, y obtener la dosis efectiva 30 (DE<sub>30</sub>) teórica de la combinación (metileugenol-diclofenaco sódico). A partir de la DE<sub>30</sub> teórica, se definió el intervalo de dosis de la combinación metileugenol-diclofenaco sódico para definir a través de un análisis isoblográfico el tipo de interacción farmacodinámica existente.

Los resultados indican que al administrar de forma conjunta el metileugenol y diclofenaco sódico (0.52 + 1.97, 1.05 + 3.95, 2.09 + 7.89 y 4.18 + 15.78 mg/kg) se presenta una interacción de tipo aditiva, sugiriendo que la nocicepción (efecto farmacológico evaluado) obtenida por la acción combinada de los dos fármacos es igual a la suma de sus efectos individuales.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 DOLOR**

Se define como esa experiencia que asociamos con daño tisular real o potencial. Es incuestionablemente una sensación en una parte o partes del cuerpo, pero también es siempre desagradable y, por lo tanto, también una experiencia emocional. (1)

La definición más aceptada actualmente, es la de la Asociación Mundial para el Estudio del Dolor (IASP): “es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular, real o potencial, descrita en términos de dicho daño”. (2)

La importancia del dolor se debe a que es un mecanismo de defensa, es decir, una señal de alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo. (3)

### **2.2 FISIOLÓGÍA DEL DOLOR**

El dolor es una experiencia compleja multimodal que involucra múltiples sitios neuronales, incluidos los nervios periféricos, la médula espinal y los centros cerebrales superiores. (4)

Las propiedades receptoras específicas de los nociceptores finos mielinizados (fibra A- $\delta$ ) y amielínicos (fibra C) están determinados por los receptores del canal iónico transductores unidos a la membrana, que están controlados por la temperatura, los estímulos químicos o las fuerzas mecánicas, y tras la activación transducen un estímulo externo en un cambio

en el potencial de membrana abriendo un canal sodio / calcio o cerrando un canal de potasio. (4)

El dolor puede ser agudo (comienza de repente) o crónico (cuando es duradero o recurrente) y según su localización puede ser superficial cuando se origina en la piel o las mucosas o visceral cuando se origina en estructuras internas del organismo. (5) El dolor puede clasificarse como: dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor neuropático o dolor disfuncional. (6)

### **2.3 NOCICEPCIÓN**

La nocicepción es la transducción, la conducción y el procesamiento en el sistema nervioso central en señales nerviosas generadas por la estimulación de nociceptores. Es el proceso fisiológico que, una vez llevado a cabo, tiene como resultado una percepción consciente del dolor. (7)

Los estímulos que pueden causar daño, por ejemplo, estímulos térmicos, mecánicos o químicos (llamados también mecanismos periféricos de la nocicepción) producen dolor cutáneo al actuar sobre los nociceptores aferentes primarios. Los nociceptores están muy extendidos en la piel, los músculos, los tejidos conectivos, los vasos sanguíneos y las vísceras. (8)

La nocicepción consiste en cuatro procesos fisiológicos que están sujetos a modulaciones farmacológicas:

1. La transducción que es la traducción de una energía física (estímulo nocivo) en una actividad eléctrica en el nociceptor periférico. Estos

receptores son considerados mecanosensibles, termosensibles y quimiosensibles.

2. La transmisión es la propagación de impulsos nerviosos a través del SNP. Las fibras aferentes A- $\delta$  mielínicas de conducción rápida y fibras C amielínicas, que conducen el dolor latente de forma más lenta.
3. La modulación que tiene lugar a través de los sistemas analgésicos descendentes endógenos (opiáceo, serotoninérgico y noradrenérgico) que modifican la transmisión nociceptora mediante la inhibición de los estímulos que operan dentro de las células del cuerno dorsal de la medula espinal.
4. La percepción la cual, es el proceso final que resulta de la transducción, transmisión, modulación e integración de la función talamocortical, reticular y límbica para producir la experiencia emocional, subjetiva y consciente final de dolor. (7)

El término nocicepción se usa para describir la respuesta neuronal periférica a los estímulos nocivos, que abarca cualquier estímulo, ya sea mecánico, térmico, eléctrico o químico, que pueda dañar el tejido. Típicamente, los estímulos nocivos activan los nociceptores, un subconjunto de neuronas sensoriales periféricas, que tienen una gama de canales iónicos especializados y receptores que transducen estímulos nocivos en señales eléctricas. Estas neuronas son pseudounipolares, con una rama periférica que termina en la piel o vísceras y una rama central que termina en la

médula espinal. Luego, las señales nociceptivas se envían a la médula espinal y al cerebro para procesarse como la sensación de dolor. Por lo tanto, el dolor es una experiencia que abarca componentes sensoriales y emocionales; por lo tanto, el término dolor no es intercambiable con nocicepción. (9)

## **2.4 FARMACOTERAPIA PARA EL MANEJO DEL DOLOR A TRAVÉS DE LOS AINE's**

Existe una gran cantidad de fármacos para el manejo del dolor desde leve a severo con una gran variedad de mecanismos de acción, con una eficacia a menudo limitada y combinada con la aparición de alguna forma de toxicidad inducida por el tratamiento. Especialmente, este último es un factor limitante en el manejo del dolor en los pacientes, ya que conlleva a su incumplimiento, restringe la dosificación adecuada, reduce la calidad de vida del paciente y puede causar morbilidad grave y afecciones peligrosas. La mayoría de las formas de toxicidad son leves y solo causan molestias al paciente. Sin embargo, incluso la presunción de efectos secundarios inofensivos puede ser la causa de una grave morbilidad. (10)

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) continúan siendo los fármacos de primera elección para enfrentar el manejo de la inflamación aguda o crónica y el dolor leve o moderado de forma aguda o crónica, por ejemplo: migraña, enfermedad articular degenerativa, cólico renal, dolor posquirúrgico y fiebre. (11)

## **2.5 LOS AINE's**

Los AINE's son fármacos con una estructura química heterogénea que comparten actividad antipirética, anti-inflamatoria y analgésica debido a su capacidad para inhibir la producción de las prostaglandinas (12). Dichos fármacos tienen un efecto máximo o de techo, lo que quiere decir que el aumento de la dosis no significa una mejora terapéutica y si una mayor incidencia de eventos adversos. (13) Estos fármacos se clasifican en dos grupos: los AINE's convencionales cuya característica es la de inhibir de forma indistinta a las COX, y los AINE's de la nueva generación conocidos también como inhibidores de la ciclooxigenasa 2. (14)

La actividad de los AINE's se atribuye a la capacidad para inhibir selectivamente o no las enzimas ciclooxigenasas. La COX1 es una enzima constitutiva encontrándose principalmente en los vasos sanguíneos, los riñones y el estómago, responsables del estímulo fisiológico (efectos homeostáticos - constitutivos), la COX2 es una enzima inducible la cual se expresa en estados patológicos, es responsable de la inducción de inflamación, dolor y fiebre. (15)

## **2.6 DICLOFENACO**

El diclofenaco es el AINE más recetado a nivel mundial con un 43.40% (16,9) y el octavo medicamento más vendido a nivel mundial (17); con propiedades analgésicas y antipiréticas, es recetado para el manejo del dolor como, por ejemplo: la dismenorrea, la inflamación ocular, la osteoartritis, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la queratosis actínica. (18)

El diclofenaco, como otros AINE's no selectivos, inhibe la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de las isozimas COX-1 y COX-2 en los tejidos lesionados y el sistema nervioso central. Sin embargo, existe evidencia de que mecanismos adicionales independientes de prostaglandinas están involucrados en el mecanismo de acción antinociceptivo del diclofenaco tanto a nivel periférico como central. En este sentido, se reporta que el diclofenaco abre los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP además de regular a la baja nociceptores periféricos por estimulación de la vía L-arginina-ON-GMPc. Como resultado de la apertura del canal de potasio, el potasio se escapa de la neurona dando como resultado una hiperpolarización y una excitabilidad reducida. Los efectos antipiréticos pueden deberse a la acción sobre el hipotálamo, lo que resulta en dilatación periférica, aumento del flujo sanguíneo cutáneo y posterior disipación de calor. (18,19)

El diclofenaco, similar a otros AINE's, se asocia con un mayor riesgo de efectos secundarios graves relacionados con la dosis, siendo los más frecuentes los gastrointestinales, cardiovasculares y renales. (16) Los eventos adversos gastrointestinales se producen debido a la inhibición de la síntesis de prostanoïdes, lo que limita la secreción de moco y bicarbonato que normalmente protege a la mucosa gástrica de las lesiones. La PGI<sub>2</sub>, un producto importante de COX-1 y COX-2, cumple una función fisiológica como vasodilatador y potente inhibidor de plaquetas. La evidencia preclínica como la clínica indican que la supresión de la síntesis de PGI<sub>2</sub> aumenta el riesgo

de hipertensión y trombosis y esto estaría relacionado al riesgo cardiovascular asociado con el consumo de diclofenaco. (16) Además, el uso de los AINE's puede aumentar la posibilidad de ulceración del intestino y también la muerte por sangrado de úlcera en pacientes con colitis, enfermedad de Crohn u otras enfermedades inflamatorias intestinales.

La autorización en el año 1999 por la Agencia Norteamericana de Control de Medicamentos y Alimentos, Food and Drug Administration (FDA), de los primeros agentes anti-inflamatorios selectivos de la COX 2 o Coxibs, Celecoxib y Rofecoxib, provocaron gran entusiasmo en el colectivo médico mundial, ya que por primera vez se disponía de piezas terapéuticas para el control del dolor y de la inflamación con eficacia similar a los AINE's convencionales, pero con menor posibilidad de desencadenar eventos adversos, principalmente gastrointestinales, debido a su capacidad para inhibir la COX-2 , respetando a la COX-1. Desafortunadamente, tras la esperanza inicial, varios estudios mostraron un riesgo similar a los AINE's convencionales para desarrollar eventos adversos gastrointestinales a largo plazo y un riesgo aumentado en la aparición de eventos adversos cardiovasculares de tipo aterotrombótico, principalmente de infarto agudo de miocardio. Las agencias internacionales de farmacovigilancia o detección de efectos secundarios postcomercialización restringieron sus indicaciones y alertaron a médicos y pacientes sobre sus efectos nocivos graves. (13)

Se han adoptado una serie de enfoques para reducir el riesgo de complicaciones no deseadas inducidas por los AINE's, incluida la reducción

de la dosis de los AINE's, y el uso de agentes gastroprotectores concomitantes de origen sintético (omeprazol, esomeprazol, rabeprazol e inhibidores de H<sub>2</sub>, ranitidina, cimetidina) o de origen natural, como son el uso de plantas medicinales. (20) La combinación de analgésicos a dosis más bajas es otra estrategia atractiva para maximizar la relación beneficio-riesgo de la farmacoterapia para el dolor con los AINE's. Este enfoque está diseñado para evitar los eventos adversos limitantes de la dosis de la terapia con un solo agente. La factibilidad de esta alternativa es determinada a través de establecer si la interacción farmacológica de estos agentes puede dar como resultado una eficacia aditiva, y posiblemente un efecto sinérgico, al proporcionar actividad analgésica en más de un nivel de señal del dolor. (21,22)

## **2.7 INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS**

Una interacción farmacológica es aquella que ocurre cuando los efectos de un fármaco se modifican por la acción de otro fármaco, una bebida, un alimento o un agente químico ambiental. (23) Las interacciones fármaco-fármaco son una de las causas más comunes de reacciones adversas, dichas reacciones son más comunes en los ancianos debido a la politerapia. De hecho, la politerapia aumenta la complejidad del tratamiento y por lo tanto aumenta la posibilidad de interacciones farmacológicas, las cuales pueden incluir el desarrollo de reacciones adversas medicamentosas y el aumento o reducción de la eficacia clínica. (24) Otras variables que pueden influir en la

aparición y consecuencias de la interacción son: sexo, características morfológicas y condiciones fisiopatológicas del paciente; entre otras. (25)

La interacción fármaco-fármaco pueden clasificarse como:

- Farmacocinética: implica que la absorción, distribución, el metabolismo y la excreción, pueden estar asociados a fracaso o toxicidad del tratamiento.
- Farmacodinámica: la cual se subdivide en tres grupos según se pueda presentar 1) efecto directo en la función del receptor 2) interferencia con un proceso de control biológico o fisiológico y 3) efecto farmacológico aditivo/opuesto. (24)

### **2.7.1 INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS**

Las interacciones farmacocinéticas son aquellas debidas a la influencia que tiene un fármaco sobre el ciclo de otro en el organismo. Incluye alteraciones de la absorción, distribución, metabolismo y excreción. (25)

### **2.7.2 INTERACCIONES FARMACODINÁMICAS**

Las interacciones farmacodinámicas son aquellas en las que los efectos de un fármaco cambian por la presencia de otro en el sitio de acción. Cuando se produce una sumación de efectos, sea beneficiosa o perjudicial, se habla de agonismo de los fármacos. Por el contrario, cuando la asociación redundante en una disminución de la eficacia, lo que con mayor frecuencia no beneficia al paciente salvo cuando precisa revertir una situación de intoxicación, se habla de antagonismo. Por último, existe también lo que se denomina potenciación de efectos, en este caso, los mecanismos de los fármacos implicados no se

complementan entre sí, si no que uno de ellos favorece el incremento de la respuesta al otro. (23) Ver figura 1

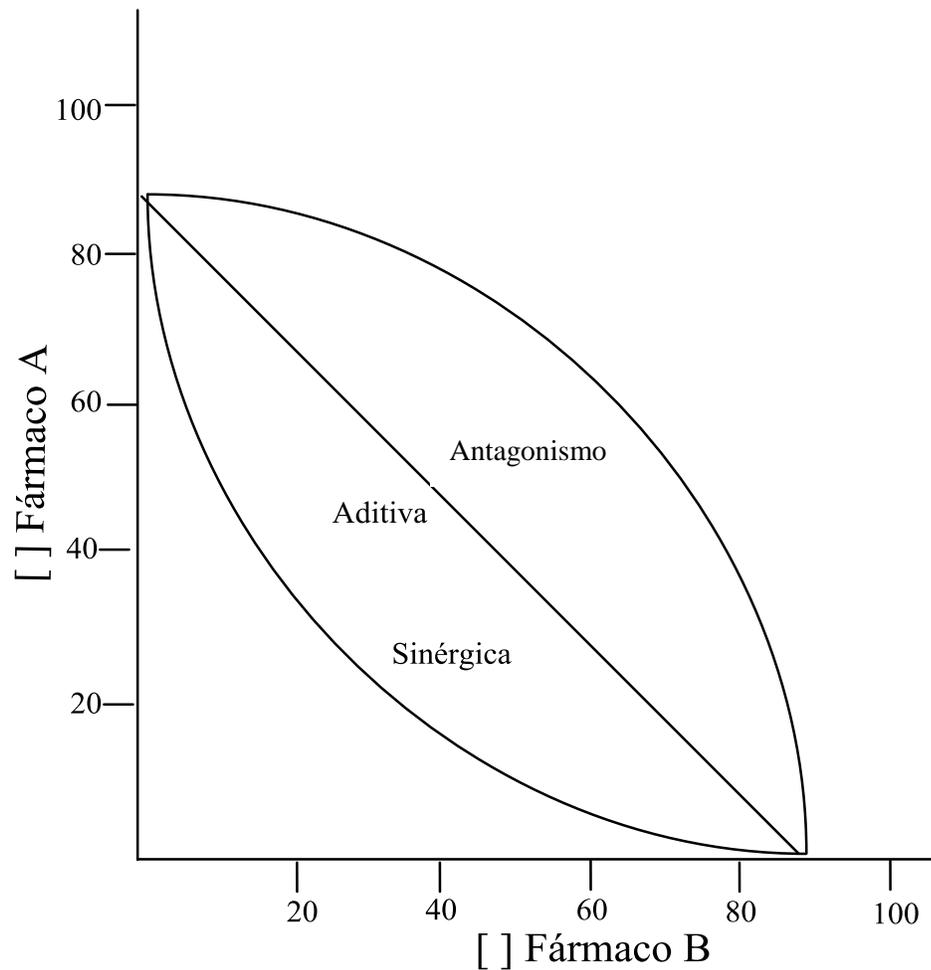


Figura 1. Interacciones farmacodinámicas

## 2.8 AINE's Y PLANTAS MEDICINALES

Como se ha mencionado los AINE's pueden reducir el dolor y la inflamación al bloquear el metabolismo del ácido araquidónico por las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y/o COX-2), lo que inhibe la producción de prostaglandinas, pero están asociados a efectos secundarios tras su

administración. Sin embargo, hay plantas medicinales o metabolitos de éstos con efectos terapéuticos anti-inflamatorios con poco o ningún efecto secundario. (26) Las plantas medicinales se han utilizado en los países en desarrollo como tratamientos alternativos a los problemas de salud. Muchos extractos de plantas y aceites esenciales aislados de plantas han mostrado actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que ha inspirado una investigación intensa sobre su uso en la medicina tradicional. (27) México tiene una rica tradición en la utilización de plantas medicinales entre sus diversas prácticas de curación popular. Se estima que la flora medicinal mexicana contiene entre 3000 y 5000 plantas que tienen un potencial beneficio medicinal, del cual solo aproximadamente el 1% de ellos se han estudiado en profundidad, en relación con sus posibles propiedades medicinales. (28)

Como ocurre con cualquier fármaco, los compuestos activos de las plantas medicinales pueden interactuar con otros principios activos (de origen natural o sintético) que el paciente esté recibiendo; la incidencia de estas interacciones, y en muchas ocasiones su significado, son desconocidos. (29)

Los productos naturales son fundamentales en la búsqueda de nuevos analgésicos para el manejo del dolor. Yunes y colaboradores publicaron la obtención de compuestos analgésicos a partir de glucósidos, alcaloides, flavonoides y terpenos. (30)

Un ejemplo exitoso de un fármaco obtenido a partir de un producto natural es la morfina, un opioide extraído de la planta *Papaver somniferum*. En el 2001

un estudio resume 210 plantas provenientes de diferentes partes del mundo, que presentan actividad analgésica a nivel central tal como la morfina y potencialmente pueden conducir al desarrollo de eventos adversos de la morfina y fármacos relacionados. (31)

El uso de plantas medicinales o compuestos derivados de éstas como alternativa a la disminución de eventos adversos de los AINE's, puede ser beneficiosa o peligrosa, lo que lleva a un aumento de la actividad anti-inflamatoria o al aumento de varios eventos adversos, tal como se ha reportado para diversos AINE's. (14)

## **2.9 ACEITES ESENCIALES Y SU ACTIVIDAD ANALGESICA**

Los aceites esenciales de plantas son mezclas complejas de compuestos volátiles, que se aíslan por métodos físicos (prensado y destilación) de una planta completa o partes de plantas (hojas, corteza, frutas, flores, etc.). La identidad y la cantidad relativa de estas sustancias volátiles en los aceites esenciales es bastante variable y tienen varias funciones ecológicas en la planta, incluida la atracción de insectos polinizadores, como mensajeros internos y como sustancias protectoras contra herbívoros.

Los efectos farmacológicos de los aceites esenciales y sus principales constituyentes incluyen la antinocicepción, antioxidante, actividades anticancerígenas y anti-inflamatorias. La actividad biológica de los aceites esenciales, es atribuida al resultado de un sinergismo entre todas las moléculas que los constituyen o reflejan solo la actividad de sus constituyentes principales. Por lo tanto, las funciones sinérgicas de las

diversas moléculas presentadas en un aceite esencial, en comparación con la acción de uno o dos de sus componentes principales, podrían ser cuestionables, si no se cuenta con estudios científicos sustentables.

Diversos reportes sugieren el potencial terapéutico de los aceites esenciales y algunos de sus componentes volátiles aislados en la prevención o terapia del dolor en modelos experimentales, al evidenciar sus efectos antinociceptivos en diferentes modelos y su mecanismo de acción bastante variable. Sin embargo, hay un número limitado de medicamentos analgésicos disponibles en el mercado hechos a partir de aceites esenciales y terpenoides. (27)

**Tabla 1. Modelos usados para evaluar el efecto antinociceptivo de los aceites esenciales.**

<b>Aceites esenciales de plantas</b>	<b>Prueba realizada</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Dosis probada (mg/kg)</b>
Schinus terebinthifolius Raddi	SNI animales sensibilidad mecánica hiperalgesia fría	oral	10-100
Duguetia lanceolata A. St.-Hill	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II)	intraperitoneal	1-200
Xylopiia laevigata (Mart.) R. E. Fr.	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II)	intraperitoneal	12.5-50
Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II)	Oral	100-400
	Ácido acético opiodérgico e histamina receptores H <sub>1</sub> y H <sub>2</sub>	oral	100-400
Carum copticum (L.) Benth. & Hook. F. ex. C. B. Clarke	Prueba de formalina (fase I y II)	intraperitoneal	20
Cuminum cyminum L.	Prueba de formalina (fase I y II) Movimiento de cola	intraperitoneal	0.0125-2
Distichoselinum tenuifolium (Lag.) F. Garcia Mart. & Silvestre	Ácido acético Placa caliente Prueba de formalina (fase	oral	25-75

	I y II)		
Heracleum persicum Desf. Ex Fisch., C. A. Mey. & Avé-Lall.	Ácido acético Prueba de formalina (fase II)	oral	50-100
Pimpinella anisum L.	Movimiento de cola Prueba de formalina (fase I y II)	intraperitoneal	125-250
Achillea aleppica DC.	4-benzoquinona	intraperitoneal	200
Ageratum fastigiatum (Gardner) R. M. King & H. Rob.	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II) Placa caliente	intraperitoneal	100-200
Artemisia absinthium L.	Ácido acético Prueba de formalina Placa caliente	intraperitoneal	2-8
Artemisia dracunculus L.	Ácido acético Prueba de formalina Placa caliente	intraperitoneal	10-300
Vanillosmopsis arbórea (Gardner) Baker	Modelo de mostaza nocicepción visceral	intraperitoneal	5-50
	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II)	intraperitoneal	5-50
Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand	Prueba de formalina (fase I y II) Placa caliente Capsaicina Movimiento de cola	oral	50-100
Cyperus esculentus L.	Prueba de formalina (fase I y II)	oral	250-500
Cyperus rotundus L.	Prueba de formalina (fase I y II)	oral	250-500
Remirea marítima Aubl.	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II)	oral	50-200
Croton adamantinus Mull. Arg.	Ácido acético Prueba de formalina	oral	10-100
Croton cordiifolius Baill.	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II) Glutamato Capsaicina Evaluación de la participación de opioides	intraperitoneal	50-100
Croton nepetaefolius Baill.	Ácido acético Placa caliente Prueba de formalina (fase I y II) Capsaicina	oral	30-300
Croton sonderianus Mull. Arg.	Ácido acético Capsaicina Prueba de formalina (fase I y II) Sistema opioide	oral	50-200

	Canales de potasio		
Hyptis pectinata (L.) Poit.	Ácido acético Placa caliente Mecanismo opioide	intraperitoneal	10-100
Lavandula angustifolia Mill.	Ácido acético Prueba de formalina (fase I y II)	oral	50 y 200

## 2.10 METILEUGENOL

Metileugenol (1-aquil-3,4-dimetoxibenzeno) es un compuesto natural, el cual forma parte de varios aceites esenciales, incluidos los de albahaca, nuez moscada, macis, anís, clavo de olor, hierba de limón, hoja de laurel, y frutas. Se usa como sustancia aromatizante en una amplia variedad de productos dietéticos, como galletas, helados y bebidas no alcohólicas, además es encontrado en cosméticos, jabones, shampoos, fragancias y productos herbales en Europa, EE. UU. y otros países. (32) Al metileugenol se le han reportado actividades biológicas tales como depresor del sistema nervioso central, anestésicas, hipotérmicas, antianafilaxis, antinociceptivas, anti-inflamatorias, miorelajantes y anticonvulsivas (33). Por otro lado, un estudio biodirigido mostró que metileugenol es el responsable de la actividad gastroprotectora de *Peperomia hispidula* (33), además de también tener efecto antinociceptivo en estímulos nociceptivos intensos agudos, usando la prueba de la formalina se observó que metileugenol inhibió significativamente la duración de la segunda fase de la prueba de formalina y también inhibió los comportamientos relacionados con el dolor inducidos por la inyección intratecal de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA); siendo su mecanismo de

acción la inhibición del receptor NMDA a través de los receptores GABA A. (32,27)

## **2.11 MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE DOLOR**

Los estudios de dolor en humanos son difíciles de realizar, son subjetivos y están limitados por consideraciones éticas, lo que lleva al uso generalizado de animales como modelos para estudiar el dolor, y las especies más utilizadas son ratones y ratas. El uso de modelos animales presenta también desafíos éticos y los relacionados con la cuantificación adecuada de las respuestas de comportamiento que podrían considerarse equivalentes al dolor en los seres humanos, dado que debe asumirse la existencia de una “experiencia sensorial y emocional desagradable” ante un estímulo potencialmente dañino (nocicepción), la cual es una función fisiológica fundamental en los mamíferos y en muchas otras especies. Como el dolor no puede medirse directamente en roedores, existen métodos indirectos para cuantificar y evaluar conductas similares al dolor (la retirada de una parte del cuerpo de un estímulo, una ambulación reducida, agitación o un aumento de aseo del área afectada) en animales no anestesiados que son confiables, reproducibles, y sensibles. (9,34,35) Uno de los modelos de medición usados es la prueba de la formalina.

Esta prueba permite evaluar la forma en que el animal responde a un estímulo de tipo moderado, continuo generado por un daño tisular y la reacción inflamatoria inducida tras la administración de una sustancia irritante (formaldehído). La prueba de formalina produce respuestas nociceptivas

cuantificables y reproducibles en varias especies. La respuesta conductual después de la inyección intraplantar de formalina es bifásica: la primera fase inicia después de la administración y tarda de 3 a 10 minutos. En esta fase se presentan conductas como son: lamido, elevación, sacudida, mordisqueo y protección de la pata inyectada. Después existe una etapa de 10-15 minutos donde los animales muestran escasa conducta que pudiera interpretarse como nociceptiva. Posterior a dicha etapa, se presenta una segunda fase que inicia aproximadamente 15-20 minutos después de la inyección de formalina y tarda de 20 a 40 minutos, se ha propuesto que la segunda fase está mediada por la combinación de una actividad de las fibras aferentes y un incremento de la sensibilidad de las neuronas de la médula espinal. (19)

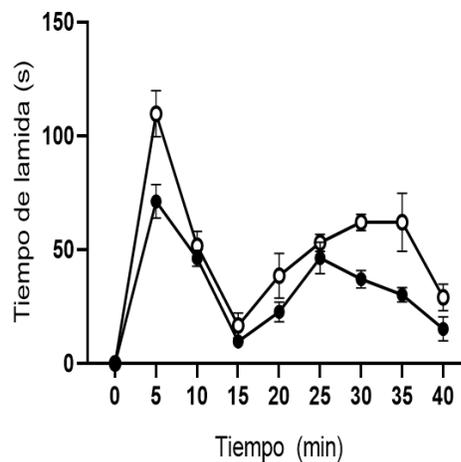


Figura 2. Gráfico curso temporal en la prueba de la formalina

## 2.12 ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO

El isoblograma es un método gráfico que nos permite analizar el tipo de interacción farmacodinámica en combinaciones analgésicas, mediante la evaluación de dosis equi-efectivas, estableciendo una línea de actividad que surge del nivel de efecto determinado para cada fármaco individual. (36)

Para la construcción del isoblograma lo primero que debe hacerse es construir una curva dosis-respuesta para cada fármaco, a partir de la cual se conocerá la  $DE_{50}$ , la  $DE_{50}$  o cualquier otra dosis del fármaco A se traza en el eje "x" y la dosis del fármaco B se traza en el eje "y", se unen los puntos y el punto medio representa la  $DE_{50}$  teórica de la combinación de los fármacos a partir de la cual se obtienen las fracciones para obtener la  $DE_{50}$  experimental de la combinación.

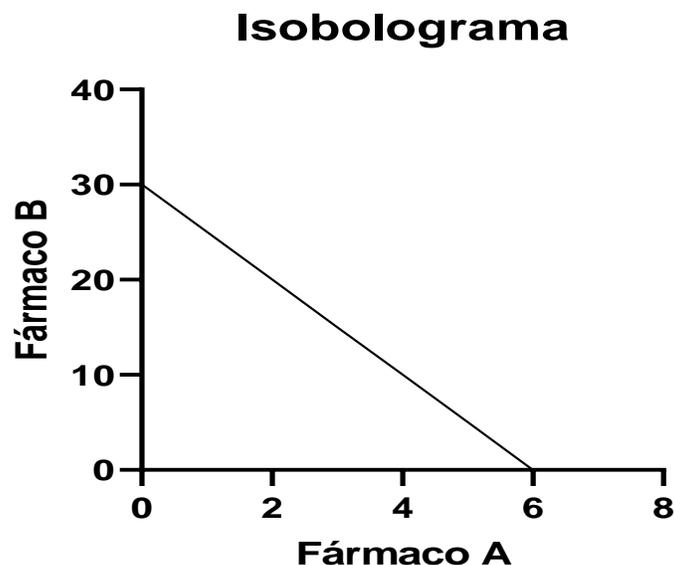


Figura 3. Construcción del isoblograma

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El manejo adecuado del dolor es una preocupación clínica generalizada y los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos se usan con frecuencia a nivel mundial para aliviar este dolor; su uso extendido se debe a que en general poseen un amplio margen terapéutico y a que varios no requieren de receta médica para su adquisición (37). Pero el aumento en el consumo de este tipo de medicamentos aunado al incremento de la dosis recomendada los expone a presentar con mayor frecuencia eventos adversos (37). Como una alternativa a lo anterior se ha propuesto la ingesta de plantas medicinales que coadyuven en la actividad anti-inflamatoria de los AINE's y protejan o disminuyan sus eventos adversos (20). Conociendo que el metileugenol proveniente de la planta medicinal mexicana *Peperomia hispidula* ha sido propuesto como agente gastroprotector y con actividad antinociceptiva (33), es necesario conocer si el metileugenol compuesto activo de la planta medicinal mexicana *Peperomia hispidula* puede tener una interacción farmacodinámica favorable o desfavorable en la actividad antinociceptiva del diclofenaco sódico usando el modelo de formalina, contribuyendo al acervo de conocimiento científico en el tema de interacciones entre plantas medicinales y fármacos de uso común.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si el metileugenol presenta actividad antinociceptiva al igual que el diclofenaco sódico, al administrarse de manera conjunta se presentará una potenciación o sinergismo del efecto analgésico.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la farmacodinamia de la combinación de diclofenaco sódico-metileugenol en ratones macho para determinar si existe interacción (aditiva, sinérgica o potenciación) entre los fármacos administrados de manera concomitante usando un modelo de formalina en ratón.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la dosis efectiva 30 de metileugenol, diclofenaco sódico y la combinación diclofenaco sódico-metileugenol.
- Evaluar si existe una interacción farmacodinámica de la combinación diclofenaco sódico-metileugenol usando el modelo de formalina, a través de un análisis isoblográfico.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Ratones machos CD1 de 6 semanas con un peso corporal de 25-30 g aproximadamente sin tratamiento previo. Provenientes del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

### **6.2 FÁRMACOS Y REACTIVOS**

- Diclofenaco sódico, metileugenol y solución de formaldehido Sigma-Aldrich
- Tween 80
- Solución salina

### **6.3 MATERIAL**

- Cilindros transparentes de acrílico 15x30 cm
- Espejos de 15x15 cm
- Jeringas de insulina
- Cronómetro
- Sonda nasogástrica metálica

### **6.4 METODOLOGÍA**

Se formaron 13 grupos individuales de 6 ratones cada uno. Una vez identificados recibieron 1 de los 4 siguientes tratamientos por administración oral antes de la prueba de formalina: 1) control (solución salina con Tween 80 al 0.5%), 2) metileugenol en dosis crecientes de 1-30 mg/kg, 3) diclofenaco sódico en dosis crecientes de 1-30 mg/kg y 4) metileugenol-

diclofenaco sódico en las dosis de 0.52 + 1.97, 1.05 + 3.95, 2.09 + 7.89 y 4.18 + 15.78 mg/kg

A. Prueba de la formalina.

- a. Evaluación biológica. En un cuarto aislado de ruido a temperatura aproximada de 25 °C, cada ratón (previamente puesto en ayuno) se colocó para su adaptación en un cilindro transparente de acrílico de 30 cm de diámetro por 15 cm de altura con 2 espejos de 15x15 cm colocados atrás del cilindro formando un ángulo de 90° entre los dos espejos, esto con el fin de aclimatar al ratón y observar su comportamiento (38). Posteriormente, el ratón fue retirado para la administración oral de la sustancia a estudiar. Treinta minutos después se inyectó 20 µL de formalina al 2.5% en el dorso de la pata trasera derecha del ratón y se regresó a la cámara, para iniciar la observación del comportamiento nociceptivo por periodos de un minuto cada cinco minutos durante 40 minutos. El tiempo dedicado a lamer la pata inyectada se tomó como comportamiento antinociceptivo.
- b. Presentación de resultados. Los datos obtenidos se expresaron como cursos temporales, en el eje de las abscisas se graficó el tiempo de duración de la prueba y en el eje de las ordenadas el comportamiento nociceptivo del animal (tiempo acumulativo lamidas de la pata). Con los cursos temporales se determinó el por ciento de efecto nociceptivo evocado en la segunda fase de la prueba de la formalina.

El porcentaje de efecto nociceptivo se calculó a partir del tiempo total de lamido evocado durante la fase II mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ antinocicepción: } \frac{\text{tiempo control de lamido} - \text{tiempo de prueba de lamido}}{\text{tiempo control de lamido}} \times 100$$

- c. Análisis de los datos. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media de 6-8 animales. La curva dosis respuesta para el curso temporal de la actividad de cada dosis de fármaco se construyó trazando el tiempo de lamida contra la dosis logarítmica y por análisis de regresión lineal. Las diferencias estadísticas entre los grupos en las curvas dosis-respuesta se determinaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de la prueba de Dunnett.
- B. Evaluación del efecto antinociceptivo de Metileugenol y Diclofenaco sódico administrados de forma individual. Determinación de una dosis efectiva.

Grupo control.

Se administró por vía oral 500  $\mu$ L de tween 80 al 0.5 % (vehículo) 30 minutos antes de administrar por inyección subcutánea en la parte dorsal de la pata derecha del ratón 20 $\mu$ L de formalina. Una vez administrada la formalina se contabilizó y registró el tiempo de lamida del sitio donde se realizó la inyección, por 40 minutos en intervalos de 5 minutos. La representación de los datos obtenidos para establecer la curva dosis-respuesta y el análisis de los mismos se realizó como se señala en la prueba de la formalina, inciso “b” y “c”. El procedimiento anterior se realizó por sextuplicado.

Grupos tratamiento.

A 4 grupos independientes de ratones, se les administró dosis crecientes (1 a 30 mg/kg) de diclofenaco sódico, por vía oral, 30 minutos antes de administrar 20  $\mu$ L de formalina de la misma forma que en el grupo control. Una vez administrado el diclofenaco sódico, se contabilizó y registró el tiempo de lamida del sitio donde se realizó la inyección, por 40 minutos en intervalos de 5 minutos. La representación de los datos obtenidos y el análisis de los mismos se realizó como se señala en el grupo control. El procedimiento anterior se realizó por sextuplicado para cada dosis y de igual manera para el metileugenol.

Con las curvas dosis respuesta obtenidas para cada fármaco de forma individual y mediante análisis de regresión lineal se obtuvieron sus dosis efectivas 30 ( $DE_{30}$ )

#### C. Obtención de isoblograma

La interacción entre diclofenaco sódico y metileugenol, se evaluó llevando a cabo el análisis isoblográfico. Para ello una vez obtenidas las dosis efectivas 30 ( $DE_{30}$ ), se construyó el isoblograma trazando una línea entre el valor  $DE_{30}$  de metileugenol en la abscisa y el valor  $DE_{30}$  de diclofenaco sódico en la ordenada para obtener la línea aditiva teórica (39). Con base al valor teórico de  $DE_{30}$  obtenido de la combinación se calculó y efectuó la coadministración de los compuestos, en proporción 1:1, por vía oral de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus  $DE_{30}$ , en un esquema de proporciones fijas construyéndose posteriormente la curva dosis-respuesta con base en las

fracciones administradas y determinar la DE<sub>30</sub> experimental de la combinación.

La región del gráfico donde se ubica el valor DE<sub>30</sub> experimental en relación al valor DE<sub>30</sub> teórico y el valor del índice de interacción, determinó el tipo de interacción. La diferencia entre la DE<sub>30</sub> teórica y experimental de la combinación se examinó mediante la prueba t de student.

El índice de interacción (medida cuantitativa de la interacción entre dos fármacos) y el intervalo de confianza para la DE<sub>30</sub> fue calculado (30) empleando la siguiente expresión:

$$\gamma = \frac{DE\ 30\ experimental}{DE\ 30\ teórica}$$

En nuestro estudio, el índice de interacción describe la DE<sub>30</sub> experimental como una fracción de la DE<sub>30</sub> teórica. Valores cerca de 1 indicarán una interacción aditiva, mientras que valores mayores a 1 implicarán una interacción antagónica y valores menores que 1 indican una potenciación. Se consideró que existían diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

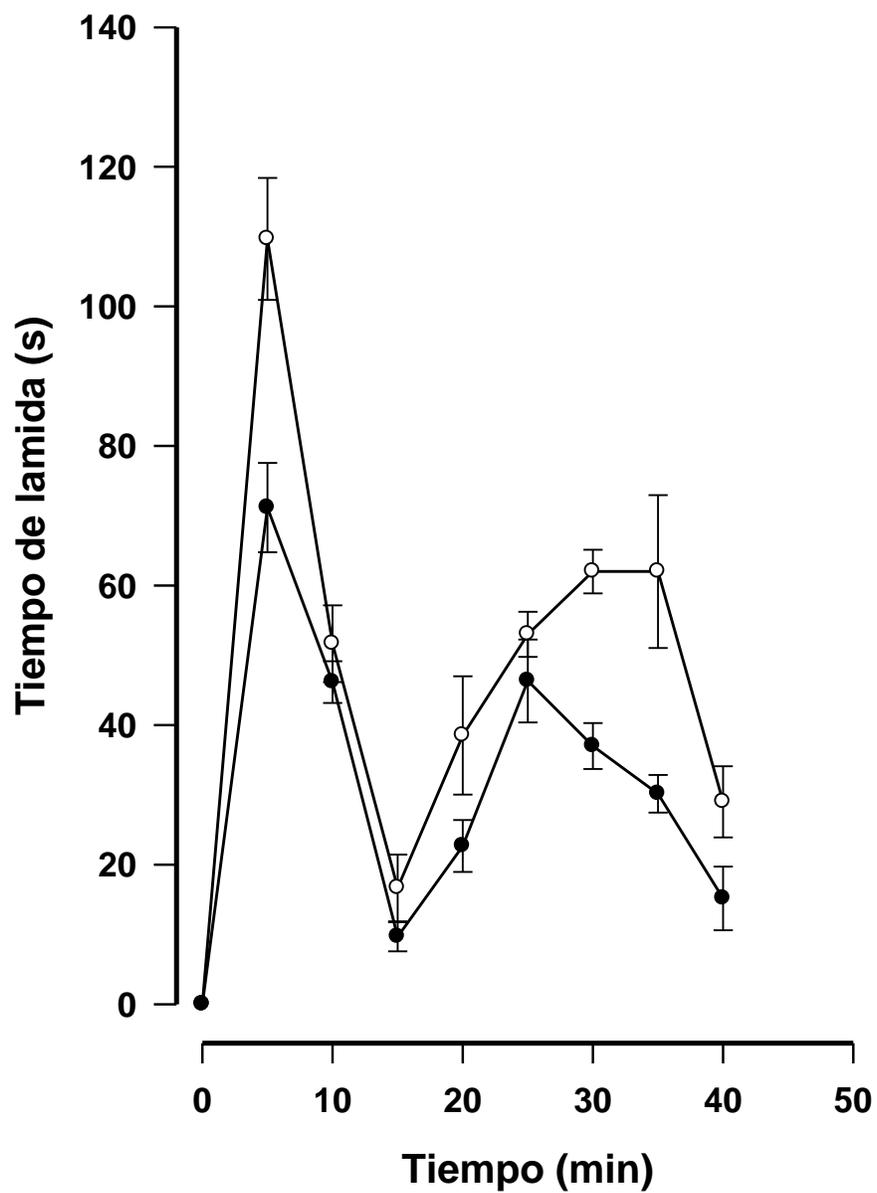
## 7. RESULTADOS

La inyección subcutánea de formalina al 2.5% en la pata derecha trasera de los ratones produjo un patrón típico de encogimiento y lamida de la pata administrada con formalina caracterizado por un curso temporal bifásico en todos los grupos estudiados: control (vehículo), metileugenol, diclofenaco sódico y la combinación metileugenol-diclofenaco sódico. Los cursos temporales para cada una de las dosis y compuestos estudiados se presentan el Anexo A, B y C.

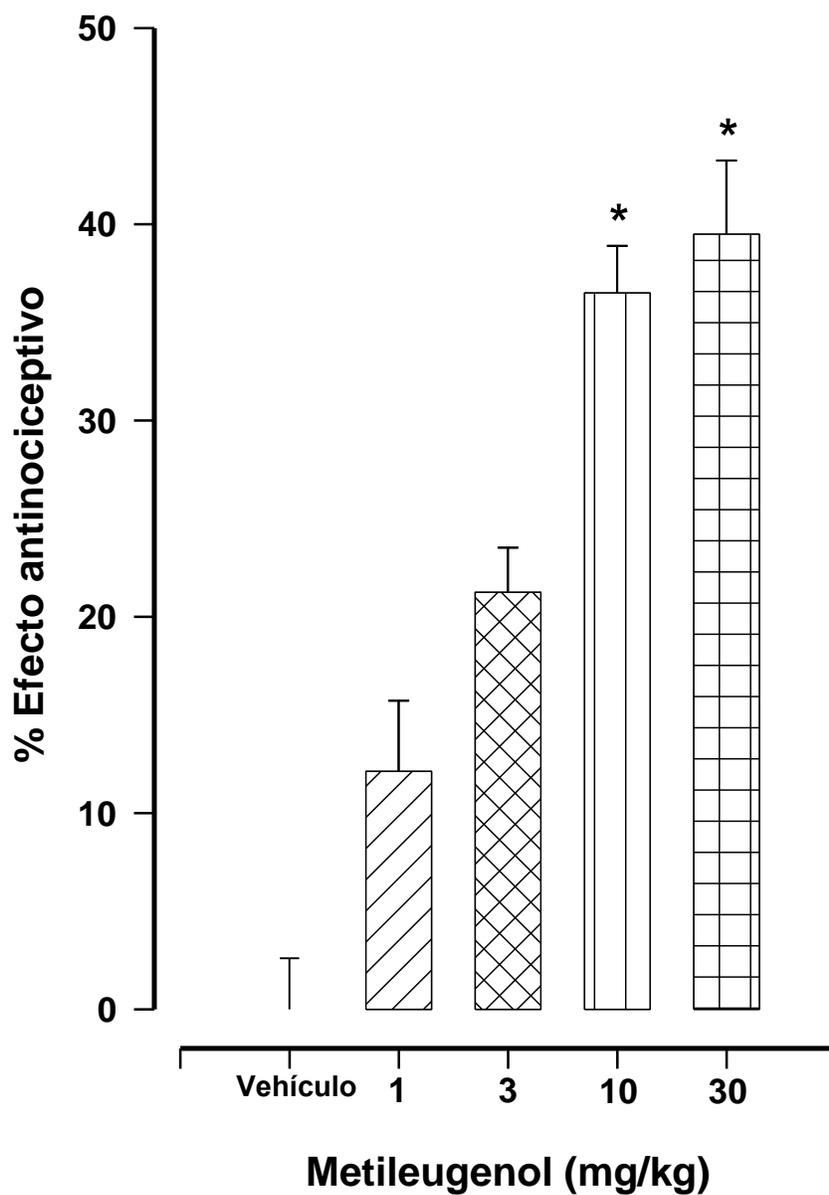
### **Efecto antinociceptivo de metileugenol administrado de forma individual.**

La administración oral de metileugenol (Figura 1-2) en incrementos de dosis de 1 a 30 mg/kg, redujo significativamente el tiempo de comportamiento de lamido de una forma dependiente de la dosis en la fase 2, pero no en la 1 de la prueba de la formalina.

La gráfica de curso temporal muestra un comportamiento bifásico, la fase 1 que empieza desde el momento en el que se inyectó la formalina y que termina alrededor del minuto 10, se debe a la estimulación química directa de los nociceptores, posterior a esta fase, inicia la fase 2 la cual estaría mediada por el desencadenamiento de un proceso inflamatorio. A partir de su curva dosis-respuesta, se determinó una dosis efectiva 50 experimental de  $8.4 \pm 1.0$  mg/kg (Tabla 1). El máximo efecto alcanzado fue de 38.7% a la dosis de 30 mg/kg.



**Figura 1.** Curso temporal de metileugenol a la dosis de 30 mg/kg. Cada punto representa la media de lamidas  $\pm$  ee para 6 animales. ○ Vehículo y ● metileugenol.



**Figura 2.** Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo de metileugenol en la fase II de la prueba de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de 6 animales. \*  $p < 0.05$  vs el grupo vehículo, ANOVA seguido de la prueba de Dunnet.

**Efecto antinociceptivo de diclofenaco sódico administrado de forma individual.**

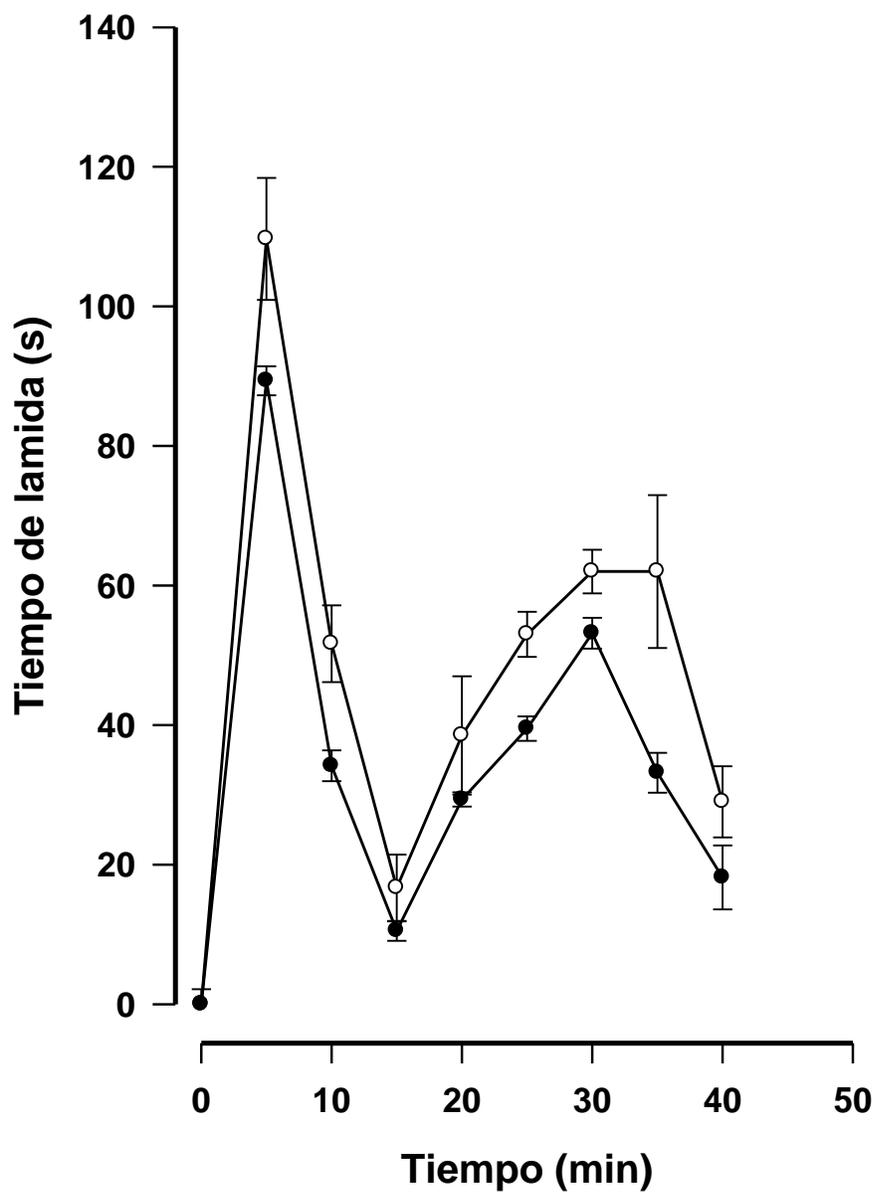
La administración oral de diclofenaco sódico (Figura 3-4) en incrementos de dosis de 1 a 30 mg/kg, redujo significativamente el tiempo de comportamiento de lamido de una forma dependiente de la dosis en la fase 2, pero no en la 1 de la prueba de la formalina. Al igual que el metileugenol, la gráfica de curso temporal muestra un comportamiento bifásico como el antes descrito.

A partir de su curva dosis-respuesta, se determinó una dosis efectiva 30 experimental de  $31.6 \pm 2.8$  mg/kg (Tabla 1). El máximo efecto alcanzado fue de 30 % a la dosis de 30 mg/kg, como se muestra en la figura 4.

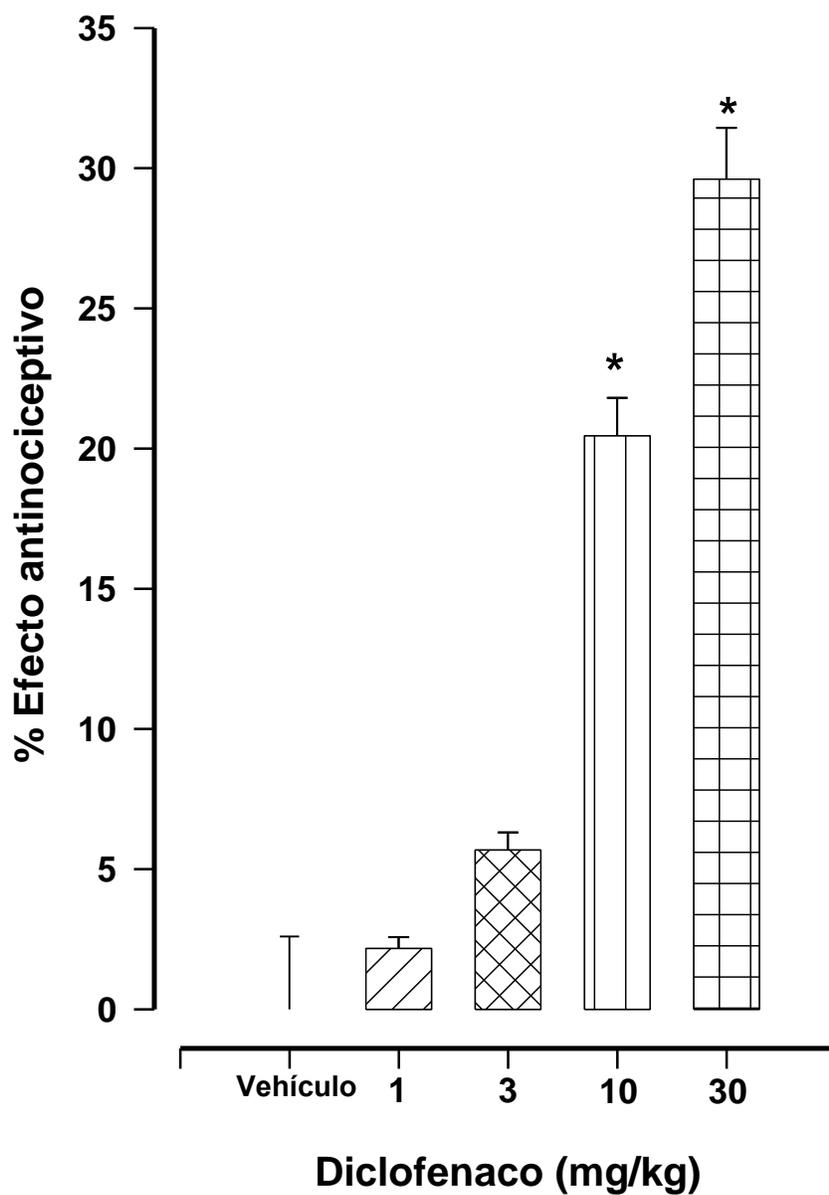
**Tabla 1.** DE<sub>30</sub> obtenidas por regresión lineal de las curvas dosis-respuesta de metileugenol y diclofenaco sódico administrados a ratones.

<b>Fármaco</b>	<b>DE<sub>30</sub> ± ee</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Metileugenol	8.4 ± 1.0	0.983
Diclofenaco sódico	31.6 ± 2.8	0.997

ee: error estándar de la media, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación



**Figura 3.** Curso temporal de diclofenaco sódico a la dosis de 30 mg/kg. Cada punto representa la media de lamidas  $\pm$  ee para 6 animales.  $\circ$  Vehículo y  $\bullet$  diclofenaco sódico.

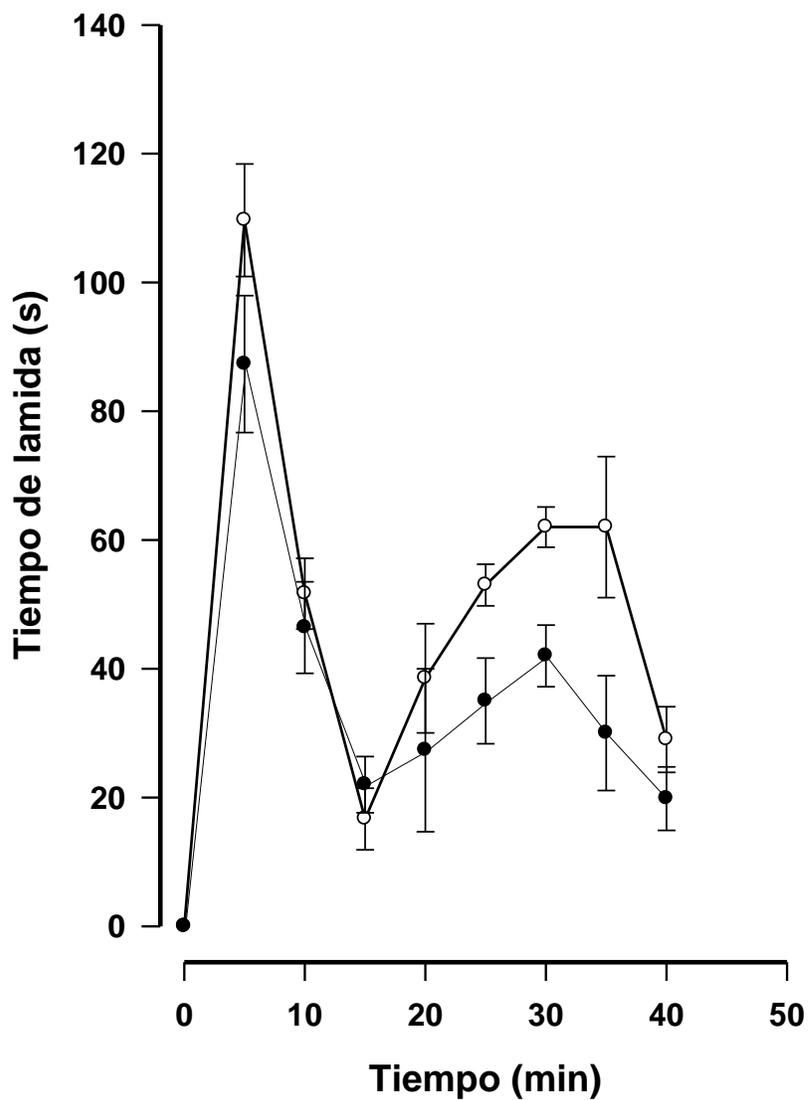


**Figura 4.** Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo de diclofenaco sódico en la fase II de la prueba de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de 6 animales. \*  $p < 0.05$  vs el grupo vehículo, ANOVA seguido de la prueba de Dunnet.

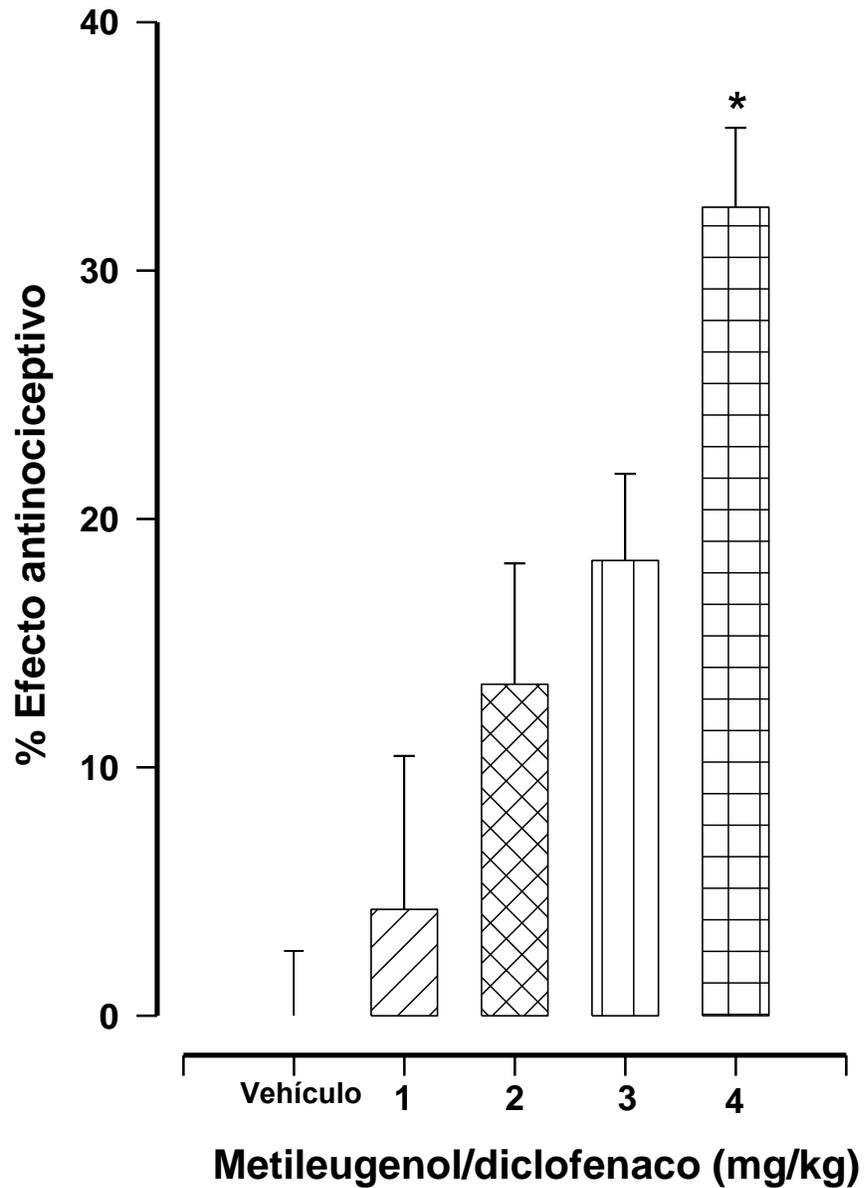
### **Efecto antinociceptivo de la combinación: Metileugenol-diclofenaco sódico.**

El curso temporal del número de lamidas en función del tiempo para la combinación de dosis metileugenol+diclofenaco sódico en una proporción 1:1 (0.52 + 1.97, 1.05 + 3.95, 2.09 + 7.89 y 4.18 + 15.78 mg/kg) disminuyó significativamente el tiempo de lamida con un valor de eficacia de  $32.9 \pm 9.3$  % (Figura 5). En la curva dosis respuesta de la combinación de los compuestos, se puede observar que el efecto nociceptivo solo se alcanzó en la dosis más alta (Figura 6).

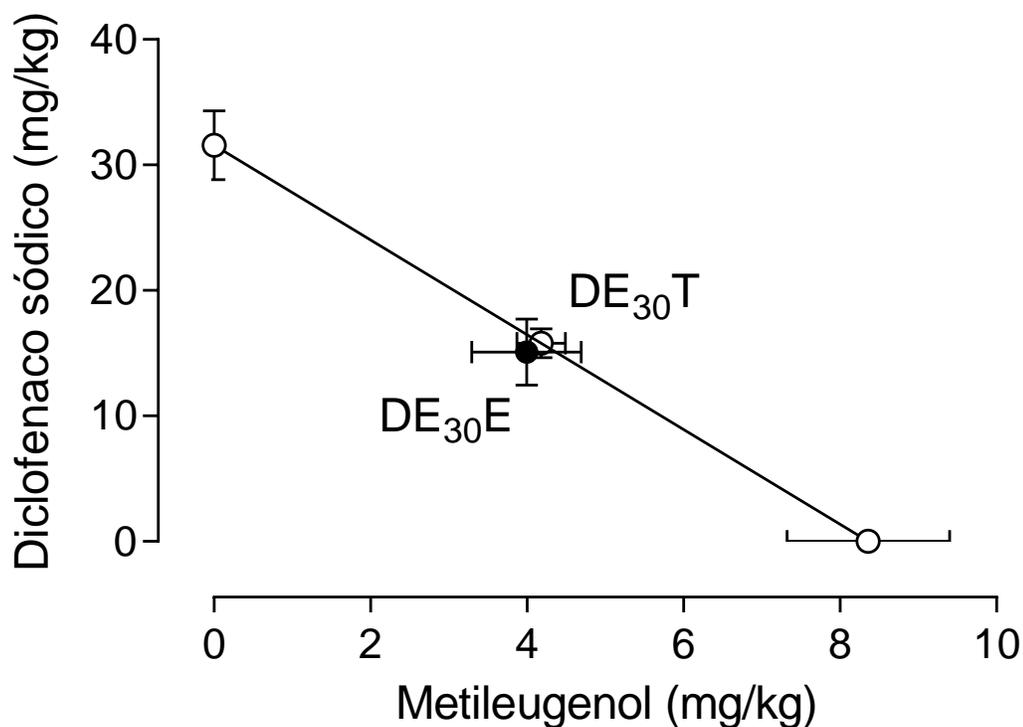
El análisis isoblográfico reveló que el valor de  $DE_{30}$  experimental obtenido y el teórico era similar ( $19.1 \pm 3.3$  mg/kg y  $20.0 \pm 1.5$  mg/kg, respectivamente) y que para la combinación de los compuestos los intervalos de confianza de la  $DE_{30}$  experimental y teórico se superponían (Figura 7). Lo anterior dio como resultado un valor de índice de interacción aproximadamente de 1 y con un intervalo de confianza que cruzó este valor (Tabla 2). Valores que sugieren la probable interacción aditiva del metileugenol + diclofenaco sódico cuando se administra a ratones bajo las condiciones experimentales estudiadas.



**Figura 5.** Curso temporal del efecto antinociceptivo inducido por un tratamiento de ratones con metileugenol + diclofenaco sódico (4.18/ 15.78 mg/kg). Los valores se basan en los resultados de la prueba de la formalina al 2.5%. ○ Vehículo y ● metileugenol más diclofenaco sódico.



**Figura 6.** Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo de las combinaciones metileugenol/diclofenaco sódico en la fase II de la prueba de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee para 6 animales. \*  $p < 0.05$  respecto al vehículo, determinado ANOVA seguido de la prueba de Dunnet. 1 = 0.52/1.97 mg/kg, respectivamente, 2 = 1.05/3.95 mg/kg, respectivamente, 3 = 2.09/7.89 mg/kg, respectivamente y 4 = 4.18/15.78 mg/kg respectivamente.



**Figura 7.** Análisis isoblográfico de metileugenol + diclofenaco sódico. El isoblograma muestra el efecto antinociceptivo provocado por la administración oral de metileugenol + diclofenaco sódico en una proporción 1:1. La línea diagonal que conecta la DE<sub>30</sub> de metileugenol y diclofenaco sódico es la línea teórica de aditividad identificada como DE<sub>30</sub> T, mientras que el punto etiquetado como DE<sub>30</sub> E indica el DE<sub>30</sub> obtenida experimentalmente para cada combinación. La DE<sub>30</sub> E no fue estadísticamente diferente del DE<sub>30</sub> T metileugenol+diclofenaco sódico evaluada por la prueba t de Student  $p < 0.05$ .

**Tabla 2.** Análisis estadístico de la administración concomitante de metileugenol + diclofenaco sódico en ratones sometidos a prueba de formalina 2.5%.

Relación de dosis Metileugenol+ Diclofenaco sódico	Valor teórico DE30± ee (I.C. al 90%)	Valor experimental DE30± ee (I.C. al 90%)	$\gamma \pm ee.$ (I.C. al 90%)
1:1	20.0 ± 1.5 (16.2 – 24.5)	19.1 ± 3.3 (9.0 – 40.5)	0.96 ± 0.18 (0.63 – 1.46)

ee: error estándar de la media, DE30 = dosis efectiva I.C = intervalo de confianza al 90%,  $\gamma$  = índice de interacción

## **8. DISCUSIÓN.**

Los AINE's representan uno de los grupos farmacológicos más consumidos en el mundo para el control del dolor leve a moderado. Sin embargo, en muchas ocasiones son infrautilizados o se abusa de ellos, siendo a veces innecesaria su prescripción. Los datos recientes sobre la seguridad cardiovascular de estos fármacos, sumados a sus riesgos gastrointestinales y renales obligan a la actualización de la información que se recibe de estos compuestos y buscar alternativas que favorezcan el uso de este AINE. (13)

En México el uso de plantas medicinales representa una práctica médica alternativa para aliviar diferentes afecciones, arraigada por razones culturales además de aspectos socioeconómicos. En nuestro país, el número de pacientes que recurre a la medicina alternativa es de entre el 15% y 20% del total de la población. Es por ello importante, que se reactive la investigación científica para evidenciar los efectos de estas especies, así como sus posibles efectos no deseados, con el objetivo de garantizar la seguridad de su uso. (40) Existen reportes de la asociación de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos con ciertos extractos de plantas puede aumentar la actividad antinociceptiva, permitiendo el uso de dosis más bajas y, por lo tanto, limitando los efectos secundarios. (41)

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la administración individual de diclofenaco sódico y metileugenol, por vía oral, producen una actividad antinociceptiva dosis-dependiente en la segunda fase de la prueba de formalina.

La prueba de la formalina es una prueba ampliamente usada para determinar características de nocicepción (dolor) en modelos animales y evaluar la respuesta analgésica/ anti-inflamatoria de compuestos AINE's tal como el diclofenaco sódico. Esta prueba permite observar dos fases de comportamiento nociceptivo, la primera fase (0-10 min) puede estar relacionada a la estimulación química directa de los nociceptores y la segunda depende de la inflamación periférica. (42) En los experimentos realizados se pudieron observar con claridad cada una de estas fases (Figura 1,3, y 5 y gráficas de los anexos A, B y C).

Para el caso de diclofenaco sódico (Figura 3 y gráficas Anexo B) en la fase 1 no se mostró efecto alguno, si no solo en la fase dos, lo cual se esperaba ya que los AINE's solo tienen efecto en la segunda fase de dicha prueba, según lo reportado por otros autores (42). Estos resultados demuestran la eficacia antinociceptiva periférica del diclofenaco sódico, lo que respalda una participación significativa de las prostaglandinas. Para el metieugenol, se pudo observar que al igual que el diclofenaco sódico a las dosis de 10 y 30 mg/kg administradas presentaban efecto antinociceptivo en la fase 2 de la prueba, datos que no contradicen lo reportado previamente por otros autores. (32) Sin embargo también se observó actividad en la fase 1, lo cual podría estar relacionado con lo reportado por Carlini, y atribuido a un efecto anestésico de este fármaco previamente reportado. (43) La eficacia analgésica de metileugenol resultó ser 3 veces más que la de diclofenaco sódico.

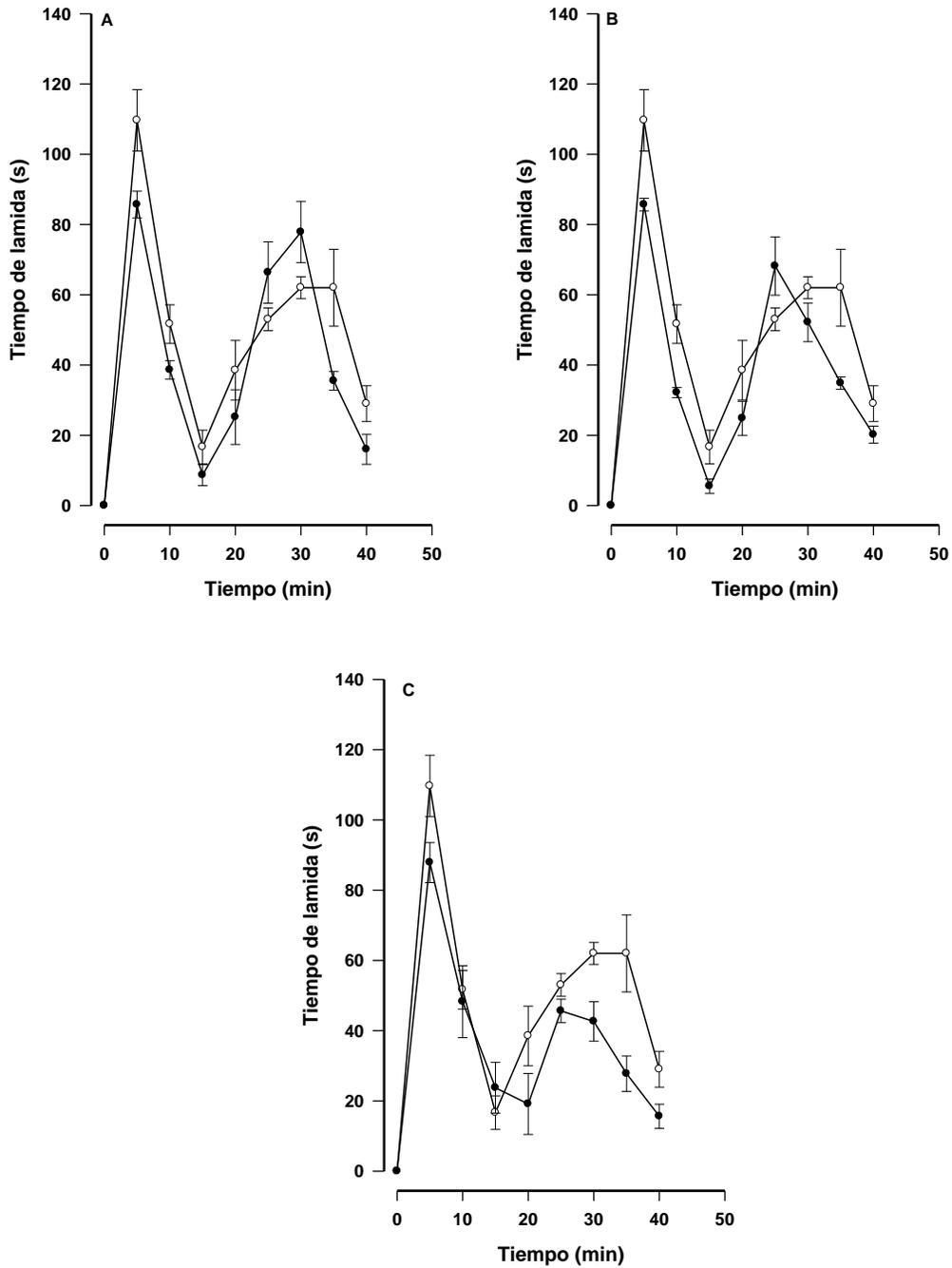
Una analgesia balanceada o multimodal se presenta por la asociación o administración simultánea de dos o más analgésicos, lo que permite disminuir las dosis empleadas de cada uno de estos, y con esto mantener una analgesia eficaz a la vez que se disminuyen los efectos adversos de éstos (44). Al confirmar la acción analgésica del diclofenaco sódico y metileugenol, se esperaba que la combinación de tales compuestos llevase a una condición como la antes descrita, sin embargo, la administración de los compuestos en forma conjunta resultó en una interacción farmacodinámica del tipo aditiva. Lo que indica que el efecto nociceptivo observado en la combinación metileugenol-diclofenaco sódico es la suma de los efectos aislados de cada uno de ellos, con lo que se sugiere que ambos fármacos tienen mecanismos de acción semejantes. (45) Tang y colaboradores (2015) indican que el metileugenol inhibe la expresión de la COX-2 y reduce dramáticamente los niveles de los productos de la COX-2: PGE2 y PGD2. (46) No obstante otros posibles mecanismos a la respuesta antinociceptiva de metileugenol pueden estar involucrados. (32, 42, 47)

Si bien este resultado no sugiere disminuir las dosis de diclofenaco sódico para mantener una analgesia eficaz y disminuir sus eventos adversos, cuando se combina con metileugenol. El resultado obtenido aporta que, la combinación metileugenol-diclofenaco sódico a las dosis estudiadas no llevara a condiciones tóxicas o la inactivación del efecto antinociceptivo del diclofenaco sódico por presencia de metileugenol.

## 9. CONCLUSIONES

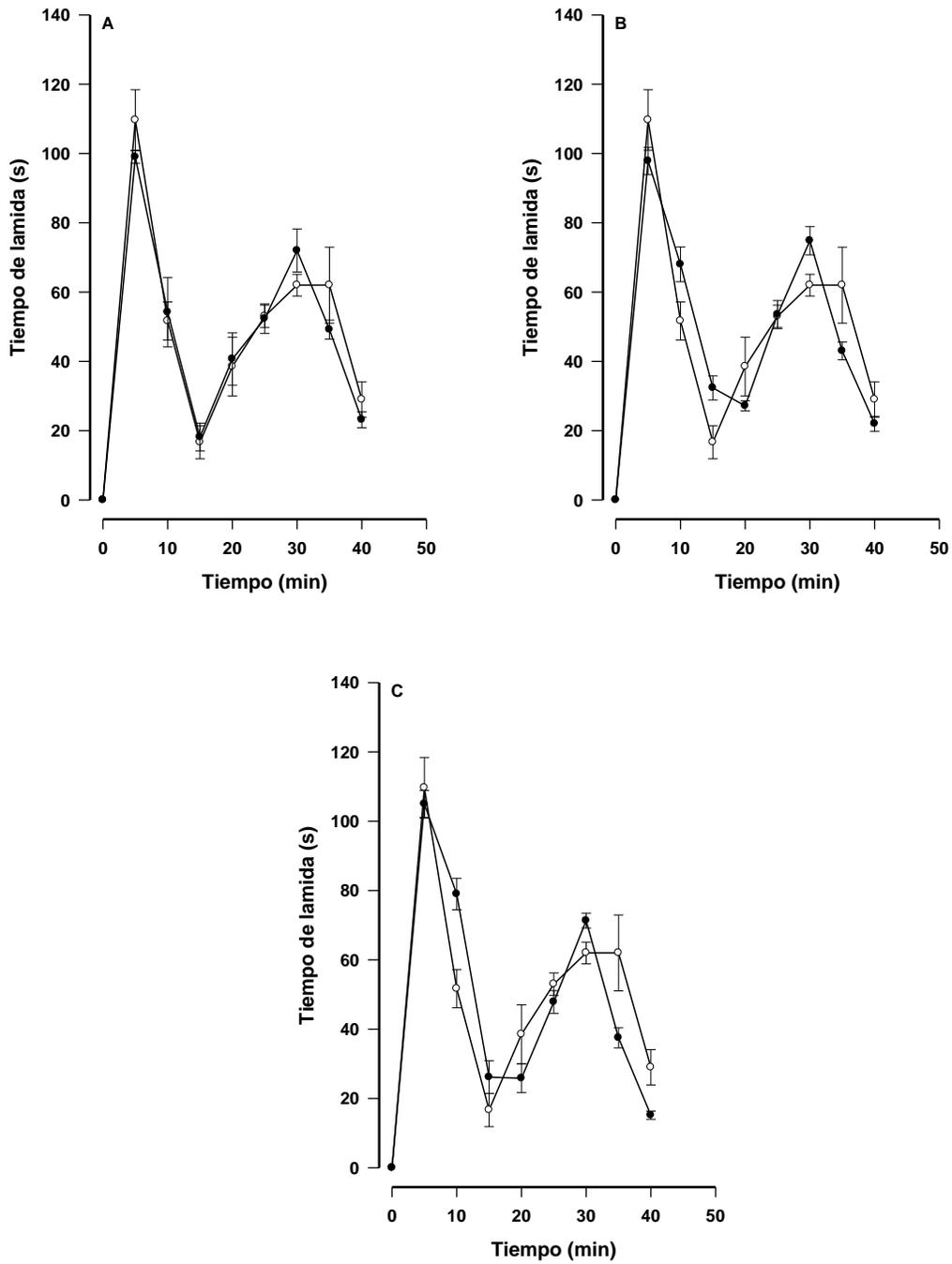
- La administración oral de diclofenaco sódico y metileugenol en dosis crecientes de 1 a 30 mg/kg produce antinocicepción de manera dependiente de la dosis en el modelo de la formalina.
- La interacción que se presenta al administrar de forma concomitante el diclofenaco sódico y el metileugenol en las dosis (0.52 + 1.97, 1.05 + 3.95, 2.09 + 7.89 y 4.18 + 15.78 mg/kg) es de tipo aditiva.
- El efecto antinociceptivo de la mezcla diclofenaco sódico-metileugenol es igual a la suma de sus efectos individuales, lo que sugiere que ambas sustancias tienen mecanismos de acción semejantes.

## 10. ANEXO A. Cursos temporales metileugenol



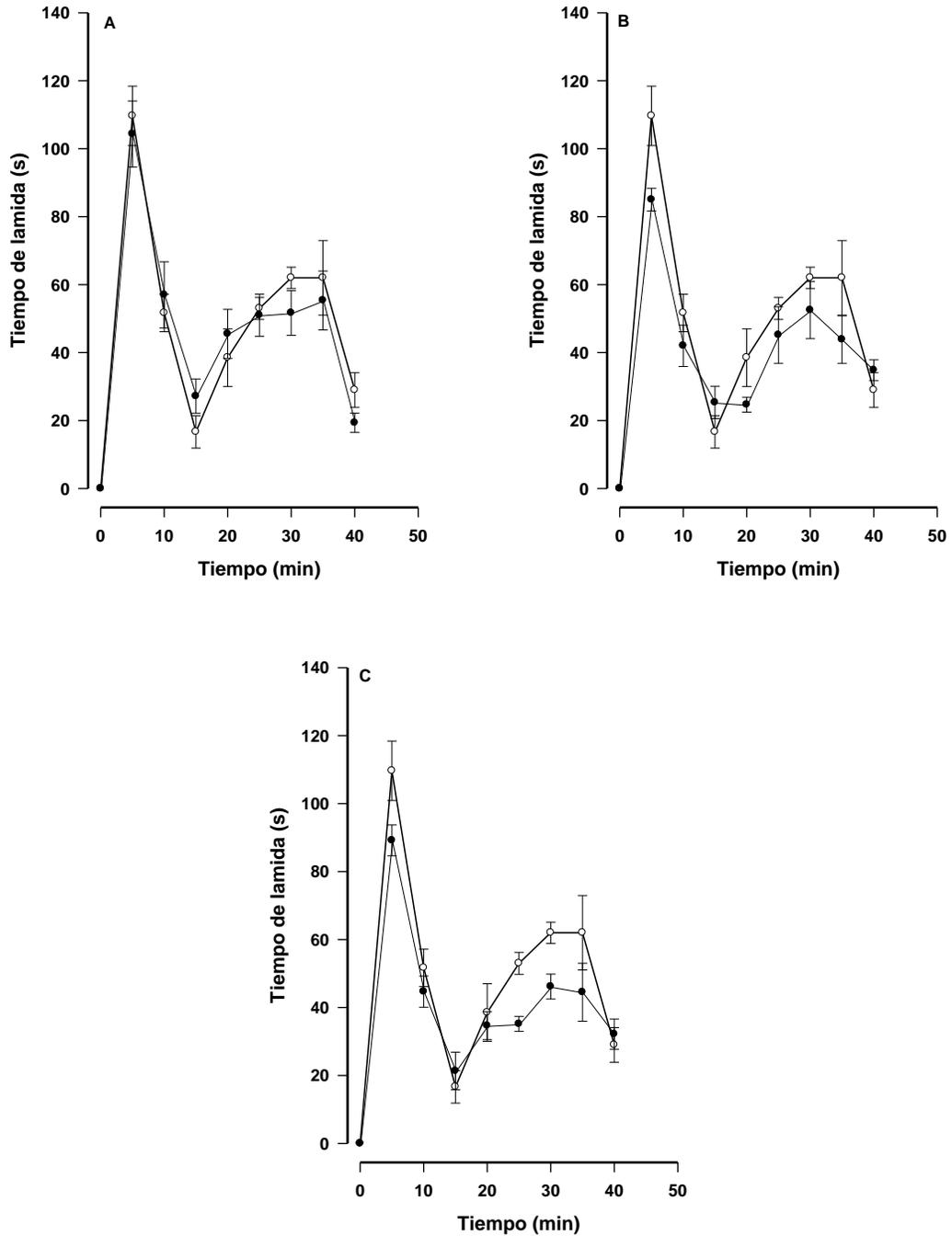
Efecto antinociceptivo de metileugenol a las dosis de 1 (A), 3 (B) y 10 (C) mg/kg, respectivamente. ○ Vehículo y ● metileugenol

## 11. ANEXO B. Cursos temporales diclofenaco sódico



Efecto antinociceptivo de diclofenaco sódico a las dosis de 1 (A), 3 (B) y 10 (C) mg/kg, respectivamente. ○ Vehículo y ● diclofenaco sódico.

## 12. ANEXO C. Cursos temporales combinación metileugenol-diclofenaco sódico



Curso temporal del efecto antinociceptivo de la combinación de metileugenol y diclofenaco sódico. A = 0.52 y 1.97 mg/kg, B = 1.05 y 3.95 mg/kg y C = 2.09 y 7.89 mg/kg, respectivamente. ○ vehículo y ● metileugenol más diclofenaco sódico.

### 13. REFERENCIAS

- 1.- Merskey H., Albe-Fessard DG., Bonica JJ., Carmon A., Dubner R., Kerr FWL., Lindblom U., Mumford JM., Nathan PW., Noordenbos W. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain*.1979; 6: 249-252.
- 2.- Lopez F. Definición y clasificación de dolor. *Clínicas Urológicas de la Complutense*. UCM.1996; 4: 49-55.
- 3.- Romera E., Perena MJ., Perena MF., Rodrigo MD. Neurofisiología del dolor. *Rev. Soc. Esp. Dolor*. 2000; 7: 11-17.
- 4.- Plaghki L., Mouraux A., Le Bars D. Fisiología del dolor. *EMC-Kinesiterapia-Medicina física*. 2018. 39: 1-22
- 5.- De Ahumada J., Santana ML., Serrano JS. *Farmacología práctica para las diplomaturas en Ciencias de la Salud*. Díaz de Santos. Madrid; 2002.
- 6.- Vardeh D., Mannion RJ., Woolf CJ. Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. 2016. (17): 50-69.
- 7.- Thurmon JC., Tranquilli WJ., Benson GJ. *Fundamentos de analgesia y anestesia en pequeños animales*. España. Masson;2003.
- 8.- Hudspith MJ., Siddall PJ., Munglani R. *Physiology of pain*. Elsevier. 2006 (1): 267-285.
- 9.- Deuis J.R., Dvorakova L.S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017;10, 284.
- 10.- Dahan A., Olodsen E., Niesters M. Pharmacotherapy for pain: efficacy and safety issues examined by subgroup analyses. *Pain*. 2015; 156(1): S119-S126.

- 11.- Lynch E.M., Watson N.P. The pharmacotherapy of chronic pain. A review. *Pain Res Manag.* 2006; 11(1): 11-38.
- 12.- Loza E. AINE's en la práctica clínica: lo que hay que saber. *Unidad de Investigacion, Sociedad Española de Reumatologia.* 2011; 35; 3: 88-95.
- 13.- Prieto J.M. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE's). ¿Dónde estamos y hacia donde nos dirigimos? (Primera parte). *Cient Dient.* 2007; 4; 3: 203-212.
- 14.- Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (2002) 27; 391–401
- 15.- Scarim CB, de Oliveira Vizioli E, dos Santos JL, Chin CM. NSAIDs and Natural Products Interactions: Mechanism and Clinical Implications. *J Immunol Clin Res.* 2017; 4(2): 1040.
- 16.- Altman R., Bosch B., Brune K., Patrignani P., Young C. Advances in NSAID Development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs.* 2015; 75: 859-877.
- 17.- Gan T.J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research & Opinion.* 2010; 26 (7): 1715- 1731.
- 18.- Drugbank [base de datos en Internet]. Canadá: Canadian Institutes of Health Research, [consultado 24 septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00586>

- 19.- León M. Efecto de la glibenclamida sobre la farmacocinética y farmacodinamia de diclofenaco en el modelo de la formalina en rata [tesis] México: Instituto Politécnico Nacional; 2007.
- 20.- Navarrete A, et al. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*.2005;57(12):1629–1636.
- 21.- Torres J.E., Carmona E., Cortes J.L., Guzmán C.G. Rocha H.I. Antinociceptive synergy between diclofenac and morphine after local injection into the inflamed site. *Pharmacol Rep*. 2013; 65(2): 358-67.
- 22.- Ortiz I.M. Synergistic interaction between diclofenac and pyrilamine on nociception, inflammation, and gastric damage in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016; 95(1):51-58.
- 23.- Hernández G., Moreno A., Zaragoza F., Porras A. Tratado de Medicina Farmacéutica. México. Editorial Médica Panamericana;2011.
- 24.- Caterina P, et al. Pharmacokinetic Drug Interaction and their Implication in Clinical Management. *J Res Med Sci*. 2013; 18(7):600-609.
- 25.- Girona L. Introducción a las interacciones farmacológicas. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Madrid; 2013.
- 26.- Oguntineju O.O. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *J. Inflamm Res*. 2018; 11: 307-317.

- 27.- Leonardao J.E., Lucielli L., Jacob G.R., Victoria N.F. Martineza M.D. Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: an update review. *J. Braz. Chem. Soc.* 2015; 27(3): 435-474.
- 28.- González AE. Use of Medicinal Plants in Monterrey, Mexico *Not Sci Biol* 2010; 2 (4): 07-11
- 29.- Parrillo S y García J P. Interacciones entre hierbas medicinales y medicamentos convencionales. *Tendencias en Medicina* 2008: Octubre; 122-126.
- 30.- Yunes A.R., Filho C.V., Ferreira J., Calixto B.J. The use of natural products as sources of new analgesic drugs. *Studies in Natural Products Chemistry.* 2005; 30: 191-212.
- 31.- Almeida R.N., Navarro D.S., Barbosa J.M. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine.* 2001; 8(4): 310-322.
- 32.- Yano S., Suzuki Y., Yuzuihara M., Kase Y., Takeda S., Watanabe S., Aburada M., Miyamoto K. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. *European Journal of Pharmacology.* 553 (2006) 99-103.
- 33.- Sánchez-Mendoza ME, et al. Gastroprotective Activity of Methyleugenol from *Peperomia hispidula* on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. *Int. J Pharmacol.* 2015; 11(7): 697-704.
- 34.- Ortega A., Roca A., Micó JA. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 2002; 9: 447- 453.
- 35.- Torres LM. *Medicina del dolor.* España. Masson; 1997

- 36.- Rangel JE., Castro A., Zapata JR., Orozco LM. Evaluación de la interacción antinociceptiva entre rutina y naproxeno utilizando análisis isobolográfico. *Jóvenes en la ciencia*. 2017; 3(1): 334-338
- 37.- Saldaña A., Vergara N. *Farmacovigilancia y Farmacia Comunitaria*. Instituto de Salud Pública. Chile; 2015.
- 38.- Plaghki L., Mouraux A., Le Bars D. *Fisiología del dolor*. Elsevier. 2018; 39(1):1-22
- 39.- Isiordia E., Pozos A., Aguirre P., Pérez J. Análisis isobolográfico de la combinación analgésica ketorolaco sistémico y tramadol local en el modelo de la formalina en ratones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010 abr-jun; 41(2): p. 42-49.
- 40.- Martínez A.L. *Herbolaria mexicana para el tratamiento del dolor*. Ciencia. 2015 jul-sep; 60-67.
- 41.- De Paz M.A., Ortiz M., Chavez A.E., Zazueta L., Castañeda G. Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine*. 2014; 21: 1543-1548
- 42.- Tjolsen A., Geir B., Hunskaar S., Henrik J., Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Elsevier. 1992; 51: 5-17
- 43.- Carlini E.A, Dallmeier K., Zelger J.L. Methyleugenol as a surgical anesthetic in rodents. *Experientia*. 1981; 37: 588-589.
- 44.- Montes A. *Tratamiento del dolor agudo post-operatorio utilizando combinaciones de tramadol y metamizol: análisis de la interacción*. [tesis] Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2003.

45.- San Martin R. Tratado de farmacodinamia. España. Editorial Científico-Médica; 1974.

46.- Tang, F., Chen, F., Ling, X., Huang, Y., Zheng, X., Tang, Q., Tan, X. Inhibitory effect of methyleugenol on IgE-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 cells. Mediators of Inflammation. Hindawi. 2015; 1-9

47.- Asomoza R., Alonso R., Mixcoatl T., Aguirre P., Torres J., Granados V. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. European Journal of Pharmacology. 2001; 195-200.