



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**



“Evaluación del efecto analgésico de la combinación de Hesperidina con Dipirona en un modelo de dolor visceral.”

TESIS

Que para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biológico

PRESENTA

Mares Sánchez José de Jesús

Directora de tesis

Dra. Rosa Ventura Martínez.

Asesores internos

M. en F. Leticia Huerta Flores

Dr. Valentín Islas Pérez

Ciudad de México, 2021



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. Islas Pérez Valentín.

VOCAL: Dra. Ventura Martínez Rosa.

SECRETARIO: QFB Sánchez Ortiz Lidia.

1er. SUPLENTE: M. en C. Fuentes Lara María Teresa Griselda.

2° SUPLENTE: Mtra. Huerta Flores Leticia.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 28 DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNAM.

DIRECTORA DE TESIS: _____
DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

ASESORA INTERNA: _____
M. EN F. LETICIA HUERTA FLORES

ASESOR INTERNO: _____
DR. ISLAS PEREZ VALENTIN

SUSTENTANTE: _____
JOSÉ DE JESÚS MARES SÁNCHEZ

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la FES ZARAGOZA quienes además de darme la educación para lograr ser el profesionalista que soy, me dio grandes historias, vivencias, amigos para toda la vida y a mi gran amor.

A mis asesores de la Tesis la Dra. Rosa Ventura Martínez, la Maestra Leticia Huerta, el Dr. Valentín Islas y a la Dra. Guadalupe Esther Ángeles López así como a mis compañeros del laboratorio de la tesis.

A mis amigos de la universidad, porque sin ellos hubiera sido más difícil y aburrido el camino.

A mi familia, a mis tíos y primos que muchas veces con risas o juegos me apoyaron con mis estudios.

A mi novia, a quien amo, quien estuvo en casi todo el camino de la carrera conmigo, me ayudo, apoyo, me motivo para ser una mejor persona y fue uno de los motivos por los que termine la universidad.

A mis abuelitos, quienes con mucho amor siempre me apoyaron en todo, en especial a mi abuelito Papachuy a quien amo mucho, por que como decía el no nos queda de otra que echarle ganas a la vida.

A mis hermanas, a quienes quiero con todo mi corazón, porque por sus juegos, sus insultos, su ayuda y sus palabras de aliento yo termine la carrea.

Y a mis padres, a quienes amo con todo mi corazón, a quienes debo todo lo que soy, porque sin ellos, sin los cafés de mi mamá por las noches de desvelo, sin el aliento de mi papá cuando veía mi desesperación y sin todo ese amor que me han dado desde el día que nací y con todo ese apoyo incondicional yo no sería la persona que soy, los amo infinitamente.

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	VI
Índice de figuras	VII
Índice de cuadros	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Dolor	3
2.1.1 Clasificación de dolor	4
2.2 Dolor visceral	5
2.3 Nocicepción	7
2.3.2 Etapas de la nocicepción	8
2.4 Tratamiento farmacológico para el dolor.....	9
2.4.1 Analgésicos opioides.....	10
2.4.2 AINEs.....	10
2.4.2.1 Dipirona (Metamizol).....	11
2.4.3 Plantas medicinales como tratamiento alternativo para el dolor	12
2.4.3.1 Flavonoides.....	13
2.4.3.1.1 Hesperidina	14
2.5 Interacciones farmacológicas	15
2.5.1 Tipos de interacciones farmacológicas	16
2.5.2 Interacciones entre analgésicos y bioflavonoides	16
2.5.1.1 Métodos de análisis de interacción.....	17
2.5.1.1.1 Isoblograma	17
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1 General	21
5.2 Particulares.....	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1 Animales.....	22
6.2 Reactivos	22
6.3 Prueba de estiramiento abdominal “Writhing test”	22
6.4 Diseño experimental	23

6.5	Análisis estadístico de datos.....	25
7.	RESULTADOS.....	26
7.1	Disminución de los estiramientos abdominales inducido por la dipirona y la hesperidina en administración individual.	26
7.2	Curvas dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo inducido por dipirona y hesperidina.....	28
7.3	Efecto antinociceptivo de varias combinaciones de dipirona+hesperidina. .	29
7.4	Análisis del número de estiramientos abdominales previo tratamiento con las diferentes fracciones combinadas.....	31
7.5	Efecto antinociceptivo inducido por varias combinaciones de Dip/Hesp en una fracción 1:1	32
8.	DISCUSIÓN	37
9.	CONCLUSIONES	43
10.	PERSPECTIVAS.....	43
11.	REFERENCIAS.....	44

Abreviaturas

AINEs	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
CDR	Curva dosis respuesta
COX	Ciclooxigenasa
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
Dip	Dipirona (Metamizol)
Dip/Hes	Dipirona con hesperidina
EE	Error estándar
E _{max}	Efecto máximo
Hesp	Hesperidina
IASP	Siglas en inglés de “Asociación internacional para el estudio de dolor”
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
Mi	Magnitud de la interacción
MMA	N-metil-4-aminoantipirina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ROS	Siglas en inglés para Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
SONi	Sintasa de óxido nítrico inducible
SSI	Solución salina isotónica
t _{max}	Tiempo máximo
TNF α	Siglas en inglés para Factor de necrosis tumoral alfa
VEH	Vehículo

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Vía de señalización de dolor visceral	6
Figura 2	Escalera analgésica	8
Figura 3	Estructura de la dipirona	11
Figura 4	Estructura básica de los flavonoides y su clasificación	13
Figura 5	Estructura química de la hesperidina	14
Figura 6	Representación del isoblograma	18
Figura 7	Características de un estiramiento abdominal	22
Figura 8	Diagrama de flujo 1. Diseño experimental	22
Figura 9	Diagrama de flujo 2. Elaboración del isoblograma	23
Figura 10	Cursos temporales de varias dosis de dipirona y Número total de estiramientos de dosis de dipirona	26
Figura 11	Cursos temporales de varias dosis de Hesperidina y Número total de estiramientos de dosis de Hesperidina	26
Figura 12	CDRs de dipirona y hesperidina. Isoblograma de dipirona-hesperidina	28
Figura 13	Numero de estiramientos totales de las fracciones Dip/Hesp probadas	29
Figura 14	Comparación entre el número de estiramientos totales de las fracciones y las dosis más cercanas a ellas.	30
Figura 15	CDRs de dipirona, hesperidina y su combinación de diferentes dosis con la fracción 1:1	32
Figura 16	Isoblograma de la combinación de Dip/Hesp en fracción 1:1	33
Figura 17	Efecto antinociceptivo de los tratamientos en administración individual (fracción 1:1) vs la combinación y la respuesta teórica	34

Índice de cuadros

		Página
Cuadro 1	Dosis calculadas con diferentes fracciones de Dip/Hesp	29
Cuadro 2	Dosis calculadas de Dip/Hesp con la fracción 1:1	32

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) se define al dolor como una experiencia sensitiva y emocional “desagradable”, asociada a una lesión, real o potencial. Siendo este padecimiento, uno de los principales motivos de asistencia médica, es de primordial importancia contar con alternativas terapéuticas eficaces para su tratamiento.

Uno de los tipos de dolor más frecuente y con mayor prevalencia alrededor del mundo es el de tipo visceral, donde el porcentaje de personas que lo padecen supera el 25 %.

De entre los principales tratamientos para el alivio de este tipo de dolor, se encuentran los fármacos denominados analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); aunque no es la única alternativa usada por los pacientes ya que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), dos terceras partes de la población mundial (4000 millones de personas) recurren al uso de plantas medicinales combinado con la medicina alopática para obtener una mejor respuesta.

Varios compuestos obtenidos de plantas medicinales o de los alimentos son utilizados como complemento de la medicina alopática; entre ellos destacan los flavonoides, que son los compuestos más abundantes dentro de la dieta diaria y con efectos farmacológicos demostrados en el tratamiento de diversos padecimientos, incluyendo el dolor.

Es en este punto que la investigación de la combinación entre los principales compuestos usados para el tratamiento del dolor, como los AINEs, y los flavonoides, toma gran importancia e interés, puesto que muchas veces, por conocimiento adquirido o por recomendación, los pacientes combinan estos dos tipos de tratamientos sin saber que tal vez el efecto obtenido no sea el deseado.

Por otra parte, si se llegan a obtener resultados positivos sobre el efecto de este tipo de combinaciones, éstos pueden servir como base para el desarrollo de nuevos medicamentos contra el dolor, con la intención de producir igual o mayor eficacia que sus componentes individuales y menores efectos adversos.

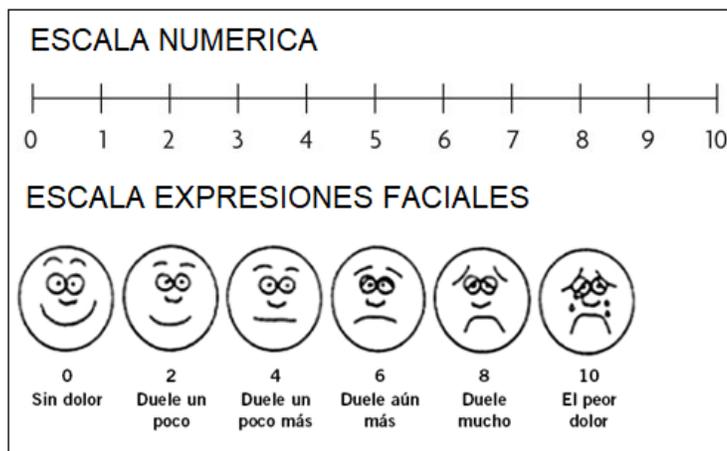
En este trabajo, para el estudio de la interacción farmacológica entre estos dos tipos de tratamientos se eligió a la dipirona, también conocida como metamizol, por ser el analgésico más utilizado para el tratamiento del dolor de tipo visceral; mientras que, del grupo de los flavonoides, se eligió a la hesperidina, a la que también se le atribuyen efectos analgésicos. Para determinar el efecto analgésico de la combinación de estos fármacos se utilizó el modelo de estiramiento abdominal provocado por ácido acético (Writhing) en ratones y se determinó el tipo de interacción que presentó esta combinación a través de un análisis isobolográfico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Dolor

A través de los últimos años, el estudio del dolor y su tratamiento ha alcanzado un reconocimiento mundial no solo como una especialidad de la medicina, sino como un tema importante para la investigación científica⁽¹⁾. La Asociación Internacional para el Estudio de Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada o que parece asociada a un daño real o potencial” (IASP 2020). Al ser subjetivo, es un síntoma muy difícil de explicar, por lo que muchas veces el paciente utiliza analogías para indicar las características del dolor que está padeciendo⁽²⁾. A nivel clínico, se realizan una serie de preguntas; además de la exploración física, encaminadas a determinar el tipo de dolor y la causa que lo produce. También existen escalas analógicas para describir su intensidad, como:

- Escala de clasificación de dolor mediante expresiones faciales.
- Escala de caja numérica de 10 puntos.
- Índice dolorimétrico “dolorímetro”.



Esquematización de las escalas del dolor⁽³⁾.

Para la toma de decisiones terapéuticas en el manejo del dolor es necesario que el médico sepa interpretar las respuestas del paciente con relación a las características del mismo; así como del resultado del uso de las escalas del dolor

en la evaluación de la intensidad para utilizarlo como una herramienta de evaluación^(4,5).

Además del dolor que refiere el paciente, otros síntomas como fatiga, irritabilidad, depresión o incapacidad para realizar actividades cotidianas lo agravan⁽²⁾, afectando así su vida laboral y social, convirtiéndose en motivo de despidos, pérdidas económicas y pérdidas personales.

2.1.1 Clasificación de dolor

El dolor puede clasificarse de diversas maneras, tomando en cuenta su duración, patogenia y localización.

Con relación a duración puede clasificarse como agudo o crónico. El dolor agudo es limitado en tiempo y se define como una experiencia no placentera con características emocionales y cognitivas, así como sensoriales, que ocurren en respuesta a un trauma tisular ⁽⁶⁾; mientras que, el dolor crónico se extiende más allá de 3-6 meses ⁽⁷⁾ y con niveles de identificación patológica que suelen presentarse durante varios años relacionadas con la magnitud del dolor ⁽⁶⁾.

Respecto a su patogenia puede clasificarse como: neuropático, nociceptivo o psicógeno. El neuropático es producido por daño al sistema nervioso central o por lesión de vías nerviosas periféricas o centrales. Se describe como punzante, quemante, acompañado de parestesias y disestesias, hiperalgesia, hiperestesia y alodinia. El nociceptivo es el más frecuente y se produce por un daño directo al tejido en donde puede estar involucrado un proceso inflamatorio. Por último, el psicógeno es el que se relaciona con el ambiente psico-social que rodea al individuo ⁽⁸⁾.

Finalmente, con relación a su localización puede ser somático o visceral. El somático se produce por la excitación anormal de nociceptores superficiales o profundos (piel, músculo esquelético, vasos, etc.) y es un dolor localizado, punzante y que se irradia siguiendo trayectos nerviosos. El dolor visceral se

describe como un dolor profundo y difuso, así como mal localizado y, como su nombre lo indica, este se presenta generalmente en las vísceras ⁽⁹⁾.

Por supuesto, la percepción del dolor puede involucrar una combinación de las clasificaciones ya mencionadas; además de ser influenciado por otros factores como la cultura, personalidad, estrés, nivel socioeconómico, nutrición y otros problemas de salud; que pueden ser motivo de aumento o disminución del dolor, dificultando el diagnóstico clínico de su origen y, por supuesto, de su tratamiento ⁽¹⁰⁾.

Debido a que este trabajo trata de un modelo de dolor visceral, vamos a ahondar un poco más en este tipo de dolor.

2.2 Dolor visceral

El dolor visceral, como su nombre lo indica, es el que se origina en las vísceras cuando los órganos están inflamados, enfermos, dañados o lesionados y es uno de los tipos de dolor más comunes entre la población ⁽¹¹⁾.

Este depende de la naturaleza del estímulo que lo provoca. Si bien algunas sensaciones no dolorosas surgen de los órganos del tracto gastrointestinal (GI) (por ejemplo, sensación de saciedad, presencia de gases o necesidad de defecar), la única sensación consciente de la mayoría de las vísceras es el dolor ⁽¹²⁾. En general, los estímulos que inducen el dolor visceral son diferentes a los que producen el dolor somático; por ejemplo, en el dolor somático una lesión inducida al tejido por una cortadura, opresión o quemadura son estímulos que producen dolor; mientras que, en el dolor visceral, los estímulos nocivos son la distensión luminal, el estiramiento, la inflamación y la isquemia ⁽¹²⁾.

El dolor visceral es el resultado de la activación de los nociceptores de algunos órganos internos que transmiten la información a la medula espinal a nivel de nervios torácicos, pélvicos o abdominales ⁽¹³⁾. Al activarse estos nociceptores, se desencadena una repuesta en las vías aferentes sensoriales viscerales primarias que convergen con las vías sensoriales somáticas en la asta dorsal,

subiendo desde la medula sacral hasta el bulbo raquídeo, el tálamo y la corteza somatosensorial, en donde se percibe la señal como dolorosa ⁽¹⁴⁾. (Figura 1)

La mayoría de las señales nociceptivas que se originan en los órganos viscerales alcanzan el sistema nervioso central (SNC) a través de fibras aferentes en los nervios simpáticos; mientras que, los nervios parasimpáticos contienen principalmente fibras aferentes viscerales relacionadas con los aspectos no sensoriales de la función visceral. Los nociceptores que transmiten el dolor visceral están conectados a fibras aferentes no mielinizadas, las cuales viajan por los nervios viscerales o periféricos, pasan por los ganglios autonómicos y tienen sus cuerpos neuronales en ganglios espinales de las raíces dorsales, por las que llegan al asta dorsal de la médula espinal ⁽¹⁵⁾.

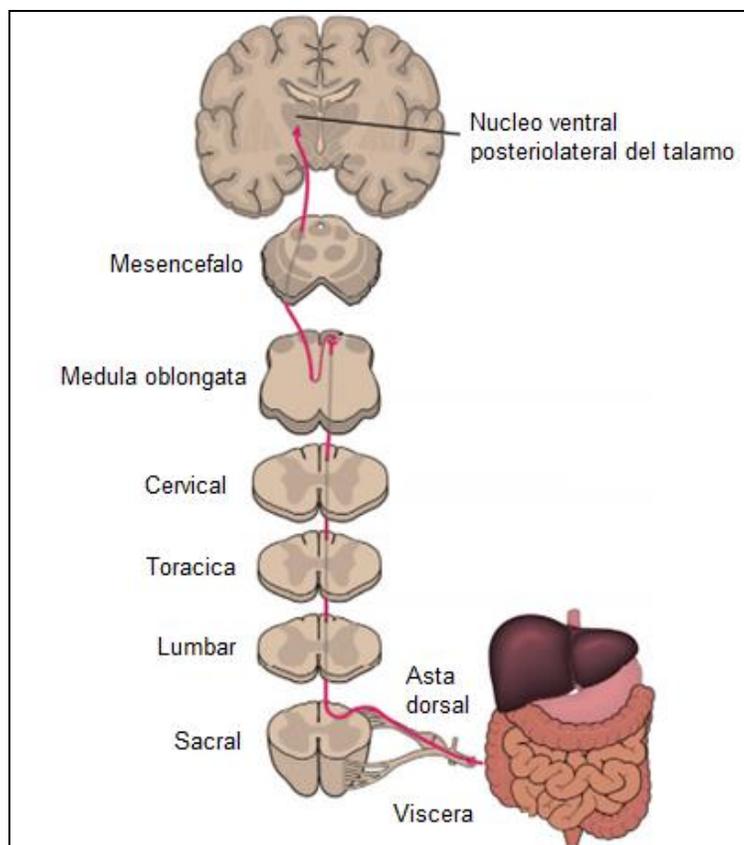


Figura 1. Vía de señalización de dolor visceral ⁽¹⁴⁾.

Las vísceras que contienen nociceptores son las relacionadas con el tracto gastrointestinal (esófago, estómago, íleon, intestino grueso e intestino delgado, colon), así como órganos como la vejiga y el corazón.

Uno de los principales receptores involucrados tanto en el dolor somático como en el visceral es el TRPV1, su importancia se centra en que él está presente en la entrada de señales nociceptivas a la medula espinal y el tronco encefálico así como en la integración de diversos estímulos dolorosos ⁽¹⁶⁾.

Sus principales características de estos receptores son:

- Es un canal cationico no selectivo, regulado por un ligando.
- Están ampliamente distribuidos por el SNC y SNP.
- Son expresados de forma selectiva en nociceptors de Fibras C y en menor grado en A δ .
- Principal receptor involucrado en la sensación del dolor.
- Estimulados por capsaicina y otros estímulos nocivos, para producir una respuesta dolorosa.

2.3 Nocicepción

La nocicepción es el proceso neuronal que implica la transducción y transmisión de un estímulo nocivo al cerebro a través de una vía de dolor. Los nociceptores son los receptores que se encargan de traducir un estímulo doloroso, en una señal eléctrica y transmitirla desde la periferia hasta el SNC mediante axones ⁽¹⁷⁾.

Existen principalmente dos tipos de nociceptores que son las fibras A δ y las fibras C. Las primeras son fibras mielinizadas de 2 a 5 μ m de diámetro con velocidades de conducción alta (5-15 m/s) y responden a estímulos intensos; mientras que, las segundas son fibras amielínicas de menos de 2 μ m de diámetro, con velocidades de conducción lenta (0.5 a 2 m/s) y responden a estímulos de tipo mecánico, químico y térmico ⁽¹⁷⁾.

Las fibras A δ tienen sus terminales axónicas en las láminas I, III, IV y V en la asta dorsal de la medula espinal y transmiten un tipo de dolor punzante y bien localizado, como el producido en el dolor somático; mientras que, las fibras C terminan en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal y transmiten el dolor lento, difuso y mal localizado, como el producido en el dolor visceral ⁽¹⁸⁾. Las fibras A δ se encuentran en los músculos y la piel; mientras que las fibras C se encuentran principalmente en los órganos viscerales.

2.3.2 Etapas de la nocicepción

La nocicepción involucra una serie de procesos neurofisiológicos que se activan de forma consecutiva, y que se conocen como transducción, transmisión, modulación y percepción.

La **transducción** es el proceso en el que un estímulo nocivo (como altas temperaturas, estímulos mecánicos, inflamación o estímulos químicos), a través de la interacción de diversos mediadores químicos liberados de la célula como las prostaglandinas, histamina, bradiquinina y serotonina; con sus respectivos receptores, convierte una señal química en un potencial eléctrico que es **transmitido** a lo largo de las fibras nerviosas hasta el asta dorsal de la médula espinal. La **modulación** se refiere a los mecanismos que se desencadenan como respuesta a la transmisión de la señal dolorosa, en la que el dolor puede incrementarse o disminuirse, dependiendo de su origen, intensidad, etc. Durante este proceso se puede activar la vía analgésica descendente en la que participa la liberación de opioides endógenos, que bloquean la transmisión de la vía nociceptiva en la médula espinal ⁽¹⁹⁾. Finalmente, la **percepción** es la conciencia subjetiva producida por las señales nociceptivas y su integración e identificación en el SNC y se lleva a cabo en la corteza somatosensorial ⁽²⁰⁾. Esta etapa se caracteriza por la conciencia o percepción del dolor, donde la corteza somatosensorial ayuda a localizar y a interpretar el estímulo. Es donde las neuronas de tercer orden ubicadas en el tálamo son proyectadas a las áreas somatosensoriales I y II donde se percibe y se proyecta el dolor ⁽¹⁹⁾.

2.4 Tratamiento farmacológico para el dolor

Los analgésicos son los fármacos utilizados en el tratamiento del dolor. La selección del fármaco específico depende de varias características del dolor que refiera el paciente, pero principalmente del tipo de dolor y de su intensidad.

En 1986, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la escalera analgésica basados en la intensidad de dolor ⁽²¹⁾ (Figura 2).



Figura 2. Escalera analgésica (Modificación a la escala de la OMS)

En esta propuesta se encuentran como opciones terapéuticas los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los opioides, aunque también es posible la administración de otros grupos de fármacos conocidos como coadyuvantes analgésicos como: antidepresivos, espasmolíticos y anestésicos locales. No hay que olvidar que además de la intensidad, otro criterio para la selección del tratamiento del dolor es el tipo de dolor que se presenta, lo cual está relacionado con la patología que lo produce ⁽⁶⁾.

El dolor severo e intratable es una de las afecciones neurológicas más difíciles y desafiantes de tratar. En cierto sentido, todo dolor es de origen neural.

La disponibilidad de medicamentos sofisticados, como la pregabalina, aumenta el abanico terapéutico contra el dolor, sin embargo cuando todo

tratamiento falla la cirugía se convierte en parte fundamental para el tratamiento del dolor. Generalmente, el tratamiento quirúrgico se divide en cirugía neuromoduladora (mejorando el control fisiológico del sistema de dolor) y neurodestruccion (lesionando y destruyendo el generador de dolor definido en el sistema nervioso central).⁽²²⁾.

2.4.1 Analgésicos opioides

Los analgésicos opioides han sido considerados como el tratamiento más efectivo, contra el dolor crónico severo; por lo que juegan un papel muy importante en la clínica. Entre los más utilizados, están la morfina, hidromorfona, fentanilo y oxicodona. Sin embargo, este tipo de compuestos se han asociado con abuso y farmacodependencia, provocando adicción en los pacientes, además de otros efectos adversos que limitan su utilidad clínica⁽²³⁾.

Su efecto se produce por su unión a los receptores opioides (μ , κ o δ) en el SNC inhibiendo así la transmisión de la señal nociceptiva que viene desde la periferia hacia la médula espinal; además de activar vías inhibitorias descendentes desde el cerebro que modulan la transmisión en la médula espinal⁽²⁴⁾. Estos efectos se traducen en una disminución de la liberación de neurotransmisores nociceptivos en la médula espinal como glutamato y sustancia P, inhibiendo así la transmisión sináptica del impulso doloroso⁽²⁵⁾.

2.4.2 AINEs

Los AINEs son los fármacos más utilizados en casi todos los tipos de dolor, ya que además de su efecto analgésico tienen efecto antiinflamatorio, antipirético y, algunos, antiplaquetario. Son muy utilizados en situaciones de dolor relacionado con enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, osteoartritis y dismenorrea⁽²⁶⁾.

El prototipo de este grupo de fármacos es el ácido acetilsalicílico, pero también se conocen otros como la dipirona (metamizol), el diclofenaco, el ibuprofeno y el ketorolaco. Éstos se utilizan en dolor leve a moderado. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), en sus dos isoformas COX-1 y COX-2, impidiendo la síntesis de

prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Las prostaglandinas son eicosanoides que participan importantemente en el dolor, la inflamación y la fiebre, por lo que su inhibición es la causa de los efectos terapéuticos de los AINEs. Sin embargo, también producen efectos adversos que limitan su utilidad en la clínica como la inhibición de la secreción de moco citoprotector que puede producir úlceras gástricas, daño renal y problemas cardiovasculares entre otros ⁽²⁷⁾.

2.4.2.1 Dipirona (Metamizol)

La dipirona, también conocida como metamizol, pertenece al grupo de los AINEs e induce efectos analgésicos, antipiréticos, espasmolíticos y antiinflamatorios. Existe en diversas presentaciones comerciales, para su administración oral o parenteral y se han utilizado clínicamente, para disminuir la fiebre, el tratamiento del dolor postoperatorio, el dolor tipo cólico y contra la migraña ⁽²⁸⁾.

La dipirona sódica es una sal orgánica de antipirina sustituida en el carbono 4 por un grupo metil amino (sulfonato de metil). Su nombre químico, relacionado con su estructura es N-(2,3-dimetil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolin-4-yl)-N metiamino metanosulfonato (Figura 3) ⁽²⁹⁾.

La dipirona, es un derivado de la pirazolona y es uno de los AINEs más eficaces para el alivio del dolor visceral. Además de inhibir a la COX-1 y 2, se ha encontrado evidencia de que también inhibe a una isoforma muy similar a la COX-1, denominada COX-3 ⁽³⁰⁾. Algunas evidencias sugieren que también estimula receptores cannabinoides y activa la vía analgésica descendente a través de su interacción con el sistema opioide endógeno, ya que la naloxona disminuye su efecto analgésico ⁽²⁸⁾.

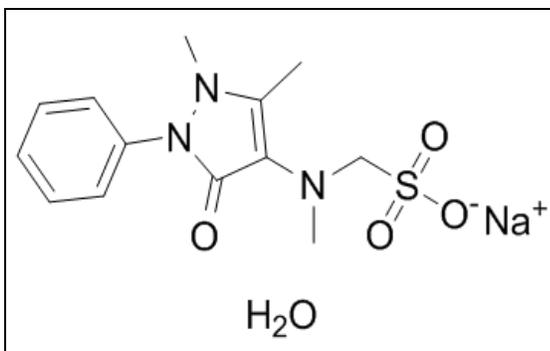


Figura 3. Estructura de la Dipirona. "Tomada de MedChemExpress

Entre los efectos adversos graves, aunque poco frecuentes, producidos por la dipirona está la agranulocitosis, que es un síndrome hematológico relacionado con el número de los neutrófilos en sangre, volviendo al cuerpo susceptible a padecer enfermedades. También puede inducir reacciones cutáneas como la urticaria y efectos gastrointestinales como náuseas, irritación gástrica y vómito ⁽³¹⁾.

La dipirona se hidroliza rápidamente a su metabolito activo N-metil-4-aminoantipirina (MMA), con un 85 % de biodisponibilidad después de su administración oral. El tiempo que tarda en alcanzar su máxima concentración a nivel sistémico por administración oral es relativamente corto (t_{max} de 1.2 a 2.0 horas); mientras que por administración intramuscular y rectal, el porcentaje de biodisponibilidad es de 87 y 54 %, respectivamente. El MMA es rápidamente metabolizado a 4-formilaminopirina y tiene un tiempo de eliminación y vida media de 2.6 a 3.5 horas. Los metabolitos de la dipirona se excretan por vía renal. El volumen de distribución del metabolito activo es de cerca de 1.15 L/kg ⁽³²⁾.

2.4.3 Plantas medicinales como tratamiento alternativo para el dolor

Además de los tratamientos farmacológicos para el alivio del dolor, muchos pacientes utilizan plantas medicinales y/o suplementos alimenticios para complementar su tratamiento farmacológico. En la actualidad el número de pacientes que utiliza remedios herbolarios, medicina complementaria y/o alternativas para el tratamiento del dolor está creciendo rápidamente. Es por eso que en los últimos 20 años se le ha dado énfasis al estudio preclínico de los

“tratamientos naturales” para diversos problemas médicos, incluyendo el dolor.
(33).

El uso de las plantas en la medicina tradicional es una práctica muy antigua. De acuerdo con diversos reportes de la OMS, se usan hasta 70,000 especies de plantas en todo el mundo con propósitos medicinales ya que se sigue considerando que “las plantas son un vasto suministro natural de compuestos que podrían alcanzar una importancia primordial para el descubrimiento de nuevos fármacos” (34).

Algunas de las especies vegetales más utilizadas en la medicina tradicional para el alivio del dolor son: Jengibre (*Zingiber officinales*), sauce blanco (*Salix alba*), chile (*Capsicum frutescens*), curcuma (*Curcuma longa*), hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) y manzanilla (*Matricaria recutita*), entre otras (33). Muchas de éstas contienen sustancias como flavonoides, los cuales son los compuestos más comunes y de mayor distribución en las plantas (35).

2.4.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos que tienen una estructura de benzopirona. Se sintetizan por la vía fenilpropanoide y se sabe que, por su naturaleza fenólica, son responsables de una gran variedad de los efectos farmacológicos de varias especies de las plantas medicinales, como antiinflamatorios, antioxidantes, hepatoprotectores, antibacteriales, anticancerígenos; así como analgésicos (35).

Estas sustancias también se encuentran como una parte integral de la dieta en frutas, verduras, granos, cortezas, raíces, tallos, té y vino. Los flavonoides ahora se consideran un componente importante con aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas (36).

Los flavonoides se pueden dividir en diferentes subgrupos según el carbono del anillo C y su grado de insaturación y oxidación en flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianinas y chalconas (Figura 4) (36).

Las flavonas son una de las clases más importante que generalmente está presente en las frutas cítricas como las naranjas, los limones y las uvas; y están

asociadas con una serie de beneficios para la salud debido a sus propiedades como atrapadores de radicales libres. Estos compuestos son responsables del sabor amargo del jugo y la cáscara de los cítricos, así como de algunos efectos farmacológicos como: antioxidantes, antiinflamatorios y para la disminución del colesterol en la sangre ⁽³⁶⁾.

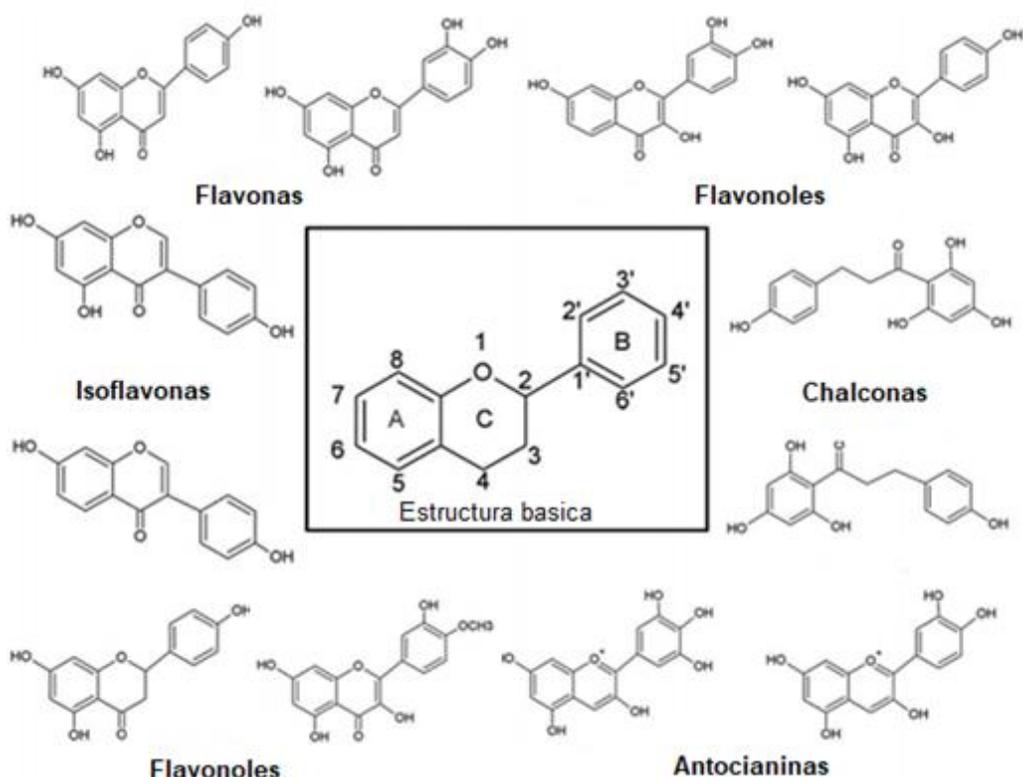


Figura 4. Estructura básica de los flavonoides y su subclasificación de acuerdo la estructura.

2.4.3.1.1 Hesperidina

La hesperidina es uno de los principales compuestos pertenecientes al grupo de las flavononas, su estructura comprende una aglicona, o metil eriodictiol y un disacárido (rutinosa) unido (Figura 5). Es un producto abundante en los cítricos y es el principal flavonoide en la naranja dulce y el limón ⁽³⁷⁾. A la hesperidina, como a otros bioflavonoides, se le atribuyen efectos antiinflamatorios, analgésicos ^(38,39), antioxidantes ⁽⁴⁰⁾, antihipertensivos, antiapoptóticos ⁽⁴¹⁾ y antibacteriales ⁽⁴²⁾.

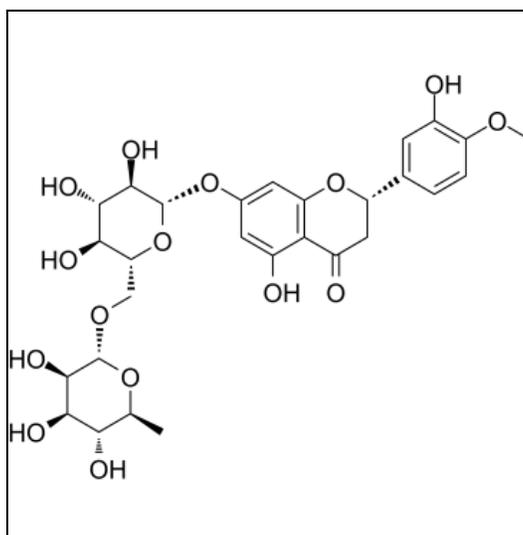


Figura 5. Estructura química de la hesperidina.

La hesperidina se encuentra de venta libre para su uso clínico en combinación con diosmina (Daflon) y es utilizado como venotónico y vasoprotector ya que produce vasoconstricción, aumento de la resistencia de los vasos y disminución de su permeabilidad ⁽⁴³⁾.

Con relación a su utilidad en el tratamiento del dolor, estudios preclínicos han demostrado su efecto antinociceptivo en varios modelos de dolor como en el de disfunción inducida por dolor en rata; en el cual se produce un dolor de tipo artritis gotosa; en el modelo de capsaicina ⁽⁴⁴⁾, en el de estiramiento abdominal (Writhing test) y en el de placa caliente (Hot plate) ⁽⁴⁵⁾.

2.5 Interacciones farmacológicas

La exploración de combinaciones de fármacos con efecto analgésico es una estrategia terapéutica que se va incrementando día con día, ya sea por el incremento del efecto con dosis bajas o por la disminución de los efectos adversos. En este sentido y considerando el beneficio de utilizar las plantas medicinales y/o compuestos derivados de ellas contra ciertos padecimientos, el número de investigaciones que estudian la posible interacción de éstos con fármacos en uso clínico, han aumentado, ya que es necesario saber si este tipo

de interacciones resultan en efectos aditivos, supraaditivos (sinérgicos) o infraaditivos (antagónicos) ⁽⁴⁶⁾.

2.5.1 Tipos de interacciones farmacológicas

En general, cuando se administran dos o más fármacos al mismo tiempo, se pueden presentar diferentes tipos de interacciones como sinergismo de suma o potenciación; o bien, antagonismo de los efectos farmacológicos inducidos por cada fármaco.

El sinergismo se refiere al aumento del efecto farmacológico de un fármaco por el empleo de otro. Esto sucede cuando se trata de dos fármacos con el mismo efecto terapéutico. Puede presentarse sinergismo de suma (efecto aditivo) que es cuando la respuesta farmacológica obtenida por la acción combinada de dos fármacos es igual a la suma de sus efectos individuales; o bien, sinergismo de potenciación (efecto supra-aditivo) que es cuando dos fármacos son administrados de manera simultánea y la respuesta obtenida es mayor que la correspondiente a la suma de sus acciones individuales.

El antagonismo (efecto infra-aditivo) se refiere a la disminución o anulación de la acción farmacológica de un fármaco por la acción de otro. Existen dos tipos de antagonismo, el competitivo, que es cuando ambos fármacos producen su efecto sobre el mismo blanco farmacológico y compiten por el sitio de acción observándose una disminución en el efecto total de la combinación. El otro tipo de antagonismo puede ser no competitivo que ocurre cuando dos fármacos actúan a través de diferentes blancos farmacológicos; o bien, sobre el mismo blanco farmacológico pero en diferentes sitios observándose una disminución del efecto de la combinación ⁽⁴⁷⁾.

2.5.2 Interacciones entre analgésicos y bioflavonoides

Algunos estudios preclínicos sobre la interacción de productos derivados de plantas medicinales con diversos analgésicos en varios modelos de dolor han mostrado una diversidad de resultados, por ejemplo: en la evaluación de la

interacción entre rutina y naproxeno mediante un estudio de isoblograma y utilizando el modelo de estiramiento abdominal en ratones, se determinó que la administración de estos dos compuestos produjo un efecto analgésico supra aditivo ⁽⁴⁸⁾. En la evaluación de la interacción entre curcumina y diclofenaco en el modelo de la formalina se observó un efecto de sinergismo de potenciación ⁽⁴⁹⁾. En la evaluación de la interacción entre ketorolaco y hesperidina en un modelo de dolor de tipo artritis gotosa en ratas, se determinó un efecto de potenciación a la respuesta antinociceptiva por medio de un análisis de superficie de interacción sinérgica ⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, no todas las referencias de interacciones entre flavonoides y AINEs son positivas, siendo el caso de la combinación entre quercetina y diclofenaco que al evaluarse en un modelo de dolor inflamatorio tipo artritis gotosa se obtuvieron resultados de antagonismo analgésico ⁽⁵⁰⁾.

2.5.1.1 Métodos de análisis de interacción

La evaluación de las interacciones fármaco-fármaco ha sido muy importante para la rama de la medicina y la química en los últimos años. Generalmente esta interacción es analizada con métodos analíticos que permiten definir el tipo de interacción. En situaciones donde el mecanismo de acción de la interacción fármaco-fármaco es bien conocida, es usual utilizar estudios computacionales (*in silico*); sin embargo, en los casos donde este mecanismo de acción conjunto se desconoce, como ocurre en el estudio de nuevas moléculas con acción terapéutica o la búsqueda de tratamientos combinados, se deben utilizar métodos basados en aditividad de Loewe para determinar el tipo de interacción que se está presentando ⁽⁵¹⁾.

Entre los métodos analíticos que permiten determinar el tipo de interacción farmacológica de la combinación de dos fármacos están el de matriz diagonal, isoblograma o el de superficie de interacción sinérgica ⁽⁵¹⁾. Como en este trabajo se utilizará el método del isoblograma es el que se explicará a detalle.

2.5.1.1.1 Isoblograma

El análisis por isoblograma ofrece una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias, ya que permite definir una simple adición de los

efectos individuales (*efecto aditivo*), una disminución (*efecto infra-aditivo*) o una potenciación del efecto estudiado (*efecto supra-aditivo*) ⁽⁵²⁾.

Este método se basa en la construcción de un isoblograma, que es una gráfica en coordenadas rectangulares de pares de dosis o concentraciones (Z_1, Z_2) de las sustancias respectivas que producen un nivel determinado de efecto cuando se aplican en forma conjunta. En esta gráfica las coordenadas ($Z_1, 0$) y ($0, Z_2$) corresponden a la concentración del compuesto menos activo y del compuesto más activo de forma indistinta que producen individualmente el mismo nivel de efecto. La línea que une a estos dos puntos define a la línea de aditividad y todos los puntos sobre esta línea, que tienen las coordenadas (Z_1, Z_2), teóricamente representan los pares de dosis aditivas (Z_{teo}) de los constituyentes administrados en forma conjunta que provocan el mismo nivel de efecto que los compuestos individuales (Figura 6) ⁽⁵³⁾.

Para el cálculo de las dosis a combinar es muy importante establecer la DE_{50} de cada uno de los compuestos en administración individual que se van a combinar. Estos datos se toman como base para calcular una dosis combinada obteniendo un valor de fracción para cada uno de los compuestos. Este valor junto con las fracciones establecidas que pueden ser desde 1:1 como fracción inicial, de 1:2 hasta 1:4 y viceversa, de 2:1 a 4:1 ayudan a la determinación de las dosis a evaluar, para al final del experimento determinar la fracción con la cual se obtiene una mejor respuesta, siempre y cuando sea estadísticamente significativa la diferencia entre las fracciones ^(54,55).

Si al realizar el experimento de la combinación de diferentes dosis de dos fármacos, las respuestas experimentales son mayores a las esperadas indicará que existe un efecto supra-aditivo, pero si las respuestas son menores a las teóricas indicará que existe un efecto infra-aditivo entre ambas sustancias.

Desde la aplicación del modelo de aditividad de Loewe en 1992 hasta el ajuste de la DE_{50} , los intervalos de confianza del 95% y las variaciones por parte de diversos investigadores en el análisis del isoblograma se ha demostrado que en la actualidad dicho método es ampliamente utilizado en experimentos

farmacológicos y práctica clínica, debido a su utilidad en la comparación de tratamientos y el análisis de los tipos de interacciones farmacológicas ⁽⁵⁶⁾.

Las ventajas del análisis isoblográfico frente a otros tipos de análisis de interacciones farmacológicas son que no se requiere conocer los mecanismos de acción específicos de los compuestos a evaluar, es un método validado matemáticamente y, lo más importante, es un método en el que el número de animales de experimentación es menor frente a los otros. De hecho, el método isoblográfico fue propuesto como el 'estándar de oro' para el análisis de interacciones farmacológicas ⁽⁵⁷⁾.

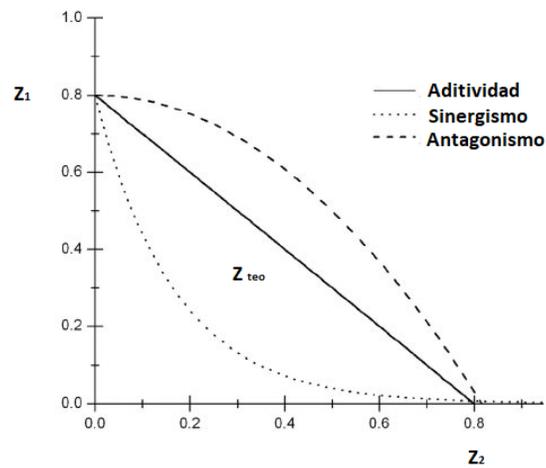


Figura 6. Representación del isoblograma, puntos Z_1 y Z_2 y Z_{teo} así como las posibles interacciones

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya se mencionó, el dolor es uno de los principales síntomas que acompañan a la mayoría de las patologías y la principal causa por la que las personas acuden al médico. La dipirona es uno de los analgésicos más utilizados para diferentes tipos de dolor, incluyendo el dolor visceral; sin embargo, produce efectos adversos que pueden limitar su uso clínico. Además, el uso de remedios herbolarios o productos naturales como complemento de los tratamientos alopáticos, es uno de los principales problemas que se presentan en el tratamiento del dolor; ya que el paciente opta por combinar el tratamiento prescrito por el médico con algún tratamiento tradicional, y en muchos de los casos, esta acción puede traer un efecto tanto positivo, como negativo, debido a algún tipo de interacción entre los dos tratamientos.

De entre los compuestos que se encuentran de forma natural en la medicina herbolaria, suplementos alimenticios y en muchos de los alimentos que se consumen diariamente se encuentran los flavonoides como la hesperidina. La hesperidina está presente en frutos cítricos y se le han atribuido diversos usos terapéuticos como en el alivio del dolor estomacal y el dolor provocado por varices.

Con estos antecedentes es de primordial importancia continuar con el estudio de la evaluación de combinaciones de fármacos y algún compuesto de origen natural, como los bioflavonoides, que puedan servir como base para el desarrollo de nuevos tratamientos para el control del dolor. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de interacción analgésica de la hesperidina en combinación con la dipirona, un analgésico antiinflamatorio no esteroideo utilizado en la clínica, en un modelo de dolor visceral.

4. HIPÓTESIS

Dado que la dipirona es utilizada para el tratamiento del dolor visceral y que la hesperidina, un bioflavonoide de origen natural, tiene propiedades analgésicas, su combinación incrementará la eficacia analgésica de la dipirona en un modelo de dolor visceral.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar el tipo de interacción analgésica de la hesperidina en combinación con la dipirona en el modelo de estiramiento abdominal en ratones.

5.2 Particulares

5.2.1. Determinar las curvas dosis respuesta del efecto analgésico de la dipirona y la hesperidina, en administración individual, en la prueba de estiramiento abdominal en ratones.

5.2.2. Determinar la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de ambos fármacos en la prueba de estiramiento abdominal para construir un isoblograma y determinar las dosis que se administrarán en combinación.

5.2.3. Determinar el efecto analgésico de varias combinaciones de dipirona con hesperidina en la prueba de estiramiento abdominal.

5.2.4. Determinar el tipo de interacción que se produce con la combinación de dipirona y hesperidina utilizando el método isoblográfico.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

En este estudio se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de entre 30-35 g, obtenidos del bioterio central de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se mantuvieron en un cuarto con condiciones controladas de temperatura y humedad (21 ± 2 °C, 33 HR), además de un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se les retiró el alimento 12 horas antes del procedimiento experimental y se mantuvieron con libre acceso al agua.

El uso de los animales, así como su disposición después de su utilización, se llevó a cabo bajo la supervisión de un protocolo aprobado por la comisión de Ética Animal de la Facultad de Medicina de la UNAM (FM/DI/054/2018) y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y normas internacionales sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2 Reactivos

Hesperidina, dipirona, cloruro de sodio (NaCl), tween 80 y ácido acético al 1%. La hesperidina se suspendió en tween 80 al 0.05% con solución salina isotónica (0.9%, SSI) y la dipirona se diluyó con solución salina isotónica (0.9%, SSI). Dado que la dipirona es un compuesto susceptible a la temperatura y fotosensible se mantuvo en refrigeración y frascos ámbar para su protección.

6.3 Prueba de estiramiento abdominal “Writhing test”

Para la determinación del efecto antinociceptivo de los diferentes tratamientos se utilizó el modelo de estiramiento abdominal el cual consiste en determinar el número de estiramientos abdominales inducidos en el ratón mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de ácido acético al 1% (Siegmund y cols., 1957)⁽⁵⁸⁾. Los estiramientos abdominales consisten en la contracción de los músculos abdominales, el arqueamiento de la espalda hasta que el abdomen toca el piso de la caja de acrílico, y la extensión de las extremidades posteriores, como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Representación de las características que debe presentar un estiramiento abdominal (arqueo de espalda, arrastre del abdomen y el estiramiento de las extremidades traseras).

6.4 Diseño experimental

Para construir las curvas dosis respuesta del efecto antinociceptivo de la dipirona y de la hesperidina en administración individual, se formaron grupos de 6 animales por tratamiento, y se utilizaron dosis de 10, 31.6, 56, 100 y 316 mg/kg de dipirona; y 10, 30, 100 y 300 mg/kg de hesperidina (Figura 8).

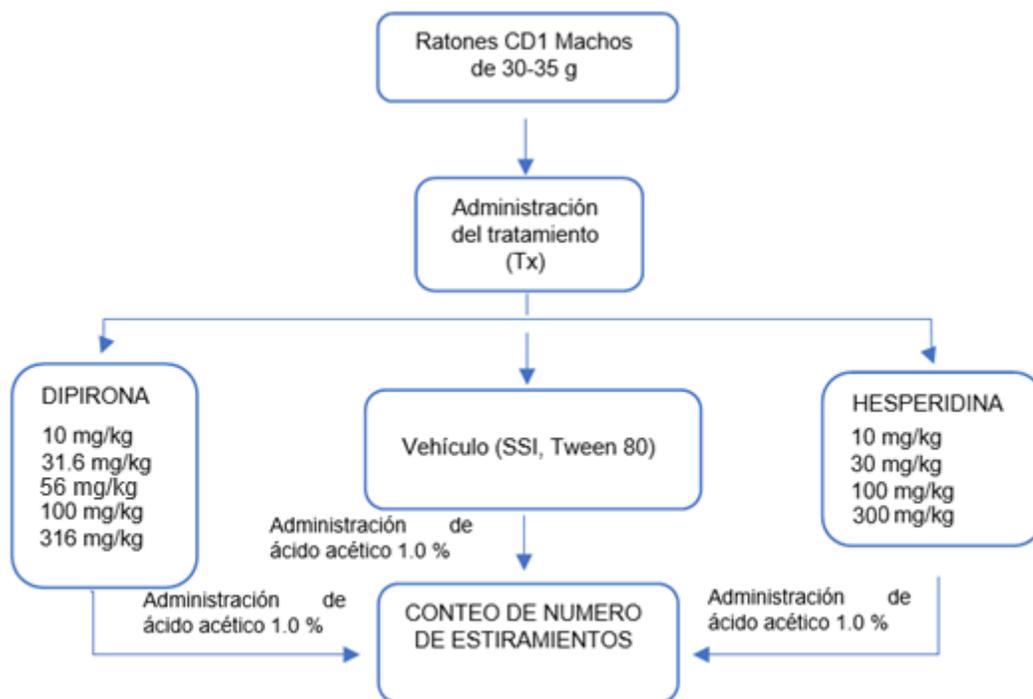


Figura 8. Diagrama de flujo de del diseño experimental sobre los tratamientos

Los tratamientos a evaluar (dipirona, hesperidina o vehículo) se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) 30 min (min) antes de la administración de 0.3 mL de ácido acético (1%) administrado por la misma vía. Una vez que se

administró el ácido acético, se cuantificó el número de los estiramientos abdominales cada 5 min durante 30 min.

Para seleccionar las combinaciones a probar de dipirona con hesperidina se construyó el isoblograma utilizando las DE_{50} de cada fármaco a partir de las curvas dosis respuesta de su administración individual. Una vez construido el isoblograma, se calcularon las dosis a combinar de cada fármaco que corresponden a las fracciones 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 y 3:1, de dipirona-hesperidina, respectivamente; con el fin de determinar la fracción con mayor efecto analgésico (Figura 9).

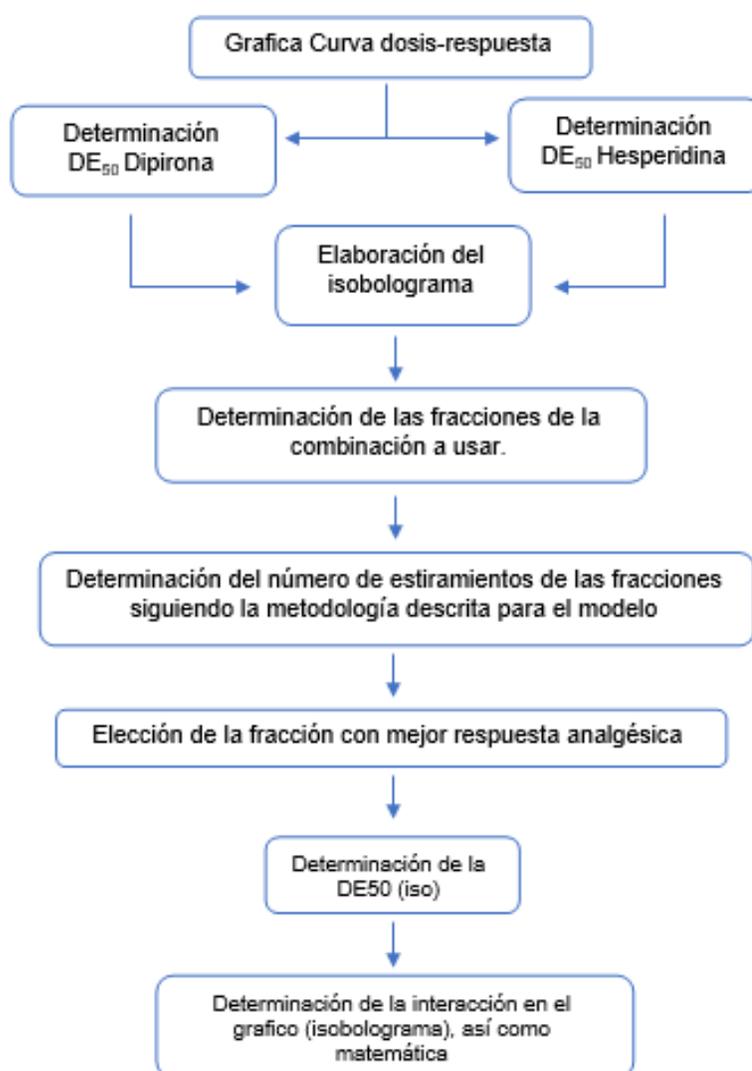


Figura 9. Diagrama de flujo de del diseño experimental para la elaboración del isoblograma.

Una vez determinada la fracción de la combinación con mayor efecto analgésico, éste se comparó con el efecto analgésico de las dosis de los fármacos administrados de manera individual para comprobar el tipo de interacción obtenida en el isoblograma.

6.5 Análisis estadístico de datos

Los porcentajes de antinocicepción de cada tratamiento se calcularon utilizando la siguiente formula:

$$\%Antinocicepción = \left[\frac{(\# \text{ Estiramientos de VEH} - \# \text{ Estiramientos Tx})}{\# \text{ Estiramientos VEH}} \right] * 100$$

Los cursos temporales de cada tratamiento se construyeron graficando la media de 6 animales \pm error estándar (EE). Para determinar si existe diferencia estadística entre los diferentes tratamientos, los datos se analizaron mediante el programa estadístico de Graph Pad Prism versión 5.0 con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas post hoc de Tukey o Dunnett, para la comparación de más de dos tratamientos; o bien, una t de Student para la comparación de dos tratamientos. Se consideró diferencia estadística con una $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Disminución de los estiramientos abdominales inducido por la dipirona y la hesperidina en administración individual.

En el modelo de dolor visceral, la administración de ácido acético al 1% por vía intraperitoneal indujo una conducta caracterizada por la presencia de estiramientos abdominales. El número máximo de estiramientos se obtuvo a los 10 min de su administración (29.2 ± 4.0), el cual disminuyó gradualmente hasta alcanzar un promedio de 17.4 ± 1.8 a los 30 min de evaluación (Vehículo, Figura 10A).

La dipirona indujo una disminución gradual dosis-dependiente del número de estiramientos inducidos por el ácido acético. Con las dosis bajas (10, 31.6 y 56 mg/kg) la disminución en el número de estiramientos abdominales fue muy pobre, aunque a la dosis de 56 mg/kg, sí mostro diferencia significativa con relación al vehículo, prácticamente en todos los tiempos de evaluación. Con la dosis de 100 mg/kg, ya se observa una reducción significativa en el número de estiramientos desde los 5 min de su administración y, con la dosis más alta (316 mg/kg), se obtuvo prácticamente la máxima reducción (de 29.3 ± 4.0 a 0.5 ± 0.3 a los 10 min de evaluación) en el número de estiramientos inducidos por el ácido acético en comparación con el grupo vehículo. Con esta dosis se mantuvo la reducción en el número de estiramientos prácticamente durante el resto del experimento (Figura 10A).

En el análisis del total de estiramientos inducidos en este modelo experimental en un periodo de 30 min, el ácido acético indujo un número total de estiramientos de 122.7 ± 13 , los cuales disminuyeron significativamente en los animales solo con las dosis más altas de dipirona (56, 100, y 316 mg/kg) a 65.3 ± 17.1 , 34.4 ± 12.1 y 14.0 ± 5.3 , respectivamente (Figura 10B).

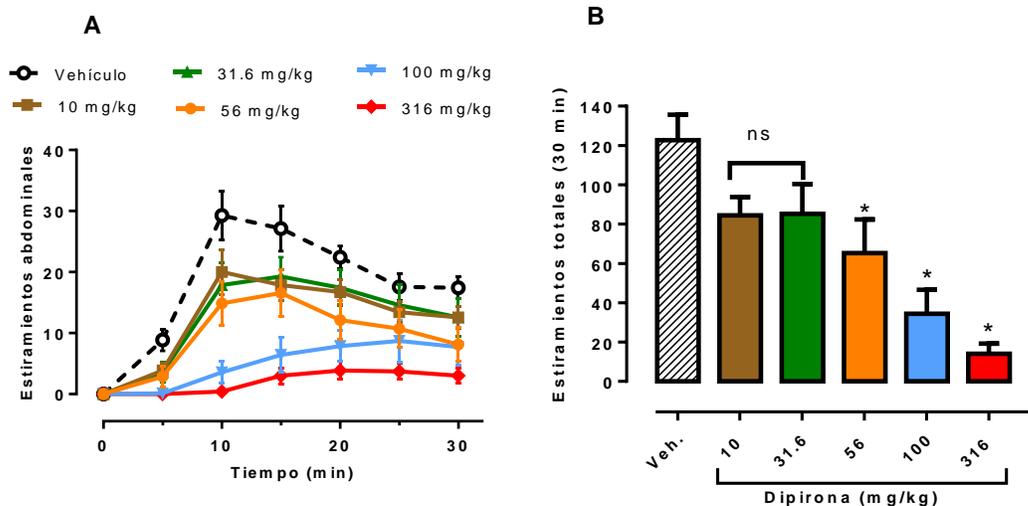


Figure 10. (A) Cursos temporales del número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético en presencia de diferentes dosis de dipirona. Cada punto representa el promedio del número de estiramientos de 7 animales a diferentes tiempos \pm EE. (B) Número total de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético durante 30 min de evaluación y el efecto inducido por diferentes dosis de dipirona. Cada barra representa el promedio \pm EE de 7 animales. * $P < 0.05$, ANOVA seguido de Dunnett.

La hesperidina también produjo una disminución dosis-dependiente del número de estiramientos inducidos por el ácido acético. Con las dosis bajas (10 y 30 mg/kg) se produce una disminución en el número de estiramientos muy similar que muestra significancia estadística desde los 10 min y se mantiene así durante el resto del experimento. De la misma manera, las dosis más altas (100 y 300 mg/kg), producen una disminución en el número de estiramientos muy similar; aunque mayor a las dosis bajas. En todos los casos se muestra una reducción significativa desde los 10 min de su administración con relación al grupo vehículo (29.3 ± 4.0); con la dosis de 10 mg/kg se obtuvieron 21.14 ± 2.3 estiramientos; con la dosis de 30 mg/kg se obtuvieron 18.0 ± 3.8 , con la de 100 mg/kg se obtuvieron 6.6 ± 1.3 ; finalmente con la dosis de 300 mg/kg se obtuvieron 5.14 ± 2.1 estiramientos (Figura 11A).

En el análisis del número total de estiramientos inducidos en este modelo en un periodo de 30 min, la hesperidina redujo significativamente los estiramientos inducidos por el ácido acético de 122.7 ± 13 en el grupo vehículo a 82.9 ± 8.7 ,

72.14±13.7, 29.9±6.6 y 25.6±8.0 a las dosis de 10, 30, 100 y 300 mg/kg, respectivamente (Figura 11B).

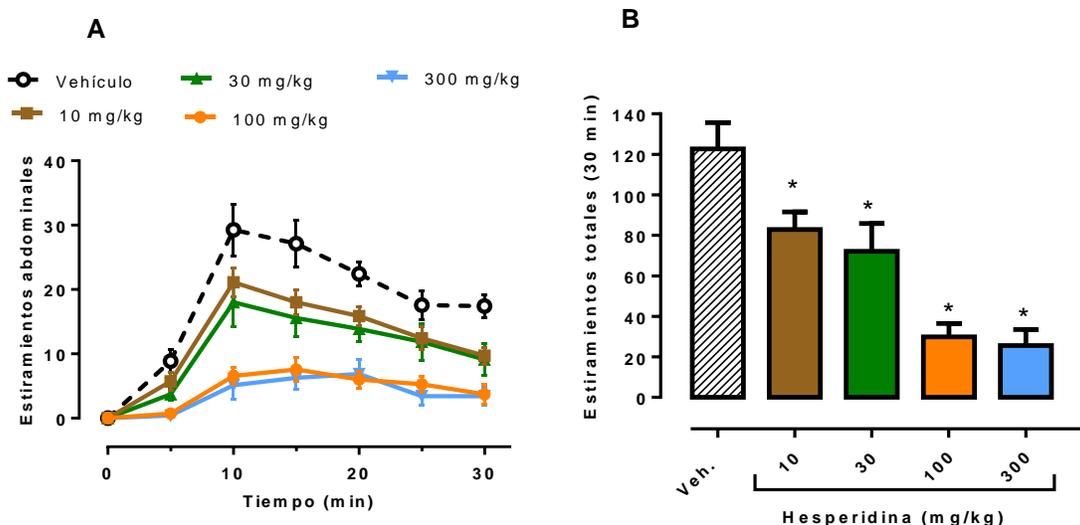


Figura 11. (A) Cursos temporales del número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético en presencia de diferentes dosis de hesperidina. Cada punto representa el promedio del número de estiramientos de 7 animales \pm EE. (B) Número total de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético durante 30 min de evaluación y el efecto inducido por diferentes dosis de hesperidina. Cada barra representa el promedio \pm EE de 7 animales. * $P < 0.05$, ANOVA seguido de Dunnett.

7.2 Curvas dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo inducido por dipirona y hesperidina.

Las CDRs del efecto antinociceptivo de la dipirona y hesperidina en administración individual se construyeron con base al número de estiramientos totales (30 min) del grupo vehículo (Veh), con respecto al número de estiramientos de cada tratamiento; es decir, con cada una de las dosis de dipirona y de hesperidina. En el análisis de la CDR de dipirona se obtuvo un efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) de $84.2 \pm 5.9\%$, el cual se alcanzó con la dosis de 316 mg/kg; y la dosis efectiva 50 (DE_{50}) calculada fue de 108.9 ± 13.3 mg/kg. Por otro lado, el $E_{m\acute{a}x}$ de hesperidina fue de $66.3 \pm 7.4\%$ con la dosis de 100 mg/kg y la DE_{50} calculada fue de 84.5 ± 10.4 mg/kg. Como se puede observar en la Figura 12A, no hay diferencia significativa en el $E_{m\acute{a}x}$ ni en la DE_{50} de ambos fármacos, mostrando ambos fármacos la misma eficacia y potencia. Con las DE_{50} de cada fármaco se

construyó el isoblograma correspondiente de la combinación dipirona+hesperidina (Figura 12B).

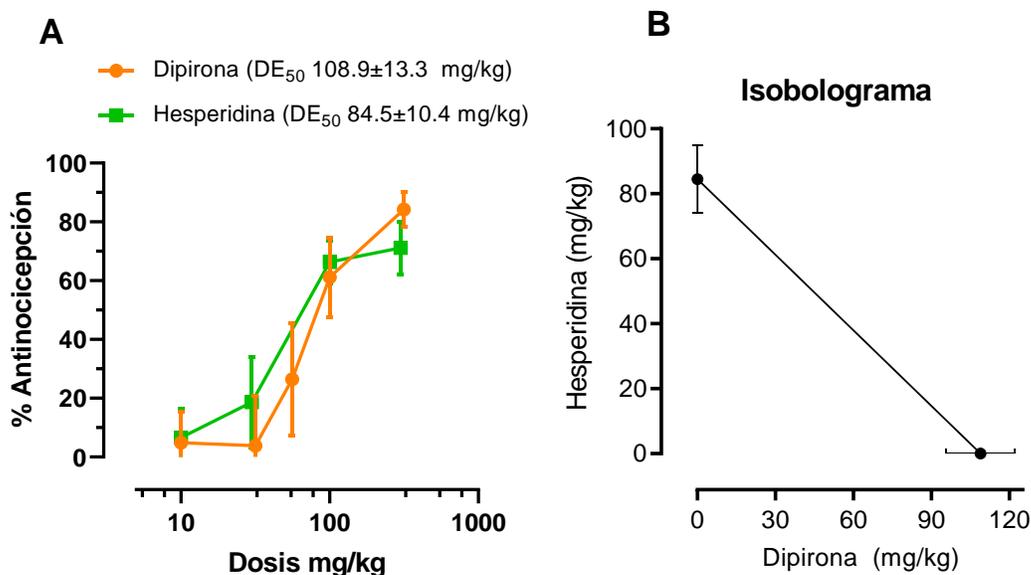


Figura 12. A) CDRs del efecto antinociceptivo de dipirona y hesperidina en administración individual en el modelo de estiramiento abdominal en ratones. Cada punto representa el promedio de estiramientos abdominales de 7 animales \pm EE. B) Isoblograma construido a partir de las DE₅₀ de hesperidina y dipirona calculadas de sus CDRs.

7.3 Efecto antinociceptivo de varias combinaciones de dipirona+hesperidina.

En función de las DE₅₀ de dipirona y hesperidina (108.9±13.3 y 84.5±10.4 mg/kg, respectivamente) y la construcción del isoblograma se seleccionaron las fracciones a probar de cada uno de los fármacos; así como las dosis correspondientes, las cuales se muestran en el Cuadro 1.

Las diferentes combinaciones de las fracciones de dipirona/hesperidina que se probaron experimentalmente mostraron una disminución significativa en el número total de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético en comparación con el grupo VEH (Figura 13).

Cuadro 1. Dosis calculadas de las fracciones a probar experimentalmente de dipirona+hesperidina

Dipirona	Hesperidina	
Fracciones		Dosis de Dip y Hesp
1	1	54.4/42.2 mg/kg
1	2	37.0/55.7 mg/kg
2	1	71.8/28.7 mg/kg
1	3	27.2/63.3 mg/kg
3	1	81.6/21.1 mg/kg

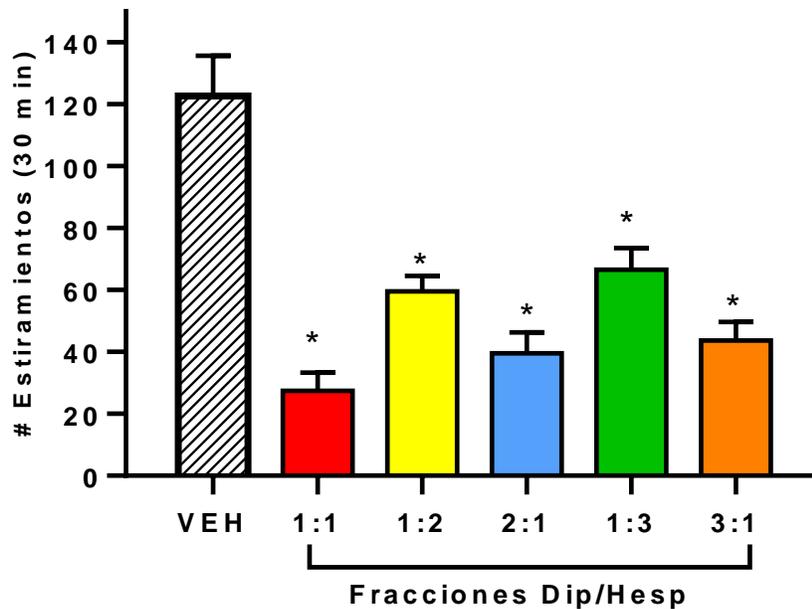


Figura 13. Número de estiramientos totales durante 30 min con la administración de ácido acético en presencia de diversas fracciones combinadas de Dip/Hesp. Cada barra representa el promedio de una n de 7 animales \pm EE. * $P < 0.05$, ANOVA una vía seguido de una prueba Dunnett comparados contra el VEH.

7.4 Análisis del número de estiramientos abdominales previo tratamiento con las diferentes fracciones combinadas

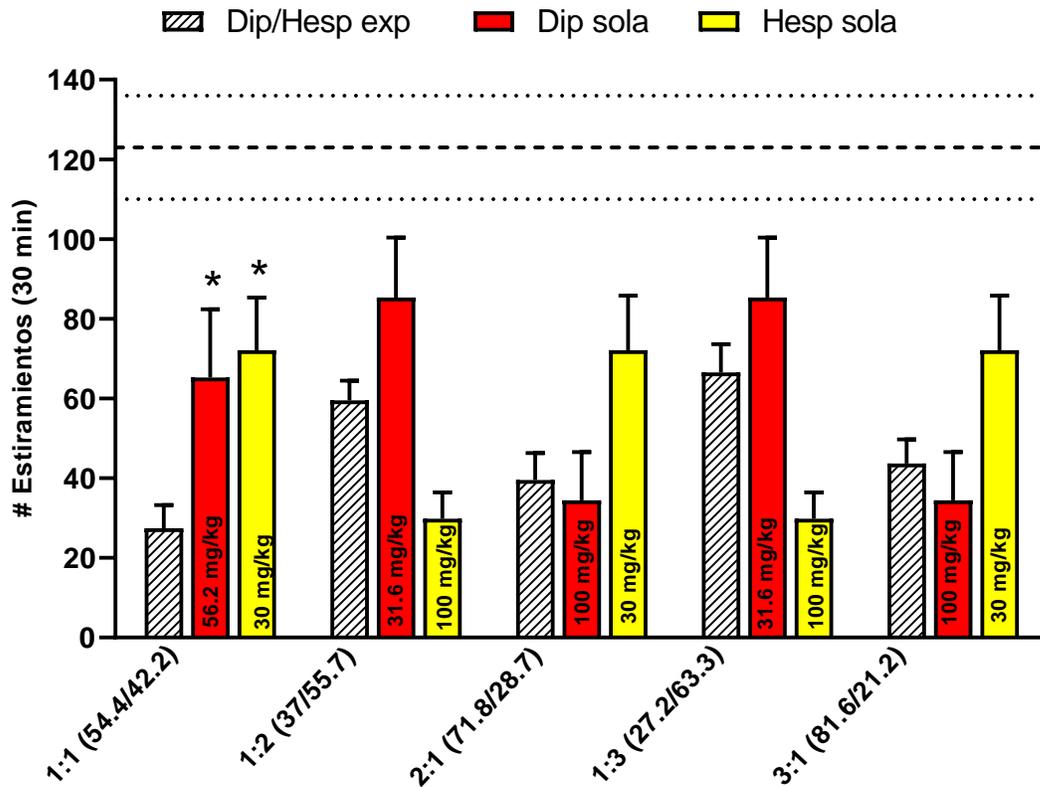


Figura 14. Número de estiramientos totales durante 30 min con la administración de las diferentes fracciones de Dip/Hesp y los efectos de las dosis más cercanas a cada combinación en administración individual. La línea punteada central representa el promedio de los estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético sin tratamiento y las líneas punteadas inferior y superior a ésta representan los EE. Cada barra representa el promedio de una n de 6 a 7 animales \pm EE. * $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett comparado con su respectiva fracción.

En el análisis de la comparación del efecto de las diferentes fracciones de Dip/Hesp contra el efecto de las dosis más cercanas a la respectiva fracción de los fármacos en administración individual sobre el número de estiramientos abdominales inducido por el ácido acético en un periodo de 30 min se observa que solo la combinación de la fracción 1:1 (54.4/42.2 mg/kg) mostró disminución significativa en el número de estiramientos en comparación con las dosis más cercanas de los fármacos en administración individual (Figura 14); por lo cual,

esta fracción fue la que se seleccionó para construir una CDR con 4 combinaciones y ser analizada en el isoblograma.

7.5 Efecto antinociceptivo inducido por varias combinaciones de Dip/Hesp en una fracción 1:1

Para la construcción de la CDR de la fracción 1:1, se calcularon las dosis a combinar de cada fármaco considerando la primera combinación de esta fracción evaluada previamente. Por lo que las dosis de la combinación de 54.4 mg/kg de dipirona + 42.2 mg/kg de hesperidina fueron divididas en dos para obtener la siguiente combinación a evaluar; a su vez éstas fueron divididas en dos obteniendo las siguientes dosis a combinar; y, nuevamente, éstas fueron divididas en dos para obtener las últimas dosis a combinar (Cuadro 2).

Cuadro 2. Dosis calculadas de dipirona y hesperidina que corresponden a una fracción constante 1:1 para la construcción de la CDR de la combinación.

Dosis para combinar (mg/kg) de la fracción 1:1 de:	
Dipirona	Hesperidina
54.45	42.24
27.225	21.12
13.6125	10.56
6.80625	5.28

El análisis de la CDR del efecto analgésico de la combinación de los dos fármacos en proporción 1:1, mostró una relación dosis respuesta dependiente de la concentración de los fármacos; es decir, a mayor concentración mayor respuesta obtenida, con un coeficiente de correlación de $r^2=0.98$, un máximo de respuesta obtenido de la mayor combinación de 69.1 ± 6.6 % y un mínimo de 20.3 ± 6.5 %. Al tener un coeficiente de correlación cercano a 1 el cálculo de la DE_{50} fue determinada mediante una interpolación, siendo esta de 46.7 ± 6.2 mg/kg (Figura 15).

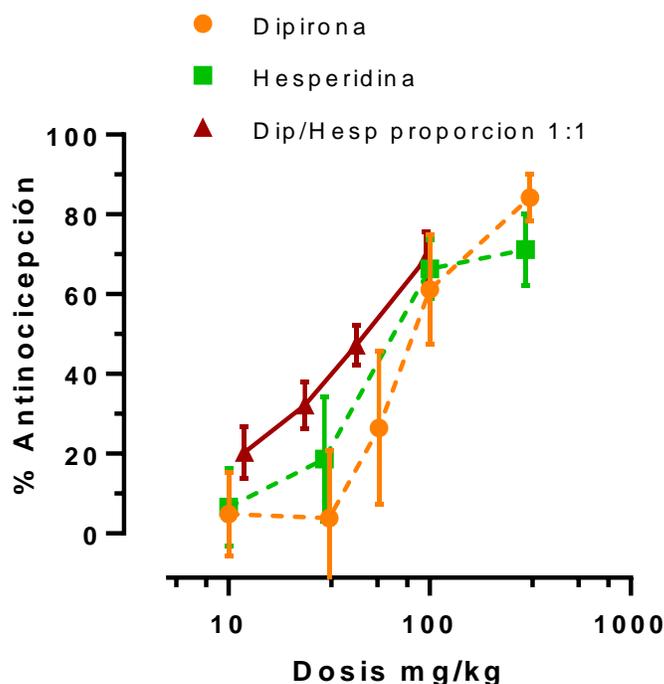


Figura 15. CDRs del efecto antinociceptivo de dipirona y hesperidina en administración individual y de la combinación de ambos fármacos en proporción 1:1 para la determinación del tipo de interacción entre los tratamientos. Cada punto representa el promedio de una n de 7 animales \pm EE.

Para el análisis isoblográfico de la combinación se utilizó la DE_{50} calculada de las CDR de los fármacos en administración individual y la CDR de la proporción a usar seleccionada (fracción 1:1), siendo esta de $DE_{50} = 96.69 \pm 11.9$ mg/kg (marcada en el gráfico con el punto color azul); además de la DE_{50} experimental, calculada a partir de las dosis que provenían de la fracción 1:1, siendo esta de DE_{50} de 46.7 ± 6.3 mg/kg (marcada en el gráfico con un punto de color rojo), y las respectivas DE_{50} de los tratamientos para la construcción de la isobola (Figura 16). Como se puede observar la gráfica muestra un posible efecto de potenciación debido a la disminución de la dosis para la obtención del efecto deseado.

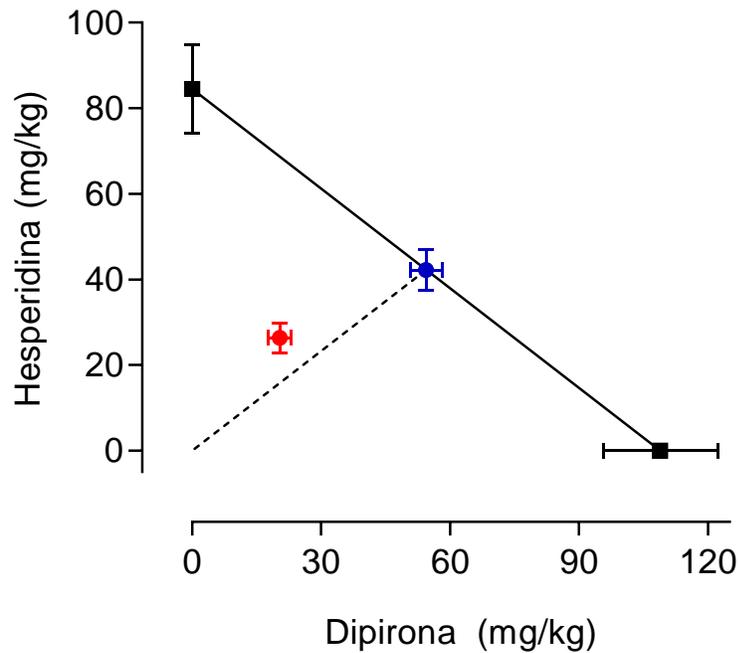


Figura 16. Isoblograma de la interacción entre dipirona y hesperidina en fracción 1:1 utilizando el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético en ratones.

Para la confirmación de una interacción de tipo potenciación con la combinación de dipirona con hesperidina se decidió utilizar las dosis con mayor efecto de la fracción 1:1 de ambos fármacos (54.4/42.2 mg/kg de Dip/Hesp) y probarla esas dosis de ambos fármacos en administración individual en diferentes grupos de animales. Los resultados muestran que la suma algebraica del efecto obtenido con la dosis de dipirona de 54.4 mg/kg ($21.3 \pm 4.5\%$) y la dosis de hesperidina de 42.2 mg/kg ($40.5 \pm 2.6\%$) en administración individual (efecto esperado), es significativamente menor al efecto obtenido experimentalmente con la combinación (61.74 ± 2.9 vs $77.6 \pm 4.7\%$, $p < 0.05$, t de Student) (Figura 17).

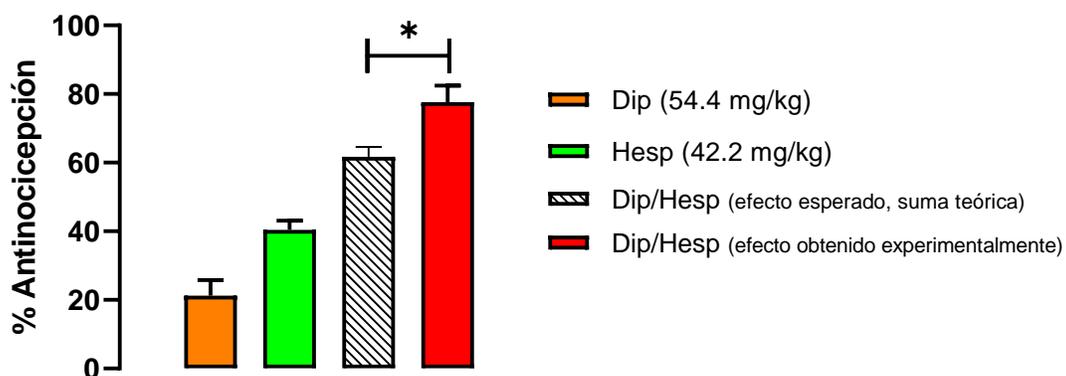


Figura 17. Efecto antinociceptivo de dipirona (54.4 mg/kg), hesperidina (42.2 mg/kg) y su combinación en el número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético. La barra con líneas diagonales representa la suma de los efectos obtenidos con los fármacos en administración individual (efecto esperado) y la barra roja representa el efecto obtenido experimentalmente con la combinación. Las barras con color representan el promedio del efecto antinociceptivo de 7 animales \pm EE. * $p < 0.05$ con una t de Student.

Para corroborar que la interacción entre dipirona y hesperidina es de tipo potenciación se calculó ⁽⁵⁹⁾ la magnitud de la interacción (Mi) entre los dos tratamientos a través de las fórmulas matemáticas.

$$\rho A = \frac{fA * DE_{50}A}{Z_{ad}} \quad ; \quad \rho B = \frac{fB * DE_{50}B}{Z_{ad}}$$

$$\rho A_{ex} = \rho A * Z_{ex} \quad ; \quad \rho B_{ex} = \rho B * Z_{ex}$$

$$Mi = (\rho A_{ex} / DE_{50}A) + (\rho B_{ex} / DE_{50}B)$$

Donde:

$f(A, B)$ = Fracción del fármaco A o B.

$DE_{50}(A, B)$ = Dosis efectiva 50 del fármaco A o B.

Z_{ad} = Relación entre las DE_{50} de cada tratamiento y las fracciones.

Z_{ex} = DE_{50} experimental.

El valor de esta interacción fue de 0.4828; el cual, de acuerdo con los parámetros de interacción, corresponde a un valor de M_i menor a 1 (<1) que sugiere una interacción de tipo superaditiva.

Otra forma de calcular la M_i es a través de la siguiente fórmula:

$$M_i = \log_{10}(Z_{ad}) - \log_{10}(Z_{ex})$$

Donde:

Z_{ad} = Relación entre las DE_{50} de cada tratamiento y las fracciones.

Z_{ex} = DE_{50} experimental.

Pero en este caso se indica que, si el resultado es mayor a cero, el tipo de interacción sería superaditivo. Al realizar el cálculo con los resultados de la combinación Dip/Hesp se obtuvo un valor de M_i de 0.3160, sugiriendo el mismo tipo de interacción que el cálculo anterior.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el efecto antinociceptivo de dipirona con hesperidina en el modelo de estiramiento abdominal (writhig) inducido por la administración intraperitoneal de ácido acético al 1%, el cual simula un dolor de tipo visceral.

La dipirona, también conocida como metamizol, es un fármaco del grupo de los AINEs, que se utiliza en la clínica para el alivio el dolor visceral provocado por espasmos intestinales, el dolor postoperatorio y la migraña, entre otros ⁽⁶⁰⁾; además, produce un efecto antipirético y espasmolítico.

En este trabajo la dipirona produjo un efecto analgésico de alrededor del 85% con la dosis de 316 mg/kg en el modelo de estiramiento abdominal (writhig). Se sabe que en este modelo, el estímulo químico actúa sobre una amplia región de fibras para el dolor (nociceptores) de tipo C, que conducen un dolor de tipo lento y difuso. Los espasmos producidos por el ácido acético (agente irritante) producen la liberación de sustancias inductoras del dolor como las prostaglandinas, la bradicinina, la histamina, etc., así como acidosis tisular local, lo cual activa a los canales iónicos sensibles a protones (ASIC) en las fibras nociceptivas, aunque también pueden estar involucrados receptores TRPV1 que son activados por acidosis o por una acción directa sobre los nociceptores ⁽⁶¹⁾. También las citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucina 1 (IL-1 β) y las quimiocinas; así como las especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyen a la inducción de los estiramientos abdominales ⁽⁶²⁾. La participación de las prostaglandinas en éste modelo de dolor explica el efecto analgésico de la dipirona mostrada en este trabajo así como en otros en donde utilizan el mismo modelo ⁽⁶³⁾; o bien, en otros modelos de dolor, como el de la formalina ⁽⁶⁴⁾ y el de disfunción inducida por dolor en ratas ⁽⁶⁵⁾.

Además de la inhibición de las ciclooxigenasas (COX-2 y COX-3) que sintetizan a las prostaglandinas que participan en el dolor, la inflamación y la

piresis; la efectividad analgésica de la dipirona se ha relacionado con la activación del sistema opioide y del sistema cannabinoide ^(66,67). El sistema cannabinoide endógeno juega un papel importante en la regulación del dolor ⁽⁶⁸⁾; y en un estudio preclínico se determinó que los metabolitos activos del metamizol activan a los receptores CB1, que participan en la vía analgésica descendente reduciendo la transmisión GABAérgica e induciendo antinocicepción ⁽⁶⁹⁾. Por otro lado, su efecto espasmolítico se ha asociado con la inhibición del incremento de Ca²⁺ intracelular, resultado de la inhibición de la síntesis del fosfato inositol, y su consecuente inactivación de la contracción del músculo liso visceral ⁽³⁰⁾.

A pesar de la eficacia clínica de la dipirona, se han reportado diversos efectos adversos que limitan su uso; entre los más graves, aunque poco frecuentes, están las reacciones anafilácticas, discrasias sanguíneas y agranulocitosis ⁽⁷⁰⁾. Por lo que una alternativa para mejorar su eficacia analgésica y/o disminuir sus efectos adversos, podría ser combinarla con otros fármacos, una práctica cada vez más utilizada clínicamente para el alivio del dolor con los AINEs ⁽⁷¹⁾.

Por otro lado, el uso de compuestos herbolarios para el tratamiento de diversas afecciones se ha incrementado en la última década, ya sea bajo prescripción médica o no ⁽⁷²⁾. Uno de los principales padecimientos en los cuales se puede complementar el tratamiento alopático con compuestos de origen herbolario, es el dolor; y siendo el dolor de tipo visceral uno de los más comunes, cobra gran significancia el análisis de la interacción de fármacos utilizados para su alivio.

La hesperidina, un compuesto de tipo herbolario, es un flavonoide abundante en frutas cítricas y en varias plantas medicinales como *Rosmarinus officinalis*, conocida comúnmente como romero. Esta especie es utilizada en la preparación de alimentos y bebidas; así como en la medicina tradicional como espasmolítico en el tratamiento de cólicos renales y dismenorrea ⁽⁷³⁾. De hecho, se sugiere que el efecto antinociceptivo inducido por el romero en un modelo de dolor inflamatorio se debe a la presencia de la hesperidina ⁽⁷⁴⁾. Además, se ha demostrado que la hesperidina produce diversos efectos farmacológicos como

venotónico ⁽⁷⁵⁾, sedante ^(76,77), antioxidante ⁽⁴⁰⁾, anticancerígeno ⁽⁴¹⁾, antiinflamatorio y analgésico ^(38,39).

En este estudio, la hesperidina mostró un efecto analgésico de cerca del 70% con la dosis de 100 mg/kg. Nuestros resultados coinciden con otros estudios donde se demostró el efecto antinociceptivo de la hesperidina en los modelos de writhing y hot-plate ⁽⁴⁵⁾; aunque con dosis menores (0.1-30 mg/kg) a las utilizadas en nuestro estudio. Las diferencias en las dosis efectivas en ese estudio y el nuestro pueden ser debido a la diferencia en la edad, el peso o la cepa (Swiss) de los animales utilizados; los cuales son algunos de los principales factores que afectan el efecto antinociceptivo de diferentes compuestos ⁽⁷⁸⁾. En otro estudio, la actividad antiinflamatoria y analgésica de la hesperidina, se obtuvo con dosis de entre los 100-400 mg/kg, cercanas a las dosis usadas en nuestro trabajo ⁽⁷⁹⁾.

El mecanismo implicado en el efecto antinociceptivo de la hesperidina se le atribuye a su actividad antioxidante, por la inhibición de la producción de ROS. Se sabe que la producción de las ROS es uno de los pasos desencadenantes de los procesos de inflamación y dolor, estas son producidas por células relacionadas con mecanismos de defensa del organismo, como los neutrófilos polimorfonucleares ⁽⁸⁰⁾. Las ROS que se liberan durante el proceso inflamatorio incluyen al anión superóxido (O_2^-), el radical hidróxido (OH), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl) ⁽⁸⁰⁾; y son capaces de desencadenar un cascada de señales que terminan con la producción del mediadores del dolor como las prostaglandinas, a través de la producción de COX-2, TNF- α y IL-1; así como el óxido nítrico, a través de la síntesis de la sintasa de óxido nítrico inducible (SONi). Además, diversos estudios relacionan la producción de ROS con el dolor visceral, en ellos se evalúa la presencia o disminución de estas en comparación con la intensidad de dolor, encontrando que al disminuir la cantidad de ellas el dolor disminuye; mientras que, durante el proceso doloroso se encuentran aumentadas ^(81,82).

Los mecanismos responsables de otros efectos farmacológicos reportados de la hesperidina; como el antiinflamatorio, no están descritos con claridad, pero se sabe que es capaz de reducir a las TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VEG, además de su

capacidad de inhibir a los neutrófilos que generan radicales superóxidos (ONOO^-) y productos finales de la glicosilación ⁽⁸³⁾ sugiriendo así que este bioflavonoide puede inducir su efecto antinociceptivo a través de varios mecanismos, ya que algunos de estos productos también están relacionados con la nocicepción.

Debido a que tanto la dipirona como la hesperidina en administración individual producen efectos analgésicos en diversos modelos de dolor a través de varios mecanismos, en este trabajo evaluamos la interacción analgésica que podría presentarse con su combinación. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una interacción positiva sinérgica de la combinación de estos dos fármacos en el modelo de dolor visceral a través de un análisis isoblográfico. Este análisis es un método utilizado para el estudio de la interacción entre dos fármacos, que permite predecir el comportamiento de la interacción utilizando un número reducido de dosis en combinación de los fármacos ⁽⁷¹⁾.

De las fracciones probadas experimentalmente en este estudio, la fracción de la combinación que demostró un mejor efecto sinérgico fue la fracción 1:1. Las dosis probadas en combinación, de acuerdo con el análisis isoblográfico, fueron 54.4 mg/kg de dipirona con 42.2 mg/kg de hesperidina. Con esta combinación, se obtuvo un efecto analgésico de cerca del 80%, efecto muy cercano al obtenido con la dosis de 316 mg/kg de dipirona en administración individual (85%) o con la dosis de hesperidina de 100 mg/kg en administración individual (70%). Como se puede observar con la combinación se utilizó 5.8 veces menos cantidad de dipirona y 2.3 veces menos cantidad de hesperidina, alcanzando prácticamente la misma eficacia analgésica que con los fármacos en administración individual, pero con dosis mucho menores. Este aumento en la eficacia analgésica utilizando dosis menores nos hace suponer una disminución en los efectos adversos de la dipirona, aunque es necesario corroborarlo con estudios específicos de efectos adversos.

Para descartar que la combinación de la fracción 1:1 produjera solo un efecto de suma, se evaluaron los efectos antinociceptivos de las dosis correspondientes de esa combinación en administración individual y el efecto de la combinación (efecto obtenido) fue superior a la suma de los efectos

individuales (efecto esperado), sugiriendo un efecto antinociceptivo de potenciación.

Estos resultados sobre la interacción de la dipirona con hesperidina concuerdan con otro estudio en el que demostraron la potenciación que se produce con la combinación de hesperidina con el ketorolaco, otro AINE utilizado para el tratamiento del dolor; en un modelo de dolor inflamatorio de tipo artritis gotosa ⁽⁸⁴⁾. Sin embargo, también existen reportes que indican que hay interacciones en donde un fármaco disminuye el efecto del otro produciendo un antagonismo analgésico; por ejemplo, la combinación de tramadol con ácido ursólico, otro metabolito derivado de plantas medicinales ⁽⁸⁵⁾; o bien, la combinación de diclofenaco con quercetina, otro bioflavonoide ⁽⁵⁰⁾. Por lo tanto, no existe la certeza de que las combinaciones de productos naturales con fármacos clínicamente eficaces puedan producir efectos benéficos, ya que éstos tienen varios compuestos activos que podrían perturbar la actividad de las enzimas y/o transportadores que metabolizan algún fármaco, o interactuar con ellos por diversos mecanismos ⁽⁸⁶⁾, por lo que es necesario el análisis cuidadoso de la interacción de las combinaciones de metabolitos de plantas medicinales con diferentes AINEs.

El mecanismo de acción responsable de la potenciación antinociceptiva de la combinación de dipirona con hesperidina obtenida en este trabajo no fue explorada; sin embargo, tomando en cuenta los antecedentes previos sobre la capacidad antioxidante de la hesperidina para inhibir la formación de ROS y la relación que tienen éstas con el modelo de dolor visceral; así como la capacidad de la dipirona de inhibir la síntesis de las prostaglandinas; importantes mediadores del dolor; nos lleva a sugerir que probablemente existe una interacción de tipo farmacodinámico con la combinación de estos fármacos. Además, también existe una interacción negativa entre los AINEs y las ROS, ya que este tipo de analgésicos pueden ser oxidados por las ROS, disminuyendo su eficacia analgésica y, al administrarlos con un agente que inhiba la formación de los ROS, como la hesperidina, se esperaría un mejor efecto analgésico de los AINEs ⁽⁸⁷⁾.

Es de suponer que el mecanismo de potenciación analgésica de la combinación de dipirona con hesperidina, no solo se centra en una vía de inhibición, sino que abarca varias vías de señalización que interfieren con la transmisión de la señal dolorosa; o bien, que existe una posible interacción farmacocinética además de la farmacodinámica. Sin embargo, es necesario realizar los estudios pertinentes para demostrar estas hipótesis.

Por otro lado, además de la potenciación analgésica encontrada con hesperidina y dipirona, otra ventaja podría ser la posible disminución de los efectos adversos a nivel gastrointestinal inducido por los AINEs como la dipirona, ya que en muchos estudios se reporta que los flavonoides inducen un efecto gastroprotector ^(88,89), lo cual protegería de los efectos gastrointestinales inducidos por la dipirona.

Varios estudios preclínicos se centran en determinar la eficacia de las combinaciones de diversos compuestos como estrategia en la mejora de los tratamientos y la disminución de los efectos adversos, así como en las posibles interacciones entre compuestos de origen natural que se encuentran en la dieta diaria en forma de suplementos alimenticios, con analgésicos como los AINEs para reducir el dolor y la inflamación ⁽⁹⁰⁾ En este sentido, consideramos que los resultados de este estudio enfatizan la importancia de evaluar las interacciones que existen entre los medicamentos alopáticos y los compuestos herbolarios, para sustentar con evidencias científicas el riesgo/beneficio de este tipo de combinaciones ⁽⁷²⁾. En el caso específico de los flavonoides, en los últimos años se ha comenzado a probar su eficacia en diferentes padecimientos donde se administran con otros compuestos o se prueban de manera individual; incluso se están realizando pruebas para el desarrollo de formas farmacéuticas apropiadas para su administración ⁽⁹¹⁾.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la administración individual de dipirona y hesperidina produjeron efectos antinociceptivos dosis dependiente en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético. Además, el análisis isobolográfico de la combinación de estos fármacos demostró que producen un efecto sinérgico de potenciación, alcanzando incluso la misma eficacia con dosis mucho menores de ambos fármacos.

Esto sugiere que la combinación de dipirona con hesperidina podría considerarse una alternativa adecuada para el alivio del dolor visceral, con la posibilidad de producir un menor riesgo de los efectos adversos en comparación con el uso de la dipirona en administración individual.

10. PERSPECTIVAS

- A. Determinar la participación de diversos mediadores y/o neurotransmisores involucrados en el efecto analgésico de la combinación de dipirona y hesperidina para establecer una posible interacción farmacodinámica. Podría evaluarse la actividad de COX, la producción de ROS y la participación de receptores a cannabinoides.
- B. Determinar si las concentraciones plasmáticas de dipirona y/o sus metabolitos se ven modificadas en presencia de hesperidina para establecer una interacción de tipo farmacocinética.
- C. Establecer si la potenciación analgésica de la combinación de dipirona con hesperidina se reproduce en modelos que representen otros tipos de dolor, como inflamatorio, nociceptivo o neuropático.

11. REFERENCIAS

1. Ibarra, E. (2006). Una nueva definición de “dolor”. Un imperativo de nuestros días. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*, 13(2), 65–72.
2. Swift, A. (2015). The importance of assessing pain in adults. *Nursing Times*, 111(41), 12–17.
3. Karcioglu, O., Topacoglu, H., Dikme, O., & Dikme, O. (2018). A systematic review of the pain scales in adults: Which to use?, 36(2018), 707-714.
4. Tripathi, L., & Kumar, P. (2014). Challenges in pain assessment: Pain intensity scales. *Indian Journal of Pain*, 28(2), 61.
5. Vicente-Herrero, M. T., Delgado Bueno, S., Bandrés Moyá, F., Ramírez Iñiguez de la Torre, M. V., & Capdevila García, L. (2018). Valoración del dolor. Revisión Comparativa de Escalas y Cuestionarios. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*, 25(4), 228–236.
6. Berry, P., Convington, E., Dahl, J., Katz, J., & Christine, M. (2015). Pain: Current Understanding of Assessment, Management, and Treatments. *National Pharmaceutical Council*, 1(703), 100.
7. Wisconsin, U. o. (2010). Pain management. Obtenido de <http://projects.hsl.wisc.edu/GME/PainManagement/session2.4.html>
8. Diaz, P. (2005). Dolor Tipos de dolor y escala terapéutica de la O . M . S . Dolor iatrogénico. *Oncologia*, 28(3), 139–143.
9. Jordi, S. C., Tratado de dolor neuropático. 1ra. Ed., Editorial Medica panamericana S.A. de C.V., (2007).
10. Woessner, J., Holistic, M., & Care, P. (2018). Overview of Pain: Classification and Concepts. *Pain Research and Management*, January 2006.
11. Collett, B. (2013). Visceral pain: the importance of pain management services. *British Journal of Pain*, 7(1), 6–7.
12. Austin, P. D., & Henderson, S. E. (2011). Biopsychosocial Assessment Criteria for Functional Chronic Visceral Pain: A Pilot Review of Concept and Practice. *Pain Medicine*, 12(4), 552–564.
13. Holzer, P. (2015). Europe PMC Funders Group Acid-sensitive ion channels and receptors (Issue 194). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7>
14. Davis, M. P. (2011). Cancer pain. *Supportive Oncology*, 131–135.
15. Navarro, X. (2014). Fisiología del sistema nervioso autónomo. *Rev. Neurol*, 35(2002), 553–562.
16. Frias B., Merighi A., (2016). Capsaicin, Nociception and Pain, 21, 797; doi:10.3390/molecules21060797

17. Steeds, C. E. (2016). The anatomy and physiology of pain. *Surgery (United Kingdom)*, 34(2), 55–59.
18. Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Adam, S. K., Manan, N. A., & Basir, R. (2018). General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>
19. Briggs, E. (2010). Understanding the experience and physiology of pain. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain))*, 25(3), 35–39.
20. Turner, J. A. (1988). Pain and disability. Clinical, behavioral, and public policy perspectives (Institute of Medicine Committee on pain, disability, and chronic illness behavior). In *Pain (Vol. 32, Issue 3)*. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90054-1)
21. Vargas-Schaffer, G. (2010). Is the WHO analgesic ladder still valid? *Clinical Chemistry*, 56(10), 514–517.
22. Rothemeyer, S. J., Enslin, J. M. N. (2016). Surgical management of pain., 106(9), 858-860.
23. Andrew, R., Lisa A, M., Herman, J., & Russell K., P. (2008). Opioids and the Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, and Future Directions. *Physiology & Behavior*, 16(5), 405–416.
24. McQuay, H. (1999). Opioids in pain management. *Lancet*, 353, 2229–2232.
25. Serna, A. V. (1998). Dolor agudo, analgesia y sedación en el niño (IIIa): Farmacocinética y farmacodinamia de los analgésicos opioides. *Regional Anesthesia*, 48(2), 429–440.
26. Gawad, J., Prakash, S., Kumar, S., Singh, L., & Goyal, S. (2013). an Overview of Nsaids Used in Anti-Inflammatory and Analgesic an Overview of Nsaids Used in Anti-Inflammatory and Analgesic Activity and. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 8(1), 41–51.
27. Cámara, C., López, P., & Escudero, J. (2001). AINEs “clásicos” e inhibidores selectivos de la COX-2. *INSALUD*, 2(4), 1–8.
28. Miljković, M., Rančić, N., Simić, R., Stamenković, D., & Dragojević-Simić, V. (2018). Metamizole: Current status of the safety and efficacy. *Hospital Pharmacology - International Multidisciplinary Journal*, 5(3), 694–704.
29. Medicine, U. N. (02 de 11 de 2019). PubChem. Obtenido de CID522325 structure: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=CID522325%20structure&tab=similarity>
30. Jasiocka, A., Maślanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(1), 207–214.
31. Nikolova, I., Petkova, V., Tencheva, J., Benbasat, N., Voinikov, J., & Danchev, N. (2013). Metamizole: A review profile of a well-known “forgotten”

- drug. part ii: Clinical profile. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(2), 3605–3619.
32. Levy, M., Zylber-Katz, E., & Rosenkranz, B. (1995). Clinical Pharmacokinetics of Dipyron and its Metabolites. *Clinical Pharmacokinetics*, 28(3), 216–234.
 33. Goci, E., Shkreli, R., Haloci, E., & Ledjan Malaj. (2013). Complementary and alternative medicine (cam) for pain, herbal anti-inflammatory drugs. *European Scientific Journal*, 9(9), 90–105.
 34. Uritu, C. M., Mihai, C. T., Stanciu, G. D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M. M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic, S., & Tamba, B. I. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Research and Management*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7801543>
 35. Kumar, S., & Pandey, K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 58(4), 1–16.
 36. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
 37. Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8), 655–669.
 38. Galati E.M., Monforte M.T., Kirjavainen S., Foretieri A.M., Tripodo M.M. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note I): anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmaco*. 49(709-712).
 39. Benavente-García, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185–6205.
 40. Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Kadoma, Y., & Fujisawa, S. (2005). Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Research*, 25(5), 3367–3374.
 41. Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Tanaka, T., & Ogawa, H. (1997). Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*, 18(5), 957–965.
 42. Sahu, N., Soni, D., Chandrashekhar, B., Satpute, D. B., Saravanadevi, S., Sarangi, B. K., & Pandey, R. A. (2016). Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. *International Nano Letters*, 6(3), 173–181.

43. Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(1), 178–192.
44. Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., Chávez, M., Pellicer, F., Moreno, J., & López-Muñoz, F. J. (2011). Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(4), 683–689.
45. Loscalzo, L. M., Yow, T. T., Wasowski, C., Chebib, M., & Marder, M. (2011). Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglicone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(3), 333–341.
46. Tres, J. C. (2006). Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 29(2), 233–252.
47. Chéry, M., Fraga, J., Romero, G., Monroy A., Bernal, M., & Gonzales, J., *Manual de farmacología básica y clínica*. 5th. Ed. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V; (2010)
48. Velazquez-Rangel, J. E., Alonso-Castro, Á. J., Morales-Zapata, J. R., & Castellanos-Orozco, L. M. (2017). Evaluación de la interacción antinociceptiva entre Rutina y Naproxeno utilizando análisis isoblográfico. *Jóvenes En La Ciencia*, 3(1), 334–338.
49. De Paz-Campos, M. A., Ortiz, M. I., Chávez Piña, A. E., Zazueta-Beltrán, L., & Castañeda-Hernández, G. (2014). Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine*, 21(12), 1543–1548.
50. Bustamante Marquina A. (2018) Tesis de Maestría: “Análisis de Superficie de interacción sinérgica del efecto antinociceptivo de la combinación de diclofenaco con quercetina”. Maestría en Ciencias en Farmacología de la Escuela Superior de Medicina del IPN
51. Lee, S. (2010). Drug interaction: focusing on response surface models. *Korean Society of Anesthesiologists*, 58(5), 421–434.
52. Tallarida, R. J. (2000). *Drug synergism and dose-effect data analysis* (1st ed.). Chapman and Hall/CRC.
53. Gessner, P. K. (1995). Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology*, 105(2–3), 161–179.
54. Luszczki, J. J., & Czuczwar, S. J. (2003). Isobolographic and subthreshold methods in the detection of interactions between oxcarbazepine and conventional antiepileptics - A comparative study. *Epilepsy Research*, 56(1), 27–42.
55. Miranda, H. F., & Pinardi, G. (2004). Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions of clonidine with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacological Research*, 50(3), 273–278.

56. Huang, R. Y., Pei, L., Liu, Q., Chen, S., Dou, H., Shu, G., Yuan, Z. X., Lin, J., Peng, G., Zhang, W., & Fu, H. (2019). Isobologram analysis: A comprehensive review of methodology and current research. *Frontiers in Pharmacology*, 10(OCT), 1–12.
57. Bijnsdorp, I. V., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2011). Analysis of drug interactions. *Methods in Molecular Biology*, 731(2), 421–434.
58. Siegmund, E., Cadmus, R. & Lu, G. (1957). A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 95 (4), 729-731.
59. Navarrete C., Alfaro A., Balderas J. Volumen 1 Farmacometria: Curvas dosis-respuesta de tipo gradual. UNAM Departamento de farmacia. Ciudad de México. México; 2003.
60. Abdo-Francis, J. M., Martínez-Juárez, A., Pineda-Corona, B., & Bernal-Sahagún, F. (2003). Un nuevo esquema terapéutico en el manejo del dolor abdominal de tipo cólico. *Revista Médica Del Hospital General*, 66(3), 142–146.
61. Akbar, A., Yiangou, Y., Facer, P., Walters, J. R. F., Anand, P., & Ghosh, S. (2008). Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut*, 57(7), 923–929. -
62. Pavao-De-Souza, G. F., Zarpelon, A. C., Tedeschi, G. C., Mizokami, S. S., Sanson, J. S., Cunha, T. M., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2012). Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI 3K and microglia in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(3), 320–328.
63. Ness, T. J. (1999). Models of visceral nociception. *ILAR Journal*, 40(3), 119–128.
64. Malmberg, A. B., Rafferty, M. F., & Yaksh, T. L. (1994). Antinociceptive effect of spinally delivered prostaglandin E receptor antagonists in the formalin test on the rat. *Neuroscience Letters*, 173(1–2), 193–196.
65. Martínez, R. V., Díaz, M. I., Patricia Hernández, G., Ramírez, A. M. D., Salazar, L. A., Cabré, F., & López-Muñoz, F. J. (2000). Role of COX-1- and COX-2-synthesized prostaglandins in a rat model of arthritic pain. *Drug Development Research*, 51(4), 253–259.
66. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13926–13931.

67. Crunfli, F., Vilela, F. C., & Giusti-Paiva, A. (2015). Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(3), 246–255.
68. Rogosch, T., Sinning, C., Podlewski, A., Watzler, B., Schlosburg, J., Lichtman, A. H., Cascio, M. G., Bisogno, T., Di Marzo, V., Nüsing, R., & Imming, P. (2012). Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(1), 101–107.
69. Rutkowska, M., Jamontt, J., & Gliniak, H. (2006). Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacological Reports*, 58(2), 200–206.
70. Kötter, T., Da Costa, B. R., Fässler, M., Blozik, E., Linde, K., Jüni, P., Reichenbach, S., & Scherer, M. (2015). Metamizole-associated adverse events: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(4), 1–18.
71. Curatolo, M., & Svetlicic, G. (2002). Drug combinations in pain treatment: A review of the published evidence and a method for finding the optimal combination. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 16(4), 507–519.
72. Bhadra, R., Ravakhah, K., & Ghosh, R. K. (2015). Herb-drug interaction: The importance of communicating with primary care physicians. *Australasian Medical Journal*, 8(10), 315–319.
73. Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus offi cinalis* Linn) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol*. 3, (124-130)
74. González-Trujano, M.E., Peña-Fajardo E., Ventura-Martínez, R., López-Muñoz, F.J., (2006). Detección y comparación del efecto antinociceptivo de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) en el modelo PIFIR. *Rev Mex Anest*. 29(2), 80-85.
75. Godeberge, P., (1994). Daflon 500 mg in the treatment of hemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo, 45(6 Pt 2), 574-578.
76. Fernández, S. P., Wasowski, C., Loscalzo, L. M., Granger, R. E., Johnston, G. A. R., Paladini, A. C., & Marder, M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*, 539(3), 168–176.
77. Guzmán-Gutiérrez, L.S., Luis Balderas, J., Aguilar, A., & Navarrete, A. (2009). Sedative Activity of Some Plants Used in Mexico To Treat Insomnia. 37(3), 243-251.
78. Gargiulo, S., National, I., Greco, A., Affuso, A., Zoologica, S., Dohrn, A., & Brunetti, A. (2012). Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. *ILAR Journal*, 53(1), E55–E69.

79. Vabeiryureilai, M., Lalrinzuali, K., & Jagetia, G. C. (2015). Determination of Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of a Citrus Bioflavanoid, Hesperidin in Mice. *Immunochemistry and Immunopathology*, 1(2), 1–7.
80. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *MDP1*, 20(7), 1126–1167.
81. Wang, J., Cochran, V., Abdi, S., Chung, J. M., Chung, K., & Kim, H. K. (2008). Phenyl N-t-butyl nitron, a reactive oxygen species scavenger, reduces zymosan-induced visceral pain in rats. *Neuroscience Letters*, 439(2), 216–219.
82. Ji, G., Li, Z., & Neugebauer, V. (2015). Reactive oxygen species mediate visceral pain-related amygdala plasticity and behaviors. *Pain*, 156(5), 825–836.
83. Ferraz, C. R., Carvalho, T. T., Manchope, F., Artero, N. A., Rasquel-oliveira, F. S., Fattori, V., Casagrande, R., & Jr, W. A. V. (2020). Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. *Molecules*, 25(762), 1–35.
84. Martínez-Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., & López-Muñoz, F. J. (2013). Análisis de la interacción antinociceptiva entre hesperidina y ketorolaco por medio de la exploración de superficie de interacción sinérgica. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 36(4), 249–256.
85. Déciga-Campos, M., Ramírez-Marín, P.M. & López-Muñoz, F.J. (2015). Synergistic antinociceptive interaction between palmitoylethanolamide and tramadol in the mouse formalin test. *European Journal of Pharmacology*, 765, 68–74.
86. Brantley, S. J., Argikar, A. A., Lin, Y. S., Nagar, S., & Paine, M. F. (2014). Herb-drug interactions: Challenges and opportunities for improved predictions. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(3), 301–317.
87. García, N. A., Bregliani, M., & Pajares, A. (2017). Interaction of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) with Reactive Oxygen Species (ROS): Possible Biomedical Implications. *Pain Relief - From Analgesics to Alternative Therapies*.
88. Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Sharopov, F., Martorell, M., Ademiluyi, A. O., Rajkovic, J., Salehi, B., Martins, N., Iriti, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Antiulcer agents: From plant extracts to phytochemicals in healing promotion. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071751>
89. De Lira Mota, K. S., Dias, G. E. N., Pinto, M. E. F., Luiz-Ferreira, Â., Souza-Brito, A. R. M., Hiruma-Lima, C. A., Barbosa-Filho, J. M., & Batista, L. M.

- (2009). Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules*, 14(3), 979–1012.
90. Bost, J., Maroon, A., & Maroon, J. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical Neurology International*, 1(1), 80.
91. Verri, W. A., Vicentini, F. T. M. C., Baracat, M. M., Georgetti, S. R., Cardoso, R. D. R., Cunha, T. M., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., Fonseca, M. J. V., & Casagrande, R. (2012). Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. In *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 36). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>