

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Identificación del posible mecanismo de acción en la
interacción del efecto antinociceptivo de la combinación
DHA-Naproxeno”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

ARROYO LIRA ARLETTE GUADALUPE

DIRECTORA DE TESIS:

D. EN C. ARACELY EVANGELINA CHÁVEZ PIÑA.



Ciudad de México, Diciembre de 2017.

COMITÉ TUTORIAL

D. EN C. MARÍA ESTHER RAMÍREZ MORENO.

D. EN C. MARIO ISIDORO ORTIZ RAMÍREZ.

D. EN C. FERNANDO RODRÍGUEZ RAMOS.

D. EN C. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 11 del mes de Diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

"Identificación del posible mecanismo de acción en la interacción del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno"

Presentada por el alumno:

Arroyo	Lira	Arlette Guadalupe							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">4</td> <td style="padding: 2px;">0</td> <td style="padding: 2px;">2</td> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">8</td> </tr> </table>	A	1	4	0	2	1	8
A	1	4	0	2	1	8			

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

D. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña

D. en C. María Esther Ramírez Moreno

D. en C. Juan Santiago Salas Benito

D. en C. Fernando Rodríguez Ramos

D. en C. Mario Isidoro Ortiz Ramírez

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
HOMEOPATIA
D. en C. Mónica Ascención de Noya Ocampo
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 23 de Enero del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH en su sesión ordinaria No. 01 celebrada el día 28 del mes de Enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

ARROYO

LIRA

ARLETTE GUADALUPE

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

A	1	4	0	2	1	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Identificación del posible mecanismo de acción en la interacción del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-Naproxeno"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Evaluar el efecto antinociceptivo de DHA, naproxeno y su combinación administrados por vía oral y local.

Determinar la seguridad gástrica de la administración sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno.

Estudiar el perfil farmacocinético de la administración oral de naproxeno y la combinación DHA-naproxeno y su posible participación en la interacción del efecto antinociceptivo de la combinación.

2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:
Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
El Laboratorio de Farmacología de la ENMyH

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director(a) de Tesis

Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña



Presidente del Colegio

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Dra. Mónica Ascención De Nova DE MEDICINA
Ocampo HOMEOPATÍA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

Aspirante

M.en C. Arlette Guadalupe Arroyo Lira

PROHIBICIÓN DE USO DE OBRA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

PRESENTE.

Bajo protesta de decir la verdad la que suscribe **C. Arlette Guadalupe Arroyo Lira**, manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada ***"Identificación del posible mecanismo de acción en la interacción del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-Naproxeno"***, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia para efecto de requisito académico para la obtención de grado de Doctor en Ciencias en Biotecnología.

Por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 de la ley federal del Derecho de Autor, se prohíbe el uso y/o explotación de "La Tesis" en las formas y medios descritos en el fundamento legal citado, en virtud de que cualquier utilización por una persona física o moral distinta del autor puede afectar o violar derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad, o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros distintos al autor de "La Tesis". Ya que se ha realizado el trámite de patente con algunos de los resultados obtenidos en la misma. Además, se han publicado otros de los resultados obtenidos en una revista científica de carácter internacional JCR indexada.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis" y limitarse a su uso en la forma arriba señalada.

Ciudad de México a 11 de Diciembre de 2017.

ATENTAMENTE



M. en C. Arlette Guadalupe Arroyo Lira

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

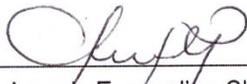
“Declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados son producto de mi trabajo y en mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona. Tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma de otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento a las personas que contribuyeron con su trabajo, principalmente a mi directora de tesis por su apoyo para realizar la concepción del proyecto, el estilo y la expresión escrita.”

ATENTAMENTE



M. en C. Arlette Guadalupe Arroyo Lira

Vo.Bo.



D. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña

Ciudad de México a 11 de Diciembre de 2017.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña.

Durante la realización de este proyecto, el alumno contó con la beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 269377 y también con la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional. Esta tesis se realizó gracias al donativo de los proyectos SIP con clave 20141036, 20150031, 20160493, 20171176, 20171838 así como el proyecto CONACYT con clave 178027.

CONSTANCIA

El que suscribe hace constar que el Proyecto de tesis titulado:

**"IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA
INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN
DHA NAPROXENO"**

Propuesto ante el Comité de Bioética, por la alumna:

ARLETTE GUADALUPE ARROYO LIRA

El presente proyecto recibe una opinión favorable por parte del Comité de Bioética, por considerarlo seguro en el sentido de que las instalaciones de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación cuenta con las condiciones de Bioseguridad para el desarrollo del mismo, además no implica ningún daño a los participantes, terceras personas, ni al medio ambiente en general.

Se emite este Acuerdo dentro del marco de la reunión del Comité de Bioética celebrada el día viernes 12 de junio del 2015. (No. de registro: ENMH-CB-136-2015).

Se extiende la presente, para los fines legales que al(a) interesado(a) convengan, a los dieciséis días del mes de junio del año Dos Mil Quince.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

DRA. VICTORINA ELIZABETH JIMENEZ SÁNCHEZ
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOÉTICA

COMITÉ DE BIOÉTICA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA ACREDITADO POR COMAEM 2014/2019
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMAEM 2011/2016
Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 México, D.F.
Tels. 57-29-60-00 ext. 55512
E-mail: enmh@ipn.mx

(alm)

Agradecimientos

A la **D. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña**, mi directora de tesis, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y paciencia. Gracias por el excelente ambiente de trabajo, la confianza depositada en mí y por brindarme las herramientas necesarias para culminar con éxito nuestro trabajo. Por ser un ejemplo a seguir a nivel profesional y personal. Por permitirme aprender que con dedicación, tenacidad, paciencia y carácter firme se pueden lograr las metas y objetivos trazados. Infinitamente gracias Doctora.

A mis asesores de tesis, la **D. en C. María Esther Ramírez Moreno**, el **D. en C. Juan Santiago Salas Benito**, el **D. en C. Fernando Rodríguez Ramos** y el **D. en C. Mario Isidoro Ortiz Ramírez**. Por la paciencia y tiempo dedicado a la revisión de este proyecto. Por los valiosos y oportunos consejos que permitieron enriquecer y culminar con éxito este proyecto.

A la **QFB. Martha Patricia González García** personal técnico del **Laboratorio 34** de la sección externa de Farmacología del CINVESTAV. Por su valiosa asistencia técnica, su amabilidad, calidez y disposición durante el desarrollo del trabajo experimental. Gracias también por brindarme tu amistad, palabras de aliento y consejos a nivel profesional y personal.

A mis compañeros de laboratorio **Nadia Díaz Triste**, **Elizabeth Pineda Peña**, **Arizai Landa Juárez**, **Christopher Miranda Lara**, **Nora Núñez**, **Víctor Arellano**, **Cristina Reyes Nolasco** y **Reyes Abril Urias**. Por el excelente ambiente de trabajo, el respeto y las enseñanzas que cada uno me deja. Gracias por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Hematobiología de la sección de estudios de posgrado e investigación de la ENMyH. **Ivette Martínez Vieyra**, **Leah Alonso Rangel**, **Clarissa Leñero Ochoa**, **Antonio Escarcega Tame**, **Tizziani Benitez**, **Giselle Pacheco**, **Erika Reus** y **Diana García**. Por brindarme su amistad, compañía y apoyo.

“Una familia feliz no es sino un paraíso anticipado”

Sir John Bowring

A mi mami y mi papi, Vero y Leo, que siempre me han apoyado y creído en mí. Gracias por todo el amor, por recordarme que la noche no es eterna y por enseñarme que no hay que temerle a la oscuridad, pues hierde más el miedo que una espada.

A mis hermanos, Leo y Alan, quienes han sido mis mejores amigos, compañeros y ejemplo de vida. Gracias por acompañarme en este viaje, por motivarme a ser mejor y diferente.

Índice

	Página
Índice de figuras	xvi
Índice de cuadros	xix
Índice de tablas	xx
Índice de abreviaturas	xxi
Resumen	xxv
Abstract	xxvi
1. Introducción	1
1.1. Dolor	1
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Función	1
1.1.3. Clasificación	2
1.1.3.1. <i>Dolor adaptativo</i>	2
1.1.3.1.1. <i>Dolor nociceptivo</i>	3
1.1.3.1.2. <i>Dolor inflamatorio</i>	3
1.1.3.2. <i>Dolor maladaptativo</i>	4
1.1.3.2.1. <i>Dolor neuropático</i>	4
1.1.3.2.2. <i>Dolor disfuncional</i>	5
1.1.4. Fisiología del dolor	6
1.1.4.1. <i>Nociceptores. Neuronas de primer orden</i>	7
1.1.4.2. <i>Nocicepción</i>	9

1.2.	Terapéutica del dolor	12
1.2.1.	Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	13
1.2.1.1.	<i>Mecanismo de acción</i>	13
1.2.1.2.	<i>Clasificación</i>	16
1.2.1.3.	<i>Naproxeno</i>	16
1.3.	Ácido docosahexaenoico (DHA)	18
1.4.	Interacciones farmacológicas	21
1.4.1.	<i>Interacciones farmacodinámicas</i>	21
1.4.1.1.	<i>Combinaciones de agentes con un mismo efecto terapéutico (analgésico o antinociceptivo)</i>	21
1.4.1.2.	<i>Análisis isobolográfico</i>	22
1.4.2.	<i>Interacciones farmacocinéticas</i>	25
1.4.3.	<i>Interacciones farmacéuticas (incompatibilidades)</i>	26
2.	Antecedentes	27
3.	Justificación	29
4.	Hipótesis	30
5.	Objetivos	31
5.1.	Objetivo general	31
5.2.	Objetivos específicos	31
6.	Estrategia experimental	32
7.	Materiales y métodos	33
7.1.	Animales de experimentación	33
7.2.	Fármacos	33

7.3. Reactivos	33
7.4. Modelo experimental de la prueba de la formalina para la evaluación del efecto antinociceptivo	33
7.5. Modelo experimental para la evaluación del daño gástrico	34
7.6. Diseño experimental	35
7.6.1. Administración oral de los fármacos y evaluación del efecto antinociceptivo y seguridad gástrica de manera individual y de las combinaciones	35
7.6.1.1. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo y evaluación del daño gástrico del naproxeno, DHA y la combinación	35
7.6.1.2. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo del naproxeno en presencia de una dosis única de DHA	36
7.6.1.2.1. Ensayo de inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) mediante un kit de ELISA	37
7.6.2. Administración local de los fármacos y evaluación del efecto antinociceptivo y seguridad gástrica de manera individual y de las combinaciones	37

7.6.2.1. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo y daño gástrico del naproxeno, DHA y la combinación	37
7.6.3. Evaluación de la farmacocinética del naproxeno y la combinación	39
7.6.3.1. Método analítico para la cuantificación de naproxeno	39
7.6.3.1.1. <i>Equipo y condiciones cromatográficas</i>	39
7.6.3.1.2. <i>Validación del método cromatográfico.</i>	39
7.6.3.1.2.1. <i>Selectividad</i>	39
7.6.3.1.2.2. <i>Linealidad</i>	40
7.6.3.1.2.3. <i>Precisión</i>	41
7.6.3.1.2.3.1. <i>Precisión intradía (Repetibilidad).</i>	41
7.6.3.1.2.3.2. <i>Precisión interdía (Reproducibilidad).</i>	41
7.6.3.1.2.4. <i>Exactitud</i>	42
7.6.3.2. Análisis farmacocinético	42
7.6.3.2.1. <i>Toma de muestra</i>	42
7.7. Análisis de datos	43

7.7.1. Curvas dosis-respuesta y cálculo de la dosis efectiva 30 (DE₃₀)	43
7.7.2. Análisis isobolográfico	43
7.7.3. Perfil y parámetros farmacocinético	46
7.7.4. Análisis estadístico	46
8. Resultados	47
8.1. Efecto antinociceptivo del naproxeno y DHA	47
8.2. Efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno	50
8.3. Evaluación del daño gástrico inducido por la administración oral y local de diferentes dosis de naproxeno	62
8.4. Evaluación de la seguridad gástrica de la administración oral y local del DHA	62
8.5. Evaluación de la seguridad gástrica de la administración oral y local de la combinación DHA-naproxeno	62
8.6. Validación del método cromatográfico	68
8.6.1. Selectividad	69

8.6.2. Linealidad	70
8.6.3. Exactitud y precisión	72
8.7. Perfiles farmacocinéticos	72
8.8. Inhibición de la actividad de la COX-2	74
9. Discusión	76
9.1. Antinocicepción de naproxeno, DHA y la combinación DHA-naproxeno	76
9.1.1. Efecto antinociceptivo de naproxeno	76
9.1.2. Efecto antinociceptivo del DHA	77
9.1.3. Aditividad, super-aditividad y sub-aditividad en la combinación sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno	79
9.1.4. Daño gástrico inducido por naproxeno, DHA y la combinación DHA-naproxeno	86
10. Conclusiones	89
11. Perspectivas	91
12. Referencias	92
13. Anexos	107
13.1. Anexo I. Productos de investigación	107

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Dolor nociceptivo.	3
Figura 2. Dolor inflamatorio.	4
Figura 3. Dolor neuropático.	5
Figura 4. Dolor disfuncional.	5
Figura 5. Fisiología del dolor.	6
Figura 6. Tipos de nociceptores.	8
Figura 7. Transducción, conducción, transmisión y percepción.	11
Figura 8. Escalera analgésica de la O.M.S.	12
Figura 9. Síntesis de prostaglandinas e inhibición de COX por AINEs.	14
Figura 10. Unión de AINEs a COX-1 y COX-2.	15
Figura 11. Estructura química del naproxeno. Ácido d-2-(6-metoxinaftil) propiónico.	17
Figura 12. Estructura química del DHA, ácido docosahexaenoico, 22:6 ω 3 (22:6n-3)	18
Figura 13. Isoblograma.	24
Figura 14. Estrategia experimental.	32
Figura 15. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo en la administración oral del naproxeno y del DHA en la segunda fase de la prueba de la formalina.	48

Figura 16. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración local de naproxeno y DHA en la segunda fase de la prueba de la formalina.	49
Figura 17. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración oral de la combinación DHA- naproxeno en la segunda fase de la prueba de la formalina.	53
Figura 18. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración local de la combinación DHA-naproxeno en la segunda fase de prueba de la formalina.	55
Figura 19. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración oral de la combinación de diferentes dosis de naproxeno y una única dosis de DHA en la segunda fase de prueba de la formalina.	57
Figura 20. Isoblograma de la interacción de la administración oral de la combinación DHA-naproxeno en el efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina.	60
Figura 21. Isoblogramas de la interacción de la administración local de la combinación DHA-naproxeno en el efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina	61
Figura 22. Imágenes representativas del daño gástrico inducido por naproxeno.	63
Figura 23. Cuantificación del daño gástrico inducido por la administración de diferentes dosis de naproxeno.	64
Figura 24. Imágenes representativas de los grupos tratados con DHA.	65
Figura 25. Imágenes representativas de los grupos tratados con la combinación DHA-naproxeno.	66
Figura 26. Cromatogramas representativos de muestras inyectadas después del procesamiento de extracción	69
Figura 27. Curva de calibración del método cromatográfico para la determinación de naproxeno en plasma de rata	71

Figura 28. Perfiles farmacocinéticos	73
Figura 29. Curvas concentración efecto. Inhibición de COX-2.	75

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Dosis empleadas para la evaluación de la interacción en el efecto antinociceptivo de la administración oral del DHA y el naproxeno.	36
Cuadro 2. Dosis empleadas para la evaluación de la interacción en el efecto antinociceptivo de la administración local del DHA y el naproxeno.	38
Cuadro 3. DE_{30} Teórica, DE_{30} Experimental e índice de interacción (γ) de la administración oral de la combinación DHA-naproxeno proporción 1:1, 1:3 y 3:1.	58
Cuadro 4. DE_{30} Teórica, DE_{30} Experimental e índice de interacción (γ) de la administración local de la combinación DHA-naproxeno proporción 1:1, 1:3 y 3:1.	59

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de los AINEs según su mecanismo de acción	16
Tabla 2. DE ₃₀ del naproxeno y DHA.	51
Tabla 3. Lesiones gástricas (mm ²) en la rata	67
Tabla 4. Linealidad del método cromatográfico.	71
Tabla 5. Exactitud y precisión.	72
Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de la administración oral de naproxeno y la combinación DHA-naproxeno.	74

Índice de abreviaturas

°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
AA	Ácido araquidónico
Ab	Péptido beta amiloide (Amyloid peptide)
ABC	Área bajo la curva
ACC	Corteza cingulada anterior (anterior cingulate cortex)
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción.
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
Amyg	Amígdala (Amygdala)
Arg120	Arginina 120
ASIC	Canales iónicos sensibles al ácido (Acid-sensig ion channels)
ATP	Adenosín trifosfato
BG	Ganglio basal (Basal ganglia)
CGPR	Proteína relacionada con el gen de la calcitonina (calcitonin gene-related peptide)
CI₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
CL	Contralateral
cm	Centímetros
C_{max}	Concentración plasmática máxima
CO₂	Bióxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenasa isoforma 1
COX-2	Ciclooxigenasa isoforma 2
CV	Coeficiente de variación
CYP1A2	Citocromo P450 1A2
CYP2C9	Citocromo P450 2C9

CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DE₃₀	Dosis efectiva treinta
DE₅₀	Dosis efectiva cincuenta
DE₇₀	Dosis efectiva setenta
DHA	Ácido docosahexaenoico (Docosahexaenoic acid)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor)
EI	Estándar interno
EPA	Ácido eicosapentaenoico (Eicosapentaenoic acid)
FA	Ácidos grasos (Fatty acids)
g	Gramos
Glu524	Ácido glutámico 524
h	Horas
HLEE	Extracto etanólico de <i>Heliopsis longipes</i> (<i>Heliopsis longipes</i> ethanolic extract)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
HT	Hipotálamo (Hypothalamus)
i.pl.	Administración intraplantar
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor (International Association for the Study of Pain)
IL-6	Interleucina 6
LNA	Ácido linolénico (Linolenic acid)
logZ*	Logaritmo de la dosis
m/s	Metros por segundo
M1	Corteza motora primaria
MCA	Muestra control alta
MCB	Muestra control baja
MCM	Muestra control media
mg	Miligramos
min	Minutos

mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm²	Milímetros cuadrados
n-3	Omega-3
nm	nanómetros
NPD1	Neuroprotectina D1
NRM	Núcleo rafe magno (nucleus raphe magnus)
OMS	Organización mundial de la salud
p.o.	Vía oral
PAG	Sustancia gris periacueductal (periaqueductal gray)
PB	Núcleo parabraquial (Parabrachial nuclei)
PC	Fosfatidilcolina (Phosphatidylcholine)
PCC	Corteza posterior cingulada (posterior cingulate)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor)
PE	Fosfatidiletanolamina (Phosphatidylethanolamine)
PFC	Corteza prefrontal
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF₂	Prostaglandina F ₂
PGH₂	Precursor prostanoide H ₂
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PLA₂	Fosfolipasa A ₂ (Phospholipase A ₂)
PPC	Corteza posterior parietal (posterior parietal cortex)
PS	Fosfatidilserina (Phosphatidylserine)
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (Polyunsaturated fatty acids)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
r²	Coefficiente de determinación
RvD1	Resolvinas de la serie D
RVM	Médula rostral ventromedial (rostral ventral medulla)

S1 y S2	Corteza somatosensorial primaria y secundaria respectivamente
SE	Error estándar (Standard error)
SEM	Error estándar de la media (Standard error of the mean)
SMA	Corteza motora suplementaria (supplemental motor área)
SNC	Sistema nervioso central
t_{1/2}	Vida media de eliminación
TG	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)
TRPA	Receptores de potencial transitorio tipo A (Transient receptor potential channels family A)
TRPM	Receptores de potencial transitorio tipo M (Transient receptor potential channels family M)
TRPV	Receptores de potencial transitorio tipo V (Transient receptor potential channels family V)
TXA₂	Tromboxano A ₂
Tyr355	Tirosina 355
Tyr385	Tirosina 385
v/v	Concentración volumen/volumen
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (Very low-density lipoprotein)
Zad	Dosis efectiva 30 teórica
Zexp	Dosis efectiva 30 experimental
γ	Índice de interacción

Resumen

El uso de combinaciones en el manejo del dolor es una práctica ampliamente usada en la clínica. Los principales objetivos del uso de combinaciones es disminuir los efectos no deseados aumentando o por lo menos manteniendo el efecto terapéutico cuando se combinan dos fármacos con el mismo efecto analgésico, de tal forma que se usen dosis menores, esto debido a que cuando dos fármacos con un mismo efecto terapéutico son coadministrados pueden producir interacciones farmacocinéticas o farmacodinámicas, que finalmente se reflejaran en el efecto terapéutico.

Es bien sabido que las combinaciones de analgésicos de eficacia probada con productos naturales pueden producir un efecto analgésico sumativo o potenciador con menores dosis de los fármacos aplicados de forma individual.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los opioides son los fármacos recomendados en el tratamiento del dolor, sin embargo, los efectos adversos que estos inducen limitan su uso de forma prolongada en enfermedades crónico-degenerativas que producen dolor.

El presente trabajo genera conocimiento acerca de las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas en el efecto antinociceptivo de la administración sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno. Del presente trabajo se proponen los posibles mecanismos implicados en dichas interacciones, así como la seguridad gástrica de la combinación.

Los resultados obtenidos muestran que en la combinación DHA y naproxeno se genera super-aditividad (1:3, administración sistémica y local), aditividad (1:1, administración local) y la sub-aditividad (3:1, administración sistémica y local; 1:1 administración sistémica). Además, la administración del DHA modifica el perfil farmacocinético del naproxeno, siendo evidente un incremento en el ABC_{0-t} del naproxeno cuando este se coadministra con DHA (1:3, DHA-naproxeno); correlacionando este incremento con el efecto antinociceptivo super-aditivo.

En cuanto a los efectos adversos se demostró que la combinación DHA-naproxeno posee seguridad gástrica.

Abstract

Drug combination is a widespread pharmacological practice in the management of pain. The main therapeutic goals of combinations of analgesic agents are improving efficacy without increasing adverse effects or decreasing adverse effects without losing of efficacy administered lower doses of each agent and, at the same time consider that pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions could occur and like a consequence of these the final therapeutic effect could be modified.

It is well known that combining analgesics of proven efficacy (i. e. NSAIDs) and natural products (i. e. DHA) interaction (additive or super-additive) could occur and the improvement of the therapeutic effect could be observed.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids analgesics are commonly used for pain relieve. However, the prescribing of these is accompanied of significant adverse effects limiting their use specially in chronic-degenerative diseases.

This work establishes the knowledge about the pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions in the antinociceptive effect between DHA and naproxen, as well as a proposal of the mechanisms of action implicated and the gastric safety resulting of the systemic and local administration of this combination compared with the sole administration of naproxen.

Our results show that pharmacodynamic interaction of DHA-naproxen combination was super-additive (1:3, systemic and local administration), additive (1:1, local administration) and sub-additive (1:1, systemic administration; 3:1, systemic and local administration). Furthermore, supra-additive interaction may be due to pharmacokinetic interactions. In the present study, the oral administration of DHA increased the naproxen AUC_{0-t} suggesting that a modification in the bioavailability of naproxen correlates with supra-additive antinociceptive effect of the oral DHA-naproxen (1:3) combination.

Finally, our data indicated that DHA-naproxen combination induce gastric safety.

1. Introducción

1.1. Dolor

El sistema somatosensorial de los mamíferos detecta un amplio rango de estímulos provenientes tanto del medio ambiente como del medio interno del organismo. Además, discrimina aquellos estímulos que son nocivos de los inocuos. Dicha discriminación sirve como una importante función de protección (Tsunozaiki and Bautista, 2009), ya que la habilidad para detectar estímulos nocivos es esencial para la supervivencia y mantenimiento del bienestar de un organismo. El dolor es uno de los componentes de un amplio grupo de controles responsables de la homeostasis del organismo. En este contexto, el dolor constituye una alarma, cuyo rol es ayudar a proteger el organismo, pues permite desarrollar reacciones e induce comportamientos para evitar cualquier estímulo que cause dolor o daño (Le Bars et al., 2001; Basbaum et al., 2009; Fein, 2012).

1.1.1. Definición

El dolor es una experiencia consciente, una interpretación de los estímulos nociceptivos influenciada por memorias, emociones, factores patológicos, genéticos y cognitivos (Tracey and Mantyh, 2007). En 1986, la asociación internacional para el estudio del dolor (IASP; por sus siglas en inglés) definió al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial, o descrito en términos de tal daño (Steeds, 2016; Hudspith, 2016) .

1.1.2. Función

El dolor tiene tres funciones principales (Woolf et al., 2004; Woolf and Mannion, 1999):

- Es un mecanismo fisiológico esencial protector que actúa como un sistema de alarma que notifica al cuerpo la presencia de estímulos nocivos en el ambiente. La sensación de dolor debe de ser lo suficientemente intensa, tanto que demanda atención inmediata.

- Cuando existe un daño tisular el dolor es un promotor de reparación, mediante la creación de una región de hipersensibilidad localizada (conocido como dolor inflamatorio) alrededor del sitio dañado. La hipersensibilidad minimiza el movimiento o contacto de la región del daño hasta la curación de este.
- Por último, el dolor neuropático no tiene ninguna función benéfica, sino que resulta de trastornos en células neuronales y no neuronales que provocan cambios no adaptativos en las neuronas del sistema sensorial. Esto puede causar dolor espontáneo, persistente e hipersensibilidad severa.

1.1.3. Clasificación

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen diversos sistemas para clasificar al dolor de acuerdo con (Thienhaus and Cole, 2002):

- Su localización anatómica (por ejemplo, cabeza, cuello, espalda).
- Su etiología (maligna o no maligna).
- Su duración (crónico, agudo, intercurrente).
- El mecanismo fisiopatológico del dolor (nociceptivo, inflamatorio, neuropático, somático).

Sin embargo, esencialmente el dolor puede ser dividido en dos amplias categorías: dolor adaptativo y dolor maladaptativo (Costigan et al., 2009; Woolf, 2010; Woolf et al., 2004).

1.1.3.1. Dolor adaptativo

Este tipo de dolor contribuye a la sobrevivencia del organismo protegiéndolo de lesiones o, promoviendo el proceso de recuperación o “sanación” una vez que la lesión ha ocurrido (Woolf et al., 2004). A su vez el dolor adaptativo se subdivide en dolor nociceptivo y dolor inflamatorio.

1.1.3.1.1. Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo es un dolor fisiológico producido por un estímulo nocivo que activa neuronas primarias de primer orden de umbral alto. Este tipo de dolor refleja la capacidad que poseemos para detectar la presencia de estímulos potencialmente dañinos y representa esencialmente un mecanismo de alarma (von Hehn et al., 2012) (Fig. 1).

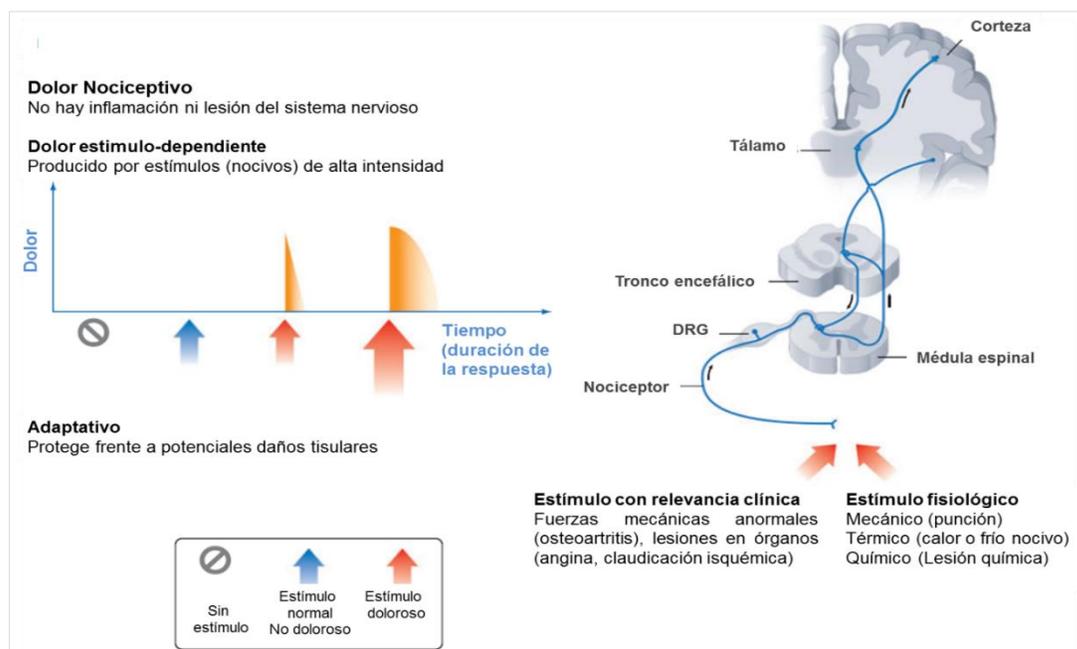


Figura 1. Dolor Nociceptivo. Modificado de Costigan et al., 2009.

1.1.3.1.2. Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio ocurre cuando la integridad de los tejidos se ve alterada por un estímulo nocivo (golpes, calor, infecciones, tumores, entre otros). Se estimula la recuperación del tejido dañado creando una zona de hipersensibilidad que limita el contacto y movimiento del tejido dañado, además de activar al sistema inmunológico, de ahí deriva su nombre, pues se desencadena el proceso inflamatorio, donde el dolor es una de las características cardinales. Generalmente este tipo de dolor se resuelve conforme se restaura la homeostasis del tejido dañado y por lo tanto el proceso inflamatorio termina (Chen et al., 2013; Woolf, 2010; Woolf et al., 2004) (Fig. 2).

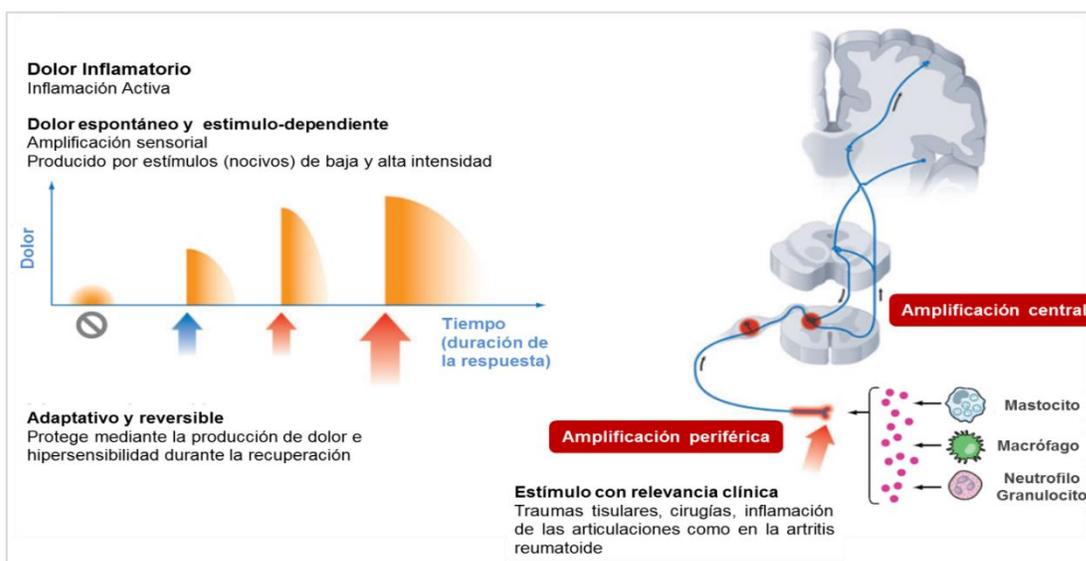


Figura 2. Dolor inflamatorio. Modificado de Costigan et al., 2009.

1.1.3.2. Dolor maladaptativo

En contraste con el dolor adaptativo, el dolor maladaptativo es una expresión patológica de la operación del sistema nervioso ya que no está acoplado a un estímulo nocivo, tampoco se deriva como una respuesta a un tejido dañado. Es un dolor patológico, el cual no es síntoma de ninguna enfermedad (Woolf et al., 2004). El dolor maladaptativo se subdivide en dolor neuropático y dolor disfuncional.

1.1.3.2.1. Dolor neuropático

El dolor neuropático ocurre en respuesta a daños o enfermedades que afectan al sistema somatosensorial, tanto el sistema nervioso periférico, como el sistema nervioso central (SNC). El procesamiento de las señales está alterado, así un estímulo inocuo puede procesarse como un estímulo doloroso y la respuesta a estímulos nocivos es potenciada (Costigan et al., 2009; Fein, 2012) (Fig. 3).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

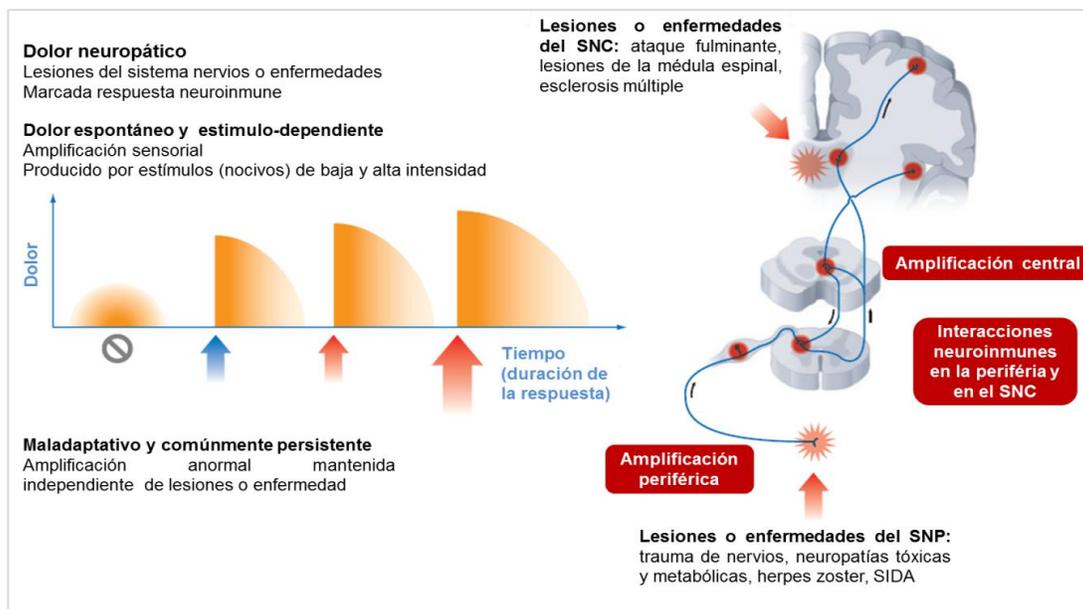


Figura 3. Dolor neuropático. Modificado de Costigan et al., 2009.

1.1.3.2.2. Dolor disfuncional

El dolor disfuncional se debe a sensibilidad o función anormal del sistema nervioso, de esta manera la sensibilidad del aparato sensorial se ve aumentada, con lo cual se amplifican los síntomas. En esta forma de dolor, déficits no neuronales o anomalías periféricas pueden ser detectadas (Fig. 4).

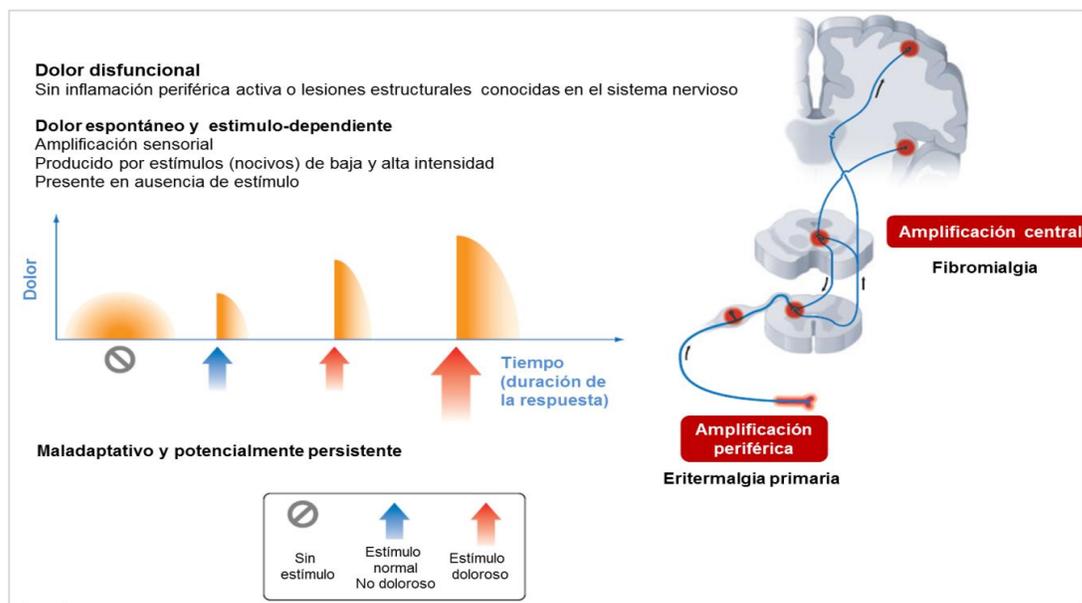


Figura 4. Dolor disfuncional. Modificado de Costigan et al., 2009.

1.1.4. Fisiología del dolor

El dolor representa una compleja modalidad sensorial acompañada de aspectos afectivos, motivacionales y cognitivos (Almeida et al., 2004). Fisiológicamente, es iniciado con la generación de potenciales de acción en fibras sensoriales aferentes especializadas que inervan los tejidos en la periferia (nociceptores). Estos potenciales de acción son conducidos hasta alcanzar la corteza cerebral en el SNC a través de una vía especializada (nocicepción) formada por una cadena de tres neuronas: a) *neuronas de primer orden*, que inician en la periferia (piel, huesos, ligamentos, músculos, vísceras) y viajan hasta alcanzar el asta dorsal de la médula espinal, el cuerpo de estas neuronas se encuentra localizado en el ganglio de la raíz dorsal; b) *neuronas de segundo orden*, estas inician en el asta dorsal y cruzan al lado contralateral, después ascienden en la médula espinal hacia el tálamo y otras áreas cerebrales; y c) *neuronas de tercer orden* (Fig. 5), estas inician en el tálamo y terminan en la corteza cerebral (Riedel and Neeck, 2001; Anwar, 2016).

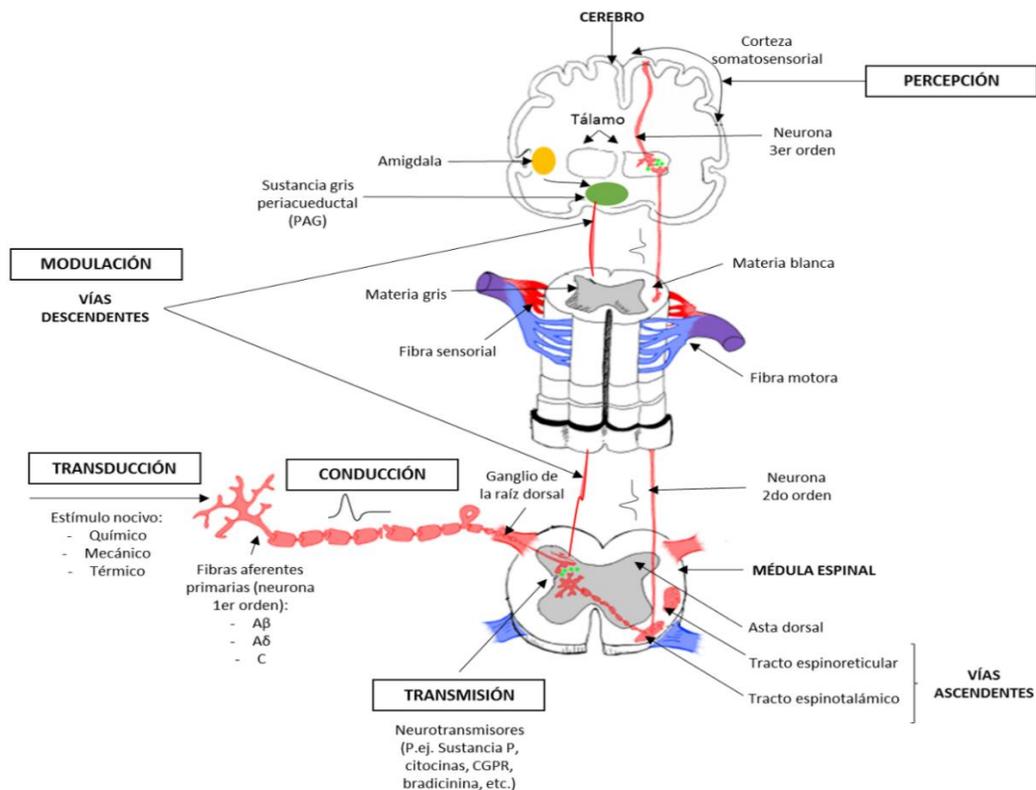


Figura 5. Fisiología del dolor.

1.1.4.1. Nociceptores. Neuronas de primer orden

Los nociceptores son terminales nerviosas libres de neuronas sensoriales primarias altamente especializadas que responden a estímulos intensos; estos se pueden clasificar en tres tipos (Fig. 6) (Fein, 2012; Bridgestock and Rae, 2013; Hudspith, 2016; Marchand, 2008; Julius and Basbaum, 2001):

- **Fibras A α y A β :** Son de diámetro grande ($> 10 \mu\text{m}$), están mielinizadas y su velocidad de conducción es rápida (30-100 m/s). Estas fibras responden a estímulos mecánicos y térmicos inocuos.
- **Fibras A δ :** Son de diámetro intermedio (2-6 μm), están ligeramente mielinizadas. Su velocidad de conducción es menor que las fibras A pero mayor que la de las fibras C (12-30 m/s). Estas fibras responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Hay dos tipos y se distinguen entre ellas de acuerdo con su umbral térmico.
- **Fibras C:** Son de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm), no están mielinizadas y su velocidad de conducción es de 0.5-2.0 m/s. Son polimodales, es decir, responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos.

La estimulación de las fibras A δ y C producen el dolor primario y secundario respectivamente, principalmente el dolor de tipo rápido y agudo. Cabe señalar que esta diferencia no aplica a todos los órganos, sino que es más evidente en la piel.

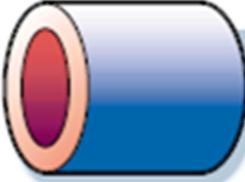
		Umbral térmico
	Fibras Aα y Aβ Mielinizadas Gran diámetro Propiocepción, toque ligero	Ninguno
	Fibras Aδ Ligeramente mielinizadas Diámetro intermedio Nocicepción (estimulos mecánico, químico y térmico)	~ 53 °C Tipo I ~ 43 °C Tipo II
	Fibras C No mielinizadas Diámetro pequeño Temperatura inocua, picazón Nocicepción (estímulos mecánico, químico y térmico)	~ 43 °C Tipo II

Figura 6. Tipos de nociceptores. Modificado de Julius and Basbaum, 2001.

1.1.4.2. Nocicepción

De acuerdo con la IASP, la nocicepción se define como “*el proceso neural de codificación y procesamiento de estímulos nocivos*”(Barrot, 2012) que comprende los procesos de transducción, conducción, transmisión, percepción y modulación (Fig. 5) (Bridgestock and Rae, 2013; Woolf et al., 2004)

En la periferia, las neuronas de primer orden dan paso al proceso de *transducción*: En este proceso, los estímulos nocivos de naturaleza mecánica, térmica y química provenientes del medio externo o interno son detectados por neuronas aferentes sensoriales llamadas nociceptores. La estimulación nociceptiva inicia una cascada de eventos donde moléculas inflamatorias pronociceptivas [bradicinina, prostaglandinas, histamina, serotonina, adenosín trifosfato (ATP), interleucinas, interferón, factor de necrosis tumoral (TNF; por sus siglas en inglés), proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP; por sus siglas en inglés), sustancia P, etc.] son liberadas en la periferia induciendo hiperalgesia periférica. El estímulo nocivo sufre una conversión hacia actividad eléctrica. Este proceso es mediado por receptores tipo canal iónico que solo se expresan en los nociceptores (TRPV, TRPA, TRPM, ASIC, etc.) (Yoneda et al., 2011; Julius and Basbaum, 2001; Woolf et al., 2004; Marchand, 2008; Marchand et al., 2005).

Cuando el estímulo es suficiente como para generar un potencial de activación, la actividad eléctrica generada en el proceso de transducción es *conducida* hacia la terminal central de los nociceptores en el SNC. El proceso de *conducción* requiere la generación de un potencial de acción, este se da por la apertura (por despolarización) de canales de sodio dependientes de voltaje y a su vez por el cierre (por hiperpolarización) de canales de potasio (Babos et al., 2013).

Una vez que el potencial de acción alcanza el extremo terminal de la neurona aferente primaria, canales de sodio dependientes de voltaje se abren, la entrada de calcio promueve la exocitosis de neurotransmisores (glutamato, sustancia P, CGRP) que *transmiten* la información a neuronas secundarias en la médula espinal. En este proceso la *transmisión* de la información nociceptiva es de tipo excitatoria y se proyecta hacia centros superiores en el SNC mediante dos vías principales: 1) *tracto espinotalámico*, que envía las proyecciones aferente al núcleo lateral del

tálamo y corteza somatosensorial, esta vía es la encargada de identificar la localización del dolor; 2) *tracto espinoreticular*, que envía las proyecciones aferentes a la región media del tálamo, y al núcleo del tronco encefálico, incluyendo el núcleo rafe magno (NRM; por sus siglas en inglés) y sustancia gris periacueductal (PAG; por sus siglas en inglés) dos de los núcleos involucrados en la *modulación* del dolor (vías descendentes), la vía espinoreticular juega un rol muy importante en los componentes afectivos y de memoria del dolor (Babos et al., 2013; Marchand, 2008; Chen et al., 2013).

Es decir, la *percepción* del dolor es un proceso complejo que implica la codificación del mensaje nociceptivo desde la periferia hasta el SNC, en cuanto a iniciación, duración, intensidad y localización. En gran medida, la *percepción* del dolor está influenciada por el proceso conocido como modulación (Woolf et al., 2004).

La *modulación* consiste básicamente en controlar la intensidad con que un estímulo nocivo será percibido (vías excitatorias e inhibitorias) (Ossipov, 2012). Este proceso comienza en la periferia e involucra numerosas estructuras del SNC [corteza cingulada anterior (ACC; por sus siglas en inglés), PAG, NRM, corteza prefrontal (PFC; por sus siglas en inglés), ínsula, amígdala, médula rostral ventromedial (RVM; por sus siglas en inglés)] (Schweinhartd and Bushnell, 2010). La *modulación* implica la liberación de serotonina, norepinefrina y dopamina predominantemente en la médula espinal (lamina I y II) y NRM; la liberación de opioides y canabinoides endógenos ejerce su efecto modulador a nivel de cerebro principalmente, aunque también se sabe que pueden actuar en las vías descendentes del dolor (Fig. 7) (Bourne et al., 2014)

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

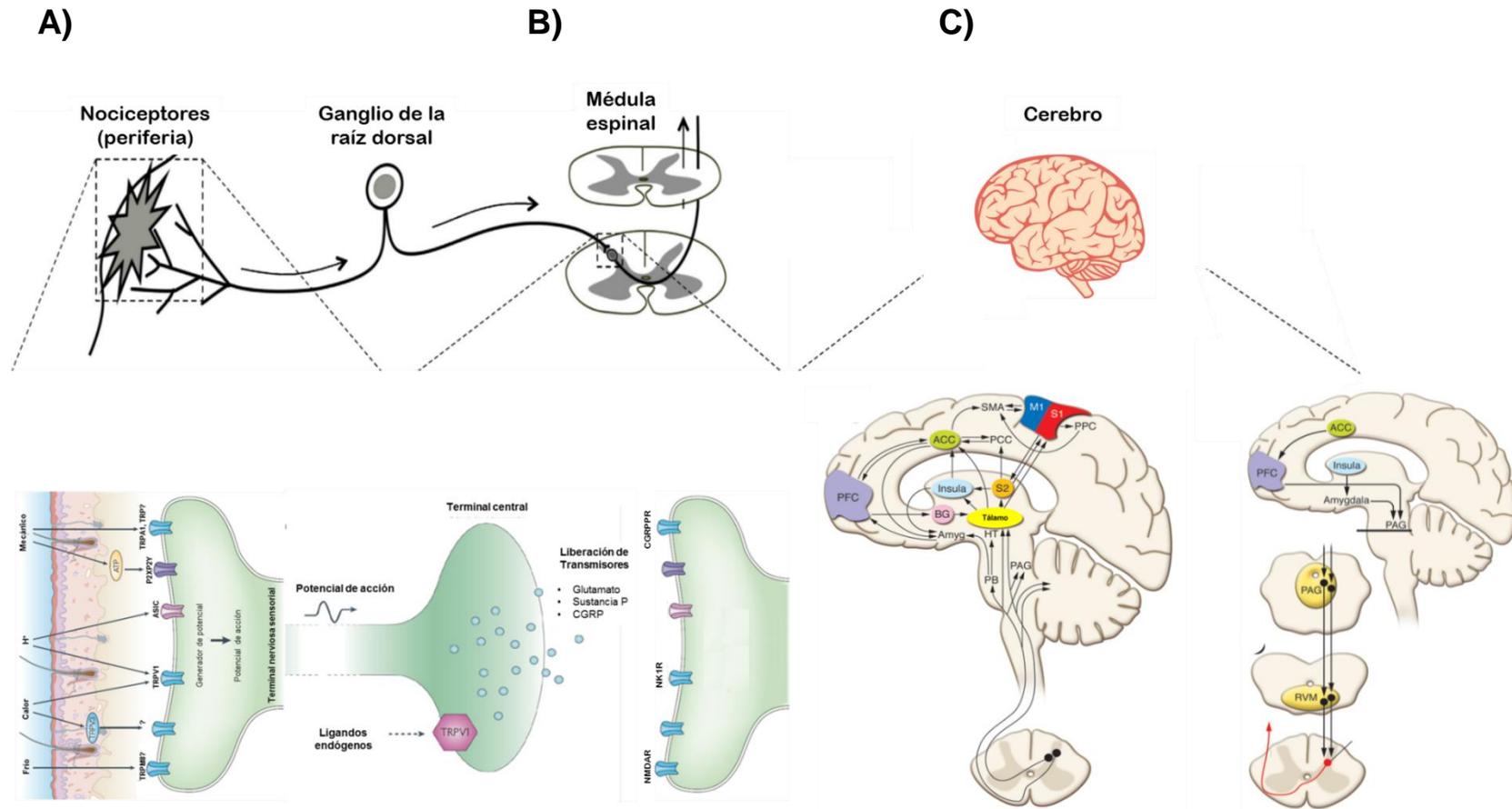


Figura 7. A) Transducción y conducción. B) Transmisión. C) Percepción y modulación. Modificado de Marchand et al., 2005; Schweinhardt & Bushnell, 2010 y Chen et al., 2013;

1.2. Terapéutica del dolor

La depresión de la sensación dolorosa se conoce como analgesia. Para que esta se presente, se deben activar ciertos sistemas endógenos que ayudan a que esos procesos dolorosos no interfieran con las funciones corporales normales (Carrillo Munguía, 2007). El tratamiento del dolor se basa en el uso de analgésicos y coadyuvantes según la escala analgésica de la O.M.S. (Puebla, 2005)(Fig. 7). Es la intensidad del dolor la que va a determinar el tratamiento analgésico. A medida que aumenta la intensidad del dolor, o bien no se controla de forma adecuada, se iniciará un tratamiento según en el escalón que nos encontremos o pasaremos al siguiente.

Escala analgésica de la O.M.S.

		Escalón III	Escalón IV
Escalón I	Escalón II	Opiáceos fuertes	
	Opiáceos débiles	±	Métodos no farmacológicos
AINES	±	AINES	±
±	AINES	±	Coadyuvantes
Coadyuvantes	±	Coadyuvantes	
	Coadyuvantes		

Paracetamol, metamizol, anticonvulsivantes, antidepresivos, esteroides	Tramadol, codeína, paracetamol, metamizol, anticonvulsivantes, antidepresivos, esteroides	Morfina, oxycodona, fentanilo, metadona, buprenorfina, paracetamol, metamizol, anticonvulsivantes, antidepresivos, esteroides	Ionoforesis, radiofrecuencia, bloqueos epidurales, bloqueos periféricos, etc.

Figura 8. Escala analgésica de la O.M.S. Tomado de Puebla, 2005.

1.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs comprenden un grupo químicamente heterogéneo de sustancias que son utilizados como analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Cuando se utilizan como analgésicos, los fármacos de este grupo suelen ser eficaces contra el dolor leve o moderado. A pesar de que su eficacia máxima es mucho menor que la de los opioides, los AINEs no generan los efectos adversos de estos últimos en el SNC, como son depresión respiratoria y aparición de dependencia física. Los AINEs no cambian la percepción de las modalidades sensoriales, salvo las del dolor (Brunton et al., 2010; Ulrich et al., 2006).

1.2.1.1. Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción de los AINEs es la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y por ende la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Angiolillo and Weisman, 2017). La primera enzima en la vía de la síntesis de prostaglandinas es la sintasa de prostaglandina G/H, llamada también ciclooxigenasa o COX. Esta enzima transforma el ácido araquidónico (AA) en el precursor prostanoide PGH_2 , el cual es posteriormente metabolizado a las distintas isoformas de prostaglandinas PGE_2 , PGD_2 , PGF_2 , PGI_2 o tromboxano A₂ (TXA₂) (Fig.9) (Brunton et al., 2010; Dwivedi et al., 2015; Ulrich et al., 2006).

Existen dos isoformas de la COX, COX-1 y COX-2. Estructuralmente las isoformas de COX contienen tres dominios distintos: un dominio estructural tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF; por sus siglas en inglés), un dominio de unión a membrana y un dominio catalítico. El dominio catalítico de las isoformas de COX se divide en los sitios activos, uno con actividad peroxidasa y otro con actividad ciclooxigenasa, separados espacialmente, pero mecanísticamente acoplados. El sitio activo ciclooxigenasa consiste en un largo canal hidrofóbico dentro del cual los aminoácidos Arg120, Tyr355 y Glu524 son de suma importancia, de igual manera, el aminoácido Tyr385 en la parte superior del canal, ya que este actúa como un donador de radicales para la reacción ciclooxigenasa (Fig. 9).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

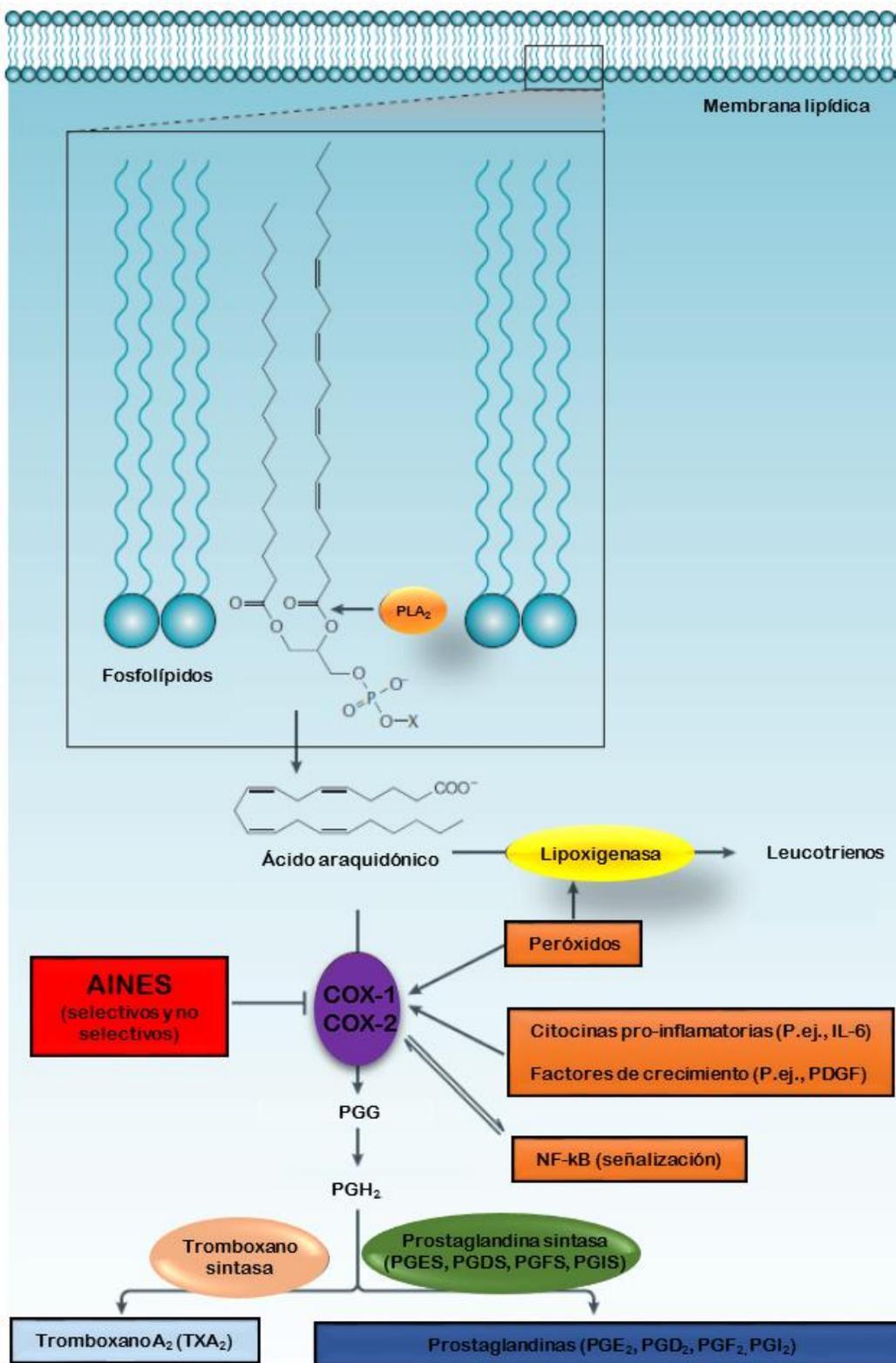


Figura 9. Síntesis de prostaglandinas e inhibición de COX por AINEs. Modificado de Ulrich et al., 2006.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

El posicionamiento correcto del AA en este sitio catalítico es de suma importancia para la síntesis de prostaglandinas, de tal forma que el bloqueo de dicho sitio catalítico por unión covalente (ácido acetil salicílico) o reversible de los AINEs (Fig. 10) inhibe la unión del AA, anulando la capacidad de la enzima para sintetizar prostaglandinas, evidenciándose de esta forma los efectos terapéuticos de los AINEs (anti-inflamatorios, analgésicos y anti-piréticos) (Abramson and Weaver, 2005; Bingham et al., 2006; Brunton et al., 2010; Hamza and Dionne, 2009; Vane et al., 1998; Dwivedi et al., 2015). Paradójicamente, los eventos adversos asociados al uso de AINEs (complicaciones gastrointestinales, daño renal y hepático, eventos cardiovasculares, entre otros) derivan de igual manera de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Brunton et al., 2010; Patrignani and Patrono, 2015)

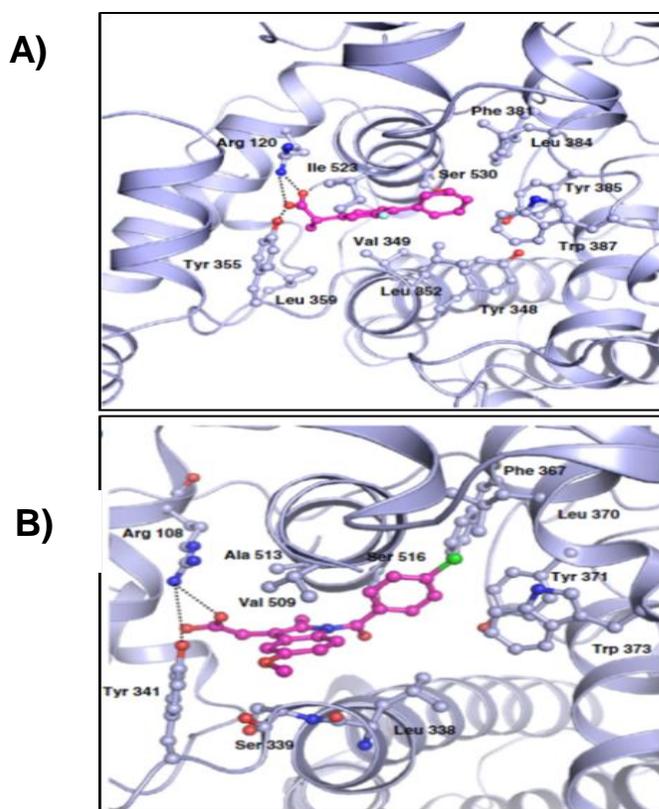


Figura 10. Unión de AINEs a COX-1 y COX-2. A) Flurbipropeno unido a COX-1. B) Indometacina unida a COX-2. Los AINEs se muestran en color magenta, las enzimas COX en color gris, los puentes de hidrógeno son representados con líneas punteadas. Tomado de Dwivedi et al., 2015.

1.2.1.2. Clasificación

Los AINEs pueden ser clasificados en función de su mecanismo de acción, fundamentalmente teniendo en cuenta la especificidad de inhibición de las isoformas de la COX (Tabla 1)(Batlouni, 2010).

Tabla 1

Clasificación de los AINEs según su mecanismo de acción (inhibición selectiva y no selectiva de la COX).

AINEs no selectivos (COX-1 y COX-2) (tradicionales, convencionales)	AINEs selectivos (COX-2) (COXIBs)
Ácido acetilsalicílico	Rofecoxib
Acetaminofén	Valdecoxib
Indometacina	Parecoxib
Ibuprofeno	Celecoxib
Naproxeno	Etoricoxib
Diclofenaco	Lumiracoxib
Piroxicam	
Meloxicam	
Ketoprofeno	

1.2.1.3. Naproxeno

El (+) ácido-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico (naproxeno) es un AINE inhibidor enzimático no selectivo de la COX derivado del ácido propiónico (Fig. 11) con propiedades analgésicas, antipiréticas y anti-inflamatorias (Drugs.com, 2016; Duggan et al., 2010). Se introdujo en la clínica en 1976, exhibe efecto antiagregante plaquetario, en nuestro país se encuentra en el grupo 21 (reumatología y traumatología) del cuadro básico de medicamentos donde se recomienda su uso para el tratamiento de dolor e inflamación, además, se usa en el tratamiento de enfermedades como la bursitis, tendinitis, dismenorrea, artritis reumatoide, artrosis, espondilitis anquilosante y artritis gotosa aguda entre otras. Para el tratamiento del dolor e inflamación aguda se recomienda su administración a razón de 250 mg 4 veces al día o 500 mg 2 veces al día o una dosis máxima por día de 1500 mg

(Lorenzo Fernández et al., 2008; Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud., 2016).

Cuando es administrado por vía oral, se absorbe en el tracto gastrointestinal por lo cual tiene una biodisponibilidad de 95-100%, aunque hay que mencionar que los alimentos retrasan su absorción. Su concentración plasmática máxima (C_{max}) surge 1 a 2 h después de la administración. Atraviesa la membrana placentaria y se excreta en leche materna, en una concentración aproximadamente de 1% de la que priva en el plasma materno. Se metaboliza por 6-desmetilación (30%) (CYP2C9 y CYP1A2), hidroxilación y conjugación con ácido glucorónico. La semivida ($t_{1/2}$) en plasma varía entre las 12 y 17 h. Los metabolitos del naproxeno y el propio naproxeno se excretan casi por completo por orina como conjugados de glucurónido u otros conjugados (Brunton et al., 2010; Duggan et al., 2010; Lorenzo Fernández et al., 2008; Palma-Aguirre et al., 2009; Thorn, 2017)

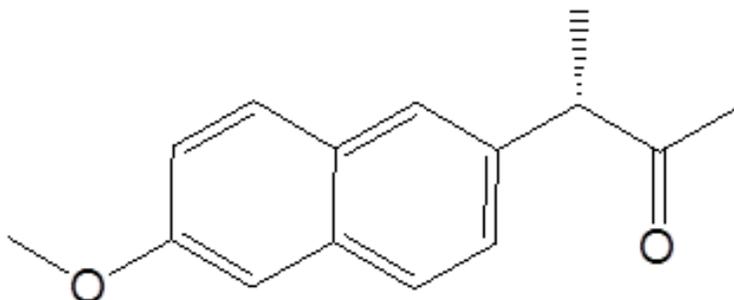


Figura 11. Estructura química del naproxeno. (+) ácido-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico.

Aunque se sabe que el naproxeno induce efectos adversos gastrointestinales significativos, es importante resaltar que aun administrado a dosis suficientemente elevadas (p. ej. ≥ 500 mg dos veces al día) como para mantener la inhibición plaquetaria a través de la inhibición de la COX-1 no se han presentado efectos adversos cardiovasculares. Esto es importante ya que existen datos que sugieren que la toxicidad cardiovascular exhibida inicialmente por rofecoxib y celecoxib se extiende a otros AINEs inhibidores no selectivos, incluidos el diclofenaco, la indometacina y el ibuprofeno (Angiolillo and Weisman, 2017; Duggan et al., 2010).

1.3. Ácido docosahexaenoico (DHA)

Los ácidos grasos (FA: por sus siglas en inglés) son parte substancial de los lípidos e importantes sustratos para la obtención de energía pues comprenden alrededor del 30% de la ingesta total del humano. Los FA en forma de fosfolípidos, constituyen la medula ósea de las membranas celulares, y son esenciales para su correcto funcionamiento y funcionalidad. Los FA saturados constan de enlaces carbono-carbono sin dobles enlaces. En contraste, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; por sus siglas en inglés) se caracterizan por tener una estructura pentadiénica con dobles enlaces. (Tvrzicka et al., 2011).

El DHA es un PUFA omega-3 (n-3) (Nakamoto et al., 2010) de veintidós átomos de carbono y 6 dobles enlaces (Holub, 2002). El termino n-3 indica que tiene un doble enlace carbono-carbono en la tercera posición respecto al grupo metil en la cadena del ácido graso (Fig. 12) (Chan and Cho, 2009).

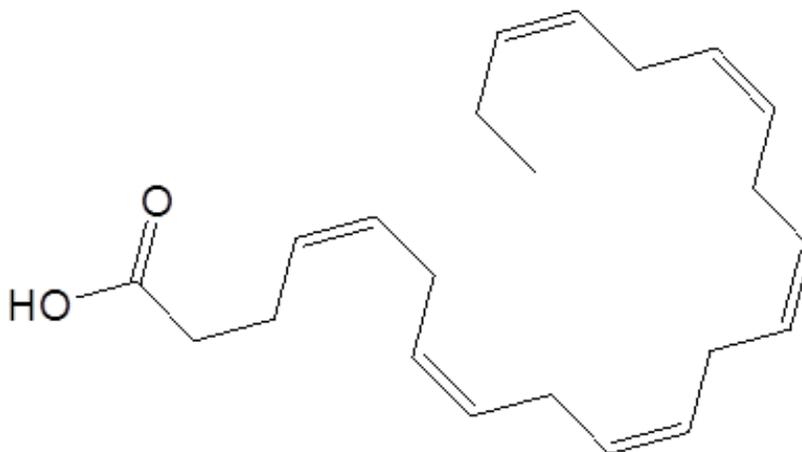


Figura 12. Estructura química del DHA, ácido docosahexaenoico, 22:6 ω 3 (22:6n-3) (contiene 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces o sitios de insaturación) (Holub, 2002).

El DHA no puede ser sintetizado *de novo* en humanos, de tal forma que es obtenido mediante la dieta (ingesta de pescado o aceite de pescado) o sintetizado a partir de ácidos grasos n-3 precursores como el ácido linolénico (18:3) (LNA: por sus siglas en inglés) y el ácido eicosapentaenoico (20:5) (EPA: por sus siglas en inglés) (Moore et al., 1995). El DHA ingerido o sintetizado a partir de los precursores LNA y EPA, se integra particularmente en la fosfatidiletanolamina (PE; por sus siglas en inglés), y en la fosfatidilserina (PS; por sus siglas en inglés) de las membranas neuronales principalmente. Además, puede ser integrado en la PE, PS y fosfatidilcolina (PC; por sus siglas en inglés) de los segmentos externos de la membrana celular de la retina. En algunas especies, incluidos los primates, el DHA es también acumulado en las membranas de los espermatozoides (Applegate and Glomset, 1986). El consumo de DHA es necesario durante el desarrollo pre y postnatal para la construcción de circuitos cerebrales funcionalmente críticos. La sinaptogénesis, formación de dendritas, biogénesis de las membranas de los fotorreceptores y la biogénesis de otras membranas neuronales tienen lugar durante el desarrollo temprano post-natal (Bazan et al., 2011; Belayev et al., 2011). Además de su importancia en el desarrollo del tejido cerebral y de la retina del ojo, se han documentado numerosos efectos benéficos del DHA, por ejemplo, la pérdida de DHA en el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer se asocia con la progresión de la enfermedad, en tanto que el mantenimiento de dicho PUFA mediante la ingesta previene el proceso oxidativo y de neurodegeneración de las células cerebrales, además el DHA y la neuroprotectina D1 (NPD1) disminuyen la formación de péptidos beta amiloides (Ab; por sus siglas en inglés) disminuyendo de esta forma los procesos proinflamatorio y proapoptótico (Bazan et al., 2011; Gleissman et al., 2010). Algunos estudios epidemiológicos respaldan la importancia del DHA en la prevención de diversos tipos de cáncer, esto mediante la inhibición de la proliferación y migración de células tumorales, inducción de la apoptosis e inhibición del microambiente tumoral (inhibición de la inflamación y angiogénesis) (El-mesery et al., 2009; Gleissman et al., 2010). Así mismo se ha reportado la influencia del DHA en la disminución de riesgo de enfermedad cardiovascular. A pesar de este importante efecto, los mecanismos mediante los cuales se ejerce esta propiedad

específica no están completamente dilucidados. Se sabe que ejercen efecto antiaterogénico y antitrombótico a través de la modulación de los lípidos sanguíneos y las lipoproteínas. Se han observado concentraciones bajas de triglicéridos (TG) en plasma, principalmente por la disminución de la secreción hepática de VLDL y de la biosíntesis de ácidos grasos libres (Brossard et al., 1997).

Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha reportado el efecto gastro y enteroprotector del DHA en un modelo de daño inducido por AINEs, se propone que el efecto gastroprotector puede ser mediado a través de la modulación de MPO, LTB₄, ICAM-1 y TNF- α , así como la inhibición de la activación de NF- κ B, lo que en conjunto participa en la disminución de la infiltración de leucocitos en el modelo de daño por indometacina, además de que el pretratamiento con DHA promueve la producción de RvD1 (Pineda-Peña et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado el efecto antinociceptivo de la administración oral del DHA en diferentes modelos murinos (Nakamoto et al., 2010). Así mismo, nuestro equipo de trabajo ha demostrado el efecto antinociceptivo de la administración local del DHA en la prueba de la formalina (Landa-Juárez et al., 2016), sinergismo al combinar AINEs como la indometacina, el diclofenaco y el ketorolaco con el DHA (Arroyo-Lira et al., 2014; García Barrera, 2016; Miranda Lara, 2016).

1.4. Interacciones farmacológicas

Tradicionalmente, las interacciones farmacológicas se clasifican en farmacodinámicas, farmacocinéticas y farmacéuticas (Pleuvry, 2005). Clásicamente podemos definir una interacción farmacológica como aquella situación en la que los efectos de un fármaco están influenciados por la administración conjunta de otro, es decir, cualquier modificación del efecto de un fármaco por la administración conjunta de cualquier sustancia química, ya sea alimento, plantas medicinales, fármaco o sustancias de abuso.

1.4.1. Interacciones farmacodinámicas

La farmacodinamia es el conjunto de episodios derivados de la interacción del fármaco con su receptor o con otro sitio de acción primaria (p.ej. enzimas). De manera simple, la farmacodinamia puede definirse como “lo que el fármaco hace al cuerpo”.

Este tipo de interacciones ocurren cuando un fármaco (A), altera el mecanismo de acción farmacológico de otro fármaco (B) sin alterar su concentración en el sitio de acción (Hinder, 2011).

Cuando dos o más fármacos producen efectos terapéuticos similares o iguales, a menudo se administran conjuntamente para reducir las dosis individuales y/o para reducir los efectos adversos de cada uno. Las combinaciones de fármacos también se emplean en experimentos para descubrir y explorar su mecanismo de acción (Tallarida et al., 1997). El efecto combinado de dos agentes con el mismo efecto terapéutico puede ser *aditivo*, *super-aditivo* o *sub-aditivo* (Tallarida, 2000).

1.4.1.1. Combinación de agentes con un mismo efecto terapéutico (analgésico o antinociceptivo).

El alivio del dolor puede ser alcanzado por una amplia variedad de métodos, siendo el uso de medicamentos la piedra angular del tratamiento analgésico (Ortiz et al., 2010). El uso de combinaciones de dos medicamentos con efectos similares es común en la práctica médica. El objetivo de usar combinaciones es disminuir la

dosis de cada medicamento, disminuyendo así los efectos adversos que generalmente están asociados con el uso de altas dosis cuando se usa el medicamento de manera individual. De manera común, la combinación de medicamentos es descrita como interacción “aditiva o de sumación”, donde el efecto de la combinación es una simple adición de los efectos individuales de cada medicamento. También puede ser descrita como una interacción “super-aditiva o sinergista”, es decir la manifestación exagerada del efecto, mientras que una disminución en el efecto es descrita como una interacción “sub-aditiva o antagonista” (Curatolo and Svetcic, 2002; Morlion et al., 2010; Tallarida et al., 2003). El uso de AINEs para el tratamiento del dolor es el método de elección. Sin embargo, debido a los efectos adversos producidos por los AINEs se ha desarrollado un gran interés por los productos de origen natural (suplementos alimenticios, remedios herbales, etc.) que se han usado por siglos para reducir el dolor y la inflamación (Maroon et al., 2010). Existen estudios que evalúan las posibles interacciones entre compuestos de origen natural y medicamentos (Ortiz et al., 2010); siendo por su efecto anti-inflamatorio los ácidos grasos poli-insaturados n-3 los compuestos mejor documentados en la literatura (Arnold et al., 2010; Maroon and Bost, 2006; Russo, 2008).

1.4.1.2. Análisis isobolográfico.

Un isoblograma (Fig. 13) es una gráfica en coordenadas rectangulares de las dosis o concentraciones (a , b), de los fármacos que producen un nivel de efecto terapéutico específico (p.ej. DE_{30} , DE_{50} , DE_{70} , etc.) cuando se coadministran. El isoblograma proporciona una representación visual de las dosis teóricas aditivas y de los pares experimentales. En el isoblograma se muestra la línea de aditividad o isobola, la cual representa todas las posibles combinaciones equivalentes para producir el efecto deseado. La isobola está definida por los puntos $(Z1^*, 0)$ y $(0, Z2^*)$, donde $Z1^*$ corresponde a la dosis del fármaco menos activo y $Z2^*$ a la del fármaco más activo, hablando de los efectos terapéuticos que individualmente producen. En este método el valor de $Z1^*$ y $Z2^*$, se calculan de la región curva dosis-respuesta en donde existe una relación lineal entre la dosis empleada y la respuesta

observada. Se calcula Z^* para cada fármaco de la regresión lineal del efecto en función del logaritmo de la dosis, de donde se obtienen el $\log Z^*$ y el error estándar del estimado SE ($\log Z^*$) para cada fármaco, que posteriormente se utilizará para realizar el análisis estadístico (Raffa et al., 2010; Tallarida, 2000, 2002, 2007, 2011, Tallarida et al., 1997, 1989).

Los pares de dosis equiefectivas son denominadas isobolas, de tal forma que $(A, 0)$, $(0, B)$ y los pares (a, b) son isobolas. Cuando la combinación de las dosis a del fármaco A y la dosis b del fármaco B cumplen con la relación $a/A + b/B = 1$ se dice que los fármacos A y B presentan una relación aditiva. La relación $a/A + b/B < 1$ indica la relación super aditiva entre los fármacos A y B , en tanto que la relación $a/A + b/B > 1$ indican la relación sub-aditiva entre los fármacos A y B (Tallarida, 2000).

Considerando la Z^* del fármaco A como A y la Z^* del fármaco B , como B . Las cantidades en la combinación aditiva son fracciones de las dosis de cada compuesto tal que la suma de las fracciones sea igual a la unidad; así entonces $a = fA$ del fármaco A y $b = (1-f) B$ del fármaco B . Es decir, para que sea una combinación aditiva se debe cumplir con la relación $a/A + b/B = 1$. Cuando estas cantidades son expresadas en unidades de masa comunes (mg) o dosis (mg/Kg) la cantidad total en la mezcla es la suma denominada Z_{ad} :

$$Z_{ad} = fA + (1 - f)B \quad \text{Ecuación 1}$$

Esta relación representa la cantidad teórica de la combinación que dará una interacción aditiva. La cantidad de cada fármaco en la mezcla estará dada por (Raffa et al., 2010; Tallarida, 2000, 2007, 2011):

$$\rho_A = \frac{fA}{Z_{ad}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\rho_B = (1 - f) \frac{B}{Z_{ad}} \quad \text{Ecuación 3}$$

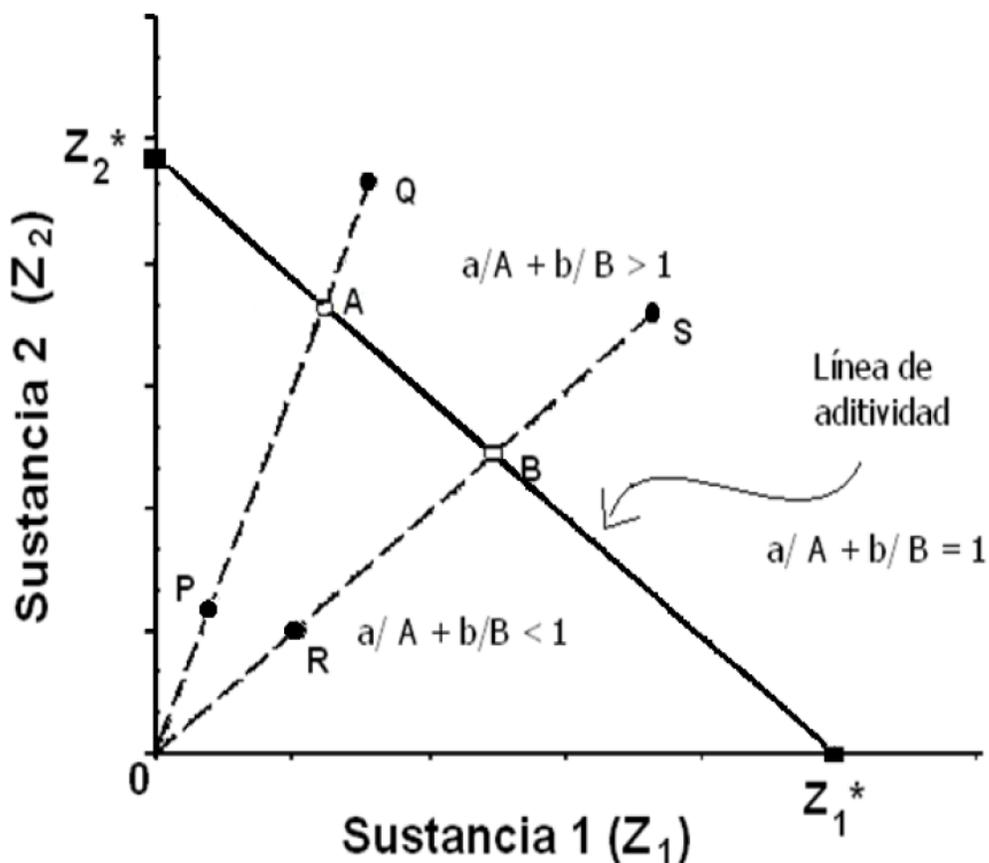


Figura 13. Isobolograma. La línea continua representa la isobola; Z_1^* y Z_2^* son las dosis equiefectivas individuales. Los puntos A y B representan las concentraciones teóricas aditivas (Z_{ad}). P y R son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con un efecto super-aditivo, en tanto que Q y S son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con un efecto sub-aditivo. Tomado de Castro, 2011.

La combinación que resulte con estas proporciones se administra experimentalmente al sistema biológico, en diferentes dosis conservando la misma proporción (p). Se determina la dosis que proporciona el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales (p.ej. DE_{30} , DE_{50} , DE_{70} , etc.) y a este valor se le denomina Z_{exp} (cantidad experimental que provoca el mismo nivel de efecto). Se calcula también el intervalo al 95%, que posteriormente se transformará en el error estándar de la media (SEM; por sus siglas en inglés).

Se realiza el análisis estadístico a la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$. Si la diferencia es significativa indicará una relación no aditiva entre los dos fármacos, estableciendo una relación de superaditividad o sinergista si $Z_{exp} < Z_{ad}$ ($M > 0$) y una relación de subaditividad si la $Z_{exp} > Z_{ad}$ ($M < 0$). Se aplica un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isobolográfico (Tallarida et al., 1997).

1.4.2. Interacciones farmacocinéticas

La farmacocinética se define como el análisis cuantitativo de los niveles de un fármaco y sus metabolitos dentro del cuerpo en función del tiempo. Se puede describir mediante una serie de procesos: la absorción, distribución y la eliminación (que comprende el metabolismo y la excreción) (ADME). De manera simple, la farmacocinética puede ser considerada como “lo que el cuerpo le hace al fármaco” (Chikhani and Hardman, 2016).

Los procesos anteriormente mencionados (ADME), pueden influenciar la concentración del fármaco en el sitio blanco, y finalmente determinan el efecto farmacológico, así como la respuesta fisiológica al fármaco. Las variaciones de estos procesos pueden causar niveles del fármaco que se encuentren fuera de su índice terapéutico, lo cual podría ocasionar el riesgo de obtener un efecto subterapéutico o efectos adversos. Es decir, los efectos deseables o indeseables de un fármaco, generalmente están asociados a su concentración en el sitio de acción, lo que a su vez está asociado con la cantidad de fármaco administrada (dosis) y con la absorción, distribución y eliminación del fármaco. Estos procesos (ADME) se pueden ver afectados por numerosos factores, entre los cuales se incluyen los de origen fisiológico, patológico y farmacológico (Chikhani and Hardman, 2016; Sousa et al., 2008; Zhang et al., 2010a).

Evaluar los cambios observados que surgen de las interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco resulta muy importante debido a que las variaciones derivadas de estas interacciones pueden alterar el perfil de seguridad y eficacia de un fármaco. La información respecto a las variaciones farmacocinéticas es usualmente obtenida después de la administración del fármaco y la

determinación de su concentración en sangre en una serie de muestras tomadas en intervalos determinados. De esta manera, los perfiles de concentración-tiempo, y la variabilidad en puntos específicos puede ser examinada (Glen, 2005; Zhang et al., 2010a).

1.4.3. Interacciones farmacéuticas (incompatibilidades)

Las interacciones de carácter farmacéutico se refieren a las incompatibilidades de tipo fisicoquímico que impide mezclar dos o más fármacos en la misma solución (antagonismo químico). Ejemplos del antagonismo químico son los quelantes (p.ej. dimercaprol), que se unen a metales pesados y reducen su toxicidad, o los antihistamínicos como la cimetidina y los antiácidos cambian el pH y esto afecta la ionización de otros fármacos. Puede ocurrir adsorción como sucede con el carbón activado que absorbe muchos fármacos (cloruro de mercurio, Imipramina, fenobarbital, clorpromazina, aspirina) y esto puede usarse desde el punto de vista terapéutico en el tratamiento de envenenamientos (Linares Borges et al., 2002)

2. Antecedentes

El efecto antinociceptivo del naproxeno es producto de la inhibición de COX-1 y COX-2, y aunque se presenta daño gastrointestinal, hasta el momento no se ha reportado ningún efecto adverso cardiovascular incluso al emplear dosis elevadas (≥ 500 mg/Kg 2 veces al día) en contraste con rofecoxib, celecoxib y otros AINEs inhibidores no selectivos (Duggan et al., 2010). Por otra parte, el DHA exhibe efecto antinociceptivo en diferentes modelos animales de dolor (Nakamoto et al., 2010). El mecanismo de acción mediante el cual el DHA ejerce su efecto antinociceptivo está mediado al menos por el receptor GPR40, al cual el DHA se une y se activan las vías de señalización necesarias para la activación del sistema opioide endógeno y la subsecuente liberación de β -endorfina (Nakamoto et al., 2012, 2011; Nishinaka et al., 2014).

En analgesia se utilizan las combinaciones de compuestos para mantener el efecto terapéutico y disminuir los eventos adversos generados por este tipo de tratamientos, en particular en el caso de AINEs, para disminuir el daño gástrico generado. Por ejemplo, se ha reportado que la coadministración de naproxeno con citral demostró tener un efecto antinociceptivo aditivo a nivel sistémico en la prueba de la formalina, además de producir un daño gástrico menor en comparación con la administración de naproxeno. Esto confiere a la combinación naproxeno-citral un potencial terapéutico en el manejo del dolor inflamatorio (Ortiz et al., 2010). También se ha identificado, mediante análisis isobolográfico, el efecto antihiperalgésico de la administración del extracto etanólico de *Heliopsis longipes* (HLEE) en combinación con el diclofenaco, en la cual se demostró un efecto antihiperalgésico de tipo sinérgico en el modelo de hiperalgnesia térmica inducida por carragenina (Acosta-Madrid et al., 2009).

Recientemente se demostró que la combinación de DHA con indometacina ejerce un efecto antinociceptivo sinérgico (Arroyo-Lira et al., 2014) y que dicha combinación posee seguridad gástrica. En otros estudios de combinaciones se ha reportado que la coadministración del opioide codeína con los AINEs indometacina y diclofenaco, exhibe un efecto antinociceptivo aditivo pero no sinérgico en la prueba de la formalina en rata tras la administración oral de indometacina (Arredondo-Garza

et al., 2007); en contraste la administración periférica, sistémica y espinal de codeína con diclofenaco ejercen un efecto antinociceptivo sinérgico (Jiménez-Andrade et al., 2003).

Por otra parte, se han descrito que en la prueba de dolor abdominal en ratón la interacción en el efecto antinociceptivo de la combinación de glucosamina con diferentes AINEs resultó ser sinérgica (ibuprofeno y ketoprofeno), aditiva (diclofenaco, indometacina, naproxeno y piroxicam) o sub-aditiva (aspirina y acetaminofén). Además, en el caso particular de la combinación glucosamina e ibuprofeno la interacción sinérgica no se debió a modificaciones en los perfiles farmacocinéticos del ibuprofeno (Tallarida et al., 2003).

En el caso del DHA, existen reportes de que este aumenta la biodisponibilidad de la ciclosporina mediante la inhibición selectiva y reversible del CYP3A4 en el lumen intestinal sin evidencia de efectos tóxicos notables, por lo cual se ha propuesto utilizar el DHA como un potenciador de la biodisponibilidad cuando se combine con substratos del CYP3A4 (Hirunpanich et al., 2006).

3. Justificación

El dolor es un proceso complejo, el cual implica numerosas vías de transmisión y control. Tanto en México como en el resto del mundo, el dolor se ha convertido en un problema de salud pública, que impacta no solo en la calidad de vida de quien lo padece, sino que, representa la primera causa de consulta médica y ausencia laboral, lo cual no solo representa pérdidas económicas, sino inversión en el tratamiento de este padecimiento, que pasó de ser considerado un simple síntoma (acompañante de otras patologías) a una enfermedad.

El tratamiento y manejo de todos los tipos de dolor (nociceptivo, inflamatorio, neuropático y disfuncional) se basa en el uso de AINEs y opioides, administrados individualmente o en combinación. En México, el naproxeno forma parte del cuadro básico de medicamentos para el tratamiento del dolor y otras enfermedades crónico-degenerativas como la artritis, sin embargo, su principal limitante son las lesiones gastrointestinales que este induce cuando es consumido de manera crónica.

La persistencia del dolor y los efectos adversos derivados del uso de estos fármacos resaltan la necesidad de encontrar nuevas alternativas que permitan controlar el dolor y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Una de estas alternativas es la combinación de AINEs con compuestos de origen natural con efecto analgésico. Se ha demostrado el efecto analgésico del ácido docosahexaenoico (DHA) [un ácido graso poliinsaturado omega-3 (n-3 PUFA)], así como su efecto gastroprotector.

Hasta el momento, no se ha realizado la combinación de los analgésicos DHA y naproxeno, por esto consideramos necesario realizar la evaluación experimental de esta combinación ya que esto nos permitirá tener las herramientas necesarias para poder establecer y determinar los mecanismos de acción implicados en las interacciones farmacodinámicas y farmacocinéticas en el efecto analgésico de la combinación DHA-naproxeno y ofrecer una terapia analgésica con seguridad gástrica.

4. Hipótesis

La administración sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno 1:1, 1:3 y 3:1 producirá una interacción super-aditiva en el efecto antinociceptivo y poseerá seguridad gástrica. Además, se espera que el DHA sea capaz de modificar los parámetros farmacocinéticos de la administración oral de naproxeno y que este fenómeno correlacione con la potenciación del efecto antinociceptivo.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general.

Identificar el posible mecanismo de acción en la interacción del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno.

5.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar la interacción farmacodinámica en el efecto antinociceptivo de la administración sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno.
2. Determinar la seguridad gástrica de la administración sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno.
3. Estudiar el efecto del DHA en la farmacocinética del naproxeno y determinar su influencia en el efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno.

6. Estrategia experimental

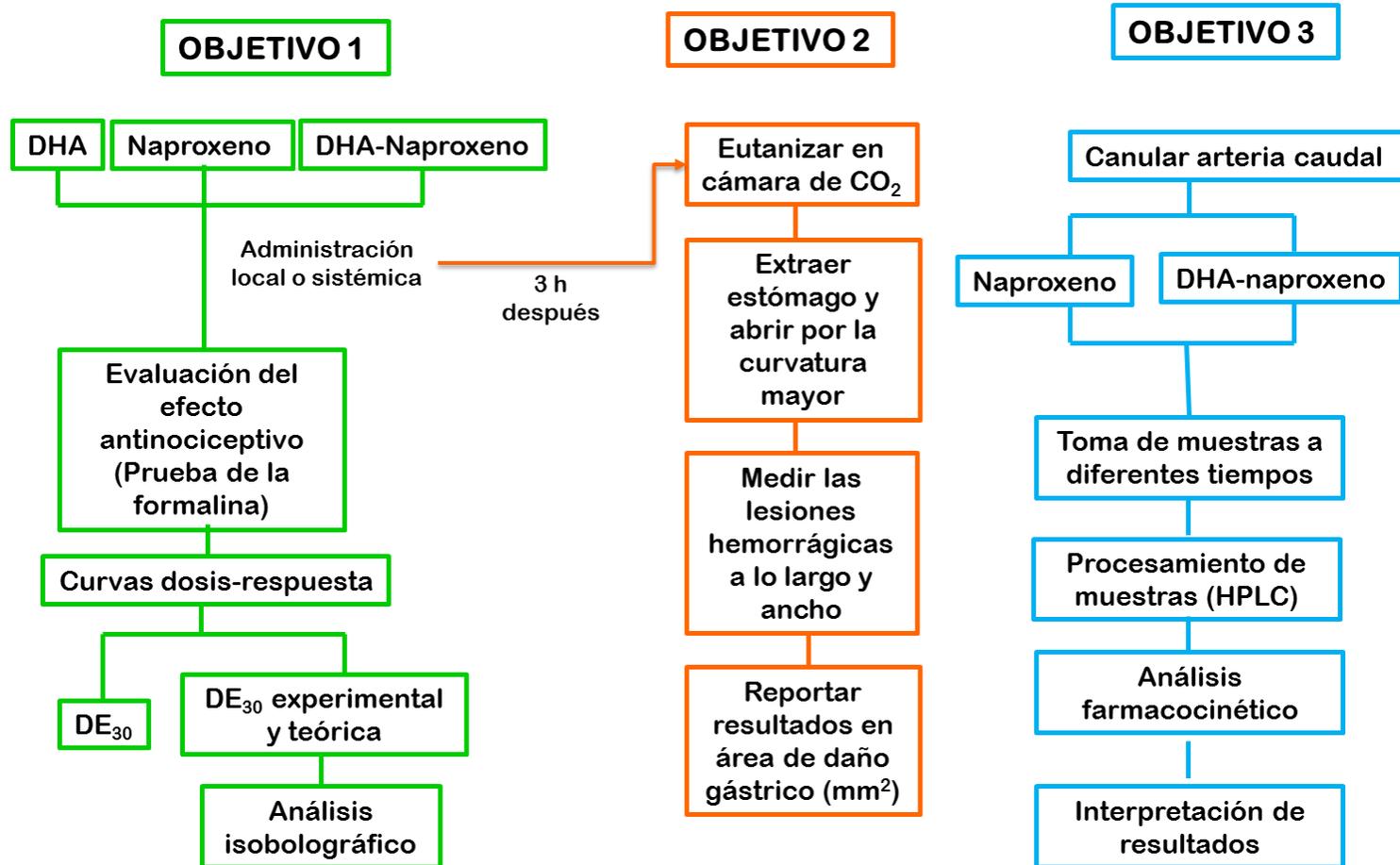


Figura 14. Estrategia experimental.

7. Materiales y métodos

7.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembras Wistar de 180-240 g de peso obtenidas de la unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV. Se mantuvieron en cajas con alimento y agua *ad libitum* a una temperatura de 23-24 °C con ciclos de luz oscuridad de 12 h. Se retiró el alimento 14 h previas al experimento. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos éticos para la investigación del dolor en animales de experimentación (Zimmermann, 1983) y en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio” NOM-062-ZOO-1999” y atendiendo el “Programa interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del CINVESTAV” y habiendo sido aprobado el protocolo experimental (número de aprobación ENMH-CB-136-2015) por el comité de bioética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

7.2. Fármacos

El naproxeno, diclofenaco y el ácido docosahexaenoico (DHA) fueron comprados a Sigma-Aldrich (Toluca, México).

7.3. Reactivos

Se utilizaron aceite de olivo y solución salina 0.9% como vehículos del DHA y naproxeno respectivamente. Para la prueba de la formalina, se preparó formalina al 1% a partir de formaldehído al 37%.

7.4. Modelo experimental de la prueba de la formalina para la evaluación del efecto antinociceptivo

En este estudio se utiliza la prueba de la formalina (Arredondo-Garza et al., 2007). Esta prueba fue introducida por Dubisson y Dennis en 1977 (Abbott et al., 1995). Dicha prueba consiste en la administración subcutánea de formalina al 1% en la pata trasera derecha de la rata y la subsecuente observación del

comportamiento inducido por dicho estímulo (Shibata et al., 1989). Para llevar a cabo el procedimiento experimental se utilizan cilindros transparentes de acrílico de 20 cm de diámetro por 40 cm de altura, estos se colocan sobre placas de vidrio de 25 por 25 cm, y se colocan detrás de cada uno de los cilindros dos espejos de 40 por 40 cm posicionados a 90°C uno respecto al otro, esto permite observar el comportamiento de la rata sin perder detalle (Jiménez-Andrade et al., 2003). Las ratas se colocan en el interior de los cilindros durante 30 min, tiempo necesario para que las ratas se acostumbren al entorno en el cuál se realiza el experimento (Arredondo-Garza et al., 2007). Transcurrido este tiempo, las ratas son removidas de los cilindros para la administración de la formalina al 1%, se administran 50 µl en la región plantar de la pata trasera derecha de la rata (De Paz-Campos et al., 2014). Una vez administrado el estímulo nocivo, se regresan las ratas al cilindro para observar su comportamiento. El comportamiento nociceptivo es cuantificado como el número de sacudidas de la pata inyectada durante 1 min, cada 5 min, durante 60 min (Jiménez-Andrade et al., 2003). Las sacudidas de la pata de la rata se caracterizan como un movimiento rápido de flexión o retirada de la pata inyectada. Las ratas son eutanizadas concluido el experimento utilizando una cámara de bióxido de carbono (CO₂).

7.5. Modelo experimental para la evaluación del daño gástrico

Las lesiones producidas por el naproxeno son determinadas siguiendo el método descrito por Wallace et al (Wallace et al., 2000). Las ratas reciben agua *ad libitum* y son sometidas a ayuno durante 14 h, transcurrido este tiempo se realiza la administración de naproxeno por vía oral (p.o.) utilizando una cánula orogástrica; 3 h después, las ratas son eutanizadas en una cámara de CO₂, este es el tiempo donde se genera el máximo de lesiones gástricas (Souza et al., 2008; Wallace et al., 2000). El estómago es removido y se abre por la curvatura mayor para una completa extensión. Se toman fotografías de los estómagos y se realiza el análisis de las imágenes para obtener el área de lesiones hemorrágicas utilizando el programa ImageJ. En el caso de la administración intraplantar no es necesario el tiempo recomendado de ayuno, y el tiempo transcurrido desde la administración del

AINE hasta la evaluación del daño gástrico es 3 h al igual que en la administración oral.

7.6. Diseño experimental

7.6.1. Administración oral de los fármacos y evaluación del efecto antinociceptivo y seguridad gástrica de manera individual y de las combinaciones

Para evaluar el efecto antinociceptivo y seguridad gástrica del DHA, naproxeno y la combinación en sus diferentes proporciones (1:1, 1:3 y 3:1) se prepararon y administraron inmediatamente como se indica a continuación:

7.6.1.1. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo y evaluación del daño gástrico del naproxeno, DHA y la combinación.

Utilizando una cánula orogástrica se realizó la administración oral de diferentes dosis de naproxeno (10, 30, 100 y 300 mg/kg), DHA (56.23, 100, 177.83 y 316.23 mg/kg) o la combinación (81.23, 40.62, 20.31 y 10.16 mg/Kg de peso, proporción 1:1; 54.43, 27.21, 13.61 y 6.80 mg/Kg de peso, proporción 1:3; 108.04, 54.01, 27.01 y 13.50 mg/Kg de peso, proporción 3:1), cada una de estas dosis representa un grupo (Cuadro 1), el grupo control únicamente recibe solución salina 0.9% (naproxeno), aceite de olivo (DHA) o ambas en el caso de la combinación. Las ratas tuvieron un ayuno previo de 14 h y la administración se realizó 1 h (naproxeno) o 14 h (DHA) antes de la prueba de la formalina. 1 h después de finalizada la prueba de la formalina las ratas fueron eutanizadas en cámara de CO₂ y se evaluó el daño gástrico. Los grupos son de una n=5-9. Se graficaron los resultados y se obtuvo la curva dosis-respuesta del naproxeno y a partir de esta, utilizando regresión lineal se determinó el valor de la DE₃₀.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Cuadro 1.

Dosis empleadas para la evaluación de la interacción en el efecto antinociceptivo de la administración oral del DHA y el naproxeno.

Combinación 1:1 DHA-naproxeno (mg/Kg, p.o.)		
DHA	Naproxeno	Total
8.43	1.73	10.16
16.85	3.45	20.31
33.71	6.91	40.62
67.42	13.81	81.23
Combinación 1:3 DHA-naproxeno (mg/Kg, p.o.)		
DHA	Naproxeno	Total
4.21	2.59	6.80
8.43	5.18	13.61
16.85	10.31	27.21
33.71	20.72	54.43
Combinación 3:1 DHA-Naproxeno (mg/Kg, p.o.)		
DHA	Naproxeno	Total
12.64	0.86	13.50
25.28	1.73	27.01
50.56	3.45	54.01
101.13	6.91	108.04

7.6.1.2. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo del naproxeno en presencia de una dosis única de DHA.

Debido a que se obtuvieron resultados que indicaron antagonismo en las proporciones 1:1 y 3:1 de la combinación administrada de forma oral se decidió realizar una curva dosis respuesta de naproxeno en presencia de una dosis única de DHA y comparar los resultados con los obtenidos en la curva dosis respuesta del naproxeno administrado por vía oral de manera individual. Utilizando una cánula orogástrica se realizó la administración oral de DHA (8.43 ó 33.71 mg/kg de peso)

y diferentes dosis de naproxeno (10, 30, 100 y 300 mg/Kg), cada una de estas dosis representa un grupo. Las ratas tuvieron un ayuno previo de 14 h. El DHA se administró 14 h antes de la administración de formalina al 1% y el naproxeno 1 h antes. El grupo control recibió aceite de olivo 14 h y solución salina 0.9% 1h antes de la administración de la formalina al 1%. Finalizada la prueba de la formalina las ratas fueron eutanizadas en cámara de CO₂. Los grupos son de una n≥5-9. Se graficaron los resultados y se obtuvo la curva dosis-respuesta del naproxeno y a partir de esta, utilizando regresión lineal se determinó el valor de la DE₃₀.

7.6.1.2.1. Ensayo de inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) mediante un kit de ELISA.

Se realizó in vitro la valoración de la inhibición de la COX-2 en presencia de naproxeno (10-300 pM) y DHA (1-30 pM). Se utilizó el kit comercial No. 560131 de Cayman Chemical. Se graficaron los resultados y se obtuvo la curva concentración-efecto del naproxeno y del DHA. A partir de estas, utilizando regresión lineal se determinó el valor de la CI₅₀.

7.6.2. Administración local de los fármacos y evaluación del efecto antinociceptivo y seguridad gástrica de manera individual y de las combinaciones

7.6.2.1. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo y daño gástrico del naproxeno, DHA y la combinación.

Se realizó la administración intraplantar (i.pl.) de diferentes dosis de naproxeno 316.23, 562.23, 1000 y 1778 µg/pata ipsilateral (en la misma pata donde se administra el estímulo nocivo, es decir en la pata trasera derecha al igual que la formalina), y 1778 µg/pata contralateral (en la pata donde no se administra estímulo nocivo, es decir en la pata trasera izquierda); DHA 178, 316.23, 562.23 y 1000 µg/pata ipsilateral y 1000 µg/pata contralateral o la combinación 512.10, 256.05, 128.02 y 64.01 µg/pata (proporción 1:1); 648.92, 324.46, 162.24 y 81.11 µg/pata (proporción 1:3); 1501.11, 750.56, 375.28, 187.64 µg/pata (proporción 3:1)

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

cada una de estas dosis representa un grupo (Cuadro 2), el grupo control únicamente recibió solución salina 0.9% (naproxeno), aceite de olivo (DHA) o ambos en el caso de la combinación 60 min antes de la prueba de la formalina. 1 h después de finalizada la prueba de la formalina las ratas fueron eutanizadas en cámara de CO₂ y se evaluó el daño gástrico. Se formaron grupos de una n≥5-9. Se graficaron los resultados y se obtuvo la curva dosis-respuesta del naproxeno y a partir de esta, utilizando regresión lineal se determinó el valor de la DE₃₀.

Cuadro 2.

Dosis empleadas para la evaluación de la interacción en el efecto antinociceptivo de la administración local del DHA y el naproxeno.

Combinación 1:1 DHA-naproxeno (µg/pata)		
DHA	Naproxeno	Total
14.90	49.11	64.01
29.81	98.22	128.03
59.62	196.43	256.05
119.23	392.87	512.10
Combinación 1:3 DHA-naproxeno (µg/pata)		
DHA	Naproxeno	Total
7.45	73.66	81.11
14.91	147.33	162.24
29.81	294.65	324.46
59.62	589.30	648.92
Combinación 3:1 DHA-Naproxeno (µg/pata)		
DHA	Naproxeno	Total
89.42	98.22	187.64
178.85	196.43	375.28
357.69	392.87	750.56
715.38	785.73	1501.11

7.6.3. Evaluación de la farmacocinética del naproxeno y la combinación

7.6.3.1. Método analítico para la cuantificación de naproxeno

7.6.3.1.1. Equipo y condiciones cromatográficas

El equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC; por sus siglas en inglés) que se empleó es Hitachi Primaide de la serie 1000, compuesto por los siguientes módulos: bomba isocrática 1110 Hitachi con inyector manual con asa de 25 μ L, horno de columna 1310 Hitachi y detector ultravioleta de absorbancia variable 1410 Hitachi. La separación de los fármacos se llevó a cabo con una columna Agilent Eclipse XDB C₁₈ de fase reversa, de 4.6 mm de diámetro (diámetro interno) x 150 mm de longitud y 5 μ m de tamaño de partícula. La detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol:agua a pH 3 en una proporción 68:32 v/v. El pH se ajustó con ácido acético glacial. La velocidad del flujo se mantuvo en 2 mL/min con un tiempo de corrida de 6.5 min. Se usó diclofenaco como estándar interno (EI). Los tiempos de retención determinados fueron de 2.3 y 5 min para naproxeno y diclofenaco respectivamente. (De Paz-Campos et al., 2014; León-Reyes et al., 2009; Patiño-Camacho et al., 2013; Shah et al., 2011).

7.6.3.1.2. Validación del método cromatográfico

Para validar el método cromatográfico se consideraron los procedimientos y requerimientos indicados en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Los puntos que se evaluaron fueron los siguientes:

7.6.3.1.2.1. Selectividad

Se define como selectividad a la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra. Se estableció la selectividad del método inyectando al equipo: 1) fase móvil, 2) metanol y 3) muestras de plasma (matriz biológica) normal, lipémico y hemolizado de rata Wistar no tratadas con el fármaco. Las dos primeras se

inyectaron directamente al equipo, en tanto que las muestras de plasma se prepararon añadiendo 100 μ L de plasma a un tubo eppendorf y adicionando 900 μ L de metanol (para precipitar las proteínas), se mezclaron en vórtex por un periodo de 3 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12, 000 r.p.m durante 15 min, finalmente se recuperaron 50 μ L del sobrenadante y se inyectaron en el HPLC. Con esto se buscó determinar que no se presentara en la fase móvil, el agente precipitante, ni la matriz biológica ninguna señal que pudiera interferir con los tiempos de retención en los cuales aparecen los picos de los analitos de interés (naproxeno y diclofenaco).

7.6.3.1.2.2. *Linealidad*

Se define como linealidad a la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra. Para determinar la linealidad, se realizaron 6 curvas de calibración para el naproxeno con un intervalo de concentraciones de 0.3 a 15 μ g/mL, incluyendo las concentraciones 1, 3, 5 y 10 μ g/mL, cada curva de calibración incluyó además una muestra de blanco de matriz (muestra procesada sin la adición del analito y del EI) y muestra cero (muestra procesada con la adición del EI). Se graficó en el eje de las abscisas la concentración del analito y en las ordenadas la relación de área bajo la curva (ABC) (ABC del analito entre ABC del EI). Se calculó el promedio de las 6 curvas, se realizó un ajuste de la curva de calibración con una regresión lineal y se determinaron los siguientes parámetros: coeficiente de determinación (r^2), intercepto (b) y pendiente (m). Se consideró como criterio de aceptación un coeficiente de determinación igual o mayor a 0.98. Además, se calculó el coeficiente de variación (CV) para cada uno de los puntos de la curva. Se consideró como criterio de aceptación un $CV \leq$ al 20% para el límite inferior de cuantificación de la curva de calibración (concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud) y un $CV \leq$ 15% para el resto de los puntos de la curva.

7.6.3.1.2.3. Precisión

Se define precisión al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes proporciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

7.6.3.1.2.3.1. Precisión intradía (Repetibilidad)

Se define repetibilidad a la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. Se realizaron tres curvas estándar el mismo día y se calculó el promedio. Además se analizaron por quintuplicado las siguientes muestras control: muestra control baja (MCB, muestra de la matriz biológica adicionada de analito en concentración equivalente hasta 3 veces el límite inferior de cuantificación), muestra control media (MCM, muestra de la matriz biológica adicionada de analito en concentración intermedia entre muestra control baja y muestra control alta) y muestra control alta (MCA, muestra de la matriz biológica adicionada de analito en concentración entre el 75-85% de la concentración del límite superior de cuantificación). Se calculó la concentración obtenida para cada muestra control interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración, así como el promedio, el error estándar y el coeficiente de variación. Se consideró como criterio de aceptación un $CV \leq$ al 20% para el límite inferior de cuantificación y un $CV \leq$ 15% para el resto de los puntos de la curva.

7.6.3.1.2.3.2. Precisión interdía (Reproducibilidad)

Se define reproducibilidad a la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos. Se realizaron seis curvas estándar en diferentes días y se calculó el promedio. Además, se analizaron mínimo por quintuplicado las siguientes muestras control: MCB, MCM y MCA. Se calculó la concentración obtenida para cada muestra control interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración, así como el promedio, el error estándar y el coeficiente de variación. Se consideró como criterio

de aceptación un CV \leq al 20% para el límite inferior de cuantificación y un CV \leq 15% para el resto de los puntos de la curva.

7.6.3.1.2.4. Exactitud

Se define exactitud como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Como concepto de exactitud se consideró el porcentaje de recuperación. El criterio de aceptación fue que el recobro contra el valor nominal estuviera entre un intervalo de 85-115%, excepto para el límite inferior de cuantificación donde el intervalo aceptado fue de 80-120%. Se obtuvo mediante el promedio de las concentraciones obtenidas en la curva de calibración de las determinaciones de los datos de repetibilidad y reproducibilidad.

7.6.3.2. Análisis farmacocinético

7.6.3.2.1. Toma de muestra

Para llevar a cabo este procedimiento se emplearon ratas hembra Wistar con un peso de entre 180-200 g. Los animales de cada uno de los grupos experimentales se mantuvieron en ayuno durante 14 h con libre acceso a agua. Las ratas fueron anestesiadas con vapores de éter para insertarles en la arteria caudal una cánula epidural con reducción similar a una cánula P10, después de su recuperación se tomó una muestra sanguínea como control (tiempo 0) y se administró oralmente naproxeno (30 mg/kg, p.o.) o la DE₃₀ de la combinación en proporción 1:1 y 1:3, respecto de los grupos de la combinación, el DHA (48.81 mg/kg, p.o. ó 146.46 mg/Kg, p.o.) fue administrado 13 h antes de la administración del naproxeno. Se tomaron muestras de 200 μ L de sangre total a los 5, 10, 15, 30 y 45 min y a las 1, 2, 4, 6, 8 y 10 h. Las muestras se colectaron en tubos que contenían 20 μ L de heparina al 0.2% como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 12, 000 r.p.m durante 10 minutos, se separaron 100 μ L de plasma y se colocaron en otro tubo, se almacenaron a -80 °C hasta ser procesadas.

7.7. Análisis de datos

7.7.1. Curvas dosis-respuesta y cálculo de la dosis efectiva 30 (DE₃₀)

Se graficó el promedio del número de sacudidas/min en función del tiempo de cada grupo después de la administración de formalina con solución salina, aceite de olivo, DHA, naproxeno o la combinación en sus diferentes proporciones (1:1, 1:3 y 3:1) o dosis única (8.43 ó 33.71 mg/kg de peso). Debido a que el naproxeno solo genera efecto antinociceptivo en la fase 2 de la prueba de la formalina, solo se consideraron el número de sacudidas totales registradas en esta fase. A partir de estos gráficos se calculó el ABC y se transformó al porcentaje de efecto antinociceptivo utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Antinocicepción} = \frac{ABC_{vehículo} - ABC_{Postcompuesto}}{ABC_{vehículo}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Posteriormente se construyeron las curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo y mediante regresión lineal se obtuvieron los valores de las DE₃₀ del DHA y naproxeno administrados de manera individual o en combinación.

7.7.2. Análisis isobolográfico

Cuando dos fármacos son administrados conjuntamente existe la necesidad de caracterizar el efecto de la combinación en relación con el efecto de cada fármaco de manera individual. Un método que permite evaluar este tipo de interacción entre dos fármacos es el análisis isobolográfico. Este método está basado en comparar las dosis determinadas que son equiefectivas.

A partir de las curvas dosis-respuesta de los agentes individuales (DHA y naproxeno), se obtuvieron sus respectivas DE₃₀. Posteriormente se obtuvo una curva dosis-respuesta después de la coadministración de DHA y naproxeno en una

proporción de dosis constante basada en los valores de la DE_{30} de los agentes individuales. A partir de la curva dosis-respuesta de la combinación de los agentes (proporción 1:1, 1:3 y 3:1), se calculó el valor de la DE_{30} , a este valor se le conoce como la DE_{30} experimental. Además, se calculó la DE_{30} teórica de la combinación para cada una de las proporciones ensayadas (1:1, 1:3 y 3:1) de acuerdo con el método reportado por Tallarida (2002) (Ecuaciones 5-7).

$$DE_{30 \text{ teórica } 1:1} = 0.5(DE_{30 \text{ DHA}}) + (1 - 0.5)(DE_{30 \text{ naproxeno}}) \quad \text{Ecuación 5}$$

$$DE_{30 \text{ teórica } 1:3} = 0.25(DE_{30 \text{ DHA}}) + (1 - 0.25)(DE_{30 \text{ naproxeno}}) \quad \text{Ecuación 6}$$

$$DE_{30 \text{ teórica } 3:1} = 0.75(DE_{30 \text{ DHA}}) + (1 - 0.75)(DE_{30 \text{ naproxeno}}) \quad \text{Ecuación 7}$$

Una vez obtenidos los valores teórico y experimental de la DE_{30} se realizó una comparación estadística entre estos. Dicho análisis se basa en la prueba t de Student, este análisis está modificado para aplicarse al análisis isobolográfico (Tallarida, 2000). Los valores de $DE_{30 \text{ experimental}}$ menores que $DE_{30 \text{ teórica}}$ fueron interpretados como una interacción *super-aditiva* o de *potenciación* cuando la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Para un valor de $DE_{30 \text{ experimental}}$ mayor que $DE_{30 \text{ teórica}}$ la combinación se interpretó como *sub-aditiva* o *antagonista*, y cuando no existió diferencia estadísticamente significativa entre los valores de $DE_{30 \text{ experimental}}$ y $DE_{30 \text{ teórica}}$ se interpretó como la ausencia de interacción, declarándose una combinación con relación *aditiva* o de *sumación* (Tallarida, 2006).

Una forma visual de representar el tipo de interacción entre dos fármacos mediante este análisis es el uso de los isobogramas. Estos se construyeron graficando el valor de DE_{30} del agente más potente en el eje de las ordenadas y del agente menos potente en el eje de las abscisas para obtener el área de aditividad.

La línea que conecta estos dos puntos se llama isobola o línea de aditividad y en esta línea están contenidas todas las posibles combinaciones de los dos fármacos que producen solamente un efecto de aditividad o sumación. Ahora bien, si la DE_{30} experimental cae por arriba de esta línea de aditividad, se habla de que se producirá un efecto de *sub-aditividad* o *antagonismo* al coadministrar los dos agentes. Pero si la DE_{30} experimental cae por debajo de esta línea, se dice que la combinación de los dos agentes se traducirá a un efecto de *super-aditividad* o *potenciación*.

Se realizó un análisis fraccional para obtener un valor que describa la magnitud de la interacción (γ =índice de interacción) para cada combinación utilizando los valores de las DE_{30} de los agentes individuales y de la combinación de acuerdo a la relación $a/A + b/B$, donde A y B son los valores de las DE_{30} cuando cada agente actúa individualmente y a y b son las cantidades con las que contribuye cada agente en la combinación, este valor mide cuanto difiere el valor de la DE_{30} experimental de DE_{30} teórica de cada combinación (Tallarida, 2000). Cuando $a/A + b/B$ fue estadísticamente significativo > 1 se interpretó como una interacción de la combinación *sub-aditiva* y cuando $a/A + b/B$ sea < 1 se consideró como una relación *super-aditiva*. Finalmente, cuando $a/A + b/B$ no fue estadísticamente diferente de 1 se interpretó el efecto como ausencia de interacción y la relación se definió como aditiva (Ecuaciones 8 y 9) (Tallarida, 2000).

$$\gamma = \frac{a}{A} + \frac{b}{B} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\gamma = \frac{\text{Dosis del DHA}_{\text{en la combinación}}}{DE_{30DHA}} + \frac{\text{Dosis de la indometacina}_{\text{en la combinación}}}{DE_{30Naproxeno}} \quad \text{Ecuación 9}$$

7.7.3. Perfil y parámetros farmacocinético

Con las concentraciones de naproxeno determinadas por HPLC se construyeron cursos temporales de la administración oral del naproxeno y la combinación DHA-naproxeno. Utilizando la extensión desarrollada para Excel PKSolver (Zhang et al., 2010b) se realizó un análisis no compartamental y se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos de interés: área bajo la curva (ABC), concentración plasmática máxima (C_{max}), el tiempo necesario para alcanzar C_{max} (T_{max}) y vida media de eliminación ($t_{1/2}$).

7.7.4. Análisis estadístico

Los datos se analizan por un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple Newman-Keuls; en cuanto a los parámetros farmacocinéticos obtenidos de la administración de naproxeno y la combinación se realizó el análisis utilizando la prueba t con el programa GraphPad Prisma 5. Se consideran valores estadísticamente significativos aquellos que presenten una $p \leq 0.05$.

8. Resultados

8.1. Efecto antinociceptivo del naproxeno y DHA

La administración de formalina al 1% en la pata trasera derecha de la rata indujo un comportamiento bifásico en la conducta de sacudidas de la pata estimulada. La primera fase inició inmediatamente después de la administración del estímulo nocivo y disminuyó gradualmente a los 10 min aproximadamente. Después, la segunda fase comenzó a los 15 min post-inyección y duró aproximadamente 45 min. La administración oral de naproxeno (10, 30, 100 y 300 mg/Kg) y DHA (56.23, 100, 177.83 y 316.23 mg/Kg) redujeron esta conducta en comparación con el grupo control (vehículo). Este mismo se observó tras la administración local de naproxeno (316.23, 562.23, 1000 y 1778.28 μ g/pata ipsilateral, así como con 1778.28 μ g/pata contralateral) y DHA (178, 316.23, 562.23 y 1000 μ g/pata ipsilateral, así como 1000 μ g/pata contralateral).

A partir del número de sacudidas de la pata de la rata y utilizando la ecuación 4 descrita en la sección de materiales y métodos, se realizó el cálculo del porcentaje de antinocicepción que produjeron el naproxeno y el DHA en comparación con su grupo control (vehículo). En ambos agentes se observó un incremento en la respuesta antinociceptiva conforme se aumentó la dosis, y el mayor porcentaje de antinocicepción observado fue de 49.05 ± 6.04 y 38.28 ± 7.48 para naproxeno y DHA respectivamente cuando estos fueron administrados por vía oral (Fig. 15). En cuanto a la administración local, el mayor porcentaje de antinocicepción alcanzado fue de 39.53 ± 12.04 para naproxeno y 52.40 ± 6.32 para DHA (Fig. 16). Dados estos resultados experimentales, se calcularon las respectivas DE_{30} para cada uno de estos agentes. Por lo tanto, el nivel de efecto a evaluar en las combinaciones por ambas vías de administración fue del 30 % de efecto antinociceptivo.

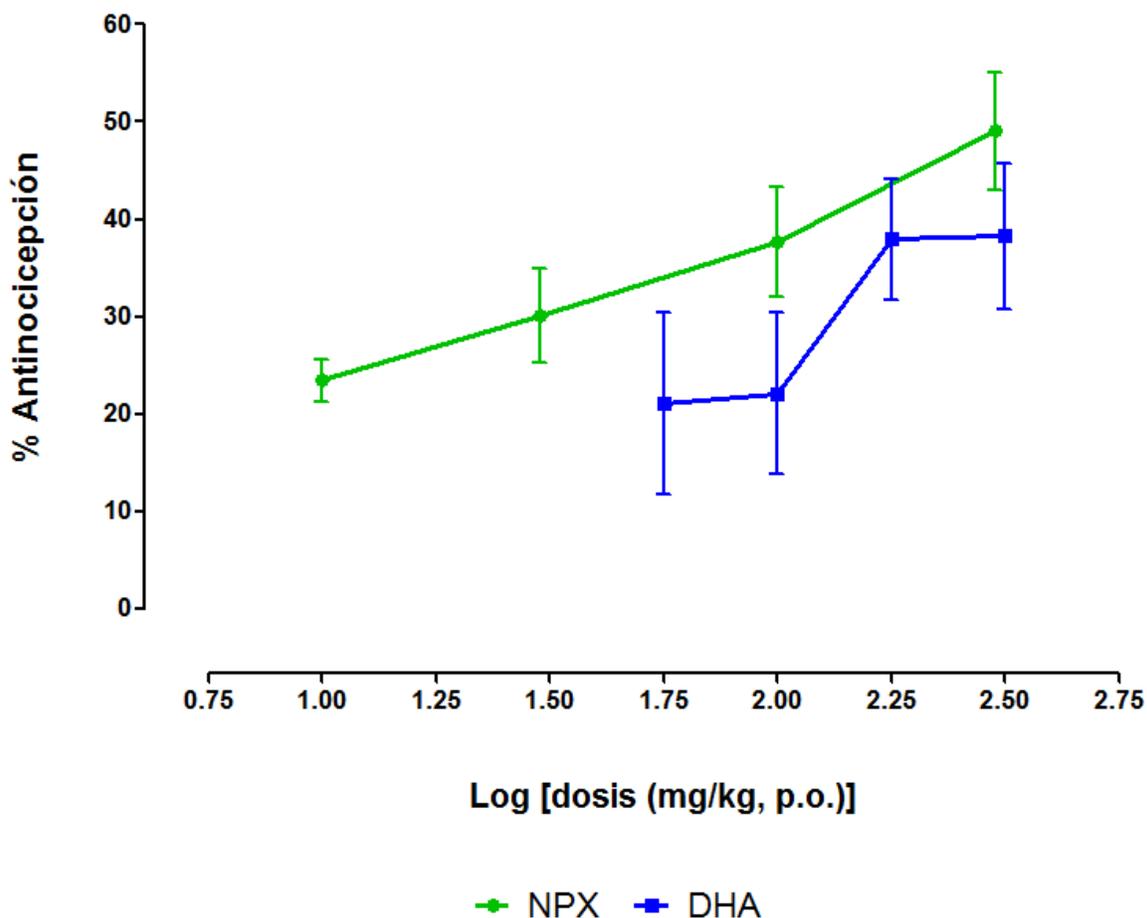


Figura 15. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo en la administración oral del naproxeno y del DHA en la segunda fase de la prueba de la formalina. En verde la curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del naproxeno (log de 10, 30, 100 y 300 mg/Kg, p.o.); en azul la curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de DHA (log de 56.23, 100, 177.83 y 316.23 mg/Kg, p.o.) en la prueba de la formalina. Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de antinocicepción de cada dosis. Cada punto representa la media \pm el error estándar (n= 5-9). *P \leq 0.05 vs vehículo (NaCl 0.9% para naproxeno y aceite de olivo para el DHA).

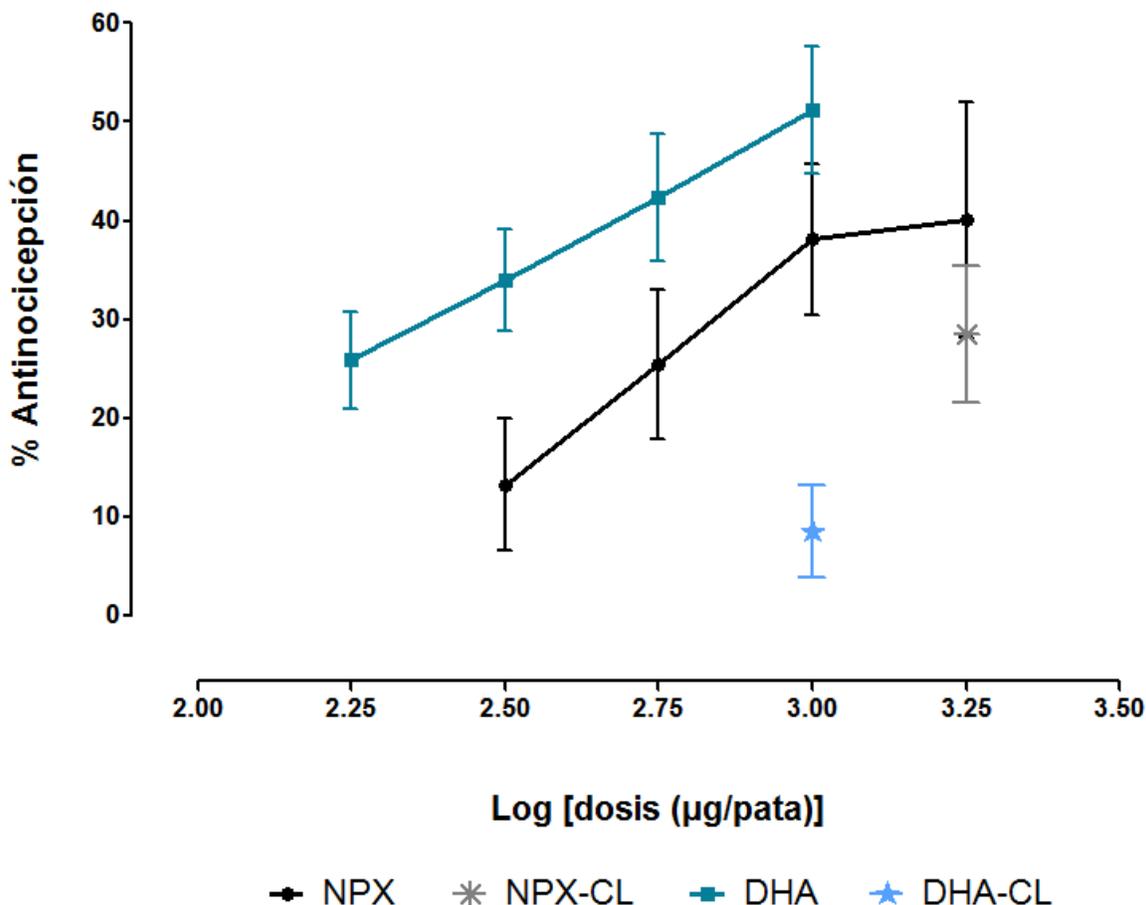


Figura 16. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración local de naproxeno y DHA en la segunda fase de la prueba de la formalina. En negro la curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del naproxeno (NPX, log de 316, 562, 1000 y 1778 µg/pata ipsilateral; y NPX-CL 1778 µg/pata contralateral); en azul la curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de DHA (DHA, 178, 316.23, 562.23 y 1000 µg/pata ipsilateral; y DHA-CL, 1000µg/pata contralateral) en la prueba de la formalina. Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de antinocicepción de cada dosis. Cada punto representa la media ± el error estándar (n= 5-9). *P ≤ 0.05 vs vehículo (NaCl 0.9% para naproxeno y aceite de olivo para el DHA).

8.2. Efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno

Una vez obtenidas las curvas dosis respuesta de la administración individual del naproxeno y del DHA se calcularon los valores de las DE_{30} para cada uno de ellos con sus respectivas medidas de variabilidad (SE). En la administración oral se obtuvo que el valor de la DE_{30} del DHA fue de 134.83 ± 27.72 mg/Kg, p.o. y la DE_{30} del naproxeno fue de 27.67 ± 3.80 mg/Kg, p.o.; mientras que en la administración local las DE_{30} fueron de 785.73 ± 97.26 μ g/pata y 238.46 ± 2.92 μ g/pata para naproxeno y DHA respectivamente (Tabla 2). Con estos datos y utilizando las ecuaciones 5-7 descritas en la sección de materiales y métodos se realizó el cálculo de las dosis equiefectivas necesarias para realizar las curvas dosis respuesta de la combinación DHA-naproxeno para las diferentes proporciones ensayadas para ambas vías de administración (Cuadro 1 y 2).

La administración oral disminuyó significativamente el número de sacudidas de la pata estimulada únicamente en la proporción 1:3, mientras que en la administración local se ha observado este mismo comportamiento en las proporciones 1:1 y 1:3. Por otra parte en la proporción 1:1 de la administración oral de la combinación no se observó una disminución estadísticamente significativa respecto al vehículo y en la proporción 3:1 no se observó disminución en la sacudida de la pata estimulada lo cual pone de manifiesto una baja o incluso nula respuesta antinociceptiva. Dado que los agentes administrados de manera individual demostraron tener eficacia, se realizó la curva dosis respuesta del naproxeno en presencia de una dosis única de DHA (8.43 ó 33.71 mg/Kg de peso), con el fin de explorar si de alguna manera el DHA podría estar interfiriendo con el efecto del naproxeno; se observó una disminución en el número de sacudidas de la pata estimulada (antinocicepción), sin embargo esta disminución no fue comparable con la inducida con la administración individual del naproxeno, por lo tanto la administración de DHA disminuyó el efecto antinociceptivo del naproxeno.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

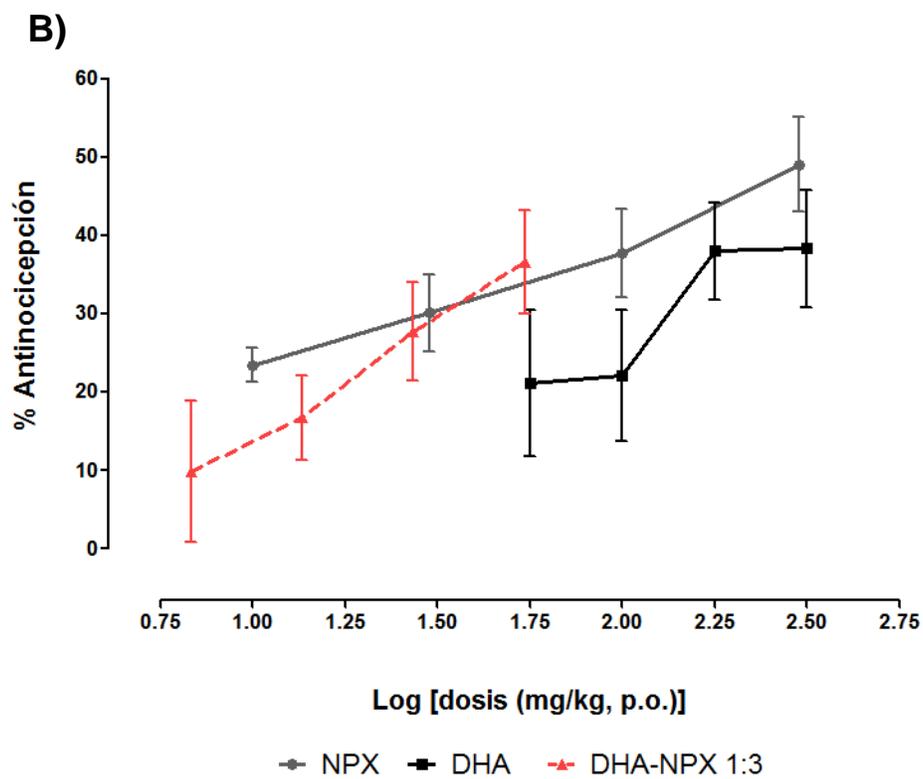
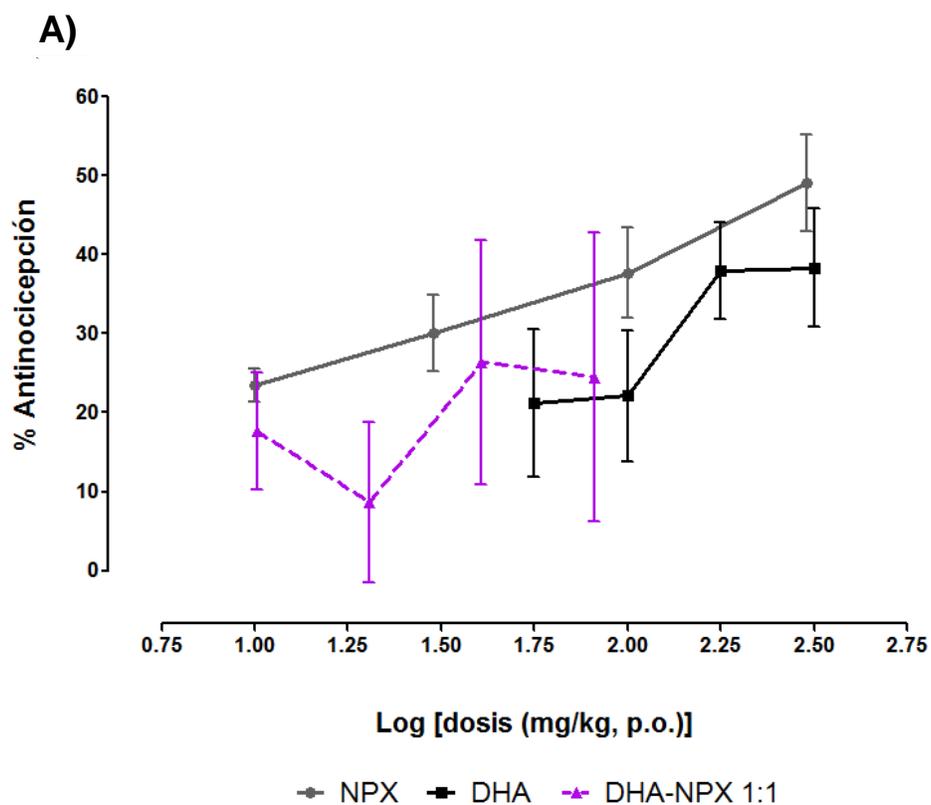
Tabla 2.

DE₃₀ del naproxeno y DHA expresada en mg/kg de peso para la administración oral y en µg/pata para la administración local.

	DE₃₀	DE₃₀
	(mg/Kg, p.o.)	(µg/pata)
Agente		
Naproxeno	27.67 ± 3.80	785.73 ± 97.26
DHA	134.83 ± 27.72	238.46 ± 2.92

Las curvas dosis-respuesta de la administración oral en proporción 1:3 (Fig. 17 B) y administración local 1:1 y 1:3 (Fig. 18 A y B), mostraron efecto antinociceptivo con un incremento en el porcentaje de antinocicepción conforme aumentó la dosis; por otra parte en la proporción 1:1 (Fig. 17 A) de la administración oral aunque se observó efecto antinociceptivo, este no fue siquiera del 30% y no se estableció una diferencia estadísticamente significativa respecto a su grupo control (vehículo) mientras que en la proporción 3:1 (oral y local) no se observó efecto antinociceptivo (Fig. 17 C y Fig. 18 C). Finalmente en la curva dosis respuesta del naproxeno en presencia de una única dosis de DHA, se estableció que la coadministración de estos compuestos fue capaz de producir efecto antinociceptivo con diferencia estadística respecto a su grupo control, sin embargo en la dosis más alta empleada (300 mg/Kg, p.o.) el porcentaje de antinocicepción observado fue de 23.73±6.02, siendo menor respecto al porcentaje de antinocicepción inducido por la administración de esta misma dosis de naproxeno de manera individual (49.04±6.04)(Fig. 19.)

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.



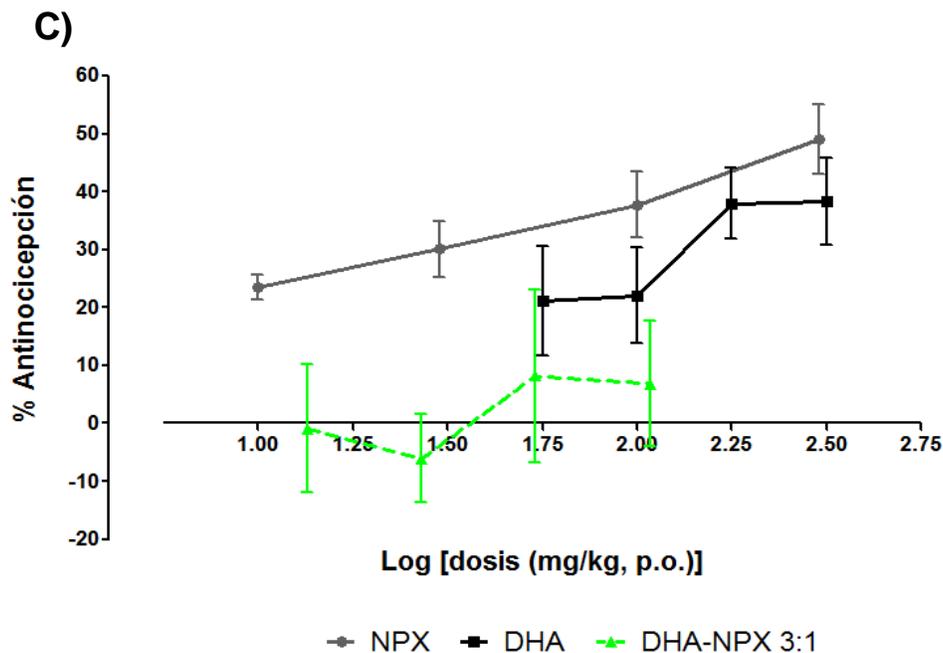
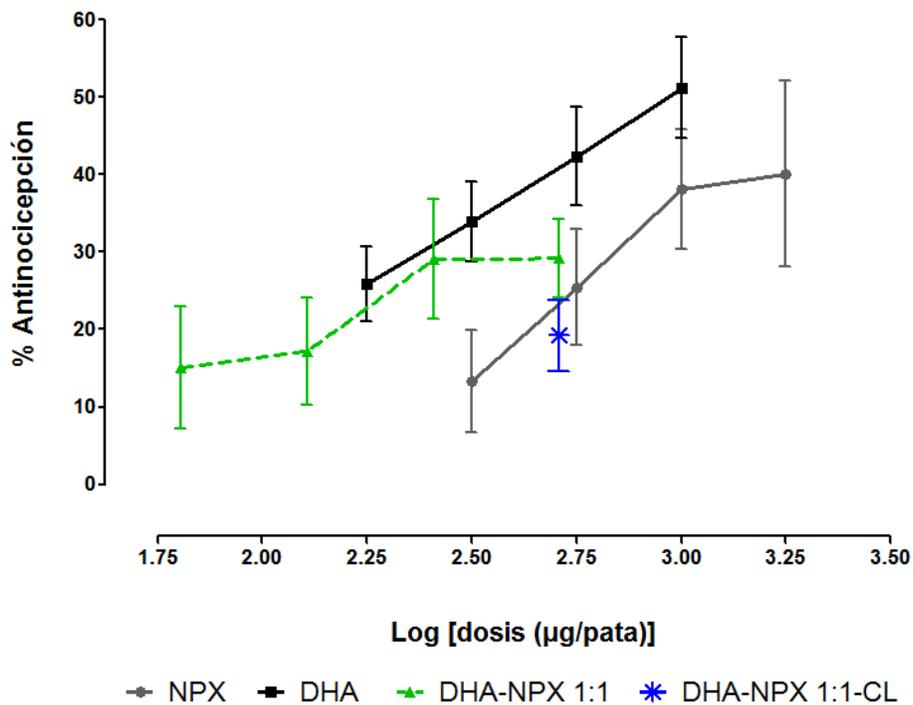


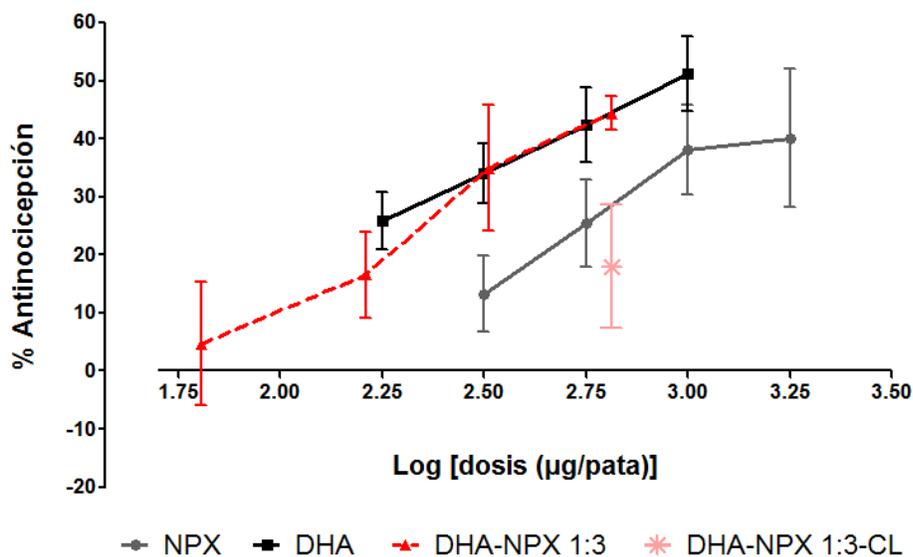
Figura 17. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración oral de la combinación DHA- naproxeno en la segunda fase de la prueba de la formalina. A) DHA-naproxeno proporción 1:1 (log de 10.15, 20.31, 40.61 y 81.23 mg/Kg, p.o.); B) DHA-naproxeno proporción 1:3 (log de 6.80, 13.611, 27.21 y 54.42 mg/Kg, p.o.); C) DHA-naproxeno proporción 3:1 (log de 13.50, 27.01, 54.01, 108.03 mg/Kg, p.o.). Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de antinocicepción de cada dosis. Cada punto representa la media \pm el error estándar (n= 5-12). *P \leq 0.05 vs vehículo (NaCl 0.9% para naproxeno y aceite de olivo para el DHA).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

A)



B)



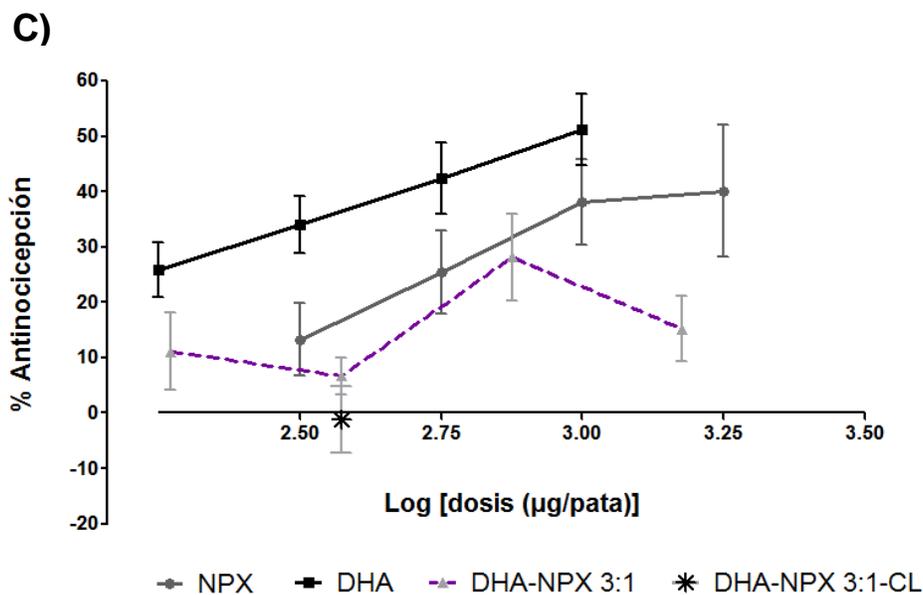


Figura 18. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración local de la combinación DHA-naproxeno en la segunda fase de prueba de la formalina. A) DHA-naproxeno 1:1 (64.01, 128.05, 256.05, 512.10 µg/pata ipsilateral y 512.10 µg/pata contralateral); B) DHA-naproxeno 1:3 (81.12, 162.23, 324.46 y 648.92 µg/pata ipsilateral y 648.92 µg/pata contralateral); C) DHA-naproxeno 3:1 (187.64, 375.28, 750.56 y 1501.11 µg/pata). Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de antinocicepción de cada dosis. Cada punto representa la media ± el error estándar (n= 5-8). *P ≤ 0.05 vs vehículo (NaCl 0.9% para naproxeno y aceite de olivo para el DHA).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

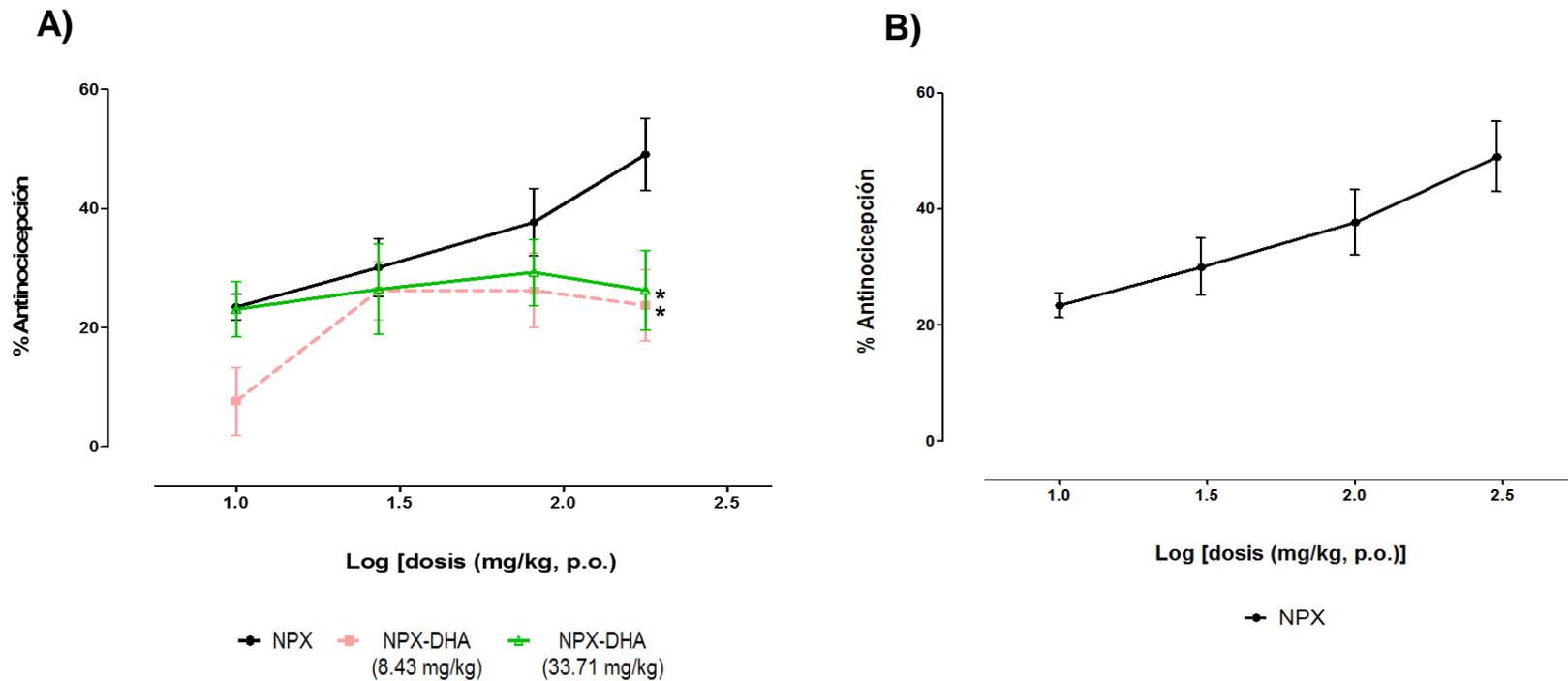


Figura 19. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la administración oral de la combinación de diferentes dosis de naproxeno y una única dosis de DHA en la segunda fase de prueba de la formalina. A) DHA (8.43 mg/Kg, p.o. ó 33.71 mg/Kg) y Naproxeno (10, 30, 100 y 300 mg/Kg, p.o.). B) Naproxeno (10, 30, 100 y 300 mg/Kg, p.o.). Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de antinocicepción de cada dosis. Cada punto representa la media \pm el error estándar (n= 9-12). *P \leq 0.05 vs naproxeno (300 mg/Kg, p.o.).

A partir de las curvas dosis-respuesta de las diferentes combinaciones de DHA-naproxeno administradas por vía oral y local se calculó el valor de la DE_{30} Experimental, los valores obtenidos en el caso de la administración oral fueron los siguientes: 201.18 ± 383.02 mg/Kg, 33.44 ± 1.90 mg/Kg y 6724.99 ± 23758.48 mg/Kg para la proporción 1:1, 1:3 y 3:1 respectivamente; mientras que en la administración local de la combinación el valor de la DE_{30} Experimental fue de 465.41 ± 163.54 µg/pata 292.56 ± 20.10 µg/pata y 10775.46 ± 44171.71 µg/pata para las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1 respectivamente. Al realizar la comparación de estas DE_{30} Experimentales con las DE_{30} Teóricas calculadas con las ecuaciones 5-7 descritas en la sección de materiales y métodos, el índice de interacción indicó que en ambas vías de administración únicamente en la proporción 1:3 ocurre una interacción de tipo super-aditiva, mientras que en la administración oral de la proporción 1:1 y administración oral y local de la proporción 3:1 ocurre una interacción de tipo antagónica; por otra parte, en la proporción 1:1 de la administración local ocurre una interacción de tipo sumatoria o aditiva (Cuadros 3 y 4). Visualmente podemos identificar los diferentes tipos de interacción en el isoblograma: en el caso de la proporción 1:1 administrada por vía local se caracterizó una interacción de tipo aditiva y encontramos nuestro punto experimental muy cerca de la línea de aditividad o isobola (Fig. 21); en cuanto a la proporción 1:3 (Fig. 20 y Fig. 21) en ambas vías de administración caracterizamos sinergismo o super-aditividad al ubicar nuestro punto experimental por debajo de la isobola.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Cuadro 3.

DE₃₀ Teórica, DE₃₀ Experimental e índice de interacción (γ) de la administración oral de la combinación DHA-naproxeno proporción 1:1, 1:3 y 3:1.

DHA-naproxeno (mg/Kg, p.o.)			
	DE₃₀ Teórica	DE₃₀ Experimental	Magnitud de la interacción
1:1	81.23 ± 13.99	201.18 ± 383.02	2.56
Agente			
DHA	67.42	166.97	
Naproxeno	13.81	34.21	
1:3	54.42 ± 7.49	33.44 ± 1.90	0.61*
Agente			
DHA	33.71	20.71	
Naproxeno	20.72	12.73	
3:1	108.03 ± 20.81	6724.99 ± 23758.48	62.25
Agentes			
DHA	101.13	6295.13	
Naproxeno	6.91	429.86	

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Cuadro 4.

DE₃₀ Teórica, DE₃₀ Experimental e índice de interacción (γ) de la administración local de la combinación DHA-naproxeno proporción 1:1, 1:3 y 3:1.

DHA-naproxeno ($\mu\text{g/pata}$)			
	DE₃₀ Teórica	DE₃₀ Experimental	Magnitud de la interacción
1:1	512.09 \pm 48.65	465.41 \pm 163.54	0.91
Agente			
DHA	119.23	108.36	
Naproxeno	392.87	357.05	
1:3	648.91 \pm 72.95	292.56 \pm 20.08	0.45*
Agente			
DHA	59.61	26.88	
Naproxeno	589.30	265.68	
3:1	375.28 \pm 24.41	10775.46 \pm 44171.81	28.71
Agentes			
DHA	178.84	5135.20	
Naproxeno	196.43	5640.26	

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

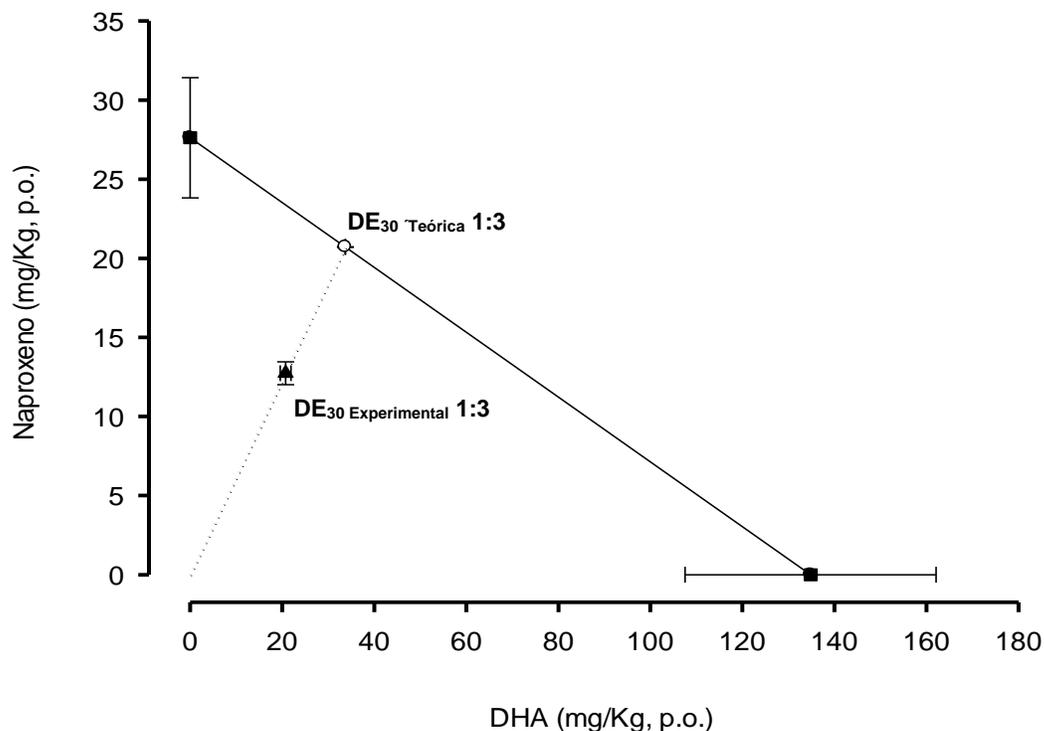


Figura 20. Isoblograma de la interacción de la administración oral de DHA-naproxeno en el efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina. Los valores de DE₃₀ para DHA y naproxeno con sus respectivos errores estándares después de la administración individual son graficados en los ejes X-Y, respectivamente. La línea recta que conecta las DE₃₀ de los fármacos, contiene todas las posibles combinaciones entre estos dos agentes que solamente producen un efecto de suma (isobola). La DE₃₀ Experimental de la combinación, se ubica por debajo de la isobola, indicando sinergismo.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

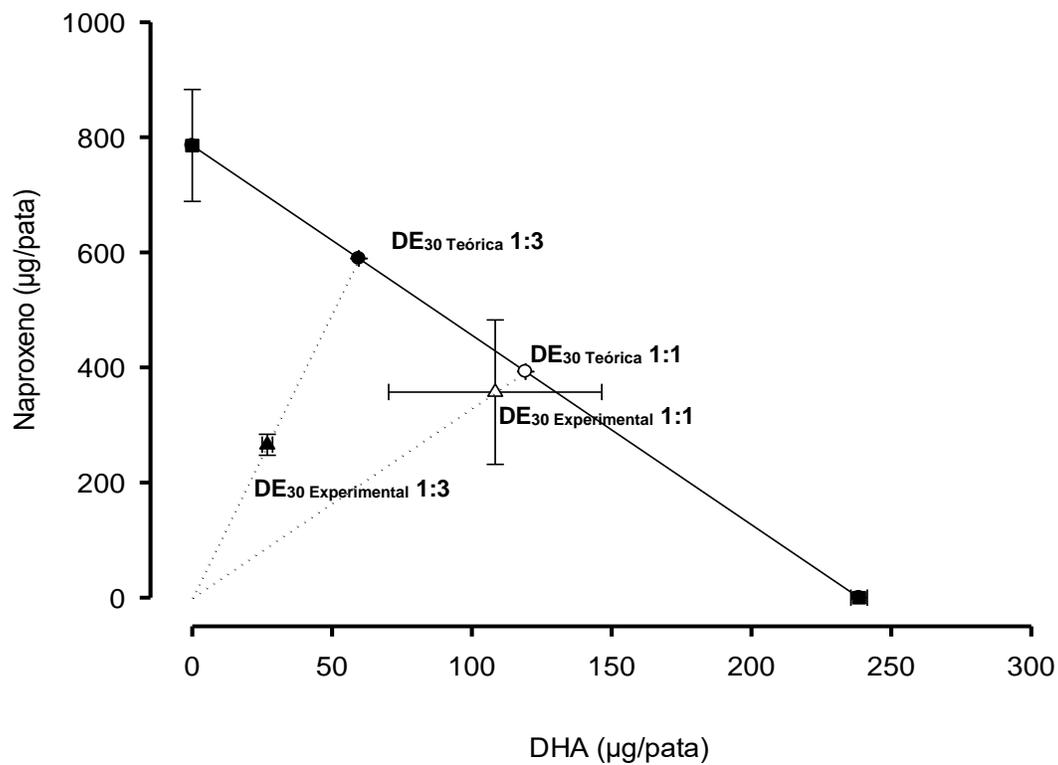


Figura 21. Isobolograma de la interacción de la administración local de DHA-naproxeno en el efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina. Los valores de DE₃₀ para DHA y naproxeno con sus respectivos errores estándares después de la administración individual son graficados en los ejes X-Y, respectivamente. La línea recta que conecta las DE₃₀ de los fármacos, contiene todas las posibles combinaciones entre estos dos agentes que solamente producen un efecto de sumación (isobola). La DE₃₀ Experimental de la combinación proporción 1:1, por debajo y muy cerca de la isobola indica sumación; la proporción 1:3, por debajo de la isobola indica sinergismo entre el DHA y el naproxeno.

8.3. Evaluación del daño gástrico inducido por la administración oral y local de diferentes dosis de naproxeno

Una hora después de finalizada la prueba de la formalina se evaluó el daño gástrico inducido por el naproxeno. La administración por vía oral provocó áreas de daño gástrico que incrementaron en número y extensión en el cuerpo del estómago conforme aumentó la dosis administrada, esto en comparación con su vehículo. Sorprendentemente la administración local también indujo daño gástrico en las dosis de 1000 y 1778 µg por pata, esto en comparación con su grupo control (NaCl 0.9%) (Fig. 22, Fig. 23 y tabla 3).

8.4. Evaluación de la seguridad gástrica de la administración oral y local del DHA

Una hora después de finalizada la prueba de la formalina, se realizó la evaluación del posible daño gástrico por parte de la administración del DHA por ambas vías de administración. En ambos casos se demostró la ausencia de daño en comparación con el grupo control (Fig. 24 y tabla 3).

8.5. Evaluación de la seguridad gástrica de la administración oral y local de la combinación DHA-naproxeno

Finalizada la prueba de la formalina y 3 h después de la administración del naproxeno se realizó la evaluación del posible daño gástrico inducido por la administración de la combinación de los agentes. En el caso de la administración oral, en las tres proporciones analizadas, se identificaron lesiones gástricas, pero estas fueron mínimas y no tuvieron relevancia estadística respecto a su grupo control (Fig. 25 A y tabla 3). Por otra parte, en la administración local no se identificaron lesiones en la mucosa gástrica, lo que sugiere que en la administración local la combinación DHA- naproxeno exhibe seguridad gástrica (Fig. 25 B).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

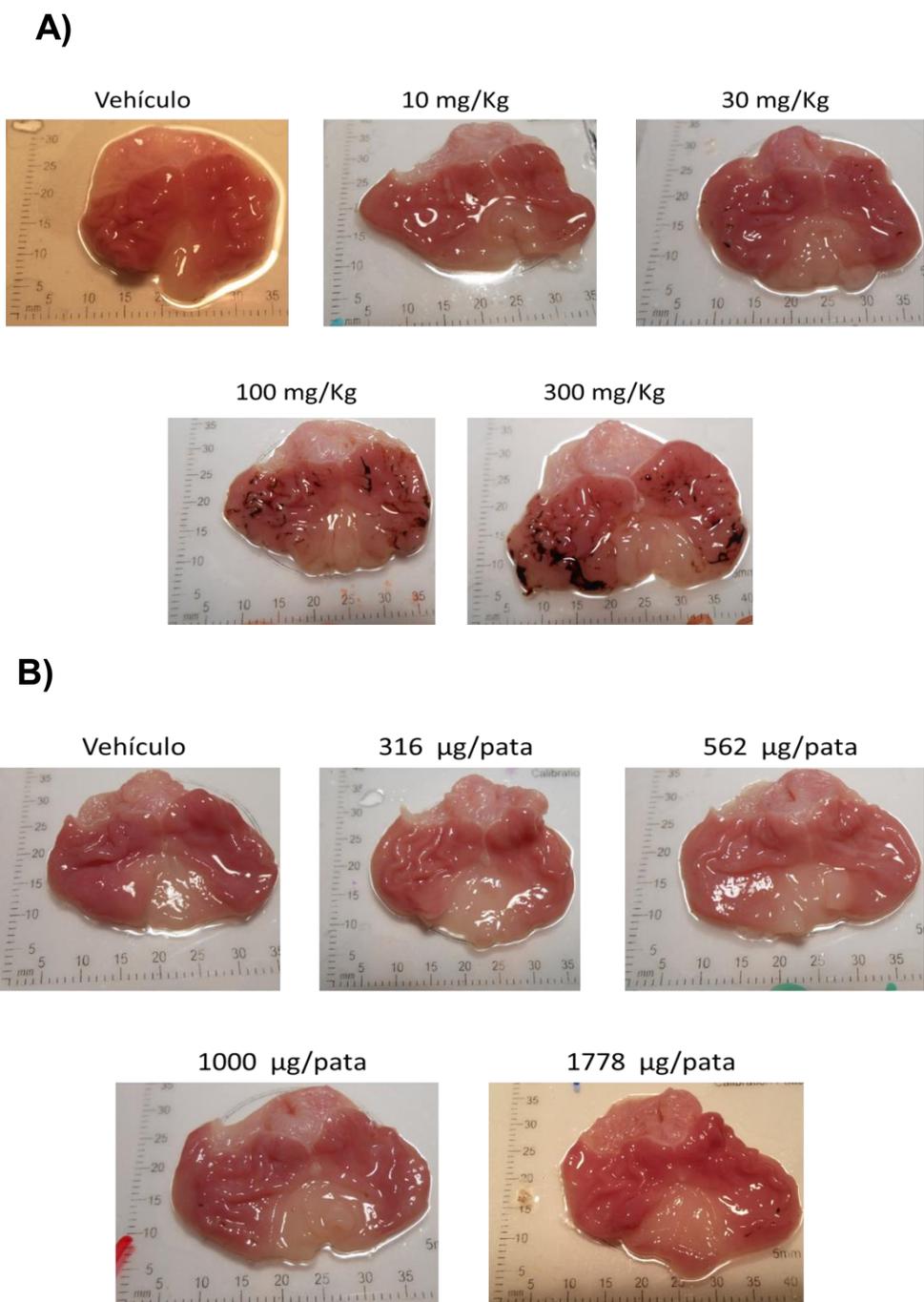


Figura 22. Imágenes representativas del daño gástrico inducido por naproxeno. A) Administración oral; B) administración local.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

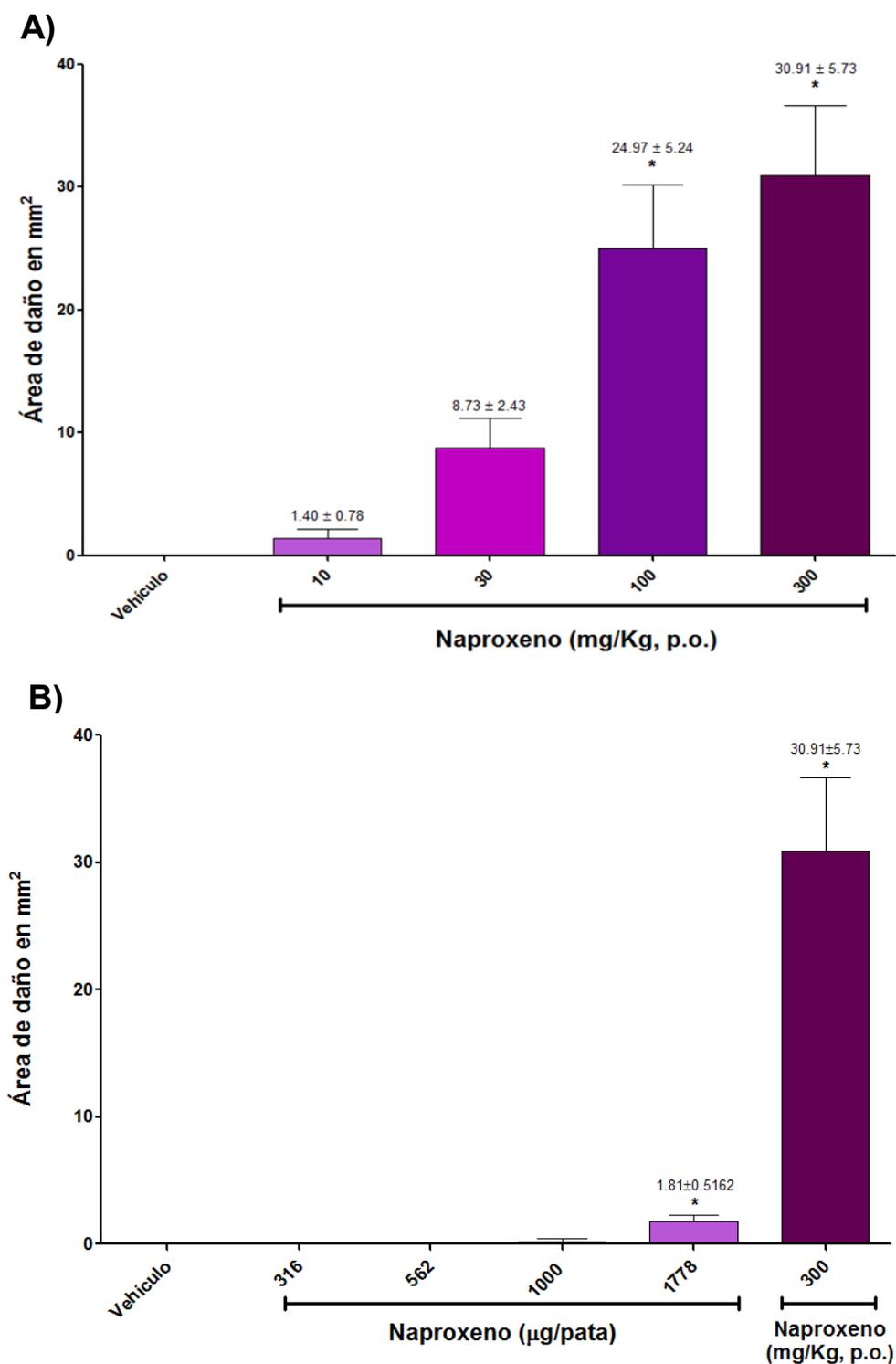


Figura 23. Cuantificación del daño gástrico inducido por la administración de diferentes dosis de naproxeno. A) Administración oral (10, 30, 100 y 300mg/Kg, p.o.); **B)** Administración local (316, 562, 1000 y 1778 µg/pata). Los datos son expresados como la media ± el error estándar (n= 5-11). *P ≤ 0.05 vs vehículo (NaCl 0.9%).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

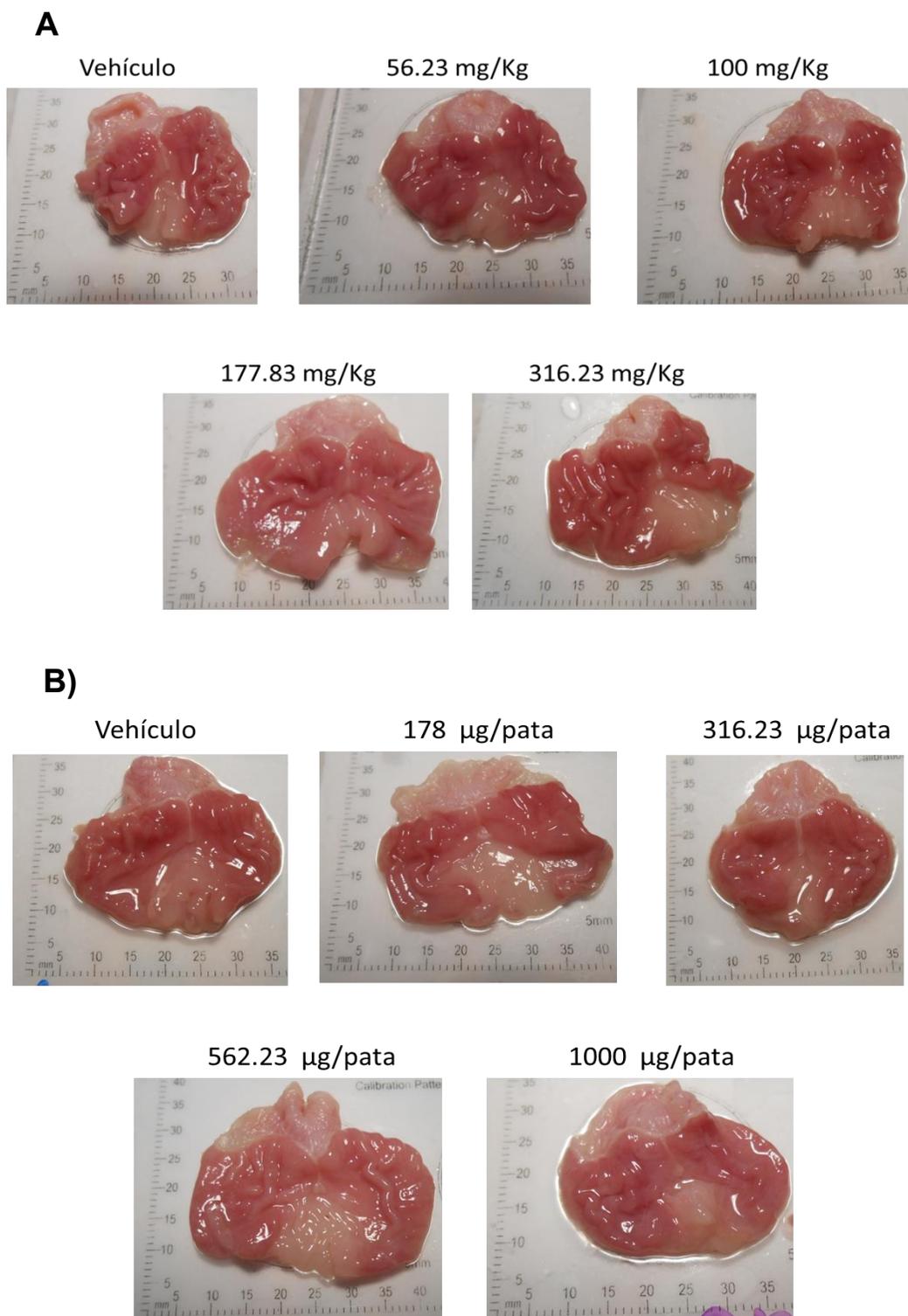


Figura 24. Imágenes representativas de los grupos tratados con DHA. A) Administración oral; B) administración local. En todos los grupos se aprecia ausencia de lesiones gástricas.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

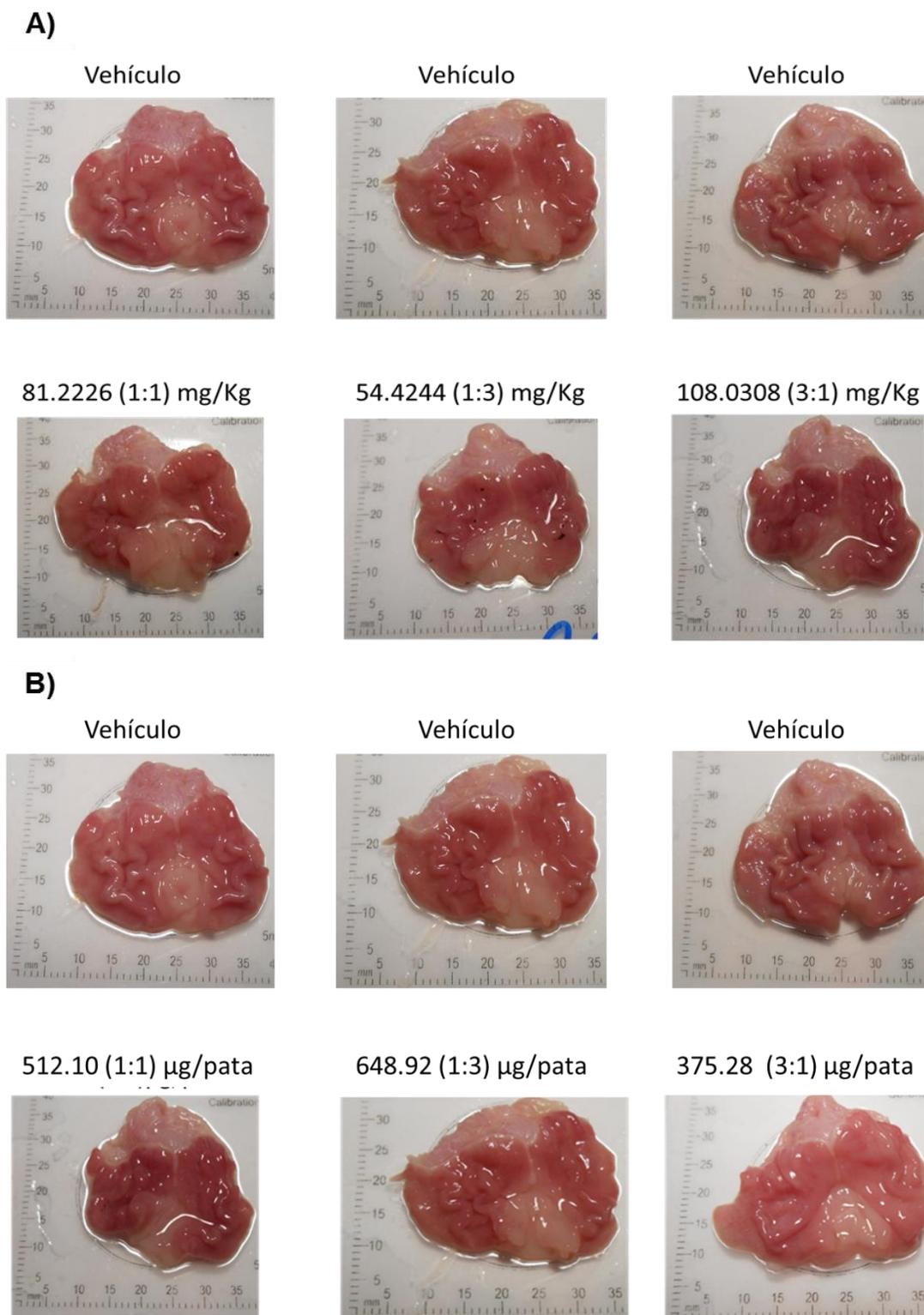


Figura 25. Imágenes representativas de los grupos tratados con la combinación DHA-naproxeno. A) Administración oral, se observan lesiones gástricas mínimas en todos los grupos tratados con la combinación; B) Administración local, en todos se aprecia ausencia de lesiones gástricas.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Tabla 3.
Lesiones gástricas (mm²) en la rata

Agente	Dosis (mg/Kg, p.o.)	Área de daño gástrico (mm ²)	
Naproxeno	10	1.4 ± 0.78	
	30	8.73 ± 2.43	
	100	24.97 ± 5.24*	
	300	30.91 ± 5.73*	
DHA	56.23	0	
	100	0	
	177.83	0	
	316.23	0	
Combinación DHA-naproxeno	1:1	10.16	0.08 ± 0.08
		20.31	0.24 ± 0.24
		40.62	0.48 ± 0.27
		81.23	0.30 ± 0.16
	1:3	6.80	0
		13.61	0.61 ± 0.54
		27.21	0.52 ± 0.44
		54.43	0.51 ± 0.38
	3:1	13.50	0
		27.01	0.22 ± 0.12
		54.01	0.20 ± 0.09
		108.04	0.20 ± 0.12
Agente	Dosis (µg/pata. i.pl.)	Área de daño gástrico (mm ²)	
Naproxeno	316.23	0	
	562.23	0	
	1000	0	
	1778.28	1.81 ± 0.52*	
	1778.28 contralateral	0	
DHA	178	0	
	316.23	0	
	562.23	0	
	1000	0	
	1000 contralateral	0	

**IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO
ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.**

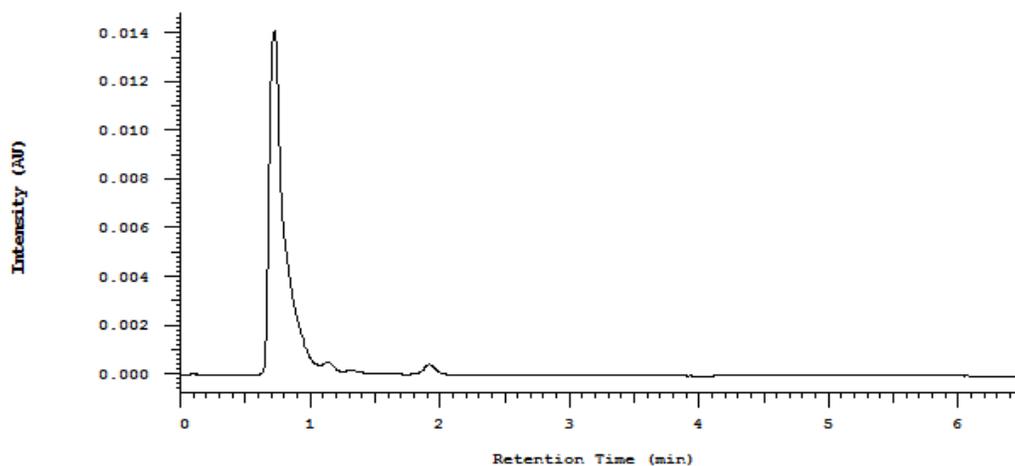
		64.01	0
	1:1	128.03	0
		256.05	0
		512.10	0
		512.10 contralateral	0
		81.11	0
	1:3	162.24	0
		324.46	0
Combinación		648.92	0
DHA-naproxeno		648.92 contralateral	
		187.64	0
	3:1	375.28	0
		750.56	0
		1501.11	0
		375.28 contralateral	0

8.6. Validación del método cromatográfico

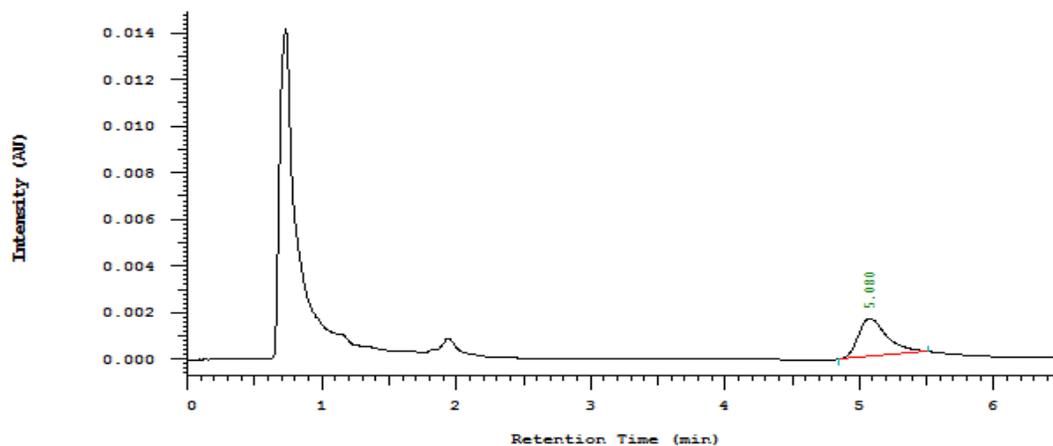
8.6.1. Selectividad.

En la figura 26 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar muestras de plasma de rata después de ser procesadas de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos. Se puede observar que ningún componente de la matriz biológica emite señal alguna que pueda interferir con los picos de los fármacos de interés (Fig. 26 A). El tiempo de retención para el naproxeno fue de 2.3 minutos, mientras que para el EI (diclofenaco) fue de aproximadamente 5 minutos.

A)



B)



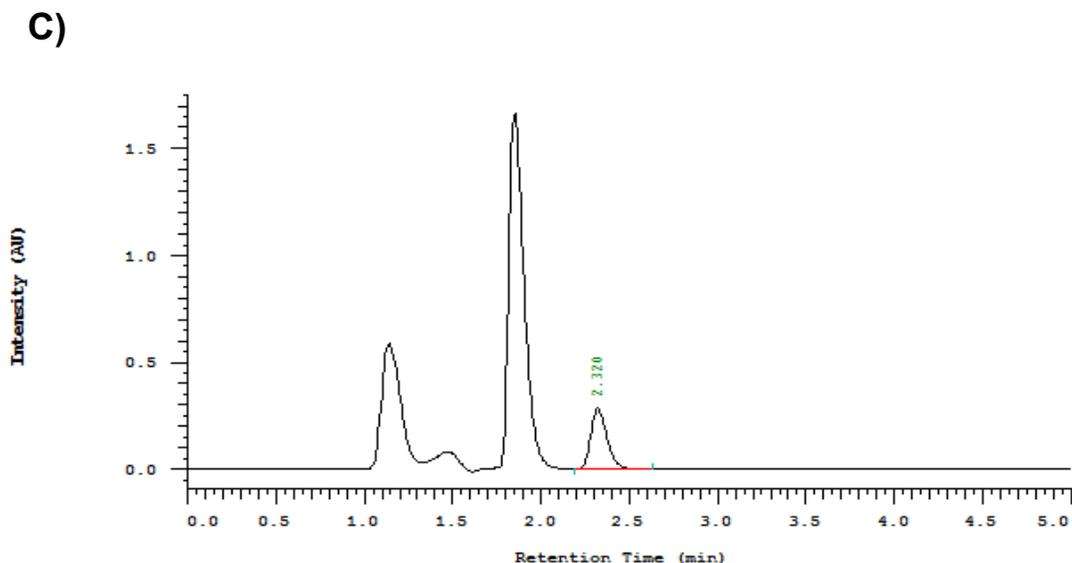


Figura 26. Cromatogramas representativos de muestras inyectadas después del procesamiento de extracción: A) Plasma de rata (muestra blanco de matriz), **B)** Plasma de rata adicionado con diclofenaco como estándar interno (muestra cero), **C)** Plasma de rata adicionado con naproxeno (muestra control).

8.6.2. Linealidad

En la figura 27 se muestra la curva de calibración promedio del naproxeno, donde podemos identificar que el método fue lineal en un intervalo de concentración de 0.3 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.99 y la ecuación que mejor describe la recta es: $y = 0.5337x - 0.3033$. Además, se determinó como límite inferior de cuantificación la concentración de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ y, como límite inferior de detección la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 4).

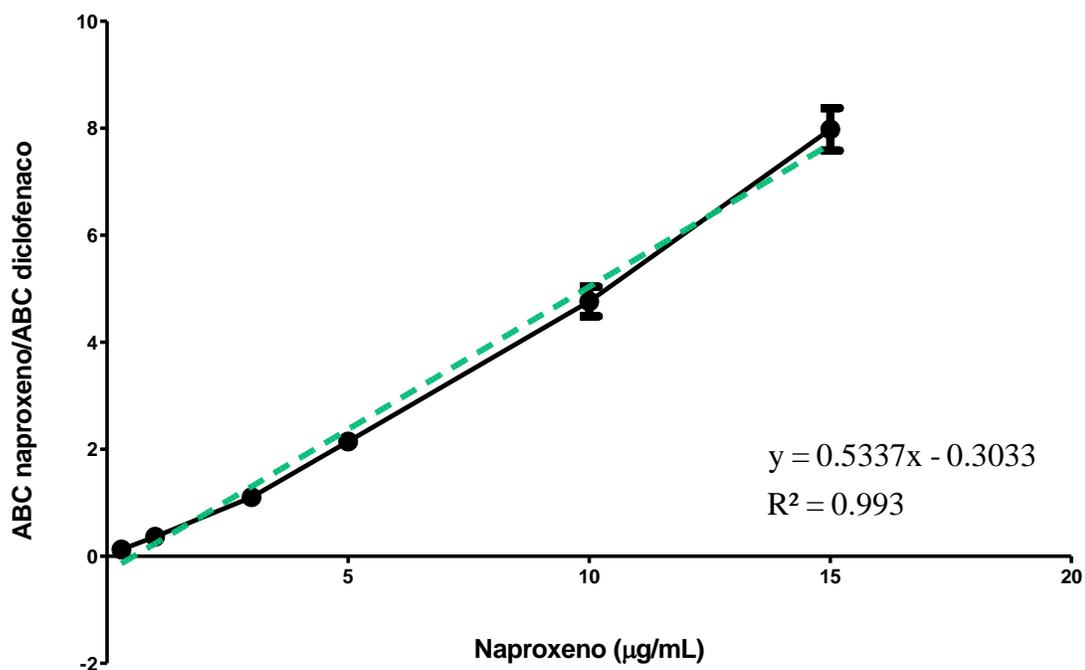


Figura 27. Curva de calibración del método cromatográfico para la determinación de naproxeno en plasma de rata. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n= 6).

Tabla 4.

Linealidad del método cromatográfico.

Intervalo de concentración	0.3 a 15 µg/mL (1,3,5 y 10 µg/mL)
Límite de detección	0.1 µg/mL
Límite inferior de cuantificación	0.3 µg/mL
Linealidad (ecuación de la recta)	$y = 0.5337x - 0.3033$
r²	0.993

8.6.3. Exactitud y precisión

En la tabla 5 se muestra la exactitud y precisión intradía e interdía. Se aprecia que los CV se encuentran dentro del 15% permitido por la norma para las concentraciones de las MCM y MCA, mientras que para la MCB se encuentra dentro del 20%. Así mismo los porcentajes de recuperación de las MCM y MCA fueron entre el 85-115% y de 80-120% para la MCB.

Tabla 5.

Exactitud y precisión. Los datos se muestran como la media \pm S.M.E

Concentración teórica	Concentración real	Exactitud (% de recuperación)	Repetibilidad (%CV)	Reproducibilidad (%CV)
0.9 $\mu\text{g/mL}$	0.96 \pm 0.06	100.6 \pm 6.68	15.42	3.58
6.5 $\mu\text{g/mL}$	5.63 \pm 0.19	86.54 \pm 2.96	12.14	10.27
12.5 $\mu\text{g/mL}$	11.66 \pm 0.36	93.32 \pm 2.87	11.65	9.23

8.7. Perfiles farmacocinéticos

En la figura 28 se presentan los perfiles farmacocinéticos de la administración oral de naproxeno y la combinación DHA-naproxeno (1:1 y 1:3). En esta imagen podemos apreciar que el DHA aumenta el ABC del naproxeno, siendo más evidente el aumento en el punto correspondiente al parámetro farmacocinético C_{max} . Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos calculados con PKSolver (Tabla 6) pudimos establecer que, aunque existe una tendencia al aumento en cada uno de estos parámetros, la diferencia no es estadísticamente significativa con respecto al naproxeno, a excepción de ABC_{0-t} .

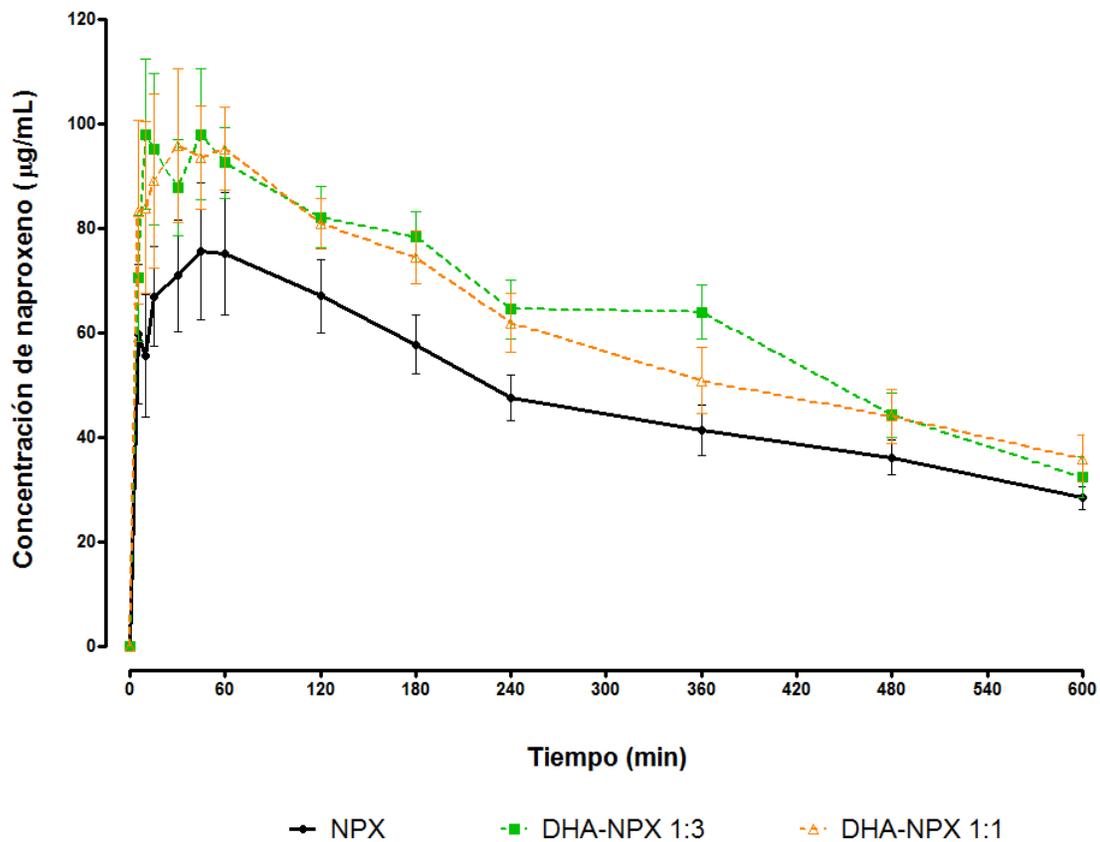


Figura 28. Perfiles farmacocinéticos. Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de naproxeno en rata después de su administración individual (30 mg/Kg, p.o.) o en combinación con DHA [1:3 (48.81 mg/Kg, p.o.) ó 1:1 (146.46 mg/Kg, p.o.)]. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n= 5-9). *P \leq 0.05 vs naproxeno.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Tabla 6.

Parámetros farmacocinéticos de la administración oral de naproxeno y la combinación DHA-naproxeno.

Tratamiento	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	Tmax (h)	ABC 0-t ($\mu\text{g h /mL}$)	ABC 0-inf ($\mu\text{g h /mL}$)	t $\frac{1}{2}$ (h)
Naproxeno (30 mg/kg p.o.)	96.18 \pm 13.52	0.83 \pm 0.24	483.33 \pm 43.03	780.43 \pm 48.03	7.56 \pm 1.91
Naproxeno-DHA 1:3 (30-48.80 mg/kg p.o.)	120.60 \pm 9.06	0.85 \pm 0.29	639.70 \pm 29.96*	917.88 \pm 114.33	5.00 \pm 1.22
Naproxeno-DHA 1:1 (30-146.46 mg/kg p.o.)	115.80 \pm 12.32	1.17 \pm 0.37	609.03 \pm 41.22	1495.37 \pm 637.83	11.98 \pm 6.62

Notas: Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n= 5-9). *P \leq 0.05 vs naproxeno

8.8. Inhibición de la actividad de la COX-2

En la figura 29, se ilustran las curvas concentración efecto del naproxeno (Fig. 29 A) y del DHA (Fig. 29 B). Donde podemos identificar un comportamiento concentración dependiente para el naproxeno, en tanto que para el DHA el comportamiento fue constante a pesar del incremento en las concentraciones. De esta forma, por regresión lineal fue posible calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) exclusivamente del naproxeno (64.59 \pm 4.79 *pmol*), en tanto que, para el DHA, el comportamiento que hubo limitó las posibilidades de realizar el cálculo. De igual manera, esto limitó el poder realizar un estudio que replicara el modelo in vivo, es decir, realizar la curva concentración-efecto de cada uno de los fármacos de manera individual y posteriormente en combinación, con lo cual podríamos tener un panorama más amplio en cuanto al mecanismo de acción en la interacción sub-aditiva del efecto antinociceptivo de la combinación.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

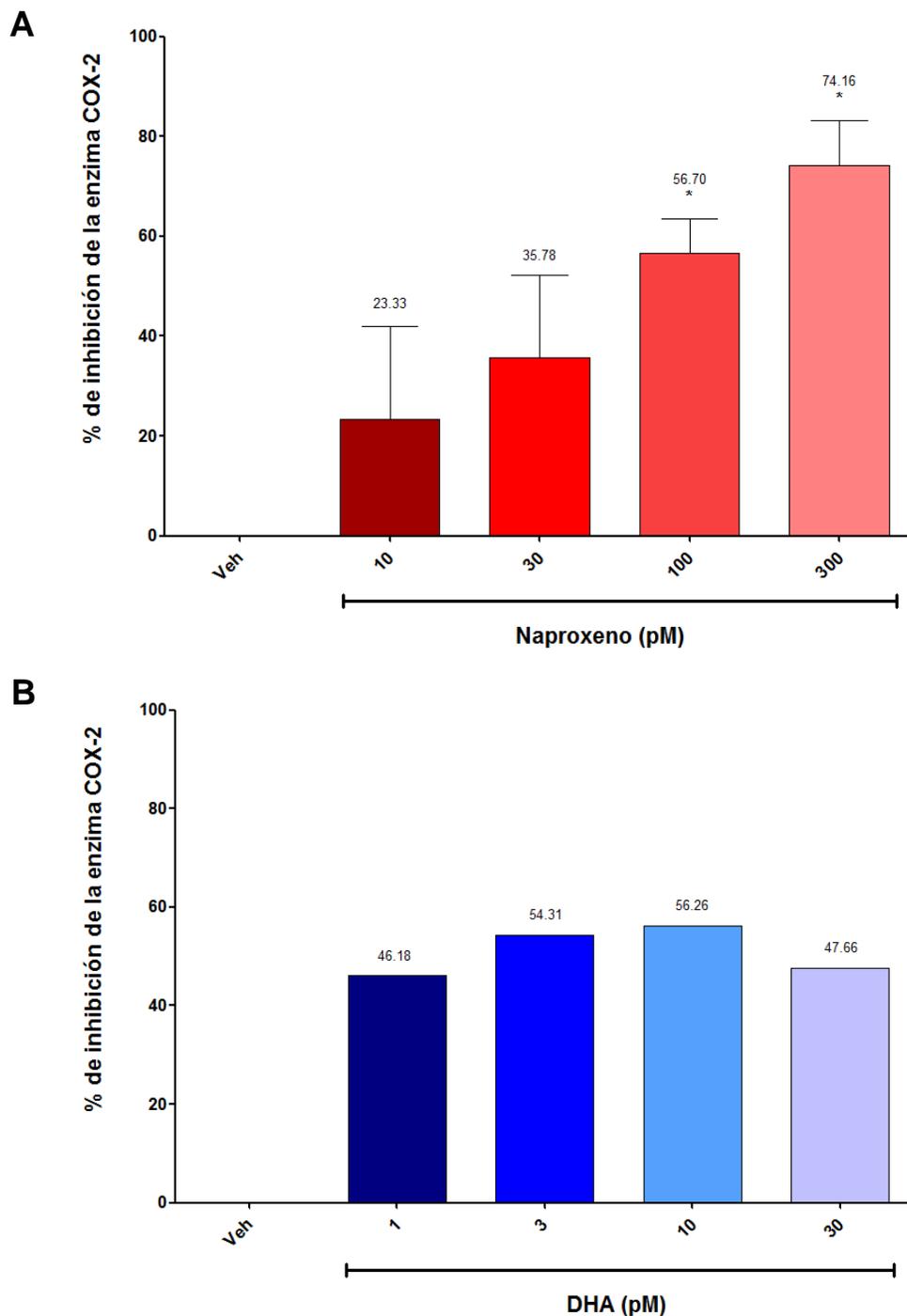


Figura 29. Curvas concentración efecto. Inhibición de COX-2 en presencia de (A) naproxeno y (B)DHA. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (4 repeticiones por cada concentración evaluada). En el caso de DHA solo se hizo una repetición de cada concentración de cada repetición evaluada.

9. Discusión

9.1. Antinocicepción de naproxeno, DHA y la combinación DHA-naproxeno

9.1.1. Efecto antinociceptivo de naproxeno

. En el pasado el dolor era considerado únicamente un síntoma, sin embargo, considerando los complejos mecanismo que implica y el impacto social de este, ahora es claro que representa un fenómeno complejo (Straube et al., 2011). El dolor, es un importante problema de salud pública, estadísticas nacionales reportan que el dolor es la primer causa de consulta médica a nivel institucional (IMSS) (Covarrubias-Gómez et al., 2010). De acuerdo con la escalera analgésica de la OMS, la primera herramienta empleada para el manejo del dolor son los AINEs, sin embargo, estos generan importantes efectos adversos (Puebla Diaz, 2005).

En el presente estudio, la administración sistémica y local de naproxeno (10, 30, 100 y 300 mg/kg, p.o. y 316.23, 562.23, 1000 y 1778 µg/pata), un AINE no selectivo, fue capaz de disminuir el efecto nociceptivo en la segunda fase de la prueba de la formalina, observándose un porcentaje de antinocicepción de 49.05 ± 6.04 y 39.53 ± 12.04 % respectivamente al administrar las dosis más altas empleadas, es importante resaltar que este es el primer reporte del efecto antinociceptivo del naproxeno administrado intraplantarmente.

Las propiedades anti-inflamatorias y antinociceptivas del naproxeno son producto de la inhibición de la enzima COX, la primera involucrada en la síntesis de prostaglandinas, catalizando la formación de la prostaglandina H₂ (PGH₂) a partir del ácido araquidónico (Angiolillo and Weisman, 2017). La enzima COX tiene dos isoformas, COX-1 y COX-2. Los AINEs no selectivos como el naproxeno, bloquean ambas isoformas, produciendo analgesia así como potenciales efectos adversos entre los cuales se incluyen lesiones de la mucosa gástrica, siendo estos la principal limitante de su uso (Duggan et al., 2010; Angiolillo and Weisman, 2017).

9.1.2. Efecto antinociceptivo del DHA

En 2010, Nakamoto et. al. reportaron el efecto antinociceptivo de la administración oral del DHA, empleando dosis de 5-25 mmol/Kg de peso en modelos murinos de nocicepción inducida por estímulos químicos y térmicos. En la prueba de la formalina el efecto antinociceptivo fue reportado en la segunda fase, con un comportamiento dosis dependiente. Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha reportado recientemente el efecto antinociceptivo dosis dependiente de la administración oral (100-300 mg/Kg, p.o.) y local (100-1778 µg/pata) del DHA en la prueba de la formalina, obteniendo el mayor porcentaje de antinocicepción de 41.3 ± 8.8 con la dosis de 300 mg/kg p.o. y 70.05 ± 3.76 % cuando se administró la dosis de 1000 µg/pata respectivamente (Landa-Juárez et al., 2016; Arroyo-Lira et al., 2014). Además, se ha reportado el efecto antinociceptivo del DHA administrado por vía intracerebroventricular (Nakamoto et al., 2013) e intra-articular (Torres-Guzman et al., 2014).

Melzack y Wall plantean en su teoría una modulación doble de las neuronas del asta dorsal de la medula espinal que involucran los sistemas descendentes supraespinales, entre ellos el sistema opioide endógeno (Goicoechea García and Martín Fontelles, 2009). La unión de opioides endógenos (endorfinas, encefalinas y dinorfinas) a sus respectivos receptores provoca una hiperpolarización de las neuronas, lo que implica una menor frecuencia de disparo, una menor conducción nerviosa y, por lo tanto, una menor activación de las neuronas que transmiten la información nociceptiva (Goicoechea García and Martín Fontelles, 2009; Pasternak, 2014; Law et al., 2013; Melzack, 1996).

El mecanismo de acción mediante el cual el DHA induce antinocicepción no está completamente dilucidado; sin embargo, Nakamoto et. al., han reportado una serie de evidencias que indican la participación del sistema opioide endógeno en dicho efecto (Nakamoto et al., 2012, 2011). Dicha información permite realizar el planteamiento de que el mecanismo de acción mediante el cual el DHA induce antinocicepción involucra la unión directa del PUFA con receptores GPR40, que al igual que receptores GPR120 han sido identificados como dianas del DHA, EPA y AA. El GPR40 está acoplado a una proteína G intracelular (Gq) que activa las vías

de señalización dependientes de fosfolipasa C y fostatidilinositol (Nakamoto et al., 2012). Esta unión promueve la movilización de calcio intracelular, lo que facilita la liberación de β -endorfinas y la unión de estas a sus receptores (Nakamoto et al., 2011, 2012, 2014, 2013). Además, el DHA podría ejercer su efecto antinociceptivo a través de la estimulación de receptores TRPV1, que representan un importante blanco para los PUFAs. Estos receptores juegan un papel importante en la señalización de la inflamación y el dolor de tipo inflamatorio. Por otra parte, Landa Juárez et. al demostraron la reversión del efecto antinociceptivo inducido por la administración local de DHA al administrar inhibidores específicos de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), de calcio de conductancia larga (KCa-cl) y conductancia corta (KCa-cc). En base a estos resultados, propone una asociación de la liberación de β -endorfina como consecuencia de la apertura de canales K^+ posterior a la unión del DHA con el GPR40. Además plantea que dada la distribución de los canales de K^+ en las neuronas sensoriales, el DHA actuaría modulando la fase de repolarización, hiperpolarización y la fase de reposo del potencial de acción del estímulo nociceptivo a través de la apertura de los canales de K_{ATP} , KCa-cl y KCa-cc, esto considerando que se ha descrito que los canales de K^+ en estado conformacional abierto permiten la salida de K^+ del espacio intracelular al espacio extracelular, por lo cual se negativiza el medio intracelular y, esto establece un potencial de acción que tiende a la hiperpolarización, lo que significa un estado más negativo que el estado de reposo. Posteriormente alcanza su estado de reposo, lo que implica que para generar de nueva cuenta un potencial de acción es necesario un estímulo más intenso que el que provocó el primer ciclo. Sin embargo, se hace hincapié en que es necesario realizar estudios electrofisiológicos para demostrar este supuesto.

9.1.3. Aditividad, super-aditividad y sub-aditividad en la combinación sistémica y local de la combinación DHA-naproxeno

El uso de combinaciones de analgésicos en el manejo del dolor es un enfoque ampliamente aceptado en la clínica ya que permite mejorar la eficacia sin aumentar los efectos adversos o, disminuye los efectos adversos sin perder la eficacia, lo que simplifica el tratamiento y prescripción además de mejorar la calidad de vida del paciente (Tomić et al., 2010). La administración de dos o más fármacos puede resultar en interacciones farmacológicas: farmacocinéticas, farmacodinámicas o incompatibilidades. Las interacciones farmacodinámicas se describen usualmente como “aditivas” cuando el efecto de la combinación es consistente con la potencia de los fármacos administrados individualmente, “super-aditivas” cuando el efecto observado es superior que la simple aditividad, mientras que en las interacciones “sub-aditivas” el efecto observado es menor que la simple aditividad (Raffa et al., 2010; Tallarida, 2011). Es importante considerar que, aunque idealmente se espera potenciar los efectos terapéuticos y disminuir los efectos adversos cuando se realiza una combinación de fármacos es posible que suceda lo contrario, por este motivo es de suma importancia determinar y caracterizar que tipo de interacción sucede con cada combinación. Una herramienta que nos permite caracterizar las interacciones farmacodinámicas es el análisis isobolográfico (Yan et al., 2010). Dicho análisis comprende la evaluación dosis-respuesta de los fármacos administrados de manera individual (DE_{30}) (Tallarida, 2011). La potencia y eficacia derivada de estas curvas permite la determinación de las dosis de la combinación necesarias para producir un nivel específico de efecto de manera experimental (DE_{30Exp}). Finalmente se realiza la comparación de la DE_{30Exp} y la $DE_{30Teórica}$ de la combinación, lo que permite establecer el tipo de interacción que sucede (Hurley et al., 2002; Zhang et al., 2010a).

En este estudio se evaluó la combinación del DHA con el naproxeno, administrados por vía oral y local en proporción 1:1, 1:3 y 3:1. Se demostró una interacción de tipo super-aditiva cuando la combinación fue administrada en proporción 1:3 por ambas vías de administración, mientras que la aditividad fue observada únicamente por vía local en proporción 1:1.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se reportó interacción de tipo super-aditiva cuando se combinó el DHA con el AINE indometacina, la administración fue por vía oral en las proporciones antes mencionadas (1:1, 1:3 y 3:1) (Arroyo-Lira et al., 2014), además en la administración oral de la combinación del DHA con diclofenaco y ketorolaco en proporción 1:3 la interacción caracterizada también fue de tipo super-aditiva (García Barrera, 2016; Miranda Lara, 2016).

Se propone que el mecanismo de acción en la interacción del efecto antinociceptivo aditivo y super-aditivo se debe a mecanismos de acción diferentes y complementarios, es decir, por una parte, los AINEs inhiben la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la isoformas de la COX (Angiolillo and Weisman, 2017; Duggan et al., 2010); mientras que el DHA, por una parte estimula la liberación de opioides endógenos (β -endorfina) al unirse al receptor GPR40, esto a su vez estimula neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas, influenciado de esta manera las rutas descendentes de la modulación del dolor; el DHA al integrarse en los fosfolípidos de membrana permite la formación de cannabinoides endógenos (Calder, 2012; Nakamoto et al., 2012, 2015); dicha integración en los fosfolípidos de membrana desplaza al AA. En las membranas celulares existen microdominios lipídicos (rafts y caveolas) que funcionan como plataformas que modulan diversas funciones celulares como la transducción de señales, tráfico de proteínas, cinética de canales iónicos entre otros, estos procesos, al igual que la fluidez de la membrana, se ven modificados por la integración del DHA (Calder, 2012; Meijerink et al., 2013; Mozaffarian and Wu, 2011; Raza Shaikh, 2010; Shaikh et al., 2012; Wassall and Stillwell, 2009); por otra parte, se propone la disminución de la síntesis de citocinas y eicosanoides derivados del AA (Calder, 2015), promoviéndose la síntesis de eicosanoides derivados del DHA (biológicamente menos activos), lo cual, en conjunto con la inhibición de síntesis de prostaglandinas por parte del naproxeno, se traduce en la potenciación del efecto antinociceptivo cuando el DHA y los AINEs se administran en combinación.

Otro aspecto que es importante considerar son las interacciones de tipo farmacocinética. La farmacocinética estudia el curso temporal de los fármacos en el organismo y permite conocer su concentración en la biofase (medio en el cual el

fármaco está en condiciones de interactuar con sus receptores para ejercer su efecto biológico), en función de la dosis y del tiempo transcurrido desde su administración. Estas concentraciones dependen de los niveles plasmáticos, suele utilizarse el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de los fármacos para predecir su efecto. Se obtiene así una curva que describe las variaciones sufridas por la concentración del fármaco en el organismo desde su administración hasta su desaparición del organismo. En esta curva se aprecian varios parámetros farmacocinéticos importantes ABC, C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ (Hamidi et al., 2013).

En este estudio se demostró que el DHA es capaz de modificar la farmacocinética de la administración oral individual del naproxeno. Esto se reflejó en el aumento del ABC_{0-t} del naproxeno cuando es coadministrado con DHA ($639.70 \pm 29.96 \mu\text{g h/mL}$) respecto a la administración individual del naproxeno ($483.33 \pm 43.03 \mu\text{g h/mL}$). Es decir, se observa un aumento en la biodisponibilidad (cantidad de fármaco presente en circulación sistémica) del naproxeno cuando se coadministra con DHA.

Considerando entonces que la biodisponibilidad de un fármaco es la fracción de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica, es importante considerar que tanto la vía de administración como el proceso de absorción son importantes al definir la biodisponibilidad de un fármaco (Kwan, 1997). La administración oral es una de las vías más usadas; por esta vía la absorción de los fármacos acontece en la mucosa del estómago y del intestino (difusión pasiva, transporte activo, difusión facilitada, transporte paracelular), usualmente por difusión pasiva, proceso condicionado por la naturaleza de los fármacos y por las diferencias de pH (Lorenzo Fernández et al., 2008). En principio los fármacos pueden ser clasificados como ácidos o bases débiles. Al entrar en contacto con el jugo gástrico (pH ácido), un medio adecuado para la absorción de ácidos débiles, el naproxeno ($pK_a=4.15$; liposoluble) es absorbido (Davies and Anderson, 1997). La rápida aparición de este en determinaciones plasmáticas sugieren que efectivamente, ocurre absorción gástrica (Runkel et al., 1973). Sin embargo, dado que el pH no es el determinante principal de la absorción de los fármacos en el aparato gastrointestinal el naproxeno es absorbido también en intestino, donde la enorme superficie de las vellosidades y

microvellosidades de este, así como la gran vascularización del epitelio de la mucosa del intestino delgado son decisivas en la absorción de muchos fármacos incluido entre ellos el naproxeno (Lorenzo Fernández et al., 2008). Se ha demostrado que moléculas lipofílicas y con pesos moleculares entre 200 y 400 (como el naproxeno; P.M. 230.26 g/mol) son absorbidas uniformemente y sin cambio en intestino delgado (yeyuno e íleon) y colón. Así mismo se ha propuesto que la capacidad del colon para absorber compuestos lipofílicos se debe en gran medida a la composición lipídica de la membrana del colonocito (Fagerholm et al., 1997). Recordando que el DHA puede integrarse a las membranas plasmáticas y modificar características importantes en el proceso de absorción de fármacos como son la fluidez y permeabilidad, existe la posibilidad de que dicha incorporación del DHA a las membranas promueva la absorción del naproxeno.

Por otra parte, simultáneamente al proceso de absorción en el lumen intestinal ocurre el metabolismo de fármacos coordinado principalmente por citocromos (CYP450) intestinales (Patel and Brocks, 2009), enzimas pertenecientes a la familia de las hemoproteínas que podemos encontrar principalmente en las membranas plasmáticas del retículo endoplásmico y mitocondria (Bezirtzoglou, 2012). En intestino se han identificado principalmente CYP3A4, CYP3A5, CYP1A1, CYP2C9, CYP2D6 y CYP2J2 (Galetin, 2006). Algunos estudios han demostrado que la biodisponibilidad de algunos fármacos se puede aumentar con la coadministración de ácidos grasos o con una dieta rica en grasas. Por ejemplo, la administración de amiodarona (AM) un compuesto lipofílico altamente metabolizado en intestino delgado de ratas por CYP1A1 y CYP3A1 con una dieta rica en grasas se tradujo en un aumento de los niveles de AM en comparación con su metabolito activo, probablemente por inhibición de CYP3A y CYP1A1 debido a los ácidos grasos libres. (Patel and Brocks, 2009). Además de la coadministración de fármacos con dietas ricas en grasas, se han administrado fármacos con PUFAs n-3, ejemplo de esto es la coadministración de saquinovir, ciclosporina y midazolam con DHA, donde se observó un aumento de la biodisponibilidad de la administración oral de estos fármacos, sugiriéndose que dicho aumento se debe al efecto inhibitorio del DHA sobre el CYP3A intestinal (Hirunpanich and Sato, 2006; Hirunpanich et al.,

2006, 2008). Los lípidos juegan un papel muy importante en el correcto funcionamiento de las enzimas CYP, pues participan en el correcto anclaje de estas a la membrana con lo que facilitan la unión de los sustratos y la transferencia de electrones, es decir, la actividad de los CYP depende del contenido lipídico (composición de los fosfolípidos de membrana), el contenido de colesterol y otros componentes. Además del impacto de la modificación del microambiente lipídico, los ácidos grasos liberados de la hidrólisis de los fosfolípidos pueden competir por los sitios de unión, no solo de las enzimas CYP, sino de otras enzimas involucradas en el metabolismo de los fármacos (Patel and Brocks, 2009).

En este estudio, también se caracterizó la interacción sub-aditiva en el efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno cuando se administró la combinación por ambas vías en proporción 3:1 y por vía oral en proporción 1:1.

Uno de los principales objetivos de uso de combinación de analgésicos es incrementar la eficacia sin incrementar los efectos adversos (Raffa et al., 2010), sin embargo, la mayoría de las combinaciones resulta en la simple adición del efecto. Por ejemplo, fármacos que tienen mecanismos de acción similares (Tallarida, 2006), como los agonistas de opioides morfina y metadona (Tallarida et al., 2003), morfina y sildenafil (Yoon et al., 2008), generalmente inducen interacciones aditivas. Sin embargo, en ciertos casos, la combinación resulta en una inesperada interacción super-aditiva (Bolan et al., 2002). La demostración de super-aditividad entre fármacos, sitios de administración y su análisis estadístico ha sido el objeto de trabajo de Tallarida et. al., los resultados que han emergido de su investigación indican que la super-aditividad no es una propiedad intrínseca de los fármacos que constituyen la combinación sino que depende también de la proporción de cada uno en la combinación (Tallarida, 2006).

Dado que la interacción puede variar en función de la proporción administrada es importante mencionar que, aunque la proporción comúnmente empleada es la proporción 1:1 (ya que esta permite determinar aditividad o partida de esta) se recomienda evaluar otras proporciones (1:3 y 3:1) con el fin de estudiar un sector radial definido de las intercepciones axiales y detectar otros posibles puntos de aditividad o partida de esta. Estas proporciones podrían no resultar en super-

aditividad, pero entre aquellas que lo sean, es posible evaluar el índice de interacción, este nos provee de una medida cuantitativa del grado de interacción de los fármacos a cierto nivel de efecto (Hurley et al., 2002; Tallarida, 2001, 2012; Zhang et al., 2010a) y considerando que la simple visualización del isoblograma no nos permite una integración estadística el índice de interacción se convierte en una poderosa herramienta para realizar dicho análisis entre las DE_{30Exp} y $DE_{30Teórica}$ (Tallarida, 2001, 2002).

Por otra parte, es de suma importancia mencionar que Tallarida y colaboradores demostraron diferentes tipos de interacciones farmacodinámicas al combinar la glucosamina con diferentes AINEs en diferentes proporciones, entre ellos el naproxeno (aditividad), diclofenaco (aditividad), indometacina (aditividad), ibuprofeno (super-aditividad), ketoprofeno (super-aditividad), ácido acetil salicílico (sub-aditividad), piroxicam (sub-aditividad), acetaminofén (sub-aditividad), enfatizando que aunque el mecanismo de acción que comparten los AINEs es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, existen otros mecanismos asociados a cada uno de estos fármacos y que además cada uno posee sus propias características farmacocinéticas y farmacodinámicas (Tallarida et al., 2003).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el antagonismo caracterizado en las proporciones 1:1 (oral) y 3:1 (local y oral), pueden deberse en primera instancia a la cantidad de cada uno de los fármacos presentes en la combinación. Sin embargo, los resultados presentados en las figuras 19 y 29 nos permiten plantear la hipótesis de que el DHA podría inhibir el efecto del naproxeno al unirse al sitio catalítico o en algún sitio alostérico de la COX. Las enzimas COX-1 y COX-2 son homodímeros que exhiben actividad catalítica solo en uno de los monómeros, es decir, una vez que el AA se ha unido al sitio catalítico la reacción puede ser orquestada por un monómero a la vez (Sharma et al., 2010). Se ha demostrado que ácidos grasos libres pueden unirse a los sitios COX de uno de los monómeros en tanto que el otro monómero (catalítico) es ocupado por el AA, esto resulta en una alteración de la actividad de COX que se traduce en la disminución de la eficiencia catalítica, es decir, la unión de los ácidos grasos al sitio activo del monómero no catalítico se traduce en un efecto de inhibición alostérica (Yuan et al., 2009), dicho de otras

palabras, estructuralmente las COX son homodímeros, funcionalmente se comportan como heterodímeros conformacionales (Dong et al., 2011). Los resultados presentados en la figura 29 muestran la inhibición de la COX-2 in vitro cuando fueron utilizados como inhibidores el naproxeno y el DHA en experimentos individuales, debido a que únicamente se pudo calcular la CI_{50} del naproxeno no podemos determinar o establecer la preponderancia de unión entre COX-2 con naproxeno y DHA, sin embargo, esto nos permite establecer que ambos compuestos son capaces de unirse a la COX-2 e inhibir su actividad. Por otra parte, se ha reportado en la literatura que en el caso del EPA hay preponderancia de unión sobre el AA cuando la unión es con la COX-2, mientras que en el caso de la unión a COX-1 no se ha reportado selectividad aparente (Sharma et al., 2010; Yuan et al., 2009). Esta información se complementa con la curva dosis respuesta presentada en la figura 19, donde podemos ver un comportamiento en la curva que indicaría un antagonismo de tipo no competitivo (alostérico) aunque en este caso el sitio alostérico es el mismo sitio catalítico en un homodímero alostérico (Brunton et al., 2010).

Finalmente, en la interacción sub-aditiva del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno (1:1 vía oral) se rechaza que el mecanismo de acción implique aspectos farmacocinéticos pues, aunque el perfil (Fig. 28) y los parámetros farmacocinéticos (Tabla 6) de la combinación tienen una tendencia a incrementar respecto al naproxeno individual, estos resultados no tienen diferencia estadísticamente significativa.

9.1.4. Daño gástrico inducido por naproxeno, DHA y la combinación DHA-naproxeno

Los AINEs son uno de los grupos de fármacos más ampliamente prescritos en el mundo debido a su eficacia en la reducción del dolor y de la inflamación. Se estima que a nivel mundial se emiten 70 millones de prescripciones anualmente y se gastan \$6.8 billones de dólares en la compra de estos fármacos (Wyatt et al., 2012). Sin embargo, la toxicidad gastrointestinal asociada al uso de AINEs es un importante problema que limita su uso (Seo et al., 2012). Los mecanismos a través de los cuales los AINEs producen daño gástrico pueden ser clasificados en acciones locales y acciones sistémicas (Atay et al., 2000; Wallace, 2008). Localmente los AINEs pueden inducir la muerte de las células epiteliales por contacto directo, particularmente aquellos AINEs cuya naturaleza es ácida. También pueden disrumpir la capa superficial de los fosfolípidos activos de la superficie mucosal, efecto que es independiente de la síntesis de prostaglandinas. Como efecto de esto, la mucosa reduce su capacidad de resistir el daño inducido por el ácido luminal. Además, la proliferación epitelial disminuye como consecuencia del uso de AINEs, lo que impide la reparación de las úlceras previamente generadas (Katsuyama et al., 2013; Wallace, 2001; Wallace et al., 2000). Sin embargo, el mayor elemento patogénico asociado al desarrollo de las lesiones gástricas inducidas por AINEs es la inhibición de ambas isoformas de la enzima COX y la consecuente inhibición de síntesis de prostaglandinas (Seo et al., 2012).

En este estudio se identificó el daño gástrico generado por la administración oral (10, 30, 100 y 300 mg/kg, p.o.) y local (316.23, 562.23, 1000 y 1778 µg/pata), este fue caracterizado como lesiones hemorrágicas, las cuales fueron medidas a lo largo y ancho, el resultado se reportó como área de daño gástrico en milímetros cuadrados. El comportamiento observado en los diferentes grupos tratados de la administración oral de naproxeno fue dosis dependiente, identificándose la mayor área de daño gástrico ($30.91 \pm 5.73 \text{ mm}^2$) con la dosis de 300 mg/kg de peso. Se sabe que los principales efectos adversos inducidos por la administración oral de naproxeno en el humano produce erosiones y ulceraciones antrales así como sangrado de la mucosa gástrica y que, en este proceso, la formación de especies

reactivas del oxígeno y los peróxidos de lípidos juegan un papel crucial en el desarrollo de las úlceras antrales, además se ha reportado que la toxicidad gastrointestinal de los AINEs está relacionada directamente con la dosis de fármaco empleada (Kim et al., 2016). Sorprendentemente, cuando el naproxeno se administró por vía local también se observó daño gástrico, aunque el área fue menor ($1.81 \pm 0.52 \text{ mm}^2$) en comparación con la administración oral. Debido a los efectos adversos provocados por la administración oral de los AINEs, Suh et. al. evaluaron la disposición farmacocinética del naproxeno (gel al 1%) tras ser administrado por vía tópica (aunque el objetivo de esta investigación fue encontrar el vehículo adecuado que permitiera la mayor disposición local en la piel y estratos de esta) del AINE, reportaron evidencia de que el naproxeno tras acumularse en piel y músculo es removido por la circulación sistémica e identificado mediante HPLC en muestras sanguíneas (Suh et al., 1997), lo que explicaría el daño gástrico que hemos observado en este estudio. Por su parte, Lerche et. al. demostraron que la administración tópica repetida (≤ 151 días) de diclofenaco (gel al 3%) es capaz de inducir úlceras pépticas y esofágicas, sangrado gastrointestinal y finalmente la muerte. En un estudio similar realizado por el mismo equipo de investigación, se reporta una alta incidencia de sangrado gastrointestinal y mortalidad de los animales de experimentación tras la administración tópica de indometacina (Lerche et al., 2011).

Por otra parte, en este estudio también se evaluó el daño gástrico inducido por la administración oral (56.23, 100, 177.83 y 316.23 mg/kg, p.o.) y local (178.83, 316.23, 562.23 y 1000 $\mu\text{g/pata}$) de DHA. Contrario a lo observado en los grupos tratados con naproxeno, el DHA no produjo lesiones gástricas. Hasta el momento no se ha reportado toxicidad del DHA, en contraste, nuestro grupo de investigación ha reportado el efecto gastroprotector del DHA en un modelo de daño gástrico inducido por el AINE indometacina. Mientras que en el daño gástrico inducido por AINEs se encuentran involucrados el incremento de la adhesión de neutrófilos y los niveles de leucotrieno B₄ (LTB₄), se ha propuesto que el mecanismo de acción por el cual el DHA ejerce su efecto gastroprotector es la disminución de los niveles de

LTB₄, así como la síntesis de mediadores del DHA como son las resolvinas (Pineda-Peña et al., 2012, 2017).

En este estudio también se evaluó el daño gástrico inducido por la administración oral y local de la combinación DHA-naproxeno (1:1, 1:3 y 3:1). Al realizar la comparación del daño gástrico observado en las combinaciones respecto a la administración individual de naproxeno cabe señalar que únicamente en los grupos tratados por vía oral se identificaron algunas lesiones en el cuerpo del estómago, principalmente en el grupo tratado con la combinación 1:3 (DHA-naproxeno), sin embargo, al realizar el análisis estadístico estos valores no fueron estadísticamente significativos respecto a su grupo control. En el caso de la administración local de la combinación no se observaron lesiones gastrointestinales.

La seguridad gástrica observada en las combinaciones en sus diferentes proporciones y vías de administración puede ser atribuida a la disminución de la dosis de naproxeno en la combinación respecto a la dosis empleada de manera individual. Algunos estudios han reportado que dosis bajas de los AINEs indometacina y aspirina inhiben la actividad de la COX en la mucosa gástrica hasta en un 90% sin causar lesiones hemorrágicas (Yoshikawa et al., 1993). Por otra parte, el DHA mediante su efecto gastroprotector contribuye a la seguridad gástrica observada en la combinación.

10. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación nos llevan a las siguientes conclusiones:

- La administración oral y local del naproxeno y del DHA inducen efecto antinociceptivo.
- La administración oral y local de la combinación DHA-naproxeno en proporción 1:3 induce efecto antinociceptivo super-aditivo, de igual manera lo hace la administración local de la combinación en proporción 1:1. Se propone que el mecanismo de acción implicado en la potenciación de este efecto se en una interacción farmacodinámica de mecanismos de acción complementarios, donde por una parte el naproxeno inhibe la síntesis de prostaglandinas y por su parte el DHA promueve la liberación de opioides endógenos que a su vez modulan la activación de las vías descendentes del dolor. Además, el mecanismo de acción implica un componente farmacocinético, donde el DHA es capaz de aumentar la biodisponibilidad del naproxeno, lo que finalmente se refleja en el efecto biológico (aumento del efecto antinociceptivo), considerándose la interacción farmacocinética primordialmente a nivel de absorción del naproxeno.
- La administración oral y local de la combinación en proporción 3:1 resultó en una interacción de tipo sub-aditiva en el efecto antinociceptivo, de igual manera sucedió al administrar por vía oral la combinación en proporción 1:1. Se propone que el mecanismo de acción implicado comprenda en primer lugar considerar la proporción en la cual se encuentran los fármacos y por otro lado que el DHA orqueste una inhibición de tipo alostérica en el efecto de la COX.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

- La administración oral y local de la combinación DHA-naproxeno posee seguridad gástrica en comparación con la administración individual de naproxeno.

11. Perspectivas

1. Realizar la valoración de la inhibición de la COX en presencia de DHA con el fin de poder establecer la CI_{50} .
2. Realizar la valoración de la inhibición de la COX en presencia de la combinación DHA-naproxeno para poder explorar con mayor detalle el tipo de inhibición que sucede.
3. Realizar ensayos de dinámica molecular de la inhibición de la COX en presencia de DHA y naproxeno.
4. En cuanto al aspecto farmacocinético sería importante determinar si el DHA es capaz de inhibir al CYP2C9 y CYP1A1 y correlacionar esta información con el aumento en la biodisponibilidad del naproxeno.
5. Realizar un estudio de la composición de los lípidos presentes en la membrana de células intestinales y correlacionar esta información con el aumento en la biodisponibilidad del naproxeno.

12. Referencias

- Abbott, F. V., K.B.J. Franklin, and R.F. Westbrook. 1995. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*. 60:91–102. doi:10.1016/0304-3959(94)00095-V.
- Abramson, S.B., and A.L. Weaver. 2005. Current state of therapy for pain and inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 7 Suppl 4:S1–S6. doi:10.1186/ar1792.
- Acosta-Madrid, I.I., G. Castañeda-Hernández, V.G. Cilia-López, R. Cariño-Cortés, N. Pérez-Hernández, E. Fernández-Martínez, and M.I. Ortiz. 2009. Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phytomedicine*. 16:336–341. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.014.
- Almeida, T.F., S. Roizenblatt, and S. Tufik. 2004. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000:40–56. doi:10.1016/j.brainres.2003.10.073.
- Angiolillo, D.J., and S.M. Weisman. 2017. Clinical Pharmacology and Cardiovascular Safety of Naproxen. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 17:97–107. doi:10.1007/s40256-016-0200-5.
- Anwar, K. 2016. Pathophysiology of pain. *Disease-a-Month*. 62:324–329. doi:10.1016/j.disamonth.2016.05.015.
- Applegate, K.R., and J.A. Glomset. 1986. Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 27:658–680.
- Arnold, C., A. Konkel, R. Fischer, and W.-H. Schunck. 2010. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol. Rep.* 62:536–547.
- Arredondo-Garza, T., J. Lozano-Cuenca, M. Jiménez-Andrade, and G. Castañeda-Hernández. 2007. Additive, but not synergistic antinociceptive effect of codeine and indomethacin combinations in the formalin test in the rat. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 50:78–81.
- Arroyo-Lira, A.G., F. Rodríguez-Ramos, and A.E. Chávez-Piña. 2014. Synergistic

- antinociceptive effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and indomethacin in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122:74–81. doi:10.1016/j.pbb.2014.03.015.
- Atay, S., A.S. Tarnawski, and A. Dubois. 2000. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 61:105–124. doi:10.1016/S0090-6980(00)00067-8.
- Babos, M.B., B. Grady, W. Wisnoff, and C. McGhee. 2013. Pathophysiology of pain. *Dis. Mon.* 59:330–58. doi:10.1016/j.disamonth.2013.05.003.
- Barrot, M. 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 211:39–50. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.
- Le Bars, D., M. Gozariu, and S.W. Cadden. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53:597–652. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x.
- Basbaum, A.I., D.M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius. 2009. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *NIH Public Access.* 139:267–284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028.Cellular.
- Batlouni, M. 2010. Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Arq. Bras. Cardiol.* 94:556–563. doi:10.1590/S0066-782X2010000400019.
- Bazan, N.G., E.M. Alberto, and J.K. Eric. 2011. Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Mol. Neurobiol.* 44:216–222. doi:10.1007/s12035-011-8200-6.
- Belayev, L., L. Khoutorova, K.D. Atkins, T.N. Eady, S. Hong, Y. Lu, A. Obenaus, and N.G. Bazan. 2011. Docosahexaenoic Acid Therapy of Experimental Ischemic Stroke. *Transl. Stroke Res.* 2:33–41. doi:10.1007/s12975-010-0046-0.
- Bezirtzoglou, E.E.V. 2012. Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* 23:1–10. doi:10.3402/mehd.v23i0.18370.
- Bingham, S., P.J. Beswick, D.E. Blum, N.M. Gray, and I.P. Chessell. 2006. The role of the cylooxygenase pathway in nociception and pain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17:544–554. doi:10.1016/j.semcdb.2006.09.001.

- Bolan, E.A., R.J. Tallarida, and G.W. Pasternak. 2002. Synergy between mu opioid ligands: evidence for functional interactions among mu opioid receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303:557–562. doi:10.1124/jpet.102.035881.
- Bourne, S., A.G. Machado, and S.J. Nagel. 2014. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 25:629–638. doi:10.1016/j.nec.2014.06.001.
- Bridgestock, C., and C.P. Rae. 2013. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth. Intensive Care Med.* 14:480–483. doi:10.1016/j.mpaic.2013.08.004.
- Brossard, N., M. Croset, S. Normand, J. Pousin, J. Lecerf, M. Laville, J.L. Tayot, and M. Lagarde. 1997. Human plasma albumin transports [13C]docosahexaenoic acid in two lipid forms to blood cells. *J. Lipid Res.* 38:1571–82.
- Brunton, L.L., K.L. Parker, D. k. Blumenthal, and I.L.O. Buxton. 2010. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapéutica. 1219 pp.
- Calder, P.C. 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: 1 Nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* doi:10.1111/1365-2125.2012.04374.x.
- Calder, P.C. 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851:469–484. doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.010.
- Carrillo Munguía, N. 2007. Mecanismos opioides que participan a nivel supraespinal en la potenciación del efecto antinociceptivo de la combinación tramadol + cafeína en el modelo de la formalina. Universidad de Colima.
- Chan, E.J., and L. Cho. 2009. What can we expect from omega-3 fatty acids? *Cleve. Clin. J. Med.* 76:245–251. doi:10.3949/ccjm.76a.08042.
- Chen, L., G. Yang, and T. Grosser. 2013. Prostanoids and inflammatory pain. *In Prostaglandins and Other Lipid Mediators.* 58–66.
- Chikhani, M., and J.G. Hardman. 2016. Pharmacokinetic variation. *Anaesth. Intensive Care Med.* 17:163–165. doi:10.1016/j.mpaic.2015.12.006.
- Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud. 2016. CUADRO BÁSICO Y CATÁLOGO DE MEDICAMENTOS. Ciudad

- de México. 564 pp.
- Costigan, M., J. Scholz, and C.J. Woolf. 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 32:1–32. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135531.
- Covarrubias-Gómez, A., U. Guevara-López, C. Gutiérrez-Salmerón, J.A. Betancourt-Sandoval, and J.A. Córdova-Domínguez. 2010. Epidemiología del dolor crónico en México. *Rev. Mex. Anesthesiol.* 33:207–213.
- Curatolo, M., and G. Svetcic. 2002. Drug combinations in pain treatment: A review of the published evidence and a method for finding the optimal combination. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 16:507–519. doi:http://dx.doi.org/10.1053/bean.2002.0254.
- Davies, N.M., and K.E. Anderson. 1997. Clinical pharmacokinetics of naproxen. *Clin. Pharmacokinet.* 32:268–293. doi:10.2165/00003088-199732040-00002.
- Dong, L., A.J. Vecchio, N.P. Sharma, B.J. Jurban, M.G. Malkowski, and W.L. Smith. 2011. Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer. *J. Biol. Chem.* 286:19035–19046. doi:10.1074/jbc.M111.231969.
- Drugs.com. 2016. Naproxen-FDA prescribing information, side effects and uses. 1.
- Duggan, K.C., M.J. Walters, J. Musee, J.M. Harp, J.R. Kiefer, J.A. Oates, and L.J. Marnett. 2010. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *J. Biol. Chem.* 285:34950–34959. doi:10.1074/jbc.M110.162982.
- Dwivedi, A.K., V. Gurjar, S. Kumar, and N. Singh. 2015. Molecular basis for nonspecificity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Drug Discov. Today.* 20:863–873. doi:10.1016/j.drudis.2015.03.004.
- El-mesery, M.E., M.M. Al-gayyar, H.A. Salem, M.M. Darweish, A. El-Mowafy, and A.M. El-. 2009. Chemopreventive and renal protective effects for docosahexaenoic acid (DHA): implications of CRP and lipid peroxides. *Cell Div.* 17:1–17. doi:10.1186/1747-1028-4-6.
- Fagerholm, U., a Lindahl, and H. Lennernäs. 1997. Regional intestinal permeability in rats of compounds with different physicochemical properties and transport

- mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* 49:687–690.
doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06093.x>.
- Fein, A. 2012. Nociceptors and the Perception of Pain.
- Galetin, A. 2006. Intestinal and Hepatic Metabolic Activity of Five Cytochrome P450 Enzymes: Impact on Prediction of First-Pass Metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:1220–1229. doi:10.1124/jpet.106.106013.
- García Barrera, A.M. 2016. Evaluación del efecto antinociceptivo y seguridad de la combinación de ketorolaco y ácido docosahexaenoico en un modelo murino.
- Gleissman, H., R. Yang, K. Martinod, M. Lindskog, C.N. Serhan, J.I. Johnsen, and P. Kogner. 2010. Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates. *FASEB J.* 24:906–915. doi:10.1096/fj.09-137919.
- Glen, I. 2005. Pharmacokinetic analysis. *Anaesth. Intensive Care Med.* 6:280–282. doi:10.1383/anes.2005.6.8.280.
- Goicoechea García, C., and M.I. Martín Fontelles. 2009. Sistemas cannabinoide y opioide en los mecanismos y el control del dolor. *Reumatol. Clínica.* 5:5–8. doi:10.1016/j.reuma.2009.04.006.
- Hamidi, M., A. Azadi, P. Rafiei, and H. Ashrafi. 2013. A Pharmacokinetic Overview of Nanotechnology- based Drug Delivery Systems: an ADME-oriented Approach A Pharmacokinetic Overview of Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems: An ADME-Oriented Approach. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 30:435–467.
- Hamza, M., and R.A. Dionne. 2009. Mechanisms of non-opioid analgesics beyond cyclooxygenase enzyme inhibition. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2:1–14. doi:10.2174/1874467210902010001.
- von Hehn, C.A., R. Baron, and C.J. Woolf. 2012. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron.* 73:638–652. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.008.
- Hinder, M. 2011. PHARMACODYNAMIC DRUG–DRUG INTERACTIONS. *In Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology.* H.G. Vogel, J. Maas, and A. Gebauer, editors. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 367–376.

- Hirunpanich, V., J. Katagi, B. Sethabouppha, and H. Sato. 2006. Demonstration of docosahexaenoic acid as a bioavailability enhancer for CYP3A substrates: In vitro and in vivo evidence using cyclosporin in rats. *Drug Metab. Dispos.* 34:305–310. doi:10.1124/dmd.105.007088.
- Hirunpanich, V., K. Murakoso, and H. Sato. 2008. Inhibitory effect of docosahexaenoic acid (DHA) on the intestinal metabolism of midazolam: In vitro and in vivo studies in rats. *Int. J. Pharm.* 351:133–143. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.09.037.
- Hirunpanich, V., and H. Sato. 2006. Docosahexaenoic acid (DHA) inhibits saquinavir metabolism in-vitro and enhances its bioavailability in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 58:651–8. doi:10.1211/jpp.58.5.0010.
- Holub, B.J. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Cmaj.* 166:608–615.
- Hudspith, M.J. 2016. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth. Intensive Care Med.* 17:425–430. doi:10.1016/j.mpaic.2016.06.003.
- Hurley, R.W., D. Chatterjea, M. Rose Feng, C.P. Taylor, and D.L. Hammond. 2002. Gabapentin and pregabalin can interact synergistically with naproxen to produce antihyperalgesia. *Anesthesiology.* 97:1263–1273. doi:10.1097/00000542-200211000-00033.
- Jiménez-Andrade, J.M., M.I. Ortiz, J. Pérez-Urizar, P. Aguirre-Bañuelos, V. Granados-Soto, and G. Castañeda-Hernández. 2003. Synergistic effects between codeine and diclofenac after local, spinal and systemic administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76:463–471. doi:10.1016/j.pbb.2003.09.001.
- Julius, D., and A.I. Basbaum. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413:203–210. doi:10.1038/35093019.
- Katsuyama, S., H. Mizoguchi, H. Kuwahata, T. Komatsu, K. Nagaoka, H. Nakamura, G. Bagetta, T. Sakurada, and S. Sakurada. 2013. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in b-caryophyllene-induced antinociception. *Eur. J. Pain (United Kingdom).* 17:664–675. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00242.x.
- Kim, J.-H., H.J. Kwon, and B.W. Kim. 2016. Protective Effect of 4-(3,4-

- Dihydroxyphenyl)-3-Buten-2-One from *Phellinus linteus* on Naproxen-Induced Gastric Antral Ulcers in Rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26:823–828. doi:10.4014/jmb.1511.11024.
- Kwan, K.C. 1997. Oral bioavailability and first-pass effects. *Drug Metab. Dispos.* 25:1329–1336.
- Landa-Juárez, A.Y., M.I. Ortiz, G. Castañeda-Hernández, and A.E. Chávez-Piña. 2016. Participation of potassium channels in the antinociceptive effect of docosahexaenoic acid in the rat formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 793:95–100. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.004.
- Law, P.Y., P.H. Reggio, and H.H. Loh. 2013. Opioid receptors: Toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends Biochem. Sci.* 38:275–282. doi:10.1016/j.tibs.2013.03.003.
- León-Reyes, M.R., G. Castañeda-Hernández, and M.I. Ortiz. 2009. Pharmacokinetic of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 12:280–287.
- Lerche, C.M., P.A. Philipsen, T. Poulsen, and H.C. Wulf. 2011. High death rate in mice treated topically with diclofenac. *Exp. Dermatol.* 20:336–338. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01215.x.
- Linares Borges, A., P.M. Milián Vázquez, L. Jimenez Fernández, J.M. Chala Tandrón, H. Alemán Aguilar, B.Y. Betancourt Rodríguez, J.M. Rodríguez Muñoz, and L.M. Martín García. 2002. Interacciones medicamentosas. *Acta Farm. Bonoerense.* 21:139–48.
- Lorenzo Fernández, P., M.J. Alfaro Ramos, I. Lizasoain Hernández, J.C. Leza Cerro, M.Á. Moro Sánchez, and A. Portolés Pérez. 2008. Velazquez; Farmacología Básica y Clínica. 621 pp.
- Marchand, F., M. Perretti, and S.B. McMahon. 2005. Role of the immune system in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:521–32. doi:10.1038/nrn1700.
- Marchand, S. 2008. The Physiology of Pain Mechanisms: From the Periphery to the Brain. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 34:285–309. doi:10.1016/j.rdc.2008.04.003.
- Maroon, J., J. Bost, and A. Maroon. 2010. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg. Neurol. Int.* 1:80. doi:10.4103/2152-7806.73804.

- Maroon, J.C., and J.W. Bost. 2006. ??-3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory: An alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surg. Neurol.* 65:326–331. doi:10.1016/j.surneu.2005.10.023.
- Meijerink, J., M. Balvers, and R. Witkamp. 2013. N-acyl amines of docosahexaenoic acid and other n-3 polyunsaturated fatty acids - From fishy endocannabinoids to potential leads. *Br. J. Pharmacol.* 169:772–783. doi:10.1111/bph.12030.
- Melzack, R. 1996. Gate control theory: on the evolution of pain concepts. *Pain Forum.* 5:128–138. doi:10.1016/S0928-4680(98)81061-4.
- Miranda Lara, C.A. 2016. Evaluación de la interacción farmacodinámica entre el diclofenaco y ácido docosahexaenoico (DHA) en el efecto analgésico y anti-inflamatorio en un modelo murino.
- Moore, S. a, E. Hurt, E. Yoder, H. Sprecher, and a a Spector. 1995. Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 36:2433–43.
- Morlion, B., J. V. Pergolizzi, and R.B. Raffa. 2010. European perspectives on upcoming analgesics: What do they have that we don't-and what do they think about them? *Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.* 14:86–98. doi:10.1053/j.trap.2010.03.002.
- Mozaffarian, D., and J.H.Y. Wu. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58:2047–2067. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.063.
- Nakamoto, K., T. Nishinaka, A. Ambo, M. Mankura, F. Kasuya, and S. Tokuyama. 2011. Possible involvement of β -endorphin in docosahexaenoic acid-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 666:100–104. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.047.
- Nakamoto, K., T. Nishinaka, M. Mankura, W. Fujita-Hamabe, and S. Tokuyama. 2010. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 33:1070–2. doi:10.1248/bpb.33.1070.
- Nakamoto, K., T. Nishinaka, K. Matsumoto, F. Kasuya, M. Mankura, Y. Koyama, and S. Tokuyama. 2012. Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain Res.* 1432:74–83.

doi:10.1016/j.brainres.2011.11.012.

- Nakamoto, K., T. Nishinaka, N. Sato, F. Aizawa, T. Yamashita, M. Mankura, Y. Koyama, F. Kasuya, and S. Tokuyama. 2015. The activation of supraspinal GPR40/FFA1 receptor signalling regulates the descending pain control system. *Br. J. Pharmacol.* 172:1250–1262. doi:10.1111/bph.13003.
- Nakamoto, K., T. Nishinaka, N. Sato, M. Mankura, Y. Koyama, F. Kasuya, and S. Tokuyama. 2013. Hypothalamic GPR40 Signaling Activated by Free Long Chain Fatty Acids Suppresses CFA-Induced Inflammatory Chronic Pain. *PLoS One.* 8:e81563. doi:10.1371/journal.pone.0081563.
- Nakamoto, K., T. Nishinaka, N. Sato, M. Mankura, Y. Koyama, and S. Tokuyama. 2014. Antinociceptive effect of docosahexaenoic acid (DHA) through long fatty acid receptor G protein-coupled receptor 40 (GPR40). *Yakugaku Zasshi.* 134:397–403. doi:DN/JST.JSTAGE/yakushi/13-00236-4 [pii].
- Nishinaka, T., T. Yamashita, K. Nakamoto, F. Kasuya, and S. Tokuyama. 2014. Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 in depression-related behavior. *J. Pharmacol. Sci.* 125:112–115. doi:10.1254/jphs.14001SC.
- Ortiz, M.I., M.L. Ramírez-Montiel, M.P. González-García, H.A. Ponce-Monter, G. Castañeda-Hernández, and R. Cariño-Cortés. 2010. The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. *Arch. Pharm. Res.* 33:1691–1697. doi:10.1007/s12272-010-1020-9.
- Ossipov, M.H. 2012. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica (Cairo).* 2012:561761. doi:10.6064/2012/561761.
- Palma-Aguirre, J.A., J. Villalpando-Hernández, G. Novoa-Heckel, I. Oliva, L. Cariño, E. López-Bojórquez, V. Burke-Fraga, S. Namur, and M. González-de la Parra. 2009. Bioavailability of two oral-tablet and two oral-suspension formulations of naproxen sodium/paracetamol (acetaminophen): Single-dose, randomized, open-label, two-period crossover comparisons in healthy Mexican adult subjects. *Clin. Ther.* 31:399–410. doi:10.1016/j.clinthera.2009.02.002.
- Pasternak, G.W. 2014. Opioids and their receptors: Are we there yet? *Neuropharmacology.* 76:198–203. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.039.
- Patel, J.P., and D.R. Brocks. 2009. The effect of oral lipids and circulating

- lipoproteins on the metabolism of drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5:1385–1398. doi:10.1517/17425250903176439.
- Patiño-Camacho, S.I., M.G.L. Moreno, F.J. Flores-Murrieta, and M. Déciga-Campos. 2013. The pharmacokinetic profile of the combination of naproxen and tizanidine in rat. *Drug Dev. Res.* 74:31–37. doi:10.1002/ddr.21053.
- Patrignani, P., and C. Patrono. 2015. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851:422–432. doi:10.1016/j.bbalip.2014.09.016.
- De Paz-Campos, M.A., M.I. Ortiz, A.E. Chávez Piña, L. Zazueta-Beltrán, and G. Castañeda-Hernández. 2014. Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine.* 21:1543–1548. doi:10.1016/j.phymed.2014.06.015.
- Pineda-Peña, E.A., J.M. Jiménez-Andrade, G. Castañeda-Hernández, and A.E. Chávez-Piña. 2012. Docosahexaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated acid protects against indomethacin-induced gastric injury. *Eur. J. Pharmacol.* 697:139–143. doi:10.1016/j.ejphar.2012.09.049.
- Pineda-Peña, E.A., Y. Martínez-Pérez, M. Galicia-Moreno, A. Navarrete, J. Segovia, P. Muriel, L. Favari, G. Castañeda-Hernández, and A.E. Chávez-Piña. 2017. Participation of the anti-inflammatory and antioxidative activity of docosahexaenoic acid on indomethacin-induced gastric injury model. *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2017.11.015.
- Pleuvry, B.J. 2005. Pharmacogenetics: familial variation in drug response. *Anaesth. Intensive Care Med.* 6:243–244. doi:10.1383/anes.2005.6.7.243.
- Puebla, F. 2005. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncol.* . 28:139–43. doi:10.4321/S0378-48352005000300006.
- Raffa, R.B., J. V. Pergolizzi, and R.J. Tallarida. 2010. The determination and application of fixed-dose analgesic combinations for treating multimodal pain. *J. Pain.* 11:701–709. doi:10.1016/j.jpain.2009.12.010.
- Raza Shaikh, S. 2010. Diet-induced docosahexaenoic acid non-raft domains and lymphocyte function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 82:159–164. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.026.

- Riedel, W., and G. Neeck. 2001. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z. Rheumatol.* 60:404–415. doi:10.1007/s003930170003.
- Runkel, R., E. Forchielli, G. Boost, M. Chaplin, R. Hill, H. Sevelius, G. Thompson, and E. Segre. 1973. Naproxen-metabolism, excretion and comparative pharmacokinetics. *Scand J Rheumatol.* 2:29–36.
- Russo, S. 2008. Integrated pain management: using omega 3 fatty acids in a naturopathic model. *Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.* 12:105–108. doi:10.1053/j.trap.2008.01.001.
- Schweinhardt, P., and M.C. Bushnell. 2010. Review series Pain imaging in health and disease — how far have we come? *J. Clin. Invest.* 120:3788–3797. doi:10.1172/JCI43498.3788.
- Seo, P.J., N. Kim, J.H. Kim, B.H. Lee, R.H. Nam, H.S. Lee, J.H. Park, M.K. Lee, H. Chang, H.C. Jung, and I.S. Song. 2012. Comparison of indomethacin, diclofenac and aspirin-induced gastric damage according to age in rats. *Gut Liver.* 6:210–217. doi:10.5009/gnl.2012.6.2.210.
- Shah, Y., Z. Iqbal, L. Ahmad, A. Khan, M.I. Khan, S. Nazir, and F. Nasir. 2011. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879:557–563. doi:10.1016/j.jchromb.2011.01.004.
- Shaikh, S.R., C.A. Jolly, and R.S. Chapkin. 2012. N-3 polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. *Mol. Aspects Med.* 33:46–54. doi:10.1016/j.mam.2011.10.002.
- Sharma, N.P., L. Dong, C. Yuan, K.R. Noon, and W.L. Smith. 2010. Asymmetric acetylation of the cyclooxygenase-2 homodimer by aspirin and its effects on the oxygenation of arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids. *Mol. Pharmacol.* 77:979–86. doi:10.1124/mol.109.063115.
- Shibata, M., T. Ohkubo, H. Takahashi, and R. Inoki. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38:347–52. doi:10.1016/0304-3959(89)90222-4.

- Sousa, M., A. Pozniak, and M. Boffito. 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of drug interactions involving rifampicin, rifabutin and antimalarial drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:872–878. doi:10.1093/jac/dkn330.
- Souza, M.H.L.P., J.M.S.C. Mota, R.B. Oliveira, and F.Q. Cunha. 2008. Gastric damage induced by different doses of indomethacin in rats is variably affected by inhibiting iNOS or leukocyte infiltration. *Inflamm. Res.* 57:28–33. doi:10.1007/s00011-007-7089-z.
- Steeds, C.E. 2016. The anatomy and physiology of pain. *Surg. (United Kingdom)*. 34:55–59. doi:10.1016/j.mpsur.2015.11.005.
- Straube, A., B. Aicher, B.L. Fiebich, and G. Haag. 2011. Combined analgesics in (headache) pain therapy: shotgun approach or precise multi-target therapeutics? *BMC Neurol.* 11:43. doi:10.1186/1471-2377-11-43.
- Suh, H., H.W. Jun, M.T. Dzimianski, and G.W. Lu. 1997. Pharmacokinetic and local tissue disposition studies of naproxen following topical and systemic administration in dogs and rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 18:623–633. doi:10.1002/(SICI)1099-081X(199710)18:7<623::AID-BDD46>3.0.CO;2-V.
- Tallarida, R.J. 2000. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. Chapman and Hall/CRC, editor. CRC Press.
- Tallarida, R.J. 2001. Drug synergism: its detection and applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:865–72. doi:10.1074/jbc.M503833200.
- Tallarida, R.J. 2002. The interaction index: A measure of drug synergism. *Pain.* 98:163–168. doi:10.1016/S0304-3959(02)00041-6.
- Tallarida, R.J. 2006. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319:1–7. doi:10.1124/jpet.106.104117.pature.
- Tallarida, R.J. 2007. Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacol. Ther.* 113:197–209. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.08.002.
- Tallarida, R.J. 2011. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer.* 2:1003–8. doi:10.1177/1947601912440575.
- Tallarida, R.J. 2012. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342:2–8.

doi:10.1124/jpet.112.193474.

- Tallarida, R.J., A. Cowan, and R.B. Raffa. 2003. Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307:699–704. doi:10.1124/jpet.103.054320.mara.
- Tallarida, R.J., F. Porreca, and A. Cowan. 1989. Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sci.* 45:947–961. doi:10.1016/0024-3205(89)90148-3.
- Tallarida, R.J., D.J. Stone, and R.B. Raffa. 1997. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci.* 61:417–425. doi:10.1016/S0024-3205(97)01030-8.
- Thienhaus, O., and B.E. Cole. 2002. The Classification of Pain. *In Pain Management: a Practical Guide for Clinicians.* 27–36.
- Thorn, C.F. 2017. Naproxen Pathway, Pharmacokinetics Overview | PharmGKB. *PHARMGKB.*
- Tomić, M.A., S.M. Vučković, R.M. Stepanović-Petrović, N.D. Ugrešić, M.Š. Prostran, and B. Bošković. 2010. Synergistic interactions between paracetamol and oxcarbazepine in somatic and visceral pain models in rodents. *Anesth. Analg.* 110:1198–1205. doi:10.1213/ANE.0b013e3181cbd8da.
- Torres-Guzman, A.M., C.E. Morado-Urbina, P.A. Alvarado-Vazquez, R.I. Acosta-Gonzalez, A.E. Chávez-Piña, R.M. Montiel-Ruiz, and J.M. Jimenez-Andrade. 2014. Chronic oral or intraarticular administration of docosahexaenoic acid reduces nociception and knee edema and improves functional outcomes in a mouse model of Complete Freund's Adjuvant-induced knee arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 16:R64. doi:10.1186/ar4502.
- Tracey, I., and P.W. Mantyh. 2007. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron.* 55:377–391. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.012.
- Tsunoaki, M., and D.M. Bautista. 2009. Mammalian somatosensory mechanotransduction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19:362–369. doi:10.1016/j.conb.2009.07.008.
- Tvrzicka, E., L.S. Kremmyda, B. Stankova, and A. Zak. 2011. Fatty acids as

- biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomed. Pap.* 155:117–130. doi:10.5507/bp.2011.038.
- Ulrich, C.M., J. Bigler, and J.D. Potter. 2006. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat. Rev. Cancer.* 6:130–140. doi:10.1038/nrc1801.
- Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting. 1998. Cyclooxygenases 1 AND 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:97–120. doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.
- Wallace, J.L. 2001. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 15:691–703. doi:10.1053/bega.2001.0229.
- Wallace, J.L. 2008. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol. Rev.* 88:1547–65. doi:10.1152/physrev.00004.2008.
- Wallace, J.L., W. McKnight, B.K. Reuter, and N. Vergnolle. 2000. NSAID-induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology.* 119:706–714. doi:10.1053/gast.2000.16510.
- Wassall, S.R., and W. Stillwell. 2009. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: Domain formation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788:24–32. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.011.
- Wolf, C.J. 2010. Review series introduction What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.* 120:10–12. doi:10.1172/JCI45178.3742.
- Wolf, C.J., American College of Physicians, and American Physiological Society. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.* 140:441–51. doi:10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010.
- Wolf, C.J., and R.J. Mannion. 1999. Neuropathic pain: Aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet.* 353:1959–1964. doi:10.1016/S0140-6736(99)01307-0.
- Wyatt, J.E., W.L. Pettit, and S. Harirforoosh. 2012. Pharmacogenetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacogenomics J.* 12:462–467.

- doi:10.1038/tpj.2012.40.
- Yan, H., B. Zhang, S. Li, and Q. Zhao. 2010. A formal model for analyzing drug combination effects and its application in TNF-alpha-induced NFkappaB pathway. *BMC Syst. Biol.* 4:50. doi:10.1186/1752-0509-4-50.
- Yoneda, T., K. Hata, M. Nakanishi, M. Nagae, T. Nagayama, H. Wakabayashi, T. Nishisho, T. Sakurai, and T. Hiraga. 2011. Molecular events of acid-induced bone pain. *IBMS Bonekey.* 8:195–204. doi:10.1138/20110507.
- Yoon, M.H., K.D. Park, H.G. Lee, W.M. Kim, T.H. An, Y.O. Kim, L.J. Huang, and C.J. Hua. 2008. Additive antinociception between intrathecal sildenafil and morphine in the rat formalin test. *J. Korean Med. Sci.* 23:1033–1038. doi:10.3346/jkms.2008.23.6.1033.
- Yoshikawa, T., Y. Naito, A. Kishi, T. Tomii, T. Kaneko, S. Iinuma, H. Ichikawa, M. Yasuda, S. Takahashi, and M. Kondo. 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut.* 34:732–7. doi:10.1136/gut.34.6.732.
- Yuan, C., R.S. Sidhu, D. V. Kuklev, Y. Kado, M. Wada, I. Song, and W.L. Smith. 2009. Cyclooxygenase allosterism, fatty acid-mediated cross-talk between monomers of cyclooxygenase homodimers. *J. Biol. Chem.* 284:10046–10055. doi:10.1074/jbc.M808634200.
- Zhang, L., K.S. Reynolds, P. Zhao, and S.-M.M. Huang. 2010a. Drug interactions evaluation: an integrated part of risk assessment of therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol.* 243:134–145. doi:10.1016/j.taap.2009.12.016.
- Zhang, Y., M. Huo, J. Zhou, and S. Xie. 2010b. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput. Methods Programs Biomed.* 99:306–314. doi:10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
- Zimmermann, M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16:109–110. doi:10.1016/0304-3959(83)90201-4.

13. Anexos

Anexo I. Productos de investigación



DRUG DEVELOPMENT RESEARCH 78 : 332–339 (2017)

Research Article

Supra-Additive Interaction of Docosahexaenoic Acid and Naproxen and Gastric Safety on the Formalin Test in Rats

Arlette Guadalupe Arroyo-Lira,¹ Fernando Rodríguez-Ramos,² Mario I. Ortiz ,³ Gilberto Castañeda-Hernández,⁴ and Aracely Evangelina Chávez-Piña ^{1,5*}

¹Doctorado en Biotecnología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

²Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México, México

³Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México

⁴Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

⁵Laboratorio de Farmacología, Programa Institucional en Biomedicina Molecular, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

Strategy, Management and Health Policy				
Enabling Technology, Genomics, Proteomics	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

ABSTRACT The aim of this work was to evaluate the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on the pharmacokinetics and pharmacodynamics—nociception—of naproxen in rats, as well as to determine the gastric safety resulting from this combination versus naproxen alone. Female Wistar rats were orally administered DHA, naproxen or the DHA-naproxen mixture at fixed-ratio combination of 1:3. The antinociceptive effect was evaluated using the formalin test. The gastric injury was determined 3 h after naproxen administration. An isobolographic analysis was performed to characterize the antinociceptive interaction between DHA and naproxen. To determine the possibility of pharmacokinetic interactions, the oral bioavailability of naproxen was evaluated in presence and absence of oral DHA. The experimental effective dose ED₃₀ values (*Z_{exp}*) were decreased from theoretical additive dose values (*Z_{add}*; *P* < 0.05). The isobolographic analysis showed that the combination exhibited supra-additive interaction. The oral administration of DHA increased the pharmacokinetic parameter AUC₀₋₄ of naproxen (*P* < 0.05). Furthermore, the gastric damage induced by naproxen was abolished when this drug was combined with DHA. These data suggest that oral administration of DHA-naproxen combination induces gastric safety and supra-additive antinociceptive effect in the formalin test so that this combination could be useful to management of inflammatory pain. Drug Dev Res 78 : 332–339, 2017. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

*Correspondence to: Aracely Evangelina Chávez-Piña, Guillermo Massieu Helguera No. 239, Fraccionamiento “La Escalera”, Ticomán, México, D.F., C.P. 07320. E-mail: achavezp@ipn.mxrapina@yahoo.com

Grant sponsor: National Council for Science and Technology, Grant number: Project CONACyT 178027; Grant sponsor: Instituto Politécnico Nacional, Grant number: SIP 20171838; Grant sponsor: Arroyo-Lira Arlette Guadalupe is a CONACyT fellow, Grant number: 269377.

Received 2 June 2017; Accepted 27 June 2017

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ddr.21396

© 2017 Wiley Periodicals, Inc.

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Revista Científica :: Mexican Journal Of Medical Research ICsSa

<https://www.uaeh.edu.mx/scige/revista/icsa/n6/index.html>

MENÚ	
INICIO (/) > REVISTAS Y BOLETINES CIENTÍFICOS (/SCIGE/INDEX/HTML) > MEXICAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH (/SCIGE/REVISTA/ICSA/N6/) >	
COVER	
Enlaces (/enlaces/)	
Dependencias (/dependencias/)	PREVIOUS ISSUES (/scige/revista/icsa/historial.html)
Directorio (/directorio/)	COVER (/scige/revista/icsa/n6/index.html)
Defensor Universitario (/defensor_univ/)	EDITORIAL BOARD (/scige/revista/icsa/n6/comite.html)
Patronato (/patronato/)	DISCLAIMER (/scige/revista/icsa/n6/disclaimer.html)
Publicaciones en línea (/publicaciones_en_linea/)	AIMS AND SCOPE, MULTIDISCIPLINARY JOURNAL AND GUIDE FOR AUTHORS (/scige/revista/icsa/n6/aims.html)
Alumnado (/alumnado/)	
Aspirantes (/aspirantes/)	CONTENTS (/scige/revista/icsa/n6/contents.html)
Personal (/personal/)	EDITORIAL (/scige/revista/icsa/n6/editorial.html)
Alumni (/egresados/)	
Visitantes (/visitantes/)	FRANCISCO DE ASIS FLORES Y TRONCOSO AND HIS INFLUENCE IN THE HISTORY OF MEDICINE IN MEXICO (/scige/revista/icsa/n6/a1.html)
	COMPARISON OF BODY FAT IN ATHLETES AFTER AN L-CARNITINE SUPPLEMENTATION (/scige/revista/icsa/n6/a2.html)
	ANALGESIC COMBINATIONS AS A STRATEGY FOR PAIN RELIEF AND ISOBOLOGRAPHIC ANALYSIS (/scige/revista/icsa/n6/a3.html)



MEXICAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH ICsSa

VOLUME 3 · JULY 2015 · NUMBER 6

ISSN 2007-5235



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Humberto A. Veras Godoy
President

Roberto Rodríguez Gaona
Provost for Internationalization

José María Busto Villarreal
Dean of the Institute of Health Sciences

Luis Carlos Romero Quezada
Dean of the school of medicine

MEXICAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH ICsSa, Volume 3, Enero 2015 - July 2015, Number 6, published by Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo / Torres de Rectoría, 6º piso, carretera Pachuca-Actopan Km. 4.5, Col. Campo de Tiro, Pachuca de Soto, Hidalgo, Zip

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

MENÚ	
INICIO (/) > REVISTAS Y BOLETINES CIENTÍFICOS (/SCIGE/INDEX.HTML) > MEXICAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH (/SCIGE/REVISTA/ICSA/N6/) > CONTENTS (/SCIGE/REVISTA/ICSA/N6/CONTENTS.HTML) >	
Enlaces (/enlaces/)	
Dependencias (/dependencias/)	A-Z
Directorio (https://www.uaeh.edu.mx/directorio/)	
Defensor Universitario (/defensor_univ/)	
Patronato (/patronato/)	
Publicaciones en línea (http://repository.uaeh.edu.mx/)	
Alumnado (/alumnado/)	
Aspirantes (/aspirantes/)	
Personal (/personal/)	
Alumni (/egresados/)	
Visitantes (/visitantes/)	

PREVIOUS ISSUES (/scige/revista/icsa/historial.html)
COVER (/scige/revista/icsa/n6/index.html)
EDITORIAL BOARD (/scige/revista/icsa/n6/comite.html)
DISCLAIMER (/scige/revista/icsa/n6/disclaimer.html)
AIMS AND SCOPE, MULTIDISCIPLINARY JOURNAL AND GUIDE FOR AUTHORS (/scige/revista/icsa/n6/aims.html)
CONTENTS (/scige/revista/icsa/n6/contents.html)
EDITORIAL (/scige/revista/icsa/n6/editorial.html)
FRANCISCO DE ASIS FLORES Y TRONCOSO AND HIS INFLUENCE IN THE HISTORY OF MEDICINE IN MEXICO (/scige/revista/icsa/n6/a1.html)
COMPARISON OF BODY FAT IN ATHLETES AFTER AN L-CARNITINE SUPPLEMENTATION (/scige/revista/icsa/n6/a2.html)
ANALGESIC COMBINATIONS AS A STRATEGY FOR PAIN RELIEF AND ISOBOLOGRAPHIC ANALYSIS (/scige/revista/icsa/n6/a3.html)

ANALGESIC COMBINATIONS AS A STRATEGY FOR PAIN RELIEF AND ISOBOLOGRAPHIC ANALYSIS

Arlette Guadalupe Arroyo-Lira, Aracely Evangelina Chávez-Piña

ABSTRACT

Pain is a multidimensional sensory experience that is intrinsically unpleasant and associated with hurting and soreness, it is essentially a sensation. Pain has strong, cognitive and emotional components, it is linked to, or described in terms of suffering. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and opioid analgesics are two of the most common types of drugs used for pain management. However, the use of these analgesics is limited by the presence of significant adverse effects. A useful practice is a combination of two agents with the same therapeutic effect wherein each agent is administered to obtain additive, synergistic or subadditive interaction in a fixed ratio. If the combination resulted in addition or synergism, the doses employed by each agent are reduced, then the side effects are absent; this kind of study is named isobolographic analysis. In this review, the authors summarized previous reports of the combination of NSAIDs with opioids and natural products as an alternative in the pain management.

Keywords: analgesic, combination, interaction, isobolographic analysis, nsaid, opioids

INTRODUCTION

Almost everybody will probably suffer from pain during a period of their lives¹. Pain is defined by the International Society for the Study of Pain (IASP)² as "an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage or described in terms of such damage". Pain represents the first cause of medical consultation³. For example, in industrialized countries, chronic pain is a major public health concern due to the high cost of medical treatment and the loss of productivity in the workplace⁴, it exerts tremendous socioeconomic costs, exceeding \$100 billion USD annually². Pain relief can be achieved by a diversity of methods, being drug use the basis of analgesic treatment⁵. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and opioid analgesics are two of the most common types of drugs used for pain management⁶. However, the use of these analgesics is limited by the presence of significant side effects; for example, it is well known that gastric damage is the major NSAID-induced side effect⁷, and opioids are frequently accompanied by many side effects such as bradycardia, hypothermia, urinary retention, respiratory depression, physical dependence, constipation, sedation and tolerance⁸. On other hand, the use of natural agents for pain relief is currently a common practice.

In order to diminish the side effects, the use of analgesic combinations of proven efficacy is a strategy intended to achieve one or more therapeutic goals; for example, improving efficacy without increasing adverse effects or decreasing adverse effects without losing efficacy⁹. With polypharmacy and an increase in the number of people taking alternative therapies, it is important to know the kind of drug interaction. An important tool is the method of isobolographic analysis.

PAIN AND ITS MANAGEMENT

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



ACUSE

OF. NÚM.D/SEPI/DI/3636/2017

Instituto Politécnico Nacional



Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"
"60 Aniversario del CECYT 14 Luis Enrique Erro"
"60 Aniversario del Patronato de Obras e Instalaciones"
"50 Aniversario de COFFA-IPN"
"30 Aniversario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología"

México D.F. a 24 de octubre de 2017

LIC. JAIME TORRES JAIME
DIRECTOR DE LA UNIDAD POLITÉCNICA PARA EL
DESARROLLO Y LA COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL
P R E S E N T E

Por este medio solicito a usted, de no existir inconveniente, gire sus finas instrucciones a quien corresponda, a fin de iniciar los trámites de registro de solicitud de patente ante el IMPI de la invención denominada "Efecto analgésico (antinociceptivo) local de la combinación del ácido docosahexaenoico (DHA) y naproxeno" desarrollada por los investigadores Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña, trabajadora académica del IPN, adscrita a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía y la M. en C. Arlette Guadalupe Arroyo Lira, alumna del Doctorado en Biotecnología del nodo de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

Por lo anterior, adjunto encontrará la siguiente documentación:

- Descripción de la Invención, resumen y reivindicaciones (por triplicado y en CD).
- Cartas de cesión de derechos de los investigadores (por triplicado y con firmas autógrafas)
- Ficha de identificación de los inventores (por duplicado)
- Copia del comprobante de percepciones de los inventores (por duplicado).

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

M. en C. LORENA GARCÍA MORALES
DIRECTORA DE LA ENMH HOMEOPATÍA
DIRECCIÓN

D. en C. Mónica Ascención De Nova Ocampo
Jefa de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación
ANV / ejd***

DIRECCIÓN
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA ACREDITADO POR COMEFOP"
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMEFOP"
Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 CDMX
RED IPN 57-29-60-00 ext. 46111
www.enmh.ipn.mx

Responsable de la información:
M. en C. Angela Núñez Vázquez
Jefa del Departamento de Investigación

UNIDAD POLITÉCNICA PARA EL
DESARROLLO Y LA
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL

03 NOV 2017
HORA 13:40
RECEPCIÓN DE DOCUMENTOS
ANEXO SI NO



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh



Synergistic antinociceptive effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and indomethacin in rats



Arlette Guadalupe Arroyo-Lira^a, Fernando Rodríguez-Ramos^b, Aracely Evangelina Chávez-Piña^{a,c,*}

^a Laboratorio de Farmacología, Programa Institucional en Biomedicina Molecular, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., Mexico

^b Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, México, D.F., Mexico

^c Doctorado en Biotecnología en Red, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2014

Received in revised form 11 March 2014

Accepted 15 March 2014

Available online 20 March 2014

Keywords:

Docosahexaenoic acid

Indomethacin

Analgesic

Interaction

Gastric injury

Antinociceptive

ABSTRACT

The use of analgesics is limited by the presence of significant adverse side effects. Thus, combinations of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with other antinociceptive agents are frequently used to decrease these adverse reactions. The aims of this work were to evaluate the antinociceptive interaction of the systemic administration of the combination of DHA and indomethacin through an isobolographic analysis of the theoretical and experimental antinociceptive effect and to demonstrate the gastric safety of the mixture compared with indomethacin alone. Female Wistar rats were orally administered indomethacin (1–10 mg/kg), DHA (100–300 mg/kg), or the DHA–indomethacin mixture at a fixed-ratio combination (1:1, 1:3, 3:1), and the antinociceptive effects of these treatments were evaluated through the formalin (1%) test. An isobolographic analysis was performed to characterize the antinociceptive interaction between DHA and indomethacin. The degree of gastric injury in all of the rats was determined 1 h after the formalin test. The theoretical ED₃₀ values (*Zadd*) for the 1:1, 1:3, and 3:1 combinations were 73.48 ± 8.96, 37.75 ± 4.50, and 109.2 ± 13.43 mg/kg, p.o., respectively, and the experimental ED₃₀ values (*Zexp*) were 43.63 ± 5.18, 13.13 ± 1.61, and 54.20 ± 6.53, respectively. The isobolographic analysis showed that the three fixed-ratio combinations studied exhibited a synergistic interaction. Furthermore, the gastric damage induced by indomethacin was abolished when this drug was combined with DHA. These data suggest that the systemic administration of the DHA–indomethacin combination induces a synergistic and gastric safety effect.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Pain is a multidimensional sensory experience that is intrinsically unpleasant and associated with hurting and soreness (Woolf et al., 2004). Conventionally, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as indomethacin or diclofenac, and opioids, such as morphine, are commonly used for pain relief (Fornasari, 2012; Pasternak, 2012). However, the use of these analgesics is limited by the presence of significant adverse side effects; for example, non-selective NSAIDs cause gastric injury or thromboembolic problems (McDaid et al., 2010; Wallace et al., 2000), and opioids are frequently accompanied by side effects such as constipation, sedation, nausea, vomiting, and respiratory depression (McDaid et al., 2010). Several reports show that a combination of drugs that induce similar effects is used for treatment (Tallarida, 2000), thereby allowing the use of lower doses from each agent to improve their therapeutic effect without enhancing their adverse reactions. Recently, the

combination of NSAIDs with opioids and other antinociceptive agents has been used in clinical practice; for example, the administration of codeine and diclofenac via a systemic route resulted in a synergistic interaction in rat (Jimenez-Andrade et al., 2003), and the same result was found with gabapentin and diclofenac at the peripheral level (Picazo et al., 2006). In addition, rilmenidine, a second-generation imidazoline- α -2-adrenoreceptor agonist, is able to increase the analgesic effects of ibuprofen in mice, as determined through the writhing test (Soukupova et al., 2009). Furthermore, the combination of *Heliotropis longipes* with diclofenac was found to induce a synergistic interaction in a murine model of thermal hyperalgesia (Acosta et al., 2009). Recently, the combination of NSAIDs with natural products is an alternative for the enhancement of the antinociceptive and anti-inflammatory effects without increasing gastric injury. Citral, a monoterpene that occurs naturally in herbs, plants, and citrus fruits, combined with naproxen induces an additive effect with less gastric injury than that induced by naproxen alone (Ortiz et al., 2010).

More recently, our group found that docosahexaenoic acid (DHA) protects against indomethacin-induced gastric injury in rat (Pineda-Pena et al., 2012). DHA is an omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) that is present in fish oil and exhibits several activities,

* Corresponding author at: Guillermo Massieu Helguera No. 239, Fraccionamiento "La Escalera", Ticomán, México, D.F. C.P. 07320, Mexico. Tel.: +52 57296000 x 55583.
E-mail addresses: achavezp@ipn.mx, arapina@yahoo.com (A.E. Chávez-Piña).

IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.



1121 14th Street NW
Suite 1010
Washington, DC 20005

Phone (202) 962-4000
Fax (202) 962-4941
Web SfN.org

*Neuroscience 2017
November 11 - 15
Washington, DC*

Please let this serve to certify that

ARLETTE ARROYO LIRA, MS

has attended Neuroscience 2017, the 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at the Walter E. Washington Convention Center in Washington, DC

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads 'Kyle Hayden'.

Kyle Hayden, CMP
Director, Meeting Programs and Attendee Services
Society for Neuroscience

Date: November 12, 2017



Certificate for Poster Presentation

Oral administration of docosahexaenoic acid (DHA) increase antinociception and bioavailability of naproxen



PROUDLY PRESENTED TO

Arlette Guadalupe Arroyo Lira

at the 15TH International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases

Puerto Vallarta, Mexico

October 22 - 25, 2017

Handwritten signature of Charles N. Serhan.

Charles N. Serhan, PhD
Harvard University

Handwritten signature of Lawrence J. Marnett.

Lawrence J. Marnett, PhD
Vanderbilt University

Handwritten signature of Gabor J. Tigyi.

Gabor J. Tigyi, MD, PhD
University of Tennessee

Handwritten signature of Edward A. Dennis.

Edward A. Dennis, PhD
University of California, San Diego

Handwritten signature of Kenneth V. Honn.

Kenneth V. Honn, PhD
Wayne State University



**SOCIETY for
NEUROSCIENCE**

1121 14th Street NW
Suite 1010
Washington, DC 20005

Phone (202) 962-4000
Fax (202) 962-4941
Web SfN.org

*Neuroscience 2015
October 17 - 21, 2015
Chicago, IL*

Please let this serve to certify that

Arlette Arroyo Lira, MS

has attended Neuroscience 2015, the 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at the McCormick Convention Center, Chicago, IL. Additionally, this attendee has participated in the following scientific session(s) listed below:

Session Type: Poster

Session Title: Pain Models: Behavior II

Session Date/Time: 10/17/2015 13:00

Presentation Number: 64.10

Presentation Title: Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and naproxen in rats

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

Kyle Hayden, CMP
Assistant Director of Annual Meeting Programs
Society for Neuroscience

Date: October 19, 2015



IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.



EL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
A TRAVÉS DE SU PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Otorga la presente:

CONSTANCIA

a:

ARLETTE GUADALUPE ARROYO LIRA



Por su participación en las XII Jornadas Académicas del Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con la ponencia:
IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN EN LA INTERACCIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO.

Presentada el día del 24 de octubre del 2016 en la Ciudad de Cuernavaca Morelos.

Atentamente
"La Técnica al Servicio de la Patria"

DR. MIGUEL ÁNGEL REYES LÓPEZ
COORDINADOR GENERAL DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DEL IPN



COORDINACIÓN GENERAL
DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA DEL
IPN





Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química



Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Arlette G. Arroyo-Lira; Elizabeth A. Pineda-Peña; Arcely E. Chávez-Piña

Por su participación en la realización y presentación del cartel:

**"Evaluación del efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio
y seguridad gástrica de la combinación del ácido
docosahexaenoico y naproxeno en ratas"**

Durante el segundo simposio "Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos" realizado los días 22 y 23 de junio de 2016 en la explanada del A de la Facultad de Química.

Dr. Andrés Navarrete Castro
Jefe del Departamento de Farmacia

"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, D.F. a 23 de junio de 2016

Dr. Alfonso S. Lira Rocha
Comité Organizador

Química
Farmacéutica
Facultad
Química



IX JORNADAS ACADÉMICAS DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Otorgan la presente

CONSTANCIA

A : ARLETTE GUADALUPE ARROYO LIRA

Por su participación en la IX Jornada Académica del Doctorado en Ciencias en Biotecnología con la ponencia: **“Identificación del posible mecanismo de acción en la interacción del efecto antinociceptivo de la combinación DHA-naproxeno”**, realizado en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, los días 18 y 19 de mayo del año en curso.

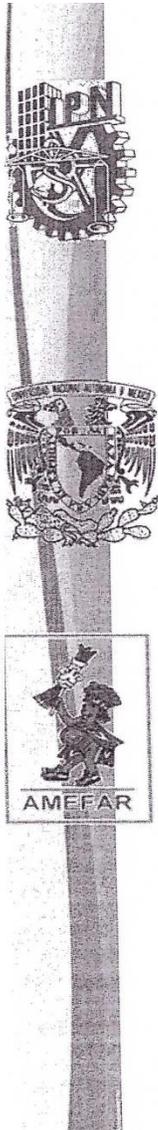
Guasave, Sinaloa, México a 19 de mayo 2015

Dr. Hugo Necoechea Mondragón
Coordinador de Operación y Redes
de Investigación y Posgrado

Dr. Miguel Ángel Reyes López
Coordinador del Doctorado en
Ciencias en Biotecnología

Dra. Diana Cecilia Escobedo Urias
Directora de IPN - CIDIR Sinaloa





XXXVII CONGRESO NACIONAL DE FARMACOLOGÍA

XVIII CONGRESO ESTUDIANTIL DE FARMACOLOGÍA “DR. GERMÁN CHAMORRO CEVALLOS”

XIII CONGRESO DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA – IPN

Dr. Eleazar Lara Padilla, Director Interino de la ESM-IPN y Presidente Honorario del Congreso

Otorgan constancia a:

Arlette Guadalupe Arroyo Lira , Aracely Evangelina Chávez Piña

Por su brillante participación con el Trabajo Libre titulado:

**VALORACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL
DE LA COMBINACIÓN DHA-NAPROXENO EN UN MODELO MURINO**

En la categoría de Investigación Experimental - Postgrado, con el tema Dolor

Tutor(es): Aracely Evangelina Chávez Piña

Institución donde se realiza la investigación: Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional

Ciudad de México, 12 y 13 de mayo de 2015.

Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional

Por el Comité Organizador

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro

Presidente de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.



Instituto Politécnico Nacional
"La técnica al servicio de la patria"



Instituto Politécnico Nacional Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Otorga el presente reconocimiento a:

ARLETTE GUADALUPE ARROYO LIRA

por su asistencia y participación en las

VII JORNADAS ACADÉMICAS DEL
DOCTORADO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA

Con el trabajo: **Identificación del posible mecanismo de acción en el efecto sinérgico de la combinación DHA-indometacina.**

Celebradas el 19 y 20 de mayo de 2014
en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-Tlaxcala.


Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa
Coordinadora de nodo CIBA
del Doctorado en Ciencias en Biotecnología


Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
Director interino del CIBA-Tlaxcala


Dr. Miguel Ángel Reyes López
Coordinador general del
Doctorado en Ciencias en Biotecnología CBG Reynosa





XXXVI Congreso Nacional de Farmacología
XII Congreso de Investigación en Medicina de la ESM-IPN
XVI Congreso Estudiantil de Farmacología en honor al Dr. Sergio Estrada Parra
Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo, Presidenta Honoraria del Congreso



Otorga constancia a:

**ARLETTE GUADALUPE ARROYO LIRA, FERNANDO RODRÍGUEZ RAMOS ,
ARACELY EVANGELINA CHÁVEZ PIÑA**

Facultad de Medicina



Por su participación como PONENTE(S) DEL CARTEL TITULADO:

**SINERGISMO EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO Y SEGURIDAD GÁSTRICA DE
LA COMBINACIÓN DHA-INDOMETACINA EN UN MODELO MURINO**



*Unidad Politécnica para el Desarrollo Empresarial y para la Competitividad del IPN
y Centro General de Formación e Innovación Educativa del IPN
Ciudad de México, D. F., del 12 al 14 de mayo de 2014.*

Por el Comité Organizador

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro
Presidente de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.