



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Efecto espasmolítico y mecanismo de acción de
Eugenol, Diclofenaco y su combinación en útero
aislado de ratas”

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD

Presenta:

MARTHA IVONNE SÁNCHEZ TRIGUEROS

Director de Tesis

DR. MARIO ISIDORO ORTIZ RAMÍREZ

San Agustín Tlaxiaca Hidalgo. Agosto de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Health Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

25/julio/2018

AAM/MCBS/082/2018

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Martha Ivonne Sánchez Trigueros
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto espasmolítico y mecanismo de acción de Eugenol, Diclofenaco y su combinación en tejido uterino aislado de rata" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

PRIMER VOCAL DR. MARIO ORTIZ RAMÍREZ

SECRETARIO DR. LUIS ENRIQUE SORIA JASSO

SUPLENTE DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS

SUPLENTE DR. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Instituto de Ciencias de la Salud
Ehacienda la Concepción s/n Camino a Tlaxautla.
San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4306
mtris_bio_sal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca **606823**.

Agradezco al Centro de Investigación de Biología de la Reproducción del Área Académica de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por prestar el apoyo, recursos, e infraestructura para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Doctor Mario I. Ortiz** por darme la oportunidad de ser mi tutor, por ser siempre un ejemplo de excelencia, por sus valiosas enseñanzas, su tiempo, su exigencia, sus consejos no solo académicos sino de vida y por la confianza que tuvo en mí para la realización de todo este proceso.

Al **Doctor Héctor Antonio Ponce**, por su guía e instrucción para la elaboración de toda la parte metodológica de esta tesis, por ser un excelente maestro, exigente, siempre preocupado e interesado por mi formación, y por su disposición incondicional para enseñar.

Por su excelente trabajo dentro del laboratorio, su compañía y su amistad, al **Ingeniero Marcelo Santos** porque sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

Gracias por la paciencia y enseñanza para instruirme en mis inicios en el trabajo del laboratorio y por su excelente trabajo al **Biólogo Yudh Manzur**.

Por ser uno de los mejores maestros que tuve durante la maestría, por su apoyo, enseñanza, tiempo, paciencia, por su exigencia, su impulso hacia la excelencia y por los valiosos aportes a esta tesis, al **Doctor Eduardo Fernández**.

A la **Doctora Raquel Cariño**, por su apoyo, su motivación, sus consejos y su apreciable contribución para la realización de esta tesis.

Al **Doctor Luis E. Soria** por sus consejos académicos y de vida, por su apoyo y las importantes contribuciones para esta tesis.

Gracias a las contribuciones sin las cuales no hubiera sido posible este proyecto, al **Doctor Martín Torres**, por su apoyo y los significativos aportes a esta tesis.

Con gratitud a mis padres **Guillermo Sánchez y Martha Trigueros** por hacer esto conmigo una vez mas, por su amor, su infinito apoyo, sus consejos, su motivación y su paciencia, por creer en mí, por todo lo que hicieron para que nuevamente me encuentre cumpliendo otro sueño y a quienes dedico esta tesis.

A mis hermanos **Israel, Daniel** y a mí cuñada **Claudia** por su presencia, cariño, apoyo y motivación en esta nueva etapa.

A **Enrique Olgún** por ser uno de mis más grandes pilares para concluir esta proyecto, por su ayuda, consejos, apoyo, paciencia, ejemplo, por ayudarme a confiar en mí y creer en mí, por su enorme cariño y por ser siempre mi compañero y amigo ante todo.

Para todos mis compañeros de generación en la maestría de Ciencias Biomédicas y de la Salud, en particular a **Yalid, Itziar y Pedro**, por que pasaron de ser solo compañeros a ser mis grandes amigos y cómplices, gracias por su apoyo, compañía, cariño y las vivencias durante toda esta etapa.

A mi tía **Alejandra Trigueros** y a su **familia Ángeles Trigueros**, por acogerme en su hogar y ser mi segunda familia, por su compañía, apoyo, paciencia y cariño, durante estos dos años.

Agradezco a la coordinación de la maestría, al **Dr. Manuel Sánchez**, a la **Dra. Jeannett Izquierdo** y a todos los profesores de la maestría, que fueron guía para mi formación desde el principio hasta el final.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	2
1 Generalidades	2
1.1 Útero.....	2
1.1.1 Ciclo menstrual y hormonas.....	2
1.1.2 Capas del cuerpo uterino.....	3
1.1.3 Músculo liso uterino.....	3
1.1.3.1 Contracción uterina	4
1.1.4 Receptores uterinos	5
1.2 Dismenorrea	5
1.2.1 Definición.....	5
1.2.2 Clasificación.....	6
1.2.3 Etiopatogenia.....	6
1.2.4 Prevalencia de la dismenorrea.....	8
1.2.4.1 Prevalencia en México	8
1.2.4.2 Prevalencia en Hidalgo.....	8
1.2.5 Factores asociados a la dismenorrea.....	8
1.2.5.1 Factores de riesgo.....	8
1.2.5.2 Factores de protección.....	9

1.2.6 Severidad, repercusión e incapacidad.....	9
1.2.7 Tratamiento de la dismenorrea	10
1.3 Medicamentos para tratar la dismenorrea.....	10
1.3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	10
1.3.2 Diclofenaco	11
1.3.2.1 Estructura y propiedades	12
1.3.2.2 Mecanismo de acción	12
1.3.3 Alternativas terapéuticas: Syncol®	13
1.4 AINEs y combinación de fármacos como primer tratamiento	14
1.4.1 Consumo.....	14
1.4.2 Efectividad de los AINEs en la dismenorrea.....	15
1.4.2.1 Efecto espasmolítico y efecto anti-inflamatorio.....	16
1.4.3 Efectos secundarios	16
1.5 Principales terapias alternativas	17
1.5.1 Suplementos dietéticos	17
1.5.1.1 Alcance y limitaciones	18
1.6 Eugenol.....	18
1.6.1 Estructura	19
1.6.2 Mecanismo de acción y actividad biológica.....	20
1.6.3 Usos clínicos.....	20
1.6.3.1 Efecto anti-inflamatorio	21
1.6.4 Efectos secundarios	22
1.7 Interacciones farmacológicas	22
1.7.1 Tipos de interacciones farmacológicas.....	22
1.7.2 Análisis isoblográfico.....	23
1.7.2.1 Isoblograma	23

2 Antecedentes del problema	27
2.1 Efectividad del eugenol en la dismenorrea.....	27
2.2 Efectividad del diclofenaco en la dismenorrea.....	27
2.3 Antecedentes de estudios de la combinación de AINEs más productos naturales	28
3 Marco Teórico	30
III JUSTIFICACIÓN	31
IV OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo general	33
4.1.1 Objetivos específicos.....	33
V HIPÓTESIS	33
VI MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Contexto de la investigación	34
6.2 Tipo de estudio	34
6.2.1 Animales de experimentación	34
6.2.2 Fármacos.	35
6.2.3 Reactantes	35
6.3 Sistema de registro isométrico para medir la contracción del tejido uterino aislado de la rata	36
6.3.1 Principio	36
6.3.2 Procedimiento.....	36
6.4 Evaluación del efecto espasmolítico del diclofenaco y eugenol ante los diferentes fármacos.	37
6.5 Análisis isoblográfico	39
6.5.1 Procedimiento.....	39
6.6 Análisis estadístico	40
6.7 Aspectos éticos	40

VII RESULTADOS	41
7.1 Efecto espasmolítico del eugenol y del diclofenaco	41
7.2 Respuesta a diferentes bloqueadores	43
7.3 Interacción farmacológica entre eugenol y diclofenaco.	45
7.4 Combinación de proporción 10:1 contra bloqueadores	51
VIII DISCUSIÓN	54
8.1 Efecto espasmolítico individual del diclofenaco y el eugenol sobre la contracción tónica sostenida inducida por K⁺	54
8.1.1 Diclofenaco	54
8.1.2 Eugenol.....	55
8.1.3 El efecto espasmolítico del eugenol es más potente que el diclofenaco.....	57
8.2 Los bloqueadores de SON, GCs y canales de K⁺ sobre el efecto espasmolítico del eugenol y diclofenaco de forma individual	58
8.2.1 Eugenol.....	58
8.2.2 Diclofenao	59
8.3 Aditividad, antagonismo y sinergismo en la combinación de diclofenaco y eugenol	61
8.3.1 Aditividad de las combinaciones en proporción 1:1, 1:3 y 3:1.....	61
8.3.2 Antagonismo de la combinacion en proporción 1:10	62
8.3.3 Sinergismo de la combinacion en proporción 10:1	64
8.4 GCs y canales de K⁺ dependientes de ATP están implicados en el efecto espasmolítico de la combinación de diclofenaco y eugenol	65
IX CONCLUSIÓN.....	67
X PERSPECTIVAS	67
XI BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentraciones de estudio en el sistema de registro isométrico de contracción de tejido uterino aislado de rata.....	37
Tabla 2	Concentraciones de estudio para cada bloqueador.....	38
Tabla 3	CI _{50 Teó} , CI _{50 Exp} e índice de interacción (γ) de la combinación diclofenaco (20 μ L) - eugenol (10 μ L), proporción 1:1, 1:3 y 3:1.....	46
Tabla 4.	CI _{50 Teó} , CI _{50 Exp} e índice de interacción (γ) de la combinación diclofenaco (20 μ L) - eugenol (10 μ L), proporción 1:1, 1:10 y 10:1.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las dos vías propuestas para la etiopatogenia de la dismenorrea	7
Figura 2	Estructura molecular del diclofenaco.....	12
Figura 3	Planta <i>Eugenia caryophyllate</i> , abajo se muestra el alabastrum (comúnmente conocido como clavo de olor)	19
Figura 4	Estructura química del eugenol.....	19
Figura 5	Isoblograma.....	25
Figura 6	Diseño metodológico.....	35
Figura 7	Método usado en el sistema de registro isométrico para tejidos aislados.....	38
Figura 8	Efecto de diferentes concentraciones de eugenol sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM.....	41
Figura 9	Efecto relajante (%) de eugenol sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM.....	42
Figura 10	Efecto útero inhibitorio de diclofenaco sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 60 mM.....	42
Figura 11	Efecto relajante (%) de diclofenaco sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM.....	43
Figura 12	Efecto de los diferentes inhibidores sobre el efecto relajante de la concentración de 230 μ M de eugenol.....	44
Figura 13	Efecto de los diferentes inhibidores sobre el efecto relajante de la concentración de 180 μ M de diclofenaco.....	44
Figura 14	Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 1:1.....	47
Figura 15	Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 1:3, 3:1.....	47
Figura 16	Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 1:10, 10:1.....	48
Figura 17	Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 10:1. Prueba de <i>t</i> adaptada ($p < 0.05$).....	49

Figura 18	Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 1:1.....	49
Figura 19	Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 1:1, 1:3, 3:1.....	50
Figura 20	Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 1:1, 1:10, 10:1.....	50
Figura 21	Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 10:1.....	51
Figura 22	Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI _{Exp} : 50, 25, 12.5 y 6.25) y el mismo en presencia de L-NAME.....	52
Figura 23	Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI _{Exp} : 50, 25, 12.5 y 6.25) y el mismo en presencia de ODQ.....	52
Figura 24	Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI _{Exp} : 50, 25, 12.5 y 6.25) y el mismo en presencia de 4-AP.....	53
Figura 25	Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI _{Exp} : 50, 25, 12.5 y 6.25) y el mismo en presencia de glipizida.....	53
Figura 26	Gráfica comparativa de la CI _{50 Exp} de la proporción 10:1 y su modificación en presencia de los bloqueadores.....	54
Figura 27	Mecanismo de acción de la combinación sinérgica de diclofenaco y eugenol en proporción 10:1 y el sitio de inhibición de los fármacos ODQ y glipizida.....	66

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
4-AP	4-aminopiridina
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CI_{Exp}	Concentración inhibitoria experimental
CI_{Teó}	Concentración inhibitoria teórica
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa isoforma 1
COX-2	Ciclooxigenasa isoforma 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DE	Dosis efectiva
EEM	Error estándar de la media
FDA	Food and Drug Administration
FHS	Hormona folículo estimulante
GCs	Guanilato ciclasa soluble
LH	Hormona luteinizante
L-NAME	NG-nitro-L-arginina
Lox	Lipooxigenasa
μM	Micro molar
mM	Mili molar
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-alquinoxalin-1-one]
PGs	Prostaglandinas
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
R_{máx}	Respuesta máxima
SON	Sintasa del óxido nítrico
XA	Ácido xilópico

RESUMEN

Introducción: La dismenorrea primaria es el dolor asociado con la menstruación; es una patología de alta prevalencia cuya patogénesis incluye la liberación de mediadores inflamatorios y espasmos del tejido uterino. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son el tratamiento de primera línea para esta patología, sin embargo, pueden causar reacciones adversas y/o falla terapéutica. Por esta razón, es necesaria una opción terapéutica alternativa. El eugenol es un aceite comúnmente extraído de la *Eugenia caryophyllate* que ha mostrado propiedades anestésicas, analgésicas y antiinflamatorias. **Objetivo:** Estudiar el efecto espasmolítico y mecanismo de acción del eugenol, diclofenaco y su combinación en el músculo liso uterino aislado de ratas. **Material y métodos:** El efecto espasmolítico se evaluó midiendo la relajación inducida por eugenol, diclofenaco o su combinación en tiras uterinas contraídas con KCl. El mecanismo de acción se determinó midiendo el efecto de diclofenaco, eugenol o su combinación contra diferentes inhibidores (L-NAME, ODQ, 4-AP y glipizida). **Resultados:** Eugenol y diclofenaco tuvieron un efecto espasmolítico dependiente de la concentración; su efecto individual no fue alterado por ningún bloqueador. La combinación en proporción 10:1 de diclofenaco y eugenol (respectivamente) produjo sinergismo; y su efecto fue bloqueado por ODQ y glipizida de manera estadísticamente significativa. **Conclusiones:** Ambos compuestos inhibieron la contracción, pero en la presencia de una cantidad mayor del AINE y menor del aceite se obtuvo sinergismo (10:1); por lo tanto, esta combinación puede estar actuando mediante la participación de la vía GMPc y canales de K^+ dependientes de ATP.

Palabras claves: Efecto espasmo, Eugenol, Diclofenaco, Interacción farmacológica, Tejido uterino de rata.

ABSTRACT

Introduction: Primary dysmenorrhea is the pain associated with menstruation; it is a pathology of high prevalence, the pathogenesis includes the release of inflammatory mediators and spasms of uterine tissue. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the first-line treatment for this pathology, however, they can cause adverse reactions and / or therapeutic failure. For this reason, an alternative therapeutic is necessary. Eugenol is an oil commonly extracted from *Eugenia caryophyllate*, it has shown anesthetic, analgesic and anti-inflammatory properties. **Objective:** To study the spasmolytic effect and mechanism of action of eugenol, diclofenac and its combination in uterine smooth muscle isolated from rats. **Material and methods:** The spasmolytic effect was evaluated by measuring the relaxation induced by eugenol, diclofenac or its combination in uterine strips contracted with KCl. The mechanism of action was determined by measuring the effect of diclofenac, eugenol or its combination against different inhibitors (L-NAME, ODQ, 4-AP and glipizide). **Results:** Eugenol and diclofenac had a concentration-dependent spasmolytic effect; their individual effects were not altered by any blocker. The 10: 1 ratio of diclofenac and eugenol, respectively, produced synergism; and its effect was blocked by ODQ and glipizide in a statistically significant manner. **Conclusions:** Both compounds inhibited contraction, but in the presence of a greater amount of NSAIDs and less of the oil synergism was obtained (10: 1); thus, this combination may be acting through the participation of the cGMP pathway and ATP-dependent K⁺ channels.

Key words: Spasm effect, Eugenol, Diclofenac, Drug interaction, Rat uterine tissue.

I INTRODUCCIÓN

La dismenorrea primaria es el dolor asociado con la menstruación; es una patología de alta prevalencia cuya patogénesis incluye la liberación de mediadores inflamatorios y espasmos del tejido uterino. Es el problema ginecológico más frecuente en las mujeres, es un grave problema de salud, ya que la prevalencia de dismenorrea en el mundo oscila desde un 16% hasta 93% (1–5); en Hidalgo, la prevalencia en dos estudios realizados entre 2009 y 2010 registró un incremento pasando del 48.4% al 64% (6,7). Por otro lado las repercusiones de la enfermedad están ligadas a su severidad, disminuyendo el rendimiento laboral y/o escolar, y, afectando el estado anímico de la mujer con el padecimiento (6–9).

La dismenorrea no tiene un tratamiento específico, de acuerdo a varios estudios, la primera opción de las pacientes es el tratamiento medicamentoso, y dentro de éste, el tratamiento que prefieren son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los medicamentos compuestos de fármacos, que al mismo tiempo tienen entre sus componentes un AINE (6,7,10,11). Sin embargo un gran porcentaje de las pacientes no suelen asistir con regularidad a los centros hospitalarios a causa de los dolores en la menstruación, ya que es común que dichas molestias se consideren una condición normal, sucede así tanto por parte de los profesionales de la salud como por las mujeres que presentan el padecimiento (6,7). Otras medidas en el manejo de la dismenorrea son los tratamientos alternos o no medicamentosos, donde se ha investigado el efecto de extractos de plantas y otros botánicos; no obstante, en los estudios donde se comparan contra los AINEs, no han tenido un efecto superior o igual a dichos tratamientos, siendo en algunos casos inhibidores del dolor pero no antiinflamatorios o espasmolíticos y viceversa; pero, sí presentan un menor riesgo en cuanto a efectos secundarios (12,13).

En la actualidad en la investigación pre-clínica y clínica se estudia el uso de AINEs combinados con una terapia alternativa y sus efectos sobre la sintomatología de la dismenorrea. Lo que se espera de dichas investigaciones es que la interacción farmacológica permita aumentar el efecto terapéutico, disminuyendo los posibles riesgos. Es por lo mencionado, que esta investigación describe el potencial del eugenol, el diclofenaco y su combinación como agentes con un potencial espasmolítico sobre la patogénesis de la dismenorrea primaria y su posible uso como tratamiento.

II ANTECEDENTES

1 Generalidades

1.1 Útero

El útero es un órgano muscular profundo, con paredes gruesas y en forma de pera. Su función principal es albergar al embrión y al feto para su desarrollo durante la gestación; para esto, adapta sus paredes musculares al crecimiento del feto y suministra la fuerza para ser expulsado durante el parto. El útero no embarazado yace en la pelvis menor con su cuerpo localizado sobre la vejiga y su cuello entre ésta y el recto. El útero se compone de dos porciones anatómica y funcionalmente distintas las cuales son, el cuerpo y el cuello (14,15).

1.1.1 Ciclo menstrual y hormonas

La menstruación es un proceso fisiológico que consiste en la expulsión de la capa superficial del endometrio, está asociada con la ruptura de los vasos sanguíneos que irrigan la capa superficial del endometrio. El ciclo menstrual se caracteriza por fluctuaciones cíclicas de los niveles de la hormona folículo estimulante (FHS), la hormona luteinizante (LH), estrógeno y progesterona. Los ciclos menstruales normales presentan tres fases (16,17):

- Folicular: dura aproximadamente dos semanas con una variación de 7 a 21 días. En esta fase el hipotálamo estimula la hipófisis para liberar la hormona FHS y la hormona LH.
- Ovulatoria: dura aproximadamente 9 días. En esta fase la FSH y la LH estimulan el desarrollo de los folículos ováricos y la síntesis de hormonas esteroideas. Está controlada por los estrógenos segregados por estos folículos, se estimula la proliferación de la mucosa endometrial cuyo grosor se duplica o triplica. Los estrógenos ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la FSH y de retroalimentación positiva en la LH, para que ocurra la ovulación en necesario que ambos tipos de retroalimentación sean funcionales.
- Lútea: dura aproximadamente 13 días, inicia después de la ovulación, cuando el folículo ovárico remanente se convierte en el cuerpo lúteo; en esta fase, también conocida como secretora se presentan cambios de glándulas y arteriolas del endometrio por efecto de la progesterona como preparación para la fertilización. Termina cuando hay fertilización. En caso de no existir fertilización el cuerpo lúteo

se deteriora, disminuyen los niveles de progesterona y estrógenos y dan lugar a la menstruación (entre 4 y 5 días de duración). Para concluir el ciclo, la disminución de progesterona y estrógenos estimula el incremento de FSH y LH vía retroalimentación negativa.

1.1.2 Capas del cuerpo uterino.

Desde el punto de vista histológico el cuerpo del útero está constituido por tres capas, el endometrio, miometrio y serosa (o peritoneo).

La serosa recubre al cuerpo uterino en sus caras anterior y posterior, por esta capa llegan los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los nervios. En el peritoneo se encuentran plexos y ganglios simpáticos (14).

El endometrio es el sitio donde se produce la implantación y a través del cual el feto obtiene el alimento. Cambia respondiendo a cambios morfológicos y a estímulos hormonales del ciclo menstrual presentando varias fases: proliferativa, secretora y menstrual. La proliferativa coincide con el periodo de crecimiento de los folículos y se produce un incremento de dos a tres veces el grosor que el endometrio presenta tras la menstruación. En la fase secretora el endometrio sigue aumentando de tamaño a la vez que las glándulas se vuelven tortuosas (glándulas contorneadas), el endometrio libera varias sustancias que pueden afectar la actividad de la capa del músculo liso, incluidos los prostanoïdes. Finalmente durante la fase menstrual, se desprenden aproximadamente las dos terceras partes del endometrio (14,18).

El miometrio está constituido por fibras de músculo liso y tejido conectivo. Las fibras musculares se disponen formando dos capas que rodean al endometrio. En la capa interna las fibras se disponen de forma circular, mientras que en la externa se disponen longitudinales (paralelas) al eje mayor del útero, aunque también se pueden encontrar fibras dispuestas en forma oblicua o circular. El tejido conjuntivo entre los haces está formado por fibras de colágena, fibroblastos, macrófagos, mastocitos, entre otros (14,18).

1.1.3 Músculo liso uterino

El miometrio es una capa constituida por músculo liso, este tipo de músculo es involuntario y distinto al esquelético y cardíaco, ya que sus células son fusiformes, alargadas, unitarias y están en íntima relación con el tejido conectivo. El músculo liso posee filamentos delgados

de actina y filamentos gruesos de miosina, los cuales se deslizan unos a lo largo de los otros, cuando se contrae la fibra muscular (14,19).

El músculo liso uterino, se encuentra innervado por fibras simpáticas y parasimpáticas, lo que permite un alto grado de actividad espontánea tanto eléctrica como contráctil. Esta actividad espontánea del músculo liso le permite reaccionar a cambios locales en el potencial de membrana y estimulación hormonal, por lo que hace que el útero sea un órgano blanco para estudios sobre la caracterización farmacológica de nuevas moléculas con potencial terapéutico (20).

1.1.3.1 Contracción uterina

Las células uterinas del músculo liso dependen en gran medida del Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) y en menor grado del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) para que se lleve a cabo el acoplamiento excitación-contracción, activando las proteínas contráctiles involucradas en este proceso (19).

En trabajos *in vitro* la contracción está dado por soluciones de cloruro de potasio alto (40 y 60 mM) lo que induce la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje ubicados en la membrana celular, el incremento de Ca^{2+} y la consecuente contracción (21). La entrada de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ al espacio intracelular se realiza principalmente a través de canales de calcio. Existen diferentes tipos de canales de Ca^{2+} : los dependientes del voltaje, los operados por receptor, los canales activados por segundos mensajeros y los operados por depósito (22).

La activación de los canales operados por voltaje se debe a un cambio en el potencial eléctrico de la membrana celular, esto quiere decir que hay un cambio entre las cargas eléctricas tanto intracelular como extracelular, a esto se le conoce como despolarización y es provocado principalmente por los iones Ca^{2+} y K^+ ; al ocurrir esta despolarización la corriente de Ca^{2+} llega a una diferencia de potencial (14,18,22).

Así, cuando aumenta la concentración del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ este se une con la proteína calmodulina, activando a la cinasa de la cadena ligera de miosina; cuando se fosforila la cadena ligera de la miosina se une a la actina, formando el complejo actina-miosina y produciendo la contracción del músculo liso. En el caso contrario la relajación está dada por el incremento de concentración de AMPc, ya que éste activa la proteína cinasa dependiente de AMPc, la

cual activa una fosfatasa que desfosforila a la cinasa de la cadena ligera de la miosina; además reduce la afinidad del Ca^{2+} por la calmodulina produciendo la disminución del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (21,23).

1.1.4 Receptores uterinos

En el útero algunos de los principales receptores membranales que juegan un papel en el proceso de contracción y relajación son: los receptores adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, histaminérgicos, dopaminérgicos, con sus respectivos subtipos. Así mismo, el útero consta de receptores a otras sustancias, por ejemplo, los receptores a oxitocina, angiotensina y prostaglandinas (18).

Los receptores uterinos pueden estar implicados en diferentes respuestas con relación a la regulación de la contractilidad uterina, por ejemplo, los receptores a acetilcolina, adrenalina, oxitocina, angiotensina, bradiquinina, endotelina, neurotensina, opioide, entre otros, producen un efecto de contracción. Mientras que los receptores de adenosina, péptido natriurético atrial, familia de calcitonina y ácido γ -aminobutírico, producen relajación. Así, mismo otras familias generan una respuesta u otra dependiendo de su subtipo, por ejemplo, en el caso de los prostanoides y los receptores de histamina (14,18).

1.2 Dismenorrea

1.2.1 Definición

La dismenorrea se define como el conjunto de síntomas que aparecen al final del ciclo menstrual y que la persona asocia al comienzo de la menstruación e inclusive durante la misma. La dismenorrea (etimológicamente “menstruación dificultosa” y en lenguaje clínico “menstruación dolorosa”) es uno de los cuadros cíclicos, dentro de los procesos dolorosos pélvicos crónicos (4,24).

Se le denomina también “algomenorrea” y puede variar desde episodios muy poco intensos, apenas molestos, hasta situaciones extremadamente severas – aunque más raras – en las que junto al dolor de gran intensidad, aparecen náuseas, vómitos y diarrea, provocando una morbilidad muy significativa, aunque nunca amenaza directamente la vida (24,25).

Aunque etimológicamente el concepto de dismenorrea hace referencia a cualquier alteración que se observe en el ciclo menstrual (amenorrea, menalgia, etc.), en la actualidad el término

se usa para referirse a todas aquellas sensaciones de malestar y dolor que se producen durante la menstruación (24,26).

1.2.2 Clasificación

La dismenorrea se clasifica en primaria cuando inicia por lo general dentro de los pocos años de presentarse la menarca (24,26) y durante los primeros días de la menstruación. Tiene su más alta incidencia durante la segunda década de la vida. No está asociada a otras patologías pélvicas subyacentes(13,25) .

Por el contrario la dismenorrea secundaria se diagnostica cuando el dolor que acompaña a la menstruación está asociado a la presencia de una anomalía o patología pélvica, por ejemplo: endometriosis, enfermedad pélvica inflamatoria, miomas, fibromas uterinos, infecciones, embarazo ectópico, tumores, adherencias pélvicas. La dismenorrea secundaria se puede diferenciar de la primaria investigando la edad de la menarca, longitud del ciclo y la regularidad y tiempo del dolor (2,25).

1.2.3 Etiopatogenia

La fisiopatología de la dismenorrea primaria no está completamente clara, la explicación más aceptable es la producción en exceso de prostaglandinas (PGs) que provienen del endometrio secretor.

La PG principal implicada en la dismenorrea primaria es la $\text{PGF-2}\alpha$ que es una sustancia intracelular que se deriva de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como el ácido araquidónico (AA) (24,26,27). El AA a su vez se deriva de los fosfolípidos por la enzima fosfolipasa lisosomal A2; la actividad lisosomal es entre otros factores regulada por los niveles de progesterona; los niveles altos de progesterona estabilizan la actividad lisosomal (28,29). Es debido a esto que cuando no ocurre el embarazo, hay disminución de la progesterona en la fase lútea tardía del ciclo menstrual, y los lisosomas liberan fosfolipasa A2, esta enzima hidroliza a los fosfolípidos de la membrana y libera al AA; el AA puede ser metabolizado por 2 vías dependiente de diferentes sistemas enzimáticos, éstas pueden ser las vías de las ciclooxigenasas y la vía de las lipoxigenasas. En la primera, la enzima ciclooxigenasa (de la que se conocen 2 isoformas COX-1 y COX-2) actúa sobre el AA y produce endoperóxidos cíclicos (PGG2 y PGH2), los cuales son transformados en diversos

productos por la acción de diferentes enzimas. La enzima isomerasa reductasa genera las prostaglandinas $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la PGE_2 , por otro lado la enzima tromboxano sintetasa genera al tromboxano A_2 ; estos eicosanoides producen la contracción del músculo liso uterino, la vasoconstricción y la hipersensibilización de las fibras del dolor (29). Por otro lado, en la vía de las lipoxigenasas se metaboliza el AA y se crean metabolitos dependientes de la enzima, es decir la enzima 5-lipooxigenasa (5-Lox) sintetiza 5-HPETE y la enzima 12-Lox sintetiza 12-HPETE. En este caso a partir de la 5-Lox se sintetizan los leucotrienos; son los leucotrienos B4 y C4 los que van a producir la contracción del músculo liso uterino. Se dice que cuando los fármacos AINEs no tienen efecto en el tratamiento de la dismenorrea es porque los síntomas son principalmente producidos por la vía de la lipooxigenasa (24,26,29,30). La etiopatogenia de la dismenorrea se puede ver de manera sintetizada en la figura 1.

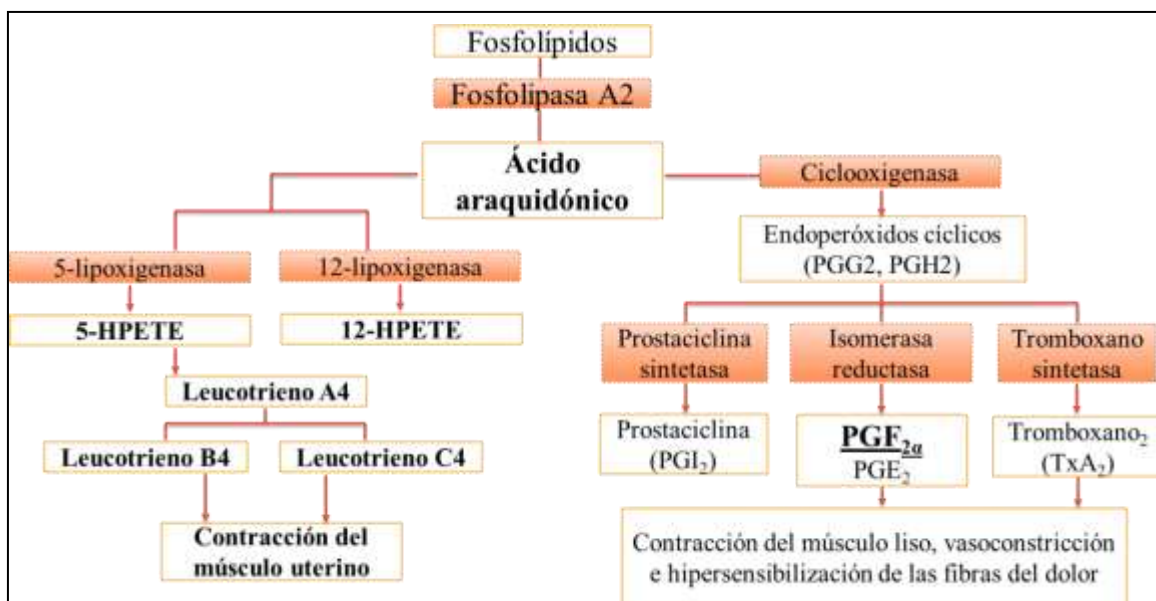


Figura 1. Esquema de las dos vías propuestas para la etiopatogenia de la dismenorrea. Esquema adaptado de las vías descritas en (29).

Para entender la patogénesis en la dismenorrea secundaria es necesario comprender los procesos patológicos propios de la enfermedad a la que está asociada, como pueden ser las mencionadas anteriormente; por ejemplo, la endometriosis puede presentarse como una dismenorrea progresiva, pero esta es frecuentemente acompañada por dolor entre cada

menstruación, puede además presentar esterilidad, hemorragia uterina disfuncional, dispareunia, disuria, etc. (24,31).

1.2.4 Prevalencia de la dismenorrea

La prevalencia de dismenorrea es de una amplia variación, de acuerdo a lo reportado a nivel mundial, oscila desde 16% hasta 93% (1–5), dicha variación se puede atribuir a la elección de los sujetos evaluados en cada estudio.

1.2.4.1 Prevalencia en México

Al igual que lo reportado a nivel mundial, en México la prevalencia de la dismenorrea tiene una amplia variación. En 1066 estudiantes de la Ciudad de México, se aplicó una encuesta para determinar la prevalencia de la dismenorrea, siendo esta de 52.3% en menores de 15 años, 63.8% en estudiantes de 15 a 19 años y 52.3% para estudiantes de 20 a 24 años (32). Por otro lado, un estudio realizado en una población Maya demostró una prevalencia general del 28% (33). El estudio reportado en México con mayor prevalencia se realizó en Colima, Colima, en estudiantes universitarias siendo de un 90% (34).

1.2.4.2 Prevalencia en Hidalgo

En el estado de Hidalgo la prevalencia de la dismenorrea se ha reportado en 2009 en estudiantes del año final de bachillerato, siendo de 48.4%, y en 2010 en estudiantes universitarias del 64% (6,7).

1.2.5 Factores asociados a la dismenorrea

Una de las principales causas a las que se atribuye la marcada diferencia de la prevalencia de dismenorrea reportada en la literatura son los factores de riesgo diversos y protectores a los que están expuestas las distintas poblaciones.

1.2.5.1 Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados al desarrollo de la dismenorrea son: a) antecedentes familiares del padecimiento que es uno de los factores más fuertemente asociados con el desarrollo de la dismenorrea (35); b) menarca, principalmente cuando la menarca aparece antes de los 12 años, se ha reportado un riesgo mayor para padecer la patología y por lo general de mayor severidad (4,6); c) fumar, en diversos estudios se ha demostrado que las mujeres que fuman y que están expuestas constantemente al humo del cigarro tiene mayor

probabilidad de padecer dismenorrea (4,6,7,24,35), d) índice de masa corporal (IMC), en algunos estudios se asocia tanto el IMC bajo (bajo peso), como el IMC alto (sobrepeso y obesidad) como factores que contribuyen al desarrollo y severidad de la dismenorrea (24,36); e) cantidad del menstuo y duración de la menstruación, se ha encontrado que cuando ocurren menstruaciones muy abundantes y por muchos días, mayor el riesgo de sufrir dismenorrea y además mayor la severidad del dolor (4,6,7,24,26); f) dieta, el consumo de moderado a alto contenido en grasas, principalmente las de origen animal, con excepción del consumo de pescado (37); g) alteraciones psicológicas en el exceso de estrés y otras condiciones como traumas importantes y depresión, aumentan considerablemente la severidad del padecimiento (24,26,38).

1.2.5.2 Factores de protección

Por otro lado los factores de protección son: a) número de partos, en diversos estudios se encontró que en las mujeres con multiparidad disminuía la probabilidad de desarrollar la enfermedad y la severidad del cuadro. Por el contrario la nuliparidad se asocia con mayor riesgo (24); b) edad, ya que la dismenorrea afecta principalmente en la segunda y tercera década de vida, por lo tanto las mujeres mayores de 30 años tiene menor riesgo de padecer la enfermedad (4,38), c) ejercicio, las mujeres que realizan ejercicio constante tiene menor riesgo de padecer dismenorrea y menor posibilidad de que los cuadros sean severos (4); d) anticonceptivos orales, el consumo de estos medicamentos se asocia negativamente con la dismenorrea (24), e) edad del primer hijo, entre menor sea la edad en el primer parto, menor es el riesgo a desarrollar dismenorrea (4,24).

1.2.6 Severidad, repercusión e incapacidad

La dismenorrea se puede clasificar de acuerdo a su severidad en: a) leve, cuando el dolor se encuentre en el primer día del ciclo y no hay síntomas relacionados o son pocos, no requiere medicación; b) moderada: Cuando el dolor persiste hasta el segundo o tercer día del ciclo, puede o no requerir medicación. Se acompaña de síntomas como nauseas, malestar e irritabilidad y puede ocasionalmente perturbar las actividades cotidianas; c) grave o severa, se evidencia porque el dolor está presente durante todo el ciclo menstrual (de 3 a 7 días), se acompaña de síntomas severos e incapacitantes que interfieren o impiden con las actividades

cotidianas y son causas de ausentismo escolar y laboral. Siempre es requerida la medicación (6–9).

1.2.7 Tratamiento de la dismenorrea

No existe un tratamiento único para el manejo de la dismenorrea. En cuanto a medicamentos para el tratamiento, los AINEs son considerados de primera línea, actúan en la disminución de las PGs y como consecuencia disminuyen la sintomatología, por ejemplo: ácido mefenámico, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, etc. (10,27). Como segunda línea para el tratamiento de la dismenorrea se encuentran los métodos hormonales, como por ejemplo, estrógenos y/o progestágenos y anticonceptivos orales. El mecanismo de acción propuesto es la reducción de la liberación de PGs durante la menstruación, al inhibir la ovulación (11,36,39).

Respecto a los tratamientos no medicamentosos se han descrito con resultados variables, por ejemplo: tratamiento quirúrgico, estimulación nerviosa transcutánea, administración de nitroglicerina, ejercicio, suplementos de vitaminas, suplementos de minerales, suplementos de aceites de pescado, acupuntura, dietas vegetarianas y bajas en grasa, herbolaria etc. (4,25,40).

1.3 Medicamentos para tratar la dismenorrea

1.3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Son un grupo de fármacos analgésicos no narcóticos que son sustancias de familias químicamente diferentes. El primer fármaco de este grupo fue la aspirina (ácido acetilsalicílico) considerado el prototipo de dicho grupo. El término AINE se utilizó por primera vez en 1952 tras la introducción de la fenilbutazona (41). Los AINEs poseen tres efectos en común son: analgesia, antiinflamación y antipirexia. El mecanismo de acción de los AINEs se basa en la inhibición de la enzima COX de la que se conocen 2 isoformas (COX-1 y COX-2), como consecuencia a esta inhibición hay una disminución de las PGs que son las encargadas de modular la respuesta inflamatoria y el dolor (42).

La potencia en que los AINEs inhiben a la enzima COX varía entre agentes diferentes. En los estudios in vitro los resultados con los inhibidores de COX son reportados como la concentración que causa una reducción del 50% en la actividad de la enzima (CI₅₀). La proporción de la CI₅₀ para COX-1 vs. COX-2 (COX-2/COX-1) es utilizado para determinar

la potencia de un compuesto para inhibir a la enzima COX-2. En base a los diferentes grados de la potencia de inhibición de los AINEs se pueden clasificar en: a) Inhibidor selectivo COX-1, el cual no tiene un efecto detectable sobre la actividad de COX-2; b) Inhibidor no selectivo de COX, el cual no muestra una diferencia clínica o biológica en la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2; d) Inhibidor preferencial COX-2, el cual tiene actividad antiinflamatoria en un rango de dosis y en determinados pacientes; mientras que a dosis más altas ocurre una inhibición de la enzima COX-1; e) Inhibidor selectivo COX-2, el cual no causa un bloqueo significativo de COX-1 en los rangos de dosis utilizados y en las concentraciones alcanzadas durante su uso clínico (43,44).

Algunos AINEs como el ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam, tolmetín, indometacina y naproxeno inhiben de manera no selectiva las 2 isoformas de la enzima COX (COX-1 y COX-2). Por otro lado, el ácido acetilsalicílico (inhibidor no selectivo) tiene la particularidad de realizar la acetilación irreversible de la enzima COX, con lo que esta molécula pierde su capacidad enzimática por el tiempo de vida media restante (42,45).

Debido a la alta incidencia de eventos adversos producidos por los AINEs no selectivos, en los inicios de los 90's del siglo pasado se inició una búsqueda de nuevos fármacos con una mayor selectividad por la COX-2 que por la COX-1, basados en la hipótesis de que el efecto analgésico y antiinflamatorio se deben principalmente a la inhibición de la enzima COX-2; y que la inhibición de la enzima COX-1 es la causa responsable de producir los eventos adversos de los AINEs. Los primeros dos fármacos nombrados como inhibidores selectivos de COX-2 que entraron al mercado a finales de los años 90's fueron rofecoxib y celecoxib (44); sin embargo, también se ha encontrado que producen efectos adversos a nivel cardiovascular y renal (46).

1.3.2 Diclofenaco

El diclofenaco es una AINE, de la familia de los ácidos fenilacéticos, es uno de los fármacos más utilizados. Tiene un efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio, su potencial es mayor que la indometacina, el naproxeno y otros AINEs. Se ha utilizado como tratamiento de enfermedades como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedades agudas como daño músculo-esquelético, dolor postquirúrgico y dismenorrea (47).

1.3.2.1 Estructura y propiedades

Tiene una absorción rápida y se une a proteínas plasmáticas, con una vida media de 1 a 2 horas. Se metaboliza en el hígado y los metabolitos son excretados el 65% de la dosis en la orina y aproximadamente el 35% en la bilis. Posterior a la administración intramuscular la absorción es inmediata dentro de los 20 a 25 minutos, se alcanzan concentraciones pico plasmáticas promedio de aproximadamente 25 $\mu\text{g/mL}$, la cantidad absorbida tiene una proporción lineal con la dosis (48,49).

El diclofenaco o ácido 2-[(2,6-diclorofenil) amino] bencenoacético ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2$), tiene un peso molecular de 296.15 g/mol, es propicio a ser soluble en disolventes polares como el agua (50,51).

Su estructura se muestra en la Figura 2.

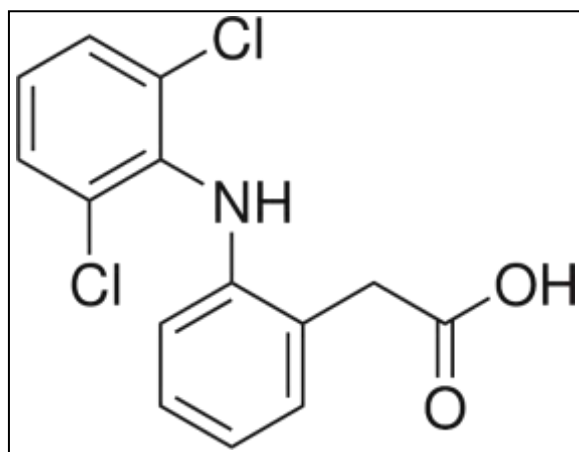


Figura 2. Estructura molecular del diclofenaco (52).

1.3.2.2 Mecanismo de acción

Como mecanismo de acción el diclofenaco, al igual que con los otros AINEs, inhibe la enzima COX-1 y a la enzima COX-2 en el 71%, lo que tiene como consecuencia la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas PGE_2 , $\text{PGF-}2\alpha$ (que es la más implicada en la inflamación) así como las PGD_2 , PGE_1 y PGI_2 , dicha inhibición se lleva a cabo en los focos de inflamación y conlleva a una acción anti-inflamatoria. Por otro lado el efecto analgésico es por una acción periférica, en la que al inhibir a PGE_1 , PGE_2 y $\text{PGF-}2\alpha$ se impide la sensibilización de los nociceptores a la estimulación de la bradiquinina (mediador de cambios inflamatorios generados o activados en el plasma) (53,54).

1.3.3 Alternativas terapéuticas: Syncol®

A pesar de que los AINEs han demostrado ser la primera opción terapéutica en el tratamiento de la dismenorrea, existen en el mercado fármacos compuestos para dicho tratamiento como por ejemplo la Buscapina Compositum® (metamizol un AINE más butioscina un antimuscarínico) y el medicamento Syncol® (6,7) del que se hablará a continuación.

Es un medicamento analgésico, compuesto de diferentes fármacos, se utiliza para el tratamiento del síndrome premenstrual y sus diferentes síntomas entre ellos la dismenorrea primaria. En México es una de los medicamentos que más se receta para el tratamiento de dicho padecimiento (6,55).

Cada comprimido de este medicamento está compuesto por paracetamol al 90% equivalente a 500 mg, pamabrom 25 mg y maleato de pirilamina 15 mg (55). A continuación se describe cada uno de ellos.

- Acetaminofén: También llamado paracetamol, a diferencia de otros analgésicos no tiene propiedades anti-inflamatorias. Asimismo, el acetaminofén es ampliamente recomendado por su seguridad y eficacia para el tratamiento del dolor de leve a moderado (56). Aún existe controversia de la habilidad de acetaminofén para inhibir la producción de prostaglandinas endometriales, así como su eficacia en aliviar la sintomatología de la dismenorrea primaria (57).
- Pirilamina: Es un fármaco antagonista a histamina-H1 muy específico, esta acción antihistamínica disminuye el conocido efecto contráctil, sobre el músculo liso (58). Se ha informado que el antihistamínico pirilamina es capaz de revertir la contracción de músculo uterino humano producida por histamina (59).
- Pamabrom: Es un diurético de acción intermedia, que es usado para el alivio de la tensión premenstrual. Su acción diurética es la resultante de un aumento de la filtración glomerular y disminución de la reabsorción tubular de sodio y por ende de agua (55).

En una revisión Girolamo et al. (57) investigaron sobre la efectividad en el tratamiento de la dismenorrea de una combinación de acetaminofén con pamabrom. En los efectos clínicos señalan que aunque el acetaminofén tiene un efecto analgésico y antipirético similar al del ácido acetilsalicílico, carece de efecto antiinflamatorio, es decir que su capacidad para inhibir

a la COX está todavía en duda, por consiguiente no disminuye la producción de PGs (implicadas en la patología de la dismenorrea) lo anterior podría ser la justificación de que por sí solo el acetaminofén tiene un limitado efecto en la dismenorrea. Respecto al pamabrom, la Food and Drug Administration (FDA) lo menciona como una posible propuesta para los productos médicos en la menstruación; en dicha investigación se concluyó que no hay evidencia contundente de la efectividad de dicha combinación de fármacos.

Recientemente se evaluó la eficacia de un medicamento con naproxeno, paracetamol y pamabrom versus una medicación con paracetamol, pirilamina y pamabrom en la dismenorrea primaria, encontraron que no había diferencia entre ambas combinaciones en la reducción del dolor dismenorreico y que ambos tratamientos eran bien tolerados y sugieren que la eficacia del medicamento con paracetamol, pirilamina y pamabrom es la combinación de sus diferentes actividades; sin embargo, señalan que la participación de los mecanismos de acción de cada fármaco que compone la mezcla requiere más investigación (60).

1.4 AINEs y combinación de fármacos como primer tratamiento

En la primera línea de los diferentes tratamientos para la dismenorrea, se encuentran los tratamientos medicamentoso entre los que destacan el uso de AINEs como por ejemplo el ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, ácido mefánico y ácido acetilsalicílico etc., y de medicamentos que son compuestos de fármacos como la Buscapina Compositum® y el Syncol® que en sus componentes cuentan también con la presencia de un AINEs (3,61). Todos estos tratamientos tienen efectos sobre la patogenia de la dismenorrea ya antes descrita.

Tanto los fármacos compuestos como la mayoría de los AINEs (utilizados en la dismenorrea) son de venta libre y se encuentran fácilmente en las farmacias (55).

1.4.1 Consumo

Una investigación realizada por Ortiz et al. (10), donde se evaluó la utilización de fármacos para el tratamiento de la dismenorrea primaria en estudiantes universitarias, encontró que solo el 24.8% consultó a un médico para el tratamiento mientras que un 67.7% de las participantes practicaron automedicación; en las mujeres que acudieron al médico encontraron que los fármacos más recetados fueron el Syncol® (18.2%), metamizol con butilhioscina (18.2%), naproxeno (15.2%), ibuprofeno (12.1%) indometacina (9.1%) y

butilioscina (9.1%); y, que las que se automedicaron utilizaron los fármacos Syncol® (44%), metamizol con butilioscina (22.9%), naproxeno (10.1%), ibuprofeno (7.3%) y paracetamol (6.4%), señalan el fuerte porcentaje de automedicación por parte de las mujeres.

Otro estudio realizado por Ortiz et al. (7) para evaluar la prevalencia y el impacto de la dismenorrea primaria en estudiantes mexicanas, encontró que el medicamento más común utilizado era el Syncol® (34.8%) seguido de la Buscapina compostum® (17.7%) y el naproxeno (13.6%); no obstante, las estudiantes reportaron que el dolor a menudo no era aliviado completamente a pesar del uso de medicamentos

Una investigación realizada por Ortiz et al. (6) que estudió la prevalencia, impacto y tratamiento de la dismenorrea primaria en estudiantes universitarias de México, obtuvo los siguientes resultados: de su población de estudio sólo el 18.4% de los estudiantes recibieron una prescripción médica, de ellas el 38.3% informaron alivio moderado, 39.8% reportó poco alivio y el 3.6% reportaron no tener ningún efecto. Por otro lado el 61.7% practicó la automedicación y señalaron que el 23.4% tenía un tratamiento completamente efectivo, el 43.0% informó eficacia moderada, el 32.5% informó poco efecto y el 1.0% informó no tener ningún efecto. En la automedicación los medicamentos más comunes fueron Syncol® (35.2%), naproxeno (16.5%), Buscapina compostum® (14.0%) y paracetamol, 75.5% señalaron que el tratamiento utilizado en la dismenorrea no tuvo efectividad completa.

Un estudio realizado por Yañez N. et al. (11) para estudiar la prevalencia y los factores asociados a la dismenorrea en estudiantes del área de la salud, encontró que el 91.3% refería toma de medicamento para el tratamiento y que el 66.7% de las veces fue automedicado, así mismo los medicamentos más utilizados fueron ibuprofeno y acetaminofén, lo que concuerda con los estudios antes mencionados.

1.4.2 Efectividad de los AINEs en la dismenorrea

Varios estudios clínicos han demostrado la eficacia de los AINEs en el tratamiento de la dismenorrea primaria; desde los inhibidores no selectivos de COX, hasta los inhibidores selectivos de COX-2 (39,61). En general, se comienza el tratamiento con AINEs no selectivos como naproxeno, ibuprofeno, ácido mefenámico y ácido flufenámico. En personas con riesgo de daño gastrointestinal, se puede sugerir la utilización de celecoxib, lumiracoxib,

etoricoxib, meloxicam, nimesulida o acetaminofén (62,63). Los AINEs pueden ser el tratamiento más eficaz de la dismenorrea primaria, pero para alcanzar su mayor efectividad deben tomarse desde el día previo al inicio de la dismenorrea y administrados de dos a tres días del ciclo para alcanzar una respuesta satisfactoria del 75 al 99% de los casos (25). Sin embargo, se sabe también que el tratamiento monótono en la dismenorrea con la utilización de un AINEs, puede no tener el alcance deseado al tener una falla terapéutica y puede ser más propicio para la presentación de efectos secundarios (6,10). El aumento del leucotrieno producido por la vía de la enzima 5-Lox en lugar de la vía COX puede explicar algunas formas de dismenorrea primaria que no responden a los AINEs (29).

1.4.2.1 Efecto espasmolítico y efecto anti-inflamatorio

Los AINEs como ya se ha mencionado actúan inhibiendo a la enzima COX, dicha enzima es la encargada de catalizar la conversión de AA y, como consecuencia, inhibe la producción de PGs; en el útero, la reducción de la formación de prostaglandinas reduce la secreción uterina y disminuye las contracciones, alcanzando así su efecto espasmolítico. De igual forma se alivia el dolor en la dismenorrea con la supresión de la síntesis de PGs endometriales y por consiguiente la respuesta inflamatoria (39,61).

1.4.3 Efectos secundarios

En un metaanálisis donde se evalúa la eficacia de los AINEs en el tratamiento de la dismenorrea primaria se encontró que aunque los AINEs tiene una mayor eficacia frente a los placebos, presentan en mayor porcentaje efectos adversos y señala que estos efectos adversos pueden ser, gastrointestinales y neurológicos (61). Otros estudios también han encontrado dolor epigástrico y malestar general de leve a moderado (6,7). Es importante señalar también que debido a los efectos conocidos de los AINEs, está contraindicado en mujeres con antecedentes de úlceras gastrointestinales o hipersensibilidades (25). No se conocen efectos secundarios graves en el uso de los AINEs como tratamiento para la dismenorrea debido a que la mayoría de las veces su uso es agudo (no más de 3 días, aproximadamente) y no crónico que es en los casos en los que se registran efectos adversos más severos (3).

En el caso del medicamento Syncol® y su combinación de fármacos, en el estudio de Ortiz et al. (55) donde se evaluó la eficacia de un fármaco compuesto (paracetamol, pirilamina y

pamabrom) versus otro igualmente compuesto (naproxeno, pirilamina y pamabrom) únicamente el 2.0% de las mujeres de su investigación presentaron efectos adversos (dolor de cabeza y dolor abdominal), en la investigación se concluyó que era un fármaco seguro para el tratamiento de la dismenorrea (64). Por otro lado, de acuerdo al reporte por PLM® se indican como reacciones adversas: somnolencia y ligero aumento de la diuresis, ligero aumento en la excreción de sodio y potasio, náuseas, vómito, dolor epigástrico, ictericia, leucopenia, anemia, daño hepático y/o renal; pueden presentarse erupciones eritematosas o urticaria. En ocasiones fiebre medicamentosa y reacciones hematológicas.

1.5 Principales terapias alternativas

Como terapias alternativas en el tratamiento de la dismenorrea se conoce a todas las medidas terapéuticas que no son medicamentosas (4).

Las terapias alternativas son tratamientos no convencionales medicamentosos que se utilizan para apoyar la medicina científica, que tienen su origen en los llamados “remedios” y tienen su antigüedad desde los inicios de la humanidad; pueden ser regionales, como algunos extractos de plantas endémicas, o pueden ser mayormente conocidos y usados por más población (4,12,13).

1.5.1 Suplementos dietéticos

Debido a los estudios de efectividad y seguridad realizados en los fármacos de uso cotidiano para dismenorrea, se ha hecho primordial la búsqueda de compuestos naturales que tengan actividad anti-inflamatoria y que conlleven menos efectos adversos (65), como es el caso de los “suplementos dietéticos”, entendiéndolos como éstos a los derivados botánicos, vitaminas, minerales, enzimas y aminoácidos.

Un metaanálisis evaluó la eficacia y la seguridad de diferentes suplementos dietéticos para el tratamiento de la dismenorrea, entre los suplementos estudiados se encuentran: manzanilla, canela, damasco, eneldo, hinojo, jengibre, fenogreco, ruibarbo, valeriana, zatarina y cinco suplementos no vegetales que eran, aceite de pescado, malatonina, vitamina B1, vitamina E y sulfato de zinc en una variedad de formulaciones y dosis; en dicha investigación, se encontró que no existe evidencia suficiente de la eficacia de los suplementos dietéticos para

el tratamiento en la dismenorrea, en la mayoría se carecía de información para sostener su seguridad, y en otros casos la evidencia estaba más justificada (12).

De forma similar Yu (13) evaluó los tratamientos complementarios y alternativos en la dismenorrea primaria en adolescentes, incluyó a la vitamina B1, vitamina E, vitamina D, ácidos grasos omega 3, magnesio, jengibre y una mezcla de azafrán, semillas de apio y anís, y encontró que aunque las terapias alternativas son efectivas, no se pueden hacer recomendaciones generales, debido a la particularidad de estos estudios (muestras pequeñas, población específica); como sugerencia, para investigaciones futuras propone la comparación de los tratamientos de primera línea versus los tratamientos alternos y, también, el estudio de ambos en combinación.

En otra investigación se evaluó la eficacia de cápsulas de menta (mentol) versus ácido mefenámico, en un estudio de doble ciego; hallaron que, tanto la intensidad del dolor como la duración, disminuyó con la menta al igual que con el ácido mefenámico, sin embargo no tuvo capacidad para disminuir la cantidad de sangrado, el estudio concluyó que aunque en menor alcance (comparado con el ácido mefenámico), sí se recomienda el uso de la menta para el tratamiento de los síntomas en la dismenorrea (66).

1.5.1.1 Alcance y limitaciones

Aunque las terapias alternativas han alcanzado mucha popularidad debido a la opción más segura que ofrecen en el tratamiento de la patología de la dismenorrea; en la mayoría de los estudios que analizan su efectividad, no presentan efectos que superen a los tratamientos médicos de primera línea como los AINEs, sin embargo, sí presentan efectos positivos sobre la sintomatología del padecimiento; una de las limitaciones de estas terapias es que la dosificación tiende a ser mayor para lograr los efectos deseados y en la mayoría de los casos es escasa la información sobre los posibles efectos adversos, o no son evaluados en la investigación (4,13).

1.6 Eugenol

Es un aceite de color amarillento y con un olor intenso, es poco soluble en agua pero soluble en alcohol, su descubrimiento se remonta a la herbolaria usada en el siglo XVI para remedios casero y usos empíricos; así, se puede encontrar en diferentes hierbas o especias por ejemplo

laurel, nuez moscada, alcanfor y canela, pero se encuentra en mayor concentración en el clavo y de donde es comúnmente extraído del alabastrum seco de la *Eugenia caryophyllate*, (figura 3); por ello se ha reconocido por la FDA como un aceite esencial de uso seguro (67,68), está implicado en el tratamiento de varios desórdenes especialmente los involucrados con el dolor y la inflamación (69).



Figura 3. Planta *Eugenia caryophyllate*, abajo se muestra el alabastrum (comúnmente conocido como clavo de olor) (70).

1.6.1 Estructura

El eugenol (2 metoxi-4-(2-propenil) fenol) es un fenilpropanoide, es considerado químicamente como un derivado del grupo fenólico, su fórmula es $C_{10}H_{12}O_2$; se muestra su estructura en la figura 4.

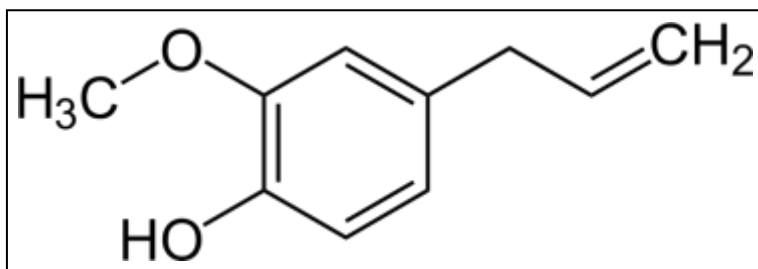


Figura 4. Estructura química del eugenol (71).

1.6.2 Mecanismo de acción y actividad biológica

Acerca de la actividad analgésica y la capacidad anti-inflamatoria del eugenol, sucede por la inhibición de la actividad nerviosa y de los componentes vasculares de la respuesta inflamatoria; estos efectos son producidos por la inhibición de COX-2, sin inhibición de la COX-1 (72). El eugenol, como un miembro de los compuestos fenólicos puede inhibir significativamente a la enzima 5-Lox que es clave en la biosíntesis de leucotrienos y que, por lo tanto, puede reducir la producción de mediadores inflamatorios (73). También, se ha encontrado que el eugenol actúa como un inhibidor de la prostaglandina H sintetasa, evitando así el enlace del AA y la consecuente formación de dicha prostaglandina. Ha demostrado ser un potente inhibidor de la formación de tromboxanos y de la agregación plaquetaria en sangre humana *in vivo* (74).

El eugenol ha demostrado capacidad antioxidante que se lleva a cabo al inhibir la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno, de igual forma inhibe la formación del superóxido en el sistema xantina-oxidasa evitando la formación de Fe^{2+} que es un radical agresivo a los tejidos (75).

1.6.3 Usos clínicos

En el área médica el eugenol presenta su mayor uso en el área odontológica (68). Aunque sus diferentes propiedades y acciones, siguen siendo objeto de estudio en otras áreas de la salud. En la actualidad son diversos los efectos para los que se está estudiando el eugenol, a continuación se enlistan algunos.

En usos odontológicos se ha demostrado que a bajas concentraciones el eugenol tiene efectos bactericidas, al estabilizar a las membranas celulares con lo cual evita la penetración de las bacterias (76).

Como agente antioxidante, Prasad et al. (77) realizaron una investigación donde median su potencial para modular las respuestas bioquímicas en una condición de hiperglucemia inducida, y encontraron que el eugenol aumentó la actividad antioxidante y disminuyó la glucosa sanguínea, también mejoró las actividades del complejo 1,3-succinato deshidrogenasa lo que provocó una restauración importante; ellos concluyen que su uso es

eficaz para utilizarse como un agente terapéutico en las complicaciones menores de la diabetes.

Por otro lado se estudió la capacidad regulatoria de un éster de aspirina-eugenol en los lípidos sanguíneos en una condición inducida de hiperlipidemia y encontraron que tenía un importante potencial anti-hiperlipidémico, al disminuir los niveles de colesterol total y triglicéridos, lo que de acuerdo a sus resultados, lo destaca como posible tratamiento para esa clase de padecimientos (69).

En un estudio realizado por Sarkar et al. (78) evaluaron y compararon la capacidad del eugenol contra la capsaicina para inducir la apoptosis en una línea celular AGS de cáncer gástrico; demostraron que aunque la capsaicina era una agente pro-apoptótico más potente, el eugenol podía inducir la apoptosis tanto en presencia y ausencia de la funcionalidad de p53 (un gen necesario para la apoptosis, que se daña en presencia de cáncer), por lo que lo señalan como un agente a desarrollar como un potente anticancerígeno. Sin embargo, es importante señalar que la investigación sobre los usos y propiedades del eugenol fuera del área de la odontología se encuentra en su mayoría en investigación básica experimental.

1.6.3.1 Efecto anti-inflamatorio

Los efectos antinociceptivo y antiinflamatorio del orto-eugenol un derivado del eugenol, fueron evaluados por Fonsêca et al. (79), en sus resultados describen que el efecto antinociceptivo fue mediado por el sistema adrenérgico y el potencial de actividad anti-inflamatoria a través de la regulación de las citocinas proinflamatorias y la fosforilación de NF- κ B y p38 (implicados en el proceso de la inflamación).

También se ha estudiado el potencial anti-inflamatorio y anti-nociceptivo del aceite extraído del clavo de olor, utilizando un modelo de constricciones abdominales inducidas por ácido acético y el edema de pata inducido por carragenina en ratones; el extracto mostró un efecto analgésico superior a la aspirina (87.7% a 77.7% respectivamente) en la inhibición de las contracciones abdominales; y aunque en menor medida que la indometacina, logró reducir en un 50.6% el edema, finalmente el examen fitoquímico mostró presencia de eugenol, lo que les permitió concluir que el extracto tenía efectos importantes que pueden servir para el uso terapéutico de enfermedades que cursen con inflamación y dolor (80).

1.6.4 Efectos secundarios

Eugenol inhibe la respiración mitocondrial *in vitro* de una manera dependiente de la dosis, produciendo un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa y la lesión celular (75).

1.7 Interacciones farmacológicas

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 (81).

En patologías como la dismenorrea, el alivio del dolor puede ser alcanzado por una amplia variedad de métodos, siendo el uso de medicamentos la piedra angular del tratamiento analgésico. La administración de dos fármacos con efectos similares es común en la práctica médica dado que las enfermedades a menudo involucran diversas afecciones que deben tratarse, otro objetivo de usar coadministraciones es disminuir la dosis de cada fármaco, disminuyendo así los efectos adversos que generalmente están asociados con el uso de altas dosis cuando se usan fármacos en monoterapia (82).

1.7.1 Tipos de interacciones farmacológicas

El término interacciones farmacológicas define las situaciones en que los efectos de un fármaco están influenciados por la administración conjunta de otro, es decir, son cualquier modificación del efecto de un fármaco por la administración conjunta de cualquier sustancia química (alimento, plantas medicinales o sustancias de abuso) (83).

Las interacciones farmacológicas que pueden producirse son incontables, pero en un sentido más amplio se pueden clasificar en farmacéuticas, farmacocinéticas, farmacodinámicas y mixtas, estas se describen más detalladamente a continuación (84).

- Farmacéuticas: Este tipo resulta de las interacciones fisicoquímicas entre los fármacos involucrados o entre fármacos y excipientes, éstas suelen ocurrir antes de ser administradas al organismo. Las interacciones de tipo farmacéutico denominan incompatibilidades.

- **Farmacocinética:** Las interacciones farmacocinéticas ocurren cuando los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco son alterados por otro administrado de forma concurrente. Resultando en un aumento o disminución de los niveles plasmáticos del fármaco objetivo.
- **Farmacodinámicas:** Existen dos tipos de interacciones farmacodinámicas, directas e indirectas. Las interacciones directas aparecen entre fármacos que actúan en los mismos lugares de acción, en cambio, cuando los fármacos interactúan por diferentes mecanismos de acción, afectando el mismo efecto se dice que se presentan interacciones farmacodinámicas indirectas.
- **Mixtas:** estas interacciones incluyen farmacocinéticas y farmacodinámicas.

1.7.2 Análisis isoblográfico

Para estudiar la interacción entre sustancias activas se puede utilizar el análisis isoblográfico, este permite realizar una evaluación cuantitativa más rigurosa. El isoblograma que resulta del análisis proporciona una representación visual de las dosis teóricas aditivas y de los pares experimentales, además es adecuado para mostrar los resultados. Cuando dos sustancias con efecto similares se administran juntas, el efecto combinado puede ser exagerado o incluso atenuado. El efecto exagerado es nombrado superaditividad o sinergismo, en tanto que el efecto atenuado se nombra sub-aditividad. En cualquiera de los casos los compuestos individualmente contribuyen al efecto, pero este se modifica al ponerlos juntos ya sea con un aumento o disminución del efecto esperado de ambos (85).

1.7.2.1 Isoblograma

El isoblograma (figura 5) es una gráfica en coordenadas rectangulares de la dosis o concentraciones (a, b), de las sustancias respectivas que producen un nivel de efecto específico (por ejemplo CI_{70} , CI_{50} , CI_{25}) cuando se aplican de forma conjunta; en el isoblograma se muestra la línea de aditividad, la cual representa todas las posibles combinaciones equivalentes para producir el efecto deseado (84,86).

Como se observa en la figura 5 la línea de aditividad está definida por dos puntos $(Z_1^*, 0)$ y $(0, Z_2^*)$. Z_1^* corresponde a la concentración del compuesto menos activo y Z_2^* a la

concentración del compuesto más activo, hablando de los efectos que producen individualmente. El valor de Z_1^* y Z_2^* se calculan de la región de la curva concentración-respuesta en donde existe una relación lineal; cuando la relación no es lineal se puede utilizar el análisis no lineal de Z^* (86). Para cada fármaco se calcula la Z^* de la regresión lineal del efecto en función del logaritmo de la concentración, de donde se obtienen el logaritmo de Z^* y el error estándar EE ($\log Z^*$) para cada fármaco, posteriormente se utilizará para el análisis estadístico (84).

Los puntos sobre la línea de aditividad que tienen las coordenadas a, b son las fracciones de concentración respectivas (Z_1^* y Z_2^*) en combinación binaria del fármaco A y el fármaco B que provocan el mismo nivel de efecto de los fármacos sin combinarse, satisfaciendo la ecuación: $\mathbf{a/A + b/B = 1}$, en donde A y B son dosis equiefectivas (Z_1^* y Z_2^* que producen el mismo nivel de efecto). Los pares de concentraciones equiefectivas son denominados isobolas, es decir que (A, 0), (0, B) y (a, b) son isobolas. Cuando la combinación de la concentración del fármaco **a** del fármaco **A** y la concentración del **b** del fármaco **B** cumplen con la relación $\mathbf{a/A + b/B = 1}$ se dice que los fármacos presentan una relación aditiva (la suma de sus efectos individuales); cuando la relación es $\mathbf{a/A + b/B = <1}$ indica una relación subaditiva entre los fármacos A y B; por último la relación $\mathbf{a/A + b/B = >1}$ señala la relación subaditiva entre los fármacos A y B (86).

La Z^* del fármaco **A** se denotará como **A** y la Z^* del fármaco **B**, se denotará **B**. Las cantidades en la combinación aditiva son fracciones de la concentración de cada compuesto tal que la suma de las fracciones sea igual a la unidad; así entonces $\mathbf{a = fA}$ del fármaco A y $\mathbf{b = (1 - f) B}$ del fármaco B. Cuando estas cantidades son expresadas en unidades de masa o dosis (mg, μg o mg/kg respectivamente) la cantidad total en la mezcla es la suma denominada Z_{ad} , como se expresa en la siguiente fórmula:

$$\mathbf{Z_{ad} = fA + (1-f) B}$$

Esta relación representa la cantidad teórica de la combinación que dará una interacción aditiva. Las proporciones de cada fármaco en la mezcla estarán dadas por: $\mathbf{p_A = fA/Z_{ad}}$ y $\mathbf{p_n = (1-f) B/Z_{ad}}$ respectivamente (84).

De estas proporciones la combinación que da como resultado se administra al sistema biológico como si fuera un tercer fármaco, en diferentes dosis o concentraciones conservando la misma proporción (p). La dosis o concentración que proporciona el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales se determinan (por ejemplo CI_{50} , CI_{25}) y a este valor se le denomina Z_{exp} (cantidad experimental que induce el mismo nivel del efecto). También se calcula el intervalo de confianza 95% y el error estándar de la media (EEM).

A la diferencia de $M = \log Z_{ad} - Z_{ep}$ se le realiza un análisis. Si el valor no es diferente significativamente de 0 se indica que la combinación es la suma del efecto de cada uno de los fármacos. Por otro lado una diferencia significativa indicará una relación no aditiva entre los fármacos siendo: $Z_{ad} < Z_{ep}$ ($M < 0$) una relación superaditiva o sinergista y $Z_{ad} > Z_{ep}$ ($M > 0$) una relación de subaditividad o antagonista. En el análisis isobolográfico se aplica el un análisis estadístico basado en la prueba de t de Student con algunas modificaciones (84,86).

Determinar el valor de t en la prueba de la diferencia significativa de $M = \log Z_{ad} - Z_{exp}$ consiste en:

$$t = M / [EE (Z_{ad}^*)^2 + EE (Z_{exp}^*)^2]^{1/2}$$

En la que Z_{ad}^* se refiere a los valores teóricos aditivos y Z_{exp} a los experimentales. Los errores estándar estimados se calculan con la fórmula:

$$EE (Z^*) = 2.3 \times Z^* \times EE (\log Z^*)$$

La varianza está dada por $V (Z_{ad}^*) = f^2 V (Z_1^*) + (1 - f)^2 V (Z_2^*)$, el error estándar de Z_{ad} se obtiene de esta relación:

$$EE (Z_{ad}^*) = [V (Z_{ad}^*)]^{1/2}$$

Obteniendo el valor de Z_{ad} y Z_{exp} con sus EE, se calcula el valor de t y se compara con el valor de T dado por:

$$T = [T_{ad} (EE (Z_{ad}^*)^2 + t_{exp} (EE Z_{exp}^*)^2) / [EE (Z_{ad}^*)^2 + EE (Z_{exp}^*)^2]$$

El valor de t_{ad} es el valor en la tabla de distribución t con $(n_1 + n_2) - 2$ grados de libertad, en donde $n_1 + n_2$ son la concentraciones del fármaco 1 y el fármaco 2 respectivamente utilizados en el cálculo y t_{exp} es el valor de distribución para $n_{exp} - 2$ grados de libertad, en donde n_{exp} es el número de la concentración de la combinación. Si el valor absoluto de t es mayor al valor de T ($|t| > T$) la diferencia es significativa (86).

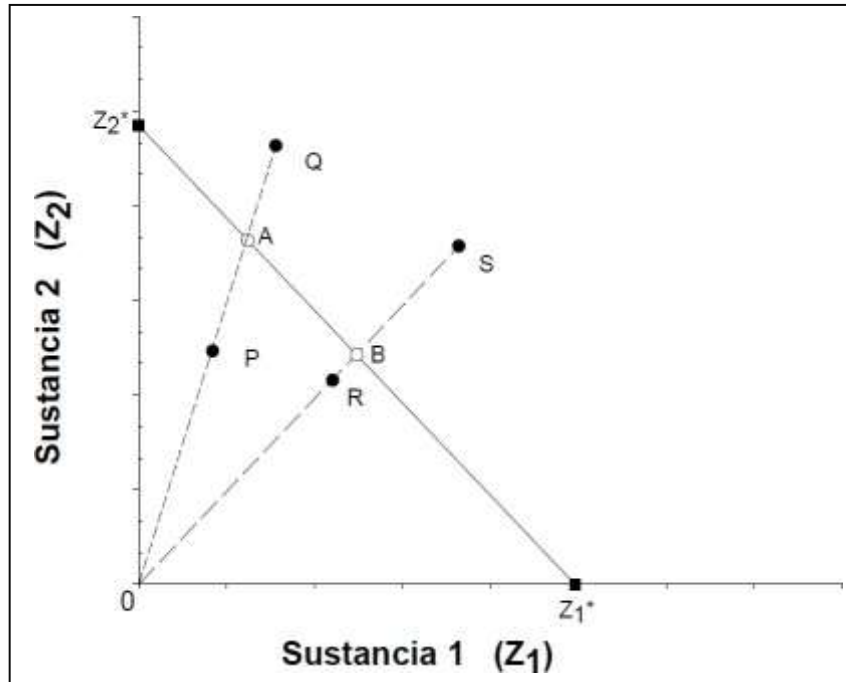


Figura 5. Isoblograma. La línea continua es la línea de aditividad para las sustancias 1 y 2; Z_1^* y Z_2^* son las concentraciones equiefectivas individuales. Los puntos A y B representan concentraciones teóricas aditivas (Z_{ad}). En esta imagen P y R son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con efecto superaditivo, mientras que Q y S representan las Z_{exp} con efecto subaditivo.

2 Antecedentes del problema

2.1 Efectividad del eugenol en la dismenorrea

A pesar de que son ya conocidos y estudiados los efectos anti-inflamatorios del eugenol, no se ha hecho investigación básica ni clínica sobre su uso en la dismenorrea.

Lui et al. (87) investigaron los mecanismos moleculares de los diferentes compuestos activos de la fórmula análoga de decocción “Siwu” para el tratamiento de la dismenorrea primaria para investigar las correlaciones entre compuestos múltiples, objetivos múltiples y vías múltiples; entre los componentes de dicha fórmula se encuentra el eugenol. Aunque las conclusiones describen la participación de vías múltiples, señalan que es necesario un estudio más profundo para evaluar los mecanismos moleculares de los compuestos de la fórmula.

Otros estudios evaluaron el efecto de eugenol sobre las contracciones uterinas. En el primero se probó el efecto del eugenol sobre contracciones espontáneas en úteros de ratas, encontrando que el eugenol fue relajante del útero en forma dependiente de la concentración (88). En el segundo estudio, se indujeron contracciones uterinas mediante un estímulo de bradiquina (incrementando el $[Ca^{2+}]_i$) en ratas, demostrando que el eugenol inhibió las contracciones de forma dependiente de la concentración. Además, se evaluó el efecto del eugenol en miometrio humano estimulado con $PGF_{2\alpha}$ en donde el eugenol fue capaz de inhibir el tono de las contracciones. Sin embargo en ninguno se habla de un posible mecanismo de acción (89).

2.2 Efectividad del diclofenaco en la dismenorrea

El efecto espasmolítico del diclofenaco se ha probado con anterioridad en músculo uterino aislado de rata.

En el estudio de Pérez Vallina et al. (90) se encontró que, el diclofenaco posee un efecto espasmolítico concentración-dependiente en útero de ratas. De acuerdo a sus resultados sugieren que el efecto relajante del útero del diclofenaco era mediado por la participación de la sintasa del óxido nítrico (SON) y nucleótidos cíclicos.

En otra investigación, utilizaron el diclofenaco como control, encontraron que posee un efecto espasmolítico dependiente de la concentración, trabajado sobre contracciones

inducidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en útero de ratas. Sin embargo, en esta investigación no se dieron más datos sobre el posible mecanismo de acción del diclofenaco (91).

2.3 Antecedentes de estudios de la combinación de AINEs más productos naturales

Debido a los efectos adversos producidos por los AINEs (primer tratamiento de elección en la dismenorrea) que se ha desarrollado un gran interés por los productos de origen natural que se han utilizado para reducir el dolor y la inflamación (81). En este sentido, existen muchos estudios que evalúan las posibles interacciones entre compuestos de origen natural y AINEs.

Una investigación evaluó la coadministración de naproxeno (AINE) con citral (presente en cítricos y otras plantas), se demostró con el análisis isoblográfico que la interacción entre el naproxeno y el citral en el efecto antinociceptivo era aditivo. Dichos datos sugieren que la combinación tiene ventajas terapéuticas para el tratamiento clínico del dolor inflamatorio (92).

Otro estudio reportó la farmacocinética y farmacodinámica de la interacción entre diclofenaco y “Trikatu” (un compuesto de pimienta negra, jengibre y pimienta larga), demostró que el porcentaje de inhibición del edema por la combinación de “Trikatu” y diclofenaco fue similar a la mostrada por “Trikatu” solo, pero significativamente menor que la mostrada por diclofenaco solo. Por lo tanto, los resultados experimentales indicaron que el pretratamiento con “Trikatu” puede disminuir la biodisponibilidad de ciertos fármacos, probablemente a través de una interacción fármaco-hierba que ha perjudicado a la eficacia terapéutica de estos fármacos (93).

Acosta-Madrid I. et al. evaluaron la interacción entre el extracto etanólico de *Heliopsis longipes* en combinación con diclofenaco en su efecto antihiperálgico. Los autores mostraron que la interacción fue sinérgica entre el fármaco y el extracto en el modelo de hiperálgia térmica, los datos sugieren que las dosis bajas de la combinación *Heliopsis longipes*-diclofenaco pueden interactuar a nivel sistémico y ofrecer un tratamiento clínico del dolor inflamatorio que es más potente y seguro (94).

En un experimento donde se evaluó la interacción farmacológica entre ácido xilópico (XA) (extracto botánico de la planta *Xylopiya aethiopyca*) con morfina y combinaciones del XA con diclofenaco. Utilizando el análisis isoblográfico se demostró que el extracto XA con

morfina y el XA con diclofenaco tenía una combinación sinérgica en todas las pruebas nociceptivas, demostrando una ventaja terapéutica en esta combinación (95).

Por otro lado Ortiz et al. (96) llevaron a cabo un estudio donde examinaron la interacción mediante análisis isobolográfico entre el extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* (MCE) y diclofenaco en la nocicepción en el modelo formalina. Los autores observaron que la DE_{35} teórica para el efecto antinociceptivo fue significativamente diferente de la DE_{35} experimental; por lo tanto, la interacción entre diclofenaco y MCE que medió el efecto antinociceptivo fue de tipo sinérgico.

Al indagar los efectos de la curcumina en la nocicepción y la farmacocinética del diclofenaco en ratas se concluyó que la DE_{30} teórica derivada para el efecto antinociceptivo (19.2 mg / Kg) era significativamente diferente del valor de DE_{30} experimental observada (9.8 mg / Kg); por lo tanto, la interacción entre diclofenaco y curcumina fue de tipo sinérgico, con base a eso se sugirió que, la combinación puede interactuar a nivel sistémico como una opción con más ventajas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y dolor (97).

Otra investigación realizada por Ortiz et al. (98) dónde describieron los efectos sobre la inflamación en las ratas que resultan de la interacción entre el naproxeno y citral, encontraron que la DE_{30} teórica derivada para el efecto anti-inflamatoria fue de 504.4 mg / Kg; este fue significativamente mayor que el valor experimental que observaron (190.6 mg / Kg), con eso resultados concluyeron que había una interacción sinérgica antiinflamatoria y que la combinación es una alternativa más potente y segura para la terapéutica de la inflamación.

Como un antecedente directo, se evaluó en un modelo de órgano aislado, la interacción del efecto relajante de la combinación de paracetamol y pirilamina en útero humano *in vitro*. Con base en el análisis isobolográfico, obtuvieron un índice de interacción de 0.33 ± 0.14 al comparar las DE_{30} este dato sugiere que la interacción a dosis bajas es de tipo sinérgica, representando una ventaja terapéutica para el tratamiento clínico del dolor dismenorreico (99).

3 Marco Teórico

La dismenorrea conocida comúnmente como cólico menstrual es una de las patologías ginecológicas principales, presenta una gran variabilidad en su prevalencia a nivel mundial (16 a 90%) (1–3); es de severidad variable, pasando desde síntomas que ocasionalmente interfieren con las actividades de la vida diaria y, en los casos más graves incapacidad e interrupción completa de las actividades cotidianas, con una repercusión fuerte a nivel escolar y laboral (6,7). El tratamiento de primera línea conocido es por AINEs (ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco etc.) así como la combinación de fármacos (paracetamol, pamabrom y pirilamina), dichos fármacos presentan limitaciones y no tienen el mismo alcance y eficacia en todas las poblaciones, y son propensos a desarrollar diferentes clases de efectos adversos como daño gástrico principalmente (6,7,10). El tratamiento de segunda línea para el manejo de la dismenorrea son los nutraceuticos (suplementos dietéticos y productos botánicos), entre las que se encuentra, la manzanilla, vitaminas B, D y E, jengibre etc., todas ellas con antecedentes que prueban sus propiedades similares a las de los AINEs (antiinflamatorios, antinociceptivos) en la sintomatología de la dismenorrea (13). Otro producto natural es el eugenol, que es el compuesto esencial extraído en el aceite de clavo y cuyas propiedades antiinflamatorias han sido estudiadas y reportadas en diferentes campos (67,68). Con la investigación creciente sobre las nuevas alternativas para el tratamiento de la dismenorrea se han realizado diversos estudios donde se combina el efecto de una medicina complementaria (llámese producto natural) con los fármacos de primera línea, esto con el objetivo de potenciar efectos terapéuticos, evitar la estrategia de una monoterapia (y la consiguiente falla terapéutica que pueda tener) y disminuir los efectos secundarios ya sea del fármaco o del producto natural.

III JUSTIFICACIÓN

La dismenorrea es uno de los trastornos ginecológicos más frecuentes en las mujeres jóvenes, siendo representado como un problema grave de salud pública debido a su prevalencia alta (1–3). La dismenorrea presenta importantes consecuencias; hablando de las complicaciones sociales (en los casos de severidad moderada y grave) provoca alteración en las actividades cotidianas, bajo rendimiento a nivel escolar y laboral e incluso incapacidad total, en el caso de este último, son muchas las horas de trabajo que se pierden por consecuencia del padecimiento, lo que conlleva también a repercusiones económicas. Acerca de las complicaciones físicas, los estudios demuestran que las mujeres dismenorréicas, presentan una mayor sensibilidad al dolor incluso en zonas no asociadas al malestar menstrual, y en etapas fuera del ciclo donde se debiera cursar sin dolor. También señalan que dicha sensibilidad aumentada puede hacer a las pacientes presentar susceptibilidad a otras condiciones de dolor crónico en la edad adulta (32).

Dicha problemática requiere un tratamiento que tenga eficacia, seguridad y buena disponibilidad. A pesar de que ya antes la literatura científica ha expuesto esta necesidad terapéutica, no existe un estándar de oro para el tratamiento de la dismenorrea; es decir, los tratamientos médicos como los AINEs presentan mayor efectividad pero más efectos secundarios y, aunque las terapias alternas presentan efectos secundarios mínimos, no poseen un efecto superior a los AINEs. Debido a esto, el manejo del padecimiento generalmente se da por automedicación, dicha práctica presenta un alto porcentaje de falla terapéutica y mayor presencia de efectos adversos (6,7,10).

El eugenol como un extracto no medicamentoso, tiene en la investigación un fuerte sustento en sus diversas propiedades; principalmente como potente anti-inflamatorio y anti-nociceptivo que se da por su mecanismo de acción como inhibidor la COX-2 y la lipooxigenasa 5 (72,73); y gracias a esto es utilizado en diferentes patologías asociadas al dolor; lo que da validez para investigar estas capacidades sobre la patogenia y sintomatología asociadas a la dismenorrea.

En la actualidad se ha optado por considerar a las terapias alternativas (extractos, vitaminas, minerales, etc.) como una opción fiable de tratamiento. Sin embargo, con base a su menor eficacia en comparación con los AINEs, aunado con el antecedente de la efectividad de los medicamentos con 2 o más combinaciones de fármacos, se ha desarrollado investigación que

evalúa los efectos combinados de un medicamento como los AINEs y un extracto o terapia alternativa no medicamentosa. La presente investigación se encuentra en la búsqueda de una sustancia que permita alcanzar este objetivo con una dosificación de ambos componentes de una manera más homogénea, como podría ser el eugenol, esto con la finalidad de potenciar de los efectos terapéuticos en el padecimiento, y a su vez disminuir la falla terapéutica y los efectos adversos.

Demostrar el efecto anti-inflamatorio y espasmolítico del eugenol en combinación con diclofenaco (AINE), aumentará el conocimiento de las propiedades de esta combinación sobre un padecimiento de esta naturaleza (ligado a los procesos de inflamación y contracción). A su vez incrementará las opciones terapéuticas en la investigación preclínica, que a futuro podrían desarrollarse en la investigación clínica, para dar un tratamiento más eficaz y seguro para la dismenorrea primaria.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto espasmolítico y mecanismo de acción del eugenol, el diclofenaco y su combinación en un modelo de útero aislado de ratas Wistar con el sistema de registro isométrico.

4.1.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto espasmolítico del eugenol y el diclofenaco de forma individual con la construcción de curvas de concentración respuesta en útero aislado de rata.
2. Comparar el efecto útero-relajante del eugenol y el diclofenaco con los parámetros de la CI_{50} y la $R_{máx}$ mediante un análisis de curvas.
3. Dilucidar el posible mecanismo de acción del eugenol y el diclofenaco evaluando su efecto espasmolítico en presencia de diferentes bloqueadores.
4. Evidenciar el tipo de interacción farmacológica de la combinación de eugenol y diclofenaco (en diferentes proporciones), utilizando las concentraciones teóricas obtenidas en el análisis isobolográfico.
5. Sugerir el mecanismo de acción utilizando la combinación que haya dado sinergismo en presencia de diferentes fármacos bloqueadores.

V HIPÓTESIS

El eugenol y diclofenaco tienen un efecto espasmolítico, mecanismos de acción complementarios, y la combinación de eugenol y diclofenaco será de tipo sinérgico o de potenciación.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Contexto de la investigación

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción, ubicado en la Escuela de Medicina Dr. Eliseo Ramirez Ulloa, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo. En el periodo de Enero a Marzo de 2017 se llevó a cabo la parte experimental del estudio, posteriormente de Marzo a Julio de 2018 se realizaron los análisis, revisión y discusión de resultados, escritura de tesis y redacción del artículo.

6.2 Tipo de estudio

Esta investigación fue de biomédica básica, de corte experimental con alcance analítico.

Criterios de inclusión:

- Ratas hembras vírgenes de línea albina Wistar.
- Peso de 200 a 220 g.
- Buen estado de salud física.
- Ratas que se encuentren en ciclo pre-estro-estro (frotis vaginal, con células cornificadas)

Criterios de exclusión:

- Reporte de enfermedades o infecciones.

6.2.1 Animales de experimentación

Para el experimento se utilizaron 70 ratas Wistar hembras con peso de 200 a 220 g, del bioterio del Centro de Investigación en Biología de la Reproducción. Las ratas estuvieron en ciclos de luz/obscuridad de 12/12 horas y tuvieron libre acceso a alimento y agua. Se dividieron en los siguientes grupos:

- 15 ratas Wistar para el sistema de registro isométrico, para la evaluación del eugenol.
- 15 ratas Wistar para el sistema de registro isométrico, para la evaluación del diclofenaco.
- 10 ratas para controles de vehículos en el sistema de registro isométrico.
- 15 ratas para evaluar la combinación de eugenol y diclofenaco.
- 15 ratas para la evaluación de mecanismo de acción de la combinación de eugenol y diclofenaco.

6.2.2 Fármacos.

Se utilizaron los siguientes compuestos: sal sódica de diclofenaco, eugenol ReagentPlus® 99%, benzoato de β -Estradiol $\geq 97\%$, dimetil sulfóxido $\geq 99.9\%$ (DMSO), NG-nitro-L-arginina (L-NAME), 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-alquinoxalin-1-one] (ODQ), glipizida y 4-aminopiridina (4-AP). Todos los fármacos se obtuvieron de la empresa Sigma-Aldrich^{MR}. El eugenol, ODQ y glipizida se disolvieron en DMSO. El diclofenaco, 4-AP y L-NAME fueron disueltos en agua bidestilada. El benzoato de β -Estradiol se disolvió en aceite de maíz.

6.2.3 Reactantes

Se utilizaron los siguientes reactantes: cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl_2) y glucosa, los cuales se disolvieron en agua bidestilada.

En el diseño metodológico se puede ver más a detalle las fases en las que se desarrolló la investigación presente (Figura 6).

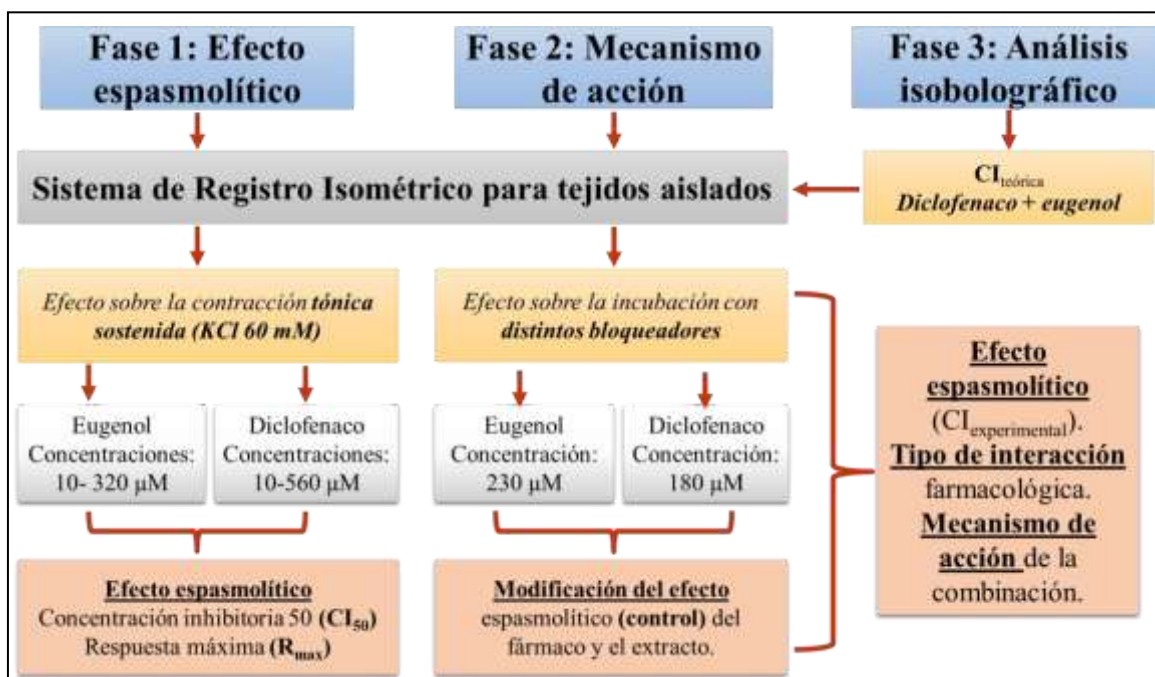


Figura 6. Diseño metodológico.

6.3 Sistema de registro isométrico para medir la contracción del tejido uterino aislado de la rata.

6.3.1 Principio

Para evaluar el efecto del eugenol sobre la contracción tónica sostenida del útero aislado de rata se utilizó el sistema de registro isométrico para tejidos aislados, el cual permite registrar la actividad funcional de los tejidos (contracción o relajación) y determinar el efecto de sustancias espasmódicas y antiespasmódicas; además, con los datos obtenidos por esta técnica, es posible cuantificar los parámetros farmacológicos de la concentración efectiva 50 o concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y la respuesta máxima (R_{máx}), utilizando estímulos electromecánicos y farmacomecánicos (100).

6.3.2 Procedimiento

Se utilizaron ratas hembras vírgenes (200-220 g de peso corporal), tratadas con benzoato de estradiol (40 µg/kg por vía subcutánea) 48 h antes del experimento; la etapa del estro se confirmó por examen microscópico de frotis frescos vaginales. Para realizar la eutanasia la rata se sacrificó por dislocación cervical. Se efectuó un corte en la pared abdominal y se extrajo el útero, que fue colocado inmediatamente en una caja de Petri con solución Ringer, después se limpió del tejido adyacente y grasa. De cada cuerno uterino se obtuvieron 12 tiras uterinas de 1 cm de longitud, las tiras se colocaron en las cámaras de tejidos aislados; una punta de la tira se sujetó a la base de las cámaras con hilo de seda de 4 ceros y la otra punta del tejido, se unió con el hilo a un transductor de tensión FT03. El volumen de cada cámara fue de 3 mL, la composición de la solución Ringer Locke utilizada fue (mM): NaCl 154, NaHCO₃ 5.95, KCl 5.63, CaCl₂ 1 y glucosa 0.277. Los tejidos se tensionaron a 1 g, a la temperatura de 37° C y con burbujeo constante de gas carbógeno (5% CO₂ en O₂). Para la estabilización de los tejidos, éstos se sometieron a un período de equilibrio (30 min) durante el cual, se lavaron con 3 mL de solución Ringer Locke fresco cada 10 minutos. Los tejidos se estimularon electromecánicamente con una solución despolarizante de KCl (60 mM) induciendo una contracción tónica sostenida. Las respuestas contráctiles se registraron isométricamente utilizando un polígrafo Grass Telefactor; los datos se digitalizaron y se analizaron por medio del programa PolyView; siguiendo el procedimiento descrito por otros estudios (101,102). Con este método se estudió el efecto del eugenol y diclofenaco a diferentes concentraciones (µM) sobre la contracción tónica sostenida inducida por la

solución despolarizante de KCl 60 mM, también se evaluó el efecto de la combinación del diclofenaco con eugenol (Figura 7a), las concentraciones estudiadas se pueden ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de estudio sobre la contracción de tejido uterino aislado de rata.

No. de ratas	Muestra	Concentraciones
15	Eugenol	10-320 μ M
15	Diclofenaco	10-560 μ M
15	Combinación	Proporción
	Eugenol y diclofenaco	1:1
		1:3 y 3:1
1:10 y 10:1		

6.4 Evaluación del efecto espasmolítico del diclofenaco y eugenol ante los diferentes fármacos.

También se evaluó la incubación (15 minutos) sobre la contracción tónica sostenida de diferentes fármacos bloqueadores: L-NAME (inhibidor de la síntesis de óxido nítrico), ODQ (inhibidor de guanilato ciclasa soluble [GCs]), glipizida (bloqueador de los canales de potasio sensibles a ATP) y 4-AP (bloquea los canales de K^+ dependientes de voltaje); las concentraciones utilizadas de cada bloqueador se muestran en la tabla 2. Luego se adicionó eugenol y diclofenaco y se registró el porcentaje de relajación; las concentraciones fueron seleccionadas de acuerdo a un análisis inicial por regresión con el programa SigmaStat, de dónde se obtuvieron la $CI_{50}=213 \mu$ M para eugenol y $CI_{50}=142 \mu$ M para diclofenaco, con base en esos datos se escogieron las concentraciones logarítmicas inmediatas, siendo 240 μ M para eugenol y 180 μ M para diclofenaco. Con este mismo método se estudió el efecto de los bloqueadores con las combinaciones teóricas de eugenol y diclofenaco y se registró el porcentaje de relajación (Figura 7b); las concentraciones se eligieron de acuerdo a los resultados del análisis isobolográfico.

Tabla 2. Concentraciones de estudio para cada bloqueador.

Fármaco	Concentraciones
L-NAME	100 μ M
ODQ	10 mM
Glipizida	10 μ M
4-AP	1 μ M
Todas las concentraciones utilizadas son con base en lo reportado por la bibliografía.	

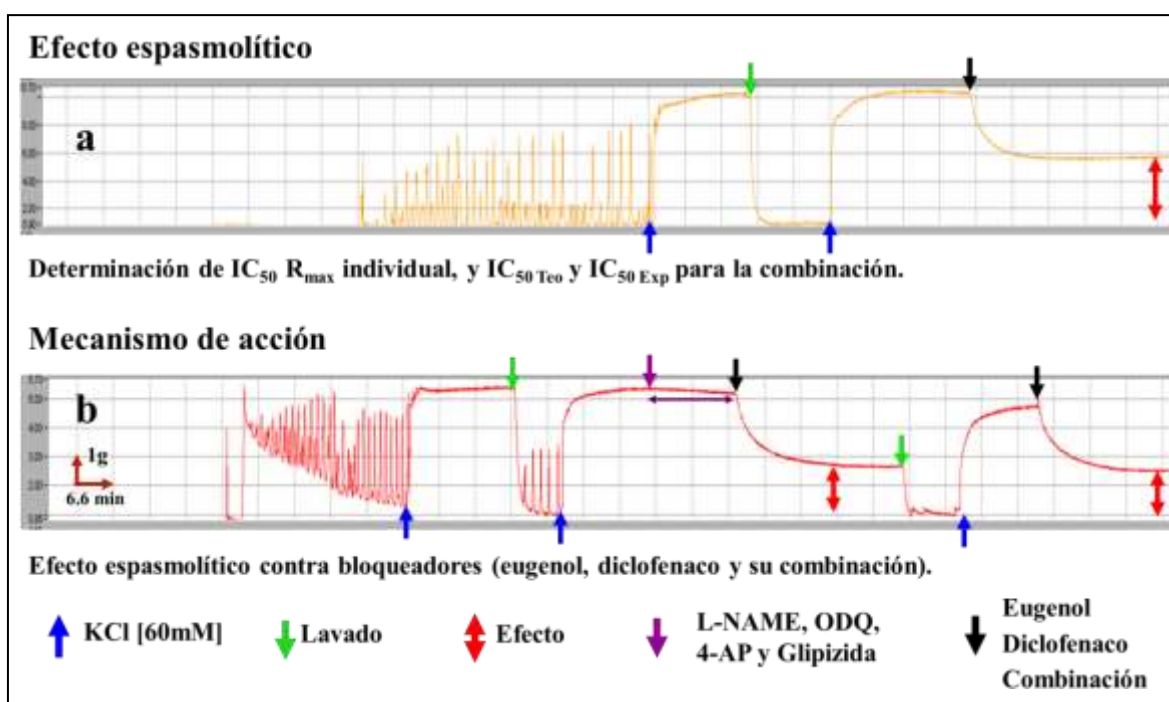


Figura 7. Método usado en el sistema de registro isométrico para tejidos aislados. Trazos obtenidos del programa Poly View.

6.5 Análisis isobolográfico

6.5.1 Procedimiento

- A.** En el modelo de tejido aislado, se realizó la contracción del tejido con KCl y se efectuó la adición al baño de diferentes concentraciones de eugenol (10 a 230 μ M). En otros tejidos se indujo la contracción del tejido con KCl y se realizó la adición al baño de diferentes concentraciones de diclofenaco (10-560 μ M).
- B.** Se graficaron los resultados de los experimentos y se obtuvieron curvas concentración-respuesta del diclofenaco y del eugenol y a partir de éstas, utilizando regresión lineal se determinó el valor de la CI_{50} de cada fármaco.
- C.** Una vez obtenida la CI_{50} de diclofenaco y de eugenol, se calculó la concentración inhibitoria 50 teórica ($CI_{50\ Teó}$) para las proporciones 1:1, 1:3, 3:1, 1:10 y 10:1.
- D.** Directamente en la cámara de tejido (sistema de registro isométrico), se administró en proporciones equiefectivas constantes a partir de la CI_{50} de cada uno de los fármacos de manera individual las siguientes concentraciones:
 - a. CI_{50} diclofenaco/2 + CI_{50} eugenol/2, CI_{50} diclofenaco/4 + CI_{50} eugenol/4, CI_{50} diclofenaco/8 + CI_{50} eugenol/8 y CI_{50} diclofenaco/16 + CI_{50} eugenol/16.
- E.** Estos resultados se graficaron en curvas concentración-respuesta y utilizando regresión lineal se calcularon los valores de las concentraciones inhibitorias 50 experimentales ($CI_{50\ Exp}$) de la combinación. Una vez obtenidos los valores teóricos y experimentales de la CI_{50} , se realizó una comparación estadística entre estos valores con la prueba t de Student.
- F.** Los valores de la $CI_{50\ Exp}$ menores que $CI_{50\ Teó}$ se interpretaron como una interacción superaditiva o de potenciación cuando la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Para un valor de $CI_{50\ Exp}$ mayor significativamente ($p < 0.05$) que la $CI_{50\ Teó}$, la combinación se interpretó como subaditiva o antagonista, y cuando no existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) se interpretó como la ausencia de interacción, declarándose una combinación con relación aditiva o de sumación (103,104).

6.6 Análisis estadístico

Los datos se procesaron por un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos que presentaron una $p < 0.05$. Utilizando regresión se obtuvo la CI_{50} y la $R_{máx}$. Todos los análisis anteriores se realizaron utilizando el programa GraphPadPrism. Los datos obtenidos en el análisis isobolográfico se evaluaron con una prueba de t de Student adaptada.

6.7 Aspectos éticos

La presente investigación fue evaluada y aprobada por del Comité Institucional Ético para el cuidado y uso de animales de laboratorio del bioterio de la UAEH. Los animales recibieron un trato humanitario de acuerdo a los lineamientos establecidos por la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

VII RESULTADOS

7.1 Efecto espasmolítico del eugenol y del diclofenaco

Los vehículos para todos los fármacos y compuestos utilizados en este estudio fueron probados, y su efecto no fue estadísticamente significativo siendo siempre menor al 10%, como se puede ver en el Anexo 1.

En el sistema de registro isométrico para tejido aislado, el eugenol inhibió la contracción tónica sostenida inducida por un estímulo electromecánico con un efecto dependiente de la concentración; con esos datos se obtuvo la CI_{50} y $R_{m\acute{a}x}$ como se muestra en la figura 8. De igual forma, el diclofenaco inhibió la concentración por el mismo estímulo de forma dependiente de la concentración (figura 10). Para eugenol y diclofenaco se hicieron pruebas de vehículos, en las figuras 9 y 11 se puede observar que el efecto de los vehículos es en ambos casos menor a 10%.

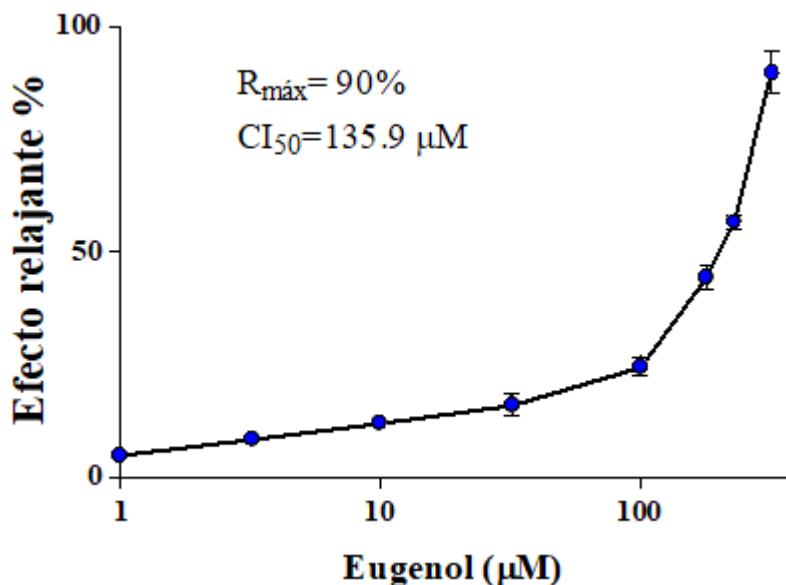


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de eugenol sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM. Cada punto representa el valor promedio de 8 experimentos ($n=8$) y las barras verticales representan el valor del EEM. Datos obtenidos por prueba de regresión lineal.

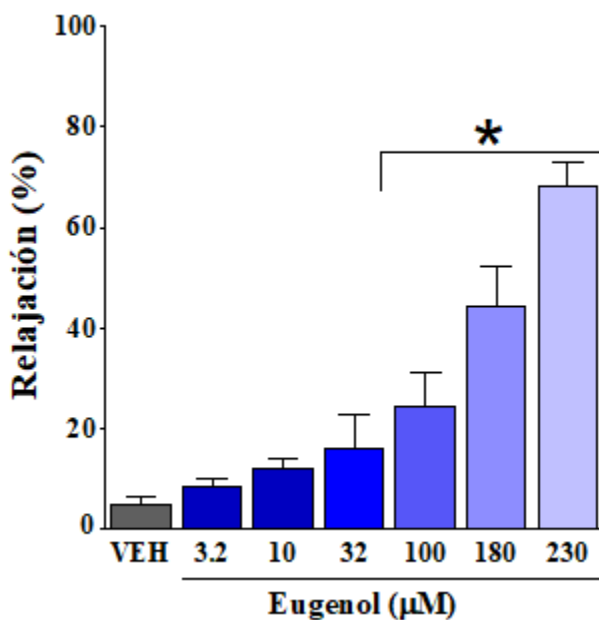


Figura 9. Efecto relajante (%) de eugenol sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM. Cada punto representa el valor promedio de 8 experimentos (n=8) y las barras verticales representan el valor del EEM, * p<0.05. Prueba de ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni.

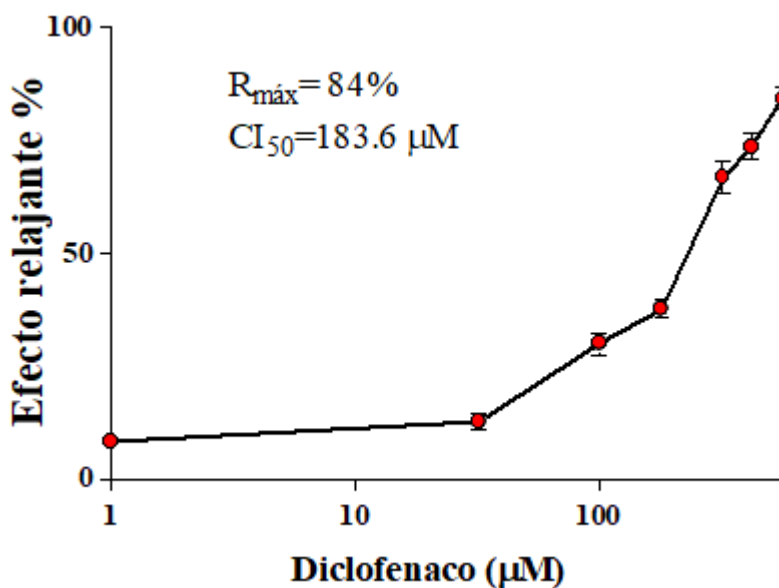


Figura 10. Efecto útero inhibitorio de diclofenaco sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 60 mM. Cada punto representa el valor promedio de 8 experimentos (n=8) y las barras verticales representan el valor del EEM. Prueba de regresión lineal.

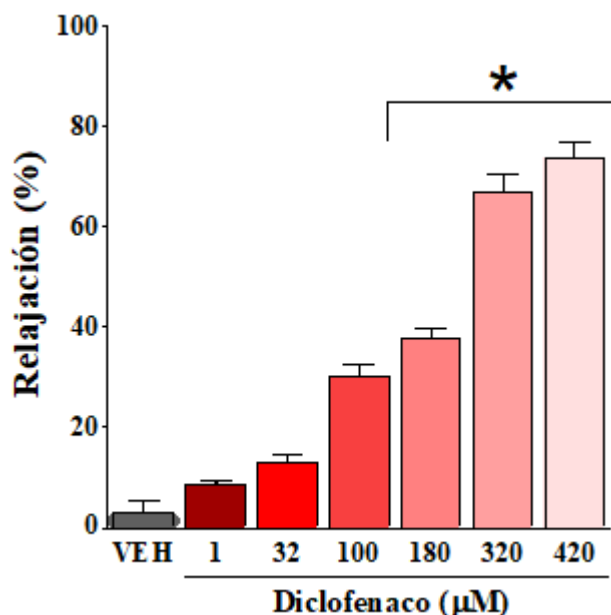


Figura 11. Efecto relajante (%) de diclofenaco sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM. Cada punto representa el valor promedio de 8 experimentos (n=8) y las barras verticales representan el valor del EEM, * p<0.05. Prueba de ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni.

7.2 Respuesta a diferentes bloqueadores.

Para investigar el mecanismo de acción probable del efecto relajante individual del eugenol y el diclofenaco se realizaron experimentos en donde se estudió el efecto relajante de los compuestos en presencia de los bloqueadores: L-NAME, ODQ, 4-AP y glipizida. El efecto relajante de eugenol a la concentración de 230 µM no presentó cambios estadísticamente significativos en presencia de los diferentes inhibidores (p<0.05); de igual forma, el efecto de diclofenaco a la concentración de 180 µM no presentó cambios estadísticamente significativos en presencia de los diferentes inhibidores (Figuras 12 y 13) (p<0.05).

De manera individual los fármacos bloqueadores no causan cambios significativos a la contracción uterina. El efecto individual de los bloqueadores durante la incubación se puede ver con más detalle en el anexo 2.

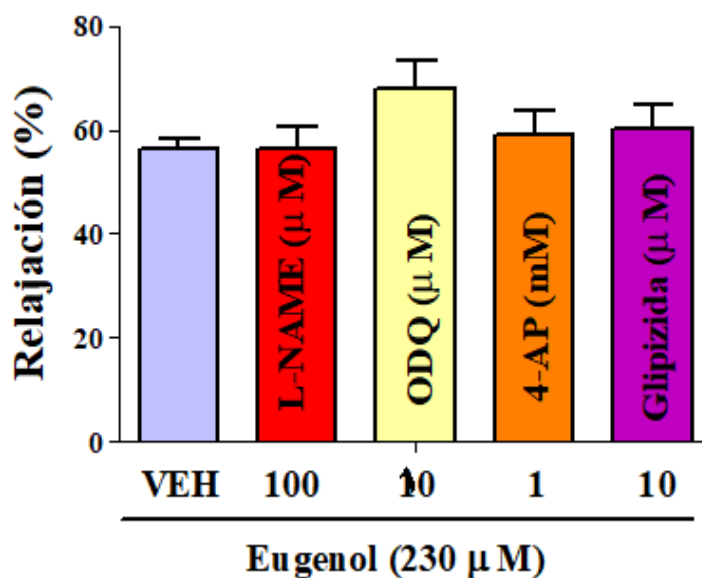


Figura 12. Efecto de los diferentes inhibidores sobre el efecto relajante eugenol: L-NAME, 4-AP, ODQ, glipizida, n=6-9. Análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni ($p > 0.05$).

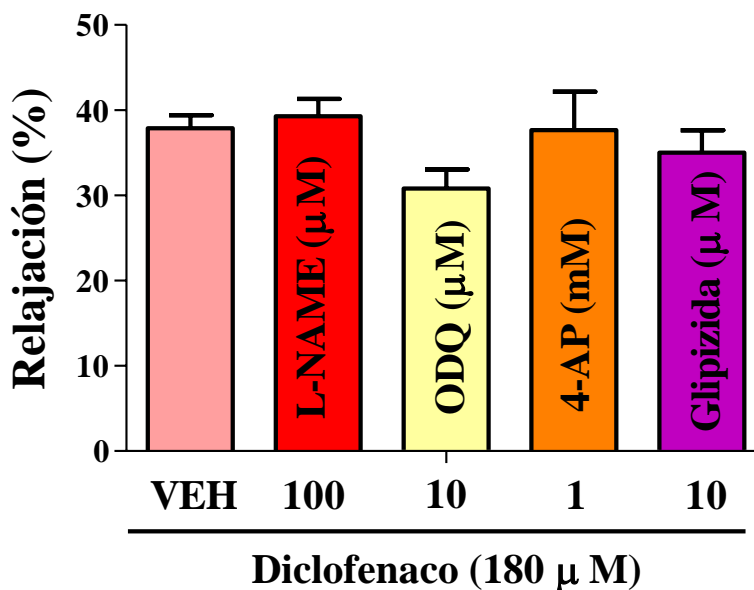


Figura 13. Efecto de los diferentes inhibidores sobre el efecto relajante diclofenaco: L-NAME, 4-AP, ODQ, glipizida, n=6-9. Análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni ($p > 0.05$).

7.3 Interacción farmacológica entre eugenol y diclofenaco.

Mediante la regresión lineal se obtuvieron las $CI_{50 \text{ Teó}}$, que fueron estudiadas, y posteriormente con base en los resultados obtenidos de las combinaciones en las diferentes proporciones se obtuvieron las $CI_{50 \text{ Exp}}$. Las concentraciones teóricas y experimentales de cada proporción se analizaron mediante el análisis isoblográfico y se obtuvieron los índices de interacción (γ), como se muestra en las tablas 3 y 4.

En el isoblograma (figura 14) se muestra en la línea de aditividad la concentración teórica 1:1, en comparación podemos observar que el punto de la $CI_{50 \text{ Exp}}$ se ubica ligeramente arriba de la línea de aditividad, lo que indica un efecto de sumación con una $\gamma=1.14$, estos datos concuerdan con la proporciones 1:3 y 3:1 (figura 15). Por otro lado en el isoblograma de la proporción 1:10 y 10:1 (figura 16 y 17) se observa que el punto de la $CI_{50 \text{ Exp}}$ para 1:10 se ubica por encima de la línea de aditividad con una $\gamma=2.45$, estos datos señalan un efecto de antagonismo entre los fármacos. Contrario a esto, el punto de la $CI_{50 \text{ Exp}}$ para 10:1 se encuentra por debajo de la línea de aditividad, es decir dicha proporción muestra un efecto de sinergismo con una $\gamma=0.55$ ($p<0.05$).

Para cada combinación en diferente proporción se estudió la $CI_{50 \text{ Teó}}$, $CI_{25 \text{ Teó}}$, $CI_{12.5 \text{ Teó}}$ y $CI_{6.25 \text{ Teó}}$ con estos datos se realizaron gráficas logarítmicas que permiten ver el desplazamiento de las diferentes combinaciones y proporciones en las figuras de la 18 a la 21.

De los resultados expuestos podemos observar que las interacciones en las curvas de las proporciones 1:1, 1:3, 3:1 se ubican al nivel de las curvas individuales de diclofenaco y eugenol (interacción de tipo aditiva o de sumación). Mientras que la curva de la proporción 10:1, se desplazó hacia la izquierda con respecto a las demás en todas la CI (interacción de tipo sinérgica). Todos estos datos concuerdan con lo mostrado en los isoblogramas.

Tabla 3. CI₅₀ Teó, CI₅₀ Exp e índice de interacción (γ) de la combinación diclofenaco-eugenol, proporción 1:1, 1:3 y 3:1.

Proporción	CI ₅₀ Teó	CI ₅₀ Exp	Índice de interacción (γ)
1:1	159.8 ± 37.8	182.4 ± 74.4	1.14
Fármaco			
Diclofenaco	91.8	104.8	
Eugenol	68	77.6	
1:3	147.9 ± 52.5	152.1 ± 44.3	1.03
Fármaco			
Diclofenaco	45.9	2920.4	
Eugenol	102	104.9	
3:1	171.7 ± 28.5	70.1	0.96
Fármaco			
Diclofenaco	132.9	42.6	
Eugenol	32.8	10.5	

Tabla 4. CI₅₀ Teó, CI₅₀ Exp e índice de interacción (γ) de la combinación diclofenaco-eugenol, proporción 1:1, 1:10 y 10:1.

Proporción	CI ₅₀ Teó	CI ₅₀ Exp	Índice de interacción (γ)
1:1	159.8 ± 37.8	182.4 ± 74.4	1.14
Fármaco			
Diclofenaco	91.8	104.8	
Eugenol	68	77.6	
1:10	140.2 ± 63.2	343.3 ± 173.1	2.45
Fármaco			
Diclofenaco	91.8 ± 21.7	104.8 ± 42.8	
Eugenol	68 ± 16.1	77.6 ± 31.7	
10:1	179.3 ± 28.2	99.2 ± 14.5	0.55*
Fármaco			
Diclofenaco	167.1 ± 26.3	92.5 ± 13.5	
Eugenol	12.2 ± 1.9	6.8 ± 1.0	

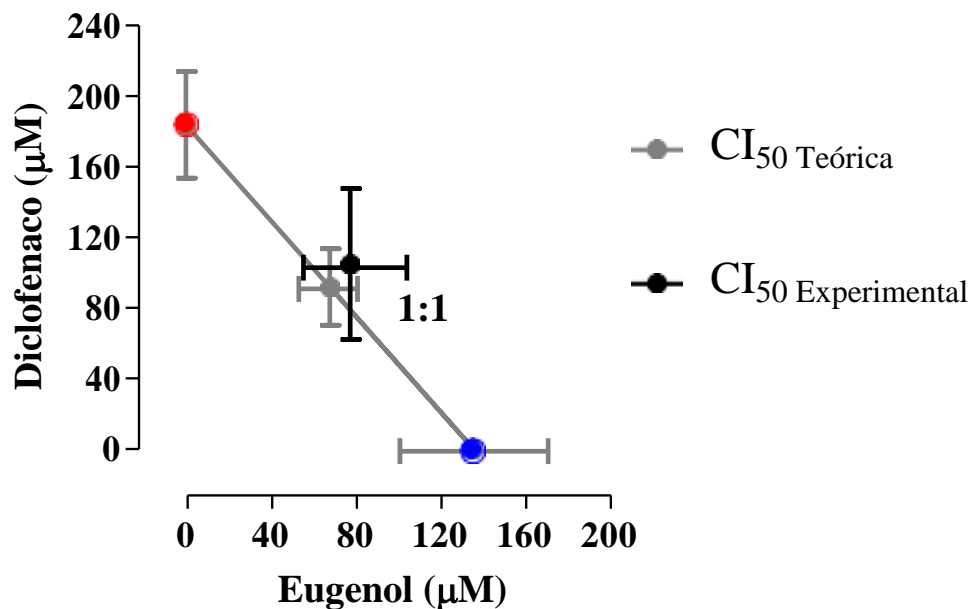


Figura 14. Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 1:1. Prueba de *t* adaptada ($p > 0.05$).

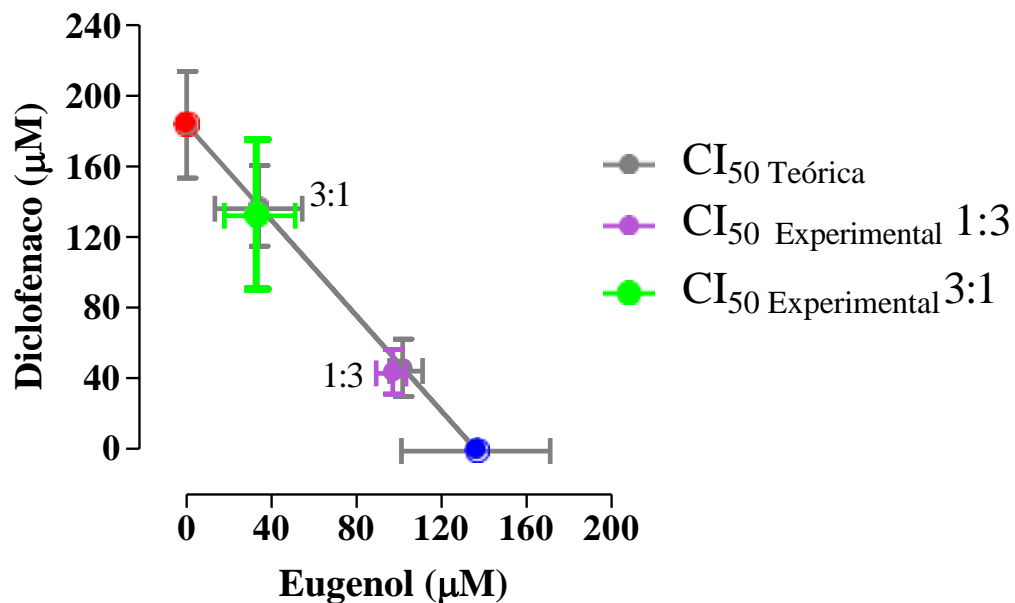


Figura 15. Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 1:3, 3:1. Prueba de *t* adaptada ($p > 0.05$).

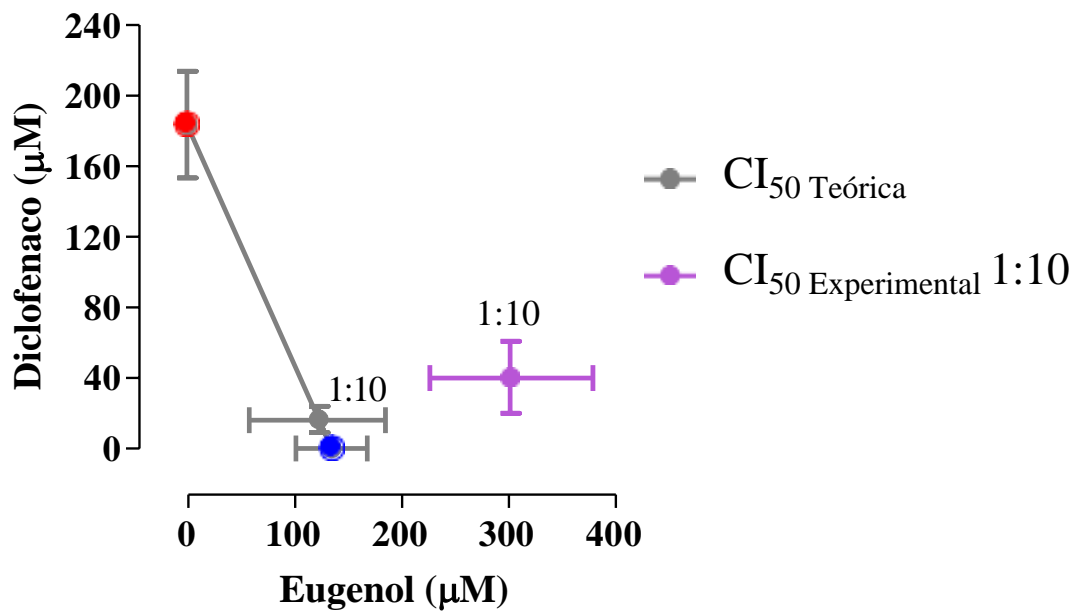


Figura 16. Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 1:10. Prueba de *t* adaptada ($p < 0.05$).

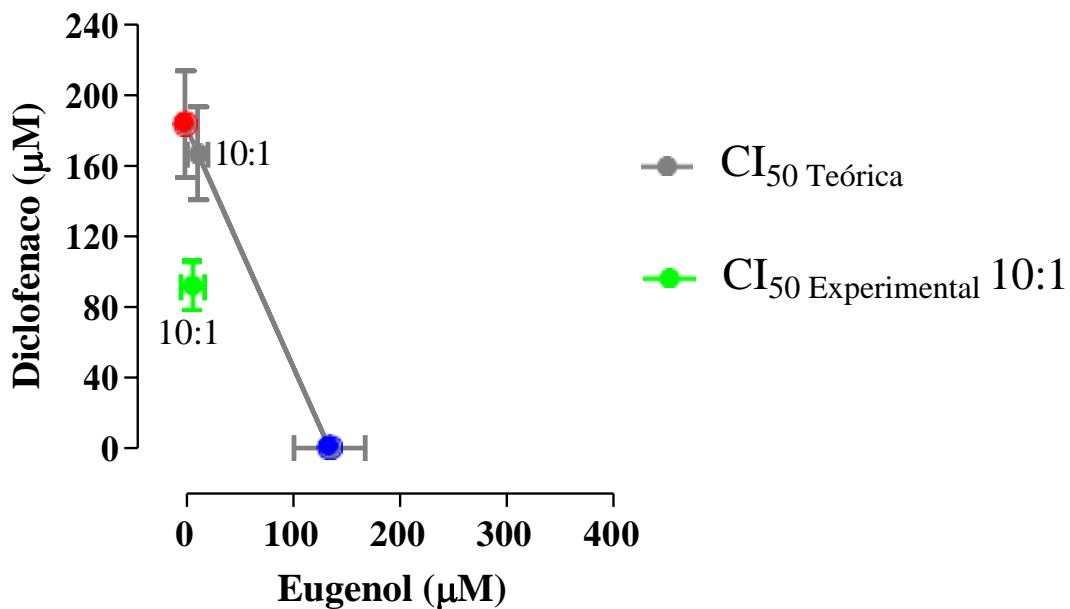


Figura 17. Isoblograma de la combinación de diclofenaco y eugenol en proporción 10:1. Prueba de *t* adaptada ($p < 0.05$).

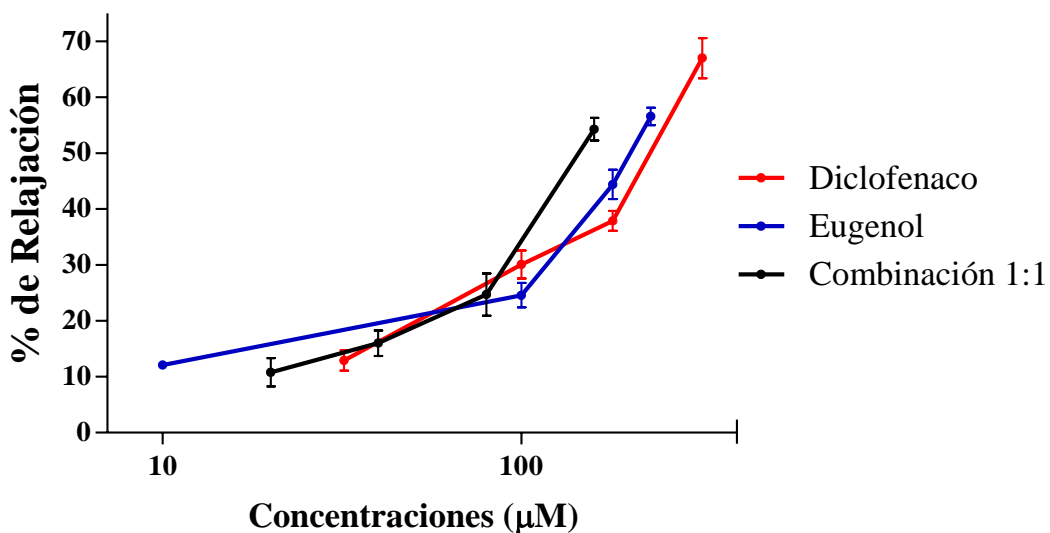


Figura 18. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 1:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25}$ Exp) (n=6).

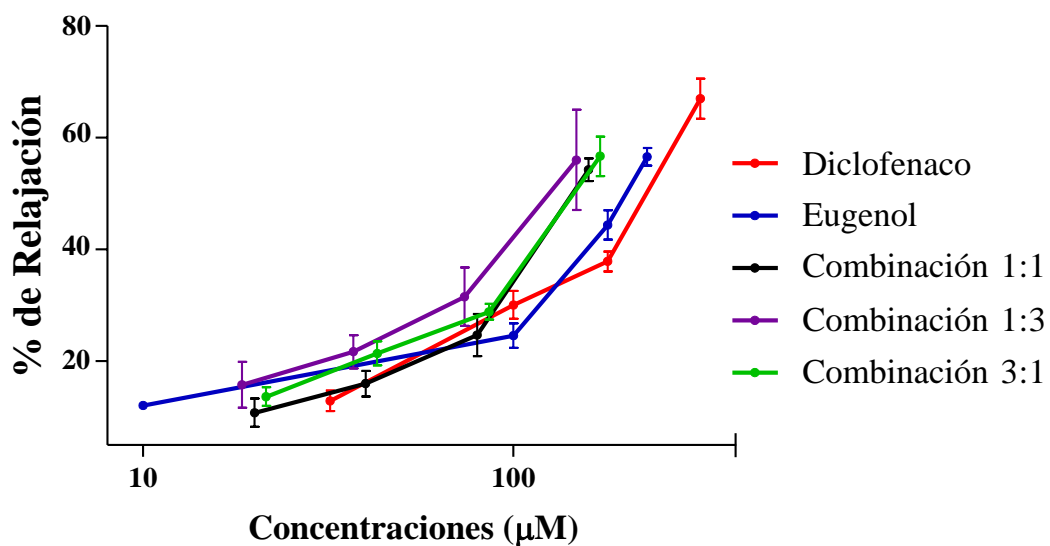


Figura 19. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 1:1, 1:3, 3:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25}$ Exp) (n=6).

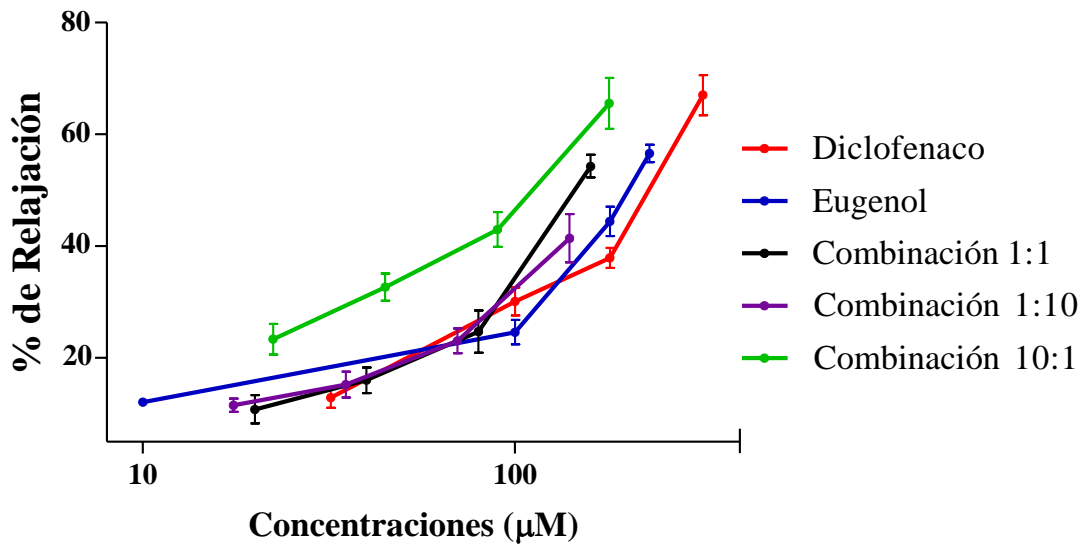


Figura 20. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 1:1, 1:10, 10:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25}$ Exp) (n=6).

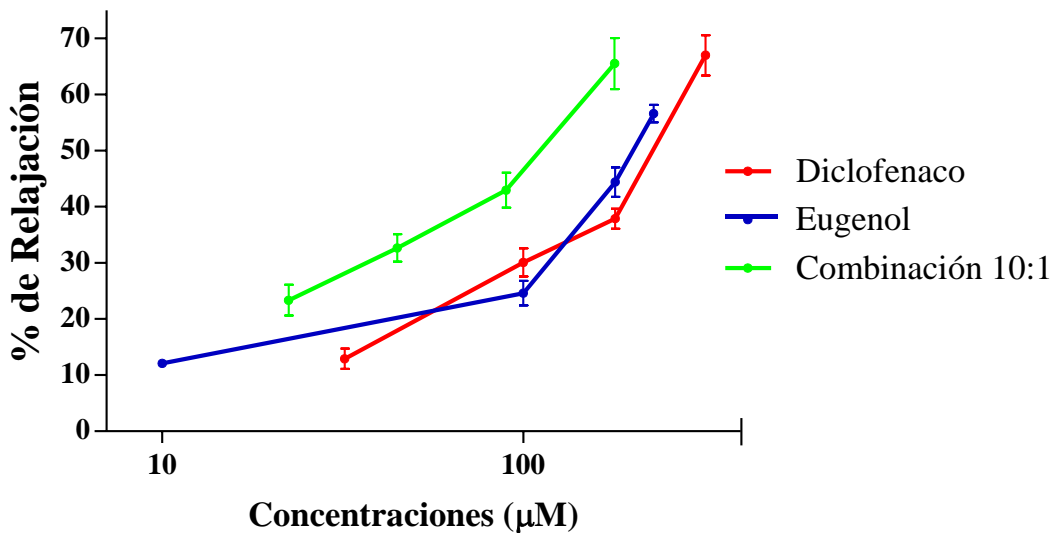


Figura 21. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del eugenol, diclofenaco y su combinación en la proporción 10:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25}$ Exp) (n=6).

7.4 Combinación de proporción 10:1 contra bloqueadores.

De acuerdo a los resultados se seleccionó la combinación en la proporción 10:1, ya que esta combinación dio una interacción de tipo sinérgica. Dicha combinación se probó contra los diferentes bloqueadores (L-NAME, ODQ, glipizida y 4-AP).

Las comparaciones entre el efecto de las CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25 \text{ Exp}}$ de la proporción 10:1 contra las mismas en presencia de los bloqueadores se puede observar en las figuras de la 22.23, 24 y 25. En la figura 26 se nota la modificación que sufrió la $CI_{50 \text{ Exp}}$ de la proporción 10:1 en presencia de cada uno de los bloqueadores.

En presencia de los inhibidores se observó que el ODQ un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (GCs), bloquea el efecto de la combinación al grado de desplazar la curva en todas las concentraciones. Con menor eficacia, la glipizida también bloquea el efecto. También, el ODQ modifica de manera significativa la $CI_{50 \text{ Exp}}$ de 99.1 a 2004.8 μM , y glipizida a 320.7 μM ($p < 0.05$).

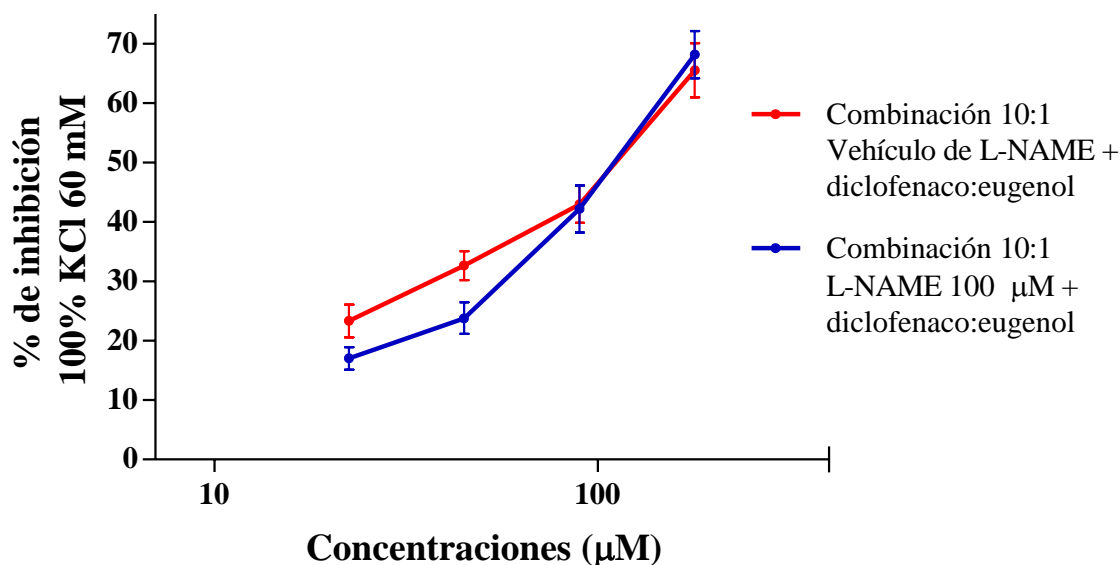


Figura 22. Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25 \text{ Exp}}$) y el mismo en presencia de L-NAME ($n=6$). Prueba de t de Student ($p > 0.05$).

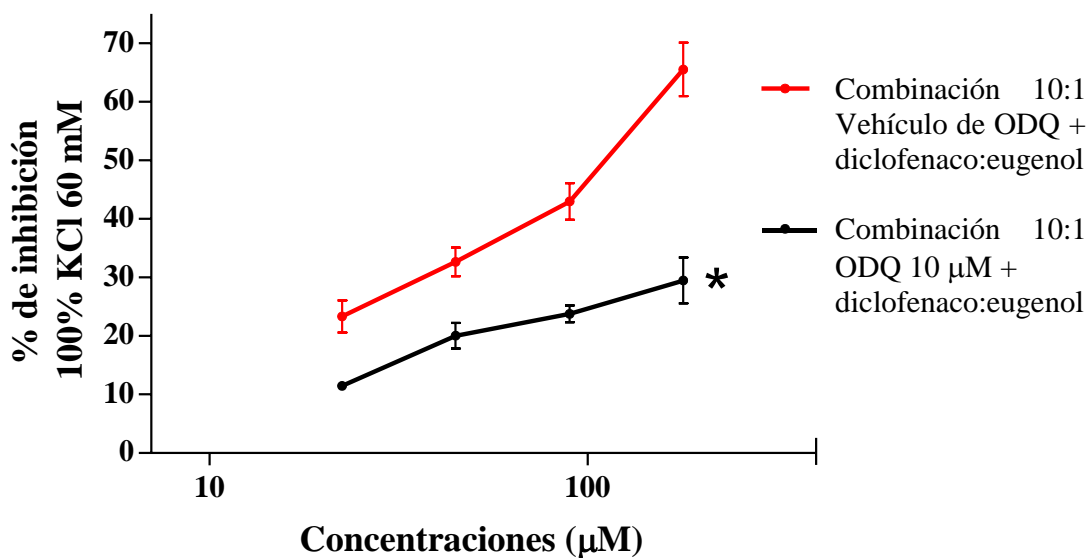


Figura 23. Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25 \text{ Exp}}$) y el mismo en presencia de ODQ (n=6). Prueba de t de Student (* $p < 0.05$).

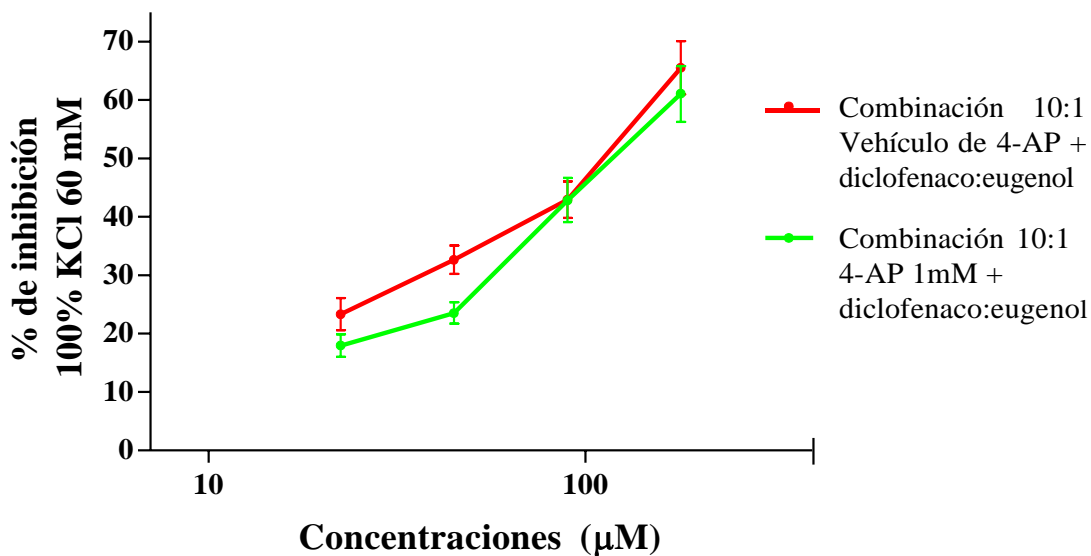


Figura 24. Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25 \text{ Exp}}$) y el mismo en presencia de 4-AP (n=6). Prueba de t de Student ($p > 0.05$).

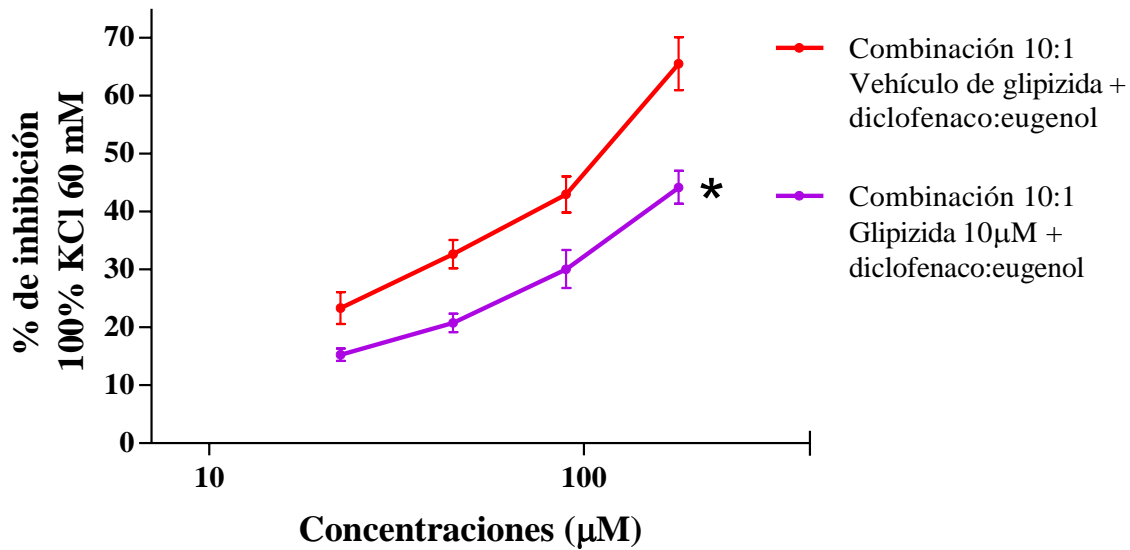


Figura 25. Curva logarítmica comparativa del efecto de la combinación 10:1 (CI_{50} , CI_{25} , $CI_{12.5}$ y $CI_{6.25}$ Exp) y el mismo en presencia de glipizida (n=6). Prueba de t de Student (* $p < 0.05$).

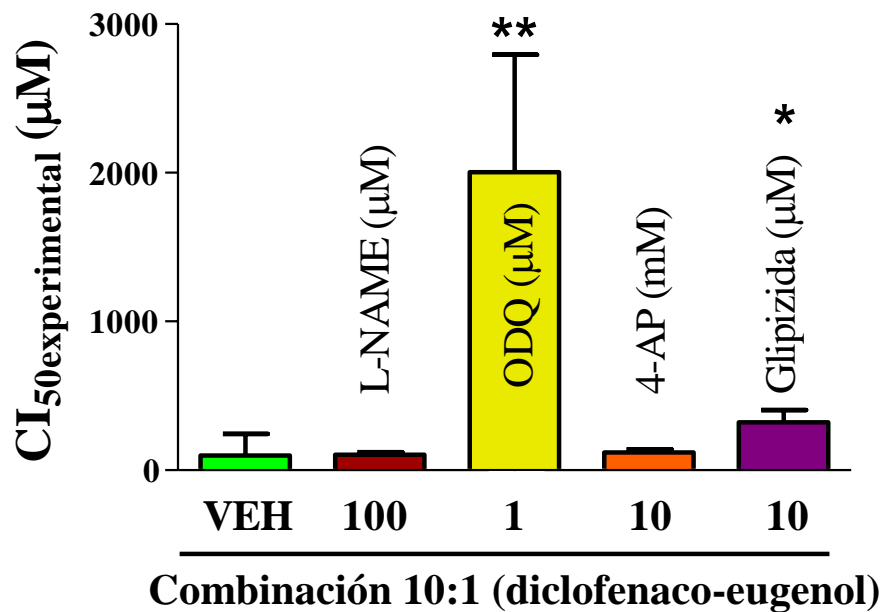


Figura 26. Gráfica comparativa de la CI_{50} Exp de la proporción 10:1 y su modificación en presencia de los bloqueadores (n=6). Análisis de ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$). Un valor superior en la CI_{50} Exp sugiere que el fármaco bloqueó el efecto de la combinación.

VIII DISCUSIÓN

8.1 Efecto espasmolítico individual del diclofenaco y el eugenol sobre la contracción tónica sostenida inducida por K^+

El músculo liso uterino tiene una naturaleza contráctil cuya función (cuando no se está gestando), es la expulsión del endometrio que recubre el útero cuando no se ha producido el embarazo: en condiciones normales, este proceso es indoloro. Sin embargo, cuando hay una disminución de progesterona en la fase lútea tardía del ciclo menstrual, la liberación de AA conlleva a una sobreproducción de PGs que son las responsables de la contracción uterina y la hipersensibilización de las fibras del dolor (14,18).

La terapia utilizada para tratar este padecimiento debe tener la capacidad de inhibir las contracciones o espasmos (efecto espasmolítico) que provocan el dolor y el consecuente malestar que puede llegar a incapacitar a las mujeres. Por esta razón los AINEs se perfilan como los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la dismenorrea, ya que éstos son capaces de inhibir a la COX, y su consecuente inhibición en la producción de PGs: sin embargo, en la actualidad se sabe que los AINEs tienen efectos más allá de la inhibición de la síntesis de PGs, por ejemplo: inhibición de la generación de anión superóxido de los neutrófilos, inhibición de la activación de neutrófilos con estímulos inflamatorios, inhibición de la síntesis de proteoglicanos, inhibición del flujo de calcio, modificación de la liberación de neurotransmisores, entre otros mecanismos (105).

8.1.1 Diclofenaco

Bajo las condiciones experimentales de este estudio, la contracción se indujo por un estímulo de KCl 60 mM con Ca^{2+} provocando la despolarización de la membrana celular y la apertura de los canales de Ca^{2+} de tipo L (los más abundantes en tejido uterino) que participan en la contracción miometrial, en este caso una contracción de tipo tónica sostenida (106). El diclofenaco fue capaz de inhibir la contracción inducida de manera dependiente de la concentración (32-560 μ M), también se observó que diclofenaco fue capaz de inhibir al 84% la contracción en su concentración más alta ($R_{m\acute{a}x}$ parcial= 84%), estos hallazgos concuerdan con otros estudios en donde se ha comprobado el efecto de diclofenaco sobre el mismo estímulo (107,108). Es importante señalar que la contracción inducida por KCl y algunos fármacos como vanadato y metacolina no tienen un efecto uterotónico por la estimulación de

la liberación de eicosanoides (107). Con base en esto podemos observar que en este ensayo el diclofenaco tiene un efecto espasmolítico mediante un mecanismo alternativo a la inhibición de COX-1 y COX-2, se sabe que la contracción tónica depende de la entrada de calcio, se puede afirmar que el efecto espasmolítico de diclofenaco en esta contracción es compatible con un efecto bloqueante de la entrada de calcio.

La CI_{50} del diclofenaco obtenida fue de $183.6 \pm 30.2 \mu\text{M}$, sin embargo, las investigaciones que estudiaron el efecto del diclofenaco en las mismas condiciones obtuvieron datos diferentes. En un estudio realizado por Pérez et al. (108) donde evaluaron los efectos de la fenidona, diclofenaco sódico y ácido etacrínico (todos inhibidores de la síntesis de eicosanoides) sobre contracciones inducidas por varios agonistas en útero de rata, entre los que se encontraba KCl 60 mM, obtuvieron una CI_{50} de $39.5 \mu\text{M}$ para diclofenaco. El mismo equipo de trabajo en un estudio posterior analizó el efecto de diferentes AINEs entre los cuales se encontraba diclofenaco sobre el estímulo de metacolina, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y KCl 60 mM en útero aislado de ratones, obtuvieron una CI_{50} de $77 \pm 10.4 \mu\text{M}$ sobre la contracción de KCl (107). La diferencia que tienen entre sí las dos concentraciones que obtuvieron puede deberse al modelo animal que utilizaron, en este caso ratas y ratones. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio difieren mucho de los estudios anteriores. En la investigación donde se utilizaron ratas fueron incluso del mismo tipo (Wistar), no obstante, sus resultados permitieron perfilar al diclofenaco como uno de los AINEs más potentes de los revisados en su estudio con una CI_{50} muy baja. La única diferencia metodológica que permite explicar la discrepancia entre los resultados puede estar en el equipo utilizado, para los dos estudios descritos se utilizó un polígrafo Omniscrite 5000, este instrumento ofrecía un registro por transductores de desplazamiento, mientras que los resultados de este trabajo fueron analizados con datos digitalizados por medio del programa PolyView, dicha condición puede considerarse más exacta.

8.1.2 Eugenol

Pese a que los AINEs son los medicamentos de primera línea para el tratamiento de padecimientos que cursan con dolor, como es el caso de la dismenorrea, es bien sabido que dichos fármacos tienen una alta incidencia de efectos adversos, de entre los cuales destaca el daño gástrico, que se intensifica con el uso crónico (109); aunado a esto, varios estudios

señalan que, a la larga, el uso de AINEs en el tratamiento de la dismenorrea puede generar falla terapéutica (10). Estas circunstancias han llevado a la investigación de nuevas opciones terapéuticas, como la medicina complementaria y alternativa, un ejemplo de éstas son las plantas, los extractos y derivados botánicos con sustancias bioactivas.

El eugenol es un aceite esencial, es el mayor componente de varias plantas, pero se extrae principalmente de la *Eugenia cariphilate* (80% del extracto). Este compuesto tiene actividad analgésica y antiinflamatoria comprobada, es decir, comparte características con los AINEs. Existen estudios que demuestran que el eugenol puede inhibir a la COX-2 y la consecuente producción de eicosanoides al igual que los AINEs, sin embargo, se ha demostrado también que no inhibe a la COX-1, dicha cualidad lo perfila como una opción más segura (73).

En este ensayo se mostró el efecto del eugenol en la contractilidad del músculo liso uterino *in vitro*, y demostró su capacidad para inhibir la contracción tónica sostenida inducida por el estímulo farmacomecánico de KCl. El efecto espasmolítico del eugenol fue directamente proporcional a la concentración aplicada (10-320 μ M), disminuyó la fuerza de contracción (efecto dependiente de la concentración) al igual que el diclofenaco, esto nos permite suponer que el eugenol actúa directa o indirectamente sobre los canales de Ca^{2+} para disminuir $[Ca^{2+}]_i$ y por consecuencia inhibir la contracción (106).

Aunque este es el primer estudio en demostrar el efecto del eugenol sobre una contracción tónica inducida con KCl en tejido uterino, existen antecedentes del efecto del eugenol sobre contracciones en tejidos de útero humano y de ratas. En útero de rata se evaluó el efecto de eugenol sobre contracciones fásicas inducidas por bradiquinina (vasodilatador dependiente del endotelio que provoca la contracción del músculo liso no vascular), y en útero humano sobre contracciones inducidas por $PGF_{2\alpha}$, ambos estímulos incrementan el $[Ca^{2+}]_i$, el eugenol logró inhibir las contracciones en ambos casos en forma dependiente de la concentración (89). En otro experimento, se demostró que tanto eugenol como el aceite de clavo, disminuyen las contracciones espontáneas en útero de rata de forma concentración-dependiente, estas contracciones están ligadas a los niveles de oxitocina, PGs y por ende, a la apertura de canales de Ca^{2+} y el incremento del $[Ca^{2+}]_i$. Aunque estos estudios evaluaron el efecto del eugenol sobre contracciones con diferente estímulos, sus hallazgos concuerdan

con los resultados presentados y reafirman la implicación del Ca^{2+} en el posible mecanismo de acción (88).

Mediante un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos del efecto espasmolítico de eugenol se obtuvo una CI_{50} de $135.9 \pm 69.3 \mu\text{M}$. Como ya se mencionó, el efecto del eugenol en tejido uterino ha sido estudiado previamente, no obstante, en dichas investigaciones no se realizó un análisis posterior para reportar la CI_{50} obtenida en sus modelos. Es importante recalcar que aunque sería un punto de comparación interesante, debería tenerse en cuenta la diferencia de métodos y los modelos con los que se trabajó.

8.1.3 El efecto espasmolítico del eugenol es más potente que el diclofenaco

Al hacer una comparación entre las $R_{\text{máx}}$ del eugenol y el diclofenaco (90% y 84% respectivamente) se puede observar que el primero tiene mayor eficacia, de la misma forma las CI_{50} obtenidas del diclofenaco ($183.6 \pm 30.2 \mu\text{M}$) y el eugenol (135.9 ± 69.3) muestran que el eugenol tiene mayor potencia al tener una CI_{50} menor, aunque dicho resultado no es estadísticamente significativo ($p = 0.89$), por lo tanto en este estudio el efecto de ambos es igual. Es importante mencionar que estos resultados no concuerdan con lo reportado por las investigaciones donde se han estudiado la eficacia y capacidad de las terapias alternas (suplementos dietéticos, vitaminas, minerales, extractos botánicos, plantas medicinales) para el tratamiento de la dismenorrea; en éstas se encontró que aunque estos tratamientos tienen efectos terapéuticos sobre la patología, no poseen una eficacia superior a la de los AINEs (fármacos de primera línea), razón por la cual recomiendan como medida la medicina convencional y la medicina complementaria (10, 74).

8.2 Los bloqueadores de SON, GCs y canales de K⁺ sobre el efecto espasmolítico del eugenol y diclofenaco de forma individual

Existen varios tipos distintos de antagonistas que bloquean el mecanismo central de la contracción miometral, además de los ya mencionados AINEs; esto se debe a la implicación de mecanismos de acción múltiples en el proceso uterino de contracción-relajación. Los antagonistas evaluados (diclofenaco y eugenol) se probaron en presencia de los diferentes bloqueadores para dilucidar el mecanismo de acción. Estos bloqueadores deben actuar sobre receptores, canales o enzimas que estén presentes en el tejido de estudio, en este caso en útero de rata. La pre-incubación de estos fármacos en el tejido (período de estabilización) para posteriormente agregar el compuesto de estudio, permite observar si se modifica el efecto de este último, con base en esto se puede afirmar si el efecto del antagonista disminuye en presencia del bloqueador, dicho fármaco está actuando por ese mecanismo de acción. Los fármacos usados en este estudio utilizan canales y enzimas que están presentes en el tejido uterino de rata (90,110,111), siendo L-NAME, ODQ, 4-AP y glipizida; otro criterio de selección de acuerdo al antecedente directo sobre el mecanismo de acción de diclofenaco en un modelo metodológico igual, ya que no había antecedentes directos para eugenol.

8.2.1 Eugenol

De acuerdo con los resultados, el efecto relajante del eugenol no se vio afectado por el L-NAME, un inhibidor de la SON, lo que indica que sus efectos no se provocan a través del óxido nítrico. El ODQ (inhibidor de la enzima GCs) tampoco bloqueo los efectos inhibidores del eugenol, esto señala que sus actividades relajantes no se deben al incremento del GMPc. Del mismo modo 4-AP un bloqueador de canales de K⁺ dependiente de voltaje y la glipizida bloqueador de canales de K⁺ dependientes de ATP no disminuyeron el efecto de eugenol, con base en esto se descarta que la actividad útero relajante del eugenol se deba a la apertura de dichos canales.

El músculo liso uterino estrogenizado con benzoato de β -estradiol responde con una contracción tónica sostenida cuando se incubaba en una solución despolarizante de KCl 60 mM con Ca²⁺ y que la contracción inducida de esta manera es dependiente del [Ca²⁺]_i. Aunque el mecanismo exacto de la actividad relajante no se estableció en este estudio, el hecho de que relajara la contracción inducida por KCl sugiere que tal actividad podría deberse a la

inhibición de los canales de Ca^{2+} (106). Un estudio previo llevado a cabo en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo, evaluó el efecto de eugenol ante un estímulo de Ca^{2+} 1 mM, así como su efecto en presencia de propranolol (antagonista de receptores β_2 adrenérgicos) y cimetidina (antagonista de los receptores H_2), encontraron que los bloqueadores no revertían el efecto y que la respuesta al Ca^{2+} era dependiente de la concentración, por lo que proponen que el eugenol está actuando mediante el bloqueo de canales de calcio tipo L. Si bien el modelo utilizado en este estudio no permite analizar más a fondo el efecto que tiene el eugenol sobre los canales de calcio, existen estudios probados en músculo liso que pueden respaldar dicha hipótesis. Soares et al. (112) evaluaron el efecto relajante de eugenol (como control) y otros compuestos en anillos de aorta pre contracturados con fenilefrina (1 μM); el efecto espasmolítico de eugenol fue abolido por los bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje nifedipina (1 μM) y diltiazem (1 μM); con base en sus resultados, concluyen que el efecto de eugenol y otro análogo estaba mediado por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. En otro estudio también se demostró que el eugenol dilataba arterias cerebrales de rata, que fueron constreñidas por la despolarización de la membrana con K^+ 60mM de manera dependiente de la concentración, aunado a esto, mediante estudios electrofisiológicos se encontró que el eugenol inhibía las corrientes de Ca^{2+} dependientes del voltaje en las células del músculo liso. Por lo tanto, el eugenol puede estar relajando las contracciones uterinas mediante el bloque de canales de Ca^{2+} .

8.2.2 Diclofenao

Al igual que el eugenol, el efecto relajante del diclofenaco no fue inhibido de forma estadísticamente significativa por los bloqueadores probados (L-NAME, ODQ, 4-AP y glipizida), con base en estos resultados se puede concluir que el efecto relajante del diclofenaco no está actuando por la inhibición de las enzima SON, GCs o los canales de K^+ sensibles al voltaje ni dependientes de ATP.

Existe un antecedente directo donde Pérez et al. (90) demostraron que el efecto espasmolítico del diclofenaco en útero de rata, estaba mediado por la participación de óxido nítrico y los nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc); estos datos fueron obtenidos al utilizar L-NAME, Rp-SAMPc y ODQ; es importante mencionar que la contracción estudiada fue inducida con vanadato, este es un ion que induce una contracción tónica sostenida por despolarización de

la membrana, al igual que el K^+ . Si bien los bloqueadores seleccionados en esta investigación se utilizaron gracias a estos antecedentes, los resultados no fueron los mismos; no se puede considerar que esta diferencia se deba a que la contracción fue inducida por diferentes compuestos ya que estos actúan de manera similar. Ahora bien, el estudio de Pérez et al. (90) encontró que la acción de diclofenaco fue antagonizada de forma estadísticamente significativa por L-NAME utilizado a la concentración $100\mu\text{M}$, y por ODQ utilizado a diferentes concentraciones (1 y $100\mu\text{M}$); en esta investigación los datos no concuerdan con los hallazgos antes mencionados para el caso de L-NAME, a pesar de que la concentración fue la misma, sin embargo cuando se utilizó ODQ ($10\mu\text{M}$) aunque no fue con relevancia estadística, se encontró que éste disminuía el efecto de diclofenaco, esta diferencia entre los resultados de ambas investigaciones puede deberse a que no se utilizaron las mismas concentraciones de ODQ, es decir, al utilizar concentraciones más altas se hubiera obtenido un antagonismo más significativo. Aquí se evaluó la participación de los canales de potasio sensibles a ATP con el bloqueador glipizida, y al igual que con ODQ, a pesar de que el cambio no fue estadísticamente significativo, este inhibió el efecto del diclofenaco. Por lo tanto, aunque con los resultados obtenidos en esta investigación no se pudo establecer un mecanismo de acción para el efecto individual del diclofenaco, no se puede descartar la participación del GMPc y de los canales de K^+ sensibles a ATP.

8.3 Aditividad, antagonismo y sinergismo en la combinación de diclofenaco y eugenol

El uso de combinaciones de compuestos con capacidad anti-inflamatoria y analgésica en el manejo del dolor es un enfoque aceptado en la clínica ya que permite potenciar el efecto terapéutico sin aumentar los efectos adversos, esto optimiza el tratamiento y la prescripción, mejorando así la calidad de vida de los pacientes.

La combinación de dos o más fármacos puede resultar en interacciones farmacológicas, que a su vez pueden ser farmacocinéticas, farmacodinámicas o mixtas. Las interacciones farmacodinámicas se describen como “aditivas” cuando el efecto consiste en la suma de los efectos individuales de cada fármaco, “sinergistas” cuando el efecto observado es superior que la aditividad, y finalmente las “antagonistas” donde el efecto observado es menor que la simple aditividad (85). Idealmente, se espera potenciar los efectos terapéuticos y disminuir los efectos adversos cuando se realiza la combinación de fármacos. No obstante, es posible que suceda lo contrario, por esta razón es crucial determinar qué tipo de interacción sucede en cada combinación; para este fin, una herramienta que nos permite caracterizar tales interacciones es el análisis isoblográfico. Dicho análisis comprende la evaluación de concentración-respuesta de los fármacos administrados de manera individual (CI_{50}). La potencia y eficacia derivada de estas curvas permite la determinación de las concentraciones de la combinación necesarias para producir un nivel específico de efecto de manera experimental ($CI_{50 \text{ Exp}}$). Finalmente se realiza la comparación de la $CI_{50 \text{ Exp}}$ y la $CI_{50 \text{ Teó}}$ de la combinación, para determinar el tipo de interacción presente (82,86,103).

8.3.1 Aditividad de las combinaciones en proporción 1:1, 1:3 y 3:1

En este estudio se evaluó la combinación de diclofenaco con eugenol en diferentes proporciones, administrados conjuntamente dentro de la cámara para tejido aislado. Se demostró una interacción de aditividad cuando la combinación fue administrada en la proporción 1:1 ($\gamma = 1.14 \pm 0.5$), 1:3 ($\gamma = 0.95 \pm 0.$) y 3:1 (0.96 ± 0.35). Como ya se dijo anteriormente estos datos nos indican que el efecto no es más que la suma del efecto individual del diclofenaco y el efecto individual del eugenol, por ello resulta en sinergismo.

Se propone que el mecanismo de acción de la interacción del efecto espasmolítico se debe a mecanismos similares, es decir, por una parte los AINEs como el diclofenaco inhiben la síntesis de prostaglandinas por la inhibición de las isoformas de COX; mientras que el

eugenol es un aceite con la capacidad comprobada de inhibir a COX-2 y a la 5-Lox. Así pues la inhibición de la COX-1 y 2 por diclofenaco y la inhibición de la COX-2 por diclofenaco y eugenol, aunado a la inhibición de la 5-Lox, se traducen en mecanismos complementarios y aditividad del efecto espasmolítico; aunque es importante considerar que la inhibición de COX no es el único mecanismo relajante de los AINEs en el útero, sobre todo tratándose de diclofenaco que posee efectos sobre el sistema nervioso central (113).

En la actualidad no hay investigaciones que caractericen la interacción farmacológica de un AINE con productos naturales, de eugenol con AINEs o de diclofenaco y eugenol en útero aislado de rata. A pesar de esto, sí existen estudios donde el diclofenaco se utilizó en combinación de productos naturales por ejemplo, extracto de *Matricaria chamomilla*, α -bisabolol, “Trikatu”, extracto de *Heliopsis longipes* y extracto de *Xylopia aethiopica* (en proporción 1:1); estos estudios fueron en su mayoría en modelos animales *in vivo*, donde se evaluó su capacidad anti-inflamatoria y anti-nociceptiva (93,96,114,115). Las interacciones en estos trabajos fueron de tipo aditiva y en su mayoría sinérgica. En esta investigación la proporción 1:1 presentó una interacción de tipo aditiva reafirmando la cualidad del diclofenaco como un medicamento con potencial para estas combinaciones.

Por otro lado, no existen estudios del eugenol en combinación con AINEs en modelos animales donde se evaluó su capacidad anti-inflamatoria, anti-nociceptiva o espasmolítica. Sin embargo, si existen investigaciones donde se estudió su efecto en combinación con antimicrobianos, en cuyo caso se han obtenidos interacciones sinérgicas. Este antecedente también ubica al eugenol como un compuesto apto para las combinaciones farmacológicas (116–118).

8.3.2 Antagonismo de la combinación en proporción 1:10

La interacción puede variar en función de la proporción administrada, así pues aunque la combinación comúnmente utilizada es la proporción 1:1 (ya que esta permite determinar la aditividad) se recomienda evaluar otras proporciones con el fin de estudiar otros posibles puntos de aditividad. Estas proporciones no siempre resultan en sinergismo.

Al no encontrar una interacción farmacológica de sinergismo en este estudio en las proporciones probadas (1:1, 1:3 y 3:1) se optó por estudiar las proporciones 1:10 y 10:1. La

proporción 1:10 (diclofenaco-eugenol respectivamente) obtuvo un índice de interacción de 2.45 ± 1.7 que muestra de un efecto antagonista.

Sabemos que el mecanismo de acción que comparten los AINEs es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, sin embargo, existen otros mecanismos asociados a cada uno de estos fármacos mediados por sus propias características no solo farmacodinámicas sino también farmacocinéticas; por ejemplo, en un estudio realizado por Tallarida et al. (119) encontraron diferentes tipos de interacciones, al combinar la glucosamida con distintos AINEs (entre ellos diclofenaco) en un modelo de nocicepción *in vivo*. Considerando estos datos, se puede proponer que el efecto antagonista de la combinación con una mayor proporción de eugenol, se debe a que el diclofenaco está bloqueando algún punto de acción del eugenol, es decir, tienen un mecanismo de acción compartido.

En los resultados obtenidos de esta investigación podemos observar que el eugenol tuvo una eficacia y potencia superior a la del diclofenaco, de acuerdo a esto se podría esperar que en al encontrarse en mayor proporción con respecto al diclofenaco esta combinación tendría un efecto de sumación o sinergismo; contrario a esto, el eugenol redujo su actividad máxima en presencia del diclofenaco esto lo convierte en un antagonista parcial a pesar de ir en menor proporción.

Si bien, el eugenol presenta antecedentes de su capacidad para bloquear canales de Ca^{2+} , no hay reportes de su capacidad para bloquear canales de K^{+} (posibles canales implicados en el mecanismo de acción del diclofenaco). Por otro lado, existen antecedentes de la capacidad del diclofenaco para bloquear canales de calcio tipo L (posible mecanismo de acción del eugenol) en cardiomiocitos ventriculares en ratas, al inhibir eficazmente las corrientes de Ca^{2+} de tipo L (120), aunque esa investigación se realizó en tejido vascular, sabemos que los canales de Ca^{2+} de tipo L son los más abundantes en el útero (18). Con base en lo anterior se sugiere que el eugenol está actuando como un antagonista competitivo para el diclofenaco por un punto de unión a los canales de Ca^{2+} , y que este efecto se ve influenciado por las concentraciones de ambos compuestos, razón por la cual al administrarse el eugenol en mayor proporción en la combinación éste produce una interacción antagonista.

8.3.3 Sinergismo de la combinación en proporción 10:1

Contrario a los resultados obtenidos por la proporción 1:10, en este estudio la combinación de diclofenaco y eugenol 10:1 produjo una interacción farmacológica sinérgica ($\gamma = 0.55 \pm 0.1$ [$p < 0.05$]) cambiando la $CI_{50 \text{ Teó}}$ de 179.3 μM a una $CI_{50 \text{ Exp}}$ de 99.2 μM . Como ya se mencionó el efecto espasmolítico del diclofenaco potencialmente involucra el bloqueo de canales de K^+ dependientes de ATP, y la inhibición de la GCs de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio. Por otro lado, para el eugenol se propone como mecanismo de acción que su efecto espasmolítico sea por la participación de canales de Ca^{2+} en tejido uterino con base en los resultados de este estudio y otros antecedentes. De acuerdo a estos datos podemos observar que los mecanismos individuales de diclofenaco y eugenol son diferentes pero a su vez complementarios, cuando el diclofenaco está presente en una mayor proporción.

Aunque en este estudio no se observó que el diclofenaco fuera más potente que el eugenol, se puede especular que el efecto espasmolítico del diclofenaco es potenciado con el bloqueo de canales de Ca^{2+} por parte del eugenol. Si bien ya se señaló que el diclofenaco puede bloquear los canales de Ca^{2+} , el eugenol parece tener una mayor afinidad hacia ellos; esto puede estar relacionado con la estructura de los compuestos, debido a que ambos comparten similitudes con otros fármacos bloqueadores de canales de Ca^{2+} muy específicos como: nifedipina, verapamil e indometacina (un AINE) (121), esto nos hace suponer que el eugenol posee una característica que le confiere una mayor afinidad por ejemplo la presencia de un grupo catecol. Una investigación que estudia la inhibición de la contractibilidad uterina por análogos de talidomida realiza una comparación similar, dónde se puede ver la influencia de estas características compartidas sobre el efecto producido (122). Sin embargo, es importante mencionar que los mecanismos individuales del efecto espasmolítico de eugenol y diclofenaco no fueron esclarecidos en esta investigación con significancia estadística, por lo que se propone que se debe a la participación potencial de varios mecanismos involucrados que provocan el sinergismo de la combinación en la relajación de la contracción uterina.

8.4 GCs y canales de K⁺ dependientes de ATP están implicados en el efecto espasmolítico de la combinación de diclofenaco y eugenol

Si bien los bloqueadores no modificaron el efecto individual de los dos compuestos, al comparar la proporción que dio sinergismo (10:1) vimos que su efecto fue bloqueado por ODQ y glipizida de forma estadísticamente significativa, esto nos dice que el efecto espasmolítico de esta combinación involucra la participación del GMPc y de los canales de K⁺ sensibles a ATP.

Estos datos reafirman la hipótesis anterior de que es el eugenol el que está potenciando el mecanismo activado por el diclofenaco. Si se hace una comparación de las CI_{50 Teó} podemos observar que la concentración de diclofenaco de 180 μM no fue bloqueada por ningún fármaco, por otro lado la concentración más alta probada para la proporción 10:1 fue de 167.1 μM para diclofenaco y 12.2 μM para eugenol, dando una CI_{50 Teó} de 179.3 μM, de inicio se ve que la concentración de diclofenaco es inferior a la probada con los bloqueadores así como la CI_{50 Teó}, a pesar de eso ODQ y glipizida son capaces de bloquear el efecto, confirmando que es la adición del eugenol en menor proporción lo que potencia la vía por la que el diclofenaco está actuando. Estos hallazgos nos permiten proponer que el mecanismo de acción de la combinación 10:1 es mediante la vía del GMPc y canales de K⁺ sensibles a ATP, así como el bloqueo de canales de Ca²⁺ de tipo L producido por el eugenol.

En la vía propuesta, la conversión de L-arginina a L-citrulina por acción de la SON da como resultado óxido nítrico, éste es el principal activador endógeno de la GCs, al ser estimulada la GCs incrementa los niveles GMPc, éste activa a la cinasa dependiente de GMPc (PKG), canales iónicos y fosfodiesterasas, modulando los procesos fisiológicos como la relajación del músculo liso. De acuerdo a los resultados obtenidos sabemos que hay una implicación de los canales de K⁺ sensibles a ATP, lo que hace suponer, que el GMPc regula las corrientes de K⁺ mediante estos canales (123,124). En el sistema utilizado en esta investigación, el bloqueo de canales de K⁺ impide la salida de K⁺ promoviendo el incremento en la concentración intracelular provocando una hiperpolarización y disminuyendo la sensibilidad al calcio por el cambio de potencial. Aunado a esto, es probable que haya un bloqueo de canales de Ca²⁺, ya sea por la activación de PKG o por acción complementaria del eugenol,

esto impediría el incremento de $[Ca^{2+}]_i$, lo cual resultaría en relajación del músculo liso uterino. Ésta hipótesis se puede apreciar mejor en la figura 27.

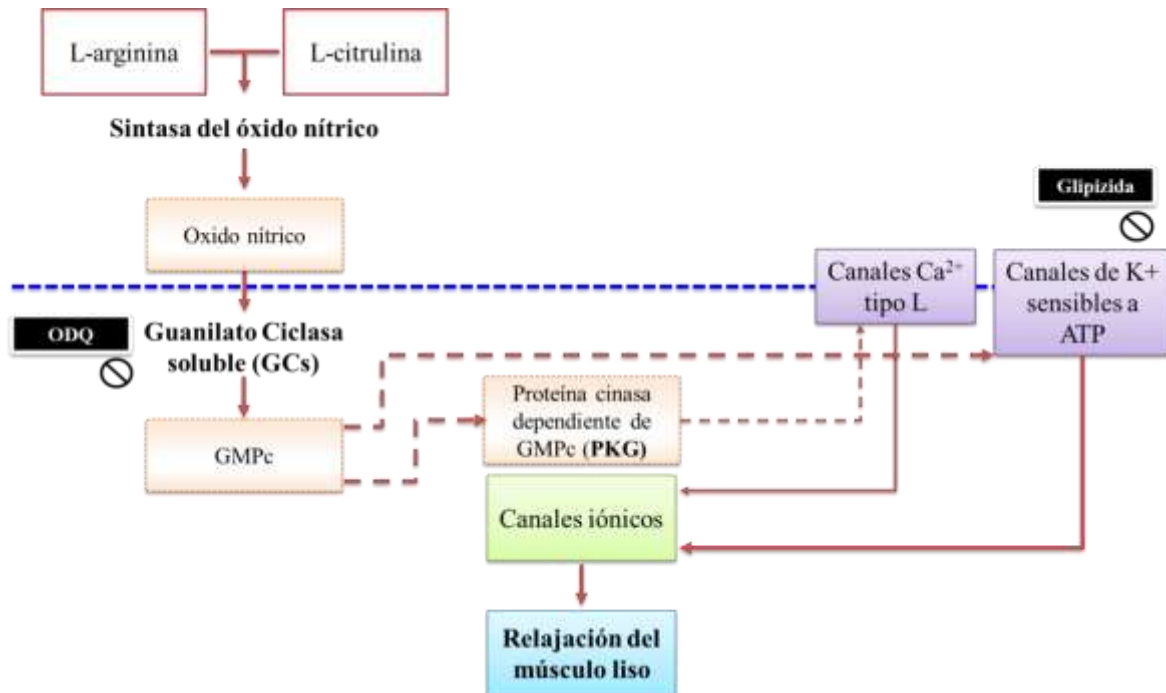


Figura 27. Mecanismo de acción de la combinación sinérgica de diclofenaco y eugenol en proporción 10:1 y el sitio de inhibición de los fármacos ODQ y glipizida.

IX CONCLUSIÓN

El eugenol al igual que diclofenaco tiene un efecto espasmolítico dependiente de la concentración. De manera individual ningún bloqueador inhibe el efecto de las concentraciones probadas de diclofenaco y eugenol en forma estadísticamente significativa, por lo que no se encontró su mecanismo de acción individual. En la interacción farmacológica, solamente en la combinación en la proporción 10:1 (diclofenaco-eugenol respectivamente) se obtuvo sinergismo. Al ser probada la interacción en porción 10:1 con los diferentes fármacos, se encontró que, fue bloqueada por ODQ y glipizida (con significancia estadística), lo que indica la posible participación de la vía GMC y de canales de K⁺ dependientes de ATP, en el mecanismo de acción. De acuerdo a estos resultados la combinación del diclofenaco y eugenol los perfila para la investigación como agentes efectivos en el tratamiento de la dismenorrea. No obstante, se necesita realizar pruebas en modelos animales de inflamación y dolor para demostrar su actividad.

X PERSPECTIVAS

Para corroborar todos los posibles mecanismos de acción es necesario complementar la investigación con experimentos que evalúen la respuesta al calcio del eugenol y el diclofenaco de manera individual, así como su combinación en la proporción que dio sinergismo, ya que la investigación da indicios de que estos canales pueden estar participando. También se puede integrar a los fármacos de prueba un bloqueador específicos de canales de Ca²⁺ tipo L como lo es la nifedipina.

Para evaluar la seguridad de estos agentes terapéuticos, lo siguiente sería estudiar el daño gástrico que esta combinación produciría en comparación con un control, así como en modelos de inflamación y nocicepción, en experimentos *in vivo*.

XI BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Jefout M, Seham AF, Jameel H, Randa AQ, Ola AM, Oday AM, et al. Dysmenorrhea: Prevalence and impact on quality of life among young adult Jordanian females. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2015;28(3):173–85.
2. Sandoval J, Madrid A, Sandoval C, Paz P. Factores que condicionan la dismenorrea en adolescentes, según estrato socioeconómico. *Rev Peru Ginecol y Obstet*. 2013;59(2):95–100.
3. Iacovides S, Avidon I, Baker FC. What we know about primary dysmenorrhea today: A critical review. *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):762–78.
4. Midilli TS, Yasar E, Baysal E. Dysmenorrhea characteristics of female Students of health school and affecting factors and their knowledge and use of complementary and alternative medicine methods. *Holist Nurs Pract*. 2015;29(4):194–204.
5. Larroy C, Crespo M, Meseg C. Dismenorrea funcional en la Comunidad Autónoma de Madrid: estudio de la prevalencia en función de la edad. *Rev Soc Esp Dolor*. 2001;8(1):11–22.
6. Ortiz MI. Primary dysmenorrhea among Mexican university students: Prevalence, impact and treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;152(1):73–7.
7. Ortiz MI, Rangel-Flores E, Carrillo-Alarcón LC, Veras-Godoy H a. Prevalence and impact of primary dysmenorrhea among Mexican high school students. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;107(3):240–3.
8. Sundell G, Milsom I AB. Factors Influencing the prevalence and severity of dysmenorrhea in yung women. *Br J Obs Gynecol*. 1990;97:588–94.
9. Bonilla, F. y PA. Reproducción y ginecología básica, en: 1st ed. Madrid, España: Panamericana; 2007. p. 830.
10. Ortiz MI, Pérez-Hernández N, Macías A, Carrillo-Alarcón L, Rangel-Flores E, Fernández-Martínez E. Utilización de fármacos para el tratamiento de dismenorrea primaria en estudiantes universitarias. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2007;38(4):24–9.
11. Yanez N, Bautista Roa S, Ruiz Stenberg J, Ruiz Stenberg A. Prevalencia y factores asociados a dismenorrea en estudiantes de ciencias de la salud. *Rev Cienc Salud*. 2010;8(3):37–48.

12. Pattanittum P, Kunyanone N, Brown J, Us S, Barnes J, Seyfoddin V. Dietary supplements for dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;(3):1-121.
13. Yu A. Complementary and alternative treatments for primary dysmenorrhea in adolescents. *Nurse Pract*. 2014;39(11):1–12.
14. Patton K, Thibodeau G. Estructura y función del cuerpo humano. 15th ed. USA: Elsevier; 2016: 485.
15. Moore K, Dalley F. Pelvis y periné. In: Anatomía con orientación clínica. 5° ed. E.U.A.: Panamericana; 2009. p. 414.
16. Moore K, Persaud T, Torchia M. Ciclo ovárico. In: Embriología clínica. 9th ed. España: Elsevier; 2013. p. 26.
17. Pricila T, Florence L, Basanti N, Devi M.. Variation in Platelet Count during Different Phases of Menstrual Cycle. *J Dent Med Sci*. 2015;14(5):46–8.
18. Crankshaw D. Pharmacological techniques for the in vitro study of the uterus. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2001;45:123–40.
19. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*. 1979;59:606–718.
20. Kamm K, Stull J. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:299–313.
21. Somlyo PA, Somlyo VP. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994;372:231–6.
22. Hai CM, Murphy RA. Ca²⁺ crossbridge phosphorylation, and contraction. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:285–98.
23. Bootman DM, Berridge JM. The elemental principles of calcium signaling. *Cell*. 1995;83:675–8.
24. Latthe PM, Champaneria R, Khan KS. Dysmenorrhoea. *BMJ Clin Evid*. 2011;2:1–59.
25. García B, Chillón R, Rebollo J, Orta MA. Dismenorrea primaria y fisioterapia. *Fisioterapia*. 2005;27(6):327–42.
26. Morrow C, Naumburg EH. Dysmenorrhea. *Prim Care -Clin Off Pract*. 2009;36(1):19–32.

27. Marjoribanks J, Ayeleke RO, Farquhar C, Proctor M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *Cochrane database Syst Rev.* 2015;(7):CD001751.
28. Mrugacz G, Grygoruk C, Siczynski P, Grusza M, Bołkun I, Pietrewicz P. Etiopathogenesis of dysmenorrhea. [ABSTRACT] *Clinical Expert Series.* 2013;17(1):85–59.
29. Dawood M. Primary Dysmenorrhea, Advances in pathogenesis and Management. *Clinical Expert Series.* 2006;108(2):428–41.
30. Dawood MY. Dysmenorrhea and prostaglandins. *Gynecol Endocrinol New York.* 1987;405–21.
31. Stoelting-Gettelfinger W. A case study and comprehensive differential diagnosis and care plan for the three Ds of women’s health: primary dysmenorrhea, secondary dysmenorrhea, and dyspareunia. *J Am Acad Nurse Pr.* 2010;22:513–22.
32. Pedrón-Nuevo N, González-Unzaga LN, De Celis-Carrillo R, Reynoso-Isla M de la T. Frequency of dysmenorrhea and associated symptoms in women of 12 to 24 years of age. *Ginecol Obs Mex.* 1998;66:492–4.
33. Pawlowski B. Prevalence of menstrual pain in relation to the reproductive life history of women from the Mayan rural community. *Annals of human biology.* 2004;3(1):1–8.
34. Velasco R, Mora A, González L, Bonilla O. Características clínica y tratamiento de dismenorrea en estudiantes de licenciatura en enfermería. *Medigraphic.* 2006;14(1):29–34.
35. Ju H, Jones M, Mishra G. The prevalence and risk factors of dysmenorrhea. *Epidemiol Rev.* 2014;36(1):104–13.
36. Ju H, Jones M, Mishra GD. A U-shaped relationship between body mass index and dysmenorrhea: A longitudinal study. *PLoS One.* 2015;10(7):1–12.
37. Gagua T, Tkeshelashvili B, Gagua D. Primary dysmenorrhea: prevalence in adolescent population of Tbilisi, Georgia and risk factors. *J Turkish Ger Gynecol Assoc.* 2012;13(3):162–8.
38. Seven M, Güvenç G, Akyüz A, Eski F. Evaluating dysmenorrhea in a sample of Turkish nursing students. *Pain Manag Nurs.* 2014;15(3):664–71.

39. Zahradnik H P, Hanjalic-Beck A GK. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hormonal contraceptives for pain relief from dysmenorrhea. *Contraception*. 2010;81:185–96.
40. Berek S. Dolor pélvico y dismenorrea. In: *Ginecología de Novak*. 16th ed. Barcelona, España: Lippincott Williams y Wilkins; 2014. p. 530–3.
41. Hart FD, Huskisson EC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. Current status and rational therapeutic use. *Drugs*. 1984;27(2):232–55.
42. Kawabata A. Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:1170–664.
43. Lipsky PE. Defining COX-2 inhibitors. *J Rheumatol*. 2000;60:13–6.
44. Jawabrah Al-Hourani, B., Sharma, S.K., Zures, M. & Wuest F. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a literature and patent review (2009-2010). *Expert Opin Ther Pat*. 21:1339–432.
45. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React*. 1998;20:3–15.
46. Wallace JL, Syer S, Denou E, De Palma G, Vong L, McKnight W, Jury J, Bolla M, Bernick P, Collins SM, Verdu E, Onigini E. Proton Pump Inhibitors Exacerbate NSAID-Induced Small Intestinal Injury by Inducing Dysbiosis. *Gastroenter*. 2011;141:1314–1322.
47. Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclifenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33(3):184–213.
48. Brogden R, Heel R PG. Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. *Drugs*. 1980;20(1):24–48.
49. Kirchheiner J, Meineke I, Steinbach N, Meisel C, Roots I BJ. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;55(1):51–61.
50. Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*. 2006;76:122–59.
51. Zilnik LF, Jazbinsek A, Vala A, Vrecer F KA. Solubility of sodium diclofenac in different solvents. *Fluid Phase Equilib*. 2007;261:140–5.

52. Sigma-Aldrich Co. [Internet]. Estructuras de análisis de interés. 1998. Available from:http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure6/042/mfcd00082251.eps/_jcr_content/renditions/large.png
53. Batlouni M. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Soc Bras Cardiol MCMXLIII*. 2010;94(4):538–46.
54. DRAWERS Laboratory. Diclofenac Drawer, Diclofenac 75 mg, Inyectable. [Internet]. Available from: http://drawer.com.ar/admin/resources/files/productos/19/DICLOFENAC_DRAWER.PDF
55. Facultad de Medicina. PLM [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 1]. Available from: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6
56. Botting R. Paracetamol-inhibitable COX-2. *Physiol Pharmacol*. 2000;51:609–18.
57. Di Girolamo G, Sanchez AJ, De Los Santos AR, Gonzalez CD. Is acetaminophen, and its combination with pamabrom, an effective therapeutic option in primary dysmenorrhoea? *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5(3):561–70.
58. Rumore MM, Schlichting D. Analgesic effects of antihistaminics. *Life Sci*. 1985;36:403–16.
59. Cruz, M.A., Gonzalez, C., Acevedo, C.G., Sepúlveda, W.H. & Rudolph M. Effects of histamine and serotonin on the contractility of isolated pregnant and nonpregnant human myometrium. *Gynecol Obs Invest*. 1989;28:1–4.
60. Ortiz MI, Murguía-Cánovas G, Vargas-López LC, Silva R, González-de la Parra M. Naproxen, paracetamol and pamabrom versus paracetamol, pyrilamine and pamabrom in primary dysmenorrhea: a randomized, double-blind clinical trial. *Medwave*. 2016;16(9):e6587.
61. Marjoribanks J, Ayeleke RO, Farquhar C, Proctor M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *Cochrane database Syst Rev*. 2015;(7):CD001751.
62. Connolly TP. Cyclooxygenase-2 inhibitors in gynecologic practice. *Clin Med Res*. 2003;1:105–10.
63. French L. Dysmenorrhea. *Am Fam Physician*. 2005;71:285–91.
64. Ortiz M, Murguía-Cánovas G, Vargas-López L, Silva R, González-de la Parra M. Naproxen, paracetamol and pamabrom versus paracetamol, pyrilamine and

- pamabrom in primary dysmenorrhea: a randomized, double-blind clinical trial. *Medwave*. 2016;16(9):e6587.
65. Gómez-Estrada H, Gonzalez K, Domingo J. Anti-inflammatory Activity of Natural Products. *Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat*. 2011;10(3):182-217.
 66. Masoumi SZ, Asl HR, Poorolajal J, Panah MH, Oliaei SR. Evaluation of mint efficacy regarding dysmenorrhea in comparison with mefenamic acid: A double blinded randomized crossover study. *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2016;21(4): 363-7.
 67. Tragoolpua Y, Jatisatiennr A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. *Phytother Res*. 2007;21:1153–8.
 68. González R. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cuba Estomatol*. 2002;39(2). Dawood, M.Y., & Khan-Dawood FS. Clinical efficacy and differential inhibition of menstrual fluid prostaglandin F2alpha in a randomized, double-blind, crossover treatment with placebo, acetaminophen, and ibuprofen in primary dysmenorrhea. *Am J Obs Gynecol*. 2007;196:35.e1–35.e5.
 69. Karam I, Ma N, Liu X-W, Li S-H, Kong X-J, Li J-Y, et al. Regulation effect of Aspirin Eugenol Ester on blood lipids in Wistar rats with hyperlipidemia. *Bmc Vet Res*. 2015;11:1–7.
 70. Monterey Bay Spice Company. HERBCO [Internet]. A bit of botany a little botanical information on cloves. 2016 [cited 2016 Oct 7]. Available from: <http://www.herbco.com/c-243-cloves.aspx>
 71. SIGMA-ALDRICH [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 2]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/390828?lang=es®ion=M X>
 72. Suk S, Oh O, Min H, Park E, Kim Y, Joo H, Nam Y, Kook S. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264 . 7 cells. 2003;73:337–48.
 73. Satya N, Raghavendra R, Lokesh BR, Akhilender K. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2004;70(6):521–8.

74. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of Eugenol and Zinc oxide-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73:729–39.
75. Toda S, Ohnishi M, Kimura M, Toda T. Inhibitory effects of eugenol and related compounds on lipid peroxidation induced by reactive oxygen. *Planta Med.* 1994;60:282.
76. Pabla T, Gulati MS, Mohan U. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials for primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 1997;15:134–8.
77. Prasad SN, Bharath MM, Muralidhara. Neurorestorative effects of eugenol, a spice bioactive: Evidence in cell model and its efficacy as an intervention molecule to abrogate brain oxidative dysfunctions in the streptozotocin diabetic rat. *Neurochem Int.* 2016;95:24–36.
78. Sarkar A, Bhattacharjee S, Mandal DP. Induction of apoptosis by eugenol and capsaicin in human gastric cancer AGS cells-elucidating the role of p53. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(15):6753–9.
79. Fonsêca D, Salgado P, Aragão H, Golzio A, Caldas M, Melo C, Leite F, Piuvezam M, Morias L, Barbosa J, Almeida R. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. *Int Immunopharmacol.* 2016;38:402–8.
80. Taher YA, Samud AM, El-Taher FE, ben-Hussin G, Elmezogi JS, Al-Mehdawi BF, et al. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. *Libyan J Med.* 2015;10:1–7.
81. Maroon JC, Bost JW, Maroon A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg Neurol Int.* 2010;1:80.
82. Raffa RB, Pergolizzi JV, Tallarida RJ. The determination and application of fixed-dose analgesic combinations for treating multimodal pain. *J Pain.* 2010;152:73–7.
83. Baños J, Farré M. Principios de Farmacología Clínica. Bases científicas de la utilización de medicamentos. Masson, editor. España; 2002. 87-98 p.
84. Tallarida R, Stone D, Raffa R. Efficient design for studying synergistic drug combinations. *Life Sci.* 1997;61:PL417–25.
85. Tallarida R. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Perspect Pharmacol.* 2006;319:1–7.

86. Tallarida R. Drugs synergisms and dose - effect data analysis with isobolograms. USA: Chapman & Hall/ CRC Press; 2000. 21-39 p.
87. Liu P, Duan JA, Bai G, Su SL. Network pharmacology study on major active compounds of siwu decoction analogous formulae for treating primary dysmenorrhea of gynecology blood stasis syndrome. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2014;39(1):113–20.
88. Lis-Balchin M, Hart S. A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle in vitro. *J Ethnopharmacol*. 1997;58(3):183–7 Ali Z, Burnett I, Eccles R, North M, Jalad M, Jalad S, Clarke G, Milsom I. Efficacy of a paracetamol and caffeine combination in the treatment of the key symptoms of primary dysmenorrhoea. *Curr Med Res Opin*. 2007;23:609–18.
89. Bennett A, Stamford IF, Tavares IA, Jacobs S. The Biological Activity of Eugenol , a Major Constituent of Nutmeg (*Myristica fragrans*): Studies on Prostaglandins , the Intestine and other Tissues. 1988;2(3):124–30.
90. Pérez J, Menéndez L, Cantabrana B, Sánchez M, Hidalgo A. Nitric oxide and cyclic nucleotides participate in the relaxation of diclofenac on rat uterine smooth muscle. *Gen Pharm*. 1998;30(1):25–9.
91. Thaina P, Tungcharoen P, Wongnawa M, Reanmongkol W, Suchadhirasaul S. Uterine relaxant effects of *Curcuma aeruginosa* Roxb. rhizome extracts. *J Ethnopharmacol*. 2009;30(3):433–43.
92. Ortiz MI, Ramírez-Montiel ML, González-García MP, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Carillo-Cortés R. The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. *Arch Pharm Res*. 2010;33(10):1691–7.
93. Lala LG, D’Mello P M, Naik SR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on interaction of “Trikatu” with diclofenac sodium. *Ethnopharmacol*. 2004;91:277–80.
94. Acosta-Madrid II, Castañeda-Hernández G, Cilia-López VG, Cariño-Cortés R, Pérez-Hernández N, Fernández-Martínez E, et al. Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phytomedicine*. 2009;16(4):336–41.

95. Woode E, Ameyaw EO, Abotsi WK B-GE. An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of xylopic acid in combination with morphine or diclofenac. *J Basic Clin Pharm.* 2015;6(4):103–8.
96. Ortiz M, Fernández-Martínez E, Soria-Jasso L, Lucas-Gómez I, Villagómez-Ibarra R, González-García M, Castañeda-Hernández G S-CM. Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats. *Biomed Pharmacother.* 2016;78:248–56.
97. De Paz-Campos MA, Ortiz MI, Chávez Piña AE, Zazueta-Beltrán L C-HG. Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine.* 2014;21(12):1543–8.
98. Ortiz MI, González-García MP, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Aguilar-Robles P. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. *Phytomedicine.* 2010;18(1):74–9.
99. Ortiz MI, Ponce-Monter HA, Mora-Rodríguez JA, Barragán-Ramírez G, Barrón-Guerrero BS. Synergistic relaxing effect of the paracetamol and pyrilamine combination in isolated human myometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;157(1):22–6.
100. Jespersen B, Tykocki N, Watts S, Cobbett P. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology Research. *J Vis Exp.* 2015;(95):52324.
101. Ponce-Monter H, Fernández-Martínez E, Ortiz MI, Ramírez-Montiel ML, Cruz-Elizalde D, Pérez-Hernández N, Cariño-Cortés R. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, *in vitro* and *in vivo* studies. *J Smooth Muscle Res.* 2010;46(6):309–19.
102. Ponce-Monter H, Campos MG, Pérez S, Pérez C, Zavala M, Macías A, Oropeza M, Cárdenas N. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. *Fitoterapia.* 2008;79(6):446–50.
103. Raffa RB, Stone DJJ, Tallarida RJ. Discovery of “self-synergistic” spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(1):291–4.

104. Ortiz MI, González-García MP, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Aguilar-Robles P. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. *Phytomedicine*. 2010;18(1):74–9.
105. Abramson S, Korchak H, Ludewig R, Edelson H, Haines K, Levin RI, Herman R, Rider L, Kimmel S, Weissmann G. Modes of action of aspirin-like drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:7227–31.
106. Granger ES, Hollingsworth M, Weston HA. Effects of calcium entry blockers on tension development and calcium influx in rat uterus. *J Pharmacol*. 1986;87:147–56.
107. Pérez Vallina JR1, Cantabrana B, Hidalgo A. Calcium and G-Protein-Related Spasmolytic Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs on Rat Uterus Contractions in-Vitro. *Pharmacology*. 1995;50(5):324–32.
108. Pérez Vallina JR1, Cantabrana B, Hidalgo A. Mechanisms Involved in the Effects of Phenidone, Diclofenac and Ethacrynic-Acid in Rat Uterus In vitro. *Gen Pharmacol*. 1991;22(3):435–41.
109. Johansson C, Bergstrom S. Prostaglandina y protección de la mucosa gastroduodenal. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1982;77:21–46.
110. Vadzyuk O, Kosterin S. Mitochondria from rat uterine smooth muscle possess ATP-sensitive potassium channel. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(3):551–7.
111. Kothencz A, Hajagos-Tóth J, Csányi A, Gáspár R. Alpha-tocopherol succinate increases cyclooxygenase-2 activity: Tissuespecific action in pregnant rat uterus in vitro. *Life Sci*. 2018;192:199–204.
112. Soares P, Lima R, Pires A, Souza E, Assreuy A, Criddle D. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. *Life Sci*. 2007;81:1085–93.
113. Sandri A. Diclofenac: update on tolerableness and spinal anti-inflammatory action. *Minerva Med*. 2014;105(4):313–8.
114. Ortiz MI, Cariño-Cortés R, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Chávez-Piña AE. Pharmacological interaction of a-bisabolol and diclofenac on nociception, inflammation, and gastric integrity in rats. *Wiley Period*. 2017;1–9.
115. Cariño-Cortés R, Gayosso-De-Lucio JA, Ortiz MI, Sánchez-Gutiérrez M, García-Reyna PB, Cilia-López VG, Pérez-Hernández N, Moreno E, Ponce-Monter H.

- Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *J Ethnopharmacol.* 2010;130(2):216–21.
116. Wang YM, Kong LC, Liu J, Ma HX. Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018;29(7):17.
117. Zhang H, Dudley EG, Harte F. Critical synergistic concentration of lecithin phospholipids improves the antimicrobial activity of eugenol against *Escherichia coli*. *Appl Env Microbiol.* 2017;83(21):1583–17.
118. Araújo LX, Novato TP, Zeringota V, Maturano R, Melo D, DA Silva BC, Daemon E, DE Carvalho MG, Monteiro CM. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Med Vet Entomol.* 2016;30(4):377–82.
119. Tallarida RJ, Cowan A, Raffa RB. Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combination of oral glucosamine plus nonpioid analgesics in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:699–704.
120. Yarishkin OV, Hwang EM, Kim D, Yoo JC, Kang SS, Kim DR, Shin JH, Chung HJ, Jeong HS, Kang D, Han J, Park JY, Hong SG. Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, inhibits L-type Ca channels in neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009;13(6):437–42.
121. Yousif FB, Triggl DJ. Inhibitory actions of a series of Ca²⁺ channel antagonists against agonist and K⁺ depolarization induced responses in smooth muscle: An assessment of selectivity of action. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986;64:273–83.
122. Fernández-Martínez E, Ponce-Monter H, Soria-Jasso LE, Ortiz MI, Arias-Montaña JA, Barragán-Ramírez G, Mayén-García C. Inhibition of Uterine Contractility by Thalidomide Analogs via Phosphodiesterase-4 Inhibition and Calcium Entry Blockade. *Molecules.* 2016;21(10):E1332.
123. Fernández B, Choi M, Rodríguez M. Nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) como segundos mensajeros. In: *Cardiología.* 2013. p. 76–80.
124. Orías M. The role of potassium channels in regulating blood pressure. *Medwave.* 2005;5(7):e2312.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de combinaciones para la evaluación de los vehículos

INHIBIDOR O VEHÍCULO	EUGENOL O VEHÍCULO	DICLOFENACO O VEHÍCULO
L-NAME 100	eugenol 230	vehículo
ODQ	eugenol 230	vehículo
4-AP	eugenol 230	vehículo
Glipizida	eugenol 230	vehículo
L-NAME 100	vehículo	diclofenaco 180
ODQ	vehículo	diclofenaco 180
4-AP	vehículo	diclofenaco 180
Glipizida	vehículo	diclofenaco 180
L-NAME 100	vehículo	vehículo
ODQ	vehículo	vehículo
4-AP	vehículo	vehículo
Glipizida	vehículo	vehículo
Vehículo	eugenol	vehículo
Vehículo	vehículo	diclofenaco
Vehículo L-NAME	eugenol 230	diclofenaco 180
Vehículo ODQ	eugenol 230	diclofenaco 180
Vehículo 4-AP	eugenol 230	diclofenaco 180
Vehículo glipizida	eugenol 230	diclofenaco 180
Vehículos		
DMSO: L-NAME, ODQ, 4-AP, glipizida y eugenol.		
Agua bidestilada: L-NAME. 4-AP y diclofenaco.		
CONCENTRACION μM		

Anexo 2. Efecto de los fármacos bloqueadores en la contracción uterina

FÁRMACO	EFFECTO INCUBACIÓN (15 minutos)	EFFECTO (20 minutos)
L-NAME	2%	8.5%
ODQ	3%	7.2%
4-AP	3.4%	9.5%
Glipizida	6.1%	9.6%
n= 5 a 6 por fármaco		