

**Determinación del mecanismo de acción de diferentes AINEs a partir de su potencial inhibitorio sobre COX y los receptores de prostaglandina**

Delfina Pilar Farías Arriaga

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

Escuela de Ciencias Farmacéuticas

Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2024

Determinación del mecanismo de acción de diferentes AINEs a partir de su potencial inhibitorio sobre COX y los receptores de prostaglandina

Delfina Pilar Farías Arriaga

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Tutor: Laura María Rodríguez

Santiago de Cali

2024

## CARTA DE AVAL PARA ENTREGA

**Firma del Tutor:**



---

Laura María Rodríguez

**Firma del estudiante:**



---

Delfina Pilar Farías Arriaga

## 1. Resumen ejecutivo

El uso extendido de los AINEs ha conllevado al planteamiento de preocupaciones sobre sus efectos secundarios, especialmente cuando se emplean sin supervisión médica. A nivel molecular, estos fármacos inhiben la ciclooxigenasa (COX), enzimas que desempeñan un papel crucial en la producción de prostaglandinas. Los AINEs tienen diferentes blancos de acción y con afinidades diversas, volviéndose más específicas frente a una isoforma respecto a la otra. No obstante, se desconoce cómo estos medicamentos afectan específicamente los receptores de prostaglandinas y el mecanismo exacto de su efecto inhibitorio sobre las ciclooxigenasas, lo que justifica la necesidad de investigar a profundidad para elucidar su acción. Por este motivo, el presente proyecto tiene como finalidad contribuir a la investigación científica en describir el mecanismo de acción de AINEs seleccionados con base en su grado inhibitorio sobre ciclooxigenasa y la expresión de los receptores de prostaglandina. Para ello, se evaluó el efecto inhibitorio de seis AINEs sobre la ciclooxigenasa en la producción de PGF2 $\alpha$  mediante ELISA competitivo y su efecto en la expresión de los receptores EP1, EP2, EP3 y EP4 en la línea celular HGC-27. Con ello, se confirmó la selectividad hacia COX-2 por el etoricoxib y celecoxib, se constató una alta inhibición del acetaminofén hacia COX y el ibuprofeno demostró una tendencia no selectiva frente a las ciclooxigenasas. Además, el meloxicam y el diclofenaco evidenciaron un efecto sobre los receptores de prostaglandina, siendo más equilibrado el efecto del diclofenaco. Asimismo, este estudio permitió establecer las concentraciones inhibitorias efectivas de dichos AINEs y su efecto sobre COX y receptores PGE2, proporcionando una base para optimizar su uso y conocer sus tendencias moleculares.

*Palabras clave: AINEs, COX, prostaglandinas*

## 2. Introducción

Los AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) constituyen un grupo farmacológico, químicamente heterogéneo, aprobado por la FDA como agentes antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos en el tratamiento de condiciones patológicas como el dolor reumático, enfermedades inflamatorias y degenerativas, así como para enfermedades no reumáticas como la migraña.<sup>1</sup> A pesar de emplearse como agentes ahorradores de opioides en traumatismos agudos, su uso en la población general está muy extendido, incluso como automedicación, dado que con frecuencia se obtienen sin prescripción ni control médico, con el consiguiente riesgo potencial de aparición de efectos secundarios.<sup>2</sup>

El mecanismo general de los AINEs implica la inhibición de COX, enzimas reguladoras involucradas en la biosíntesis de prostaglandina (PG), que está implicada en la inflamación. Anteriormente, se creía que los inhibidores de COX-1, al inhibir la síntesis de PG en la mucosa gástrica, provocaban complicaciones gastrointestinales. Sin embargo, evidencia emergente sobre los efectos adversos cardiovasculares de los inhibidores de COX-2 y los ensayos controlados con placebo posteriores han demostrado que los inhibidores selectivos de COX-2 estaban relacionados con un mayor riesgo de eventos vasculares aterotrombóticos, llevando incluso a su retiro en el mercado por parte de la FDA.<sup>3</sup> Simultáneamente con la evolución y el establecimiento del modo dependiente de COX/PG de toxicidad de los AINEs, su uso recurrente también se asocia con nefrotoxicidad e insuficiencia renal junto con otros efectos transitorios sobre el equilibrio hídrico y electrolítico. Sin embargo, el mecanismo involucrado en la inflicción de estos efectos aún es complejo de determinar.<sup>4,5</sup>

Además, atendiendo al efecto directo sobre la mucosa gastrointestinal que generan estos medicamentos, y a su empleo en la profilaxis de enfermedades cancerígenas, como el cáncer de colon y gastrointestinal, el empleo de células HGC-27 (línea celular de la mucosa gástrica metastásica humana) exhibe ventajas desde su rentabilidad, reproducibilidad y capacidad para crear modelos patológicos que simulan el sistema biológico *in vitro* donde estos blancos moleculares se expresan de forma representativa.<sup>4</sup>

Asimismo, se buscará evaluar el efecto inhibitorio de AINEs como Meloxicam, Ibuprofeno, Acetaminofén, Celecoxib, Diclofenaco y Etoricoxib sobre COX en la producción de PGE2 y su efecto sobre la expresión de los receptores de prostaglandinas EP1, EP2, EP3 y EP4 en HGC-27 ante la exposición de AINEs. Lo anterior, con el propósito de contribuir a la

investigación y desarrollo de medicamentos que garanticen mayor seguridad y eficacia en la salud pública, puesto que atendiendo al grado en que son empleados, su uso seguro puede evitar el riesgo de efectos adversos graves e insuficiencia orgánica.<sup>3,4,5</sup>

## **2.1 Clasificación de los AINEs**

Los AINEs presentan una diversidad estructural y funcional, donde en su mayoría son ácidos orgánicos débiles que comprenden una fracción ácida junto con un grupo funcional aromático. No obstante, con objeto de valorar la acción sobre los distintos órganos, resulta indispensable la clasificación de los AINEs atendiendo al grado funcional, donde la selectividad específica para la inhibición de COX (ciclooxigenasas) forma la base de la diferenciación. De igual forma, se debe tener en cuenta la biodisponibilidad de los AINEs en el suero, resaltando su acción respecto a su perfil farmacocinético en el contexto sistémico.<sup>3,4,5</sup>

### **2.1.1 Clasificación basada en su estructura química**

Los AINEs se pueden clasificar en salicilatos, derivados del ácido arílico y heteroarilacético, derivados del ácido indol/indeno acético, antranilatos y ácidos enólicos. La estructura general consiste en una fracción ácida unida a un grupo funcional aromático planar, donde los salicilatos fueron los primeros AINEs identificados, derivados del ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico). Posteriormente, prevalecen los derivados del ácido acético arílico o heteroarílico, como el ibuprofeno, y la derivación del ácido indólico o indeno acético que incluye analgésicos populares como la indometacina. Adicionalmente, los antranilatos son derivados N-arílicos sustituidos del ácido antranílico, como el diclofenaco, y los oxicams, que consisten principalmente en piroxicam y meloxicam, caracterizados por la presencia del heterociclo de 4-hidroxibenzotiazina.<sup>3,6</sup>

### **2.1.2 Clasificación basada en su interacción con COX y selectividad**

La bioconversión del ácido araquidónico (AA) en prostanoídes inflamatorios (prostaglandinas y prostaciclina) está mediada por las enzimas COX, principalmente COX-1 y COX-2, que son inhibidas por los AINEs. La potencia de los AINEs para inhibirlas se puede establecer sobre valores de IC<sub>50</sub> (concentración de fármaco que inhibe el 50% de la actividad enzimática) en el sistema de ensayo *in vitro*, y dicha inhibición resulta variables en sus dosis terapéuticas.<sup>7</sup> Por lo tanto, sobre la base de la selectividad, se determina una relación inhibitoria basada en el IC<sub>50</sub> de COX-1/IC<sub>50</sub> de COX-2. Si la relación es 1, ambas enzimas son igualmente inhibidas,

mientras que, si es menor que 1, significa que el fármaco es menos selectivo para COX-2; de lo contrario, si la relación es mayor que 1, es preferentemente selectivo hacia COX-2.<sup>3,7</sup>

Ahora bien, con base a las potencias para inhibir las isoformas de COX, los AINEs pueden dividirse en cuatro categorías principales: (i) inhibidores completos no selectivos de COX-1 y COX-2, (ii) inhibidores completos de COX-1 y COX-2, aunque con preferencia específica por COX-2, (iii) inhibidores potenciales de COX-2, aunque con acción inhibidora débil contra COX-1 e (iv) inhibidores leves de COX-1 y COX-2. Sin embargo, en términos de cinética, las interacciones de los AINEs con ambas enzimas también pueden utilizarse para su clasificación: interacción libremente reversible (ibuprofeno), interacción lentamente reversible (indometacina, diclofenaco, celecoxib) e interacción irreversible (aspirina).<sup>8,9</sup>

### **2.1.3 Clasificación de los AINEs según la vida media plasmática ( $t_{1/2}$ ) y parámetros farmacocinéticos.**

Según la prolongación de su actividad, se establece una clasificación de los AINEs en acción corta ( $t_{1/2}$  menor a 6 h) como el diclofenaco y el ibuprofeno siendo aplicables para dolores agudos, y en acción prolongada ( $t_{1/2}$  aproximadamente mayor a 10 h) como el celecoxib, efectivos para tratar afecciones crónicas. Además, debido a que la mayoría presenta una solubilidad lipídica moderada a alta, permitiendo su penetración de la barrera hematoencefálica, muestran una biodisponibilidad alta. Su elevada capacidad de unirse a proteínas plasmáticas conlleva a que baja cantidad del fármaco se excrete directamente, por lo que el metabolismo hepático elimina los AINEs del cuerpo como metabolitos inactivos que se excretan en la orina y la bilis.<sup>3,11</sup>

No obstante, el sistema de eliminación del fármaco por aclaramiento y vida media terminal es altamente específico. El sistema de oxidasa de función mixta que contiene enzimas microsomales citocromo P450 (CYP) es responsable de la mayor parte del metabolismo de los AINEs, donde CYP2C9 es la oxidasa responsable principalmente. En particular, las variaciones alélicas en esta proteína afectan la eficacia farmacoterapéutica del medicamento de manera específica para el paciente. Por lo tanto, la variabilidad farmacogenómica de P450 en una población también se correlaciona bien con el grado variable de metabolismo de los fármacos. Aunque la unión a las proteínas plasmáticas dificulta el paso fácil de los AINEs a los fluidos intersticiales y transcelulares desde el plasma, el mismo aspecto facilita su penetración y

persistencia en los exudados inflamatorios, permitiendo así acciones antiinflamatorias. Las diferencias inherentes en las propiedades farmacocinéticas de los AINEs con centros quirales en su estructura exigen además una atención específica antes de prescribir una dosis adecuada para su administración. Esto se debe a las diferencias estructurales y, por lo tanto, farmacocinéticas entre los enantiómeros de los fármacos que en última instancia dictan sus especificidades en términos de depuración sistémica, semividas de eliminación y volúmenes de distribución en la circulación.<sup>3,11</sup>

La inhibición de COX explica predominantemente las acciones farmacodinámicas y toxicodinámicas de los AINE; aunque si bien la inhibición de COX-1 contribuye principalmente a los efectos secundarios tóxicos de estos medicamentos, la inhibición de COX-2 subyace a la mayoría de los efectos terapéuticos; no obstante, los casos de cardiotoxicidad asociada a la inhibición de COX-2 justifican firmemente el riesgo del uso de coxib.<sup>8,9</sup>

## **2.2 Enzimas ciclooxigenasas (COX)**

Las enzimas ciclooxigenasa (COX) desempeñan funciones complejas en la fisiología y patología humanas, abarcando los sistemas cardiovasculares, inmunológicos, gastrointestinal, reproductivo, al igual que el neuronal. Como se mencionó previamente, existen dos isoformas de la COX.<sup>13</sup> Tanto COX-1 como COX-2 catalizan dos reacciones enzimáticas secuenciales, las cuales se conocen como la oxigenación y reducción de ácido araquidónico, donde la reacción de oxigenación ocurre en un canal dentro de la molécula COX y la reducción en la superficie del sitio heme, molécula de señalización que modulan procesos celulares desde la transcripción hasta la detección de señales y la regulación postraduccional de proteínas.<sup>14</sup> En otras palabras, son enzimas bifuncionales que exhiben tanto la actividad ciclooxigenasa como la peroxidasa, además de catalizar el primer paso de la biosíntesis de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina. Siendo así, por un lado, el componente COX, convierte el ácido araquidónico en hidropoxi endoperoxidasa, prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), mientras que por el otro la actividad peroxidasa se encarga de reducir las endoperoxidasas a su alcohol correspondiente (PGH<sub>2</sub>), que es el precursor de las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos.<sup>15,16</sup>

Ambas isoformas residen predominantemente en el retículo endoplásmico y son idénticas en longitud aproximada de más de 600 aminoácidos (que tienen un 63% de homología). Su sitio activo se encuentra al final de un canal hidrofóbico, donde los AINEs impiden el acceso del

AA, el sustrato de COX, a este canal. Cabe resaltar que COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de las células y produce prostanoïdes para fines de mantenimiento, como la protección de la mucosa gástrica, la regulación de la secreción ácida y la homeostasis, así como el mantenimiento de las funciones renales. Por otro lado, COX-2, inducido por citocinas inflamatorias, mitógenos, endotoxinas y promotores tumorales, produce prostanoïdes durante la inflamación y el cáncer, y se ha relacionado principalmente con células inmunes, incluidos leucocitos y macrófagos, así como fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y mesangiales. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que también se expresa constitutivamente en varios tejidos, como el cerebro e intestino, donde produce prostanoïdes.<sup>13,15,16</sup>

Las distinciones estructurales y funcionales de las COX se atribuyen a la dicotomía de expresión de los genes en los contextos fisiológicos y patológicos, así como a las diferencias en el requisito de concentraciones de sustrato y el rango de especificidad del sustrato. En particular, COX-2 tiene una especificidad de sustrato más amplia, con capacidad para metabolizar derivados de ésteres y amidas de AA. Además, la retención de la capacidad de oxigenación de AA tratado con aspirina también contribuye a la diferencia en la función específica de la isoforma del PGHS y tiene relevancia fisiológica debido a la propiedad antiinflamatoria de los lípidos polihidroxiados producidos.<sup>3,11,14</sup>

### **2.3 Prostaglandinas**

El AA, ácido graso insaturado, es el precursor de la síntesis de las principales clases de prostaglandinas y leucotrienos, conocidos colectivamente como eicosanoides. El nivel de AA libre en las células es muy bajo, pero se almacena en altas concentraciones en forma esterificada en los fosfolípidos de membrana. Es decir, dado que AA es altamente reactivo y sensible a la oxidación, no se encuentra libremente en las células; en lugar de eso, se almacena en los fosfolípidos de membrana, principalmente en forma de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, y las fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>) lo libera. Posteriormente, el AA libre se oxida primero a PGG<sub>2</sub> (endoperoxido) por la actividad de la ciclooxigenasa, seguida de una peroxidación para formar PGH<sub>2</sub> por las COX.<sup>17,18</sup> El PGH<sub>2</sub>, se conoce como el precursor de los prostanoïdes, los cuales son moléculas lipídicas bioactivas que median la acción autocrina y paracrina a través de receptores acoplados a proteína G de alta afinidad.

Ahora bien, los endoperóxidos de prostaglandinas tienen una existencia transitoria y se hidrolizan rápidamente en metabolitos más estables por medio de la COX-2, dando lugar a PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> y tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), a través de isomerización específica de tejido para producir prostanoídes que ejercen efectos biológicos tras la interacción con receptores acoplados a proteína G específicos. Por lo tanto, el papel de estos prostanoídes también es específico del tejido y, por lo tanto, determina los resultados fisiopatológicos de una manera dependiente del contexto. Mientras que la PGD<sub>2</sub>, la PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> son potentes vasodilatadores en el sistema cardiovascular, la TxA<sub>2</sub> exhibe vasoconstricción en el mismo sistema. La TxA<sub>2</sub> juega un papel significativo en la agregación plaquetaria, mientras que la PGI<sub>2</sub> exhibe propiedades anticoagulantes. En las vías respiratorias, la TxA<sub>2</sub> y la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  actúan como broncoconstrictores mientras que la PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub> son broncodilatadores. La PGE<sub>2</sub>, la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y la PGI<sub>2</sub> también protegen la mucosa gástrica.<sup>19, 20</sup>

Ahora bien, en relación con la respuesta inflamatoria del cuerpo, la PGE<sub>2</sub> es la PG que se produce en la mayoría de los tejidos, de tal manera, que la PGE<sub>2</sub> ejerce sus acciones actuando sobre un grupo de receptores que responden a los subtipos designados EP1, EP2, EP3 y EP4, donde prevalecen múltiples isoformas de empalme del subtipo EP3.<sup>19</sup> Los subtipos de EP exhiben diferencias en la transducción de señales, la localización tisular y la regulación de la expresión. Esta heterogeneidad molecular y bioquímica de los receptores de PG lleva a que PGE<sub>2</sub> sea el prostanoíde más versátil.<sup>18</sup>

### 3. Metodología

#### 3.1 Determinación de concentración inhibitoria efectiva de los AINEs

Inicialmente, se estimaron las concentraciones de los seis AINEs a partir de la concentración de fármaco libre con la cual ejercen su efecto farmacológico a partir de los parámetros farmacocinéticos reportados de cada fármaco. Además, se tuvo en cuenta el rango terapéutico para el desarrollo del ensayo ELISA competitiva y pruebas *in vitro* en HGC-27 para evaluar el efecto del Celecoxib, Acetaminofen, Diclofenaco, Etoricoxib, Meloxicam e Ibuprofeno sobre los niveles de la expresión de los receptores de la PGE2 (EP1, EP2, EP3 y EP4) comparado con los niveles basales. Para la determinación de la concentración inhibitoria, se realizaron ensayos en HGC-27 para una concentración estándar (concentración de fármaco libre), concentración máxima (50% superior a concentración de fármaco libre) y concentración mínima (50% inferior a la concentración del fármaco libre).

**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos de los principios activos.

Principio Activo	Parámetros Farmacocinéticos				Determinación de concentración AINEs			
	Vd (L/kg)	F (%)	C <sub>máx</sub> (µg/mL)	% Unión Proteínas	Dosis diaria recomendada (mg)	Fracción farmaco libre (µg/mL)	Concentración fármaco libre + 50%	Concentración fármaco libre - 50%
Acetaminofén	0.7-1	85-98	6.7-8.79	10-25	1300-3900	6.5925	9.88875	3.29625
Ibuprofeno	0.11-0.18	80	18-21.1	98	1600-2400	0.422	0.633	0.211
Meloxicam	9.63-16	89	1.314-2.072	97-99.4	5 - 7.5	0.012432	0.018648	0.006216
Diclofenaco	1.3	50	1.033 - 2.068	99	50-100	0.02068	0.03102	0.01034
Etoricoxib	119	80-100	1.4-3.6	92	30-120	0.288	0.432	0.144
Celecoxib	288-499	99	0.329-0.797	97	200	0.02391	0.035865	0.011955

**Tabla 2.** Preparación de principios activos para pruebas *in vitro*.

Principio Activo	Fracción fármaco libre ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pesaje API (mg)	Concentración solución madre ( $\mu\text{g/mL}$ en 10mL DMSO)	Alícuota solución madre ( $\mu\text{L}$ )	Concentración solución de trabajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen total solución trabajo (mL)	Alícuota solución de trabajo ( $\mu\text{L}$ )
Meloxicam	0.012432	5.206	518	12.0	0.622	10	40.0
	0.018648						60.0
	0.006216						20.0
Celecoxib	0.02391	5.428	545	21.9	1.1955	10	40.0
	0.035865						60.0
	0.011955						20.0
Diclofenaco sódico	0.02068	5.396	575	18.0	1.034	10	40.0
	0.03102						60.0
	0.01034						20.0
Acetaminofén	6.5925	5.231	521.5	6320.7	329.625	10	40.0
	9.88875						60.0
	3.29625						20.0
Ibuprofeno	0.422	5.543	541	390.0	21.1	10	40.0
	0.633						60.0
	0.211						20.0
Etoricoxib	0.288	5.789	576	250.0	14.400	10	40.0
	0.432						60.0
	0.144						20.0

**Tabla 3.** Preparación de principios activos para el inmunoensayo ELISA competitiva.

Principio Activo	Fracción fármaco libre ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pesaje API (mg)	Concentración solución madre ( $\mu\text{g/mL}$ en 5mL DMSO)	Alícuota solución madre ( $\mu\text{L}$ )	Concentración solución de trabajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen total solución trabajo (mL)	Alícuota solución trabajo ( $\mu\text{L}$ )
Meloxicam	0.012432	5.206	518	5.5	0.286	10	10
Celecoxib	0.02391	5.428	545	10.1	0.54993	10	10
Diclofenaco sódico	0.02068	5.396	575	8.3	0.476	10	10
Acetaminofén	6.5925	5.231	521.5	2907.5	151.628	10	10
Ibuprofeno	0.422	5.543	541	179.4	9.706	10	10
Etoricoxib	0.288	5.789	576	115.0	6.624	10	10

### 3.2 Desarrollo ensayo ELISA competitiva

Se dispuso del *Cox human inhibitor screening assay kit*, de la marca comercial Cayman Chemical, el cual mide el PGF2 $\alpha$  generado al reducir el producto intermedio de la reacción COX, es decir PGH<sub>2</sub>, por medio de la reducción con cloruro de estaño. Dicho prostanoide es cuantificado utilizando un antisuero específico para PGF2 $\alpha$ . El principio de este ensayo consiste en la competencia entre PGF2 $\alpha$  y un conjugado PGF2 $\alpha$  de acetilcolinesterasa (AChE), conocido como el trazador de PGF2 $\alpha$ . La competencia se da por una cantidad limitada del anticuerpo policlonal PGF2 $\alpha$  en el antisuero. Dado a que la concentración de trazador PGF2 $\alpha$  es constante, mientras que PGF2 $\alpha$  varía, la cantidad que se pueda unir del trazador es inversamente proporcional a la concentración de PGF2 $\alpha$  en el pozo que tiene adherido anticuerpo monoclonal de ratón (anti-conejo), al cual se unirá el anticuerpo PGF2 $\alpha$  de conejo que se encuentra libre o en el trazador.

Posteriormente, se realizó un lavado a cada pozo para retirar los componentes no unidos y se incorporó el reactivo de Ellman (el cual contiene el sustrato de AChE). El producto de la reacción enzimática presenta un color amarillo distintivo y se absorbe con mayor intensidad a 412nm. Ahora bien, la intensidad de este color se determina espectrofotométricamente, siendo proporcional a la cantidad del trazador PGF2 $\alpha$  unido al pozo, pero inversamente proporcional a la cantidad de PGF2 $\alpha$  libre presente en el pozo durante la incubación.

Para ello, inicialmente se prepararon los reactivos para la reacción de COX-1 y COX-2, y se elaboraron las siguientes reacciones por tubo:

- **Tubos de *Background* COX-1 y COX-2:** contienen la enzima inactiva luego de colocar a 100°C por 3 minutos. Luego, se dispuso a cada tubo con 160uL de Buffer de Reacción (1X), 10uL de Heme y 10uL de la enzima inactiva.
- **Tubos de actividad 100% de COX-1 y COX-2:** a diferencia de los tubos background, contienen la enzima activa.
- **Tubos inhibidores:** contiene 10 uL de cada inhibidor (AINEs) a la concentración de fármaco libre establecida por reacción de COX, además de 160uL de Buffer de Reacción, 10uL de Heme y 10uL de la enzima.

A continuación, se incubaron los tubos por 10 minutos a 37°C y se inició la reacción añadiendo 10uL del sustrato AA. De ahí, se añadieron 30uL de SnCl<sub>2</sub> para detener la catálisis enzimática. Con ello, se realizaron las diluciones respectivas para incorporar en la placa ELISA, y los

reactivos previamente preparados para el desarrollo del inmunoensayo (ver *Anexo 2*). Seguidamente, la placa se almacenó a 4°C durante 18 horas y posterior a ello, se realizaron los lavados con buffer ELISA para la incorporación del reactivo de Ellman y lectura en lector de platos entre 405-420 nm.

El método de Ellman es uno de los métodos más utilizados para medir la actividad de la colinesterasa, porque determina tioles a bajas concentraciones. Este método detecta la presencia de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato de acetiltiocolina por la acetilcolinesterasa. La tiocolina reacciona con el reactivo cromóforo, el DTNB (reactivo de Ellman), dando lugar a un producto de coloración amarilla cuya absorbancia es medida a una longitud de onda de 412 nm. De este modo, cuanto mayor coloración amarilla, menor actividad inhibitoria tendrá la muestra sobre COX-1 y COX-2.

### **3.3 Ejecución de los ensayos *in vitro* en la línea celular HGC-27**

#### **3.3.1 Mantenimiento de la línea celular HGC-27 y aplicación de tratamiento**

La línea celular de la mucosa gástrica metastásica humana HGC-27, una vez suministrada, debe pasar por el proceso de establecimiento y subcultivo de la cantidad de células requeridas tanto en criopreservación como en cultivo para poder emplearlas posteriormente en los ensayos *in vitro*. En este sentido, el protocolo de subcultivo consistió en retirar el medio de cultivo del frasco, y se lava con solución salina 0.9%. Seguidamente, se agregó la suficiente cantidad de tripsina que cubra la capa de células para desadherirlas y se mantuvo bajo incubación por 3 minutos a condiciones constantes de CO<sub>2</sub> y temperatura (4.5% y 37°C). Luego, se agitó ligeramente el frasco para asegurar el desprendimiento de las células y cuando  $\geq 90$  % de las células se hayan desprendido, se agrega solución de inactivación. Finalmente, se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm y se resuspendió el sedimento celular para realizar el conteo en cámara de Neubauer con azul de tripano.

Ahora bien, las pruebas *in vitro*, se sembraron en una placa multiwell de 24 pozos aproximadamente 100.000 células por pozo, con un volumen de trabajo de 2mL de DMEM, y se incuban a condiciones constantes de CO<sub>2</sub> y temperatura (4.5% y 37°C) durante 24 horas para la realización del bioensayo con los fármacos, lo cual garantiza una confluencia celular del 70-80% y una adhesión adecuada. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de 7 minutos estimadamente, se adicionó el volumen de dilución correspondiente a las

concentraciones de fármaco libre por triplicado (**Tabla 2**) y se empleó como control vehicular DMSO diluido en medio DMEM.

### 3.3.2 Extracción del material genético y retrotranscripción

Se procedió con la extracción de ARN total de las células de cada tratamiento y sus respectivas réplicas, así como el de los controles, con el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Una vez efectuada la elución, se descartó la columna, quedando con el tubo de colección y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente cuantificar el ARN total por espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher), evaluando la calidad mediante la relación de las absorbancias 230nm, 280nm respecto a la 260 nm.

Ahora bien, para la elaboración de la transcripción reversa de ARN a cDNA, se efectuó el procedimiento indicado en la **Tabla 4**, cuya muestra de ARN fue ajustada acorde al resultado de cuantificación de en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher) buscando utilizar  $1\ \mu\text{g}$  por muestra.

**Tabla 4.** Procedimiento transcripción reversa ARN a cDNA.

Paso	Reactivo	Volumen	Consideración
2	Primers (60 mM) o oligo d(T) (50 mM)	2 $\mu\text{L}$	Diluir oligo d(T) de acuerdo al volumen final a utilizar.
3	dNTPs	1 $\mu\text{L}$	Proporción de nucleótidos para síntesis de cDNA.
4	Agua	c.s.p 10 $\mu\text{L}$	Desnaturalización mix a $65^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos en termociclador o baño seco y colocar en hielo.
5	Buffer 10x MMuLV	2 $\mu\text{L}$	Pre calentado en baño seco a $60^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.
6	MMuLV RT	1 $\mu\text{L}$	Enzima para la transcripción inversa.
7	Agua	c.s.p 20 $\mu\text{L}$	Completar volumen final según el deseado.

A continuación, dependiendo del empleo de oligo d(T) o primers, se configuró un protocolo de incubación en termociclador diferente, siendo  $42^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para oligo d(T) y  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos y luego  $41^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para primers. Finalmente, se incubó 20 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  para inactivar y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para cuantificar el cDNA con Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

Ahora bien, como prueba confirmatoria para verificar la amplificación del cDNA, se realizó PCR convencional (ver **Tabla 5**) y el montaje de electroforesis con gel de agarosa al 2% previo a la cuantificación relativa de los niveles de expresión por qPCR.

**Tabla 5.** Preparación reactivos para PCR convencional.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen por reacción
F-Primer	10 pm/uL	0.3 pm/uL	0.6
R-Primer	10 pm/ $\mu$ L	0.3 pm/ $\mu$ L	0.6
Buffer	10X	1X	2
dNTPs	10 nm/ $\mu$ L	0.2 nm/ $\mu$ L	0.4
Taq polimerasa	5 u/ $\mu$ L	0.05 u/ $\mu$ L	0.2
Magnesio	25 mM	2 mM	1.6
Agua	-	-	c.s.p
<b>Volumen Final</b>			20 $\mu$ L

### 6.3.3 Cuantificación relativa de los niveles de expresión por qPCR

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión por qPCR, se empleó el QuantiNova SYBR Green PCR Kit, para lo cual se descongeló *SG RT-PCR Master Mix*, los primers diseñados para la amplificación PCR (ver **Tabla 6**) y agua libre de RNAsas. Asimismo, se siguió la preparación PreMix respecto a las cantidades proporcionadas en la **Tabla 7**.

**Tabla 6.** Secuenciación de pareja de primers para el desarrollo de PCR y qPCR.

Nombre	Receptor	Adhesión	FoR	seq 5'-3'	Tm (°C)	Longitud producto (pb)
EP1_a	EP1	NM_000955.3	F	ATCATGGTGGTGTTCGTGCAT	61	164
			R	TGGCGCAGTAGGATGTACAC	61	
EP1_b	EP1	NM_000955.3	F	GCCTCAGCCACTTCTAAGC	60.3	95
			R	TATTCCCAAAGGCTCTGCG	59.9	
EP2_a	EP2	NM_000956.4	F	TCTGCTCCTTGCCTTTCACG	62.6	173
			R	ACAACAGAGGACTGAACGCA	60.9	
EP2_b	EP2	NM_000956.4	F	TCTGCTCCTTGCCTTTCAC	60.1	173
			R	ACAACAGAGGACTGAACGC	59.5	
EP3_a	EP3 (Variant 5)	NM_198715.3	F	GATCCTTGGGTTTACCTGCT	59.8	102
			R	CTGCCCTTTCTGTCCATCATT AG	60.3	
EP3_b	EP3 (Variant 5)	NM_198715.3	F	GCAAGACACACACGGAGAA	59.9	149
			R	GACAGCATTTGCTACCTGGC	60.5	
EP4_a	EP4	NM_000958.3	F	AGGTGAAAGCAGGTTGGAG	60.3	198
			R	ATGGTCACTGGGCTGTTC	60.3	
EP4_b	EP4	NM_000958.3	F	AATCGTCCGCTCCTTG	60.6	80
			R	ACCACCCCGAAGATGAAC	60.9	
B2M	B2M	NM_004048	F	CGCTACTCTCTTTTCTGGCC	62.3	73
			R	GCTGGATGACGTGAGTAAAC C	60.4	

**Tabla 7.** Preparación premix para qPCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Unidad	Concentración Final	Unidad	Volumen por tubo (μL)
Master	2	x	1	x	5
Rox	200	x	1	x	0.05
F-primer	10	pm/μL	0.3	pm/μL	0.3
R-primer	10	pm/μL	0.3	pm/μL	0.3
Agua	-	-	-	-	3.35
cDNA	-	-	1.5	ng/μL	1
<b>Volumen final</b>					10

Posteriormente, se transfirió el PreMix a reacciones individuales contenidos en los diferentes pozos de la placa multiwell de qPCR para un volumen final de 10μL. Una vez individualizadas

las reacciones, para la reacción de amplificación se distribuyó 1  $\mu$ L del cDNA molde, según la configuración de la placa en el termociclador BioRad CFX96 (Qiagen).

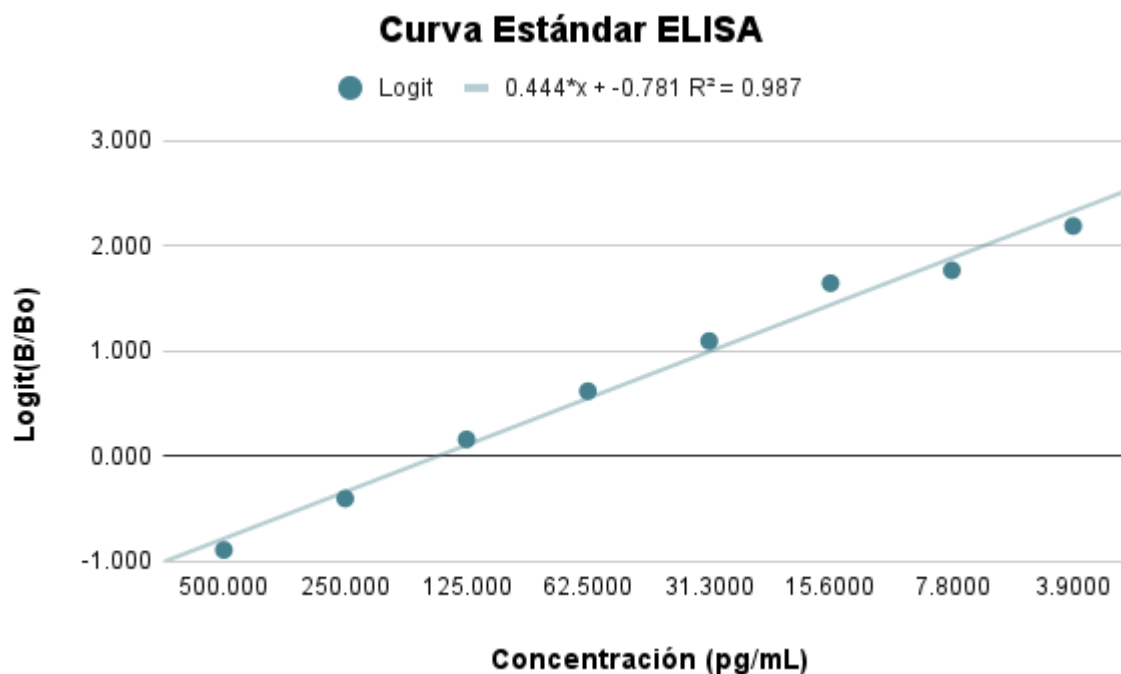
Cabe resaltar que se realizaron un grupo de experimentos para optimizar los protocolos, incluyendo concentraciones de reactivos y parámetros de termoperfil. En este sentido, el termoperfil empleado fue el siguiente: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 s; se evaluaron tres temperaturas de alineamiento 58°C, 60°C y 62°C por 10 s y elongación a 72°C por 20 s con adquisición de dato fluorescente. Después de los ciclos de PCR, se generó una curva de disociación (0 s a 95°C, 15 s a 65°C, 0 s a 95°C) para discriminar entre los amplicones específicos y los productos de amplificación no específicos.

Finalmente, después de la qPCR se realizó un análisis de la curva de fusión para evaluar la especificidad del ensayo y análisis descriptivo de la expresión diferencial de los receptores respecto a los niveles basales de expresión. Las expresiones génicas se tomaron cuando el umbral de detección excedió el valor de fondo (valor CT) y se calcularon utilizando el  $-2\Delta\Delta CT$  empleando como normalizador la expresión del B2M.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Desarrollo ensayo ELISA competitiva

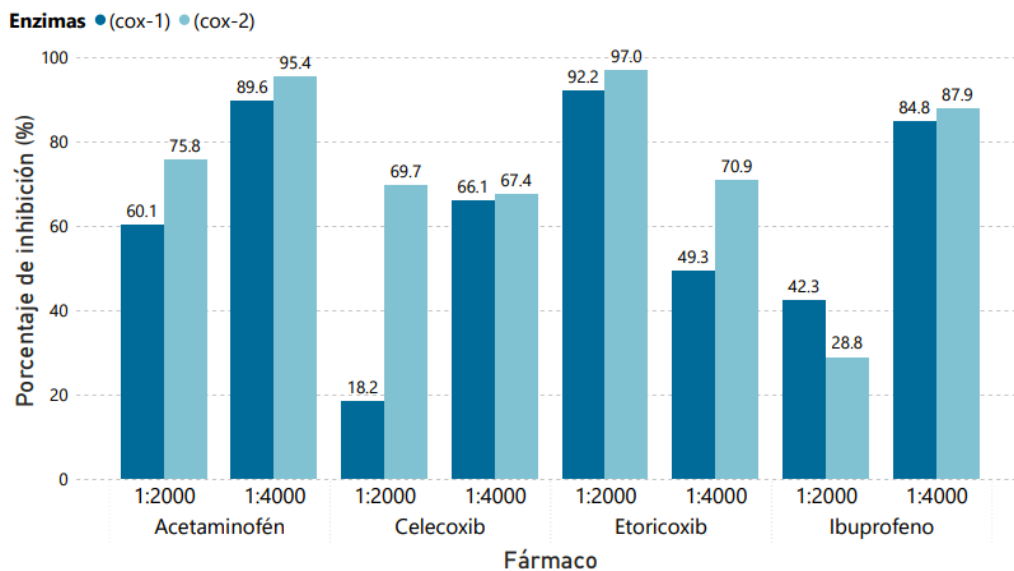
Las concentraciones de fármaco libre se extrapolaron a la prueba ELISA competitiva, ensayando a dos diluciones de 1:2000 y 1:4000 para su lectura. La curva estándar obtenida en el ensayo ELISA (*Figura 1*) presenta una relación lineal entre la concentración del analito (pg/mL) y el Logit (B/B<sub>0</sub>), descrita por la ecuación  $y = 0.444x - 0.781$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.987$  que indica un ajuste óptimo al modelo. El rango dinámico de la curva abarca concentraciones de 3.9 a 500 pg/mL, dentro del cual se mantiene la linealidad, permitiendo una cuantificación precisa del analito. La pendiente de la curva 0.44 refleja la sensibilidad del ensayo, evidenciando que pequeños cambios en concentración producen respuestas detectables. Además, la distribución uniforme de los puntos sugiere alta consistencia en las mediciones realizadas en duplicado, lo que garantiza la fiabilidad de los datos experimentales.



**Figura 1.** Curva Calibración del Estándar ELISA en inmunoensayo ELISA competitiva.

Ahora bien, para determinar la concentración de las muestras y calcular el porcentaje de inhibición, se calculó el porcentaje de unión máxima relativa (%B/B<sub>0</sub>) para cada muestra. Esto se realizó dividiendo la absorbancia corregida de cada muestra por la absorbancia máxima corregida (B<sub>0</sub>), y multiplicando por 100. De esta manera, se interpolaron los %B/B<sub>0</sub> sobre la curva estándar para obtener el valor correspondiente en el eje de concentración, evaluando

valores mayores al 80% o menores al 20%, ya que generalmente están fuera del rango lineal de la curva estándar. Posteriormente, se multiplicaron las concentraciones obtenidas por los factores de dilución correspondientes para calcular las concentraciones reales, restando la concentración de fondo (concentración enzimas COX inactivas) de las concentraciones de la actividad inicial (actividad al 100% de enzimas COX) y de las muestras con inhibidores. Asimismo, el porcentaje de inhibición sobre COX-1 y COX-2 se encontró restando la concentración de cada muestra con inhibidor de la concentración de la actividad inicial y dividiéndola por este.



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición hacia COX-1 y COX-2 mediante ELISA competitiva.

Basado en el conocimiento actual de la  $PGF2\alpha$  como mediadora inflamatoria, se ha demostrado que la  $PGF2\alpha$  activa la respuesta al calcio y las vías de señalización proinflamatorias, específicamente en el miometrio humano, a través del acoplamiento de  $G\alpha_q$  y también de  $G\alpha_i$  del receptor. La  $PGF2\alpha$  aumenta la activación de  $NF-\kappa B$ , MAP quinasas, CREB y  $C/EBP-\beta$  y, a su vez, regula positivamente la expresión de citocinas y quimiocinas, así como de COX-2. Se ha evidenciado que AINEs selectivos para COX-2 exhiben un perfil inhibitorio mayor sobre dicho prostanoide, sugiriendo una afinidad por COX-2 sobre la expresión de los niveles de  $PGF2\alpha$ . En este sentido, el celecoxib y etoricoxib reflejaron la selectividad constatada bibliográficamente hacia COX-2, lo cual podría ser un indicativo de que existe una mayor dependencia de expresión de  $PGF2\alpha$  hacia dicha isoenzima.<sup>25,26</sup>

En cuanto a los porcentajes de inhibición hacia COX-1 y COX-2, se pudo verificar que el carácter selectivo de Celecoxib hacia COX-2 se mantuvo en ambas concentraciones, dada su

especificidad por unirse al sector hidrofílico de COX-2. Siendo así, el ácido araquidónico estimuló la producción de  $\text{PGF2}\alpha$ , mientras que el celecoxib impidió la síntesis de PG inducida por el ácido araquidónico. No obstante, se evidenció una característica concentración-dependiente hacia COX-1, puesto que cuando la concentración disminuye la interacción con COX-1 demostró una mayor tendencia inhibitoria. Este aspecto se pudo desencadenar debido a factores como desplazamiento competitivo de ligandos o del trazador de acetilcolinesterasa presentes en el ensayo, así como por la dinámica de la prueba que favorece la unión inespecífica de baja afinidad en concentraciones diluidas.<sup>25</sup> En este punto, se debe tener en cuenta que los ensayos ELISA competitiva pueden tener diferentes niveles de sensibilidad o especificidad para las dos isoenzimas dependiendo de la concentración del inhibidor. Por ende, si el sistema tiene una mayor sensibilidad para detectar cambios en COX-1 a concentraciones bajas, el aumento aparente de inhibición podría deberse a la forma en que se detecta la inhibición a concentraciones más diluidas, donde los efectos de la afinidad diferencial enzimáticos no sean tan marcados.<sup>26, 27</sup>

Ahora bien, el etoricoxib, presentó una tendencia selectiva hacia COX-2, esto está sujeto a su carácter altamente selectivo 106 veces mayor a COX-1. En comparación con otros agentes de esta clase, como rofecoxib y celecoxib, en sangre humana completa, el etoricoxib ha demostrado una mayor selectividad para la COX-2, como lo evidencian los índices de  $\text{IC}_{50}$ , la cual aumenta a mayor concentración. Este estudio, permitió confirmar dicha tendencia, sugiriendo una relación concentración-dependiente. No obstante, el rango de concentraciones ensayado es insuficiente para determinar si esta inhibición, dependiente de la ruta COX/ $\text{PGF2}\alpha$ , sigue un patrón consistente o si alcanza un punto de saturación, motivo por el cual tanto para celecoxib como para etoricoxib sería recomendable realizar el ensayo para más concentraciones y evaluar si este comportamiento persiste.<sup>25,26,27,28</sup>

Respecto al ibuprofeno, se pudo identificar su tendencia no selectiva, siendo variable respecto a la concentración en la que se encuentra, e indicando mayor inhibición en dilución 1:4000, lo que podría deberse a una mayor afinidad relativa o a una saturación menos significativa de los sitios de unión. Además, se podría relacionar que la interacción del antígeno con el anticuerpo IgG presente en el pozo se ve afectada por el ibuprofeno. Los efectos inmunomoduladores de los AINEs no se comprenden completamente y están lejos de estar completamente dilucidados, sin embargo, las prostaglandinas derivadas de COX, como  $\text{PGF2}\alpha$  y  $\text{PGE2}$ , pueden alterar la producción de citocinas al promover citocinas de tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10) e inhibir la

producción de citocinas de tipo 1 (IFN- $\gamma$  e IL-12). Las citocinas de tipo 2 están implicadas en las respuestas inmunitarias humorales (síntesis de anticuerpos), por lo tanto, además de afectar la proliferación de linfocitos B, los AINEs también podrían influir en la producción de citocinas y, en última instancia, en la síntesis de anticuerpos y las interacciones entre proteínas durante la respuesta inmune. A pesar de que este mecanismo no sea el principal del ibuprofeno, podría generar un efecto en la interacción antígeno-anticuerpo a concentraciones más altas, reduciendo el grado inhibitorio del AINE.<sup>29</sup> Siendo así, no es posible evidenciar una tendencia selectiva del fármaco, que más allá de ser empleado como coadyuvante de varias patologías reumáticas, inflamatorias y piréticas por su amplio espectro de acción, se debe ahondar más su estudio en el campo inmunológico para evaluar su comportamiento inhibitorio frente a COX.<sup>29,30</sup>

Por parte del acetaminofén, se detectaron niveles elevados de inhibición frente hacia ambas isoenzimas, con una ligera especificidad hacia COX-2. El acetaminofén se considera que tiene un efecto limitado sobre las prostaglandinas periféricas y no es clasificado como un AINE debido a su débil acción antiinflamatoria. A pesar de esto, estudios han demostrado que puede disminuir los niveles de ciertas prostaglandinas en el sistema nervioso central, específicamente en áreas relacionadas con la percepción del dolor y la regulación de la fiebre, lo que podría justificar su efecto en la medición de PGF2 $\alpha$  en el ensayo y grado inhibitorio.<sup>31,32</sup> También, se ha sugerido que la inhibición de COX-2 podría estar mediada por su interacción con mecanismos moleculares que no están directamente relacionados con su inhibición, pero que aún reducen los niveles de prostaglandinas, como las interacciones con la vía de señalización de las proteínas quinasa y la activación de receptores del sistema endocannabinoide. No obstante, como este ensayo no se efectúa sobre un tejido específico, sino sobre proteínas recombinantes, se puede determinar que su efecto sobre dichas enzimas es prevalente, aunque puede ser diferencial su grado inhibitorio dependiendo del tejido y de acuerdo a la dosis terapéutica. Siendo así, es un punto de partida prometedor de evaluar, considerando también la inclusión del nuevo blanco al cual se ha postulado que es mayormente selectivo: COX-3, una variante de COX-1 que sigue en investigación sobre su papel fisiológico humano.<sup>33,34</sup>

Finalmente, el diclofenaco en concentración más diluida presentó una inhibición equilibrada para ambas enzimas, siendo del 49% y 52% para COX-1 y COX-2 respectivamente, así como el meloxicam del 22% y 64%. Sin embargo, ambos fármacos generaron una interferencia sobre la PGF2 $\alpha$  a diluciones 1:2000, lo cual puede sugerir a nivel farmacológico su eficiencia para

inhibir la producción de  $\text{PGF2}\alpha$  o que estos inhibidores hayan competido altamente con el ácido araquidónico, reduciendo la producción de  $\text{PGH2}$  que es precursor de  $\text{PGF2}\alpha$ . En general, los AINEs se emplean terapéuticamente en dosis que generan más del 50% de reducción de la producción de PG.<sup>35,36</sup> En este contexto, sería importante verificar el grado en que COX-1 se inhibe a la misma concentración de AINE que se requiere para inhibir el 80% de la actividad de COX-2. Sin embargo, en el caso del diclofenaco, la concentración que inhibe el 80% de la actividad de COX-2 también puede inhibir el 70% de la actividad de COX-1 al mismo tiempo, de manera que la dosis terapéutica (80% de inhibición de COX-2) puede incluso provocar toxicidad (70% de inhibición de COX-1). Por lo tanto, en este escenario, cuando la selectividad relativa varía dentro de un rango estrecho, se deben considerar otras variables, incluida la dosis consumida y la vida media plasmática para determinar a nivel biológico esta inhibición.<sup>37</sup>

Cabe resaltar que, es de vital importancia poder extrapolar los resultados con mayor cantidad de concentraciones con la finalidad de poder obtener el IC50 de cada fármaco para evaluar su comportamiento frente a la producción de  $\text{PGF2}\alpha$  dependiente de COX-1 y COX-2 para tener indicios más representativos de cada AINE. Además, es de gran importancia para detectar la reactividad cruzada con otros compuestos resultantes en el ensayo que permitan brindar un análisis más exhaustivo de la acción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos.<sup>37</sup>

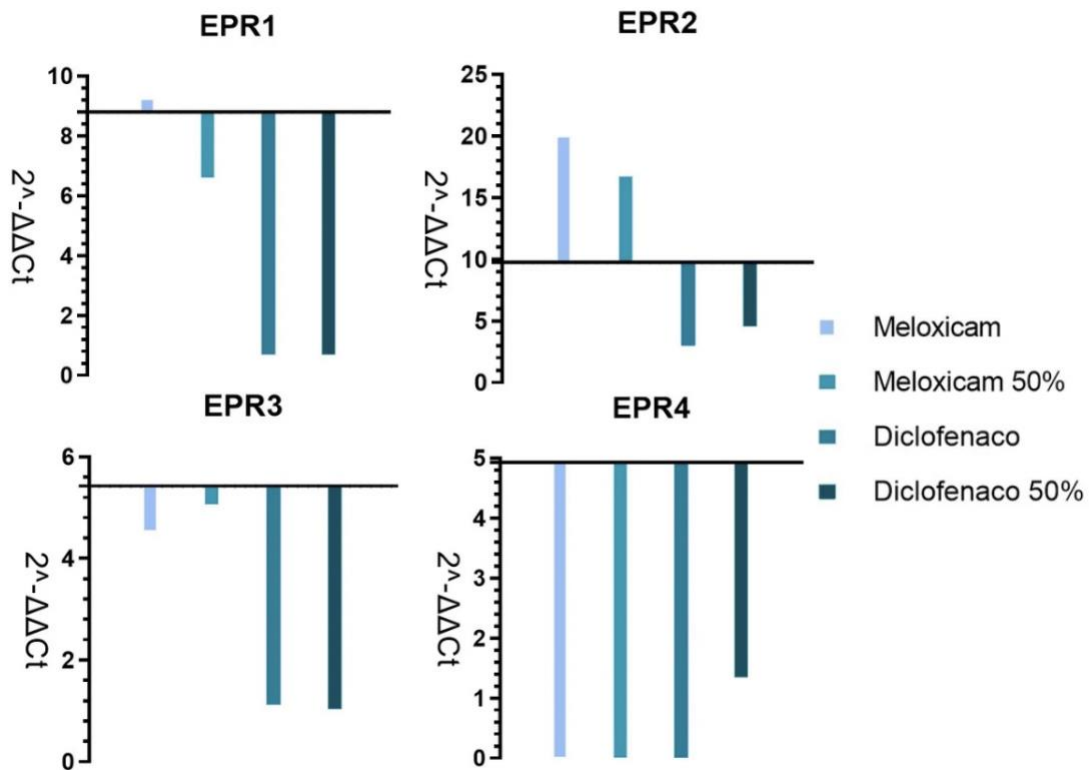
#### **4.3 Cuantificación relativa de receptores PGE2 por qPCR**

El objetivo en este punto se centró en evaluar si los AINEs inducen modificaciones significativas en los niveles de los receptores de PGE2 en las células HGC-27, comparado con sus niveles basales (sin tratamiento). Debido a que los AINEs ácidos se unen en gran medida a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina, es de vital relevancia la implementación de dichas pruebas para confirmar que la concentración plasmática es la óptima para ejercer su efecto inhibitorio. Por ejemplo, el diclofenaco, al igual que otros AINEs ácidos, se concentra no solo en la circulación sistémica, sino también en los tejidos inflamados, donde el ambiente ácido débil reduce la unión a las proteínas plasmáticas, aumentando así la fracción libre del fármaco y facilitando la difusión del diclofenaco a los espacios intracelulares, donde puede ejercer su efecto terapéutico.<sup>37</sup> Siendo así, se determinó como efectiva la concentración que corresponde a la de fármaco libre, denominada como estándar, ya que demostró una expresión diferencial en los receptores de prostaglandina tras la cuantificación relativa en qPCR.

Diversos estudios han demostrado que la COX-2 promueve la proliferación tumoral, la inducción de la angiogénesis, invasión tumoral, metástasis y la inhibición de la apoptosis. Además, su sobreexpresión está asociada a neoplasias malignas gastrointestinales como el cáncer colorrectal, pancreático, hepático, gástrico y esofágico.<sup>38</sup> Un producto importante de la COX-2 es la PGE2 y su mayor expresión está vinculada con la progresión de la carcinogénesis. La actividad fisiológica de la PGE2 está mediada por la activación de un grupo diverso de cascadas de señalización descendentes a través de siete receptores acoplados a proteína G transmembrana (GPCR), denominados receptores EP, FP, DP, IP y TP. Estos receptores son altamente selectivos para sustratos prostanoideos individuales, incluidos PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGD2, PGI2 y TxA2, respectivamente.<sup>39</sup> Cada receptor tiene un patrón de expresión específico del tipo celular que permite un control estricto sobre sus funciones fisiológicas distintas, pero ocasionalmente superpuestas. La PGE2 se une a los miembros de la familia de receptores EP que constan de cuatro isoformas (EP1-4) y desempeñan un papel importante durante la inflamación. EP3 tiene varias variantes de empalme, lo que añade un nivel funcional adicional al receptor.<sup>40</sup> De estos cuatro receptores, EP3 y EP4 tienen una mayor afinidad por PGE2 y, por tanto, requieren una concentración significativamente menor de PGE2 para una señalización eficaz, en comparación con EP1 y EP2. Los receptores EP2 y EP4 median la actividad antiinflamatoria y supresora de PGE2 mediante la señalización a través de receptores acoplados a Gs, mediada por la vía cAMP/PKA/CREB activada por la adenilato ciclasa. Aunque EP2 y EP4 comparten la misma función, se activan con diferentes concentraciones de PGE2, lo que permite que EP2 medie las funciones de PGE2 durante un período de tiempo más largo y en una etapa posterior de la inflamación, mientras que EP4 se desensibiliza rápidamente.<sup>41</sup>

La cuantificación relativa se enfocó en determinar el perfil de expresión diferencial de los receptores de PGE2 tras la exposición a estos agentes inhibidores, evaluando las variaciones en relación a los niveles basales (ver **Figura 3**). Si bien este ensayo fue determinado para los seis fármacos, se pudo identificar que la expresión diferencial de los receptores de PGE2 fue significativa para Meloxicam y Diclofenaco. Por un lado, los efectos analgésicos periféricos del diclofenaco, al inhibir la COX, reduce la síntesis de PGE2 y la expresión de los receptores de PGE2, además de modular otras vías implicadas en la inflamación, como la vía del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Un ensayo *in vitro* en sangre entera humana, desarrollado por Paola Patrignani y colegas, para medir el grado de selectividad de los AINEs hacia las COX cuantificando la inhibición de la formación dependiente de la COX-2 de PGE2, hace referencia

a que el diclofenaco evidencia refleja un mayor grado de inhibición de PGE2 modulado por su mayor selectividad para COX-2. Sin embargo, mediante ELISA competitivo, se demostró que para concentraciones menores a la de fármaco libre hay una tendencia inhibitoria equilibrada frente a ambas isoenzimas, lo cual podría dar indicios que la disminución de los receptores podría estar modulado por la inhibición balanceada de COX-1 y COX-2.<sup>37,42,43</sup>



**Figura 3.** Expresión diferencial de receptores de PGE2 en HGC-27 bajo tratamiento con AINEs.

Por otro lado, el meloxicam es un inhibidor preferencial de COX-2, con una relación de inhibición COX-2/COX-1 de aproximadamente 0.09, lo que significa que es significativamente más efectivo en bloquear la COX-2 que la COX-1. Esto lo hace más selectivo para procesos inflamatorios específicos, pero limita su impacto general sobre todas las prostaglandinas, ya que COX-1 tiene un papel importante en la síntesis basal de estas moléculas en tejidos no inflamatorios.<sup>44,45</sup> Con base en los resultados, se evidenció un efecto menos marcado de este fármaco frente al diclofenaco sobre los receptores. Esto se puede fundamentar por su efecto equilibrado frente a ambas isoformas, cuya inhibición dual tiene un efecto más amplio sobre la reducción de receptores de PGE2, incluyendo aquellas prostaglandinas mediadas por la COX-1, que contribuyen a la homeostasis basal en tejidos como el gastrointestinal y el renal. Incluso,

el diclofenaco tiene una mayor potencia inhibitoria global frente a las ciclooxigenasas en comparación con el meloxicam. Esto significa, que incluso a bajas concentraciones puede bloquear de manera más eficiente la síntesis de prostaglandinas tanto en condiciones inflamatorias como no inflamatorias.<sup>44,45,46</sup>

Ahora bien, el meloxicam no demostró un efecto inhibitorio profundo sobre los receptores de prostaglandina, a excepción de EPR4. Cabe resaltar que, a dosis antiinflamatorias como la implementada en el presente estudio, se ha demostrado que el meloxicam suprime aproximadamente en un 50% la producción gástrica de PGE2 inducida por estados inflamatorios, pero la supresión no es significativa dado que los efectos del Meloxicam están más enfocados en el exudado pleural y peritoneal.<sup>44,45,47,48</sup> En el tracto gastrointestinal, se postula que los prostanoides están involucrados en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el control de la secreción de ácido gástrico, el flujo sanguíneo, la producción de moco y el mantenimiento de la integridad de la mucosa. Sin embargo, la producción reducida de prostanoides en el tracto gastrointestinal resulta en una mayor producción de ácido y una menor formación de moco citoprotector, lo que puede conducir a efectos gastrointestinales tales como dispepsia y formación de úlceras.<sup>49,50,51</sup> La dosis antiinflamatoria de meloxicam puede exhibir selectividad por COX-2 sobre COX-1 en el tracto gastrointestinal lo suficiente como para preservar la producción de prostanoides, como se muestra aquí y también en ensayos clínicos que indican su baja toxicidad gástrica.<sup>50,51</sup> De tal manera que el meloxicam no presenta un efecto inhibitorio significativo en la expresión de los receptores de prostaglandina, pero sí sobre EPR4 dado que se ha comprobado su comportamiento dirigido a vías específicas de PGE2/EPR4, sugiriendo que su efecto no selectivo sobre COX puede tener implicaciones como agente antagonista de prostaglandinas. Además, según lo reflejado en el ELISA competitivo, la afinidad inhibitoria de meloxicam hacia COX-2 es sugestivo de que no ejerce actividad representativa sobre COX-1, la cual presenta mayor inducción en la expresión de los receptores EP1 y EP2 en la protección gástrica.<sup>50,51,52,53</sup>

## 5. Conclusiones

Los AINEs con un grupo de fármacos heterogéneo, que tienen un mecanismo de acción común (inhibición de enzimas COX) pero que presentan distintos perfiles de selectividad COX, así como diferencias relevantes a nivel de espectro de acción terapéutica, perfil farmacocinético, tipos de interacciones y efectos adversos. Son fármacos altamente prescritos y es conveniente tener presentes estas diferencias a la hora de seleccionar el mejor fármaco según la indicación, características, polimedicación y comorbilidades del paciente. El estudio permitió establecer las concentraciones inhibitorias efectivas de seis AINEs (Celecoxib, Acetaminofén, Diclofenaco, Etoricoxib, Meloxicam e Ibuprofeno) mediante un enfoque integral que incluyó parámetros farmacocinéticos y ensayos funcionales *in vitro*. Se desarrollaron pruebas con células HGC-27 para evaluar el impacto de estos fármacos sobre los niveles de expresión de receptores de PGE2 (EP1-EP4) en comparación con niveles basales, utilizando concentraciones estándar, máximas y mínimas del fármaco libre. Además, se implementó el ensayo de ELISA competitivo para cuantificar el efecto inhibitorio sobre las enzimas COX-1 y COX-2, empleando el método de Ellman para medir la actividad colinesterasa como indicador indirecto de la inhibición enzimática. Los resultados proporcionan una base para comprender la tendencia de los mecanismos de acción de los AINEs y su efecto en la expresión diferencial de los receptores de prostaglandina. Con ello, es un punto de partida que permite tener indicios para la optimización de su uso clínico, especialmente en relación con la modulación de la inflamación y el dolor asociados a la actividad de la PGE2. Siendo así, como perspectiva a futuro, se esperaría extrapolar estos ensayos a resultados estadísticamente significativos, que promuevan un mayor espectro de conocimiento de su efecto sobre dichas dianas moleculares y correlacionar cómo se ven afectados para diferentes concentraciones de fármacos.

## **6. Agradecimientos**

A lo largo de este camino académico, han sido muchas las personas que han contribuido de manera significativa a la culminación de este proyecto de grado, a quienes quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento. En primer lugar, agradezco a la Universidad Icesi, por ser una institución que fomenta la excelencia, el pensamiento crítico y la innovación. Su compromiso con la formación integral de sus estudiantes ha sido un faro de inspiración y un motor constante para alcanzar este logro. Mi especial gratitud a mi tutora, Laura María Rodríguez, quien, con su conocimiento, paciencia y dedicación, guió este proyecto con una visión clara y constructiva. Su apoyo incondicional no sólo enriqueció este trabajo, sino que también dejaron una huella en mi desarrollo profesional y personal. A mi familia, cuya fe en mí ha sido inquebrantable, les debo todo. Su amor, comprensión y apoyo constante me dieron la fortaleza necesaria para superar los desafíos en cada etapa del proceso, así como su aliento en los momentos de incertidumbre. A mis colegas y compañeros de la Universidad Icesi, quienes compartieron conmigo aprendizajes, experiencias y momentos inolvidables a lo largo de esta etapa. Su compañerismo y retroalimentación fueron un reflejo del espíritu colaborativo que caracteriza a esta institución. Finalmente, reconozco a todos los profesores y profesionales que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a mi crecimiento académico, brindando herramientas que hoy me permiten alcanzar este importante hito. A cada uno de ustedes, mi más profundo agradecimiento por ser parte esencial de esta trayectoria, que representa no solo el cierre de un capítulo, sino el inicio de nuevos retos y oportunidades de la mano de Dios.

## Referencias Bibliográficas

1. Ghlichloo, I. & Gerriets, V. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). PubMed <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/> (2023).
2. Takeuchi, K., Amagase, K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des.* PMID: 29956615 (2018). doi: 10.2174/1381612824666180629111227.
3. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* PMID: 32653589; PMCID: PMC7347500. (2020). doi: 10.1016/j.bcp.2020.114147.
4. Zhang P, Luo HS, Li M, Tan SY. Artesunate inhibits the growth and induces apoptosis of human gastric cancer cells by downregulating COX-2. *Onco Targets Ther.* Apr 16;8:845-54. (2015). doi: 10.2147/OTT.S81041
5. Zhang, B. *et al.* PGD2/PTGDR2 signalling restricts the self-renewal and tumorigenesis of gastric cancer. *Stem Cells* **36**, 990–1003. (2018).
6. Mazumder, S., Bindu, S., Debsharma, S., Bandyopadhyay, U. Induction of mitochondrial toxicity by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): The ultimate trade-off governing the therapeutic merits and demerits of these wonder drugs. *Biochem Pharmacol.* PMID: 38750902. (2024). doi: 10.1016/j.bcp.2024.116283.
7. Dvorakova, M., Langhansova, L., Temml, V., Pavicic, A., Vanek, T. & Landa, P. Synthesis, Inhibitory Activity, and *In Silico* Modeling of Selective COX-1 Inhibitors with a Quinazoline Core. *ACS Medicinal Chemistry Letters* *12* (4), 610-616. (2021). DOI: 10.1021/acsmchemlett.1c00004.
8. Minhajul, A., Ashish, S., Noopur, S., Riaz, A., Khan, S., Almahmoud, A., Hamdoon, A. Design, classification, and adverse effects of NSAIDs: A review on recent advancements, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 112, 117899, ISSN 0968-0896. (2024). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117899>
9. Ribeiro, H., Rodrigues, I., Napoleão, L., Lira, L., Marques, D., Veríssimo, M., Andrade, J.P., Dourado, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), pain and aging: Adjusting prescription to patient features, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 150, 112958, ISSN 0753-3322. (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112958>.
10. Fokunang, C. Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in resource limited countries. *MOJ Toxicology* *4*. (2018).
11. Ricciotti, E., FitzGerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *31*, 986–1000 (2011).

12. Grosjean, N., Yee, E.F., Kumaran, D. *et al.* A hemoprotein with a zinc-mirror heme site ties heme availability to carbon metabolism in cyanobacteria. *Nat Commun* 15, 3167 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47486-z>
13. Wang, B., Wu, L., Chen, J. *et al.* Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* 6, 94. (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
14. Zhang, Y., Liu, Y., Sun, J., Zhang, W., Guo, Z., Ma, Q. Arachidonic acid metabolism in health and disease. *MedComm*. PMID: 37746665; PMCID: PMC10511835. (2023). doi: 10.1002/mco2.363.
15. Tallima, H. Clarification of Arachidonic Acid Metabolic Pathway Intricacies *ACS Omega* (24), 15559-15563. DOI: 10.1021/acsomega.1c01952. (2021).
16. Li, X-J., Suo, P., Wang, Y-N., Zou, L., Nie, X-L., Zhao, Y-Y., Miao H. Arachidonic acid metabolism as a therapeutic target in AKI-toCKD transition. *Front. Pharmacol.* 15:1365802 (2024). doi: 10.3389/fphar.2024.1365802.
17. Alfaro RA, Davis DD. Diclofenac. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. (2023). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557879/>
18. DICLOFENAC: AN UPDATE ON ITS MECHANISM OF ACTION AND SAFETY PROFILE. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 30(2), 830-833. (2023). <https://doi.org/10.53555/jptcp.v30i2.4862>
19. García Aguirre L, Bohorquez Nassar C, Ruiz Olmedo I, Dennie L, Medina Nolasco AG. Bioequivalence Evaluation of Two Oral Formulations of Acetaminophen in Healthy Subjects: Results From a Randomized, Single-Blind, Crossover Study. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2019 Jan;8(1):9-15. doi: 10.1002/cpdd.469. Epub 2018 May 11. PMID: 29749718; PMCID: PMC6667897.
20. Geith, S., Renner, B., Rabe, C. *et al.* Ibuprofen plasma concentration profile in deliberate ibuprofen overdose with circulatory depression treated with therapeutic plasma exchange: a case report. *BMC Pharmacol Toxicol* 18, 81 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40360-017-0187-9>
21. *CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS REVIEW(S)*. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (FDA). (2017). [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/125545Orig1s000/ClinPharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/125545Orig1s000/ClinPharmR.pdf)

22. Hasan, Syed Muhammad Farid & Ahmad, Tasneem & Talib, Nasira & Hasan, Fouzia. Pharmacokinetics of diclofenac sodium in normal man. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. (2005).
23. Harikrishnan, N. *et al.* 'Pharmacokinetics and bioequivalence of generic etoricoxib in Healthy Volunteers', *Generics and Biosimilars Initiative Journal*, 10(3), pp. 113–118. (2021). doi:10.5639/gabij.2021.1003.013.
24. Chang WK *et al.* Bioequivalence Evaluation of two Formulations of Celecoxib 200mg Capsules in Healthy volunteers by using a validated LC/MS/MS method. *Int J Bioanal Methods Bioequival Stud*, 2(2), 34-40. (2015). doi: <http://dx.doi.org/10.19070/2470-4490-150004>
25. Patrignani, P., Panara, M.R, Greco, A., Fusco, O., Natoli, C., Iacobelli, S., *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;271(3): 1705–12
26. Shin VY, Liu MX, Siu JM, Kwong A, Chu KM. Inhibition of EP2 receptor suppresses tumor growth and chemoresistance of gastric cancer. *Am J Cancer Res*. (2022). 15;12(10):4680-4692. PMID: 36381319; PMCID: PMC9641405.
27. Matheny, R.W. Jr, Kolb, A.L., Geddis, A.V., Roberts, B.M. Celecoxib impairs primary human myoblast proliferation and differentiation independent of cyclooxygenase 2 inhibition. *Physiol Rep*.;10(21):e15481. (2022). doi: 10.14814/phy2.15481. PMID: 36325583; PMCID: PMC9630763.
28. Riaposova, L., Kim, S.H., Hanyaloglu, A.C., Sykes, L., MacIntyre D.A., Bennett, P.R., Terzidou, V. Prostaglandin F2a requires activation of calcium-dependent signalling to trigger inflammation in human myometrium. *Front. Endocrinol*. (2023). 14:1150125. doi: 10.3389/fendo.2023.1150125
29. Bancos, S. B., Phipps, R. Ibuprofen and other widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit antibody production in human cells. *Cellular immunology*. 258. 18-28. (2009). 10.1016/j.cellimm.2009.03.007.
30. Vleeshouwers, W., Van den Dries, K., de Keijzer, S., Joosten, B., Lidke, D.S., Cambi, A. Characterization of the Signaling Modalities of Prostaglandin E2 Receptors EP2 and EP4 Reveals Crosstalk and a Role for Microtubules. *Front. Immunol*. 11:613286. (2021). doi: 10.3389/fimmu.2020.613286

31. Ayoub, S. S. Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. *Temperature*, 8(4), 351–371. (2021). <https://doi.org/10.1080/23328940.2021.1886392>
32. Ayoub, S.S., Flower R.J. Loss of hypothermic and anti-pyretic action of paracetamol in cyclooxygenase-1 knockout mice is indicative of inhibition of cyclooxygenase-1 variant enzymes. *Eur J Pharmacol.* (2019); 861:172609
33. Bashir, S., Elegunde, B., Morgan, W.A. Inhibition of lipolysis: a novel explanation for the hypothermic actions of acetaminophen in non-febrile rodents. *Biochem Pharmacol.* (2020); 172:113774. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113774>
34. Ohashi, N., Kohno, T. Analgesic effect of acetaminophen: a review of known and novel mechanisms of action. *Front Pharmacol.* (2020); 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580289>
35. Regueras, E., Velázquez, I., Torres, L.M. Actualización en farmacología de los antiinflamatorios no esteroideos: actualización. *Revista de la Sociedad Española Multidisciplinar del dolor (Journal of the Multidisciplinary Spanish Pain Society)*. DOI: 10.20986/mpj.2023.1059/2023. (2023).
36. Dong X, Li R, Xiu P, Dong X, Xu Z, Zhai B, et al. Meloxicam Executes Its Antitumor Effects against Hepatocellular Carcinoma in COX-2- Dependent and -Independent Pathways. *PLoS ONE* 9(3): e92864. (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092864>
37. Atzeni, F., Masala, I.F. & Sarzi-Puttini, P. A Review of Chronic Musculoskeletal Pain: Central and Peripheral Effects of Diclofenac. *Pain Ther* 7, 163–177 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40122-018-0100-2>
38. Santiso, A., Heinemann, A., Kargl, J. PGE2 and Its Receptors in the Tumor Microenvironment. *Pharmacological Reviews*, 76 (3) 388-413. (2024). DOI: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.123.000901>
39. Sun, X., Li, Q. Prostaglandin EP2 receptor: Novel therapeutic target for human cancers (Review). *International Journal of Molecular.* (2018). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3744>
40. Liudmila, L., Mazaleuskayaa, B., Katherine, N., Thekena, B., Gongc, L., Thornc, F., Garret, A., FitzGerald, B., Russ, B. Altmanc,d, and Teri E. KleinPharmacogenet Genomics. 25(2): 96–106. (2015). doi:10.1097/FPC.000000000000113.

41. Gromova, M., Vaggelas, A., Dallmann, G., Seimetz, D. Biomarkers: opportunities and challenges for drug development in the current regulatory landscape. *Biomark Insights*. (2020); 15:1177271920974652. <https://doi.org/10.1177/1177271920974652>
42. Davis KD, Aghaeepour N, Ahn AH, et al. Discovery and validation of biomarkers to aid the development of safe and effective pain therapeutics: challenges and opportunities. *Nat Rev Neurol*. (2020); 16(7): 381-400. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0362-2>
43. Gomez-Valenzuela, F., Escobar, E., Perez-Tomas, R., Montecinos, V. P. The Inflammatory Profile of the Tumor Microenvironment, Orchestrated by Cyclooxygenase-2, Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, *Front. Oncol.*, **11**, 686792, (2021).
44. Cheng, L., Hu, Z., Gu, J., Li, Q., Liu, J., Liu, M., Li, J., & Bi, X. Exploring COX-Independent Pathways: A Novel Approach for Meloxicam and Other NSAIDs in Cancer and Cardiovascular Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, 17(11), 1488. (2024). <https://doi.org/10.3390/ph17111488>
45. Pawlukianiec, C., Gryciuk, M. E., Mil, K. M., Żendzian-Piotrowska, M., Zalewska, A., & Maciejczyk, M. A New Insight into Meloxicam: Assessment of Antioxidant and Anti-Glycating Activity in In Vitro Studies. *Pharmaceuticals*, 13(9), 240. (2020). <https://doi.org/10.3390/ph13090240>
46. K. Cao, Y. Lyu, J. Chen, C. He, X. Lyu, Y. Zhang, L. Chen, Y. Jiang, J. Xiang, B. Liu and C. Wu, Prognostic Implication of Plasma Metabolites in Gastric Cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(16), 12774, (2023).
47. Kim J. Are nonsteroidal anti-inflammatory drugs safe for the kidney in ankylosing spondylitis?. *J Rheum Dis* 2023;30:139-140. <https://doi.org/10.4078/jrd.2023.0033>
48. Wautier, J. -L., & Wautier, M. -P. (2023). Pro- and Anti-Inflammatory Prostaglandins and Cytokines in Humans: A Mini Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9647. <https://doi.org/10.3390/ijms24119647>
49. Noori M, Yadegar A, Zali MR. 2020. A complex scenario of nonsteroidal antiinflammatory drugs induced prostaglandin E2 production and gut microbiota alteration in Clostridium difficile-infected mice. *mBio* 11:e02596-19. <https://doi.org/10.1128/mBio .02596-19>.
50. Geurts, F., Chaker, L., van der Burgh, A. C., Cronin-Fenton, D., Fenton, R. A., & Hoorn, E. J. (2024). Urinary Prostaglandin E2 Excretion and the Risk of Cardiovascular

and Kidney Disease. Journal of the American Heart Association, 13(4), Article e032835. <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.032835>

51. Ogino, K., Hatanaka, K., Kawamura, M., Ohno, T., & Harada, Y. *Meloxicam Inhibits Prostaglandin E2 Generation via Cyclooxygenase 2 in the Inflammatory Site but Not That via Cyclooxygenase 1 in the Stomach. Pharmacology, 61(4), 244–250. (2000).* doi:10.1159/000028408
52. Taylor S, Gruen M, KuKanich K, et al. 2024 ISFM and AAFP consensus guidelines on the long-term use of NSAIDs in cats. Journal of Feline Medicine and Surgery. 2024;26(4). doi:10.1177/1098612X241241951
53. Jang, Y., Kim, M. & Hwang, S.W. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. *J Neuroinflammation* 17, 30 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1703-1>

## Anexos

*Anexo 1. Resultados cuantificación relativa por qPCR bajo tratamiento con Meloxicam y Diclofenaco.*

Target	Fármaco	Ct	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
B2M	Meloxicam	19,328	-	-
B2M	Diclofenaco	16,666	-	-
B2M	Control	16,273	-	-
EPR1	Meloxicam	24,914	-3,203	9,208715931
EPR1	Diclofenaco	26	0,545	0,685391402
EPR1	Control	25,062	8,789	0,002260723
EPR2	Meloxicam	24,741	-4,314	19,8903947
EPR2	Diclofenaco	24,823	-1,57	2,969047141
EPR2	Control	26	9,727	0,001179998
EPR3	Meloxicam	22,571	-2,184	4,544117059
EPR3	Diclofenaco	21,935	-0,158	1,115739322
EPR3	Control	21,7	5,427	0,023243965
EPR4	Meloxicam	30,895	6,64	0,010026765
EPR4	Diclofenaco	30	8,407	0,002946055
EPR4	Control	21,2	4,927	0,032871931

## Anexo 2. Configuración placa ELISA competitiva.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blk	S1	S1	BC	BC	Ibuprofeno Dilución 3 (cox-1)	Ibuprofeno Dilución 3 (cox-1)	Celecoxib Dilución 3 (cox-1)	Celecoxib Dilución 3 (cox-1)	Diclofenaco Dilución 3 (cox-1)	Diclofenaco Dilución 3 (cox-1)	Bo-Diclofenaco
<b>B</b>	Blk	S2	S2	IA2 (cox-1)	IA3 (cox-1)	Ibuprofeno Dilución 2 (cox-2)	Ibuprofeno Dilución 2 (cox-2)	Celecoxib Dilución 2 (cox-2)	Celecoxib Dilución 2 (cox-2)	Diclofenaco Dilución 2 (cox-2)	Diclofenaco Dilución 2 (cox-2)	Bo-Diclofenaco
<b>C</b>	NSB	S3	S3	IA2 (cox-2)	IA3 (cox-2)	Ibuprofeno Dilución 3 (cox-2)	Ibuprofeno Dilución 3 (cox-2)	Celecoxib Dilución 3 (cox-2)	Celecoxib Dilución 3 (cox-2)	Diclofenaco Dilución 3 (cox-2)	Diclofenaco Dilución 3 (cox-2)	N/A
<b>D</b>	NSB	S4	S4	Acetaminofén Dilución 2 (cox-1)	Acetaminofén Dilución 2 (cox-1)	Etoricoxib Dilución 2 (cox-1)	Etoricoxib Dilución 2 (cox-1)	Meloxicam Dilución 2 (cox-1)	Meloxicam Dilución 2 (cox-1)	Bo-Acetaminofén	Bo-Acetaminofén	N/A
<b>E</b>	B0	S5	S5	Acetaminofén Dilución 3 (cox-1)	Acetaminofén Dilución 3 (cox-1)	Etoricoxib Dilución 3 (cox-1)	Etoricoxib Dilución 3 (cox-1)	Meloxicam Dilución 3 (cox-1)	Meloxicam Dilución 3 (cox-1)	Bo-Ibuprofeno	Bo-Ibuprofeno	N/A
<b>F</b>	B0	S6	S6	Acetaminofén Dilución 2 (cox-2)	Acetaminofén Dilución 2 (cox-2)	Etoricoxib Dilución 2 (cox-2)	Etoricoxib Dilución 2 (cox-2)	Meloxicam Dilución 2 (cox-2)	Meloxicam Dilución 2 (cox-2)	Bo-Etoricoxib	Bo-Etoricoxib	N/A
<b>G</b>	B0	S7	S7	Acetaminofén Dilución 3 (cox-2)	Acetaminofén Dilución 2 (cox-2)	Etoricoxib Dilución 3 (cox-2)	Etoricoxib Dilución 3 (cox-2)	Meloxicam Dilución 3 (cox-2)	Meloxicam Dilución 3 (cox-2)	Bo-Celecoxib	Bo-Celecoxib	N/A
<b>H</b>	TA	S8	S8	Ibuprofeno Dilución 2 (cox-1)	Ibuprofeno Dilución 2 (cox-1)	Celecoxib Dilución 2 (cox-1)	Celecoxib Dilución 2 (cox-1)	Diclofenaco Dilución 2 (cox-1)	Diclofenaco Dilución 2 (cox-1)	Bo-Meloxicam	Bo-Meloxicam	N/A

## Anexo 3. Volumen de reactivo por pozo de reacción en placa ELISA competitiva.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	N/A	50 uL Tubo 1 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 1 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL BC + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL BC + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-D + 50 uL trazador + 50 uL antiserum
<b>B</b>	N/A	50 uL Tubo 2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IA2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IA2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-D + 50 uL trazador + 50 uL antiserum
<b>C</b>	100 uL ELISA buffer + 50 uL trazador	50 uL Tubo 3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IA3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IA3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	N/A
<b>D</b>	100 uL ELISA buffer + 50 uL trazador	50 uL Tubo 4 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 4 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-A + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-A + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	N/A
<b>E</b>	50 uL ELISA buffer + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 5 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 5 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-I + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-I + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	N/A
<b>F</b>	50 uL ELISA buffer + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 6 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 6 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-E + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-E + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	N/A
<b>G</b>	50 uL ELISA buffer + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 7 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 7 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL AC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL EC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL MC3 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-C + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-C + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	N/A
<b>H</b>	N/A	50 uL Tubo 8 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL Tubo 8 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL IBC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL CC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL DC2 + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-M + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	50 uL soln Bo-M + 50 uL trazador + 50 uL antiserum	N/A