

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**PERFIL FARMACOLÓGICO DE KETOPROFENO Y MELOXICAM EN DOLOR
AGUDO EXPERIMENTAL**

Rodolfo Plass Larraín

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Hugo F. Miranda G.**

**TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Gianni Pinardi T.**

**Santiago – Chile
2005**

ÍNDICE

	Páginas
Introducción	4
Hipótesis	20
Objetivos	21
Materiales y métodos	22
Resultados	26
Discusión	39
Conclusiones	42
Resumen	43
Referencias bibliográficas	44

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, por su infinita paciencia, entrega y amor. Por su esfuerzo, en darme la posibilidad de estudiar y hacer de mi una mejor persona.
- A Exequiel Hermosilla, por todo su apoyo y cariño. Por ser como un segundo padre para mí.
- Al departamento de Farmacología en especial a los doctores Hugo Miranda y Gianni Pinardi, por haber sido no sólo destacables profesores guías, sino también por ser excelentes personas.
- A mi polola Constanza Gonzalez y familia, por el cariño incondicional hacia mí y por ser un gran apoyo durante este año.
- A los Cabros; Claudio Sotomayor, David Stevens, Jorge O`Brien, Pablo Galvez, Rodolfo Ortega, Nicolás Daneri, Vicente Stevens, José Miguel Bernucci, por todos los lindos momentos vividos en su compañía y por haber estado ahí cada vez que los necesité.
- A mis profesores de la escuela dental, por su entrega y apoyo durante toda la carrera.
- A todo el personal de la escuela dental, en especial a Patricio Sepúlveda, por su amistad y cariño entregado en todos estos años.

INTRODUCCIÓN Y ASPECTOS TEÓRICOS

El dolor, como elemento estructural de las entidades mórbidas en el ser humano, está considerado, en la gran mayoría de los casos, entre los síntomas más importantes que integran la estructura general de lo que consideramos como una enfermedad (1). Por esto, el estudio del dolor se ha convertido en el campo de la investigación neurológica de más rápido desarrollo, lo cual ha tenido profundas implicancias clínicas en el tratamiento de los pacientes que sufren este síntoma (2).

El principal obstáculo en cualquier discusión sobre el dolor animal es establecer una definición aceptable. Esta dificultad radica en que el dolor mismo es un análisis subjetivo de la actividad del sistema nervioso central (SNC) y, como tal, involucra la relación entre el SNC y la mente.

El dolor ha sido definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial” (1).

Por otra parte, muchas personas refieren dolor en ausencia de daño tisular o causa fisiopatológica conocida; sin embargo, esta experiencia es aceptada como dolor, ya que no existe forma de distinguirla de aquella debido a un daño tisular efectivo (3). Sabemos que es esto y algo más. Su esencia se imbrica en el psiquismo en forma imperceptible y directa. El dolor es tolerable o intolerable según el estado anímico temporal del individuo; la alegría lo mitiga y la angustia lo exacerba (1).

De muchas formas, el dolor trasciende el intento de definirlo, y es mejor considerado como una experiencia que involucra una sensación fisiológica y emocional o, como en el caso de los animales, reacciones conductuales (4).

No existe razón para concederle una mente a los seres humanos y negársela a los animales. Además, no hay razón para suponer que en la evolución la percepción del dolor aparece como un fenómeno totalmente nuevo en los seres humanos. Estudios comparativos anatómicos, fisiológicos y de conducta realizados en seres humanos y animales han revelado muchas más similitudes que diferencias en el mecanismo neurológico del dolor.

En los animales, el dolor ha sido definido como una experiencia sensorial y emocional, la cual produce reacciones motoras protectoras, que resultan en evasiones aprendidas, y que pueden modificar rasgos conductuales especie-específicos, incluyendo el comportamiento social. Debe hacerse énfasis en el hecho de que el dolor es una percepción, un fenómeno de la mente, y que de esta forma no tiene dimensiones físicas (5).

Se han realizado grandes avances en este último tiempo, debido a un mayor conocimiento de la acción de los fármacos analgésicos y de sus coadyuvantes, al igual que un mejor entendimiento de las vías comprometidas en la conducción del estímulo doloroso (1).

Se puede actuar a distintos niveles del sistema nervioso central, para producir un efecto analgésico. Así por ejemplo, a nivel periférico, actúan un grupo de fármacos de estructuras químicas diferentes, pero que tienen acciones farmacológicas en común, los analgésicos anti-inflamatorios no-esteroidales (AINEs). Estas drogas, son considerados analgésicos débiles, compartiendo también propiedades anti-inflamatorias y antipiréticas. La génesis de su analgesia, se produciría principalmente por la inhibición de síntesis de las prostaglandinas tanto a nivel periférico como centralmente. También se puede obtener analgesia, bloqueando la transmisión del impulso nervioso, a través de los anestésicos locales, o, en forma irreversible, utilizando alcoholes y fenoles.

Por último, se puede actuar directamente a nivel central, mediante los opioides, de los cuales la morfina es el prototipo (1).

Los modelos experimentales de inflamación son herramientas valiosas e indispensables para entender, entre otras cosas, la complejidad de la participación de diferentes mediadores en la respuesta inflamatoria in vivo. Como ya se ha descrito, el NO (óxido nítrico) puede actuar como mediador del componente vasodilatador de la inflamación, así como tener un papel relevante en la extravasación de macromoléculas iniciada por diversos estímulos inflamatorios.

Hoy en día se sabe que los fármacos esteroideos con actividad anti-inflamatoria inhiben la síntesis de la NOS (óxido nítrico sintasa) (6) (7).

Otras drogas anti-inflamatorias también inhibirían la inducción de la NOS, incluyendo las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs) (8).

Los recursos farmacológicos se han perfeccionado y son de gran importancia en el tratamiento del dolor, pero si se carece de una visión total del espectro de posibilidades, tanto farmacológicas como no farmacológicas para combatir un cuadro doloroso, es fácil caer en una mecanización o rutina de prescripción de fármacos, que no siempre cumple con su objetivo final (1).

ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINEs)

Los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) también suelen ser denominados como analgésicos débiles, analgésicos periféricos o analgésicos no esteroideos. Comprenden un vasto grupo de fármacos que pertenecen a diferentes estructuras químicas funcionales, pero que tienen la particularidad de poseer ciertas acciones farmacológicas en común, entre las

que destacan sus propiedades anti-inflamatorias, sus efectos analgésicos y antipiréticos. Como consecuencia de este mecanismo de acción común, también comparten algunas reacciones adversas a medicamentos (RAM) por inhibir en menor o mayor grado a la ciclooxigenasas (COXs), enzimas que inician la cascada de transformación del ácido araquidónico para la formación de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (1).

Por lo general son fácilmente absorbidos desde el tracto gastrointestinal superior. La clásica distribución de los AINEs es extracelular, y al ser ácidos débiles, tienden a penetrar el medioambiente ácido de los tejidos dañados e inflamados. Como grupo, los AINEs tienen la característica de unirse en una alta proporción (90%) a proteínas plasmáticas, además si la afinidad por proteínas es particularmente grande para una droga, la farmacocinética de eliminación se ve prolongada. El metabolismo de los AINEs generalmente es hepático y mediado por el sistema de oxidación, siendo también comunes las reacciones de conjugación, existiendo diferencias entre AINEs para las distintas especies. La excreción es principalmente renal vía filtración glomerular y secreción tubular, pero también es posible la eliminación biliar de conjugados. La velocidad de excreción renal es dependiente del pH, y la secreción tubular puede ser inhibida competitivamente por otros ácidos débiles (9).

EFFECTOS TERAPÉUTICOS Y COLATERALES DE LOS AINES.

1) Efectos terapéuticos.

Todos los anti-inflamatorios no esteroideos son además antipiréticos y analgésicos, pero existen diferencias importantes en sus actividades. No se conocen en detalle las causas de tales diferencias, pero tal vez sea importante la sensibilidad diferencial de las enzimas COXs en los medios hísticos. Sus

efectos máximos son mucho menores, que los opioides, pero no originan las manifestaciones indeseables de ellos en el sistema nervioso central, que incluyen la depresión respiratoria y aparición de dependencia física.

Como antipiréticos, los AINEs aminoran la temperatura corporal en estados febriles; todos los productos de este tipo son antipiréticos y analgésicos, pero algunos no son idóneos en el empleo sistemático o duradero dada su toxicidad. El control de la temperatura del cuerpo se lleva a cabo en el hipotálamo, el cual actúa como termostato del organismo y conserva una temperatura constante en el cuerpo al mantener un equilibrio entre la producción y la pérdida de calor. Durante la fiebre, el termostato se ajusta más alto. En los estados patológicos, ciertas sustancias llamadas pirógenos que se derivan y liberan de los leucocitos estimulan la síntesis de prostaglandinas en el cerebro. A su vez la acción de las prostaglandinas en el hipotálamo equivale a reajustar el termostato a un nivel más alto. De manera similar a la descrita para un efecto analgésico, los salicilatos inhiben la síntesis de prostaglandinas y evitan el efecto pirético (10).

La aplicación clínica principal de estos compuestos es como analgésicos y anti-inflamatorios en el tratamiento de trastornos músculo-esqueléticos como la artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. En términos generales, los AINEs brindan únicamente alivio sintomático del dolor y de la inflamación que acompañan a las enfermedades y no detienen la evolución de la lesión patológica de tejidos durante episodios graves (11).

2) Efectos colaterales de los AINEs.

Además de compartir muchas actividades terapéuticas, los AINEs tienen en común algunos efectos adversos indeseables. El más frecuente es la propensión de éstos a inducir úlceras gástricas o intestinales, que a veces se

acompañan de anemia por la pérdida hemática resultante. El daño en el estómago que generan dichos fármacos puede surgir de dos mecanismos diferentes; La irritación local de las sustancias ingeridas permite la difusión retrógrada de ácido al interior de la mucosa gástrica y la inducción de daño tisular, pero la administración parenteral puede ocasionar también daño y hemorragia, en relación con la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas en el estómago y, en particular, PGI₂ y PGE₂ que actúan como agentes citoprotectores de la mucosa estomacal. Los eicosanoides ya mencionados inhiben la secreción ácida del estómago, intensifican la corriente sanguínea por la mucosa y estimulan la secreción de moco citoprotector en el intestino; al suprimirse su síntesis, el estómago se torna mas sensible a sufrir daños.

Otros efectos colaterales de estos productos, que dependen del bloqueo de la síntesis de prostaglandinas endógenas, incluyen perturbaciones de la función plaquetaria, prolongación de la gestación o del trabajo de parto espontáneo, y cambios en la función renal (11)

CLASIFICACIÓN QUÍMICA DE AINES

Comprenden varios grupos, que suelen agruparse de la siguiente manera:

Derivados del ácido salicílico

Aspirina, salicilato de sodio.

Derivados del para-aminofenol.

Acetaminofén

Indol y ácidos indenacéticos

Indometacina, sulindac.

Ácidos heteroarilacéticos

Diclofenac, ketorolac.

Ácidos arilpropiónicos

Ibuprofeno, ketoprofeno.

Ácidos antralínicos (fenamatos)

Ácido mefenámico.

Ácidos enólicos

Meloxicam, piroxicam.

Alcanonas

Nabumetona.

Coxib

Parecoxib, lumiracoxib

Ketoprofeno

Los derivados del ácido arilpropiónico constituyen un grupo de anti-inflamatorios no esteroideos útiles y eficaces; pueden tener ventajas notables con respecto a la aspirina e indometacina en muchos enfermos, por que suelen

ser mejor tolerados. Los estudios en seres humanos señalan que los derivados del ácido propiónico son similares a la aspirina para tratar signos y síntomas de artritis reumatoide y osteoartritis. Son inhibidores eficaces de las COXs aunque se advierte notable variación en su potencial al respecto. Todos los compuestos de este grupo modifican la función plaquetaria y prolongan el tiempo de sangrado. Todos son anti-inflamatorios eficaces en varios modelos de inflamación en animales de experimentación; todos poseen propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas en seres humanos, y pueden causar efectos adversos en vías gastrointestinales de seres humanos, aunque suelen ser menores que con el uso de aspirina. El ketoprofeno comparte las propiedades farmacológicas de otros derivados del ácido propiónico, es un AINE derivado de éste, relacionado con el diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y el ácido tiaprofénico. Inhibe la actividad de las enzimas COXs para provocar una disminución de la formación de precursores de las prostaglandinas y de los tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Los efectos analgésicos pueden implicar bloqueo de la generación del impulso doloroso mediante una acción periférica por inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Está indicado en artritis reumatoídea; osteoartritis; dolor leve a moderado; dismenorrea; inflamación no reumática (11).

Meloxicam

Es uno de los derivados del oxicam, una clase de ácidos enólicos con propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas. El meloxicam es un anti-inflamatorio no osteroidal con intensa acción anti-inflamatoria, puede ser mejor tolerado que el ácido acetilsalicílico o la indometacina. Tienen una vida media larga que permite administrar una o dos dosis al día. Es un AINE con

acción analgésica y antipirética. Indicado en el tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide, periartritis de hombro y cadera, espondilitis anquilosante, esguinces, distensiones musculares y ataques agudos de gota. Útil en la analgesia y tratamiento de la inflamación secundaria a traumatismos. En procesos inflamatorios de las vías respiratorias como amigdalitis, faringitis, faringoamigdalitis, sinusitis, otitis. Su mecanismo de acción se debe a su capacidad para evitar la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición selectiva de la COX-2, enzima mediadora del proceso inflamatorio en el sitio de lesión. El meloxicam inhibe la síntesis de prostaglandinas con una potencia mayor en el sitio de la inflamación y no sobre la mucosa gástrica o en los riñones. Esta ventaja se debe a su mecanismo de acción específico consistente en la inhibición selectiva de la COX-2 en relación con la COX-1 cuyos productos expresados en forma constitutiva son citoprotectores para el riñón y en particular para la mucosa gástrica, por lo que se puede reducir la inflamación sin mostrar los efectos adversos en riñones ni en vías gastrointestinales (11).

Mecanismo de acción de AINES

Los principales efectos analgésicos de los AINES son consecuencia de su propiedad de inhibir la producción prostaglandínica. La primera enzima en la vía sintética de prostaglandina es la prostaglandina de endoperóxido sintetasa o ciclooxigenasa de ácidos grasos; esa enzima transforma el ácido araquidónico en productos intermediarios inestables, PGG₂ y PGH₂. Se sabe ahora que hay dos formas de la ciclooxigenasa llamadas ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). La primera es una isoforma constitutiva que aparece en vasos sanguíneos, estómago y riñones, en tanto que la segunda se presenta en situaciones de inflamación por citocinas y mediadores inflamatorios (11).

Los AINEs inhiben a las isoenzimas COX-1 y COX-2, que son pieza clave en la síntesis de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico.

El metabolismo de fosfolípidos de la membrana celular genera ácido araquidónico, que en contacto con las ciclooxigenasas (COXs), da origen a endoperóxidos cíclicos que rápidamente se convierten en prostaglandinas y tromboxano (12).

El ácido acetilsalicílico y los anti-inflamatorios no esteroideos inhiben a las COXs y por tanto, la producción de prostaglandinas, pero no suprimen las vías de la lipooxigenasa ni la formación de leucotrienos.

En la estructura de COX-1, la aspirina acetila la serina 530, de modo que impide que se ligue al ácido araquidónico al sitio activo de la enzima y, de ese modo, la posibilidad de que esta última elabore prostaglandinas. En el caso de la COX-2, la aspirina acetila una serina homóloga en posición 516. La modificación covalente COX-2 por parte de la aspirina también bloquea la actividad ciclooxigenasa de dicha isoforma.

La mayor parte de los AINEs son ácidos orgánicos y, a diferencia del ácido acetilsalicílico constituyen inhibidores competitivos reversibles de la actividad de la ciclooxigenasa.

Los AINEs de mayor uso inhiben con diferente selectividad las isoformas de COX-1 y COX-2, de acuerdo al siguiente esquema, tomado de una publicación reciente de Warner y Mitchell (13). Fig. 1.

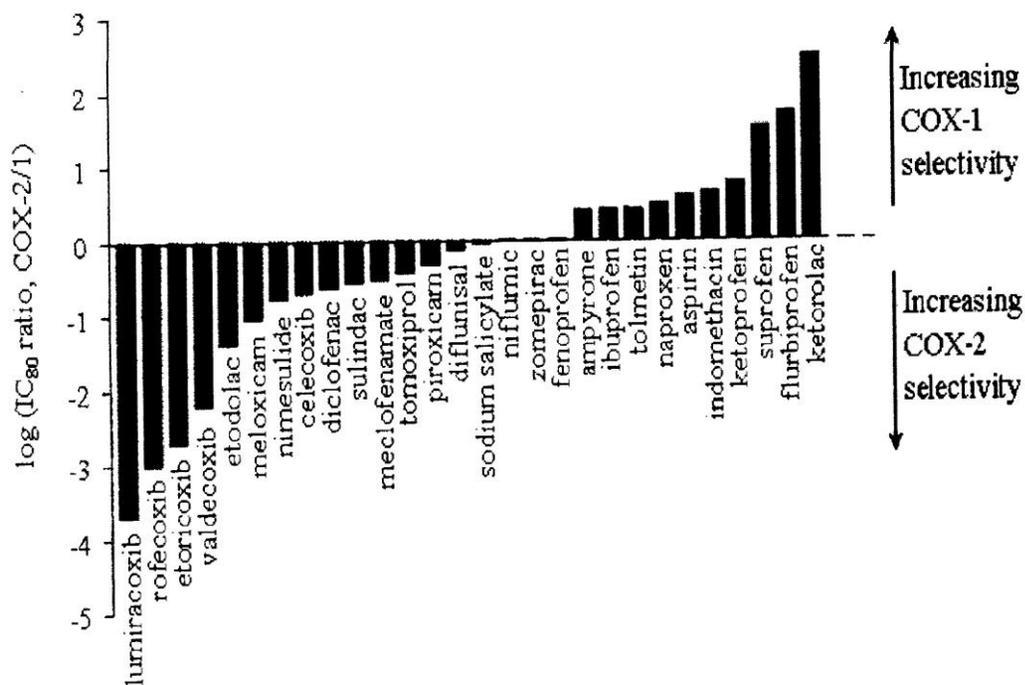


Fig. 1. Esquema de selectividad COX-1 y COX-2 para los AINEs de mayor uso.

Se ha demostrado la participación de diferentes sistemas (adrenérgicos, colinérgico, serotoninérgicos, opioides, etc) en la actividad analgésica de los AINEs (14) (15).

ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que tiene diferentes funciones, para mantener la homeostasis orgánica. Así, se ha relacionado en las funciones de mensajero intracelular en el SNC, en el daño neuronal, en la mantención de las funciones inmunes, en la disfunción endotelial, en la percepción del dolor, etc (16). El NO es sintetizado a partir de L-arginina por acción de varias enzimas denominadas NO sintasas: inducible: iNOS, endotelial: eNOS y neuronal: nNOS (17).

Las funciones del NO podrían ejercerse a varios niveles:

1. Inicialmente, por su capacidad de producir vasodilatación, alteración de la permeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas (18) (19).
2. En una fase más tardía o crónica de la inflamación, la señal inflamatoria puede magnificarse mediante la producción de moléculas como el factor transcripcional NF- κ B, el factor de necrosis tumoral (FNT) y el interferón (IFN); estos, promoverían la transcripción de la iNOS, generándose grandes cantidades de NO, mayor vasodilatación y edema; este NO puede sufrir procesos de transformación a productos altamente reactivos capaces de inducir daño por diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes, el daño de la doble hélice del DNA, con la consecuente la muerte celular (19)(20). La administración sistémica del L-NAME o del L-NMMA (inhibidores no selectivos de la NOS) reduce las fases tempranas y tardías del edema (21).

El óxido nítrico (NO) ha sido implicado en varios niveles de la vía neuronal; nociceptiva, periférica y central. Funcionalmente, la mayoría de los

reflejos nociceptivos envuelven la interacción de NO y el receptor NMDA, y se ha establecido que la síntesis de NO incrementa la facilitación del transporte espinal de la vía aferente a la corteza y la manifestación subsecuente de la respuesta del comportamiento. Sin embargo el rol del NO cambia acorde con el estímulo doloroso. La inhibición del NO tiene efectos antinociceptivos cuando el dolor proviene de la estimulación química de un nervio periférico y en modelos de termo-hiperalgésia o dolores viscerales, mientras que la administración intratecal de L-arginina induce alodinia convirtiendo el estímulo mecánico no nocivo a nocivo. En contraste, el bloqueo de la síntesis de NO exacerba el dolor en modelos de hiperalgésia mecánica. El uso de bloqueadores de la nNOS en ratones no ha sido clarificada debido a resultados contradictorios; por ejemplo, estos animales exhiben una sensibilización normal a algunos tipos de daño no modificados por inhibidores de la NOS. La implicancia de NO en el efecto antinociceptivo de las drogas es también controversial. Por ejemplo, los inhibidores del sistema NO/guanilato ciclasa potencia la acción antinociceptiva de la morfina mientras que atenúa los efectos antinociceptivos de la beta-endorfina. Además, existe evidencia que sugiere la variante nNOS-2 de la nNOS, modula la analgésia de la morfina pero no la tolerancia (16).

Existe evidencia de que el efecto nociceptivo del rofecoxib, otro inhibidor selectivo de la COX-2, está involucrado en la activación de la vía del NO/CMPc. Además, estudios recientes sugieren que el diclofenaco induce antinocicepción periférica a través de la activación de la vía del NO/CMPc. Al igual que el diclofenaco, otros AINEs estimulan la vía del NO/CMPc en la periferia.

Después de un daño agudo, el estímulo repetitivo de la fibra C evoca un estado de facilitación espinal. Entre los receptores que median este fenómeno están el N-Metil-D-aspartato (NMDA) y la sustancia P. La activación de estos

receptores incrementan las concentraciones de Ca^{2+} intracelular que activan la NOS así como también la COX-2 (22).

Recientemente, el efecto antinociceptivo de ciertos AINEs, como dipirona, diclofenaco y ketorolaco y algunos inhibidores selectivos de la COX-2, como rofecoxib, está reportado que está involucrado en la activación de la vía de la L-arginina/NO/CMPc además de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (23).

El éster metílico de la nitro-L-arginina (L-NAME) inhibidor no selectivo de las NOS, ha sido utilizado en dilucidar el rol del NO en las funciones de algunos los AINEs (16) (22). Hoy en día se sabe que los fármacos esteroideos con actividad anti-inflamatoria inhiben la síntesis de la iNOS (11) (12). Otras drogas anti-inflamatorias también inhibirían la inducción de la iNOS, incluyendo las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs) (13), o los productos nuevos que demuestran efectos anti-inflamatorios en modelos experimentales, tales como los derivados de chalcona, capaces de inhibir la síntesis de novo de la iNOS (24) o un derivado nuevo del ditriazine, también capaz de inhibir la inducción de la COX (25).

L-NAME

La inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) puede realizarse mediante sustancias análogas a la L-Arginina como son N^G -metil-L-arginina (L-NMA), N^G -nitro-L-arginina (L-NNA) y N^G -nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) que inhiben a las tres isoenzimas con diferente intensidad (26). En ratones, la inyección de formalina en la extremidad produce un comportamiento de lamido en dos fases, lo cual indica nocicepción (27). Es generalmente aceptado que la inyección de

L-NAME intraperitoneal (i.p) no ejerce una gran influencia en la fase temprana provocada por la formalina, aunque la fase tardía puede ser inhibida por un pre-tratamiento con L-NAME en ratones y ratas (28) (29) (30).

OPIOIDES

La existencia de diversos receptores: μ , δ , y κ ha sido establecida desde hace tiempo, tanto en lo que se refiere a agonistas como antagonistas. Las funciones relacionadas con la activación de ellos ha sido sujeto de extensas revisiones. Las respuestas relacionadas con los receptores opioides, radican principalmente en los del subtipo μ (31). Entre los antagonistas de este subtipo se encuentra la naltrexona. Los cambios en la estructura química de un opioide pueden convertir al fármaco, que era primordialmente un agonista, en otro con acciones antagonistas sobre uno o más tipos de receptores opioides. La sustitución más frecuente es la de la mitad de mayor tamaño (p. ej., un grupo alilo o un grupo metilciclopropilo) por un grupo N-metilo que es típico de los agonistas de los opioides μ . Estas sustituciones transforman a la morfina en nalorfina, levorfanol o levalorfán, y a la oximorfona en naloxona o naltrexona. En algunos casos se producen congéneres que son antagonistas competitivos a nivel de los receptores μ , pero que tienen también acciones agonistas a nivel de los receptores κ . Otros congéneres, en especial naloxona y naltrexona, parecen carecer de acciones agonistas y probablemente interactúen con todos los tipos de receptores de opioides, aunque con afinidades muy diversas.

La naltrexona parece también un antagonista relativamente puro, pero con mayor eficacia por vía oral y acción de mayor duración. En dosis altas, tanto naloxona como naltrexona muestran ciertos efectos agonistas especiales

(7). La naltrexona es similar a la naloxona en su actividad antagonista. Se utiliza principalmente para ayudar a individuos con dependencia al opio, a permanecer sin la droga. La naltrexona bloquea la euforia y la dependencia física producida por los opioides y puede reducir el deseo de los pacientes por dicha droga (9).

En este estudio se usaron dos fármacos antagonistas: uno de receptores opioides: naltrexona y otro sobre las NOS: L-NAME, con la finalidad de comprobar el posible efecto que podrían tener sobre la actividad analgésica de meloxicam y ketorprofeno.

HIPÓTESIS

La administración de meloxicam y/o ketoprofeno produce actividad analgésica y anti-inflamatoria en el ensayo agudo experimental de la formalina en ratones.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la actividad antinociceptiva de meloxicam y de ketoprofeno en el ensayo algesiométrico experimental de la formalina y estudiar la participación del sistema opioide y de la vía NO-GMP cíclico en dicha actividad.

Objetivos específicos:

- 1- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración intraperitoneal o sistémica de meloxicam y de ketoprofeno en el test de la formalina.
- 2- Caracterizar la naturaleza de la potencia analgésica de meloxicam y de ketoprofeno.
- 3- Caracterizar la naturaleza de la potencia anti-inflamatoria de meloxicam y de ketoprofeno.
- 4- Estudiar la participación del sistema opioide en la actividad de meloxicam y de ketoprofeno, en el mismo modelo algesiométrico.
- 5- Evaluar el componente de la vía NO-GMP cíclico en la actividad de meloxicam y de ketoprofeno en el test de la formalina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron 180 ratones de la cepa CF/1 (*Mus musculus*) tanto machos como hembras, de 28 a 30 gramos de peso, los que fueron aclimatados el ambiente del laboratorio al menos dos horas antes de la experimentación. La cual se realizó de acuerdo a un protocolo aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina: cada animal recibirá solamente una dosis de las drogas, las observaciones fueron efectuadas en forma randomizada, ciega y controladas con salino. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después del experimento mediante dislocación cervical.

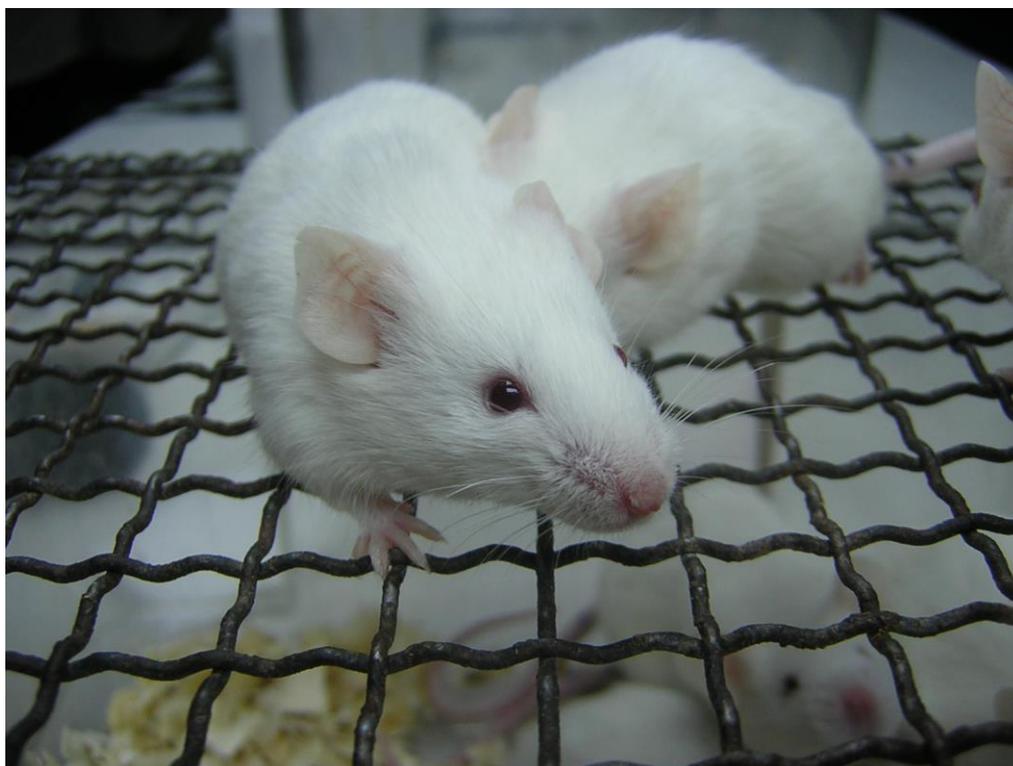


Fig. 2: Ratón de la cepa CF/1 (*Mus musculus*)

La evaluación de la actividad antinociceptiva se efectuó por el método de la formalina. Para ello se realizó una inyección intradérmica de 20 μ L de una solución de formalina al 5 % en la superficie dorsal de la extremidad posterior izquierda. Los ratones se colocaron en un cilindro especialmente diseñado para la observación y se registró el tiempo total que ellos se lamen la extremidad inyectada durante los 5 minutos inmediatos a la inyección, que corresponde a la fase analgésica. Luego se registró por 10 minutos, a partir de los 20 minutos de la inyección y hasta los 30 minutos, el tiempo total durante el cual los animales se lamen la extremidad inyectada y que corresponde a la fase anti-inflamatoria. No se contabiliza el tiempo entre la fase analgésica y la inflamatoria, debido a que el ratón se encuentra en un período de quietud o de no actividad.

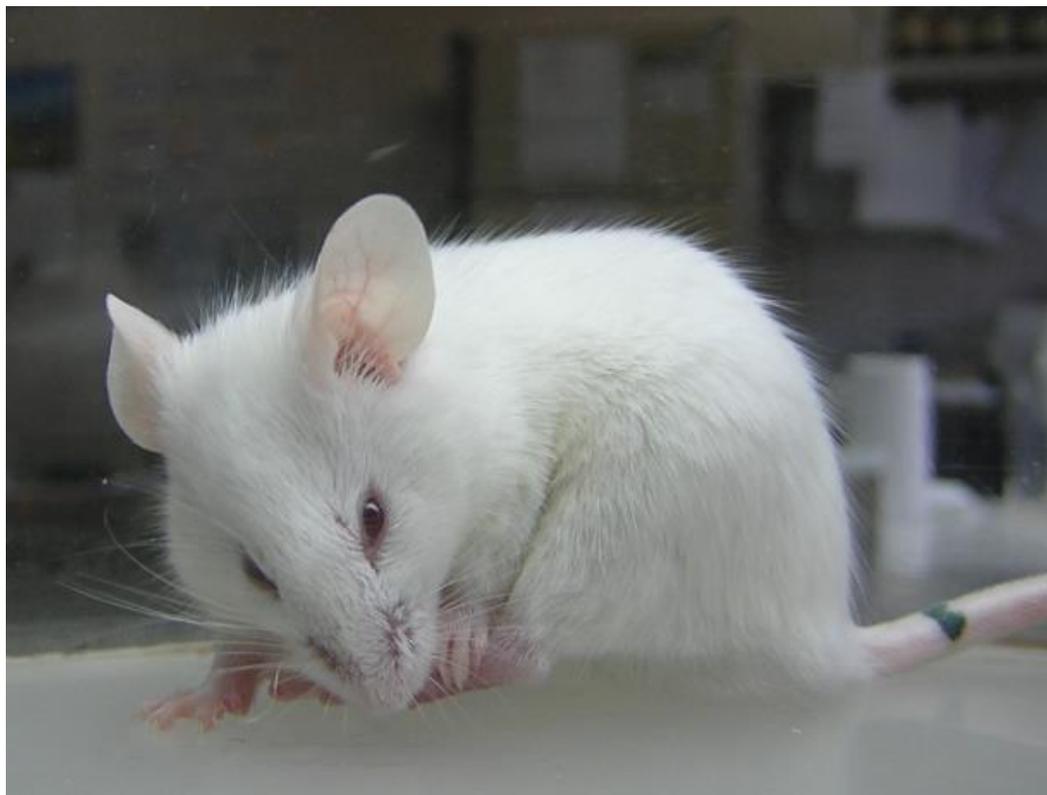


Fig. 3: Ratón lamiendo extremidad inyectada con formalina al 5%.

Los animales controles fueron inyectados intra-peritonealmente (i.p.) con solución salina al 0.9 % y la evaluación fue idéntica a la de los animales tratados. Estos se inyectaron, por vía i.p. con meloxicam (1 – 100 mg/kg) o con ketoprofeno (1- 100 mg/kg), 30 minutos antes de la administración de la formalina. Para estudiar la participación del sistema opioide o del nitridérgico, se administró, por la misma vía, naltrexona (1 mg/kg), un antagonista de receptores opioide mas potentes y de mayor duración que la naloxona, o bien L-Name (10 mg/kg), un inhibidor no selectivo de las enzimas nitrosintasas (NOS), 30 minutos antes de la inyección de meloxicam o de ketoprofeno.

Los fármacos se administraron por vía i.p. en un volumen de 10 ml/kg y el ensayo algesiométrico se realizó cuando se produjo el efecto máximo de cada droga, que fue determinado previamente.

Para la evaluación de las drogas, se comparó el efecto del fármaco antes y después de la administración de naltrexona o de L-Name y el análisis estadístico de los datos fueron procesados por ANOVA y pruebas t Student. La significancia se consideró a un nivel de 5 % ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Grupo tratado con solución salina:

El pre-tratamiento de los ratones con la administración de 10 mL/kg de solución salina fisiológica, vía i.p. 30 minutos antes de la inyección de formalina produjo en promedio 140 segundos de lamido en la primera fase (n=30) y 169 segundos de lamido en la segunda fase (n=36).

Grupo tratado con meloxicam:

La administración intra-peritoneal de meloxicam 30 minutos antes produce una disminución en el tiempo de lamido, de forma dosis dependiente. Al administrar 100 mg/Kg el tiempo de lamido disminuyó a 18 segundos en la Fase I y a 5 en la fase II. La administración de 30 mg/Kg el tiempo de lamido disminuyó a 72 en la fase I y a 71 segundos en la fase II. En el caso de usar 10 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 97 en la primera fase y 132 segundos en la segunda fase, respectivamente. Cuando se administró 3 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 125 en la primera fase y de 135 segundos en la segunda fase. Todos estos resultados se observan en la figura 4 y 5.

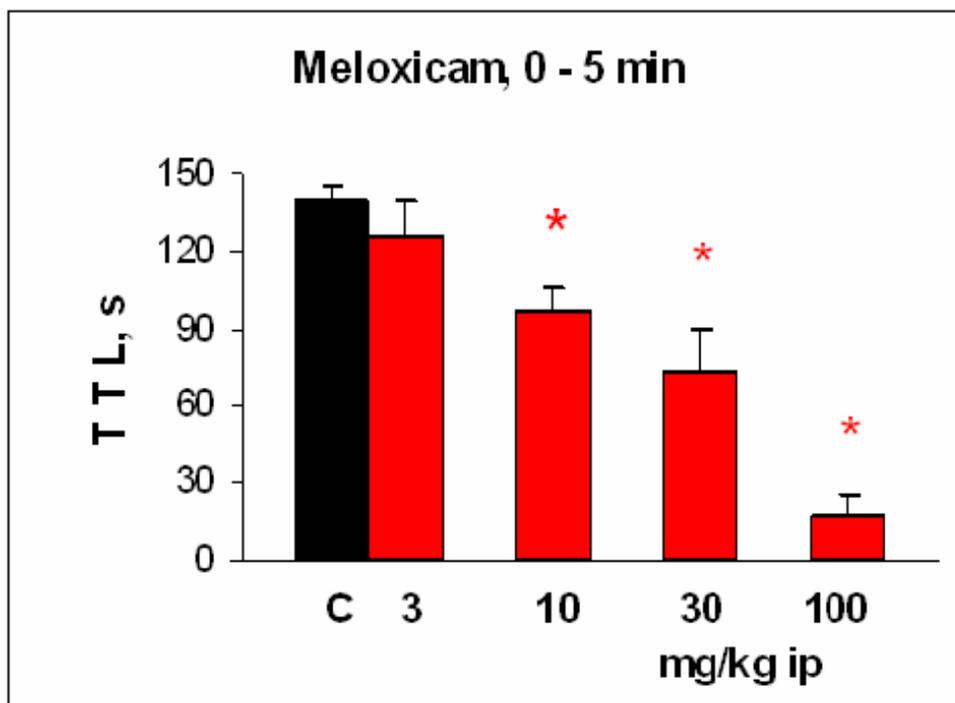


Fig.4: Histograma de la respuesta a meloxicam i.p. (■) en el test de la formalina en la fase I. TTL,s: tiempo total de lamido en segundos. * $p < 0,05$ versus control

(■).

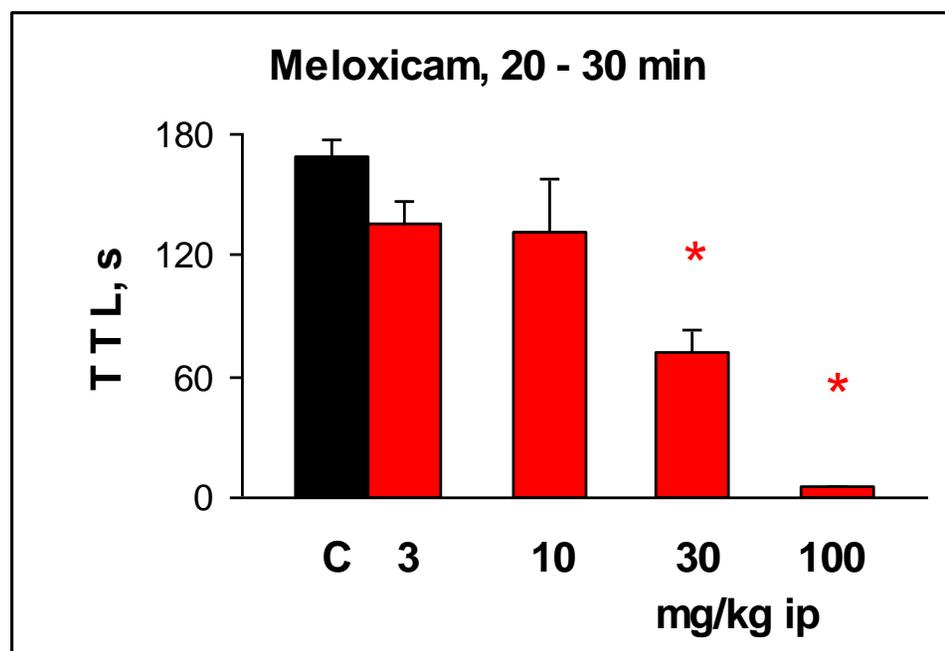


Fig. 5: Histograma de la respuesta a meloxicam (i.p.) (■) en distintas dosis en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.). * = significancia $p < 0,05$
C = Control (■).

Grupo tratado con naltrexona:

El pretratamiento de los animales con naltrexona (0.1mg/Kg), 30 minutos antes de la inyección de formalina, produjo en promedio 126 segundos de lamido en la primera fase (n=24) y 161 segundos en la segunda fase (n=20).

Grupo tratado con naltrexona y meloxicam:

El pretratamiento con naltrexona del meloxicam disminuye el tiempo de lamido, tanto en la fase I como en la fase II. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

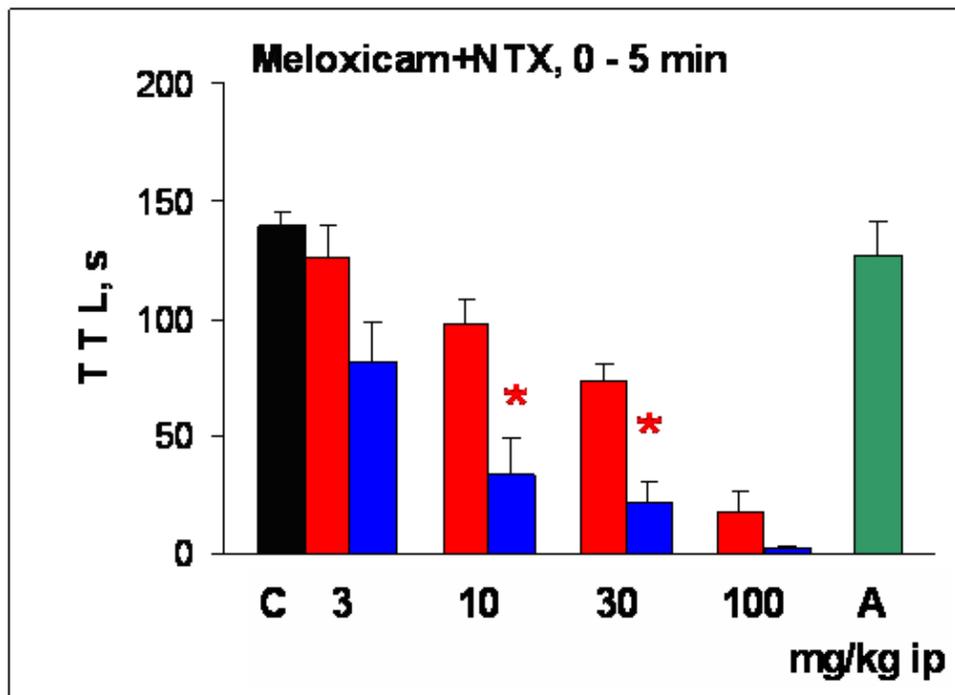


Fig. 6: Histograma de la respuesta a meloxicam (i.p.) (■) previa administración de 0.1 mg/kg de naltrexona (NTX) en el test de la formalina. Primera fase (0-5 min). * = significancia $p < 0,05$. C = control (■); A = NTX (■).

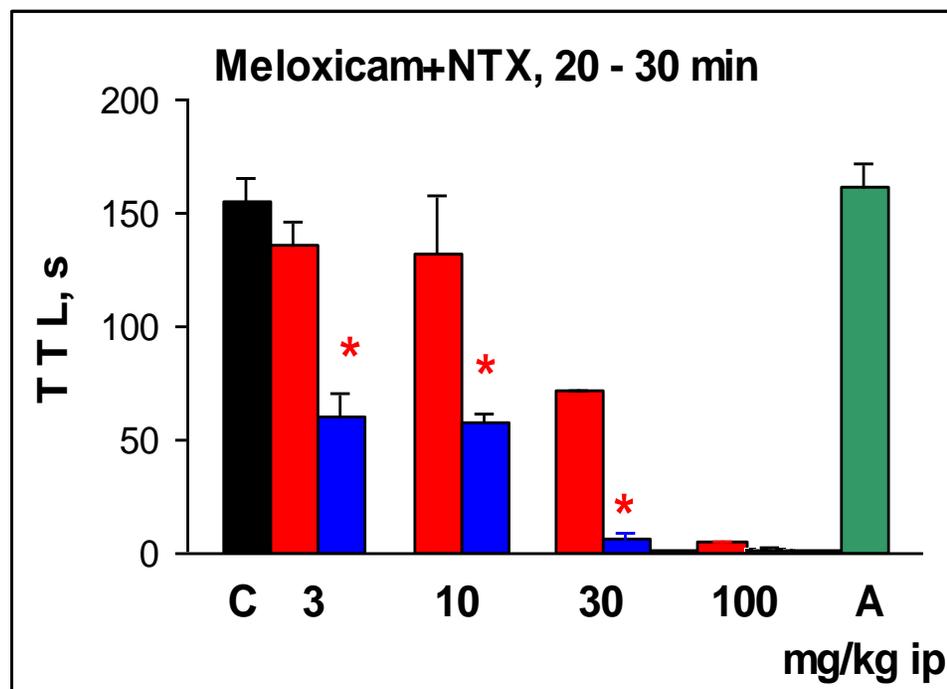


Fig. 7: Histograma de la respuesta a Meloxicam (i.p.) previa administración de NTX (0.1mg/Kg) (■) en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.) * = significancia $p < 0,05$ C = control (■) ; A = NTX (■).

Grupo tratado con L-NAME:

Al administrar L-NAME, 2.5 mg/Kg i. p, 30 minutos antes de la inyección de formalina no produjo cambios en el tiempo de lamido, ya que se obtuvo 129 segundos de lamido en la primera fase (n=24) y 145 segundos de lamido en la segunda fase (n=20).

Grupo tratado con meloxicam y L-NAME:

La administración de L-NAME antes de la administración de meloxicam no produjo una disminución significativa en el tiempo de lamido en ambas fases.

Grupo tratado con ketoprofeno:

La administración i.p. de ketoprofeno 30 minutos antes del test algesiométrico produce una disminución en el tiempo de lamido, dosis dependiente. Al administrar 100 mg/Kg el tiempo de lamido disminuyó a 29 segundos en la primera fase y a 18 en la segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 89 segundos en la primera fase y de 28 en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 110 en la primera fase y 127 segundos en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 128 en la primera fase y de 134 segundos en la segunda fase.

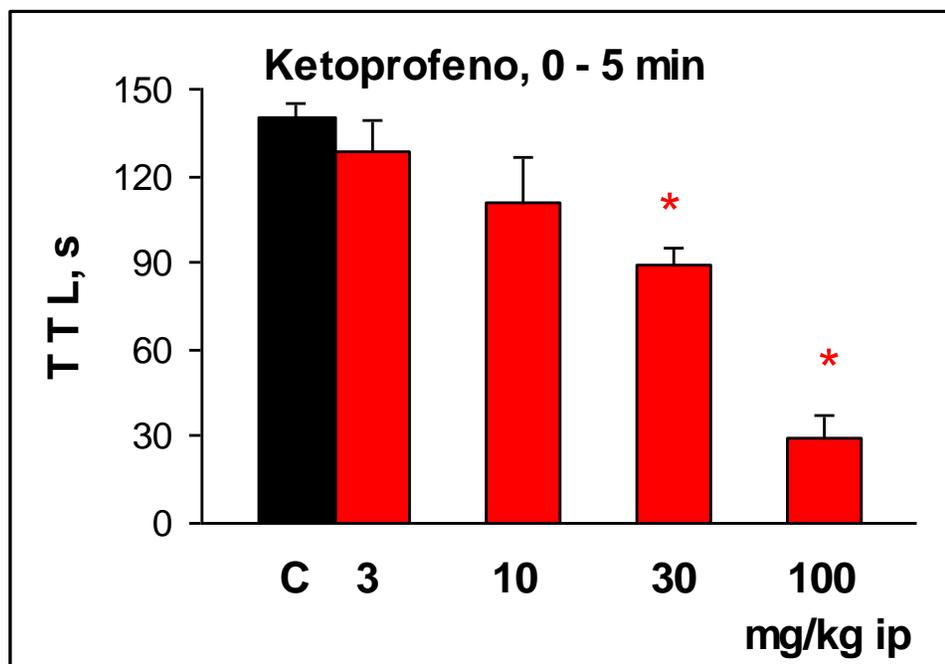


Fig. 8: Histograma de la respuesta a ketoprofeno (i.p.) (■) en distintas dosis en el test de la formalina. Primera fase (0-5min.) * = significancia $p < 0,05$. C = control (■).

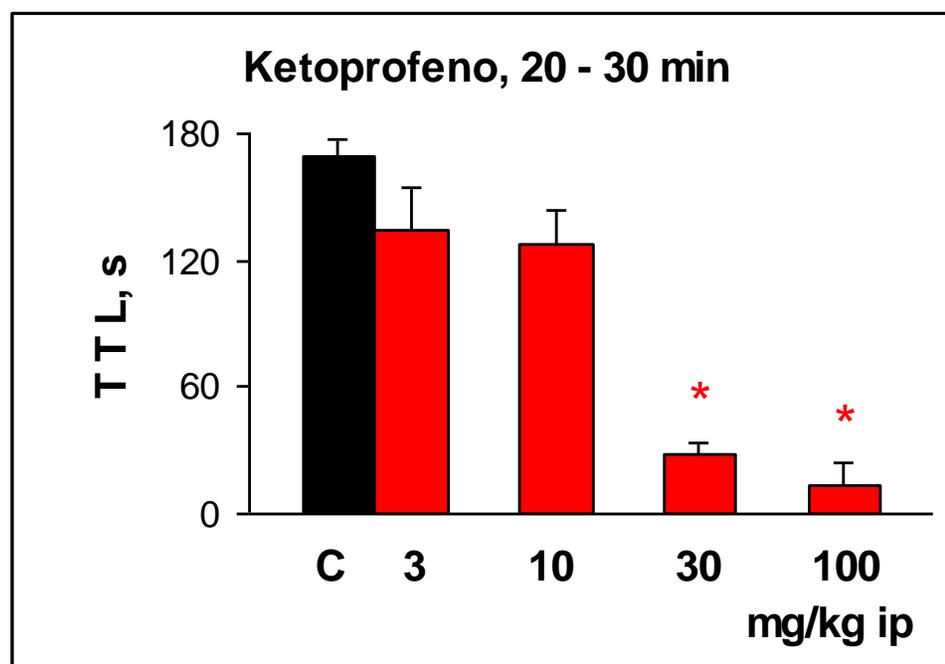


Fig. 9: Histograma de la respuesta a ketoprofeno (i.p.) (■) en distintas dosis en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.). * = significancia $p < 0,05$; C = control (■).

Grupo tratado con naltrexona y ketoprofeno:

Al administrar 0.1mg/Kg de naltrexona 30 minutos antes de la administración de ketoprofeno 100 mg/Kg no produjo un cambio significativo en el tiempo de lamido en la primera fase, pero aumentó a 140 segundos en la segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg de ketoprofeno no produjo un cambio significativo en el tiempo de lamido en la primera fase, sin embargo en la segunda fase el tiempo de lamido aumentó a 145 segundos. Al administrar 10 mg/Kg de ketoprofeno el tiempo de lamido no experimentó cambios significativos. Al administrar 3 mg/Kg no hubo cambios significativos en el tiempo de lamido.

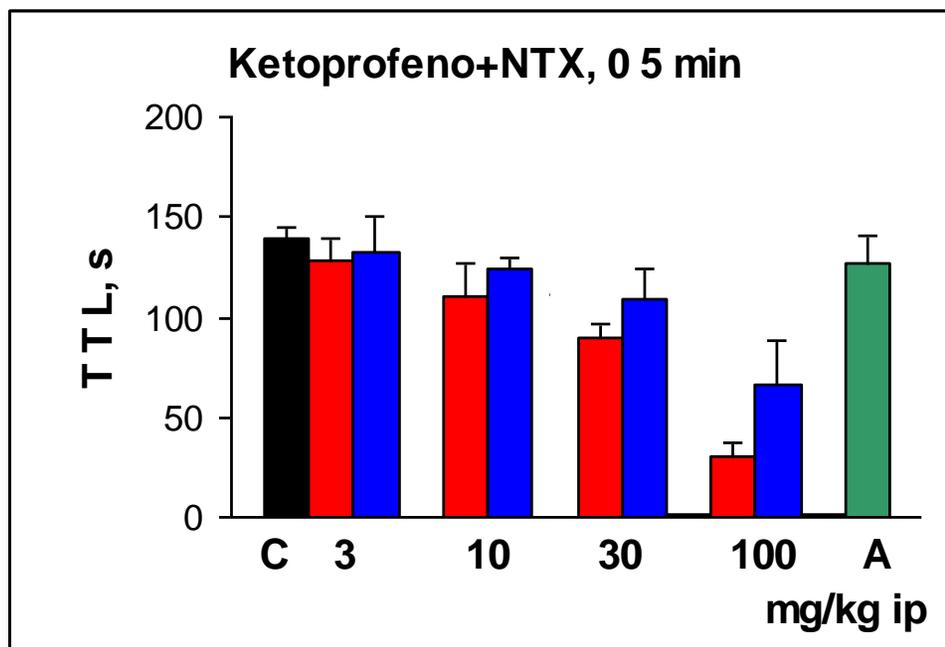


Fig.10: Histograma de la respuesta a ketoprofeno (i.p.) previa administración de NTX (1mg/Kg) (■) en el test de la formalina. Primera fase (0-5 min.) * = significancia $p < 0,05$; C = Control (■); A = NTX (■).

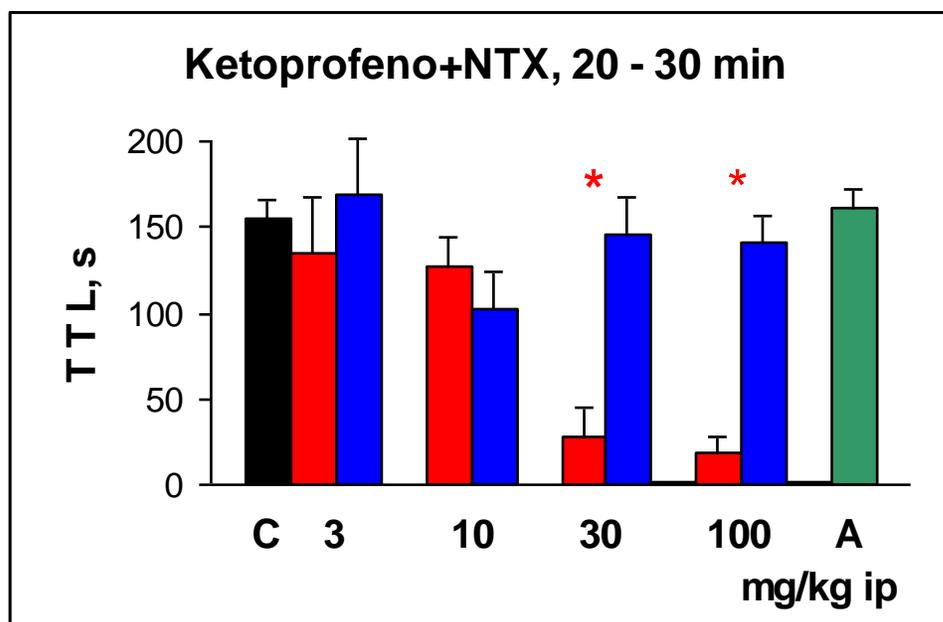


Fig. 11: Histograma de la respuesta a ketoprofeno (i.p.) previa administración de NTX (1mg/Kg) (■) en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.) * = significancia $p < 0,05$; C = Control (■); A = NTX (■).

Grupo tratado con ketoprofeno y L-NAME:

La administración de L-NAME 30 minutos antes de la administración de ketoprofeno no produjo cambios significativos en el tiempo de lamido en la primera y segunda fase, en ninguna de las dosis de ketoprofeno administradas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la administración de meloxicam y ketoprofeno, por vía i.p., producen una actividad antinociceptiva dosis dependiente, en el test de la formalina, tanto en la primera como en la segunda fase. La potencia relativa de meloxicam resultó ser mayor que la del ketoprofeno tanto en la fase I como en la fase II. Este hallazgo sugiere que el meloxicam es mejor analgésico y anti-inflamatorio que el ketoprofeno. Este hallazgo podría radicar en la diferente selectividad inhibitoria de COX-1 y COX-2 que poseen los AINEs, ya que meloxicam tiene mayor selectividad por COX-2 que ketoprofeno y éste tiene mayor capacidad inhibitoria de COX-1 que de COX-2 (32) (33). El pretratamiento con 0.1 mg/kg de naltrexona, no indujo actividad antinociceptiva en la primera o en la segunda fase del ensayo de la formalina. Sin embargo, es capaz de inducir un incremento parcial en la actividad antinociceptiva del meloxicam a las dosis de 10 y 30 mg/kg en la fase I y en la dosis de 3, 10 y 30 mg/kg en la fase II. Para el caso del ketoprofeno, no se obtuvo modificación en su potencia analgésica, en la primera fase, sin embargo hubo un antagonismo significativo en su potencia antinociceptiva a las dosis de 30 y 100 mg/kg. Estos resultados, permiten sugerir la participación del sistema opioide, tanto en la fase solamente analgésica como en la fase analgésica post-inflamatoria del ensayo de la formalina.

El efecto desarrollado por naltrexona podría ser explicado por la capacidad de ella de unirse con distinta afinidad a los diferentes tipos de receptores opioides, induciendo un bloqueo de los sistemas autoinhibitorios presinápticos de la liberación de opioides endógenos, que se manifiesta en un aumento en la liberación de ellos, que conducen por un efecto modulador, a

una mejor respuesta analgésica del AINE (34). Sin embargo este efecto modulador de la naltrexona en la actividad antinociceptiva de los AINEs, parece ser dependiente de la capacidad inhibitoria de las COXs, ya que es significativamente mayor en los inhibidores de COX-2 (meloxicam) que en los inhibidores de COX-1 (ketoprofeno). Por otra parte, el antagonismo inducido frente a la actividad analgésica de ketoprofeno, sugiere que este AINEs podría usar como mediador la liberación de opioides endógenos para su efecto antinociceptivo, en forma dual o diferida, ya que se obtiene solo cuando se utilizan dosis altas.

Para evaluar el rol del de la vía NO-GMPc, se utilizó L-NAME, el que administrado por via i.p. no produce efecto alguno en este ensayo algesiométrico. La falta de efecto del L-NAME, confirma la controversia de que el NO es capaz de producir analgesia e hiperalgesia en los procesos nociceptivos (35) Por otra parte, el pretratamiento con L-NAME no modificó significativamente el efecto de meloxicam y ketoprofeno, ya sea en la primera fase o en la segunda fase del test de la formalina. El efecto del L-NAME, no parece estar relacionado con la selectividad de los AINEs en su efecto inhibitorio de las COXs (33) ya que los efectos analgésicos e anti-inflamatorios de meloxicam (COX-2) y ketoprofeno (COX-1) no fueron modificados.

Estos resultados, no concuerdan con la información de la literatura, que señala que el L-NAME inhibe, la síntesis o la liberación, tanto de NO como de glutamato, que normalmente son liberados por la administración de formalina (36). Además se ha sugerido que, en el sistema nervioso, el NO puede aumentar la actividad neuronal espinal frente a inflamación pero la deprime frente a un estímulo doloroso (37). Esta diferencia podría estar dada por una regulación diferenciada en las fibras aferentes o que debido a que el NO podría

actuar como un mensajero molecular diferenciado en las distintas neuronas, dependiendo del carácter excitatorio o inhibitorio en una vía nociceptiva dada. Si actúa sobre neuronas excitatorias el efecto resultante será hiperalgesia, en tanto que si el NO induce activación de neuronas inhibitorias el efecto resultante será hipoalgesia.

En conclusión, la actividad antinociceptiva de meloxicam y ketoprofeno, en el ensayo algesiométrico de la formalina, es dependiente de la dosis y parcialmente modulada por la actividad de los sistemas opioides y el sistema nitridérgicos, parece no tener mayor contribución o implicancia en dicha actividad.

CONCLUSIONES

- Meloxicam y ketoprofeno producen antinocicepción dosis-dependiente al ser administrados por vía i.p. en el test de la formalina.
- Meloxicam posee mayor potencia analgésica que ketoprofeno, lo que se debe probablemente, a su selectividad por COX-2.
- Naltrexona administrada i.p. no posee efecto antinociceptivo per se en el ensayo de la formalina
- Existe una participación del sistema opioide tanto en la actividad analgésica de meloxicam como de ketoprofeno.
- L-NAME administrado i.p. no posee efecto antinociceptivo per se en el test de la formalina
- La actividad antinociceptiva de los AINEs no parece ser modulada por el sistema nitridérgico.

RESUMEN

En el presente trabajo, se investigó la actividad analgésica o antinociceptiva, de dos AINEs, con distinta selectividad inhibitoria de las ciclooxigenasas: meloxicam y ketoprofeno, en un ensayo que mide dolor e inflamación: modelo de la formalina. Se usaron 180 ratones, machos y hembras, con un peso aproximado de 30 g. Los animales fueron inyectados en la superficie dorsal de la extremidad posterior izquierda con 20 μ L de solución de formalina al 5 % y se midió el tiempo que se lamieron la extremidad, durante los 30 minutos consecutivos a la inyección (fase I: 5 minutos posteriores a la inyección; fase II: 20 a 30 minutos finales). La participación de los sistemas opioide y NO/GMPc, en la acción desarrollada por meloxicam y ketoprofeno, se evaluó con el pretratamiento de los animales con naltrexona y L-NAME, respectivamente. Los resultados demuestran que tanto en la fase I como en la fase II, el meloxicam es más potente en su actividad analgésica y anti-inflamatoria que el ketoprofeno. En la acción antinociceptiva de meloxicam la participación del sistema opioide y del NO/GMPc es de mayor contribución que el caso del ketoprofeno. Los resultados obtenidos, podrían explicarse porque naltrexona, que aún cuando carece de actividad analgésica en el modelo de la formalina por si solo, modula en forma más importante el analgésico cuyo mecanismo de acción se debe a su efecto inhibitorio de COX2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paeile, C., Saavedra, H., "El dolor, aspectos básicos y clínicos". Editorial Mediterráneo, Santiago, Chile 1990. 12-103.
2. Bernucci J., "Anatomía y fisiología del dolor". Rev. Sanidad Def. Nac. 11 (2): 17-120.
3. Dagnino, J., "Definiciones y clasificación del dolor". Boletín Esc. De Medicina, P. Universidad Católica de Chile. 1994; 23: 148-151.
4. Lamont L, Tranquilli W, et al., "Physiology of Pain". Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 2000; 30; 4: 703-723.
5. Ralph L., "Problems in Defining and Periferal Mechanism of Pain". JAVMA 1987; 191; 10; 1195-99.
6. Di Rosa M, Radomski M, et al., "Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages". Biochem Biophys Res Commun. 1990; 15; 172: 1246-52.
7. McCartney-Francis NL, et al., "Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease". Immunol. 2001; 15; 166: 2734-40.
8. Cirino G, Wheeler-Jones CP, et al., "Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by novel nonsteroidal anti-inflammatory derivatives with gastrointestinal-sparing properties". Br J Pharmacol. 1996 ;117:1421
9. Jenkins W., Pharmacologic aspects of analgesic drugs in animals: An overview. JAVMA, 1987; 191; N° 10: 1231-40.
10. Ciancio S., "Farmacología clínica para odontólogos" Manual Moderno, 1990, 95.
11. Hardman J, et al., "Las bases farmacológicas de la terapéutica". McGraW-Hill interamericana Editores, SA. 1996; 1: 586-587, 662-666.

12. Euchenhofer C., Mainhofer C., et al., "Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and diclofenac on formaline induced nociception in the rat". *Neurosci. Lett.* 1998; 248: 25-28.
13. Warner TD, Mitchell JA., "Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors and lessons from the clinic". *Faseb J.* 2004; 18: 790-804.)
14. Fürst S., "Transmitters involved in antinociception in the spinal cord". *Brain Res Bull.* 1999 Jan 15; 48:129-41.
15. Miranda T J, PInardi G, et al., *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 1591-1597
16. Esplugues JV., "NO as a signalling molecule in the nervous system". *Br J Pharmacol.* 2002 Mar; 135: 1079-95.
17. Mollace V, Muscoli C, et al., "Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors". *Pharmacol Rev.* 2005 ;57:217-52)
18. Whittle BJ., "Nitric oxide in physiology and pathology". *Histochem J.* 1995; 27: 727-37.
19. Szabo C, Dawson VL, "Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion". *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19: 287-98.
20. Ridger VC, Greenacre SA, et al., "Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat". *Br J Pharmacol.* 1997; 122: 1083-8.
21. Salvemini D, Wang ZQ., "Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation". *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 829-38.
22. Lozano-Cuenca J, Castaneda-Hernandez G, et al., "Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib". *Eur J Pharmacol.* 2005; 18; 513: 81-91.

23. Ventura-Martinez R, Deciga-Campos M, et al., "Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat". *Eur J Pharmacol.* 2004; 25; 503: 43-8.
24. Herencia F, Ferrandiz ML, et al., "Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages". *FEBS Lett.* 1999; 18; 453: 129-34.
25. Rioja I, Terencio MC, et al., "A new ditriazine inhibitor of NF-kappaB modulates chronic inflammation and angiogenesis". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002; 365: 357-64.
26. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S., "Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target". *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 191-220.
27. Shibata M, Ohkubo T., "Modified formalin test: characteristic biphasic pain response". *Pain.* 1989; 38: 347-52.
28. Moore PK, Handy RL., "Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase--is no NOS really good NOS for the nervous system". *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18: 204-11.
29. Sakurada T, Sugiyama A., "Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse". *Neurochem Int.* 1996; 29: 271-8.
30. Malmberg AB, Yaksh TL., "Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction". *Anesthesiology.* 1993; 79: 270-81.
31. Bodnar RJ, Klein GE., "Endogenous opiates and behavior". *Peptides* 2005; 26: 2629-2711.

32. Snyder M, Shugars DA, White RP, Phillips C. "Pain medication as an indicator of interference with lifestyle and oral function during recovery after third molar surgery". *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63: 1130-7.
33. T.D. Warner, J.A. Mitchell., "Cyclooxygenases: new form, new inhibitors, and lesson from the clinics". *Faseb J.*, 2004; 18: 790-804.
34. Gourlay GK., "Advances in opioid pharmacology". *Support Care Cancer* 2005 13: 153-159.
35. Prado W, Schiavon V., "Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats". *European Journal of Pharmacology.* 2002; 441: 57-65.
36. Watanabe C, Okuda K., "Evidence that nitric oxide-glutamate cascade modulates spinal antinociceptive effect of morphine: a behavioural and microdialysis study in rats". *Brain Res.* 2003; 14; 990: 77-86.
37. Luo ZD, Chaplan SR., "Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development". *J Neurosci.* 1999; 19: 9201-8.