



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE NEUROFARMACOLOGIA

MODULACION OPIOIDE DE LA ANALGESIA OROFACIAL
INDUCIDA POR KETOPROFENO

Cristian Dávalos Correa

TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL
TITULO DE CIRUJANO DENTISTA
UNIVERSIDAD DE CHILE

TUTOR PRINCIPAL Prof.

Dr. Hugo Miranda G.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Gianni Pinardi T.

Prof. Dr. Fernando Sierralta G

SANTIAGO – CHILE

2008



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE NEUROFARMACOLOGIA

SANTIAGO – CHILE

MODULACION OPIOIDE DE LA ANALGESIA OROFACIAL
INDUCIDA POR KETOPROFENO

Cristian Dávalos Correa

TRABAJO DE INVESTIGACION

REQUISITO PARA OPTAR AL

TITULO DE CIRUJANO DENTISTA

UNIVERSIDAD DE CHILE

TUTOR PRINCIPAL Prof.

Dr. Hugo Miranda G.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Gianni Pinardi T.

Prof. Dr. Fernando Sierralta G

SANTIAGO – CHILE

2008

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padre, que son el pilar más importante de mi vida.

Agradecimientos

Doy gracias al Doctor Hugo Miranda, fundamental para el desarrollo de esta tesis, por su apoyo, comprensión, paciencia, consejos y amistad.

También quiero agradecer al personal de Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en especial a José López, y a Alejandro Correa, por su valor humano y colaboración en este trabajo.

INDICE

	PAGINA
I.- INTRODUCCION.....	7-10
II.- MARCO TEORICO.....	11-23
III.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	24-25
IV.- MATERIAL Y METODOS.....	26-30
V.- RESULTADOS.....	31-35
VI.- DISCUSION.....	36-38
VII- CONCLUSION.....	39
VIII.- SUGERENCIAS.....	40
IX.- RESUMEN.....	41
X.- BILIOGRAFIA.....	42-44

INTRODUCCION

En los últimos años, el estudio sobre el dolor se ha convertido en un campo de investigación de rápido desarrollo, lo cual ha permitido ayudar en el tratamiento de pacientes que sufren de este mal. Es considerado en la gran mayoría de los casos entre los síntomas más importantes de una enfermedad. Su importancia se va configurando a partir de un saber intuitivo, producto de la experiencia sensorial que la gran mayoría de los seres humanos vamos acumulando momento a momento (1).

Dentro del gran numero de definiciones una de las mas aceptadas es la de la IASP (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor) que define al dolor como una “experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular actual o potencial “. A lo largo de las últimas décadas se han logrado avances significativos en la comprensión de los mecanismos del dolor y su tratamiento. El dolor constituye una señal de alarma para intentar proteger al organismo. Esto desencadena una serie de reacciones con la finalidad de disminuir la causa, y así limitar las consecuencias de la agresión. Dichos mensajes nociceptivos son transmitidos, modulados e integrados en diferentes niveles del sistema nervioso, los cuales, iniciados en la periferia, serán conducidos hacia el asta dorsal de la médula y de ahí a diversas estructuras hasta llegar a centros superiores como el tálamo y la corteza (2).

En las últimas décadas se ha acumulado evidencia sobre la existencia de un sistema de analgesia endógeno originado en el tronco encefálico, capaz de controlar mediante vías descendentes la transmisión del dolor en las astas dorsales de la médula espinal. Al respecto, se ha demostrado que la estimulación del cerebro medio en la sustancia gris periacueductal, rafe magno pontomedular y el núcleo reticular magnocelular produce una potente analgesia, donde los receptores opioides y sus ligandos (encefalinas y endorfinas) fueron identificados como los responsables. Estos descubrimientos han soportado 20 años de progreso en el campo del entendimiento del dolor y de los sistemas de analgesia, con la consecuente innovación en la terapia del dolor (2).

Actualmente hay gran cantidad de evidencias de que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) producen algunas de sus acciones analgésicas en el SNC. Esto se hace evidente ya desde sus reacciones adversas centrales observadas en su uso clínico, además de existir evidencia directa para este componente central en la analgesia de los AINEs. Los AINEs pueden influir indirectamente en la función neuronal alterando la hemodinámica neuronal. Los AINEs tienen un efecto inhibitorio en la síntesis central de prostaglandinas que podría ser relevante también en esta analgesia central. Además puede ser necesaria una neurotransmisión serotoninérgica y catecolaminérgica intacta para la antinocicepción mediada por AINEs.

Otros estudios indican la acción de opioides centrales en la antinocicepción mediada por AINEs. Se puede concluir que existen tres sistemas principales involucrados en el efecto antinociceptivo central de los AINEs:

- Sistema serotoninérgico
- Sistema de opioides endógenos
- Sistema óxido nítrico, por separado o en combinación (3,4).

Existen reportes clínicos donde se reconocen los selectivos y poderosos efectos analgésicos de la administración neuroaxial de opioides. Además de los opioides, drogas de otras clases farmacológicas también producen analgesia espinal tales como drogas alfa adrenérgicas, serotoninérgicas, colinérgicas, agonistas del receptor GABA y antagonistas del receptor NMDA, sin embargo estas drogas también cuentan con efectos colaterales. Para esto, una alternativa a la terapia con fármacos aislados es el uso de múltiples drogas de diferentes clases farmacológicas en forma concomitante. De esta forma la dosis de cada droga puede ser limitada para disminuir los efectos colaterales, mientras que el efecto deseado se mantiene o se mejora. Estos resultados sugieren que la coadministración de drogas produce efectos antinociceptivos mediante distintos mecanismos, lo cual

viene a presentarse como una efectiva estrategia para mejorar el manejo del dolor en una gran variedad de escenarios (5).

La investigación en el área de los receptores opioides y de los agonistas y antagonistas de los receptores de opioides es un proceso activo. El empleo de opioides y sus receptores constituye la piedra angular de varias técnicas en anestesia, control del dolor postoperatorio y en las clínicas de dolor por lo que la finalidad de este trabajo es ver la interacción de ellos con los AINEs.

MARCO TEORICO

Definición de Dolor

Se puede definir al dolor como uno de los síntomas más comunes que se presenta en una enfermedad, es una experiencia sensorial y emocional desagradable que experimenta la persona de una manera que es única para él, razón por la que el dolor es referido y vivido en cada paciente de manera diferente. El dolor es también un problema físico, psicológico y social, que puede afectar el desenvolvimiento y conducta normal de un individuo (6).

El dolor busca la preservación de la integridad del individuo, es un mecanismo de protección que aparece cada vez que hay una lesión presente o parcial en cualquier tejido del organismo, que es capaz de producir una reacción del sujeto para eliminar de manera oportuna el estímulo doloroso. Por estas razones instintivas, los estímulos de carácter doloroso son capaces de activar a todo el cerebro en su totalidad y poner en marcha potentes mecanismos que están encaminados a una reacción de huida, retraimiento, evitación y/o búsqueda de ayuda para aliviarlo (6).

Clasificación del Dolor

El dolor se puede clasificar en dos modalidades: dolor agudo (<6 meses) y dolor crónico (>6 meses). El dolor agudo se percibe de 0.1 segundos después del contacto con el estímulo doloroso; el impulso nervioso generado

viaja hacia el sistema nervioso central a través de fibras de una alta velocidad de conducción ($A\delta$). Dura segundos, minutos o incluso días; pero generalmente desaparece cuando la afección que lo origina llega a término. En la mayor parte de las ocasiones es producido por estimulación nociva, daño tisular o enfermedad aguda; el dolor agudo casi no se percibe en algún tejido profundo del organismo. (7)

El dolor crónico tarda 1 segundo o más en aparecer y aumenta lentamente su frecuencia e intensidad durante segundos, minutos o varios días, persiste más allá del tiempo razonable para la curación de una enfermedad aguda, por lo que se le asocia a un proceso patológico crónico que provoca dolor continuo; se relaciona con las estructuras profundas del cuerpo; no está bien localizado y es capaz de producir un sufrimiento continuo e insoportable. (7)

Otra forma de clasificar el dolor es de acuerdo a la presencia de dos vías para la conducción de los impulsos dolorosos (lenta y rápida), esta clasificación explica la observación fisiológica de la existencia de dos tipos de dolor. Un estímulo doloroso produce una sensación precisa y localizada seguida de una sensación sorda, difusa y desagradable. El dolor rápido se ha asociado con las fibras tipo $A\delta$ y el lento con las fibras C. (7)

Se han descrito tres tipos de receptores para el dolor:

a) Receptores en las terminaciones nerviosas libres o nociceptores: asociadas con fibras C no mielinizadas. Cuando se encuentran en estructuras profundas, como es el caso de la córnea, pulpa dentaria y periostio, son receptores unimodales respondiendo tan sólo al dolor.

b) Mecanorreceptores de umbral elevado: responden a presiones lesivas para los tejidos y transmiten a través de fibras $A\delta$ mielinizadas. Son responsables del dolor inicial agudo, punzante o primer dolor.

c) Receptores polimodales en la piel: responden a una serie de estímulos como calor, tacto superficial, acción de sustancia química, y dolor (8).Corresponden en su mayoría a fibras C y son responsables de la disestesia ardiente consecutiva o segundo dolor (9).

Las sustancias liberadas por los tejidos como respuesta al dolor serán las mismas que las que se liberan ante una alteración o daño tisular: desde los tejidos lesionados se liberaran iones de potasio (K^+) e hidrógeno (H^+), histamina, serotonina, prostaglandinas y leucotrienos. Desde la circulación sanguínea se liberan bradicinina y sustancia P desde las terminaciones nerviosas libres (10). El resultado de la liberación de estas sustancias será el inicio de impulsos nerviosos con el fin de disminuir (en condiciones

normales) el umbral de otras fibras nerviosas locales, y así evitar un incremento en la actividad primaria de las fibras nerviosas.

Las vías involucradas en la transmisión de los impulsos dolorosos comienzan en los nociceptores, que se encuentran en diferentes tejidos corporales como son piel, vísceras, vasos sanguíneos, músculo, fascias, cápsulas de tejido conectivo, periostio, hoz cerebral; los demás tejidos apenas cuentan con terminaciones nociceptivas (7, 11).

Estos receptores a su vez transmiten la información a través de fibras nerviosas que son clasificadas dependiendo de su diámetro y grado de mielinización en fibras A y C. Se ha calculado que cerca de 200 fibras tipo C por cm^2 . Fibras tipo A subdivididas en términos de velocidad de transmisión en A-alfa (α), A- beta (β), A - gamma (γ) y A- delta (δ). Solo los tipos A δ y C conducen los impulsos nociceptivos. Para poder transmitir la información nociceptiva los nociceptores poseen un alto umbral de estímulo y la capacidad para codificar la intensidad del estímulo en una frecuencia de impulsos. En la primera sinapsis del asta posterior y a todo lo largo del eje neural existe una alta modulación de la transmisión de los impulsos aferentes. Un nervio periférico tiene varios tipos de fibras, dentro de las cuales van incluidas las nociceptivas.

Los nociceptores son distinguidos de otras fibras nerviosas sensoriales con base en su morfología, velocidad de conducción y responsividad a estímulos mecánicos. Los nociceptores tienen terminaciones pobremente

diferenciadas, con umbrales altos sensibles al daño y conducen impulsos nerviosos a través de pequeñas fibras A δ (mielinizadas y rápidas) y fibras C (lentas y amielínicas). Los nociceptores polimodales responden a sustancias químicas, calor, estímulos mecánicos (fibras aferentes C) o a calor y estímulos mecánicos (aferentes A δ 2) (11). Las unidades mecanorreceptoras especiales (A δ 1 aferentes) son nociceptores que tienen lenta adaptación; de hecho, los receptores al dolor se adaptan muy poco o nada en lo absoluto. Además, las fibras aferentes A δ 1 responden a fuertes presiones; produce las primeras sensaciones dolorosas bien localizadas, asociadas con daño inmediato; en tanto que las fibras C conducen las sensaciones secundarias que son pobremente localizadas y persistentes (7).

Además, las fibras C (y termorreceptores) tienen receptores TRK-A sobre los cuales actúa el NGF. La activación de este tipo de receptor puede ser una causa de hiperalgesia, ya que induce aumento y desarrollo de neuronas autonómicas (12). Las fibras C también poseen receptores VR-1 (para capsaicina); el cual en su porción extracelular posee una fracción que detecta los protones, por ello, es sensible a pH bajo y posiblemente su activación se produce durante el daño tisular que origina una disminución del pH y la liberación de sustancias inflamatorias, produce daño tisular.

Todas estas particularidades y los neurotransmisores y mediadores liberados parecen ser los responsables de que los impulsos conducidos sean característicos de dolor.

Se cree que la causa más importante de dolor clínico es la inflamación, la cual da lugar a cambios químicos bien definidos que ocurren en el lugar donde ocurrió daño tisular y en los procesos de enfermedad. El pH bajo y una variedad de mensajeros llamados algógenos son los causantes del dolor, las sustancias son: citocinas, prostaglandinas, histamina, 5-hidroxitriptamina, péptidos, acetilcolina (13).

Los nociceptores cuando son activados por estímulos nocivos, liberan neuropéptidos en sus cuerpos celulares, es decir, en el cuerno dorsal (sustancia P, CGRP) que actúan en la periferia, pero también las células nociceptoras aferentes primarias estimulan a las neuronas simpáticas posganglionares para que liberen NE, ATP, etc (12).

Opioides

La capacidad de inducir analgesia por estimulación eléctrica de determinados núcleos del neuroeje, permitió el hallazgo de sustancias endógenas opioides: dos pentapéptidos, met-enkefalina y leu-enkefalina y un péptido de 31 aminoácidos denominado β -endorfina, los tres péptidos son capaces de ocupar selectivamente los receptores opioides, de inducir las acciones farmacológicas propias de la morfina y de ser antagonizados por el

antagonista naltrexona. Estos péptidos son denominados péptidos opioides por su capacidad de imitar a los fármacos opioides (14).

Tipos de receptores

Tanto los opioides endógenos como los fármacos opiáceos pueden interactuar con diversos tipos de receptores. Se diferencian 3 tipos básicos de receptores opioides: el MOR (μ) activado por la morfina, el KOR (κ) activado por la ketociclazocina, y el DOR (σ) activado por la N-alilnormetazocina. La aparición de los opioides endógenos met-enkefalina y leu-enkefalina indujo la descripción de otro receptor δ , por el cual estos péptidos mostraban mayor afinidad que por el receptor μ .

En cuanto a la selectividad de los antagonistas, la naltrexona se comporta como antagonista a nivel de todos los receptores, pero con afinidades diferentes; en general es mayor su afinidad por los receptores μ que por los receptores δ y κ . La técnica de autorradiografía demuestra que los diversos tipos de receptores se distribuyen de manera irregular por los núcleos y las áreas del SNC y por los tejidos periféricos (14).

Tratamiento del Dolor

En el tratamiento farmacológico del dolor son los opioides y los analgésicos antiinflamatorios no-esteroidales (AINEs) los fármacos de

primera elección, lo que suelen usarse con agentes coadyudantes como los antidepresivos, los antiepilépticos, los anestésicos locales, los cannabinoides, el alcohol, etc. (13-15).

De los fármacos antes citados, los AINEs son utilizados en diferentes tipos de dolor, tanto agudo como crónico, y en consecuencia de frecuente estudio en varias especialidades médicas y en especial en el campo odontológico, tanto en el período preoperatorio como postoperatorio, de diversos cuadros clínicos odontológicos agudos o inflamatorios.

Además de su eficacia analgésica comprobada, los AINEs poseen acción antiinflamatoria, antipiréticas, antiplaquetaria y se proyectan efectos beneficiosos en ciertos tipos de neoplasia y en la enfermedad de Alzheimer, sin embargo producen una serie de reacciones adversas que limitan su uso, o en algunos casos simplemente lo contraindican, entre las cuales se pueden mencionar: úlcera gástrica o duodenal, dispepsia, náuseas, vómitos, epigastalgias, constipación, diarrea, asma o antecedentes de haber sufrido angioedema (edema de la cara, ojos, labios, lengua o dificultad para respirar), broncospasmo, insuficiencia renal moderada a severa, insuficiencia hepática grave, trastornos de la coagulación de la sangre y pacientes bajo tratamiento con anticoagulantes. A nivel cutáneo prurito, exantema, urticaria, reacciones de hipersensibilidad. Además, se ha informado de cefaleas, palpitaciones, edema, vértigo, acúfenos, mareos, cefaleas, somnolencia. Se han descrito reacciones de hipersensibilidad

cruzada con otros antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina y producción de crisis asmáticas. Deben indicarse con precaución en sujetos con antecedentes de enfermedades gastrointestinales o que reciben anticoagulantes orales. Pueden modificar el funcionalismo hepático y renal deberá ponerse una atención especial en pacientes añosos, deshidratados, nefrópatas, cardíacos, cirróticos. Los antihipertensivos (diuréticos, calcio antagonistas, IECA, beta bloqueantes), pueden disminuir sus efectos por inhibición de las prostaglandinas vasodilatadoras; dispositivos intrauterinos (DIU), se ha informado que los antiinflamatorios pueden disminuir su eficacia (14-15).

Los AINEs producen sus efectos primariamente por bioinhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COXs). Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas que ocurren en el organismo siempre que sean termodinámicamente posible. Entre ellas se encuentran las COXs, de las cuales existen 3 isoenzimas: COX-1; COX-2 y COX-3. La COX-1 es una enzima constitutiva que se expresa en casi todos los tejidos, incluyendo el sistema nervioso central; y por lo tanto posee múltiples funciones, entre las cuales se pueden destacar la que protege la integridad de la mucosa del tracto gastrointestinal, la de mantener la función renal a nivel normal, etc. La COX-2 es una enzima inducible, pero es constitutiva en el sistema nervioso central, se induce por varias citoquinas, hormonas y mitógenos en el curso de la inflamación. La nueva isoenzima COX-3 se

encuentra en el sistema nervioso central, corazón, aorta y tractogastrointestinal, está relacionada con el dolor, la fiebre y la inflamación. En resumen estas 3 isoenzimas COXs contribuyen a mantener la homeostasis del organismo y le permiten producir prostaglandinas o prostanoides, a partir del ácido araquidónico. Las prostaglandinas son una familia de mediadores celulares, con efectos diversos. Intervienen en la respuesta inflamatoria con producción de vasodilatación, aumento de la permeabilidad de los tejidos permitiendo el paso de los leucocitos; son antiagregante plaquetario; estimulan las terminaciones nerviosas nociceptivas; contraen la musculatura lisa, esto es importante en el útero de la mujer, también intervienen en la regulación de la temperatura corporal, etc. (14, 16,17).

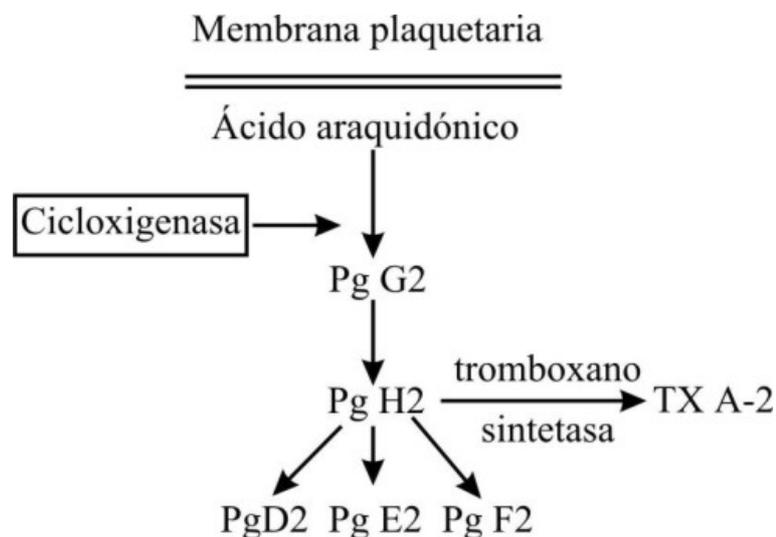


Figura 1. Mecanismo de acción de los AINEs.

Las prostaglandinas están directamente relacionadas con la patogénesis de la inflamación y del dolor, sin embargo, existen evidencias que el efecto analgésico es modulado por fármacos que interactúan con otros receptores, como por ejemplo agentes adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, nitridérgicos, etc. Así se ha demostrado que con el uso de antagonistas no selectivos y selectivos de diversos neurotransmisores (prazosin, yohimbina, atropina, tropisetron, L-nitroarginina, naltrexona, etc) se puede modificar los efectos analgésicos de los AINEs, ya sea aumentándolos o bien disminuyéndolos, por que alteran los factores que intervienen en el proceso nociceptivo, tanto a nivel de los receptores involucrados en él, o por modificación de la conductancia de ciertos iones: Na^+ , K^+ , Ca^{+2} o por interferir con la señal intracelular emergente de los mediadores celulares o bien por modificar el sistema de control del dolor inhibitorio descendente o por influir en la liberación de péptidos endógenos analgésicos o en la liberación de sustancias algógenas (14,18 -21).

El ketoprofeno es un analgésico antiinflamatorio no esterooidal racémico. Químicamente, está formado por partes iguales de 2 moléculas que tienen las mismas propiedades físicas y químicas, con la excepción de su interacción con la luz polarizada, siendo uno dextrógiro (S) - (+) y el otro levógiro (R) - (-). Suelen llamarse también moléculas quirales. Las moléculas que contienen un estereocentro son siempre quirales. La mezcla de enantiómeros en una solución se denomina mezcla racémica.

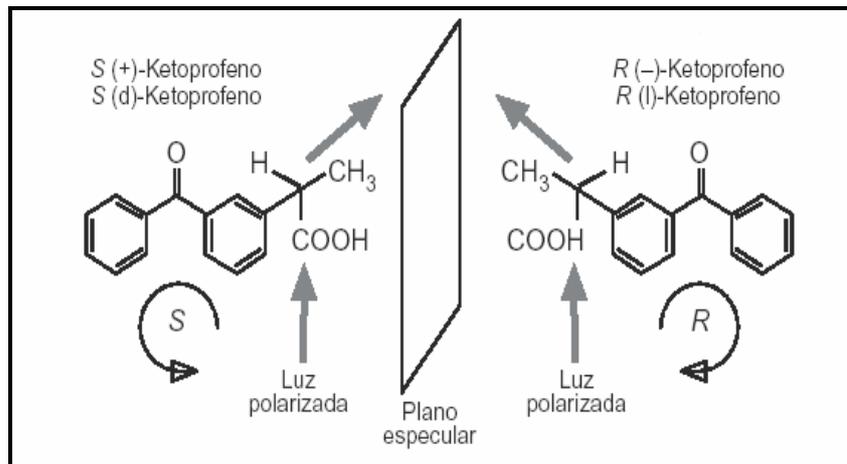


Figura 2. Nomenclatura de los enantiómeros del ketoprofeno en función de sus propiedades químicas y físicas.

El ketoprofeno, en su forma racémica es un AINE que ha sido clasificado como inhibidor preferencial de la COX-1 (22-25). Posee, por tanto, una excelente actividad analgésica y puede ser administrado por vía parenteral en procesos dolorosos agudos de moderado a severo (24-25). En este estudio se evaluará la modulación opioidérgica del efecto analgésico del ketoprofeno, usando el método algosiométrico agudo de la formalina orofacial y usando diversos antagonistas de los receptores opioides, como: naltrexona, naltrindole y norbinaltorfimina, bloqueadores de receptores MOR, DOR, y KOR, respectivamente (17, 26-28).

Los analgésicos opioides actúan estimulando receptores de tres tipos: mu (μ), kappa (κ) y delta (δ), los cuales se encuentran distribuidos en el sistema

nervioso central y periférico, especialmente en zonas relacionadas con la transmisión del dolor (27).

La naltrexona (NTX) es un antagonista no selectivo de los receptores opioides, derivado directo de la morfina, tiene mayor afinidad por el receptor μ , por lo tanto, revierte todos los efectos producidos por los fármacos opioides debido a la activación de receptores del subtipo μ . Se usa principalmente en el tratamiento por intoxicación inducida por los opioides y el alcohol. Su mayor eficacia se encuentra a nivel oral. Algunos estudios in vitro y en animales sugieren que la administración de bajas dosis de antagonistas opioides, como naltrexona, mejora el efecto analgésico de diferentes fármacos, lo que se debería a que la naltrexona sería capaz de bloquear los receptores con carácter excitatorio permitiendo una mejor respuesta analgésica y reduciendo los efectos secundarios (14).

Hipótesis

La administración intraperitoneal (i.p.) de ketoprofeno, produce actividad antinociceptiva, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial, que es modulada por el sistema opioidérgico.

Objetivo general

Estudiar la actividad antinociceptiva del ketoprofeno, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones.

Objetivos específicos

4.1.- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de ketoprofeno en el test orofacial.

4.2.- Estudiar el efecto modulador de naltrexona, naltrindole o nor-binaltorfimina en la analgesia inducida por ketoprofeno.

Material y métodos

Se usaron ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa CF/1 de 28 a 30 g de peso y habituados al ambiente del laboratorio al menos dos horas antes del experimento, de acuerdo al protocolo CBA N° 238 FMUCH aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina (cada animal recibe solamente una dosis de las drogas, las observaciones serán efectuadas en forma ciega, aleatoria y controladas con solución salina). Se deja constancia que, basándose en las normas éticas internacionales que rigen este tipo de experimentación, el número de animales utilizados será el mínimo estrictamente necesario, para un correcto análisis estadístico. Los animales se sacrificaron después del experimento mediante dislocación cervical, por personal experimentado.



Foto 1. Ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa CF/1

Test de la formalina

La evaluación de la actividad antinociceptiva se efectuó utilizando el test algesiométrico orofacial de la formalina que permite medir dolor originado en la estimulación del nervio trigémino, uno de los nervios de mayor inervación del territorio maxilofacial. Para ello se realizó una inyección subcutánea de 20 μ L de una solución de formalina al 5 % en el labio superior del animal. Ello induce un sostenido frotamiento de la zona inyectada y un vigoroso restregamiento de la cara en el área perinasal. Los ratones se colocaron en un cilindro diseñado para la observación y se registró por medio de un cronómetro digital el tiempo total que se frota el área perinasal durante los 5 minutos inmediatos a la inyección y que corresponde a la fase algésica aguda (fase I). Luego se registra 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 frota el labio comprometido y que corresponde a la fase inflamatoria y que mide el dolor crónico (fase II). No se contabilizó el tiempo entre la fase algésica y la inflamatoria, debido a que el ratón se encuentra en un período de quietud (29,30)



Foto 2.Frotamiento de zona comprometida



Foto 3.Administracion de ketoprofeno i.p.



Foto 4.Administración de formalina

Evaluación de la analgesia

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se construyeron las correspondientes curvas dosis-respuesta del AINE administrado por vía i.p. con un mínimo de 6 animales por cada uno, de al menos 4 dosis logarítmicas diferentes y crecientes. Los animales controles fueron inyectados con solución salina al 0.9 %.

Estudio de la modulación opioidérgica

Para estudiar el rol del sistema opioidérgico se pretrataron los animales con 1 mg/kg de naltrexona, naltrindole o norbinaltorfimina y se repitieron las curvas dosis respuesta de ketoprofeno.

Los fármacos se administraron i.p. en un volumen constante, de 10 mL/kg y el ensayo de la formalina se realizó al momento de obtenerse el efecto máximo de cada droga, el cual fue determinado previamente.

El análisis estadístico de los parámetros relativos a este estudio, se expresan como promedio \pm error estándar del promedio (EES) y el efecto de los antagonistas opioides en la actividad antinociceptiva del ketoprofeno en el ensayo orofacial de la formalina, se evaluó por el cambio de la DE50 antes y después del tratamiento con los antagonistas opioides, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de cambio} = \text{ED50 pretratamiento} / \text{ED50 postratamiento} \quad (31)$$

Los parámetros farmacológicos (promedios, error estándar, dosis efectivas, límites de confianza al 95 %) se evaluaron usando un programa computacional elaborado en el laboratorio, de acuerdo a Tallarida (32) y la significación estadística considerada a un nivel de 5 % por análisis de varianza y pruebas t de Student.

RESULTADOS

1.- Controles.

La inyección subcutánea de 20 μ L de una solución de formalina al 5 % en el labio superior del animal, en animales controles inyectados con suero fisiológico, 30 minutos antes de la administración de la formalina, produjo un tiempo de frotamiento, de 134 ± 4.7 (n = 20) segundos, durante la fase I y de 163 ± 4.4 (n= 20), segundos, durante la fase II.

2.- Animales tratados con ketoprofeno

La administración i.p. de ketoprofeno (0.01 – 100 mg/kg) indujo una respuesta antinociceptiva, de naturaleza dosis-dependiente, tanto en la fase I como en la fase II. A partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta, se dedujo las ED50, por regresión lineal por cuadrados mínimos. Para la fase I la ED50 fue de 0.22 ± 0.13 mg/kg y para la fase II resultó ser de 4.5 ± 0.8 mg/kg. Estos resultados se muestran en los graficos 1 y 2.

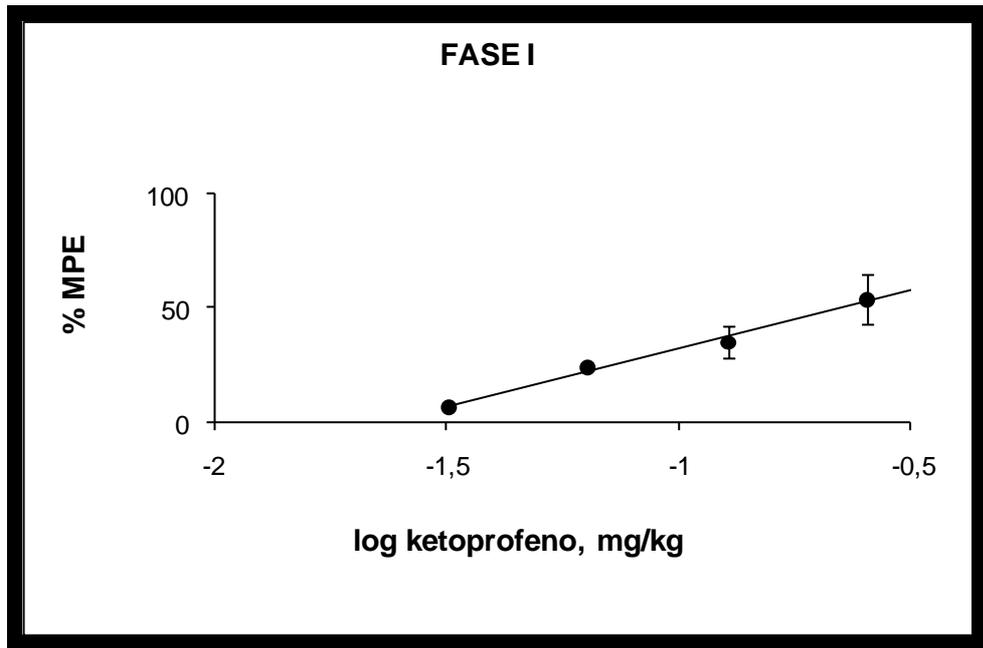


Gráfico 1. Curva dosis-respuesta del ketoprofeno en el test de la formalina en la fase I.

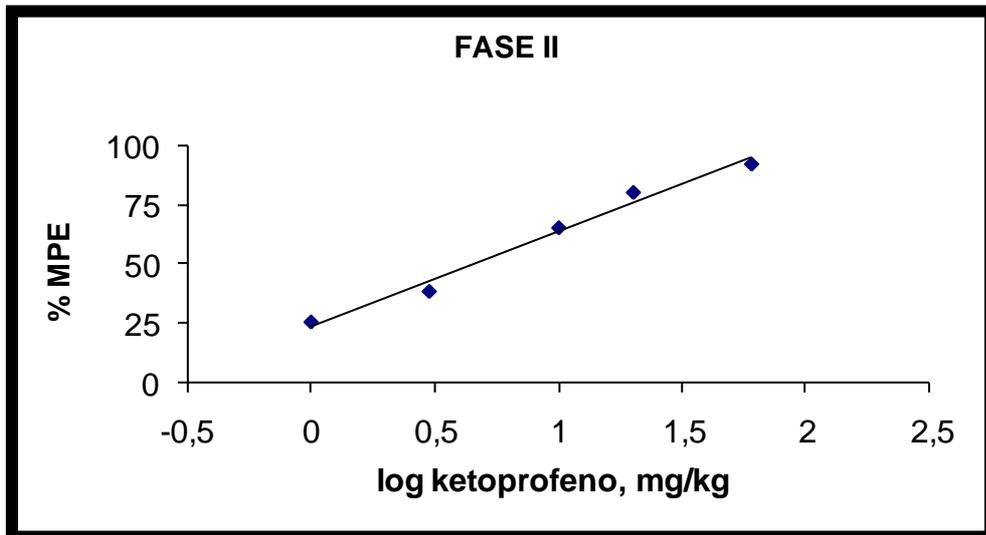


Gráfico 2. Curva dosis-respuesta del ketoprofeno en el test de la formalina en la fase II.

3.- Grupo tratado con naltrexona, naltrindole y nor-binaltorfimina

La administración de 1 mg/kg de naltrexona, naltrindole o nor-binaltorfimina no induce un efecto analgésico significativo, ya sea en la Fase I o en la Fase II del ensayo de la formalina orofacial en ratones. Datos que no se muestran por no tener significancia alguna.

El pretratamiento de los animales con 1 mg/kg de naltrexona (n=6), o de naltrindole (n= 6) o de nor-binaltorfimina (n=6), produjo una disminución significativa ($P > 0.05$), de las ED50 de ketoprofeno, como se observa en las graficos 3 y 4.

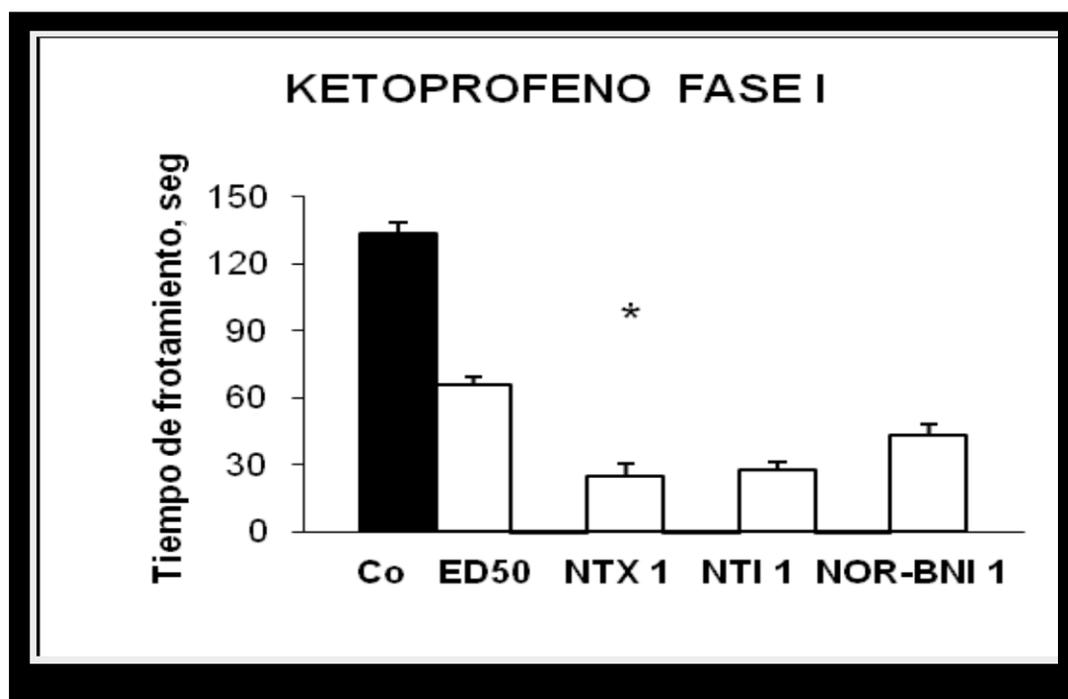


Grafico 3. Histograma de dosis-respuesta de la antinocicepción producida por la administración i.p de ketoprofeno en el test de la formalina durante los primeros 5 minutos.

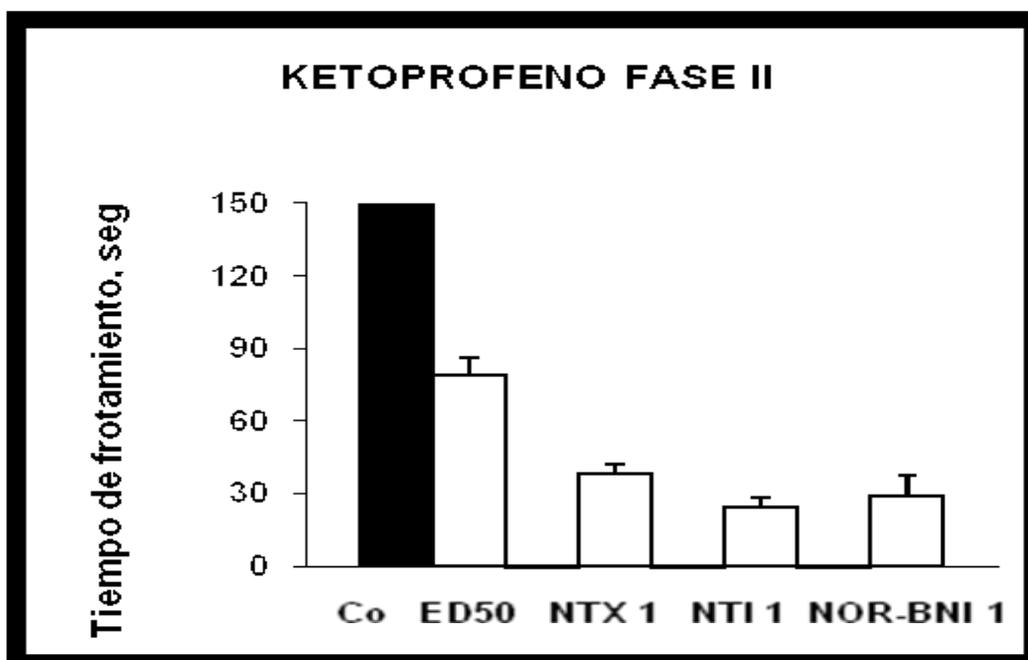


Grafico 4 Histograma de dosis-respuesta de la antinocicepción producida por la administración i.p de ketoprofeno en el test de la formalina entre los 20 y 30 minutos.

En la Tabla 1, se observa que el pretratamiento con los antagonistas opioides disminuye significativamente ($P > 0.05$) en tiempo de rascado de la ED50 del ketoprofeno.

	Fase I (seg)	Fase II (seg)	Razón I	Razón II
ED50 ketoprofeno mg/kg	65.50 ± 3.79	79.17 ± 7.16	---	---
+Naltrexona 1mg/kg	24.83 ± 5.52	38.30 ± 4.09	2.63	2.06
+Naltrindole 1 mg/kg	27.67 ± 3.49	24.67 ± 3.82	2.36	3.20
+Nor-binaltorfimina 1 mg/kg	43.33 ± 4.83	28.83 ± 8.48	1.50	2.70

Tabla I: Efecto de antagonistas opioides en el tiempo de frotamiento inducido por la ED50 del ketoprofeno en el ensayo de la formalina orofacial en ratones. Valores, en fase I y en fase II, son expresados en tiempo en seg ± E.E.S. Razón I = ED50 pre/ED50 postratamiento; Razón II= como en razón I.

DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que la administración de ketoprofeno, administrado por vía i.p., en el test de la formalina orofacial produce una actividad antinociceptiva 20 veces mayor en la fase I que en la fase II, al comparar las correspondientes ED50. Esta mayor potencia del ketoprofeno en la fase I puede explicarse por su capacidad inhibitoria selectiva de la COX-1, relacionada directamente con la analgesia en comparación a la COX-2, la cual está mayormente relacionada con los procesos dolorosos que ocurren con inflamación (22,25).

El pretratamiento con naltrexona, naltrindole y nor-binaltorfimina que per se no indujeron actividad antinociceptiva en la primera o en la segunda fase del ensayo de la formalina orofacial, resultados que no concuerdan con los descritos previamente (29,30). Estas divergencias se pueden deber a la diferencia en los protocolos experimentales, por ejemplo, ratones de cepas diferentes y la concentración de la formalina usada también es diferente. Por otra parte, los resultados divergentes se explicarían por el uso de ratas en lugar de ratones (29).

Los antagonistas opioides usados incrementaron en diferentes proporciones la actividad antinociceptiva de la ED50 del ketoprofeno, siendo mayor el efecto con el uso de naltrexona en la fase I, por una disminución del tiempo de frotamiento de 31 %, frente a un 29 % producido por naltrindole y de 18 % en el caso de nor-binaltorfimina.

Por otra parte, igualmente en la fase I, la razón del tiempo de frotamiento entre el pre y el postratamiento de los animales resultó ser mayor con la naltrexona (2.63) que con naltrindole (2.36) y con nor-binaltorfimina (1.50). Estos índices reflejan el desplazamiento de la curva dosis-respuesta de ketoprofeno con y sin tratamiento, de acuerdo a Zelcer y cols. (31). El mayor efecto de naltrexona en la Fase I, podría explicarse por su antagonismo no selectivo sobre los diferentes subtipos de receptores opioides que están comprometidos en la actividad analgésica y en diferentes proporciones (15,27). Este efecto mayor de naltrexona, se ve reflejado tanto en la disminución del % del tiempo de frotamiento como en la razón entre las ED50 pre y postratamiento.

Por otra parte, en la fase II, la mayor disminución de tiempo de frotamiento fue obtenida con naltrindole (35 %) contra nor-binaltorfimina (32 %) y frente a naltrexona (27 %). Corroboran estos resultados, el desplazamiento de la curva dosis-respuesta de 3.20 unidades para naltrindole, de 2,70 para nor-binaltorfimina y de 2.06 para naltrexona. La justificación del mayor efecto de naltrindole en la fase II, podría deberse a la mayor capacidad antagonística de los receptores δ , que podrían tener un rol mas prominente en la analgesia relacionada con inflamación (33). Similarmente, el factor o razón de desplazamiento de la curva dosis-respuesta fue mayor para el antagonista de receptores opioides δ .

El incremento de la actividad antinociceptiva del ketoprofeno, tanto en la fase I como en la fase II, por los antagonistas opioides, permite suponer la participación del sistema opioide. Este incremento podría explicarse porque se ha demostrado que los antagonistas opioides, son capaces 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 (28). Estos efectos de los antagonistas opioides conducen a un efecto modulador, que se manifiesta en una mejor respuesta analgésica del AINE.

En conclusión, la actividad antinociceptiva de los AINEs, en el ensayo algesiométrico de la formalina, parece ser dependiente de la dosis y modulado por la actividad de los sistemas opioides.

CONCLUSIONES

- Ketoprofeno produce antinocicepción dosis dependiente al ser administrado por vía i.p. en el test de la formalina orofacial, tanto en la fase I, relacionada solo con analgesia, como en la fase II, que es de analgesia dependiente de inflamación..
- Ketoprofeno posee una potencia analgésica 20 veces mayor en la fase I que en la fase II. Probablemente por su mayor capacidad inhibitoria de COX-1.
- Naltrexona, naltrindole y nor-binaltorfimina administrada i.p. no poseen efecto antinociceptivo per se en el ensayo de la formalina orofacial.
- Naltrexona, un antagonista no selectivo de MOR, DOR, y KOR, incrementó significativamente la analgesia inducida por ketoprofeno en la fase I
- Naltrindole, antagonista selectivo de receptores opioides del subtipo δ , aumentó la analgesia de ketoprofeno en la fase II.

SUGERENCIAS

Se sugiere, para próximos estudios:

- Analizar la actividad analgésica de combinaciones de otros AINEs, en diferentes ensayos algesiométricos y por distintas vías de administración.
- Evaluar los tipos de interacciones que ellos puedan originar.
- Al mismo tiempo se sugiere, estudiar la modulación del sistema opioide en los ensayos anteriormente mencionados.

RESUMEN

Los AINEs producen sus actividad antinociceptiva primariamente por bioinhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COXs) a lo cual se agrega la modulación del efecto analgésico por agentes adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, nitridérgicos y opioides. Entre los AINEs se encuentra el ketoprofeno, un AINEs primariamente inhibidor de COX-1. Los AINEs, producen varios efectos entre los cuales se encuentra la antinocicepción, la antipiresis y su actividad antiinflamatoria. En este estudio del tipo de diseño experimental con post-prueba y grupo control, se evaluó la actividad antinociceptiva del ketoprofeno. Para ello, en ratones, se utilizó el método algiesiométrico de la formalina, que posee 2 fases: fase I, netamente analgésica y fase II, de analgesia correlacionada. Al analizar los resultados se comprobó que el ketoprofeno administrado por via i.p. presenta un efecto antinociceptivo dosis dependiente, tanto en la fase I como en la fase II. El pretratamiento de los animales con antagonistas opiodes modificó significativamente la actividad antinociceptiva del ketoprofeno, siendo mayor el efecto del antagonista no selectivo, naltrexona, en la fase I y el naltrindole, antagonista de receptores opioides del subtipo δ , en la fase II. Los resultados anteriores permiten sugerir que el efecto antinociceptivo del ketoprofeno en el modelo de la formalina orofacial, tanto en la fase I como en la fase II, estaría modulado por la via opioide.

REFERENCIAS

1. Bernucci J. "Anatomía y Fisiología del Dolor. Rev. Sanidad Def. Nac". (Chile); 11: 107-120, 1994.
2. Mason P. "Central Mechanisms of Pain Modulation. Current Opinion in Neurobiology" 9: 436-441,1999.
3. Bjorkman R. "Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Acta Anaesthesiol", Scan. ; 39; suppl 103,1995
4. Cashman J. "The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia". Drugs; 52;Suppl 5: 13-23, 1996.
5. Solomon R, Gebhart G. " Synergistic antinociceptive interactions among drugs administered to the spinal cord". Anesth. Analg; 78: 1164-72, 1994.
6. Bonica, J.J."Anatomic and physiology basics of nociception and pain". En: Bonica JJ (ed). The management of pain. 2ª ed. Pennsylvania, Lea &Febiger ; 28-94, 1990.
7. Busquets C, Ribera M. "Monografies Mediques. Unidades de dolor. Realidad hoy, reto para el futuro". Gispert S.A. Barcelona, España. 426. p 217- 250. cap.19, 2002.
8. Burgess PR, Perl E. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. J Physiol; 190: 541-62),1967.
9. Dray A. "Inflammatory mediators in pain". Br. J. Anaesth; 75: 125-31), 1995.
10. Mayer, Mayer DJ, Price CD. Central Nervous System mechanisms of analgesia. Pain; 2: 379-404,1976.
11. Sbeit W, Krivoy N, Shiller M, Farah R, Cohen HI, Struminger L, Reshef R. "Nimesulide-induced acute hepatitis". Ann. Pharmacother; 35(9):1049-52, 2001.
12. Markenson JA, "Mechanisms of chronic pain". Am. J. Med. , 101 (suppl 1A): 6s-18s, 1996.
13. Grubb BD, "Peripheral and central mechanisms of pain" Br.Med.Anaesth; 81(1): 8-11, 1998.

14. Martin T J, Eisenach J.C. "Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states". *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 299: 811-817, 2001.
15. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL: "Opioid receptors". *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 953-990, 2004.
16. Vane J R. "Aspirin and other anti-inflammatory drugs". *Thorax* ; 55;3-9, 2000.
17. Smith WL, DeWitt DL, Garavito R. M. "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:97-120, 1998. *Rev. Biochem.*; 69: 145-182, 2000.
18. Florez J., Armijo J.A., Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 4ª Edición, Barcelona, España; cap. 20, "Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas". Espluges, JV Lopez-Jaramillo P. pag. 327-342; cap. 22, "Fármacos Analgésicos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos". *Antiartríticos*. Feria M. pag. 355-388, 2003.
19. Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. "An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception". *Anesth. Anal.*; 93: 430-435, 2001.
20. Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. "Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs". *Br. J. Pharmacol.*; 135: 1591-1597, 2002.
21. Barbanj MJ. et al. "Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen". *Clin. Pharmacokinet.*, 40: 245-262, 2002.
22. Jackson ID et al. "Double-blind, randomized, placebo-controlled trial comparing rofecoxib with dexketoprofen trometamol in surgical dentistry". *Br. J. Anaesth.* ; 92: 675-680, 2004.
23. Warner T.D., Mitchell J.A., "Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic". *FASEB J.* 18: 790-804, 2004.
24. Capone ML. et al. "Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. *Int J Immunopathol Pharmacol.*"; 16:49-58, 2003.
25. Chandrasekharan NV. et al. "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression". *PNAS* ; 99:13926-31, 2002.
26. Vane JR , Bakhle Botting RM. "Cyclooxygenases 1 and 2". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:97-120, 1998.

27. Reisine T, Pasternak G. "Analgésicos opioides y sus antagonistas". In: Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. México: Mc Graw- Hill Interamericana Editores; 557-93, 1996.
28. Gourlay G.K. "Advances in opioid pharmacology". Support Care Cancer ; 13: 153–159, 2005.
29. Luccarini P. et al. "The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception". J. Pain; 12: 908-914, 2006.
30. Raboisson P and Dallel R. "The orofacial pain". Neurosci. Biobehav. Rev.; 28:219-226, 2004.
31. Zelcer S, et al. "Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs". Brain Res. ; 1040: 151-156, 2005.
32. Tallarida RJ. Murray RB. "Manual of pharmacologic calculations with computer programs". Second edition, Springer-Verlag, New York, 1986.
33. R.J. Bodnar. "Endogenous opiates and behavior. Peptides" ;28;2435 – 2513, 2007.