



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIO DE DOLOR
FARMACOLOGÍA**

**“INTERACCION ANTINOCICEPTIVA DE KETOROLACO CON CLONIXINATO
DE LISINA EN DOLOR EXPERIMENTAL”**

Mauricio Alejandro Bustamante Huerta

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Ramiro Zepeda I.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Hugo F. Miranda G.

Prof. Dr. Fernando A. Sierralta G.

Adscrito a Proyecto FONDECYT 2015

Santiago – Chile

2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIO DE DOLOR
FARMACOLOGIA**

**“INTERACCION ANTINOCICEPTIVA DE KETOROLACO CON CLONIXINATO
DE LISINA EN DOLOR EXPERIMENTAL”**

Mauricio Alejandro Bustamante Huerta

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Ramiro Zepeda I.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Hugo F. Miranda G.

Prof. Dr. Fernando A. Sierralta G.

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 2015
Santiago – Chile
2015**

Dedicatoria

Estas palabras, son para mostrar mi agradecimiento y dedicar este gran paso de mi vida, en primer lugar a Dios que me permitió tener la oportunidad de estudiar la profesión que tanto amo.

Agradezco de corazón a mis padres, por el gran esfuerzo que han tenido que hacer para poder darme la posibilidad de estudio, sin lugar a dudas, son uno de los pilares fundamentales en mi realización como profesional y en mi vida.

Quiero hacer una importante mención a la persona que camina junto a mí el día de hoy, Carolina Bilbao B., agradezco su inmenso apoyo, su inigualable dulzura y su tremendo cariño, que ha sabido darme durante estos duros años de carrera. Me siento muy afortunado de haberle conocido, y espero podamos seguir avanzando juntos en los muchos proyectos que nos tiene la vida.

Finalmente agradezco y dedico mi logro, a mis amigos y hermanos, en especial a Felipe Bustamante H., quienes han logrado darme esa cuota de alegría y fuerzas, que tanto se necesitan para cumplir paso a paso los objetivos propuestos durante la vida universitaria.

De la manera más sincera, les estoy eternamente agradecido.

Mauricio Bustamante Huerta.

ÍNDICE

Contenido	Página
LISTA DE ABREVIACIONES.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO	
- Dolor.....	4
- Clasificación del Dolor.....	5
- Componentes de la fisiopatología del dolor orofacial.....	8
- Mecanismos del Dolor.....	8
- Características del Dolor.....	11
- Tratamiento del Dolor.....	12
- AINEs.....	14
- Ketorolaco.....	18
- Clonixinato de Lisina.....	20
- Interacciones Farmacológicas.....	22
- Medición Experimental del Dolor: Modelos animales del dolor.....	23
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS	
- Anexo 1.....	58
- Anexo 2.....	59

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
AA	Ácido Araquidónico
AAS	Ácido acetil salicílico
AINE	Anti Inflamatorio No Esteroidal
CL	Clonixinato de Lisina
COX	Ciclooxigenasa
DSR	Distrofia simpática refleja
DE₅₀	50% de Dosis Efectiva
E.E.M.	Error Estándar del Promedio
GABA	Ácido Gaba Amino Butírico
I.I.	Índice de Interacción
I.M.	Intra muscular
i.p.	Intra peritoneal
i.v.	Intra venoso
KT	Ketorolaco Trometamol
MPE	Máximo Efecto Posible
NMDA	N-metil-D-aspartato
PG	Prostaglandina
SNC y SNP	Sistema Nervioso Central / Periférico
TXA₂	Tromboxano A ₂

RESUMEN

Introducción: El dolor es una experiencia compleja que abarca dimensiones cognitivas, sensorial-discriminativa y emocionales. Es la primera causa de consulta a nivel de salud oral. Para su tratamiento se han utilizado diversos fármacos, entre ellos destacan los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) por la ventajosa relación costo-eficacia que presentan, pero sus efectos adversos complican el masificar su uso y prolongar tratamientos. Ellos se pueden reducir con la combinación de estos fármacos a fin de disminuir las dosis totales necesarias. El objetivo de este estudio es establecer el tipo de interacción antinociceptiva, al administrar intraperitonealmente (i.p.) una combinación de clonixinato de lisina (CL) y ketorolaco trometamol (KT) en la prueba de la formalina orofacial.

Material y Métodos: Se administraron i.p. CL y KT para determinar la actividad antinociceptiva y el tipo de interacción en el ensayo algésimétrico de la formalina orofacial. Se usaron 108 ratones, a los que se les inyectó una solución de formalina al 2% en el labio superior, para cuantificar el tiempo de frotamiento de la zona perinasal durante los primeros 5 minutos (fase I algésica aguda) y desde los 20 a 30 minutos (fase II algésica-inflamatoria). Los resultados se miden como el promedio \pm error estándar del promedio (E.E.M.). La significancia estadística se determinó por pruebas *t* Student ($p < 0,05$).

Resultados: La administración de CL, KT, o su combinación produce un efecto analgésico dosis-dependiente en ambas fases. La coadministración de ellos, en proporción 1:1 de sus DE_{50} , demostró a través del análisis isoblográfico, que estos fármacos tienen una interacción de tipo supraaditiva o sinérgica en fase II, correspondiente a la fase inflamatoria del dolor y aditiva en fase I.

Conclusiones: La coadministración intraperitoneal de CL y KT produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente tanto en la primera como en la segunda fase, existiendo una interacción de tipo sinérgica entre ambos fármacos para la fase II, correspondiente a la fase inflamatoria del test de la formalina orofacial.

INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre apareció en la Tierra, el dolor ha sido uno de sus principales problemas y ha buscado sistemáticamente la forma de librarse de él. Podemos definir el dolor como la percepción de una sensación aversiva, displacentera, originada por estímulos intensos potencialmente capaces de lesionar el organismo y que actúan sobre receptores específicos (Cingolani H. y Houssay A. 2000).

El ser humano desde tiempos inmemoriales ha presentado gran interés por aliviar las dolencias, tanto físicas como emocionales. El dolor ha estado unido con la vida, durante toda la historia del hombre. Los hallazgos prehistóricos nos muestran que desde el principio de los tiempos, humanidad y dolor han estado irremisiblemente unidos: huesos descalcificados, fracturados, hipertrofiados o afectados por infecciones y tumores, cráneos trepanados y pinturas y esculturas rupestres representando la muerte, el parto o las heridas son los primeros testimonios del dolor en el hombre (Fernández-Torres B. y cols. 1999).

Dado que hasta finales del siglo XIX no se empezaron a poner las bases del conocimiento científico del dolor, la concepción que de él se tenía hasta entonces estuvo íntimamente ligada a factores culturales, religiosos y filosóficos (Pérez-Cajaraville J. y cols. 2005).

Durante miles de años el tratamiento del dolor se asoció principalmente a un concepto mágico de enfermedad, haciendo uso de ritos mágicos, hechizos, sacrificios y el uso de plantas medicinales para el tratamiento de éste. (Pérez-Cajaraville J. y cols. 2005).

Hasta los griegos, las enfermedades y sus tratamientos no se concebían en términos naturales y racionales. Durante la historia del dolor, los médicos se han enfrentado a éste con grandes dosis de literatura y superstición, y sólo a partir del siglo XIX, caracterizados por la transición hacia una medicina moderna, entendida como ciencia experimental basada en la fisiología y fisiopatología, se ha logrado dar grandes avances en el ámbito terapéutico (Fernández-Torres B. y cols. 1999, Pérez-Cajaraville J. y cols. 2005).

El dolor es una sensación de gran importancia para la supervivencia del hombre, provocada por estímulos potencialmente dañinos para el organismo, que despierta reacciones reflejas que tienen por finalidad protegerlo. Sin embargo, una aparente desviación de esta función protectora es el dolor crónico, que representa un problema médico y social de difícil solución y que debe ser suprimida para permitirle al organismo sobrevivir (Cingolani H. y Houssay A. 2000).

El dolor del área orofacial, junto con las cefaleas, es una de las algias más frecuentes en la población, presentando una incidencia en el mundo occidental de un 70%-89% en varones y un 77%- 97% en mujeres. Este es un problema complejo, en el que pueden estar implicadas diversas regiones anatómicas y que puede responder a diferentes etiologías: neurológica, vascular, tumoral, traumática, iatrogénica y dental, entre otras. No obstante, las algias faciales se deben en su mayoría a causas de origen dental (caries, pulpitis, flegmones y enfermedad periodontal), esto es, dolor odontogénico (Díez M. y Arteagoitia I., 2004).

El manejo del dolor es complejo y muchos pacientes presentan comorbilidades que lo complican. Existen innumerables opciones de medicamentos que lo alivian, sin embargo los analgésicos están asociados a efectos secundarios, problemas de tolerancia, toxicidad e incluso riesgo de adicción. Por ello, el manejo del dolor se convierte en un balance entre efectividad versus tolerancia y seguridad. Dado que los analgésicos disponibles presentan una amplia intervariabilidad entre pacientes es necesario estar familiarizado con el gran espectro de opciones y de

dirigir la terapia a las necesidades de cada paciente. Más aún, la analgesia es una terapia dinámica que puede estar influenciada por múltiples factores por lo que ésta debe ser constantemente monitoreada y ajustada (Pergolizzi y cols. 2014).

El tratamiento del dolor involucra básicamente dos aproximaciones, farmacológica y no farmacológica. El dolor agudo generalmente es manejado a través de analgésicos y otros coadyuvantes como calor o frío local. Por otro lado, el dolor crónico afecta a la totalidad del individuo y requiere un enfoque multidisciplinario para abarcar las múltiples dimensiones del sufrimiento del paciente, incluyendo aspectos físicos, psicológicos y emocionales relacionados a la discapacidad del paciente (Asociación Americana de Farmacéuticos, 2004).

Los fármacos más usados en el tratamiento farmacológico del dolor son principalmente los opioides y los analgésicos antiinflamatorios no-esteroidales (AINEs) que comprenden un vasto grupo de moléculas de diferente estructura química pero con acciones farmacológicas comunes entre las que destacan sus propiedades **antiinflamatoria** (por inhibición de distintas fases en la cascada del ácido araquidónico, particularmente en la vía COX2), **antipirética** (ya que los AINEs inhiben la síntesis de PGE2 suprimiendo la respuesta que conlleva al aumento de la temperatura corporal) , **antiagregante plaquetario** (esta acción la cumplen el ácido acetilsalicílico y otros AINEs que inhiben la COX plaquetaria) y **analgésica**. Además existen agentes coadyuvantes como los antidepresivos, los antiepilépticos, los anestésicos locales, los cannabinoides, el alcohol, etcétera (Christie y cols. 2000, Martin y Eisenach 2001).

MARCO TEÓRICO

Dolor

La definición del dolor ha ido variando a lo largo de los años. El dolor es definido por la Asociación Internacional del Estudio de Dolor (IASP) como “una experiencia sensorial y emocional displacentera con daño de tejido real o potencial,

o descrito en términos de ese daño” (International Association for the Study of Pain, 2004.)

Según esta definición, el dolor es siempre una experiencia subjetiva. Diversos estudios han demostrado que la variación en los reportes subjetivos de dolor se relacionan directamente con el grado de activación de regiones del cerebro asociadas a procesamiento del dolor. Numerosas regiones del cerebro funcionalmente distintas están involucradas en la percepción del dolor, incluyendo la corteza cingulada anterior, la corteza primaria somatosensorial y la corteza prefrontal. Al aumentar la intensidad de un estímulo doloroso, se incrementa la actividad de estas regiones cerebrales. (American Pharmacists Association, 2004)

El dolor tiene los siguientes componentes: (Houssay A. 2000)

1. **Componente sensorial**, es decir, se tiene conciencia del lugar, duración e intensidad del dolor. En la experiencia sensorial están contenidos todos los elementos de la excitabilidad del tejido, es decir, potencial de membrana, potencial de acción, umbral de excitación, fibras nerviosas periféricas vinculadas a esta modalidad y otros elementos indispensables para su comprensión.
2. **Componente motor**, como el acto reflejo; un componente vegetativo (p. ej., taquicardia).
3. **Componente Afectivo- Emocional**: involucra al denominado sistema límbico que rige la conducta y las emociones, es por esto que no todas las personas soportan el dolor por igual. Además, las experiencias dolorosas previas llevan a la **valoración del dolor**, de la que resulta una actitud ante el mismo (p. ej., el lamento).

Clasificación del dolor

Las clasificaciones de dolor, atienden a diversos criterios como por ejemplo, calidad de la sensación, lugar del daño tisular y otros, también de acuerdo a la

velocidad de propagación del impulso nervioso a través de las vías vinculadas a la nocicepción (Pérez A., 2008). Pero quizás las más utilizadas sean aquellas basadas en su evolución y en la naturaleza de su origen, ya que estas, al tener implicancias de tipo diagnóstico y terapéutico quizás sean las de mayor importancia clínica.

Según duración o evolución:

A) Dolor agudo: tiene un propósito fisiológico, de advertir daño tisular o potencial injuria y tiene un objetivo protector. Normalmente está presente a continuación de una herida o cirugía y generalmente subsiste mientras dure el proceso de curación y el estímulo doloroso disminuya (American Pharmacists Association, 2004).

B) Dolor crónico: este dolor ha persistido más allá de su utilidad y no se relaciona con una injuria ni tiene valor fisiológico. El dolor crónico continúa presente más allá del tiempo esperado para la curación y se considera como una enfermedad propiamente tal. Este tipo de dolor constituye un problema de salud pública, debido a los problemas que genera a quien lo padece en términos de calidad de vida, capacidad para desenvolverse en el medio, ausentismo laboral, etc. (American Pharmacists Association, 2004).

Según Etiología: (Pérez Ruiz A. 2008)

1. Dolor nociceptivo: la fibra aferente sensorial primaria, relacionada con la nocicepción es denominada nociceptor; ya que el verdadero receptor de esta fibra aferente, de forma frecuente, no está bien definido, el término nociceptor se utiliza de manera indistinta tanto para la fibra como para su receptor.

a) Somático: El dolor nociceptivo somático, resulta de la lesión tisular con la consiguiente activación de los nociceptores en tejidos superficiales (cutáneos y mucosos) y profundos (músculo esquelético, articulaciones y hueso). Por lo general, se controla bien con la terapéutica específica y las drogas analgésicas (AINEs y

opioides, solos o en combinación), así como por terapias alternativas principalmente, la acupuntura que tiene una gran eficacia y promueve analgesia, en las personas que experimentan dolor.

b) Visceral: El dolor nociceptivo visceral es consecuencia entre otras cosas, de la infiltración, compresión, distensión o estiramiento de vísceras torácicas o abdominales, de forma habitual, producida por el crecimiento del tumor, primitivo o metastásico, otras causas pueden ser, un cálculo (concreción calcárea) que se origina en vísceras como el riñón, vías biliares, glándulas salivales. La característica fundamental del dolor visceral es que no está bien localizado y puede asociarse con náuseas, vómitos y sudoración, es decir, con manifestaciones autonómicas. Puede estar referido a puntos cutáneos distantes de la lesión que pueden servir para su diagnóstico. Responde a fármacos analgésicos, generalmente, opioides, antiespasmódicos y también a ciertos tipos de bloqueos analgésicos específicos generalmente, de la cadena simpática (por ejemplo: ganglio estrellado, plexo celíaco, plexo hipogástrico o ganglio impar de Walter). El dolor pulpar se incluye en la clasificación de dolor visceral y aunque las estructuras dentarias no son vísceras, sí tienen en su interior la pulpa, la cual se encuentra protegida por tejidos mineralizados del diente con una dotación neural similar a las vísceras, con las consiguientes fibras A δ y C.

2. Dolor neuropático o no nociceptivo: Provocado por: 1) una lesión del sistema nervioso periférico (SNP) o del sistema nervioso central (SNC) como resultado de la compresión o infiltración tumoral de nervios periféricos, médula espinal u otras estructuras del SNC. 2) Lesión química, traumática o biológica de un nervio periférico o cualquier estructura del SNC, como resultado de cirugía, radioquimioterapia y otras, y se acompaña con edema, hipomotricidad y disturbios vasomotores que, a largo plazo pueden producir una enfermedad regional compleja (del tipo de la distrofia simpática refleja (DSR); puede aparecer tardíamente, semanas o meses después de la lesión y, en general, no responde a la mayoría de las terapéuticas convencionales.

Componentes de la fisiopatología del dolor orofacial.

El dolor es uno de los motivos de consulta más frecuente en la clínica médica y estomatológica y posee una serie de connotaciones especiales debidas a las particularidades de la región anatómica orocervical (Pérez A., 2008).

Inervación

La inervación sensitiva orofacial procede fundamentalmente del V par craneal o nervio trigémino, aunque también coadyuvan el VII par o nervio facial (áreas profundas de la cara), el IX par o nervio glossofaríngeo (orofaringe, paladar blando, epiglotis, fauces y amígdalas, y pared faríngea hasta su unión con el esófago, tercio posterior de la lengua, oído medio), el X par o nervio vago (cara inferior de la epiglotis, laringe, conducto auditivo externo) y el plexo cervical (C1-C4) superficial y profundo (piel cervical y parte del cuero cabelludo). (Atlas cabeza y cuello, Netter.2007)

La inervación simpática, muy importante por su participación en los fenómenos de vasodilatación/vasoconstricción asociados al dolor, procede del ganglio estrellado para toda la cabeza.

En el caso del nervio trigémino, el componente sensitivo emerge del troncocerebral en la Protuberancia y se dirige hasta el ganglio de Gasser y de él salen las tres ramas, los nervios oftálmico, maxilar y mandibular (Atlas Cabeza y Cuello, Netter. 2007). La información sensorial, exteroceptiva y propioceptiva orofacial se transmite desde la periferia hacia el SNC, casi en su totalidad, a través del nervio trigémino, para inervar los 3 tercios de la cara. (Almeida y cols. 2004, Lemke, 2004).

Mecanismos del dolor

Terminaciones nerviosas libres ubicadas en piel, músculo y vísceras que reciben señales de dolor son denominadas nociceptores. La transducción consiste en recibir impulsos nerviosos de una noxa y la consecuente iniciación de potenciales de acción hacia los nociceptores. Éstos pueden ser activados por varios estímulos que provengan de injurias a los tejidos (Taylor E.C. y cols. 2001; Guyton A.C. y cols. 2000). Este daño a los tejidos se traduce en la liberación de bradiquinina, serotonina, iones de potasio e histamina que impulsan la liberación de prostaglandinas y sustancia P, lo que aumenta la sensibilidad de los nociceptores, sin estimularlos directamente (Taylor E.C. y cols. 2001; Guyton A.C. y cols. 2000). Durante la transmisión del estímulo fibras nerviosas aferentes provenientes de los nociceptores (llamadas fibras A delta y fibras C) transmiten el potencial de acción hacia la médula espinal y cerebro. Las fibras nerviosas aferentes hacen sinapsis en el asta dorsal de la médula y liberan neurotransmisores como glutamato, sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Ellos estimulan la transmisión continua de señales dolorosas a través de numerosas vías ascendentes desde la médula espinal hacia el tálamo y desde allí hacia la corteza cerebral en donde la señal es procesada y percibida como dolor.

Fibras A delta (A δ)

Las fibras A se subdividen en los tipos alfa, beta, gamma y delta. De estos subtipos, las fibras A delta son las que conducen los impulsos nociceptivos. Son fibras de pequeño diámetro (1 a 4nm) y mielinizadas que conducen impulsos nerviosos relativamente rápidos variando de 5 a 50 metros por segundo. Algunas de ellas responden a la estimulación química o térmica en forma proporcional con el grado de lesión tisular; otras, sin embargo, se activan principalmente por estimulación mecánica como presión, lo que evidencia que se localizan en el lugar de la lesión. Algunas fibras A delta pueden tener respuestas polimodales y comenzar a excitarse después de que se haya alcanzado un umbral alto de excitación tras la producción del daño tisular. (Houssay A. 2000; American Pharmacists Association, 2004)

Fibras C

Son amielínicas, de pequeño grosor (1nm) de baja velocidad de conducción (0,5 a 2 m/seg.), alto umbral de excitación, con capacidad de conservación de su integridad funcional en situaciones de hipoxia tisular y están vinculadas al dolor de tipo lento y quemante. Se calcula que existen alrededor de 200 fibras tipo C por centímetro cuadrado de piel. (Houssay A. 2007; American Pharmacists Association, 2004)

Modulación del dolor

Diversos estímulos sensoriales distintos a estímulos nociceptivos dolorosos viajan por el mismo camino. Dado que el cerebro puede procesar sólo una cierta cantidad de información a la vez, estos estímulos no nocivos pueden contribuir a alterar la percepción del dolor. De acuerdo a la teoría de la puerta de entrada del dolor, la transmisión de señales aferentes de dolor desde la periferia hacia la médula espinal y el cerebro puede modularse medianamente estimulando las fibras tipo A delta, reduciendo así la transmisión de señales dolorosas producidas por fibras tipo C (Linchitz R. y Sorell P., 2000). Existen otras técnicas psicológicas de relajación, distracción y guías mentales de imágenes que pueden disminuir en parte la cantidad de señales de dolor que se procesan en la corteza cerebral (Baumann T., 2002).

Sensibilización central

Durante la modulación del dolor, la percepción de éste es moderada por vías inhibitorias que descienden desde el tálamo y tronco cerebral. El sistema opioide endógeno usa endorfinas (encefalinas, dinorfinas y beta-endorfinas) que interactúan con receptores opioides mu, delta y kappa a través de todo el sistema nervioso central (SNC). Estas endorfinas se unen a los receptores opioides para inhibir la transmisión de impulsos dolorosos o alterar la percepción. La estimulación de receptores N-methyl-D-aspartato (NMDA) ubicados en el asta dorsal puede disminuir la respuesta de receptores mu a los opioides. Receptores antagonistas de

NMDA revierten este efecto. Otros neurotransmisores importantes que inhiben la transmisión del dolor incluyen la serotonina, norepinefrina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y neurotensina. (Baumann T.J. 2002) (American Pharmacists Association, 2004)

Wind-Up

La estimulación nociceptiva constante desde la periferia puede provocar sensibilización central al dolor, lo que se conoce como fenómeno de “Wind-up”. Los impulsos prolongados de fibras C conllevan a respuestas de larga duración en el asta dorsal. La activación de receptores NMDA parece tener un rol importante en este proceso. El aumento de excitación del asta dorsal puede durar por minutos e incluso horas después de la aparición del estímulo nocivo inicial. Esta sensibilización central puede resultar en el reclutamiento de neuronas que no están normalmente involucradas en la transmisión del dolor, llevando a una hiperalgesia, alodinia y/o irradiación del dolor a otros tejidos no injuriados. El fenómeno de wind-up explicaría por qué el dolor agudo no tratado puede conllevar al desarrollo de dolor crónico, y que mientras más tiempo demore en tratarse el dolor, más difícil se tornará su tratamiento. (American Pharmacists Association, 2004)

Características del Dolor

Según las características del dolor se puede conocer su origen o etiología y por lo tanto su diagnóstico, su gravedad o pronóstico y tratamiento. Estas características son (Houssay A. 2007):

- Localización o irradiación: el dolor puede ser localizado a un segmento corporal o generalizado
- Tipo o carácter: Punzante, Opresivo, Lacerante, Cólico, etc.
- Duración: El tiempo desde su aparición, desde cuándo.

- **Evolución:** puede tener un comienzo brusco o súbito, insidioso y cómo se desarrolla en el tiempo.
- **Frecuencia:** Es el número de veces que ha ocurrido el dolor.
- **Intensidad:** Generalmente cuando es el primer dolor suele ser intenso o fuerte, pero cuando se ha repetido varias veces en el tiempo, se puede cuantificar.
- **Irradiación:** Es el trayecto que recorre el dolor desde su localización original hasta otro lugar.
- **Síntomas asociados:** Como náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, temblor.
- **Signos asociados:** Sudoración, palidez, escalofríos, trastornos neurológicos, etc.
- **Factores agravantes:** Son los factores que aumentan el dolor por ejemplo tras la ingesta, determinados movimientos, factores a los que atribuye el paciente.
- **Factores atenuantes:** Son los factores que disminuyen el dolor, por ejemplo el descanso, posiciones corporales, medicación utilizada.

Tratamiento del Dolor

1) No Farmacológico

- a. Terapia psicológica
- b. Terapia Física (frío, calor, ultrasonido, kinesiología)
- c. Medicina alternativa y complementaria (quiropaxis, acupuntura, terapia herbal y dietética)

2) Farmacológico

La OMS ha desarrollado una guía para el tratamiento del dolor asociado a cáncer denominada “escalera de analgesia” en la que se indica el tipo de medicamento a utilizar dependiendo de la intensidad del dolor. Esta guía es también utilizada

generalmente para otros tipos de dolor. Según la escalera, para dolor leve a moderado se utilizarían analgésicos simples como aspirina, paracetamol, AINEs o inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2 (COX-2). Para dolor moderado a severo se prefiere utilizar analgésicos opioides, especialmente si el dolor tiene un componente central. Por otro lado, ciertos tipos de dolor responden mejor a algunos analgésicos que a otros, por ejemplo el dolor mediado por prostaglandinas responde mejor a los AINEs ya que éstos reducen la producción de prostaglandinas. La combinación de opioides con paracetamol y/o AINEs produce efecto analgésico sinérgico, lo que se utiliza comúnmente para dolor moderado. El dolor neuropático responde mejor a agentes coadyuvantes que no se utilizan generalmente para dolor nociceptivo. El uso preventivo de analgésicos se utiliza previo a una experiencia dolorosa, como cirugía, para prevenir el dolor post operatorio (American Pharmacist's Association, 2004).

Farmacocinética: corresponde a los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco por sí sólo o en interacción con otros fármacos.

Farmacodinamia: corresponde a los efectos del fármaco en su sitio de acción, su secuencia acción-efecto, relación dosis-efecto, y su modificación por interacción con otros factores locales u otros fármacos.

Paracetamol

Tiene efecto analgésico y antipirético, pero pobre efecto antiinflamatorio. Es el más utilizado para el manejo de dolor leve a moderado, y como primera línea de tratamiento de varios tipos de dolor. Se cree que su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de prostaglandinas a nivel central, y periféricamente bloqueando la generación de impulsos dolorosos (Taketomo C.K. y cols. 2001). También hay evidencia que sugiere que inhibe a COX-3 (Chandrasekharan NV y cols.2002). No tiene mayores interacciones con otros medicamentos, lo que lo hace un medicamento seguro para pacientes con polifarmacia, además de ser útil en

pacientes que presentan efectos adversos gastrointestinales a los AINEs debido a que presentan una débil inhibición en la síntesis de prostaglandina (American College of Rheumatology, 2000). El uso excesivo resulta en daño hepático y hepatotoxicidad. Debido a esto, la dosis diaria máxima recomendada es de 4grs. (Remington T.L. 2004) (Nourjah P y cols. 2002)

Anti Inflamatorios No Esteroidales (AINEs)

Los AINEs tienen acción analgésica, antipirética y antiinflamatoria. Ellos comprenden una amplia categoría de drogas con más de 20 diferentes compuestos en el mercado, y son comúnmente los más prescritos como analgésicos y antiinflamatorios. (American Pharmacist's Association, 2004)

Los principales efectos terapéuticos de los AINEs provienen de su capacidad de inhibir la producción de prostaglandinas. La primera enzima en la vía de síntesis de dichos intermediarios es la sintasa de prostaglandina G/H, llamada también ciclooxigenasa o COX, enzima que transforma el ácido araquidónico (AA) en los productos intermediarios PGG₂ y PGH₂, y que culmina en la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) y diversas prostaglandinas.

Se conocen dos formas de ciclooxigenasa, la forma 1 (COX1) y la forma 2 (COX 2). La COX-3 o también conocida como COX-1b es una enzima construida a partir del gen de la COX-1 más el intrón1 del ARN_m. Se encuentra presente en el corazón y principalmente en el encéfalo. Su acción es analgésica y antipirética al actuar sobre el hipotálamo. (Chandrasekharan N.V. y cols. 2002)

La COX 1 es predominantemente una isoforma constitutiva que aparece en casi todas las células y tejidos normales, en tanto que las citoquinas y los mediadores de inflamación que la acompañan inducen la producción de COX 2. Sin embargo, la COX 2 también se expresa en forma constitutiva en algunas zonas de riñones y encéfalo, y su actividad es inducida en las células endoteliales por fuerzas de cizallamiento laminar. Como dato importante, la isoforma constitutiva dominante en las células del epitelio gástrico es COX 1, pero no COX 2, y constituye la principal

fuente para la formación de prostaglandinas citoprotectoras. Los AINEs pueden inhibir en forma selectiva y no selectiva a la COX-2. (Brunton L. y cols. 2007)

Los inhibidores no selectivos, inhiben tanto COX-1 como a la COX-2, produciendo efectos terapéuticos y adversos, particularmente este último a nivel gástrico. Estos potenciales efectos secundarios llevaron al desarrollo de los inhibidores selectivos de la COX-2 (“coxibs”). Éstos presentan beneficios tales como reducción de la incidencia de úlceras gástricas, efectos mínimos sobre la agregación plaquetaria y aparentemente una acción más prolongada que los analgésicos convencionales. (Brunton L. y cols. 2007)

Las prostaglandinas no son las que producen el dolor directamente, sino que disminuyen el umbral para la transducción del dolor, vía sensibilización de nociceptores por bradiquinina e histamina. Luego, previniendo la producción de prostaglandinas, se reduce la sensibilidad de los nociceptores y se incrementa el umbral del dolor.

Cabe mencionar, que los AINEs son poco efectivos para estados dolorosos que tienen poca actividad de prostaglandinas como la presión del edema o dolores neuropáticos. (Ducharme J. 2000, Jackson y Lipman 2004)

Las prostaglandinas presentan otras funciones: rol citoprotectivo de la mucosa gástrica; incrementan el filtrado glomerular, por su efecto vasodilatador. El tromboxano A2 actúa como un potente agregante plaquetario.

Reacciones Adversas Medicamentosas (RAMs) de los AINEs

Podemos clasificar los efectos adversos de los AINEs según los órganos que afectan en (Brunton L. y cols. 2007):

- 1) Vías Gastrointestinales: dolor abdominal, náuseas, anorexia, erosiones o úlceras gástricas, anemia, hemorragia en vías GI, diarrea. Los efectos disminuyen con fármacos selectivos de COX-2 (coxibs).

- 2) Riñones: retención de sodio y agua, edema y empeoramiento de la función renal en sujetos con nefropatía, cardiopatía o cirrosis, disminución de la eficacia de los antihipertensivos, disminución de la eficacia de los diuréticos, disminución de la excreción de ácido úrico (en especial con AAS), hiperpotasemia.
- 3) Sistema nervioso central: cefalea, vértigo, mareos, confusión, depresión, disminución del nivel umbral de convulsiones, hiperventilación (salicilatos).
- 4) Plaquetas: inhibición de la activación de plaquetas, propensión a la aparición de hematomas, mayor riesgo de hemorragias. Los efectos disminuyen con fármacos selectivos de COX-2 (coxibs).
- 5) Hipersensibilidad: rinitis vasomotora, edema angioneurótico, asma, urticaria, hiperemia, hipotensión, choque.
- 6) Vasos: cierre del conducto arterioso.
- 7) Hígado: aunque casi todos los AINEs se han asociado a daño hepatocelular, las dos drogas que más comúnmente se relacionan a toxicidad son la aspirina y el paracetamol.
- 8) Embarazo: pueden prolongar el embarazo al disminuir las contracciones por bloqueo de la COX-1. Además, la administración prolongada de AINEs durante el tercer trimestre podría provocar el cierre del ductus arteriosus e inducir hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido, por el mismo bloqueo.

Clasificación de los AINEs

Los AINEs incluyen muy diversos compuestos que comparten actividades terapéuticas y efectos colaterales.

En este vasto grupo se incluyen los fármacos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y en la actualidad dentro de sus acciones farmacológicas debe

considerarse su efecto antiagregante plaquetario (Morita I. y Schindler M,1995, Brooks P. y cols. 1999).

Principales grupos químicos de AINEs (Pérez A. y cols. 2002):

Grupo Farmacológico	Inhibidores NO selectivos de las COXs	Inhibidores de la COX-2	selectivos
Derivados del	ÁCIDOS		
Ácido Salicílico	Ácido acetilsalicílico		
Ácido Enólico: - Pirazolonas - Pirazolidindionas - Oxicams	Metamizol o Dipirona Fenilbutazona Piroxicam, Tenoxicam	Meloxicam	
Ácido Acético: - Indolacético - Pirrolacético - Fenilacético - Naftilacéticos - Piranoindolacético	Indometacina Ketorolaco Diclofenaco Nabumetona	Etodolaco	
Ácido Propiónico:	Naproxeno, Ketoprofeno Dexketoprofeno, Ibuprofeno, Dexibuprofeno, Fenoprofeno		
Ácido Antranílico	Ácido Mefenámico	Amidas y ésteres meclofenamatos	
Ácido Nicotínico	Clonixina		
	NO ÁCIDOS		
Sulfonamidas		Nimesulida	
Paraaminofenoles	Paracetamol		
Coxibs		Celecoxibs, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib	

KETOROLACO TROMETAMOL

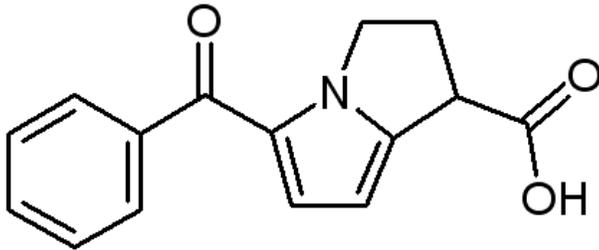


Fig. 1. Formula molecular de Ketorolaco Trometamol

Aspectos generales del ketorolaco.

El ketorolaco trometamol (KT) es un derivado del ácido pirrol-pirrónico con actividad analgésica potente, efecto antiinflamatorio y antipirético moderado. Su estructura química se relaciona con la indometacina y tolmetina. Su absorción es rápida, alcanzando su máxima concentración plasmática a los 30-40 minutos luego de su administración oral. Presenta un 99% de unión a proteínas plasmáticas y es metabolizado principalmente a través de la conjugación con ácido glucurónico; siendo su semivida de 5 a 7 horas (Smith 2009, Tripathi 2008). Es excretado por el riñón (Smith 2009); un 60% se excreta sin cambios en la orina (Tripathi 2008).

Su administración puede ser por vía intramuscular (IM), intravenosa (IV) u oral.

Estudios clínicos han determinado que dosis de ketorolaco IV o IM entre los 30mg y 90mg son comparables a dosis de morfina entre 6 y 12mg, de meperidina entre 50 y 100mg, y de propacetamol de 2mg en el tratamiento de dolor postoperatorio moderado (Macario y Lipman, 2001). Pese a que en el dolor

posoperatorio ha igualado la eficacia de la morfina, no interactúa con los receptores opiáceos y carece de los efectos colaterales de ésta. Al igual que otros AINE, inhibe la síntesis de prostaglandinas y alivia el dolor a través de un mecanismo periférico (Smith 2009).

Por vía oral se usa en dosis de 10 a 20 mg cada 6 hrs. para el manejo a corto plazo del dolor moderado. La dosis diaria máxima recomendada de ketorolaco vía oral es de 40mg (Sevarino y cols.1992, Reuben y cols. 1998) pero no debe ser utilizado por un lapso mayor a 5 días pues se ha establecido que causa úlceras gastrointestinales (Smith 2009)

En el dolor odontológico posoperatorio ha resultado mejor que 650 mg de AAS o 600 mg de paracetamol y equivalente a 400 mg de ibuprofeno (Tripathi 2008, Varrasi y cols. 1999, Mroszczak y cols. 1990). No obstante, su eficacia analgesia al ser utilizado como monoterapia es insuficiente para el tratamiento del dolor moderadamente severo y severo post cirugía mayor (Smith 2009).

Es el único AINE no selectivo actualmente disponible para uso inyectable en Estados Unidos, pero presenta los mismos efectos secundarios asociados a los AINEs incluyendo sangrado gastrointestinal y ulceraciones (Choo y Lewis 1993, Lewis 1994, Donald y cols. 2003).

Indicaciones:

El ketorolaco se usa con frecuencia en el dolor posoperatorio, odontológico y musculoesquelético agudo. También puede usarse para cólicos renales, migrañas y dolores debido a metástasis óseas.

El ketorolaco es indicado en el manejo del dolor agudo a corto plazo y dolor asociado a procedimientos quirúrgicos (Surender 2007).

Efectos adversos y Riesgos:

Se han informado náuseas, vómitos, dolor abdominal, dispepsias, úlceras gastrointestinales, diarrea, somnolencia, dolor de cabeza, mareos, nerviosismo,

prurito, dolor en el sitio de inyección, elevación de las transaminasas séricas y retención de líquidos (Tripathi 2008).

Riesgo en administración en embarazadas C y D durante el tercer trimestre (Echeverría 2003)

CLONIXINATO DE LISINA

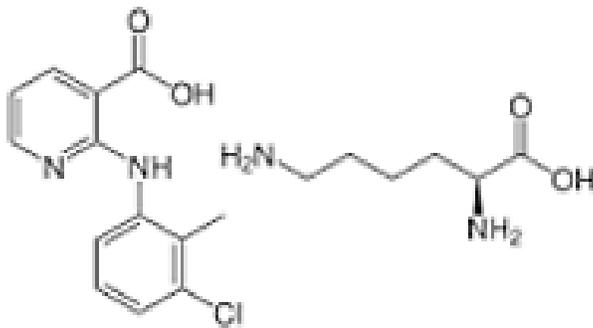


Fig 2. Formula Molecular del clonixinato de lisina

Aspectos generales del Clonixinato de Lisina

El clonixinato de lisina (CL) se ha descrito como un AINE, incorporado al Catálogo de Medicamentos y acreditado ante la Secretaría de Salud de Chile y también de otros países como Brasil (liberado por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA y disponible en el Sistema Único de SUS). Es un derivado antranílico semejante a la estructura química del ácido flufenámico. Su fórmula estructural (2-(3-cloro-o-toluidina) piridino- 3-carboxilato) permite una rápida absorción. El CL se une en un 96-98% a proteínas plasmáticas y sus resultados metabólicos hepáticos dan cuatro metabolitos inactivos diferentes. El 75% de su excreción es renal y 25% fecal (Aravena y cols. 2013). En animales, ha mostrado una vida media de 3 horas (Noronha y cols. 2009).

Se ha descrito que el CL inhibe la síntesis de las prostaglandinas interviniendo en una variedad de funciones fisiológicas, como el mantenimiento operativo de la barrera mucosa gástrica, la regulación del flujo sanguíneo renal y del tono endotelial. También juegan un papel importante en los procesos inflamatorios y nociceptivos. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre el mecanismo de acción de esta

clase de compuestos, como su habilidad para inhibir la formación de prostaglandinas dependientes de ciclooxigenasa (Noronha y cols. 2009, Aravena y cols. 2013). Según un estudio realizado por Paeile C. y cols. el CL ha demostrado un bloqueo en los canales de calcio, lo que explicaría en parte su acción analgésica, pues está demostrado que el calcio actúa directamente en la modulación del dolor a nivel central (Paeile y cols. 1994).

El CL es usado en cirugía oral como apoyo a otros AINEs. Estudios previos evidencian ser una droga antiinflamatoria, antipirética y analgésica con una rápida y efectiva acción clínica (Aravena y cols. 2013).

Puede ser usado por vía oral o parenteral en el tratamiento del dolor postoperatorio y es uno de los pocos AINEs disponibles para su administración vía I.V.

Tiene una excelente bio-tolerancia y baja incidencia de reacciones adversas medicamentosas. Un estudio de Quiralte y cols. encontró que los tres fármacos en mayores cantidades relacionados con reacciones adversas fueron el ácido acetilsalicílico (39,5%), el metamizol (26,1 %) y el paracetamol (7,8%), siendo el CL aquel medicamento con menores efectos adversos (Quiralte y cols. 1996).

Aunque el CL se ha estudiado como un buen analgésico postoperatorio en exodoncias dentales simples y en terceros molares, no se registran estudios sobre el beneficio en su uso como profilaxis analgésica en la reducción del dolor postoperatorio. De ser efectivo, su aplicación podría ofrecer mayor comodidad y confort a los pacientes sometidos a exodoncias simples o complejas que involucren mayor grado de trauma (Aravena y cols. 2013).

Indicaciones:

Su eficacia farmacológica es reconocida para el tratamiento de síndromes dolorosos, de moderados a severos, como cefaleas, dolores musculares, dolores renales, neurogénicos, articulares y dentales, dismenorrea, dolores postraumáticos o postquirúrgicos e incluso en el tratamiento de migraña (Orti y cols. 1999, Krymchantowski y cols. 2001, Krymchantowski y cols. 2005, Noronha y cols. 2009, Urizar y cols. 2013)

Efectos Adversos:

El CL presenta escasos efectos secundarios sobre el sistema digestivo y sobre la coagulación sanguínea (Torres y cols. 1998).

Interacciones Farmacológicas

Se denomina interacción farmacológica a la acción que un fármaco ejerce sobre otro, de modo que éste experimente un cambio cuantitativo o cualitativo en sus efectos. En toda interacción hay, pues, un fármaco cuya acción es modificada y otro u otros que actúan como precipitantes o desencadenantes de la interacción. En algunos casos, la interacción es bidireccional. En ocasiones, al asociar fármacos, se potencian sus efectos terapéuticos, ocurriendo este fenómeno con tal frecuencia que utilizamos esta interacción para obtener, mediante su asociación, un beneficio terapéutico (p. ej., diurético más β -bloqueante en la hipertensión arterial, corticoide más agonista β_2 inhalados en el asma o azatioprina más ciclosporina para la inmunodepresión post-transplante). En estos casos, la incidencia de interacción se acerca al 100 % de los casos (Flórez, 1997).

La interacción puede tener lugar en el nivel farmacocinético o en el nivel farmacodinámico (Tripathi, 2008):

1) Sinergia: Cuando la acción de un fármaco es favorecida o aumentada por el otro, se dice que son sinérgicos. En un par sinérgico, ambos fármacos pueden actuar en la misma dirección o uno puede ser inactivo cuando se administra solo pero, pese a ello, aumenta la acción del otro cuando se los administra juntos. La sinergia puede ser:

2) Aditiva: El efecto de los dos fármacos sigue la misma dirección y, simplemente, se suma

Efecto de los fármacos A + B = efecto del fármaco A + efecto fármaco B

3) Supraaditiva (potenciación): El efecto de la combinación es mayor que los efectos individuales de los componentes.

Efecto del fármaco A + B > efecto del fármaco A + efecto fármaco B

4) Antagonismo: Cuando un fármaco disminuye o anula la acción de otro, se dice que ambos son antagonistas:

Efecto de fármacos A + B < efecto fármaco A + efecto fármaco B

Por lo general, en un par de antagonistas, uno de los fármacos es inactivo como tal, pero disminuye el efecto del otro. Según el mecanismo involucrado, el antagonismo puede ser:

- a) Físico: Basado en la propiedad física de los fármacos
- b) Químico: Ambos fármacos reaccionan químicamente y forman un producto inactivo.
- c) Fisiológico o funcional: los dos fármacos actúan sobre diferentes receptores o por distintos mecanismos, pero ejercen efectos francos opuestos sobre la misma función fisiológica; es decir, tienen efectos farmacológicos de dirección opuesta.

5) Receptor: El antagonista interfiere con la unión del antagonista a su receptor o inhibe la generación de respuesta secundaria a esa unión. El antagonismo de receptores es específico.

Medición Experimental de Dolor: Modelos Animales de Dolor

La *American Veterinary Medicine Association* (AVMA) ha definido el dolor en animales como: “Una experiencia sensorial y emocional aversiva, que evoca acciones motoras protectoras, las que resultan en evitación aprendida y que pueden modificar rasgos de conducta especie-específicos, incluyendo comportamiento social” (Paeile y Bilbeny 2005). Por lo tanto, es el análisis de este tipo de conductas el que permite identificar en el animal las dimensiones sensodiscriminativa y emotiva

del dolor, percepción que en el contexto experimental recibe el nombre de nocicepción. Será entonces la antinocicepción el fenómeno de inhibición parcial o total de la respuesta nociceptiva, el cual es estudiado como una forma de predecir la capacidad de algún procedimiento (administración de un fármaco, técnica neuroquirúrgica, etc) para producir analgesia en el contexto clínico (Paeile y Bilbeny 2005).

Dentro de los parámetros que se pueden utilizar para evaluar la nocicepción en los animales caben mencionar; cambios en la condición corporal, en la apariencia física y signos clínicos, pero los más importantes son los indicadores fisiológicos y de comportamiento animal al dolor, éstos son: vocalización, alternaciones en la postura, alteraciones en la actividad locomotora como lamer, morder o rascar el área afectada (Le Bars y cols. 2005).

Existen pocos estudios de comportamiento de animales de laboratorio dedicados al estudio de la nocicepción en la región trigeminal. Además, con la excepción de los modelos de dolor neuropáticos del trigémino, la mayoría se basa en mediciones de umbrales o latencia relativamente breves ante estímulos nocivos específicos (térmicos, químicos, mecánicos, etc.). Si bien, proporcionan información valiosa, no corresponden a reminiscencia del dolor clínico. Dentro de la categoría de modelos de dolor nociceptivos, la prueba de la formalina es una de las más utilizadas (Capone y Aloisi 2004).

Prueba de la formalina

Esta prueba o test es un método algiesiométrico donde se inyecta una solución de formalina en la extremidad trasera del animal. Posee dos fases bien definidas: una fase temprana debida a la activación directa de los nociceptores que sigue a la injuria corrosiva que produce el irritante (fase 1), y luego una fase tardía debida a la organización de un foco inflamatorio en el sitio de la injuria y la sensibilización central y periférica que conlleva (fase 2) (Paeile y Bilbeny 2005). Tras la aplicación de la formalina, aparecen respuestas conductuales dirigidas hacia la extremidad injuriada como: lamido-mordisqueo, sacudidas, elevación y resguardo (Le Bars y cols. 2001).

La intensidad de las respuestas conductuales depende de la concentración de formalina que es administrada, presentando una relación lineal positiva entre concentración y amplitud de la actividad de frotamiento con concentraciones de hasta 5%, induciendo una respuesta nociceptiva creciente. El uso de concentraciones mayores no se traduce en una mayor expresividad nociceptiva. De hecho, concentraciones mayores al 2,5% pueden incluso inducir una conducta de inmovilidad del animal durante largos períodos (Capone y Aloisi 2004, Paeile y Bilbeny 2005).

Prueba de la formalina orofacial

El test de la formalina ha sido adaptado por Luccarini (Luccarini y cols. 2006) para el estudio del dolor orofacial, con el fin de medir el dolor originado en la estimulación del nervio trigémino. Este método permite discriminar con menor daño tisular el efecto de la administración de formalina, observándose tras la aplicación del irritante un aumento en el acicalamiento facial, expresado por parte del ratón como frotamiento o rascado de la cara.

Este ensayo tiene una duración de 30 minutos y presenta una respuesta nociceptiva bifásica:

- Fase I: fase algésica o de dolor agudo, los nociceptores perciben la irritación química provocada por la formalina. Comienza en el minuto 0 (inmediatamente después de realizada la inyección) y termina al minuto 5 de realizada la punción.
- Fase II: fase inflamatoria, ocurre debido a la organización de un foco inflamatorio en el sitio de la injuria con la consecuente sensibilización central y periférica. Comienza al minuto 20 de realizada la inyección y termina al minuto 30 posterior a ésta.

El tiempo comprendido entre ambas fases, es decir, desde el minuto 5 al 20 posteriores a la inyección, se denomina periodo de latencia y no se contabiliza debido a que el ratón se encuentra en una etapa de quietud.

En la práctica clínica el tratamiento farmacológico del dolor debiese perseguir el objetivo de conseguir la máxima analgesia a las menores dosis de fármacos, a fin de disminuir las reacciones adversas medicamentosas asociadas a su administración. En pos de ello, en este estudio se evaluará la interacción analgésica inducida por ketorolaco, clonixinato de lisina y su combinación, usando como método algesiométrico el de la formalina orofacial de Luccarini.

HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal (i.p.) de la asociación de clonixinato de lisina con ketorolaco produce actividad antinociceptiva sinérgica, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la actividad antinociceptiva de clonixinato de lisina, de ketorolaco y de la combinación de ellos en el test de la formalina orofacial en ratones.

Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de clonixinato de lisina en el test de la formalina orofacial.
- 2.- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de ketorolaco en el test de la formalina orofacial.
- 3.- Calcular, a partir de las respectivas curvas dosis-respuesta, la dosis que produce el 50 % del efecto máximo (DE_{50} del $Emáx$).
- 4.- Evaluar la naturaleza de la interacción farmacológica de Ketorolaco con Clonixinato de lisina en el ensayo de la formalina antes mencionado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron 108 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa CF/1 de 25 a 30g de peso y habituados al ambiente del laboratorio al menos dos horas antes del experimento, manteniéndose en condiciones de temperatura y humedad ambiental ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), iluminación artificial y un espacio adecuado que permitió libertad de movimiento y libre acceso a agua y comida (Luccarini y cols. 2006, Miranda y cols. 2009), de acuerdo al protocolo CBA N° 238 FMUCH aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina (Anexo 1). Cada animal recibió solamente una dosis de la droga, las observaciones fueron efectuadas en forma ciega, aleatoria y controladas con solución salina al 0.9 % provenientes de datos históricos del laboratorio. Se deja constancia que, basándose en las normas éticas internacionales que rigen este tipo de experimentación, el número de animales utilizados fue el mínimo estrictamente necesario para un correcto análisis estadístico. Los animales se sacrificaron después del experimento mediante dislocación cervical, bajo sobredosis de anestesia (60 mg/kg de pentobarbital) por personal experimentado.

Administración de los Fármacos

Todos los fármacos y materiales utilizados fueron suministrados por el Laboratorio de Neurofarmacología del Dolor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile:

- Fármacos: Ketorolaco Trometamol (KT) Y Clonixinato de Lisina (CL).
- Soluciones: Formalina al 2% y Solución salina al 0,9%.
- Jeringas: Tuberculina (1 ml) para inyección intraperitoneal (i.p.).
Hamilton (50 μL) para inyección subcutánea.
- Aguja: 27 Gauge.
- Cronómetro digital.

Para la habituación de los ratones éstos se dispusieron en un cilindro de observación.

Los fármacos fueron disueltos en solución salina y se administraron (i.p.) en una relación constante de 10 ml/kg de peso y administrados i.p.

Las dosis utilizadas fueron 15, 30, 45 y 60 mg/kg para KT, y dosis de 12,5, 25, 50 y 100mg/kg de CL. Se usaron dichas dosis en base a curvas dosis-respuesta determinadas en estudios previos, que indican que los valores de DE₅₀ se ajustan a este rango de concentraciones (Miranda y cols. 2007, Miranda y cols. 2009).

La inyección intraperitoneal se realizó 30 minutos antes del ensayo algiesométrico orofacial de la formalina, puesto que existe evidencia previa que demuestra que es el tiempo de latencia necesario para alcanzar el efecto analgésico máximo de ambos fármacos (Miranda y cols. 2007, Miranda y cols. 2009).

Los animales usados como grupo control fueron tratados con suero fisiológico i.p.. Se esperó el mismo tiempo para realizar el test de la formalina.

Test de la formalina

La evaluación de la actividad antinociceptiva se efectuó usando una modificación del test algiesométrico orofacial de la formalina de Luccarini (Luccarini y cols. 2006), que permite medir dolor originado en la estimulación del nervio trigémino. Para ello se realizó una inyección subcutánea de 20 µL de solución de formalina al 2% en el labio superior del animal, lo cual induce un sostenido frotamiento de la zona inyectada. Los ratones se colocaron en un cilindro diseñado para la observación y con un cronómetro digital se midió el tiempo total que se frotaron el área perinasal durante los 5 minutos inmediatos a la inyección y que corresponde a la fase algésica aguda (fase I). Luego se registró por 10 minutos, a partir de los 20 minutos de la inyección y hasta los 30 minutos, el tiempo durante el cual los animales se frotaron el labio comprometido y que corresponde a la fase inflamatoria, 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 (Luccarini y cols. 2006). Los resultados se expresaron en segundos de frotamiento registrados en cada intervalo (mediante un cronómetro digital).

El grado de intensidad del dolor fue evaluado por el tiempo total que el animal realizó el frotamiento de su labio superior con una de sus extremidades.

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 obtener el efecto máximo de cada droga, el cual ha sido determinado previamente por ensayos preliminares en el laboratorio.

Como criterios de exclusión se consideraron una inyección incompleta de formalina o un excesivo sangrado en el sitio de inyección.

Diseño Experimental

Los ensayos fueron ejecutados en forma ciega, aleatoria y controlados con solución salina. El tamaño total de la muestra fue de 108 ratones ($n=108$) (ver anexo 2), los cuales se dividieron en 5 grupos experimentales:

- a) Grupo tratado con KT: ratones inyectados con KT por vía i.p. con dosis de 15, 30, 45 y 60 mg/kg. Para cada una de las dosis se utilizó 6 animales.
- b) Grupo tratado con CL: ratones inyectados con CL por vía i.p. con dosis de 12,5, 25, 50 y 100 mg/kg. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.
- c) Grupo tratado con mezcla de KT y CL durante Fase I: ratones inyectados por vía i.p. con una mezcla que contiene a cada fármaco en una proporción 1:1, en fracciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus correspondientes DE_{50} durante la fase I. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.
- d) Grupo tratado con mezcla de KT y CL durante Fase II: ratones inyectados por vía i.p. con una mezcla que contiene a cada fármaco en una proporción 1:1, en fracciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus correspondientes DE_{50} durante la fase II. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.
- e) Grupo control: ratones inyectados por vía i.p. con solución salina al 0,9%. Se utilizaron 12 animales.

Evaluación de la analgesia

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva de clonixinato de lisina se construyó una curva dosis-respuesta, administrando por vía i.p. a 6 animales para cada concentración de: 12,5, 25, 50 y 100 mg/kg. Para el ketorolaco se usaron concentraciones de 15, 30, 45 y 60 mg/kg. Ambos fármacos fueron administrados 30 minutos antes de la inyección de formalina.

Estudio de la interacción antinociceptiva

La evaluación de la actividad antinociceptiva de cada fármaco en forma individual se realizó mediante la construcción de curvas dosis-respuesta, usando al menos 6 animales por cada una de las cuatro dosis administradas. Estas curvas se construyeron utilizando el logaritmo de las dosis en la abscisa y el efecto antinociceptivo, expresado como máximo efecto posible (MEP), en la ordenada. El valor del máximo efecto posible (MEP) representa la antinocicepción o actividad analgésica, se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula (Tallarida 2000, Tallarida 2001).

$$\%MEP = 100 - \left[\left(\frac{\text{tiempo de rascado experimental}}{\text{tiempo de rascado control}} \right) \times 100 \right]$$

A partir de las curvas dosis-respuesta de cada fármaco, se ajusta una recta por análisis de regresión lineal (utilizando mínimos cuadrados), permitiendo calcular la dosis que produce un 50% del efecto máximo posible (DE₅₀) de antinocicepción, cuando cada fármaco es administrado solo (Tallarida 2001).

Para la evaluación de las interacciones se utilizó el método del cálculo isobologramas.

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar del promedio (EEM). Los datos obtenidos se expresaron en curvas logarítmicas dosis–respuestas construidas mediante regresión lineal por cuadrados mínimos y a partir de ellas se determinaron las DE_{50} . Los parámetros estadísticos, se calcularon con el programa computacional del laboratorio, y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza y pruebas t de Student, considerando un nivel del 5% ($p < 0,05$).

Los valores de DE_{50} de cada fármaco que arrojó la prueba de la formalina orofacial, fueron las dosis equiefectivas utilizados en el análisis isobolográfico.

Análisis isobolográfico

Con el propósito de evaluar la interacción producida entre los fármacos, durante ambas fases, se utilizó el método isobolográfico descrito por Tallarida (Tallarida 2000), modificado por el Programa Pharm Tools Pro, versión 1.27 (McCary Groups, Inc., PA, U.S.A.) comprado por el Laboratorio de Neurofarmacología del Dolor. Este programa permite conocer si existe interacción entre los fármacos, de qué tipo es esta interacción y cuál es su magnitud.

Esto se logra a través de representaciones gráficas de dosis equiefectivas de cada fármaco. Para ello, se administró de forma conjunta ambos fármacos, en proporciones de 1:1, por vía i.p. 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus DE_{50} , en un esquema de proporciones fijas, tanto para la fase I como para la fase II. Luego, estas curvas dosis-respuesta fueron analizadas mediante regresión lineal del logaritmo por medio de cuadrados mínimos (mínimo seis animales de cada dosis) para calcular las DE_{50} de las mezclas. Esta dosis se comparó estadísticamente con la DE_{50} que representa teóricamente la adición simple de efectos (por medio de t Student), que se obtiene con la siguiente fórmula:

$$DE_{50} \text{ aditividad teórica} = \frac{DE_{50} \text{ droga 1}}{P1 + R \times P2}$$

Donde, **R**: relación de potencia entre los fármacos administrados por separado.

P1: proporción de ketorolaco en la mezcla.

P2: proporción de clonixinato de lisina en la mezcla.

El punto experimental resultante se grafica en un sistema de coordenadas cartesianas que contiene una línea que conecta la DE_{50} KT en la abscisa con la DE_{50} de CL en la ordenada (línea de aditividad simple o teórica). La región del gráfico donde se ubica el valor o punto experimental en relación al valor teórico determina el tipo de interacción (Tallarida 2001):

- Interacción sinérgica o supraaditiva: si el punto experimental se ubica bajo la línea de aditividad y es estadísticamente diferente del valor teórico de la DE_{50} .
- Interacción aditiva: si el punto se ubica cerca de la línea de aditividad y además estadísticamente no es diferente de la DE_{50} teórica.
- Interacción antagónica o subaditiva: si el punto experimental se sitúa sobre la línea de aditividad y es estadísticamente distinto de la DE_{50} teórica.

Por otra parte, el programa permite conocer el índice de interacción (I.I) de los fármacos, valor que confirma la naturaleza de la interacción entre las drogas, a través de esta fórmula (Tallarida 2000):

$$\text{Índice de interacción} = \frac{DE_{50} \text{ experimental}}{DE_{50} \text{ teórica}}$$

El cociente permitirá identificar la magnitud de la interacción, valores menores a 1 indican una interacción sinérgica; si es igual a 1 es de tipo aditiva y si es mayor a 1 es de tipo antagónica (Tallarida 2000, González y cols. 2011).

Análisis Estadístico

Todos los parámetros se calcularon con el software Pharm Tools Pro, version 1.27 (McCary Groups, Inc., PA, U.S.A) elaborado en base a las publicaciones de Tallarida. En este estudio los resultados se consideran como el promedio \pm error estándar de la media o promedio (E.E.M.) o con su límite o intervalo de confianza correspondientes al 95% (LC 95%). La significación estadística se determinó a través de análisis de varianza ANOVA (curvas dosis-respuesta) y por pruebas *t* Student (comparar los puntos experimental y teórico en los isobogramas) considerando la significancia a un nivel del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Grupo control

La administración de 10 mg/Kg de solución salina al 0,9% vía i.p. 30 minutos antes de la administración de formalina al 2% en el labio superior produjo un tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal de $95,30 \pm 3,45$ segundos para la fase I ($n=12$) y de $101,76 \pm 3,62$ segundos para la fase II ($n=12$).

2. Grupo tratado con Ketorolaco.

La administración i.p. de Ketorolaco, da como resultado una actividad antinociceptiva dosis-dependiente tanto en la fase algésica aguda (fase I), como en la fase inflamatoria (fase II) con respecto al grupo control, que se expresa en una disminución del tiempo de frotamiento, ver tabla n°1.

Tabla n°1. Tiempo promedio de rascado, en segundos, durante la primera y segunda fase del test de la formalina orofacial al 2% del grupo tratado con KT, con sus respectivos E.E.M. n=6 para cada dosis. * p <0,05 respecto del control.

Dosis (mg/kg)	Tiempo de rascado Fase I (s)	Tiempo de rascado Fase II (s)
<i>Control</i>	95,30 ±3,45	101,76± 3,62
15	91±14,9*	90,67±17,25*
30	53,50±7,98*	61,17±11,84*
45	35,67±6,21*	32,67±11,18*
60	16,17±1,40*	22,67±3,59*

Así, para el cálculo efectivo de la DE₅₀ en fase I, se realiza una curva dosis-respuesta antinociceptiva, expresada en el logaritmo de la dosis de ketorolaco versus el porcentaje del efecto máximo esperado (sigla en inglés, MPE), según se muestra en el gráfico 1. En este caso la DE₅₀ resultó ser 32.483 ± 0.815 mg/kg.

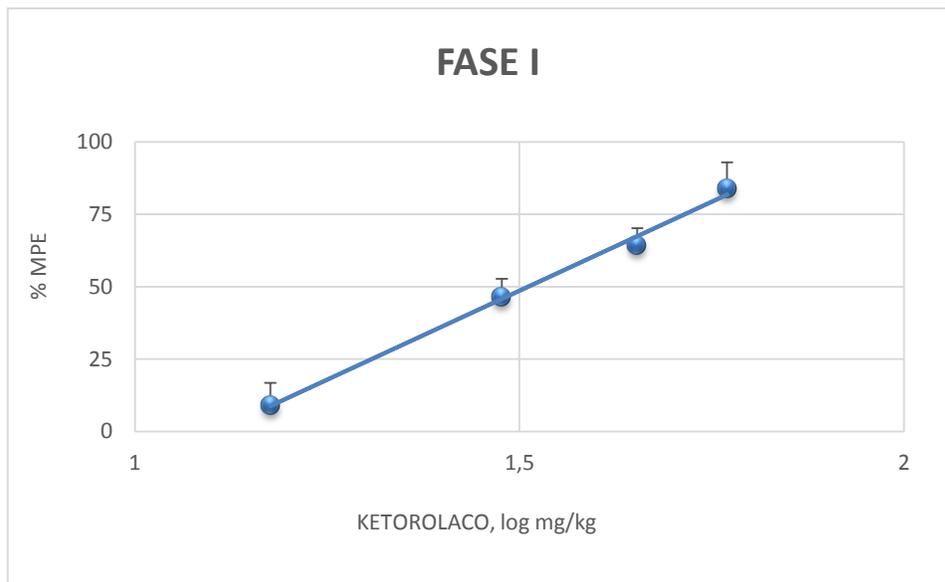


Gráfico 1. Curva dosis-respuesta para la administración de Ketorolaco i.p. en fase I. Cada punto en

el gráfico representa el promedio ± EEM de al menos 6 animales.

En el caso de la fase II, el cálculo de la DE50 se obtuvo mediante la curva dosis-respuesta antinociceptiva que se aprecia en el gráfico 2:

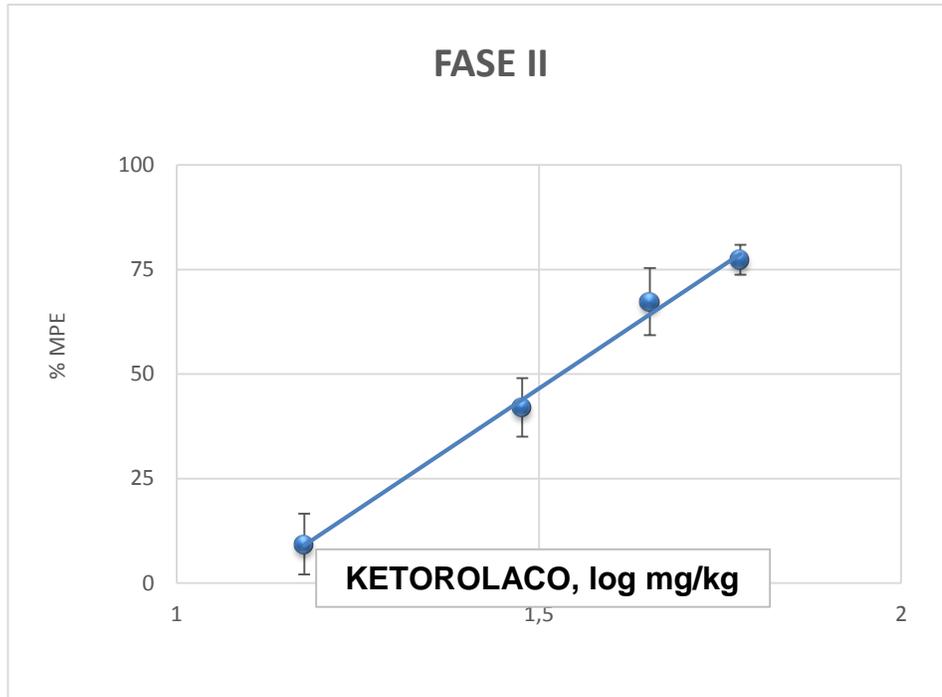


Gráfico 2. Curva dosis-respuesta para la administración de Ketorolaco i.p. en fase II.
Cada punto en el gráfico representa el promedio \pm EEM de al menos 6 animales.

A partir de esto, se obtiene una DE50 de 33.868 ± 0.920 mg/kg.

3. Grupo tratado con Clonixinato de Lisina.

La administración i.p. de Clonixinato de Lisina, en el ensayo de la formalina orofacial, indujo una respuesta antinociceptiva dosis-dependiente en relación a la fase I y la fase II, observándose estos resultados en la tabla n°3 y en los gráficos 3 y 4.

La DE50 resultó ser de $30.066 \pm 1,020$ mg/kg en la fase I, mientras que en la fase II fue de $22.311 \pm 1,284$ mg/kg.

Tabla n°2. Tiempo promedio de rascado, en segundos, durante la primera y segunda fase del test de la formalina orofacial al 2% del grupo tratado con CL, con sus respectivos E.E.M. n=6 para cada dosis. * p <0,05 respecto del control.

Dosis (mg/kg)	Tiempo de rascado Fase I (s)	Tiempo de rascado Fase II (s)
Control	95,30 ±3,45	101,76± 3,62
12,5	59,086±7,83*	60,54±2,48*
25	50,985±6,16*	48,84±7,07*
50	40,026±5,87*	38,495±7,67*
100	31,83±9,06*	22,794±3,72*

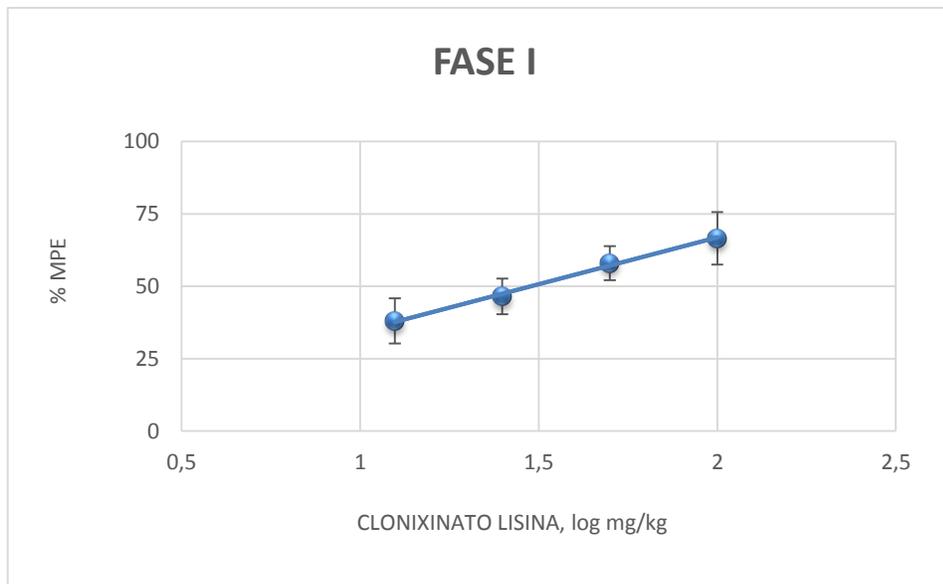


Gráfico 3. Curva dosis-respuesta para la administración de Clonixinato de Lisina i.p. en fase I. Cada punto en el gráfico representa el promedio ± EEM de al menos 6 animales.

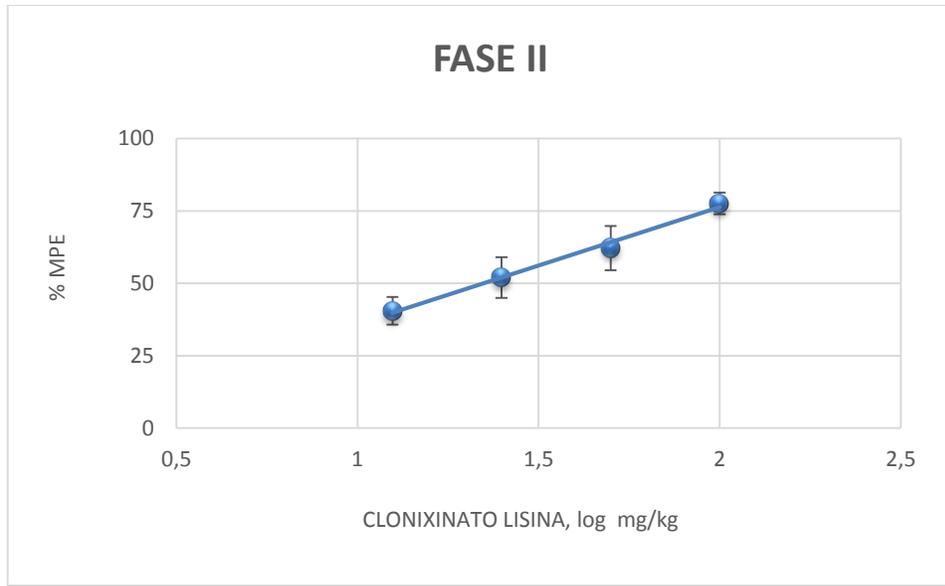


Gráfico 4. Curva dosis-respuesta para la administración de Clonixinato de Lisina i.p. en fase II. Cada punto en el gráfico representa el promedio \pm EEM de al menos 6 animales.

Grupo tratado con mezcla DE₅₀ de Ketorolaco y Clonixinato de Lisina durante la Fase I

Al administrar por vía intraperitoneal la combinación de ketorolaco trometamol y clonixinato de lisina en proporción fija (1:1) de cada una de sus respectivas mezclas de DE₅₀ (1/2, 1/4, 1/8, 1/16), se obtuvo una disminución de la actividad antinociceptiva dosis dependiente, con respecto al grupo control durante la fase I entre 0 y 5 minutos (ver tabla n°3 y gráfico 5).

Tabla n°3. Tiempo promedio de rascado, en segundos, durante la primera fase del test de la formalina orofacial al 2% del grupo tratado con mezcla KT/CL, con sus respectivos E.E.M. n=6 para cada dosis. * p <0,05 respecto del control.

Fracción de la mezcla de DE ₅₀ KT/CL	Dosis (mg/kg)	Tiempo de rascado Fase I (s)
Control		95,3 \pm 3,45
1/2	31,27*	46,697 \pm 3,72
1/4	15,635*	57,18 \pm 7,67*
1/8	7,8175*	65,757 \pm 7,07*
1/16	3,90875*	75,287 \pm 6,83*

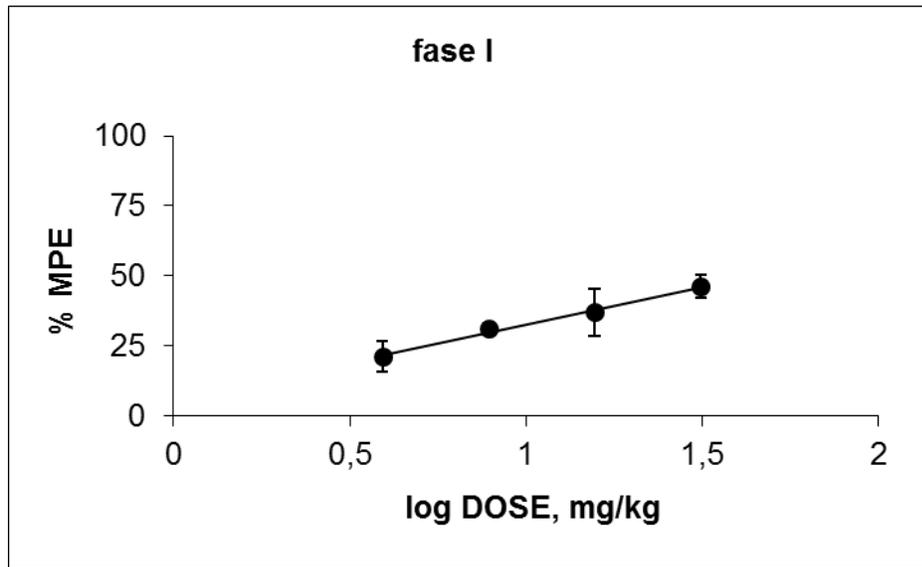


Gráfico 5. Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de la mezcla KT/CL en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm E.E.M (n=6 para cada dosis).

Grupo tratado con mezcla DE₅₀ de Ketorolaco y Clonixinato de Lisina durante la Fase II

Al administrar por vía intraperitoneal la combinación de ketorolaco trometamol y clonixinato de lisina en proporción fija (1:1) de cada una de sus respectivas mezclas de DE₅₀ (1/2, 1/4, 1/8, 1/16), se obtuvo una disminución de la actividad antinociceptiva dosis dependiente, con respecto al grupo control durante la fase II entre 20 y 30 minutos (ver tabla n°4 y gráfico 6).

Tabla n°4. Tiempo promedio de rascado, en segundos, durante la primera fase del test de la formalina orofacial al 2% del grupo tratado con mezcla KT/CL, con sus respectivos E.E.M. n=6 para cada dosis. * p <0,05 respecto del control.

Fracción de la mezcla de DE ₅₀ KT/CL	Dosis (mg/kg)	Tiempo de rascado Fase II (s)
Control		101,76±3,62
1/2	28,05*	46,697±3,72
1/4	14,042*	57,18±7,67*
1/8	7,021*	65,757±7,07*
1/16	3,51*	75,287±6,83*

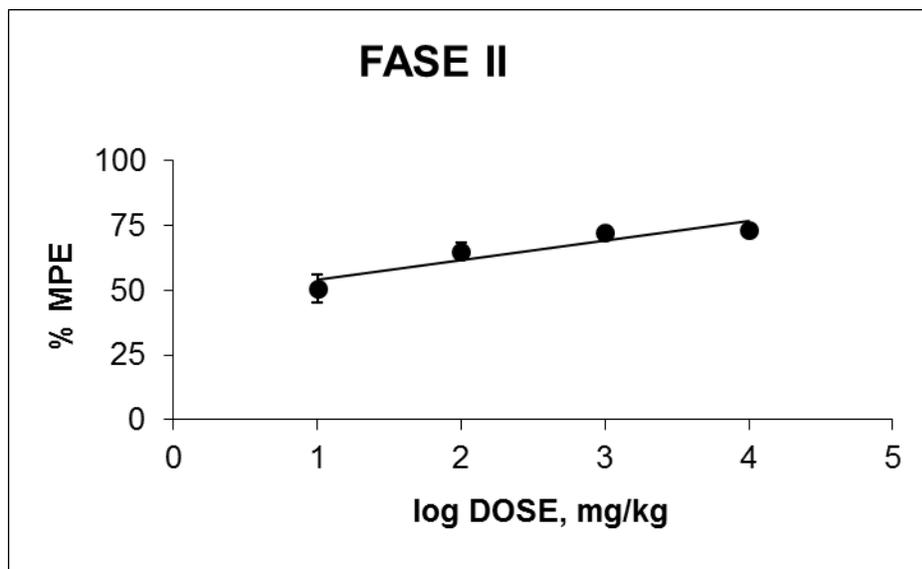


Gráfico 6. Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de la mezcla KT/CL en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio ± E.E.M (n=6 para cada dosis).

4. Análisis isoblográfico de la interacción de Ketorolaco y Clonixinato de Lisina:

Al realizar el análisis isoblográfico de la combinación de ketorolaco con clonixinato de lisina, se observa una interacción de antinocicepción de tipo Aditiva para la fase I, correspondiente a la fase aguda del dolor, con un índice de interacción de 1.401.

Para la fase II del proceso doloroso, correspondiente a la fase inflamatoria, vemos una antinocicepción de tipo Supraaditiva con un índice de interacción de 0.085. Esto es debido a la ubicación del punto experimental, el cual se encuentra sobre la línea de aditividad teórica en la fase I y bajo la línea en la fase II, visto esto en los respectivos gráficos 7 y 8.

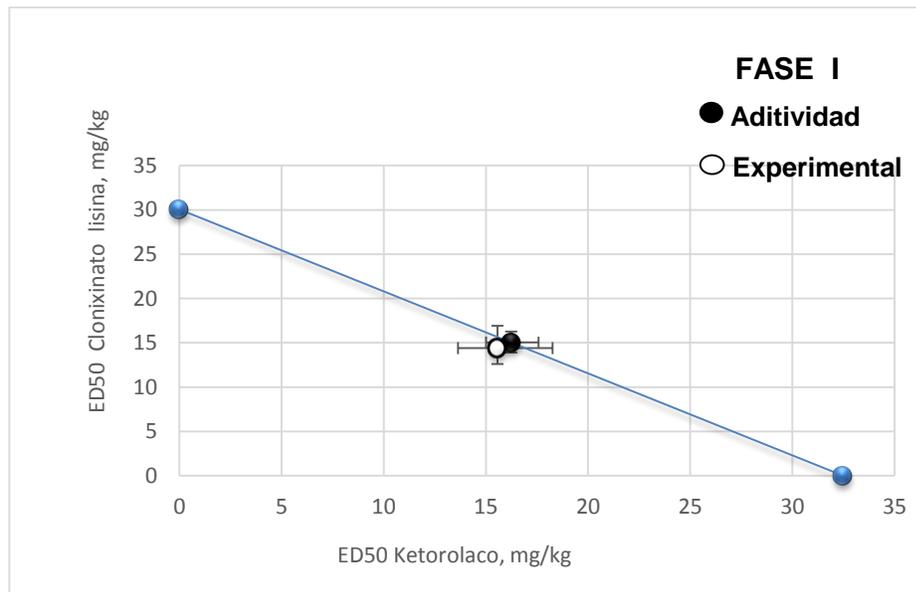


Gráfico 7. Isoblograma de la interacción antinociceptiva de Ketorolaco y Clonixinato de Lisina en fase I, en el test de formalina orofacial. El punto negro sobre la línea de aditividad, representa el punto de actividad teórica de la combinación, mientras que el punto blanco representa el punto de aditividad experimental, cada uno con sus límites de confianza al 95%.

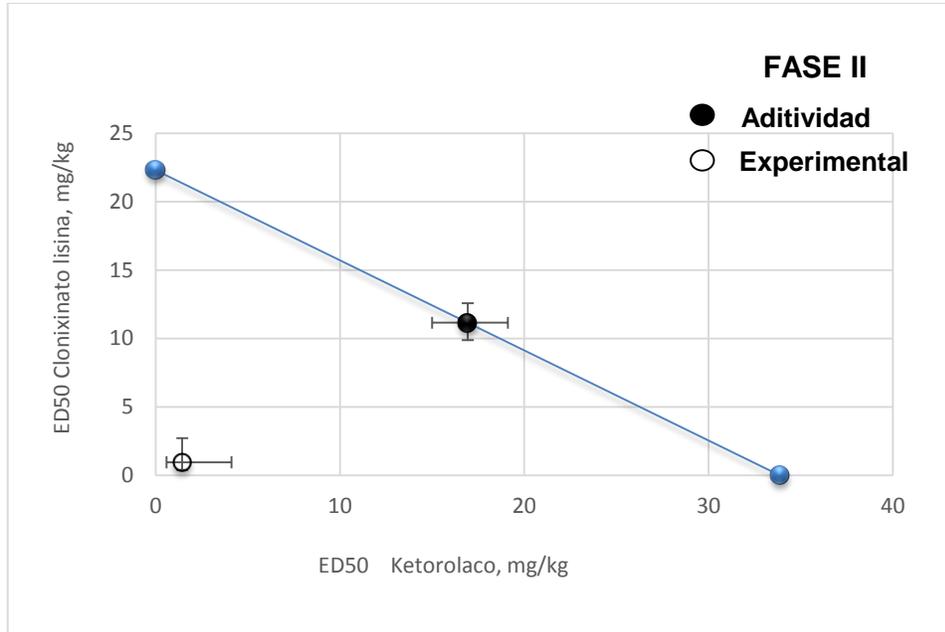


Gráfico 8. Isoblograma de la interacción antinociceptiva de Ketorolaco y Clonixinato de Lisina en fase II, en el test de formalina orofacial. El punto negro sobre la línea de aditividad, representa el punto de actividad teórica de la combinación, mientras que el punto blanco representa el punto de aditividad experimental, cada uno con sus límites de confianza al 95%.

DISCUSIÓN

Existen diversas razones por las cuales los pacientes acuden a la consulta odontológica. La percepción de dolor es quizás el motivo de consulta espontáneo más común, por lo que el manejo de éste resulta de suma importancia en la práctica clínica.

Un enfoque multidisciplinario y un correcto diagnóstico son la clave para el éxito en el alivio del dolor. Una vez que se determina utilizar una terapia farmacológica existe un amplio espectro de medicamentos a considerar. Se sabe que la inflamación es en gran medida la responsable del dolor odontogénico, es por ello que los AINEs han resultado ser una excelente alternativa por su gran eficacia en el alivio del dolor, que se basa en un efecto antiinflamatorio y/o analgésico importante (Hargreaves y Abbott, 2005).

El test algesiométrico de la formalina orofacial utilizado en este trabajo, permite cuantificar el efecto antinociceptivo de fármacos en un modelo experimental con animales. Corresponde a uno de los modelos de dolor experimental más adecuados e útil para estudiar dolor en el territorio trigeminal, ya que se considera similar a la respuesta dolorosa en humanos, porque el estímulo (formalina) genera una reacción nerviosa desde las fibras A δ y C, neuronas del asta dorsal de la médula y núcleos del trigémino, así como el rascado o frotamiento por parte del animal es una respuesta directa a ésta. Esta prueba además, posee la ventaja que junto con el hecho de utilizar bajas concentraciones de formalina que permiten estudiar de manera fiable el proceso nociceptivo, es un modelo que resalta por su sencillez de ejecución (Luccarini y cols. 2006).

En el presente estudio, se puede determinar que tanto el clonixinato de lisina como el ketorolaco presentan una respuesta antinociceptiva dosis-dependiente. Esto se deduce, pues los tiempos de rascado de los animales (comportamiento que expresa dolor) tratados farmacológicamente presentaron una disminución significativa con

respecto al grupo control. Paralelamente, los resultados obtenidos por Pallapies y cols. en 1995, en un estudio *ex vivo* en ratas en el cual compararon la liberación de prostaglandinas al inyectar dosis de ambos fármacos en diferentes órganos determinaron la misma relación antinociceptiva (Pallapies y cols. 1995).

Además se observó que la respuesta antinociceptiva que producen los fármacos administrados es dosis dependiente tanto para la fase I como para la fase II. Todos estos resultados concuerdan con investigaciones previas que demuestran que la administración sistémica de AINEs produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente en diversos modelos algiesiométricos en animales, como la prueba de contorsiones abdominales (*writhing test*), de la retirada de cola (*tail-flick*) y de la pata trasera (*hind paw model*) (Dionne y Berthold 2001, Anthony y Jasinsky, 2002).

La administración i.p de CL y KT por separado, produce en este experimento una mayor analgesia en la fase II comparado con la fase I para CL y similares valores para KT. Este resultado difiere con lo concluido por Padi y cols. en el año 2006 (Padi y cols. 2006), en donde tras la administración sistémica de ketorolaco o diclofenaco (10 y 30 mg/Kg i.p) en el test de la formalina orofacial en ratas, disminuye significativamente la respuesta nociceptiva en la fase II, pero no en la fase I en el test. Estas diferencias podrían deberse a variaciones en las mediciones de tiempo de rascado, pero no concordarían con revisiones sistemáticas previas (Macario y Lipman, 2001) que indican que KT posee una actividad nociceptiva a nivel de COX-1 y COX-2 que indican actividad analgésica en fases I y II, en concordancia con lo concluido en este estudio.

Se ha reportado que algunos inhibidores específicos de la COX-1 bloquean la expresión de RNAm de canales iónicos sensibles al ácido en neuronas del asta dorsal, los cuales son dramáticamente up-regulados durante la inflamación (Voilley y cols. 2001, Gu y Lee 2010). Ketorolaco es llamado un inhibidor no selectivo de las COX, actualmente preferente para COX-1. Por lo tanto cabe la posibilidad que el KT además de disminuir la producción de PGs, pueda inhibir directamente la

expresión del RNAm en los nociceptores de los canales iónicos sensibles al ácido (Macario y cols. 2001).

Poco se sabe acerca del CL, su mecanismo de acción o sus interacciones con otros medicamentos. Estudios previos han postulado que su acción analgésica tendría relación tanto con una inhibición moderada de las ciclooxigenasas (Pallapies D. y cols, 1995-1996), como con un bloqueo en los canales de calcio en las células presinápticas, (Bustamante y cols. 1988, Paeile y cols. 1988, Bustamante y cols. 1989, Miranda y cols. 1990). Nuestros resultados muestran una disminución en el tiempo de rascado para las fases I y II, siendo significativamente mayor para la fase II, correspondiente a dolor inflamatorio (ver tabla 2); esto apunta sin duda a una actividad sobre las ciclooxigenasas.

Los resultados de esta investigación, que indican una relación positiva antinociceptiva en la región orofacial, se suman a los resultados obtenidos por Kramer y cols. en el año 2000, que apuntaron que el CL no produciría una modificación en la función plaquetaria y por lo tanto tendría utilidad clínica en aquellos pacientes con problemas de coagulación. Esto además sugiere una leve actividad sobre COX-1, y consecuentemente una mayor actividad sobre COX-2, en concordancia con lo concluido por Gimeno y cols. en 1999 (Franchi y cols. 1999, Kramer y cols, 2000).

Al revisar la literatura disponible, se encuentra sólo un estudio que compara la actividad de CL versus KT (Pallapies y cols., 1995). En el presente trabajo, al analizar los resultados de la administración conjunta de CL con KT en ratones, se observa que la combinación de ambos fármacos obtuvo como resultado una interacción antinociceptiva de tipo supraaditiva o sinérgica para la fase II y aditiva para la fase I. Esto se concluye a partir de la ubicación del punto experimental, que está bajo la línea del isobolo, y se acompaña con índices de interacción (I.I.) estadísticamente menores a 1 en la fase II (fase I= 0,959; fase II= 0,110). El sinergismo producido por estos fármacos en la fase II, es concordante con la teoría general de interacción de drogas, que establece que la combinación de fármacos

es más efectiva que la acción que tienen cuando actúan en forma individual (a través de mecanismos de acción analgésicos diferentes) por lo tanto, la posibilidad de que actúen de forma supraaditiva es mayor. Para lograr esta acción sinérgica los AINEs exhiben su acción antinociceptiva a través de diversos mecanismos distintos a la inhibición de síntesis de PGs, como modulación de opioides endógenos, mecanismos serotoninérgicos y noradrenérgicos, y activación de vías óxido nítrico (NO) – GMP cíclico (GMPc) (Barrera y cols. 2005, Miranda y cols. 2007). Diferentes vías son activadas a diversos niveles por distintos AINEs en orden de reducir la transmisión del impulso nociceptivo, lo que determina la base de la acción sinérgica al combinarlos, dado que si sólo una misma vía fuese activada se obtendría simple aditividad. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que se produce una interacción supraaditiva en esta investigación no puede ser establecida con la metodología de este estudio.

En relación a la interacción de tipo aditiva obtenida para la fase I, podría explicarse gracias a que el CL presenta una acción moderada en la inhibición de ciclooxigenasas y menor aún en COX-1, principal responsable de la respuesta nociceptiva durante la fase I, por lo que el CL no tendría mayor participación en la actividad sinérgica en la fase I, a diferencia del KT el cual presenta gran efectividad en inhibición de COX-1 y COX-2. Además, esta acción más efectiva en fase II que en fase I, podría deberse a que la acción antinociceptiva del CL vía bloqueo de canales de calcio demoraría más tiempo en ser expresada, por lo que se mostraría más allá de los primeros 5 minutos que corresponden a la fase I (Bustamante y cols. 1988, Paeile y cols. 1989), sin embargo no existe evidencia que confirme esta teoría, por lo que se requieren más estudios.

En el presente trabajo se demostró la actividad analgésica de CL y KT para ambas fases del ensayo orofacial de la formalina, y que la asociación entre ambos AINEs producen un efecto supraaditivo o sinérgico en la fase II, y un efecto de aditividad simple en la fase I. Si bien estos resultados han sido obtenidos utilizando sólo un modelo de dolor animal, ellos son suficientemente positivos para estimular la generación de futuras investigaciones con otros modelos de nocicepción.

La utilidad clínica de esta investigación radica en que al coadministrar CL y KT se produce un efecto antinociceptivo sinérgico en la fase inflamatoria del dolor, con lo cual es posible disminuir las dosis terapéuticas individuales necesarias de cada fármaco, reduciendo de esta manera los efectos adversos propios de los AINEs que restringen su uso. Esta asociación podría constituir una nueva herramienta farmacológica para el tratamiento odontológico multimodal del dolor.



CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de clonixinato de lisina produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente, en el test algésiométrico de la formalina, tanto en la fase algésica-aguda (fase I) como en la fase algésica-inflamatoria (fase II).
2. La administración intraperitoneal de ketorolaco trometamol produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente, en el test algésiométrico de la formalina, tanto en la fase algésica (fase I) como en la fase algésica-inflamatoria (fase II).
3. Al administrar intraperitonealmente la combinación de clonixinato de lisina y ketorolaco trometamol se produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente, en el ensayo orofacial de la formalina, tanto en la primera como en la segunda fase.
4. La coadministración intraperitoneal de clonixinato de lisina y ketorolaco trometamol demostró la existencia de una interacción de tipo sinérgica entre ambos fármacos para la fase II, correspondiente a la fase inflamatoria del test de la formalina orofacial.
5. La supraaditividad obtenida en la fase II posiblemente sea producto de los diversos mecanismos de acción de cada uno de los fármacos por separado, yuxtapuestos, concatenados o potenciados.
6. La aditividad obtenida en la fase I se debe posiblemente a la baja actividad sobre COX-1 ejercida por el clonixinato de lisina en esta fase.
7. Los hallazgos tras la administración de la combinación de clonixinato de lisina y ketorolaco sugiere ventajas en cuanto a lograr un mayor efecto analgésico con menores dosis, así como la posibilidad de disminuir ciertos efectos adversos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida T, Roizenbalt S, Tufik S (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research* 1000:40-56

American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis (2000). Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. *Arthritis Rheum.*;43:1905–15.

American Pharmacist association. (2004). A pharmacist's guide to the clinical assessment and management of pain.

Anthony D., Jasinski D. (2002). Postoperative pain management: morphine versus ketorolac. *J Perianesth Nurs* 17(1):30-42.

Aravena P, Benso B, Bertín A & Aravena-Torres R. (2013). “Efectividad de la profilaxis analgésica con clonixinato de lisina en exodoncias: ensayo clínico aleatorio”. *J Oral Res*; 2(3): 125-130.

Barrera N.P., Morales B., Torres S., Villalón M. (2005). Principles: mechanisms and modeling of synergism in celular responses. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 26(10):526-532.

Baumann TJ. (2002). Pain Management. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 5th ed. New York, NY:McGraw Hill; 1103–116.

Brooks P, Emery P., Evans, J., Fenner, H., Hawkey, C., Patrono, C., Smolen, J., Breedveld, F., Day, R., Dougados, M., Ehrich, E., G., Kvien, T.K., Van Rijswijk, M., Warner, T., Zeidler, H. (1999). Interpreting the clinical significance of different inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology* 38:779-88.

Brunton L., Lazo J., Parker K. (2007). "Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica". Undécima edición. Ed. McGraw- Hill Interamericana, 2007; 671- 717

Bustamante D., Miranda HF., Paeile C., Wolstenholme W. (1988). Effects of clonixin, a non-steroidal analgesic, on the neurotransmission of the vas deferens of the rat. *Gen Pharmac* Vol. 19. N.6. pp. 755-758.

Capone F., Aloisi AM. (2004). Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann Ist Super Sanità*. 40(2):223-229.

Cingolani H., Houssay A. (2000). Fisiología Humana, 7ma edición. El Ateneo.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*.;99:13926–31.

Chichorro J., Lorenzetti B., Zampronio A., (2004). Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol* 141(7):1175-1184.

Choo V, Lewis S. (1993). "Ketorolac doses reduced". *Lancet* 342:109.

Christie M, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE. (2000). Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*:27: 520-523.

Díez MA., Arteagoitia I. (2004). Dolor odontológico. Prevención y tratamiento. *Farmacia Profesional*. Vol 18. N.9.

Dionne R., Berthold C. (2001). Therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in dentistry. *Crit Rev Oral Biol Med* 12(4):315-330.

Donald R. Mehlisch, Paul J. Desjardins, Stephen Daniels, and Richard C. Hubbard. (2003) "Single Doses of Parecoxib Sodium Intravenously Are as Effective as Ketorolac in Reducing Pain After Oral Surgery". *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. J Oral Maxillofac Surg*; 61:1030-1037

Ducharme J. (2000). "Acute pain and pain control: state of the art". *Ann Emerg Med*; 35:592–603.

Fernández - Torres B, Márquez C, De las Mulas M. (1999). Pain and disease: historical evolution I. From the Prehistory to the Enlightenment. *Rev Soc Esp Dolor*; 6: 281-291.

Flórez J. (1997). *Farmacología Humana*. 3ª edición. Ed. Masson. Cap. 10. Págs.165- 176.

Franchi A., Girolamo G., De los Santos A., Marti M., Gimeno M. (1999). Ex vivo effects of lysine clonixinate on cyclooxygenases in rat lung and stomach preparations. *Inflammopharmacology*. 7 (4): 401-11.

Gonzalez C., Zegpi C., Noriega V., Prieto J.C., Miranda H. (2011). Synergism between dexketoprofen and meloxicam in an orofacial formalin test was not modified by opioid antagonist. *Pharmacological reports*. 63:433-440.

Gu Q., Lee L. (2010). Acid-sensing ion channels and pain. *Pharmaceuticals* Vol. 3(5). 1411-1425.

Guyton AC, Hall JE. (2000). Somatic sensations, II: pain, headache, and thermal sensations. In: *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company;552–63.

Hargreaves K., Abbott P.V. (2005). Drugs for pain management in dentistry. *Aust Dent J*, 50 Suppl. 2:S14-S22.

Houssay A., Cingolani H. (2007). *Fisiología Humana*. 7ma edición. Ed. El Ateneo.

Ibarra E. (2006). Una nueva definición de dolor. Un imperativo de nuestros días. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2: 65-72.

International Association for the Study of Pain. *IASP Terminology*. Available at: <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>. Accessed September 8, 2015.

Jackson K.C., Lipman A.G.(2004). "Nonopioid Analgesics". In: Lipman AG, ed. *Pain Management for Primary Care Clinicians*. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists;43–57.

Kramer E., Sasseti B, Kaminker AJ, De Los Santos AR, Martí ML, Di Girolamo G. Effects of lysine clonixinate on platelet function. Comparison with other non-steroidal anti-inflammatory agents. *Medicina (B Aires)*. 2001;61(3):301-7.

Krymchantowski AV, Barbosa JS, Cheim C. (2001). Oral lysine clonixinate in the acute treatment of migraine: a double-blind placebo-controlled study. *Arq Neuropsiquiatr*;59(1):46-9.

Krymchantowski AV, Peixoto P, Higashi R.(2005). Lysine clonixinate vs naproxen sodium for the acute treatment of migraine: a double-blind, randomized, crossover study. *Med Gen Med*.;7(4):69.

Echeverría García J.(2003). *Terapéutica dental*. 2ª edición inglesa traducida al español. Ed Masson. Págs. 77- 101.

Lemke K. (2004). Understanding the pathophysiology of perioperative pain. *Can Vet* 45: 405-443.

Lewis S., (1994). "Ketorolac in Europe". *Lancet*, 343:784

Linchitz RM, Sorell PJ. (2000). Physical methods of pain management. In: Raj PP, ed. *Practical Management of Pain*. 3rd ed. St. Louis,MO: Mosby, Inc; 529–42.

Luccarini P., Childeric A., Gaydier A.M., Voisin D., Dallel R. (2006). The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J Pain*. 12:908-914.

Macario A., Lipman A. (2001). Ketorolac in the era of cyclo-oxygenase-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a systematic review of efficacy, side effects, and regulatory issues. *Pain Medicine* 2:336-351

Martin T J. Eisenach J.C. (2001). Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 299: 811-817.

Melzack R, Wall PD. (1965). Pain mechanism: a new theory. *Science*. 150:171

Miranda H.F., Puig M.M., Dursteler C., Prieto J.C., Pinardi G. (2007). Dexketoprofen-induced antinociception in animal models of acute pain: synergy with morphine and paracetamol. *Neuropharmacology*. 52: 291-296.

Miranda HF, Sierralta F., Prieto J (2009). Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 92:314-318.

Morita I, Schindler M. (1995). Differential intracellular locations for proctaglandin endoperoxide synthase 1 and 2. *J Biol Chem*. 270:10902-8.

Mroszczak E, Jung D, Yee J, et al. (1990). "Ketorolac tromethamine pharmacokinetics and metabolism after intravenous, intramuscular, and oral administration in humans and animals". *Pharmacotherapy*;10:33–49.

Netter F. (2007). Atlas cabeza y cuello. Ed. Elsevier.

Noronha VRA, Gurgel GS, Alves LCF, Noman-Ferreira LC, Mendonça LL, Aguiar EG, Abdo EN.(2009). "Analgesic efficacy of lysine clonixinate, paracetamol and dipyrrone in lower third molar extraction. A randomized controlled trial". *Med Oral Patol Oral Cir. Bucal*. Aug 1;14 (8):e411-5.

Nourjah P,Ahmad SR, Karwoski CB. (2002). "Safety analysis of acetaminophen (APAP)-associated hepatotoxicity". Slide presentation at: FDA CDER Nonprescription Drugs Advisory Committee Meeting; September 19; Silver Spring,MD.

Orti E, Coirini H, Pico JC (1999) "Site-specific effects of the nonsteroidal anti inflammatory drug lysine clonixinate on rat brain opioid receptors". *Pharmacology*. 58(4):190-9.

Padi S., Naidy P., Kulkarni S. (2006). Involvement of peripheral prostaglandins in formalin-induced nociceptive behaviours in the orofacial área of rats. *Inflammopharmacology* 14 (a-2): 57-61

Paeile C., Bustamante D., Morales M., Pelissier T., Saavedra H., Miranda HF. (1989). Experimental cardio-depressant effects of clonixin. *Gen Pharmac*. Vol 20. N. 5. Pp. 605-608.

Paeile C., Bustamante S., Sierralta F., Bustamante D., Miranda H. (1994). The Analgesic Effect of Clonixine is not mediated by 5-HT, Subtype Receptors. *Cm. Pharmac*. Vol. 26, No. 6, pp. 1369-1374.

Paeile C., Bilbeny N. (2005). Medición experimental del dolor. En: El dolor de lo molecular a lo clínico. 3º Edición. Editorial Mediterráneo. Buenos Aires. Cap.19 p.272-281.

Pallapies D., Muhs A., Bertram, L; Rohleder, G; Nagyiványi, P; Peskar, B A. (1996). Effects of single oral doses of lysine clonixinate and acetylsalicylic acid on platelet functions in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*. Vol 49. Issue 5.

Pallapies D., Saling A., Meyer A., Gottesberge, Atkins DJ., Rohleder G., Nagyivanyi P., Peskar BA. (1995). Effects of lysine clonixinate and ketorolac tromethamine on prostanoid release from various rat organs incubated ex vivo. *Life Sciences*. Vol 57. N. 2. 83-89.

Pérez-Cajaraville J, Abejón D, Ortiz JR, Pérez JR. (2005). Pain and its treatment over history. *Rev Soc Esp Dolor*, 12: 373-384.

Pérez Ruiz A. (2008). El estomatólogo, su relación con el dolor y la sangre, 1ª edición. Ed. Ciencias Médicas.

Pérez A., López A., Grau I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Consideraciones para su uso estomatológico. *Rev Cubana Estomatol*;39(2)

Pergolizzi J., Raffa R., Taylor R. (2014). Treating acute pain in light of the chronification of pain. *Pain Management Nursing*. Vol. 15. N 1. 380-390.

Quiralte J, Blanco C, Castillo R, Delgado J, Carrillo T. (1996). Intolerance to nonsteroidal antiinflammatory drugs: Results of controlled drug challenges in 98 patients. *J Allergy Clin Immun* ;98:678-85.

Remington TL. (2004). Headache and muscle and joint pain. In: Berardi RR,McDermott JH, Newton GD, et al, eds.*Handbook of Nonprescription Drugs*. 14th ed.Washington, DC: American Pharmacists Association:73–110.

Reuben SS, Connelly NR, Lurie SD, et al. (1998). “Dose-response of ketorolac as an adjunct to patient-controlled analgesia morphine in patients after spinal fusion surgery”. *Anesth Analg*; 87:98–102.

Sevarino FB, Sinatra RS, Paige D, et al. (1992). “The efficacy of intramuscular ketorolac in combination with intravenous PCA morphine for postoperative pain relief”. *J Clin Anesth*; 4: 285–288.

Smith H. (2009). *Current Therapy in Pain*. 1ª edición. Ed. Saunders, Elsevier. Págs. 59-72.

Surender S. (2007). *Pharmacology for dentistry*. 1ª edición. Ed. New age international (P) limited, publishers. Págs. 83- 95.

Taketomo CK,Hodding JH, Kraus DM. (2001). *Pediatric Dosage Handbook*. 8th ed.Hudson, OH: Lexi-Comp.

Taylor EC, Young LY, Kradjan WA, et al, (2001). *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins:chap 7.

Tripathi K. D. (2008). *Farmacología en odontología fundamentos*. 1ª edición. Editorial Médica Panamericana. Págs. 335-352.

Torres LM, Calderón E, Fuentes R, De Antonio P, López-Fernández J. (1998). Treatment of postoperative pain after biliary surgery with intravenous PCA system. Comparison between lysin clonixinate, tramadol and ketorolac . *Rev Soc Esp Dolor*; 5: 112-119.

Urizar J.P., Pozos A., Rider R., Torres I., Aguilera G., Gómez M. (2013). "Analgesic efficacy of a lysine clonixinate and diclofenac mixture compared to ibuprofen or ketorolac after impacted third molar extraction. A pilot study". *ADM* 2013; 70 (3): 126-133

Varrassi G, Marinangeli F, Agro F, et al. (1999). "A double-blinded evaluation of propacetamol versus ketorolac in combination with patient-controlled analgesia morphine: analgesic efficacy and tolerability after gynecologic surgery". *Anesth Analg*; 88:611–6.

Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 21:8026-8033.

Zar JH (1984). *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs. SJ Prentice Hall. 718p.

ANEXOS

Anexo 1.

1762
- 6 SET. 2007

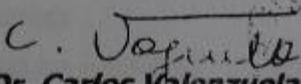

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

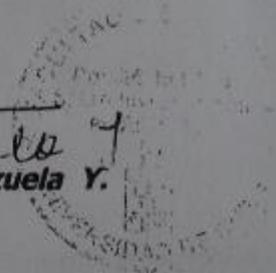
CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *"Perfil farmacológico de analgésicos en dolor crónico experimental"* cuyo investigador responsable es el **Dr. Hugo F. Miranda** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0238 FMUCH).

El Dr. Miranda se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto indicado, financiado por Laboratorios Menarini.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente



Santiago, 30 de agosto 2007
CBA # 0238
CVY/rkv

Anexo 2.

El número mínimo de ratones de todos los experimentos se calculó de acuerdo a la variabilidad de los procedimientos experimentales y de acuerdo a la variación intrínseca entre los animales. La determinación del número mínimo de muestra, se realizó según la ecuación $n=2(Z\alpha +Z\beta)^2 \times$

S^2/δ^2 basado en lo descrito por Zar J. 1984 (Zar J. 1984), n:sujeto necesario en cada una de las muestras; S:desviación estándar; δ :diferencia que se espera estimar como estadísticamente significativa;

$Z\alpha$: probabilidad de cometer un error estadístico tipo I (5%); $Z\beta$: probabilidad de cometer un error estadísticamente significativo tipo II (20%). Para el cálculo del tamaño muestral cuando se comparan proporciones se utilizará la siguiente formula $n=[Z\alpha \cdot \sqrt{2p(1-p)}] + Z\alpha \cdot \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2 / (p_1-p_2)^2$, donde n: sujeto necesario en cada una de las muestras; $Z\alpha$: corresponde al riesgo deseado; p_1 :valor de la proporción en el grupo de referencia placebo, control o tratamiento habitual; p_2 valor de la proporción en el grupo del nuevo tratamiento, intervención o técnica; p: la media de las proporciones entre p_1 y p_2 . Se determinará la normalidad de los datos y según eso se realizarán test para población con una distribución normal test paramétricos (T de Student o ANOVA). Por otro lado, si los datos no presentan una distribución normal se utilizará un test no paramétricos (Mann Whitney o Kruskal Wallis según corresponda). De acuerdo a esto utilizando un nivel de confianza del 95%, una potencia del test del 80%, y considerando un 15% de pérdidas se estima utilizar entre 6 y 8 animales para cada grupo (control + tratados).