

M
H565m
2006
CS

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**“MODULACION OPIOIDE Y NITRIDERGICA DE KETOPROFENO Y
KETOROLACO EN ANALGESIA E INFLAMACION EXPERIMENTAL”**

Gustavo Adolfo Herrera Iturriaga

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO
DE CIRUJANO DENTISTA**



7715

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Hugo Miranda G.
TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Gianni Pinardi T.**

**SANTIAGO – CHILE
2006**

7435

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, especialmente a mi madre por su apoyo y cariño constante, por haberme entregado el mejor regalo que le puede hacer una madre a un hijo, la educación.
- A los tutores de esta tesis, Dr. Hugo Miranda y al Dr. Gianni Pinar di por haberme guiado, mediante su ayuda y experiencia para así lograr llevar a cabo este trabajo.
- Al Sr. José López y al Sr. Alejandro Correa por toda la colaboración entregada en el laboratorio durante el desarrollo de este trabajo de investigación.
- A mis compañeros, por todos estos años de amistad y buenos momentos, Especialmente a Arnoldo Hernández, Rodrigo Hernández, Pablo Cáceres y Yahir López.
- A Lorena por todo su amor, apoyo y compañía.

INDICE

Páginas	
Introducción	1
Aspectos Teóricos	3
Hipótesis	21
Objetivos	22
Material y Método	23
Resultados	30
Discusión	35
Conclusiones	38
Sugerencias	39
Resumen	40
Bibliografía	41

INTRODUCCIÓN Y ASPECTOS TEÓRICOS

El dolor es un padecimiento muy común en odontología, el cual debe ser constantemente sobrellevado de manera eficaz por el odontólogo que atiende a un paciente que lo sufre ya sea por patología primaria, ya sea consecuencia de esta.

La asociación internacional para el estudio del dolor (IASP), da la siguiente definición que incorpora varios elementos: “es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular existente o potencial, descrito en términos de daño” (1).

La gran mayoría de los tratamientos de emergencia de piezas dentarias, o bien el tratamiento de procesos infecciosos, implican cierto grado de malestar. Esta experiencia de dolor relacionada con las piezas dentarias, afecta de manera permanente la disposición al tratamiento dental. Es por esto, muy importante para el odontólogo reducirlo al mínimo o prevenirlo.

El conocimiento de la neuroanatomía y de la neurofisiología del dolor constituyen las bases que sustentan su tratamiento racional. De ahí la importancia clínica de conocer estos procesos en forma general.

Clasificación del dolor.

1. Según sus características clínicas(2).

1.1.- Dolor agudo: Es aquel causado por estímulos nocivos desencadenados por heridas o enfermedades de la piel, estructuras somáticas profundas o vísceras. El dolor agudo asociado a una enfermedad previene al individuo de que algo anda mal, limita la actividad, previniendo un daño mayor o ayudando a la curación

1.2.- Dolor crónico: La persistencia del estímulo, de la enfermedad o de ciertas condiciones fisiopatológicas, puede conducir al establecimiento de un dolor crónico. El dolor crónico tiene efectos fisiológicos, psicológicos y conductuales sobre el paciente y su familia, además de un costo social enorme.

2. Según su origen anatómico(2).

2.1.- Dolor somático: Es aquel que aparece cuando un estímulo, potencialmente dañino para la integridad física, excita los receptores que tenemos en la piel. Este tipo de dolor es habitualmente bien localizado y el paciente no tiene grandes dificultades en describirlo.

2.2.- Dolor neuropático: Es el que resulta de lesiones o alteraciones crónicas en vías nerviosas periféricas o centrales. Puede desarrollarse o persistir en ausencia de un estímulo nocivo evidente. Los síntomas pueden ser focales o más generalizados.

2.3.- Dolor psicogénico: ocurre cuando el paciente describe problemas psicológicos como ansiedad o depresión en términos de daño tisular, verbalmente o a través de su comportamiento, si bien el daño puede o pudo existir, el problema central es la amplificación y distorsión de esos impulsos periféricos por el estado psicológico.

Neurofisiología del Dolor

El dolor no es más que el resultado de la transmisión de un estímulo nociceptivo desde la periferia al SNC, que en su recorrido transita a través de diferentes estructuras, comenzando por los receptores periféricos, nervio raquídeo, médula espinal, sistema de transmisión ascendente, hasta llegar al sistema supraespinal donde se integra la información y se percibe entonces de forma consciente el dolor (3,4).

Transducción

Este proceso ocurre en las terminaciones nerviosas libres, ramificaciones distales de fibras C amielínicas y de fibras A δ , que a este nivel han perdido su delgada capa de mielina. Allí se inicia la despolarización y la transmisión de los impulsos dolorosos hacia la médula. La respuesta de estos receptores periféricos puede ser modificada por factores que la sensibilizan, aumentando la respuesta (acidez del medio, presencia de sustancias alógenas como prostaglandinas o bradisininas) o por otros que causan fatiga, disminuyendo su respuesta (estímulos mecánicos repetidos). Estos receptores aumentan significativamente su respuesta eléctrica cuando los estímulos se hacen dolorosos (3,4,5).

Transmisión de la periferia a la Médula.

Los impulsos dolorosos se transmiten por fibras C, con velocidad de conducción lenta (0,5-2 m/seg) y por las fibras A δ , con mayor velocidad de conducción (4-30 m/seg). Estas fibras, parten de la neurona en T o neurona periférica, tienen su soma en el ganglio espinal y penetran a la médula por el asta posterior.

En las astas posteriores de la médula se produce la sinapsis con la segunda neurona en la sustancia gelatinosa de Rolando. Muchas fibras nociceptivas,

antes de su ingreso a la sustancia gris, emiten colaterales descendentes y ascendentes, constituyendo parte del haz de Lissauer.

El grueso de las fibras del haz, que conducen la sensibilidad dolorosa, se proyectan en sentido contralateral a través de la Comisura Anterior y en menor magnitud de forma ipsilateral hacia los centros superiores.

Luego de pasado el fascículo de Lissauer llegan hasta la sustancia gris del asta posterior en la zona marginal, algunas fibras ascienden o descienden de uno a tres segmentos en sentido ipsilateral, otras pasan a través de la Comisura Anterior hacia el asta dorsal contra lateral.

Dolor y temperatura se transmiten por las fibras A-delta (más gruesas, mielinizadas y de mayor velocidad de conducción) y C (finas, amielínicas y lentas). Esta diferencia da lugar a dos formas diferentes de conducir el dolor.

Las primeras llevan información del dolor agudo, bien localizado y relacionado directamente con la noxa y las otras conducen información sobre el dolor difuso, sordo, ardiente.

Sistema de Transmisión Ascendente

Los axones de la segunda neurona al agruparse en múltiples haces, forman el Fascículo Anterolateral Ascendente (FAL) que es el encargado de llevar la información dolorosa desde el asta posterior hacia los centros superiores.

El FAL ascendente es una estructura funcional que está formada por dos grandes sistemas: el sistema Neoespinotalámico (espinotalámico lateral) formado por axones de las láminas I y V que llevan la información dolorosa discriminativa hasta los núcleos ventro-postero-laterales del tálamo; y el sistema Paleoespinotalámico (espinotalámico medial, espino-reticular y espino-mesencefálico) formado por los axones de la segunda neurona aferente que lleva la información de tipo afectiva hasta el sistema reticular, sustancia gris periacueductal, núcleo talámico medio e hipotálamo.

Existen otros dos sistemas que aunque no forman parte de los anteriores sí están incluidos en el FAL ascendente y que son el sistema espino-medular-postsináptico y el sistema ascendente propio-espinal multisináptico.

Sistema Supraespinal

Constituido por el Sistema Reticular, Sistema Límbico, Hipotálamo, Tálamo y Corteza (5). Aunque su función en la percepción del dolor no es aún bien conocida dada la complejidad e interconexión de las mismas, se sabe que están relacionadas con los tres componentes de las sensaciones dolorosas:

- discriminativa
- motivacional-afectiva
- cognitivo-evaluativo

El sensorial discriminativo se procesa en el núcleo ventro-basal del tálamo y en la corteza el cual es llevado allí por las fibras del Sistema Lateral Ascendente. El componente afectivo se integra en el Sistema Reticular y Límbico, Hipotálamo y núcleo medial del Tálamo al cual le llega la información a través del Sistema Medial Ascendente y el componente cognitivo depende de la función de la Corteza y su interrelación con las otras estructuras (5).

Neurotransmisores y Neuromoduladores del Dolor

El proceso mediante el cual la transmisión del dolor es facilitada o inhibida se le denomina neuromodulación, la cual puede estar presente en cualquiera de los niveles de transmisión dolorosa (a nivel sináptico).

A nivel periférico: Un estímulo potencialmente nocivo, provoca que se liberen sustancias al medio extracelular las cuales actúan sobre el receptor periférico aumentando la sensibilización del mismo y/o disminuyendo el umbral de excitación. Entre las sustancias más conocidas tenemos a los iones de potasio e hidrógeno y las prostaglandinas (de los tejidos), la histamina (de los mastocitos, plaquetas y basófilos) la sustancia P (de las terminaciones nerviosas periféricas), las Kininas (del plasma) y la Serotonina (de las plaquetas y mastocitos) (6).

A nivel del asta posterior de la Médula espinal es donde se considera que se realiza la actividad neuromoduladora para la transmisión del dolor. Aquí intervienen cuatro estructuras con funciones bien definidas:

1. Fibras A-beta inhibitorias, cuya función es inhibir la transmisión sináptica entre la primera y la segunda neurona aferente, actividad que esta mediada por el Acido Gamma Amino Butírico (GABA).
2. Sistema Local de Interneuronas que puede inhibir la transmisión por medio de Neurotransmisores como los péptidos opiáceos endógenos y monoaminas.

Estos dos sistemas intervienen en la modulación ascendente del dolor y tienen una estrecha relación con otros dos moduladores del dolor, pero que actúan de forma descendente, o sea partiendo desde los centros superiores.

Ellos son:

3. Sistema Facilitador Descendente: que parte de las células de los núcleos del Rafe y que facilitan la transmisión en la primera sinápsis (asta posterior de la médula espinal).
4. Sistema Inhibidor Descendente: integrado por un fascículo cortical descendente, un fascículo que parte de la sustancia gris periacueductal y periventricular (mediado por péptidos opiáceos endógenos) y un fascículo que parte de la Protuberancia y el Rafe (mediado por el Sistema

Monoaminérgico) cuya función es inhibir o retardar la neurotransmisión del dolor por medio de la liberación de neurotransmisores.

Neuromodulación a Nivel Medular

Múltiples son los neurotransmisores que han sido identificados con actividad neuromoduladora a nivel medular, entre ellos: los péptidos opiáceos endógenos (POE) y no endógenos, el Sistema Monoaminérgico y el Sistema GABA(6). Todos estos neuromoduladores pueden desempeñar sus funciones gracias a la existencia de receptores opiáceos de los cuales se conocen 5 tipos: mu, delta, kappa, épsilon y tetta (cada uno de los cuales posee acciones diferentes y se encuentran distribuidos por todo el SNC); de ellos mu, kappa y épsilon tienen acción analgésica demostrada. Los neuromoduladores realizan su función inhibitoria al unirse a estos receptores a nivel presináptico bloqueando la liberación de la sustancia P (polipéptido de 11 aminoácidos, descrito en 1931 por Von Euler y Gaddum, que conjuntamente con los aminoácidos Aspartato y Glutamato, son los encargados de la neurotransmisión dolorosa en la médula espinal) por la primera neurona aferente, o a nivel postsináptico (segunda neurona aferente) bloqueando la unión de la sustancia P a sus receptores (7).

OXIDIDO NITRICO

El óxido nítrico es un radical libre que actúa como transductor de señales en diversos procesos celulares. Además de ser neurotransmisor y vasodilatador, es citotóxico para algunas células tumorales (8).

El óxido nítrico es sintetizado a partir de la L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintetasas. La expresión de una de estas enzimas es modulada por citocinas (IL-1b, IL-6, INFg, etc.) conocidas como estimuladoras de la proliferación celular.

La reacción de síntesis

El óxido nítrico es sintetizado por las óxido nítrico sintetasas (NOSs). Se pueden diferenciar tres isoformas de este enzima: la NOS1 (también llamada NOS neuronal, nNOS ó NOS I), la NOS2 (NOS inducible, iNOS ó NOS II) y finalmente la NOS3 (NOS endotelial, eNOS ó NOS III). Todos estos subtipos utilizan L-arginina, oxígeno y NADPH como sustratos y producen óxido nítrico, L-citrulina y NADP^+ . Se necesitan, además, FMN, FAD, tetrahidrobiopterina, el grupo hemo y Ca^{2+} /calmodulina como cofactores.

Aunque la NOS1 se encontró inicialmente en el cerebro, la NOS2 en macrófagos y la NOS3 en endotelio, estas enzimas se han encontrado después en muchas otras células diferentes del organismo (8).

La iNOS o tipo 2 o inducible, no se encuentra expresada, es inducida por estímulos inmunológicos-inflamatorios como citoquinas proinflamatorias y endotoxinas, que producen NO en concentraciones mayores, que son citotóxicas y citostáticas para células blanco. Se producen en macrófagos, polimorfos mononucleares neutrofilos, músculo liso y endotelio vascular. A diferencia de otras señales neuroactivas no se acumula en un compartimiento presináptico, y su liberación depende sólo de su biodisponibilidad. Como un gas el NO difunde con facilidad a las membranas celulares activando la guanidilciclase, catalizando la transformación de guanosín trifosfato (GTP) en guanosín monofosfato cíclico (GMPC), provocando un aumento intracelular de GMPC, el cual es mediador de sus efectos fisiológicos, incluyendo dolor y analgesia. La biodisponibilidad de GMPC está modulada por una fosfodiesterasa cuyas isoformas son tejido dependientes, por lo que constituyen blancos farmacológicos para amplificar el efecto de NO (10).

La NOS puede ser inhibida por derivados estructurales del aminoácido arginina, como por ejemplo la N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME). Usando fármacos activadores e inhibidores de la cascada L-arginina / NO / GMPC, se ha reportado que el NO juega un rol nociceptivo y antinociceptivo en los tejidos periféricos en donde se encuentra esta vía. Inhibidores de la NOS han demostrado ejercer un efecto nociceptivo en modelos animales. Así, se ha

demostrado la participación de la vía L-arginina-NO en la modulación del dolor. Se ha establecido que la liberación de acetilcolina, sustancia que estimula la liberación de NO constitutivo, antagoniza la hiperalgesia inducida en ratas por prostaglandina E2 (PGE2) y Carragerina, así como las contorsiones inducidas en ratones por el ácido acético (9).

Hay creciente evidencia que indica el rol del NO en el desarrollo y mantención de los mecanismos que provocan la hiperalgesia, provocada por estímulos, mecánicos químicos o térmicos (9), de hecho, jugando un rol importante en la vía nociceptiva.

Utilizando activadores y/o inhibidores de la cascada L-arginina/NO/GMPc se ha demostrado que el NO juega roles tanto nociceptivos como antinociceptivos. La inhibición de la NOS espinal lleva a un aumento de la actividad neuronal mayoritariamente en las neuronas nociceptivas del asta dorsal. Por otra parte, la administración sistémica e intratecal de inhibidores de NOS ha demostrado experimentalmente reducir la hiperalgesia (11). Mientras que los dadores de NO disminuyeron los umbrales de nocicepción a la estimulación mecánica y térmica (12).

Algunas de las explicaciones posibles para estas aparentes discrepancias son:

- 1.- El NO y el GMPc tienen diferentes actividades en la actividad neuronal basal y en la excitabilidad.
- 2.- Tienen diferentes acciones en el nivel espinal y supraespinal.
- 3.- Tienen efectos antinociceptivos o nociceptivos dependiendo de su concentración (13).

El rol del NO y del GMPc en el proceso nociceptivo se discute controversialmente. Muchos estudios implican un rol de la vía NO-GMPc en la hiperalgesia más que en la antinocicepción, especialmente en condiciones fisiopatológicas (14,15). Sin embargo, otros estudios apuntan a una acción antinociceptiva (16,17). Hay evidencia en la literatura de que el NO y el GMPc pueden ejercer una actividad dual en la actividad neuronal. A nivel espinal, el GMPc, dependiendo de la dosis, inhibe o facilita la transmisión nociceptiva (13). La aplicación de dadores de NO refleja este efecto dual del GMPc (18), de nuevo, bajas dosis de dadores de NO indujeron antinocicepción mientras altas dosis aumentaron la respuesta nociceptiva.

ANALGÉSICOS

La palabra compuesta analgesia procede del griego *a-* carencia, negación, y *algos*, dolor. Por lo tanto, un analgésico es cualquier procedimiento que calma o elimina el dolor.

Antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo heterogéneo de fármacos analgésicos que actúan inhibiendo las enzimas ciclooxigenasas, cruciales en la producción de prostaglandinas, sustancias mediadoras del dolor. Además de propiedades analgésicas, los AINEs son antipiréticos, antiinflamatorios y algunos antiagregantes plaquetarios. Tienen el inconveniente de que no se puede superar una dosis de tolerancia o techo terapéutico debido a los graves efectos adversos como es la hemorragia digestiva(19).

2.-Mecanismo de Acción de los AINEs

El mecanismo de acción de los AINEs se encuentra relacionado con la inhibición de uno de los pasos que forman parte de la cascada del ácido araquidónico, este compuesto se forma a partir de la degradación de los fosfolípidos de membrana, proceso mediado por la enzima fosfolipasa. Una vez formado el ácido araquidónico su metabolismo puede derivar diversos autacoides, entre ellos: las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos. Dos enzimas son claves en la degradación del ácido araquidónico: la lipoxigenasa, involucrada en la formación de los

leucotrienos. La otra enzima involucrada es la Ciclo-oxigenasa (COX) para la formación de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina.

Hoy en día se sabe de la existencia de dos enzimas COX (20), con variaciones sutiles en su secuencia de aminoácidos. Estas enzimas se diferencian en que la COX-1 es una enzima constitutiva y la COX-2 es una enzima inductiva. Esto significa que hay una cantidad de COX-1 disponible para actuar en cualquier momento en que se estimule la producción de prostaglandinas o tromboxanos, a diferencia de la COX-2, la cual se activa en aquellos momentos en que se desarrolla una noxa en el organismo, y posiblemente esta COX-2 sea la responsable de la síntesis de las PG que están involucradas en los procesos inflamatorios.

Actualmente existen fármacos con actividad selectiva para la inhibición de la COX-2. Se pensó que su aparición desplazaría a los inhibidores no selectivos de la COX del tipo Aspirina, ya que estas nuevas drogas inhibirían la síntesis de las PG involucradas en los procesos inflamatorios y no aquellas que regulan ciertos mecanismos fisiológicos en el organismo. Sin embargo, se ha visto que ambas COX son importantes y que en algunos casos el sólo bloqueo de la COX-2 no es suficiente para producir un efecto farmacológico efectivo (21), y que se hace necesario incrementar la dosis del inhibidor

selectivo hasta el punto de que pierda su selectividad y poder producir inhibición de la COX-1 y producir el efecto terapéutico deseado.

Hace menos de una década atrás se planteó la posibilidad de la existencia de una COX-3 que probablemente medie la reversión del proceso inflamatorio al sintetizar PG antiinflamatorias.

3.-Mecanismo de acción analgésico.

La acción analgésica tiene lugar a nivel periférico, mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas producidas en respuesta a una agresión o lesión tisular. Existen datos que sugieren que también puede haber una acción a nivel central (22).

4.-Mecanismo de acción antiinflamatoria.

Los AINEs inhiben la expresión o la actividad de algunas moléculas de adhesión involucradas en la inflamación: selectinas (E, P y L), moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1).

5.-Mecanismo de acción antipirético.

La fiebre puede ser consecuencia de cualquiera de los siguientes procesos: infección, daño tisular, inflamación, rechazo de injerto, etc. Estos cuadros

tienen en común la formación de citocinas: IL-1, IL-6, interferón y, TNF. Las citocinas incrementan la síntesis de PGE₂, los AINEs suprimen esta respuesta al inhibir la síntesis de PGE₂ y observamos el efecto antipirético de estos fármacos.

6.-Reacciones adversas de los AINEs:.

Se deben a extensiones de sus acciones farmacodinámicas que se manifiestan en aquellos sistemas donde las prostaglandinas cumplen sus funciones fisiológicas. Entre estos efectos adversos encontramos:

a)Gastrointestinales: Dispepsia, diarrea, estreñimiento, gastritis y dolor gástrico (15-25%).

b)Renales: Debido a que las PGs están involucradas en procesos fisiológicos renales, la inhibición de las mismas puede desmejorar o reducir la función renal.

c) Inhibición de la motilidad uterina: Se ha demostrado que los AINEs prolongan la gestación.

d) Reacciones hematológicas: Su incidencia es muy baja. Estas reacciones incluyen agranulocitosis, anemia aplásica, trombocitopenia y anemia hemolítica.

KETOROLACO

Perfil farmacológico del Ketorolaco:

El ketorolaco es un AINE que pertenece al grupo pirrolacético (22-24). Su efecto analgésico empieza a los 30 minutos de administrado y está indicado por máximo 5 días, pues el aumentar su uso, no se incrementa la efectividad analgésica pero si aumenta el riesgo de producir efectos adversos (23,24). El ketorolaco ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de dolor moderado a severo. Se le asignan tres acciones farmacológicas principales asociadas entre sí: analgésica, antipirética y antiinflamatoria. Las dos primeras están relacionadas con el uso clínico durante cortos períodos y la última, se manifiesta cuando se emplea de forma continua (23) .

El ketorolaco no se une a receptores opioides, por tanto la activación directa de receptores opioides puede descartarse. Se ha sugerido la activación indirecta por medio de la liberación de opioides endógenos. Sin embargo, esta posibilidad parece poco probable, dado que la actividad analgésica del ketorolaco no es bloqueada por naloxona (25). Se ha sugerido también, la posibilidad de que pueda bloquear la síntesis de leucotrienos, por acción sobre la lipooxigenasa, lo que podría representar un beneficio farmacológico al incrementar tanto su eficacia terapéutica, como su seguridad o tolerancia (19).

KETOPROFENO

Perfil farmacológico del ketoprofeno:

El ketoprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo, derivado del ácido propiónico. Posee actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética.

A nivel periférico el ketoprofeno, actúa sobre el dolor mediante un potente efecto antiinflamatorio relacionado con la inhibición de la ciclooxigenasa y, por lo tanto, la biosíntesis de las prostaglandinas (26).

Éstas, en particular las PGE_2 , no generan dolor por sí mismas, pero sensibilizan los nociceptores de las terminaciones nerviosas a la acción de las sustancias alógenas, como la bradicinina, que se vuelven susceptibles de desencadenar sensaciones dolorosas a partir de estímulos dolorosos o no.

A nivel central, el ketoprofeno actúa sobre el dolor porque atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, gracias a su liposolubilidad, además de que sugiere un efecto central directamente a nivel espinal, o bien, a nivel suprasegmentario.

Sin embargo, el efecto analgésico del ketoprofeno no es tan sólo por una acción inhibitoria de las prostaglandinas centrales o periféricas. Actúa también sobre la síntesis y la actividad de otras sustancias neuroactivas que se supone tienen un papel fundamental en la aparición del influjo nociceptivo en el asta posterior de la médula.

NALTREXONA (NTX)

La Naltrexona es un antagonista no selectivo de los receptores opiodes, pero tiene una mayor afinidad por el receptor μ que naloxona, en consecuencia, revierte todos los efectos producidos por los fármacos opioides, debido a la activación del subtipo μ (27,28).

L-NAME

El NG- nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), es un antagonista de las NOS.

El L-NAME bloquea la síntesis de todas las isoformas de NOS (antagonista no selectivo) y aumenta la actividad basal de neuronas del asta dorsal cuando se administra espinalmente (17).

Estudio Isobolográfico de la Asociación de Fármacos

Análisis que permite cuantificar el efecto de dos drogas cuando se coadministran. Por ejemplo, si 2 drogas se administran juntas, sus efectos pueden ser: a) aditivos: que corresponde a la simple suma de los efectos que producen cada una de ellas separadamente; b) subaditivo: también llamado antagonístico, y que corresponde a un efecto menor que la simple suma de cada agente por separado y ; c) sinérgico o supra-aditivo: que es un efecto mayor que la suma de los efectos por separado de cada droga (29, 30).

Hipótesis

La administración simultánea de una mezcla de ketorolaco y ketoprofeno produce una sinergia en la actividad antinociceptiva, que es modulada por el sistema opioide y nitridérgico (NO-GMPc.).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antinociceptiva de ketorolaco y ketoprofeno en el ensayo experimental de dolor agudo tónico visceral denominado test de las contorsiones abdominales, el efecto de la inhibición de la NOS y la participación del sistema opioide.

Objetivos específicos

1.-Evaluar la antinocicepción inducida por la administración intraperitoneal (i.p.) de ketorolaco y ketoprofeno y la mezcla de ambos en el modelo de las contorsiones abdominales inducidas por la administración intraperitoneal de ácido acético al 0.6% en ratones.

2.- Caracterizar la naturaleza de la interacción antinociceptiva producida por la *combinación* i.p. de dosis sub-analgésicas de ketorolaco y ketoprofeno, usando el método de las contorsiones abdominales acéticas inducidas.

3. Estudiar la participación del sistema NO-GMPc en la interacción i.p. ketorolaco y ketoprofeno, en el mismo modelo.

4.- Estudiar la participación del sistema opioide en la interacción i.p. de ketoprofeno e ketorolaco, en el mismo modelo algesiométrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de estudio.

En el estudio fueron usados ratones de la cepa CF/1 (*Mus musculus*) tanto machos como hembras, de 25 a 30 gramos de peso (fotografía 1).



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

Los animales fueron aclimatados al ambiente de laboratorio al menos 2 horas antes de la experimentación, la cual se realizó siguiendo el protocolo aprobado por la Comisión de ética de la Facultad de Medicina de la

Universidad de Chile. Cada animal seleccionado de manera aleatoria, fue usado sólo una vez y recibió solamente una dosis de las drogas estudiadas.

Las observaciones fueron efectuadas en forma randomizada, ciega y controladas con salino. El número de animales fue el mínimo necesario para obtener datos estadísticos reproducibles y los animales fueron sacrificados inmediatamente después de realizado el experimento mediante el método de dislocación cervical.

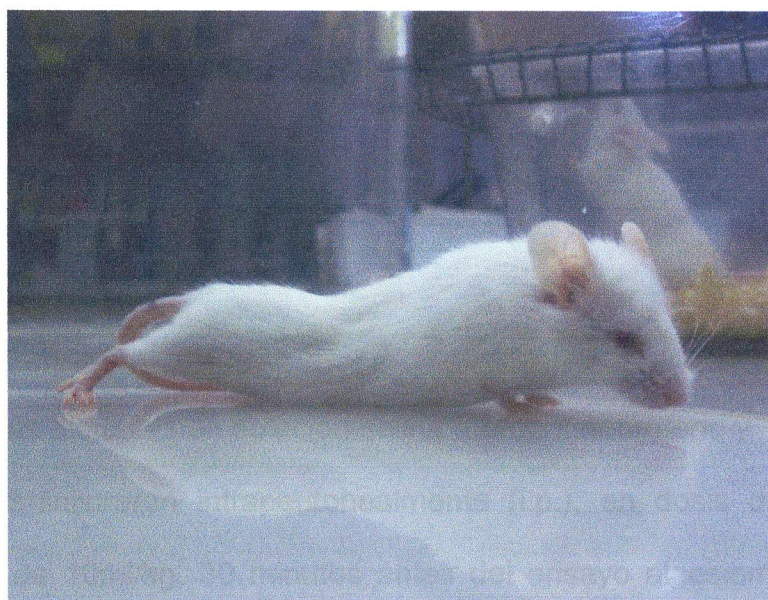
2. Método de las contorsiones abdominales.

La evaluación de la actividad antinociceptiva se realizó por el método algosiométrico agudo del writhing test o test de las contorsiones, en el que se usa un estímulo químico irritativo: la inyección i.p. de 10 ml/kg de una solución de ácido acético al 0.6% (fotografía 2).



Fotografía 2. Administración de la solución irritante.

El dolor producido se midió contando el número de contorsiones que presentó el animal después de 5 minutos de la inyección y durante 5 minutos. Se entiende por contorsión la contracción de la musculatura abdominal junto con una elongación del cuerpo y extensión de una o ambas extremidades posteriores (fotografía 3).



Fotografía 3. Contorsión de un ratón previamente inyectado con una solución de ácido acético.

Los resultados se expresan como porcentaje de antinocicepción (%AN) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ AN} = 100 - (\text{WE} / \text{WC} \times 100)$$

Donde:

WE: número de contorsiones de los animales inyectados con droga

WC: número de contorsiones en los animales inyectados con salino (controles)

3. Administración de drogas

Las drogas disueltas en solución salina fueron ketoprofeno y ketorolaco, los que se administraron intraperitonealmente (i.p.), en dosis de un volumen constante de 10ml/kg, 30 minutos antes del ensayo algesiométrico, ya que experimentos preliminares demuestran que es el tiempo en que se alcanza el efecto analgésico máximo. También, fue administrado, Naltrexona junto a las drogas recién descritas. La otra droga que también se uso fue L-NAME el cual fue administrado por vía i.p, 5 minutos antes de la administración de, ketorolaco y ketoprofeno y/o la mezcla de ambas.

4. Análisis isoblográfico de la interacción ketoprofeno y ketorolaco.

Se construyeron curvas dosis-respuesta de los fármacos administrados por vía intraperitoneal con un mínimo de 6 animales por cada una de al menos 4 dosis. Las interacciones entre las diferentes drogas, se efectuó coadministrando i.p. $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, y $\frac{1}{16}$ de las DE 50 de Ketoprofeno y Ketorolaco. La coadministración se efectuó en animales antes y después del pretratamiento de ellos con 1mg/kg i.p. de naltrexona, opioide u, más potente y de mayor duración que naloxona y 1mg/kg de L-Name, inhibidor no selectivo de la NOS.

Para la evaluación de las interacciones, se usó el método isoblográfico del laboratorio, que corresponde a representaciones graficas de dosis isoefectivas para un efecto determinado, de cada uno de los fármacos utilizados individualmente y combinados. Este tipo de análisis permite conocer si existe interacción, de que tipo y cual es su magnitud.

Para cada combinación de las drogas se determino la DE₅₀, dosis que produce el 50% del efecto máximo, esta se calculó mediante el análisis de regresión lineal de su curva dosis-respuesta. Esta dosis se comparó estadísticamente con la dosis que representa teóricamente la adición simple de efectos, que se obtienen según la siguiente fórmula:

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

Donde:

R: relación de potencia entre las drogas 1 y 2 administradas por sí solas

P1: proporción de la droga 1 en la mezcla

P2: proporción de la droga 2 en la mezcla

El punto experimental resultante se grafica en un sistema de coordenadas cartesianas que contiene una línea que conecta la DE_{50} de la droga 1 en la abscisa, con la droga 2 en la ordenada (línea de aditividad simple).

La región del grafico donde se ubica el punto experimental determina el tipo de interacción.

En el caso de que la interacción sea sinérgica, el punto experimental se ubica bajo la línea de aditividad. En el caso contrario, si resultase una interacción antagónica el punto se ubicará sobre la línea de aditividad, y si el punto se ubica en un sector cercano a la línea de aditividad, la interacción será de simple aditividad.

El programa, también calcula el índice de interacción (I.I) entre las drogas para completar la naturaleza de la aditividad, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I.I = DE_{50} \text{ experimental} / DE_{50} \text{ teórico}$$

Si el valor resultante es menor que 1 corresponde a una interacción sinérgica; al resultar igual a 1 la interacción es aditiva, y si es mayor a 1, es antagónica.

5.- Estudio estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos de las curvas log dosis-respuesta se analizaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos para determinar las DE_{50} . Los parámetros estadísticos relativos a los isobogramas se calcularon con un programa computacional del laboratorio y la significación estadística se determinó por análisis de varianza y pruebas t de Student. La significación se consideró en un 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Grupo control writhing test:

Al administrar solución fisiológica salina (10 ml/Kg.) por vía i.p., 30 minutos antes del ensayo algesiométrico se obtuvo 19.67 ± 1.45 contorsiones (n = 32).

Grupo tratado con analgésicos:

A) Ketorolaco: La administración de ketorolaco i.p., en el ensayo algesiométrico de las contorsiones abdominales, produjo una actividad antinociceptiva dosis-dependiente. De la curva dosis-respuesta se calculó la DE_{50} que resultó ser de 2.89 ± 0.23 mg/Kg. (Figura 1).

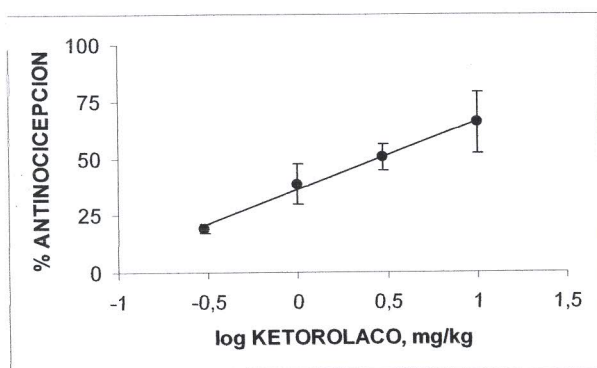


Figura 1. Curva dosis-respuesta a ketorolaco en el ensayo de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético.

Cuando se pretrataron los animales con 1 mg/kg i.p. de L-NAME, la DE₅₀ de ketorolaco produce 59.5% ± 10.5 de analgesia, lo cual no fue estadísticamente significativo (p= 0.05).

Cuando se pretrataron los animales con NTX i.p, la DE₅₀ de ketorolaco produce 67.9% ± 11 de analgesia, lo cual fue estadísticamente significativo (p< 0.05).

B) Ketoprofeno: La administración de ketoprofeno por vía i.p., induce una respuesta antinociceptiva de naturaleza dosis-dependiente, en el test de las contorsiones. La DE₅₀ de ketoprofeno resultó ser de 30.3 ± 3.8 mg/Kg. (Figura 2).

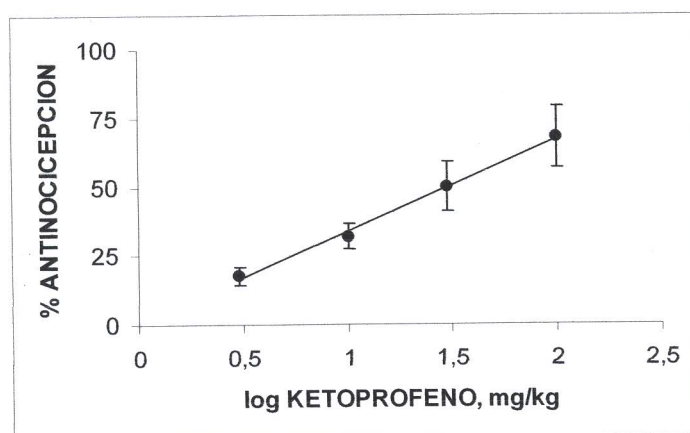


Figura 2. Curva dosis-respuesta a ketoprofeno en el ensayo de las contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético.

Cuando se pretrataron los animales con 1 mg/kg i.p. de L-NAME, la DE_{50} de ketoprofeno produce $54.5\% \pm 8.6$ de analgesia, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p= 0.05$).

Cuando se pretrataron los animales con NTX i.p, la DE_{50d} de ketoprofeno produce $83.1\% \pm 15.2$ de analgesia, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.03$).

Paralelismo de las curvas dosis-respuesta:

El estudio estadístico de las curvas dosis-respuesta obtenidas de la actividad antinociceptiva de ketoprofeno y ketorolaco (figura 3), demostró que ellas son paralelas.

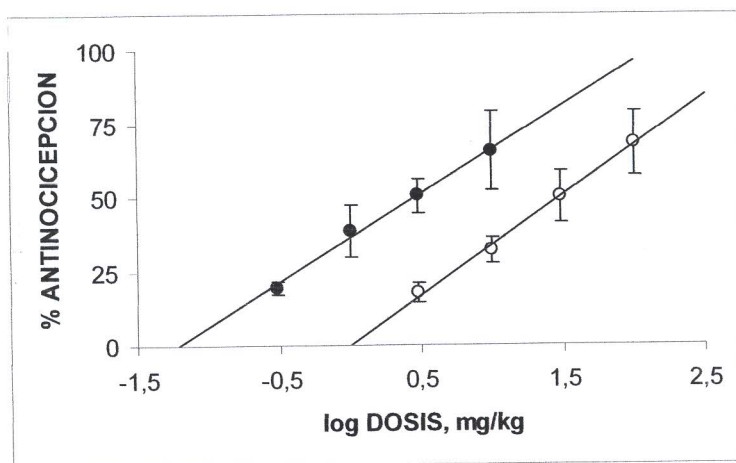
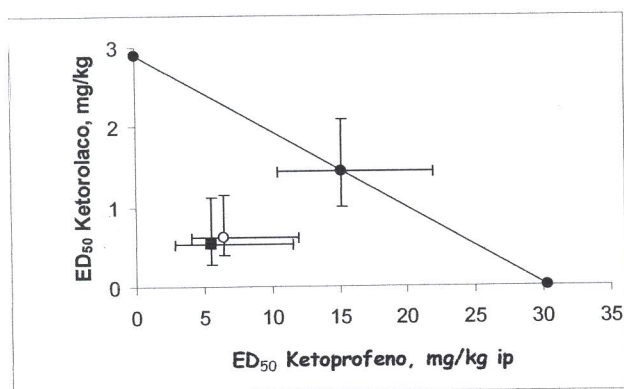


Fig. 3: Paralelismo de las curvas dosis-respuesta a ketorolaco (●) y ketoprofeno (○) en el ensayo del writhing test.

Análisis isobolográfico:

El estudio de la interacción analgésica entre ketoprofeno y ketorolaco, administrados por vía i.p. y en proporciones fijas de sus DE_{50} , fue realizado mediante análisis isobolográfico. Los resultados demostraron que dicha interacción antinociceptiva es de naturaleza supra-aditiva o sinérgica. Además se comprueba esta sinergia, por el hecho que el índice de interacción de la combinación fue de 0.192. El pretratamiento de los animales con L-NAME (1 mg/Kg. i.p.) no modificó la naturaleza de dicha interacción, ya que la DE_{50} de la mezcla ketorolaco/ketoprofeno no es significativamente diferente de la que se obtiene sin la previa administración del inhibidor no selectivo de la NOS. Estos resultados se observan en la figura 4.



Círculo lleno = aditividad
 Círculo vacío = experimental
 mezcla
 Cuadrado lleno = + L-NAME

Fig. 4: Isoblograma de la interacción analgésica entre ketoprofeno y ketorolaco, administrados por vía intraperitoneal, en el modelo del writhing test. El (●) representa el punto de aditividad teórica de la

mezcla, el (○) corresponde al punto experimental y el (■) al punto experimental obtenido después del pretratamiento con 1 mg/kg de L-NAME.

El pretratamiento de los animales con NTX (1 mg/Kg. i.p.), modificó la naturaleza de dicha interacción, ya que la DE_{50} de la mezcla ketorolaco/ketoprofeno es significativamente diferente de la que se obtiene sin la previa administración del antagonista opioide. Estos resultados se observan en la figura 5.

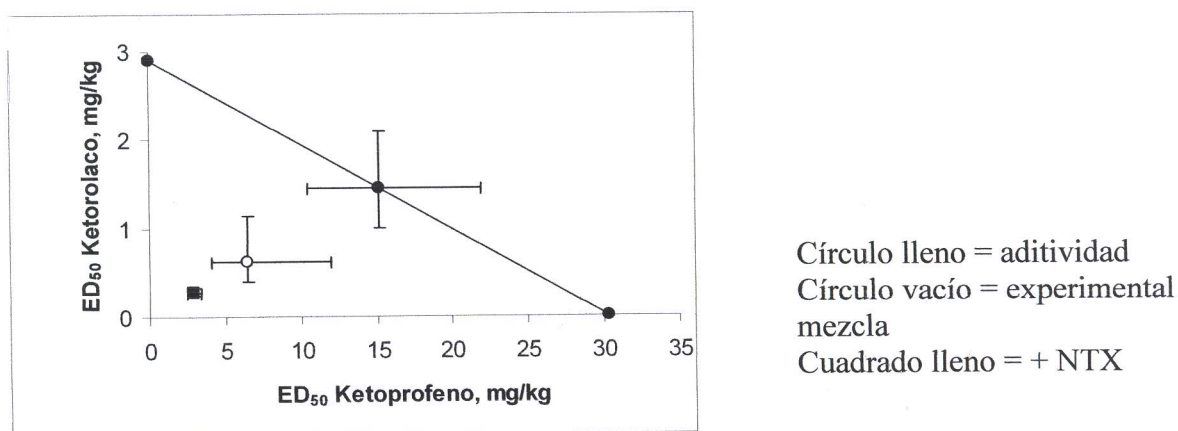


Fig. 5: Isoblograma de la interacción analgésica entre ketoprofeno y ketorolaco, administrados por vía intraperitoneal, en el modelo del writhing test. El (●) representa el punto de aditividad teórica de la mezcla, el (○) corresponde al punto experimental y el (■) al punto experimental obtenido después del pretratamiento con 1 mg/kg de-NTX.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo confirman que la administración de ketoprofeno o de ketorolaco por vía i.p. produce una actividad antinociceptiva dosis-dependiente en el test de las contorsiones abdominales, lo que concuerda con lo encontrado en otros estudios algesiométricos (31, 32, 33).

La DE_{50} del ketorolaco fue 10 veces mayor que la del ketoprofeno lo que podría radicar en la diferente eficacia en la inhibición de las COXs, ya que ketorolaco es el más potente inhibidor de COX-1 (34,35) en tanto que ketoprofeno actuaría a nivel de COX-2 (36).

El paralelismo de las curvas dosis-respuestas, confirma que ambos AINEs actúan a nivel de un mismo sistema receptorial o enzimático, que en este caso sería preferentemente COX-1 para ketorolaco y COX1 y COX-2 para ketoprofeno (34).

La administración de la mezcla de Ketoprofeno y ketorolaco por vía i.p. produce una actividad nociceptiva dosis-dependiente de tipo sinérgico o supra-aditivo que es concordante con la teoría de que al asociar dos o más fármacos que producen el mismo efecto, activando 2 mecanismos diferentes, se obtienen un efecto sinérgico (37).

El pretratamiento con naltrexona, indujo un incremento de la actividad antinociceptiva del ketorolaco y ketoprofeno, lo que hace suponer la participación del sistema opioide. Esto se debería a que la naltrexona sería capaz de unirse con distinta afinidad a los diferentes tipos de receptores opiodes, induciendo un bloqueo de los sistemas autoinhibitorios presinápticos de la liberación de opioides endógenos, que se manifiesta en un aumento en la liberación de ellos, que conducen por un efecto modulador, a una mejor respuesta analgésica del AINE (38).

La falta de cambios estadísticamente significativos en la sinergia antinociceptiva de la co-administración de ketorolaco y ketoprofeno, producida por el pre-tratamiento con L-NAME, sugiere que el sistema GMPc-NO no está comprometido o bien que L-NAME, al ser inhibidor no específico de las NOS, puede tener un efecto débil como para caracterizar su participación en los procesos fisiopatológicos, como lo han sugerido Duarte y Ferreira (14).

Otra posibilidad, que podría explicar la ausencia de cambios significativos, es que la dosis administrada de L-NAME por vía sistémica no alcanza una concentración capaz de inhibir la actividad de la NOS. Además, debe tenerse presente que los cambios en los efectos

antinociceptivos son dependientes de diferentes tiempos y velocidades de administración, absorción, distribución, etc.

Si bien una serie de estudios sugieren que el óxido nítrico participa en el proceso de nocicepción, la complejidad de los mecanismos que regulan la expresión de las diferentes óxido nítrico sintasas, la producción cuantitativa de NO producida por la enzima y la célula donde se genera, así como también la diferente respuesta de las neuronas inhibitorias o excitatorias frente al NO, ha determinado que no se tenga bien definido cuál es el papel exacto de este gas en el dolor (18).

CONCLUSIONES

- El ketorolaco produce actividad antinociceptiva dosis-dependiente cuando se administra por vía i.p. usando el test de las contorsiones abdominales.
- El ketoprofeno induce similar efecto analgésico de naturaleza dosis dependiente, después de la administración sistémica en iguales condiciones de administración y ensayo algésimétrico.
- La administración combinada vía i.p. de ketoprofeno y ketorolaco, produce una interacción de tipo sinérgica o supra-aditiva en el test de las contorsiones abdominales.
- El pretratamiento de los animales con L-NAME, no altera la naturaleza de la interacción sinérgica de la mezcla de ketorolaco y ketoprofeno.
- El pretratamiento de los animales con NTX, incrementa la interacción sinérgica de la mezcla de ketorolaco y ketoprofeno.
- Los resultados del presente trabajo sugieren explorar una vía alternativa para el tratamiento del dolor, con el uso de combinaciones de fármacos.
- Del presente trabajo se podría sugerir que el efecto antinociceptivo de los AINEs ketorolaco y ketoprofeno es modulado por el sistema opioide.

SUGERENCIAS

En el presente trabajo se demuestra la actividad antinociceptiva de ketorolaco y ketoprofeno, que es modulada por el sistema opioide. Las siguientes son las sugerencias que permitirían evaluar la modulación de otros sistemas en analgesia bi o polimodal, de amplio uso en otros países:

- 1) Evaluar combinaciones de ketoprofeno o ketorolaco y otros analgésicos, por diferentes vías de administración y en otros ensayos algésiométricos.
- 2) Estudiar el efecto de fármacos que modifiquen la síntesis, o liberación de serotonina, noradrenalina, acetilcolina, dopamina o NO, en la actividad analgésica de las asociaciones anteriores.



RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la modulación nitridérgica y opioide en la acción antinociceptiva de ketorolaco y ketoprofeno, en un modelo de dolor agudo en ratones: el test de las contorsiones abdominales. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente, al tiempo del máximo efecto, usando 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de las DE_{50} de ketorolaco y de ketoprofeno y la interacción se cuantificó por análisis isobolográfico. La interacción entre los AINEs resultó sinérgica o supraaditiva. La participación del sistema NO/GMPc, en la interacción, se evaluó con el pretratamiento de los animales con L-NAME, un inhibidor no selectivo de NOS, el cual no modifica significativamente la naturaleza de la interacción. El sistema opioide, mediante el pretratamiento de los animales con naltrexona, un antagonista no selectivo de los receptores opiodes, el cual incrementó la interacción sinérgica.

Los resultados del presente trabajo demuestran un efecto sinérgico en la actividad antinociceptiva de la co-administración sistémica de ketorolaco y ketoprofeno, efecto en el cual parece haber participación del sistema opioide.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paeile, C., Saavedra, H., "El dolor, aspectos básicos y clínicos". Editorial Mediterráneo, Santiago, Chile. 1990 pp 20-22..
2. Cerveró F, Laird JM. "Fisiología del dolor. Tratamiento del dolor, teoría y práctica". Barcelona 1995 pp 9-25.
3. Burgess PR, Perl ER. "Cutaneous mechanoreceptors and nociceptores". En: Iggo A (ed.) Handbook of sensory Physiology. Springer- Verlag. Berlin 1973; 2: 29- 78.
4. Ganong WF, fisiologia medica, 16ª edición, Manual moderno 1998, páginas 155-162.
5. Ortega, E., "Neurofisiología del dolor", Cuad. Cir.1955 9:50-54
6. Levine J. "The peripheral nervous system and the inflammatory process. Pain"; 1987.cap 4: 109-115;
7. Wall P. "Inflammatory and neurogenic pain: new molecules, new mechanisms". Br J Anaesth; 1995 cap 75: 123 – 124.
8. Espulgues JV."NO as a signalling molecule in the nervous system". British Journal Pharmacol.2002. 135:1079-1095
9. Abacioglu N, Tunctan B, Akbulut E. "Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/Cgmp cascade by chemically-induced abdominal constriccion in mouse". Life Sciences 2000; 67: 1127-1137.

10. Patel KP, Li YF, Hirooka Y. "Role of nitric oxide in central sympathetic outflow". *Exp Biol Med*.2001 226: 814-824.
11. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*; 14: 60-67. 1991.
12. Machelska H, et al. Differential effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered nitric oxide donors on noxious mechanical and thermal stimulation. *Pol J Pharmacol*;50:407–415. 1998.
13. Tegeder I, et al. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci Lett*;332:146–50. 2002.
14. Duarte ID, Ferreira SD. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators Inflamm*;9:25–30. 2000.
15. Sakurada C, et al. Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. *Neurochem Int*;38:417–423. 2001.
16. Jain NK, et al. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res*;909:170–178. 2001.
17. Ulrich Hoheiselb, Thomas Ungerb, Siegfried Mense , The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: Different spinal and supraspinal

- action of enzyme blockers on rat dorsal horn neurones, *Pain*; 117: 358–367. 2005.
18. Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*;897:9–19. 2001
19. Katzung, Bertrán G .*Farmacología básica y clínica*. Buenos Aires. Medica panamericana., pp 456-490. 2002.
20. Brooks P, Emery P, et al. Interpreting the clinical significance of different inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology*; 38:779-788. 1999
21. Vane JR, Borring RM. Overview: mechanism of action of anti- inflammatory drugs. COX-2 enzyme inhibitors. Kluwer Academic Publishers- William Hawey Press, 1-27. 1996.
22. Ciancio S. *Farmacología clínica para odontólogos*. México. El manual moderno, pp 231-345. 1990.
23. Curtis P. Gartman L. Utilization of ketorolac Tromethamine for control of severe odontogenic pain. *Journal of endodontic*. 20: 457-459; 1994
24. Rogers M, Bradford, R.. Johnson, N.. Comparison of effect of intracanal use of ketorolac tromethamine and dexamethasone with oral ibuprofen on post treatment endodontic pain. *Journal of endodontics*; 25 : 381-385. 1999.
25. Granados V, et al, Evidence for the involvement of nitric oxide in the

antinociceptive effect of ketorolac, *Eur J Pharmacol.* 277; 281-284. 1995

26. Veys EM. 20 years' experience with ketoprofen. *Scand J Rheumatol.* 90:1-44, 1991.

27. Gonzales A., Dagnino., "Analgesicos Narcóticos". *Boletín Esc. De Medicina, P. Universidad Católica de Chile*, 1994,23: 159-163.

28. Dénes Budai, "Neurotransmitter and receptors in the dorsal". *Acta Biológica Szegediensis.*2000, 44 (1-4):21-38

29. Tallarida RJ, Murray RB. *Manual of Pharmacologic Calculation with computer program*, 2nd edition, Springer-Verlag G. New York 1987.

30. Tallardi R.J., Porreca F., Cowan A., "Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms", *Life Sci.*1989;45:947-961.

31. Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception; 93: 430-435. 2001

32. Miranda HF, Prieto JC, Pinardi G. Spinal synergy between nonselective cyclooxygenase inhibitors and morphine antinociception in mice. *Brain Res.*; 1049: 165-270. 2005.

33. Granados Soto V. et al. "Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of ketorolac in the rat". *J Pharmacol Exp Ther.*;272(1):352-356. 1995

34. Warner TD., Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and

lessons from the clinic. FASEB J ; 18: 790-804. 2004.

35. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase I and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med; 10:13-21. 1998

36. Chandrasekharan N.V., et al. COX-3 cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs ;cloning, structure and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. ; 99:13926-13931. 2002.

37. Solomon RE, Gerbhat GF. Synergistic antinociceptive interactions among

drugs administered to the spinal cord, Anesth. Analg.78: 1164-1172, 1994

38. Gourlay GK. Advances in opioid pharmacology. Support Care Cancer 2005
13: 153-159.