

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**“CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE
LA FARMACOCINÉTICA Y EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO
DEL KETOPROFENO EN LA RATA”**

T E S I S

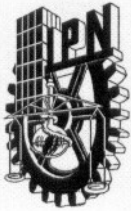
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
FARMACOLOGÍA**

PRESENTA:

QFB. JOSÉ CARLOS AGUILAR CARRASCO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de octubre del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. S. M. para examinar la tesis de grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA FARMACOCINÉTICA Y EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DEL KETOPROFENO EN LA RATA"

Presentada por el alumno:

AGUILAR
Apellido paterno

CARRASCO
materno

JOSÉ CARLOS
nombre(s)

Con registro:

A	0	2	0	1	7	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA

DRA. ROSA AMALIA BOBADILLA LUGO

DRA. GUADALUPE CLEVA VILLANUEVA LÓPEZ

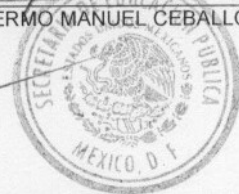
DR. VIÑICIO GRANADOS SOTO

DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

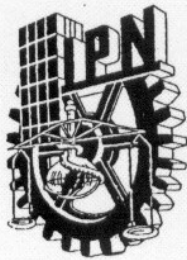
DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
IPN
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 09 del mes noviembre del año 2005, el que suscribe **José Carlos Aguilar Carrasco** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacología** con número de registro **A020170**, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA** y cede los derechos del trabajo intitulado **“CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA FARMACOCINÉTICA Y EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DEL KETOPROFENO EN LA RATA”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **jcaguilarcarrasco@hotmail.com..** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



JOSÉ CARLOS AGUILAR CARRASCO

Nombre y firma

Este trabajo se desarrollo en la Unidad de Investigación en Farmacología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Flores Murrieta.

RESUMEN

El ketoprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esterooidal (AINE) ampliamente utilizado en la práctica clínica y al igual que otros AINEs presenta los efectos adversos característicos de este grupo de fármacos lo cual puede limitar su uso. Está bien establecido que el estudio y conocimiento de la relación entre las propiedades farmacocinéticas y el efecto de un fármaco (modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos) es la base para el diseño de regímenes de dosificación más racionales. Con esto se puede evitar, en la medida de lo posible, la aparición o disminución de los efectos adversos de los fármacos. El establecimiento de modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos en AINEs son escasos debido en parte a lo complejo que puede resultar medir el dolor. En ese sentido, el propósito de este estudio fue caracterizar la relación entre la farmacocinética y el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en la rata, utilizando el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata. Se evaluó el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en la rata y simultáneamente se les tomaron muestras sanguíneas las cuales fueron analizadas por un método de cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado y validado en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos al graficar el efecto en función de la concentración del fármaco en sangre de la rata, mostraron una relación directa. Se obtuvo un buen ajuste con el modelo del efecto máximo. La CE_{50} calculada fue de 1.49 $\mu\text{g/ml}$ y el E_{max} calculado fue de 99.01%. En base a estos resultados se puede tratar de establecer un mejor uso clínico de este fármaco.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA	1
1.2 DOLOR	6
1.2.1 CLASIFICACIÓN DEL DOLOR	7
1.2.2 COMPONENTES DEL DOLOR	8
1.2.3 TRANSMISIÓN DEL DOLOR Y NOCICEPTORES	9
1.3 INFLAMACIÓN Y DOLOR	12
1.3.1 MECANISMO DE LA INFLAMACIÓN	13
1.4 HIPERALGESIA	16
1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE DOLOR	19
1.5.1 MODELO DE EDEMA POR CARRAGENINA	20
1.6 TERAPÉUTICA DE LA INFLAMACIÓN	21
1.7 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES	22
1.7.1 INTRODUCCIÓN	22
1.7.2 CLASIFICACIÓN DE LOS AINES	24
1.7.3 KETOPROFENO	25
1.7.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL KETOPROFENO	26
1.7.3.2 FARMACOCINÉTICA DEL KETOPROFENO	28
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAES Y MÉTODOS	33
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSIÓN	55
7. CONCLUSIONES	65
8. REFERENCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva dosis-respuesta típica	3
Figura 2. Relación directa entre el efecto producido y las concentraciones de un fármaco	4
Figura 3. Relación indirecta entre el efecto producido y las concentraciones de un fármaco	5
Figura 4. Mediadores químicos liberados durante una lesión	14
Figura 5. Representación gráfica de la hiperalgesia	18
Figura 6. Estructura química del ketoprofeno	25
Figura 7. Vía metabólica del ácido araquidónico	26
Figura 8. Metodología para la obtención de muestras sanguíneas	39
Figura 9. Tiempos de latencia grupos control	42
Figura 10. Tiempos de latencia para ketoprofeno	43
Figura 11. Cursos temporales del efecto antihiperalgésico	44
Figura 12. Curva dosis-respuesta	46
Figura 13. Cromatogramas típicos	47
Figura 14. Curva de calibración del método analítico	48
Figura 15. Cursos temporales de las concentraciones sanguíneas	50
Figura 16. Cursos temporales de las concentraciones sanguíneas y del efecto antihiperalgésico del ketoprofeno	52
Figura 17. Relación entre el efecto antihiperalgésico y la concentración sanguínea del ketoprofeno	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los AINEs	24
Tabla 2. Parámetros farmacodinámicos del ketoprofeno	45
Tabla 3. Precisión y exactitud intra e interdías del método analítico	49
Tabla 4. Parámetros farmacocinéticas del ketoprofeno	51
Tabla 5. Parámetros farmacodinámicos calculados en la relación en la relación concentración – efecto	54

LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

5-HT	Hidroxitriptamina ó serotonina.
AA	Ácido araquidónico.
ABC	Área Bajo la Curva.
AINEs	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.
C _{max}	Concentración máxima.
COX	Ciclooxigenasa.
DE ₅₀	Concentración necesaria para alcanzar el 50% del efecto máximo.
e.e.	Error Estándar.
EAH	Efecto Antihiperálgico.
E _{max} _{obs}	Efecto máximo observado.
FC	Farmacocinética.
FC-FD	Relación farmacocinética-farmacodinámica.
FD	Farmacodinamia.
HETE	Ácido Hidroxieicosatetraenoico.
i.p.	Intraperitoneal.
IL	Interleucina.
LCs	Leucotrienos
LOX	Lipooxigenasa.

p.o.	Oral.
PCs	Prostaciclina.
PGs	Prostaglandinas.
PIFIR	Pain-Induced Functionality Impairment in the rat.
r	Coefficiente de Correlación.
s.c.	Subcutáneo.
SNC	Sistema Nervioso Central.
$t_{1/2}$	Vida media de eliminación
TBXs	Tromboxanos.
TE _{max}	Tiempo necesario para alcanzar el E _{max} .
T _{max}	Tiempo necesario para alcanzar la C _{max} .
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
TR	Tiempo de retención.
UV	Ultravioleta.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

Un fármaco se define como toda sustancia química que introducida voluntariamente en el organismo de un sujeto posee la propiedad de modificar las condiciones físicas o químicas de éste (OMS). La magnitud de dicho cambio puede ser valorado o medido en función de la respuesta obtenida en determinado tejido, órgano o sistema del organismo y relacionarlo con la cantidad de fármaco administrada. Se ha observado en numerosos estudios farmacológicos, que en la mayoría de los casos existe una relación directa entre la cantidad administrada y el efecto producido del fármaco; es decir, a mayor cantidad administrada del fármaco, mayor respuesta obtenida. De tal manera que la intensidad y duración del efecto farmacológico dependerá de la dosis administrada y la cinética de distribución del fármaco (Shargel y Andrew, 1985). Ahora, para que los efectos de un fármaco lleguen a presentarse, es necesario que éste sufra varios procesos al interior del organismo vivo y así poder llegar de forma libre a su sitio de acción. Una vez ahí, las moléculas del fármaco se encargarán de provocar varios procesos bioquímicos y fisiológicos en el organismo e iniciar una cascada de eventos que se traducirán en el efecto farmacológico que podrá ser benéfico o indeseable.

Una de las metas de la terapéutica es minimizar los efectos adversos posibles. Para ello, es necesario establecer una relación dosis-efecto, o bien, establecer la relación farmacocinética – farmacodinámica (Holford, 2001).

La farmacocinética (FC), estudia los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos, así como los múltiples factores que pueden modificarlo (Aarons, 1997). En otras palabras, la farmacocinética hace relación específicamente a las diferentes acciones que el organismo ejerce sobre un fármaco.

Por otro lado, la farmacodinamia (FD) se puede definir como la relación cuantitativa entre la concentración (observada) en plasma o tejido y la magnitud del efecto (observado) (Venitz, 1995, Shargel, 1985). En esta etapa, es el fármaco el que produce transformaciones en el organismo.

En general se acepta que para la mayoría de los fármacos el efecto farmacológico es proporcional a la dosis administrada. La figura 1 muestra una típica curva dosis – respuesta típica, en ella se puede apreciar que existe una región lineal comprendida en el intervalo del 20 al 80 % del efecto farmacológico máximo (Shargel y Andrew, 1985). Antes y después de este intervalo, la relación no se comporta lineal. A valores muy bajos de la dosis, la curva es horizontal; a dosis mayores, la pendiente empieza a decrecer hasta que la curva se vuelve asintótica.

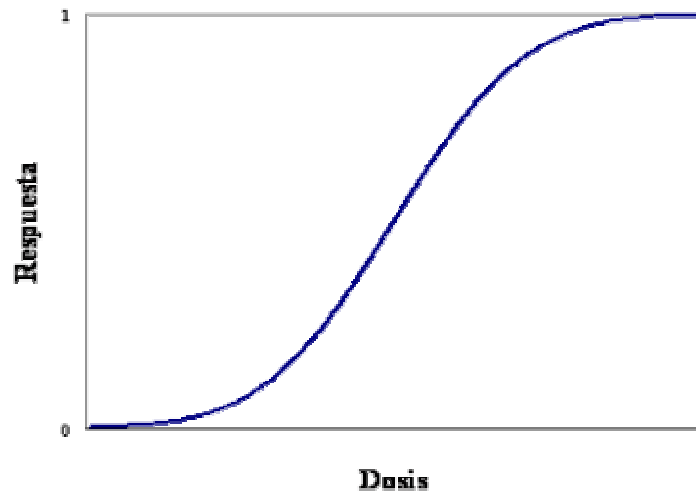


Figura 1. Curva dosis respuesta típica.

El estudio y conocimiento de la relación entre las propiedades farmacocinéticas y el efecto de un fármaco es la base para el diseño de regímenes de dosificación más racionales (Holford, 1981). Así, mediante la utilización de datos que relacionen las concentraciones séricas o plasmáticas de un fármaco con la medición del efecto suscitado y representado en modelos matemáticos, permite entender en gran medida la relación entre la dosis administrada y la magnitud del efecto fisiológico alcanzado (Schwinghammer, 1988).

Para algunos fármacos es posible establecer una relación directa entre el efecto producido y la concentración del fármaco en algún compartimento accesible del cuerpo, usualmente plasma o sangre (Holford, 1981). Obviamente, la relación más fácilmente delineada es aquella en la cual existe una correlación directa de la concentración plasmática y el efecto que puede ser observado; donde dicha

concentración y el efecto se incrementan o disminuyen en forma paralela. (Colburn, 1988); tal como lo muestra la figura 2.

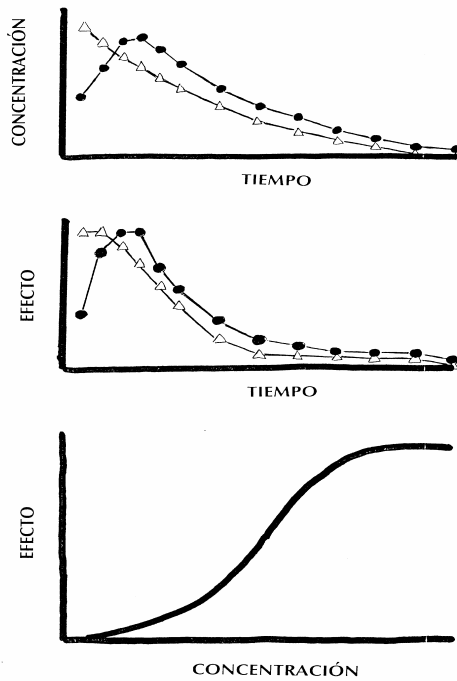


Figura 2. Relación directa entre el efecto producido y las concentraciones de un fármaco.

Sin embargo, cuando la respuesta farmacológica toma tiempo para ser observada, y dicha respuesta aparentemente no está relacionada con la concentración del fármaco, se aplica un modelo de relación indirecta para relacionar la farmacocinética y la farmacodinamia. Entonces son necesarias técnicas matemáticas que pueden resultar complejas para intentar explicar este fenómeno (Dayneka, 1993). Bajo estas circunstancias, cuando los datos de los efectos obtenidos en función de la concentración son graficados, la gráfica obtenida representa una curva de histéresis antihoraria, es necesario entonces aplicar los

modelos matemáticos para tratar de explicar la relación existente, tal como lo muestra la figura 3.

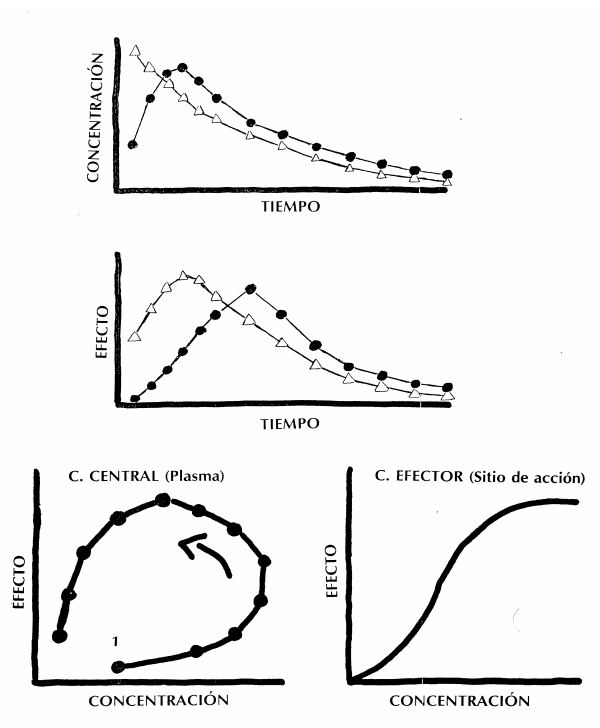


Figura 3. Relación del tipo indirecta entre el efecto producido y las concentraciones de un fármaco.

En el establecimiento de modelos FC-FD, es muy importante contar con métodos reproducibles y confiables. El muestreo de las concentraciones en los fluidos biológicos y las mediciones del efecto farmacológico deben ser consistentes, así como métodos que cumplan con las características de especificidad, reproducibilidad, sensibilidad, precisión y exactitud establecidas (Bellisant y cols., 1998).

1.2 DOLOR

El dolor quizá sea la experiencia más universalmente compartida por el ser humano. Es la primera causa de búsqueda de ayuda médica y uno de los temores más profundamente enraizados en la naturaleza humana. Su manejo representa una carga económica impresionante en términos de cuidados sanitarios, pérdidas de productividad, compensaciones económicas y otros factores relacionados (Belmonte, 2001).

La sensación de dolor es una de las funciones vitales del sistema nervioso central (SNC) y por su naturaleza inherente de aversión, provee información segura de lo que ocurre o de amenaza de lesión. Si la causa del dolor no se retira, bajo condiciones fisiopatológicas el dolor persiste, genera miedo y ansiedad (Ito y cols., 2001).

El dolor se ha definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) como: “Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión tisular real o potencial, cuya presencia se manifiesta por alguna forma de conducta observable” (IASP, 1986). Esta definición implica dimensiones diferentes en esa experiencia compleja: una disminución sensori-discriminativa, referida a la capacidad de distinguir las características del estímulo doloroso en el espacio y en el tiempo: localización, extensión, intensidad y duración. Una dimensión cognitiva-evaluativa, referida a la percepción del estímulo y la comprensión de su significado, y, una tercera dimensión, la afectivo-emocional, que corresponde a los sentimientos de aversión que evoca el conocimiento de lo que ocurre y el deseo de evitar el daño (Belmonte, 2001).

De tal manera que el dolor lo tenemos que ubicar como una cuestión benéfica desde el punto de vista biológico, ya que nos indica que existe un posible daño. En ese sentido, una de las principales finalidades del dolor es la de defensa o mecanismo protector que actúa como un sistema de alarma, informando al organismo de algún daño o estímulo nocivo lo que hace que el individuo reaccione eliminando o alejándose del estímulo doloroso (Basbaum y Wolf, 1999; Guyton y Hall, 1999). Sin embargo, cuando ha ocurrido una lesión y hay daño, entonces el organismo mismo promueve la reparación del tejido mediante la generación de una zona de hipersensibilidad localizada (dolor inflamatorio) alrededor del tejido lesionado, lo que trae como consecuencia que el sujeto evite los movimientos y el contacto con cualquier objeto, favoreciendo y logrando así la curación (Basbaum y Woolf, 1999; Guyton y Hall, 1999).

1.2.1 CLASIFICACIÓN DEL DOLOR

Existen diversas clasificaciones del dolor, sin embargo, puede subdividirse en tres categorías desde el punto de vista fisiopatológico: el dolor fisiológico, el inflamatorio y el neuropático. El dolor normal o fisiológico, es una sensación protectora que nos alerta acerca de la presencia en el ambiente de estímulos lesivos. A su vez, después de un proceso inflamatorio o una injuria nerviosa se suceden una serie de alteraciones en el sistema somatosensorial, que amplifican las respuestas e incrementan la sensibilidad a estímulos periféricos, de tal manera que el dolor puede ser activado por estímulos normalmente inocuos o de baja intensidad. El dolor fisiológico, llamado también clínico o

patológico, es una expresión de la plasticidad del sistema somatosensorial, que se define como la capacidad de las neuronas de cambiar sus funciones, su perfil bioquímico o su estructura. Estos cambios operan en múltiples sitios y se producen por diversos mecanismos. La hipersensibilidad que acompaña al dolor inflamatorio usualmente retorna a lo normal si el proceso o enfermedad causante es controlado. Mientras que el dolor neuropático persiste por tiempo prolongado aun cuando haya ocurrido un proceso de cicatrización (Woolf y Salter, 2000).

1.2.2 COMPONENTES DEL DOLOR

La existencia de varios tipos de dolor puede ser entendida si se utilizan los siguientes componentes para su análisis: nocicepción, percepción del dolor, sufrimiento y comportamiento del dolor. Cada una de las cuales posee un substrato anatómico, fisiológico y psicológico (Loeser y Melzack, 1999; Chapman y Gavrin, 1999). El término nocicepción se refiere a los mecanismos fisiológicos asociados con la recepción de señales en el sistema nervioso central, generados tras la activación de receptores sensoriales específicos, o nociceptores por los estímulos nocivos (Bonica, 2003).

La percepción del dolor se desencadena por un estímulo nocivo, como un daño o una enfermedad o por lesiones que comprometen al SNC o periférico (Treede, 1995; Bonica, 2003).

El sufrimiento se define como una experiencia emocional negativa inducida por el dolor y también por miedo, ansiedad, estrés, pérdida de los objetivos y otros

estados psicológicos. No todo sufrimiento es causado por dolor, pero es muy común que las personas describan el sufrimiento en el lenguaje del dolor (Bonica, 2000).

Los comportamientos del dolor son todas las acciones que el paciente hace o deja de hacer con relación a la presencia de daño tisular, como por ejemplo, manifestaciones orales, llanto, inmovilidad física, cambios en la marcha, rechazo al trabajo, consulta frecuente al médico, etc. (Bonica, 2000).

1.2.3 TRANSMISIÓN DEL DOLOR Y NOCICEPTORES

La nocicepción se lleva a cabo cada vez que existe un estímulo capaz de activar receptores que indican daño háptico (nociceptores). Los nociceptores tienen tres funciones claras con respecto a su papel en la nocicepción: la transducción, la conducción y la transmisión de la información a las neuronas centrales (Woolf y Costigan, 1999).

El proceso de transducción implica que el nociceptor convierte el estímulo nocivo en potenciales de acción. La transmisión se refiere a la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas. La modulación detalla la alteración de las señales nociceptivas dentro del asta dorsal de la médula espinal. Se liberan neurotransmisores que inhiben o amplifican la señal sensorial. En la percepción se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva del dolor (Hyman y Cassem, 1995; Stuart, 1999; Woolf y Costigan, 1999).

Los nociceptores son las estructuras sensoriales especializadas en captar la información nociceptiva. Se localizan en la piel, el tejido subcutáneo, músculos, articulaciones y vísceras (Cerveró y Laird, 1996). En condiciones fisiológicas normales, los nociceptores son capaces de distinguir entre señales nocivas o inocuas, según la intensidad del estímulo, aunque el umbral de activación de los nociceptores depende del tejido innervado y del tipo de estímulo. En la membrana de los nociceptores se expresan receptores especializados que se activan por estímulos específicos, por ejemplo, canales iónicos sensibles al calor, o receptores sensibles a la estimulación por agentes químicos. Los nociceptores se clasifican en tres grupos principalmente, esto basándose en su función y anatomía: las fibras A β son de gran diámetro, mielinizadas con conducción muy rápida. La mayoría de estas fibras detectan estímulos inocuos aplicados a la piel, músculo y articulaciones, normalmente no se ven involucradas en procesos de dolor bajo condiciones normales. Las fibras A δ son de diámetro mediano y poco mielinizadas, poseen una conducción intermedia entre las fibras A β y las fibras C. Las fibras C poseen diámetro pequeño y mediano, no son mielinizadas y de conducción lenta. La mayoría son polimodales, o sea que responden a estímulos nocivos térmicos, químicos y mecánicos (Julius y Basbaum, 2001).

Cuando un estímulo específico o de una intensidad suficiente activa los nociceptores se genera una corriente de despolarización como respuesta. La mayoría de las células animales poseen una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la membrana celular. Cuando la membrana se

encuentra en reposo se acumula un exceso de iones negativos (Cl^-) en el interior de la membrana, de manera que en ese estado, existe un potencial de membrana negativo. Tras ocurrir un estímulo nociceptivo, se inicia un potencial de acción, aumenta bruscamente la permeabilidad de la membrana a los iones de Na^+ y en menor proporción los de K^+ . Así, estos penetran a la célula y se invierte el potencial de membrana, o sea, se despolariza. Generando con ello un impulso nervioso que se propaga por las fibras nerviosas que convergen en la médula espinal a través de la raíz dorsal y de ahí a la sustancia gris de la médula espinal. Es ahí donde ocurren sinapsis con interneuronas o directamente con neuronas de proyección espinotalámica. Del tálamo se conduce el estímulo hacia la corteza cerebral donde se genera la percepción sensorial consciente del dolor (Guyton y Hall, 1999, Millan, 1999). Posteriormente, la membrana se repolariza, ya que se bloquean los canales de Na^+ (pero no los de K^+), así se tiene de nuevo el potencial de reposo de la membrana.

Existen algunas sustancias químicas que se liberan durante el proceso inflamatorio y que pueden actuar de forma directa o indirecta sobre los nociceptores. Básicamente, la activación o inactivación de los nociceptores se produce en relación con cambios en la conductancia a los iones Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} , que derivan en la apertura de canales asociados a receptores de membrana o a cascadas de segundos mensajeros en el interior de la célula (Richardson y Vasko, 2002). Por ejemplo, las citocinas liberadas por células del sistema inmune que infiltran el tejido inflamado, aumentan la conductancia al

Ca^{2+} y Na^+ ; la serotonina produce un efecto similar, a la vez que disminuye la conductancia del K^+ (Millan, 1999).

1.3 INFLAMACIÓN Y DOLOR

Los sistemas de transmisión nociceptiva descritos anteriormente se activan como respuesta a la lesión inflamatoria periférica. La inflamación es una reacción local conectivo-vascular, provocada por microorganismos o sustancias irritantes, cuyo fin es localizar y destruir dichos agentes patógenos, así como reparar los daños que estos pueden producir. A nivel macroscópico, la respuesta más común se acompaña de eritema, edema y dolor a la palpación (hiperalgesia) (Robbins, 1990).

Las respuestas inflamatorias surgen en tres fases diferentes mediadas por mecanismos distintos: Una fase transitoria aguda que se caracteriza por vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar; una fase subaguda tardía que se identifica por infiltración de leucocitos y fagocitos y, una fase proliferativa crónica en que se advierten degeneración y fibrosis tisulares (Gallin y cols., 1982).

La inflamación se divide en aguda y crónica en función de su duración, y al igual que el dolor, conduce a una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada (Robbins y cols., 1990). La inflamación aguda presenta edema de manera inmediata o transitoria, suele comenzar inmediatamente después del estímulo lesivo, alcanza un máximo a los 5 a 10 minutos después y puede desaparecer en 15 a 30 minutos si no existe otro estímulo o si no se

desencadenan otros mecanismos. Este fenómeno se caracteriza por cambios de flujo y calibre vascular, cambios de la permeabilidad vascular y exudación leucocitaria. Inicialmente, la reacción inflamatoria está mediada por la histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos que son activados en fases consecutivas (Robbins y cols., 1990; Bendtzen y cols., 1998).

1.3.1 MECANISMO DE LA INFLAMACIÓN

La presencia de material extraño o de una lesión tisular induce la activación de los macrófagos residentes, los cuales cumplen un papel decisivo en el desarrollo de la inflamación aguda (Ferreira, 1980). A partir de este evento inicial, se desencadenan una serie de procesos que incluyen el reclutamiento de leucocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), los cuales ejercen un papel amplificador y una cascada de liberación de mediadores de diferentes orígenes: algunos generados por la lesión tisular (bradicinina, factores de la coagulación, serotonina, histamina, prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PCs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TBXs), ATP, etc), factores neurogénicos (sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, aminoácidos excitatorios, catecolaminas) además de factores de crecimiento (factor de crecimiento nervioso) (Dray, 1994; Ferreira, 1993; Sorkin, 1997). En la figura 4 se esquematiza este proceso.

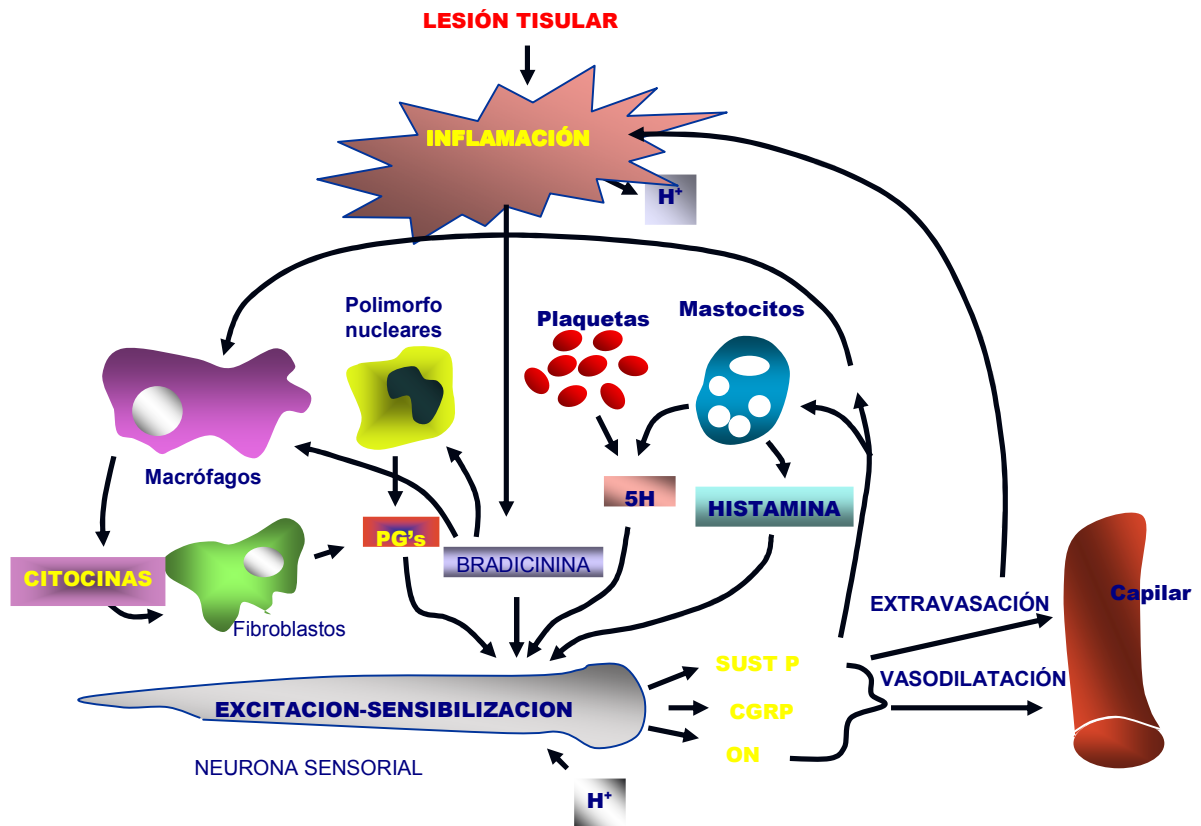


Figura 4. Mediadores químicos liberados durante una lesión tisular.

En estas condiciones, los nociceptores se rodean de lo que se ha denominado la “sopa inflamatoria” (Dray, 1994). Como ya se había mencionado, algunos de estos mediadores químicos activan los receptores de las fibras aferentes primarias generando potenciales de acción, mientras que otros los sensibilizan, es decir, ocurre una disminución en su umbral de respuesta, de tal forma que estímulos mecánicos o térmicos de menor intensidad logran activarlos (Ferreira, 1990).

Especial mención merecen las PGs por la magnitud de su participación en los procesos de inflamación y por consiguiente del dolor que cursa por esta patología. Las PGs se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA) presente en los fosfolípidos de las membranas celulares, el cual es liberado al producirse una lesión tisular por acción de la fosfolipasa A₂ (Higgins y cols., 1984). El AA actúa como sustrato de varias enzimas, siendo la vía de la ciclooxigenasa (COX) y de la lipooxigenasa (LOX) las rutas metabólicas oxidativas principales (Meot y cols., 1992). La COX cataliza la oxidación del AA obteniendo las PGs, las PCs y los TBXs, mientras que la LOX cataliza la peroxidación obteniendo cadenas de ácido hidroxieicosatetraenoico (HETEs) y LCs (Cashman, 1996).

Existen al menos dos isoformas de la COX, una denominada COX-1 o “constitutiva” y descrita como la responsable de la biosíntesis de las PGs importantes en la homeostasis y ciertas funciones fisiológicas ya que participan en la citoprotección, principalmente en el tubo gastrointestinal o en la regulación del flujo sanguíneo renal. La otra isoforma es la denominada COX-2 o “inducible”, que aparece como respuesta a situaciones de daño tisular o estímulo inflamatorio y por lo tanto se ha propuesto que participa y/o empeora la respuesta inflamatoria (Granados y col., 2001). Durante los procesos inflamatorios, diversas citocinas como la IL-1 β y el TNF α , entre otros, inducen la producción de la COX - 2, con la subsecuente liberación de PGs, las cuales participan activamente en la sensibilización de las terminaciones nociceptivas ante estímulos dolorosos (Bley y cols., 1998). Esto conlleva a una respuesta dolorosa exagerada frente a estímulos que en otras ocasiones serían nada o

poco dolorosos (hiperalgesia), en otras palabras, disminuyen el umbral de dolor (Granados y col., 2001). La PGE₂ y la PGI₂ (prostaciclina) han sido señaladas como las PGs que más contribuyen a la hiperalgesia, tanto en animales como en humanos (Stock y cols., 2001). Por otra parte, también se han relacionado algunos leucotrienos con el fenómeno de hiperalgesia (Wook y cols., 2000).

1.4 HIPERALGESIA

Cuando el organismo recibe un estímulo de suficiente intensidad, se pone en marcha el sistema somatosensorial, el cual, alerta al individuo sobre la posibilidad que exista un daño a su integridad, y desencadenar así una respuesta de evitación. Si el estímulo es tan intenso que ocasiona una lesión tisular o nerviosa comienzan los complejos mecanismos productores de dolor que ya se han descrito. Si el nociceptor de la zona dañada no se recupera de la lesión, entonces aparece el fenómeno de hiperalgesia, la cual modifica el estado basal del nociceptor, alterando la respuesta habitual al fenómeno nociceptivo (Dray y cols., 1994). Sin duda, la aparición de la hiperalgesia tiene una finalidad protectora del tejido inflamado, ya que previene el posible daño posterior del área lesionada (Cerveró y Laird, 1996).

El daño tisular cutáneo provocado por irritantes químicos, daño térmico, estimulación eléctrica, etc., relacionado con la reacción inflamatoria se relaciona con dos zonas principales de dolor. En la primera, se tiene comprendida la región tisular dañada, y se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo y una sensibilidad aumentada a los estímulos térmicos, mecánicos

y químicos y se denomina zona de hiperalgesia primaria. Alrededor de esta zona se localiza un área no dañada pero que posee un aumento en la sensibilidad ante estímulos mecánicos y estímulos térmicos fríos, no siendo así con calor. Esta área se denomina zona de hiperalgesia secundaria (Aloe y cols., 1997).

La presencia de un proceso inflamatorio afecta no solo a los nociceptores, el SNC manifiesta también una serie de cambios que van a participar de manera importante en la generación de este tipo de dolor. El sitio donde mayoritariamente se han descrito estos procesos es la médula espinal, ahí se produce un estado de sensibilidad alterada con un incremento en la excitabilidad de estas neuronas, caracterizado por: a) reducción en los umbrales de activación de estas neuronas, las cuales pueden ser activadas con estímulos considerados no dolorosos; b) alteración en el patrón temporal de respuesta, de tal manera que estímulos breves pueden evocar una actividad sostenida de las neuronas; c) incremento en la respuesta de las neuronas, de forma que estímulos dolorosos producen un mayor efecto en ellas; d) expansión en los campos receptivos, lo que permite que las respuestas sean evocadas, estimulando una mayor área (Woolf, 1996).

Estos cambios dependen fundamentalmente de la actividad de las fibras C y de la liberación de diferentes moléculas e involucran tanto a las neuronas primarias como a las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Es posible que los mecanismos periféricos sean preponderantes en las fases tempranas después de un daño tisular y que sean estas entradas las responsables de generar los cambios centrales que explican las características que causan el

dolor, aun en ausencia de inflamación (Coderre y cols., 1993; Woolf y cols., 1997).

El término hiperalgesia se refiere a un desplazamiento hacia la izquierda en la curva que relaciona la intensidad del estímulo con la sensación dolorosa percibida, e incluye a la alodinia cuando el estímulo es de baja intensidad, tal como lo muestra la figura 5.

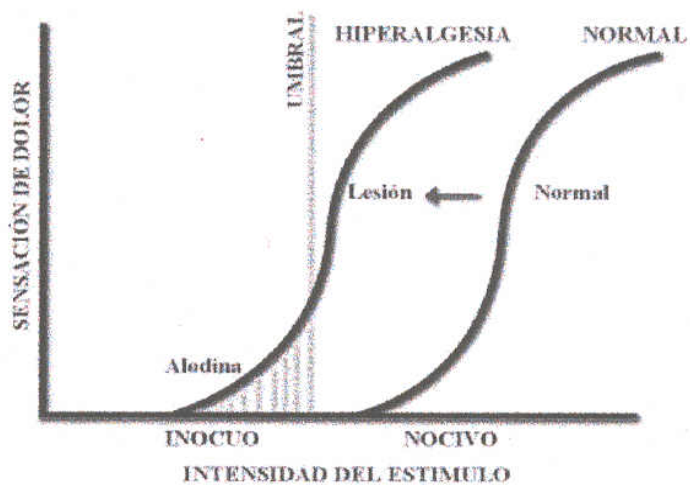


Figura 5. Representación gráfica del fenómeno de la hiperalgesia.

La hiperalgesia primaria se puede explicar por los mecanismos periféricos ya mencionados. Mientras que la hiperalgesia secundaria por mecanismos centrales (Coderre y cols., 1993; Treede, 1995; La Motte, 1996; Woolf, 1996; Coda y Bonica 2000).

1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE DOLOR

Sin duda alguna, siendo el dolor un fenómeno tan difícil de medir y explicar, el campo del estudio del dolor se ha beneficiado en gran medida con los modelos experimentales que se han desarrollado para su estudio, ya que han permitido profundizar en su mecanismo y tratamiento para plantear nuevos enfoques para mejorar la terapéutica farmacológica.

La percepción del dolor es un hecho psíquico que resulta imposible valorar en forma directa en animales, y por ello su presencia se deducirá de manera indirecta, partiendo de las respuestas conductuales y por correlación con estudios paralelos en humanos.

La creación de modelos animales para estudiar el dolor agudo y persistente entre 1980 y 2000 permitió acumular muchos conocimientos sobre los mecanismos de la neuroplasticidad periférica y central, en particular a lo tocante a cuadros inflamatorios crónicos y neuropáticos, así como los fenómenos de sensibilización, hiperalgesia, alodinia, dolor espontáneo, difusión bilateral, a partir de lesiones unilaterales y plasticidad que dependen de la actividad. En muchos estudios, el animal controla la duración e intensidad del estímulo al quedar en libertad para escapar, como es el caso del reflejo de retiro de la pata o las pruebas de estimulación de la cola, o por medio de reacciones de escape aprendidas más complejas en las cuales se puedan medir los tiempos de latencia (Byers y Bonica, 2003). En ese sentido, el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata (METRP) ha resultado ser un modelo confiable para la evaluación de la hiperalgesia en ratas. A la rata se

le provoca una lesión tisular mediante la administración subcutánea de una solución de carragenina en el cojinete plantar de la pata trasera de la rata. Para evaluar la hiperalgesia se hace incidir un haz luminoso térmico en la región de la lesión tisular y se registra el tiempo de latencia (tiempo que tarda la rata en retirar la pata de la fuente de luz). Este modelo ha sido efectivo para evaluar el efecto antihiperalgésico de algunos fármacos utilizados en el tratamiento del dolor (Yaksh y cols., 2001; Reyes y cols., 2002).

1.5.1 MODELO DE EDEMA POR CARRAGENINA

La carragenina es una mezcla de polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas rojas *Rhodophyceae*. Es soluble en solventes polares. La podemos encontrar en dos formas: κ y λ (The Merck Index, 1995). La dosis para producir el efecto inflamatorio agudo por carragenina varía entre 0.05 y 0.1 ml de una suspensión de carragenina en solución salina al 1%, aunque se obtienen variabilidad de un experimento a otro en función de la dosis y el tipo de carragenina utilizada.

En el modelo de carragenina, la inyección subplantar de esta sustancia genera una reacción inflamatoria tiempo-dependiente (Winter y cols., 1962; Di Rosa y cols., 1970; Castañeda y cols. 1995). El mecanismo de la formación del edema por esta sustancia parece estar mediado por la liberación de histamina y serotonina en una primera etapa; posteriormente en una segunda etapa, aparece la producción de PGs, bradicinina y 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Ferreira y cols., 1974; Ucelay y cols., 1988). En este modelo, los niveles de COX-2 se ven incrementados por la reacción inflamatoria y por consiguiente

hay un aumento de las PGs que incrementan la formación de edema y filtración leucocitaria al promover el flujo sanguíneo de la región inflamada. En ese sentido, la inhibición de la COX da como resultado una disminución en la producción de las PGs en el sitio de la inflamación, así como a nivel espinal (Coderre y cols., 1990; Seibert y cols., 1994).

1.6 TERAPÉUTICA DE LA INFLAMACIÓN

El tratamiento de los pacientes con inflamación incluye dos objetivos principales: primero, el alivio del dolor que con frecuencia constituye el síntoma de presentación y la principal queja continua del enfermo; y segundo, la disminución, o en teoría, la suspensión del proceso lesivo tisular. La reducción de la inflamación con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) a menudo genera alivio del dolor durante periodos significativos. Además, la mayor parte de los analgésicos no opioides, tales como la aspirina, también tiene efectos antiinflamatorios, por lo cual son apropiados para tratar padecimientos inflamatorios, tanto agudos, como crónicos (Furst y Caldwell, 2002).

Los glucocorticoides también presentan potentes efectos antiinflamatorios y cuando se utilizaron por primera vez se consideró que constituían la respuesta final al tratamiento de la artritis inflamatoria. Desafortunadamente, la toxicidad relacionada con la terapéutica corticosteroide crónica evita su uso, excepto para brotes agudos de la enfermedad articular. Por lo tanto, los antiinflamatorios no esteroideos han adquirido una función principal en el tratamiento de patologías con procesos inflamatorios (Furst y Caldwell, 2002).

1.7 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINEs)

1.7.1 INTRODUCCIÓN

Estos fármacos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que no guarda relación química entre sí (aunque muchos de ellos son ácidos orgánicos), y que a pesar de esto, comparten ciertas características terapéuticas y de efectos colaterales (Roberts y Morrow, 2001).

Los AINEs son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de procesos inflamatorios. También poseen efectos antipiréticos y analgésicos, pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los vuelven útiles para el control de trastornos en los cuales el dolor se relaciona con la intensidad de los procesos inflamatorios (Furst y Munster, 2002).

Esta actividad terapéutica está mediada principalmente por la inhibición de la COX, enzima encargada de la síntesis de PGs. Sin embargo, los AINEs también pueden actuar sobre otros sitios, ya que poseen múltiples efectos centrales y periféricos (Miyoshi, 2001; Furst y Caldwell, 2002; Roberts y Morrow, 2001), tales como:

a) Inhibir la migración de leucocitos hacia el exudado inflamatorio (Higgs y cols., 1983).

b) Inhibir la actividad o expresión de algunas moléculas de adherencia celular (selectinas, integrinas, molécula 1 de adherencia celular (ICAM-1), molécula 1 de adherencia de células vasculares (VCAM-1), que actúan al ser activadas las

células endoteliales que a su vez orientan a las células circulantes al sitio de inflamación (Kavanaugh y cols., 1994; Rao y cols., 1994; Campbell, 2000).

c) Inhiben la producción de bradicinina en el lugar de la inflamación (Lees y cols., 1991).

d) Estabilizan las membranas celulares al inhibir la liberación de enzimas lisosomales las cuales median la destrucción de tejido en procesos inflamatorios (Veys, 1991).

e) Inhiben la enzima lipooxigenasa, provocando así el bloqueo de la síntesis de leucotrienos (Veys, 1991).

f) Inhiben la activación y función de los neutrófilos, reduciendo la cantidad de mediadores inflamatorios en el sitio de la lesión (Abramson y cols., 1989; Weissmann, 1991).

g) Estimulan la vía óxido nítrico-GMPc. Algunos AINEs que bloquean la hiperalgesia al parecer activan esta vía (Duarte y cols., 1992).

h) Activación de canales de K^+ . Al activar diferentes canales de K^+ produciendo una hiperpolarización de las neuronas nociceptivas y generando así analgesia (Lázaro y cols., 2001; Granados y cols., 2002).

i) Por efectos a nivel central (Malmberg y Yaksh, 1992).

1.7.2 CLASIFICACION DE LOS AINES

Se han sugerido varios esquemas para clasificar a los AINEs, que se basan en diferentes características clínicas y farmacológicas. Sin embargo, la clasificación química, con lo antigua que es, sigue siendo la manera más útil de clasificar a los fármacos en grupos que tienen características clínicas similares (Miyoshi, 2003). En la Tabla 1 se muestra dicha clasificación.

Derivados del ácido salicílico	Aspirina Salicilato de sodio Trisalicilato de colina y magnesio Salsalato Diflunisal Acido salicilsalicílico Sulfasalazina Olsalazina
Derivados del paraaminofenol	Acetaminofén
Acidos indolacéticos	Indometacina Sulindac Zomepirac Etodolac
Derivados del pirazol	Fenilbutazona Oxifenbutazona Azapropazona
Acidos antranílicos (fenamatos)	Acido mefenámico Acido meclofenámico
Acidos pirrolacéticos	Tolmetina Alclofenaco Diclofenaco Ketorolaco Bromfenaco
Acidos propiónicos	Ibuprofeno Naproxeno Fenoprofeno Ketoprofeno Suprofeno Flurbiprofeno Cixaprozín
Derivados de la benzotiacina (oxicams)	Piróxicam Tenoxicam Meloxicam
Alcanonas	Nabumetone
Inhibidores selectivos de la COX-2	Celecoxib Nimesulide Mk-966 Rofecoxib
Otros agentes nuevos	Tenidap

Tabla 1. Clasificación de AINEs de acuerdo con su estructura química. (Miyoshi, 2003)

1.7.3 KETOPROFENO

El ketoprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esterooidal perteneciente a la familia de los ácidos 2-aryl propiónicos. Posee un centro quiral en su estructura molecular, de tal manera que presenta dos enantiómeros: R(-) y S(+); sin embargo, en la clínica es administrado como la mezcla racémica a pesar de que se han reportado diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre los enantiómeros (Mauleon, 1996; Cooper y cols. 1998). Su estructura química se muestra en la figura 6.

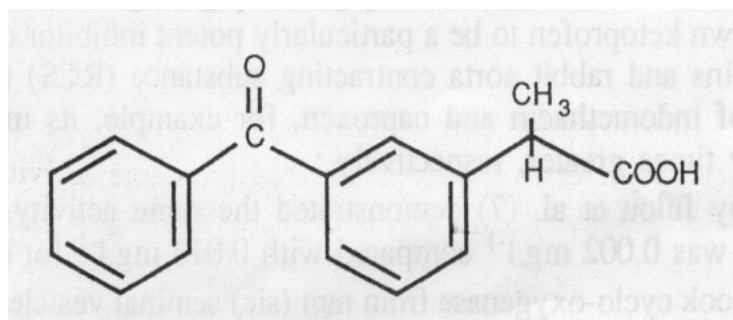


Figura 6. Estructura química del ketoprofeno (Veys, 1991).

El ketoprofeno ha emergido como un potente fármaco AINE (Veys, 1991). Es ampliamente utilizado en la práctica clínica para el control del dolor crónico y agudo de tejido blando y músculo esquelético (Fossgreen, 1976; Kantor, 1986; Veys, 1991; Moretti y cols., 2000). De acuerdo con algunos reportes, se ha establecido que su efecto terapéutico se debe principalmente al enantiómero S(+) (dexketoprofeno) (Gich y cols., 1996; Cabré y cols., 1998).

En estudios in vitro se ha demostrado que el enantiómero R (-) es entre 100 y 1000 veces menos potente que el enantiómero S(+) (Addams y cols., 1970; Williams, 1990).

1.7.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN

El principal mecanismo de acción del ketoprofeno, al igual que el de otros AINEs es la inhibición de la enzima COX, tal como lo muestra la figura 7, provocando con esto la disminución de la síntesis de PGs y TBXs (Kantor, 1996; Veys, 1991). Además, se ha demostrado que el ketoprofeno es capaz de inhibir la síntesis de leucotrienos y de 5-HETE (Williams y Upton, 1988).

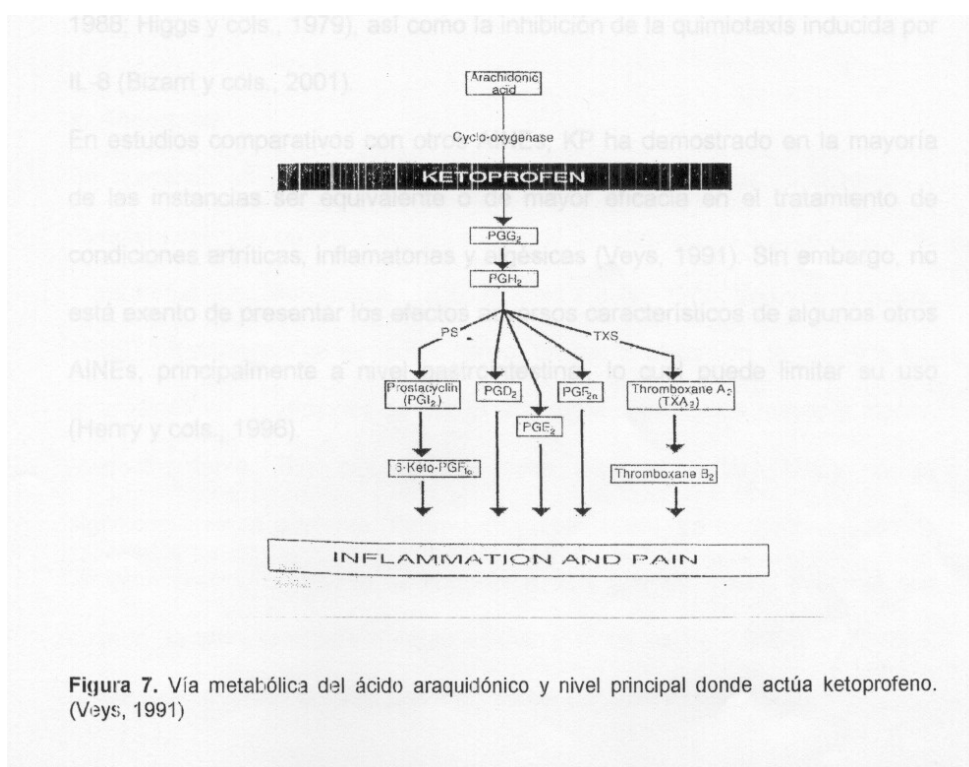


Figura 7. Vía metabólica del ácido araquidónico y nivel principal donde actúa ketoprofeno. (Veys, 1991)

Otras propiedades del ketoprofeno que también contribuyen a su acción antiinflamatoria y analgésica son la capacidad de inhibir los receptores a bradicinina (Julou y cols., 1976), la estabilización de membrana lisosomal en daño osmótico y la prevención de la liberación de enzimas lisosomales que median la destrucción tisular durante la inflamación (Kantor, 1996).

Estas propiedades terapéuticas se han descrito tanto en humanos como en modelos animales (caballos, ovejas, ratas y gatos) (Turek y cols., 1988 ; Sunshine y cols., 1988; Landoni y cols., 1995; Arifah y cols., 2001; Díaz y cols., 2002; Lees y cols., 2003). También se ha propuesto que el ketoprofeno puede actuar inhibiendo la migración de leucocitos a la zona de la lesión (Vannier y cols., 1988; Higgs y cols., 1979), así como la inhibición de la quimiotaxis inducida por IL-8 (Bizarri y cols., 2001).

En estudios comparativos con otros AINEs, ketoprofeno ha demostrado en la mayoría de las instancias ser equivalente o de mayor eficacia en el tratamiento de condiciones artríticas, inflamatorias y algésicas (Veys, 1991). Sin embargo, no está exento de presentar los efectos adversos característicos de algunos otros AINEs, principalmente a nivel gastrointestinal, lo cual puede limitar su uso (Henry y cols., 1996).

1.7.3.2 FARMACOCINÉTICA DEL KETOPROFENO

Se ha descrito que el ketoprofeno posee propiedades farmacocinéticas excepcionales. En humanos, se absorbe rápidamente a través del tracto gastrointestinal alcanzando su concentración máxima (C_{max}) en plasma a la hora o dos horas después de su administración oral. Posee una vida media corta (1-2 h) y una rápida eliminación lo cual reduce el riesgo de acumulación. Las interacciones adversas con otros fármacos son raras y existen pocas contraindicaciones para el uso de este fármaco. Sin embargo, no está exento de producir efectos colaterales gastrointestinales representativos de los AINEs, aunque la incidencia de estos y otras reacciones adversas son relativamente menores en comparación con otros de su clase (Veys, 1991).

a) Absorción

En humanos se ha demostrado que el ketoprofeno tiene una absorción rápida y completa después de una administración oral, alcanzando su C_{max} alrededor de 1 a 2 horas (Lewellen y cols., 1976; Ishizaki y cols., 1980; Williams y Upton, 1988). La presencia de alimentos parece afectar la absorción, la C_{max} y la t_{max} alcanzadas en condiciones de ayuno son significativamente mayor y menor, respectivamente. Sin embargo, el área bajo la curva (ABC) no es significativamente diferente (Bannwarth y cols., 1988). La biodisponibilidad de ketoprofeno administrado oralmente es superior a 90% (Jamali, 1990), mientras que cuando es administrado vía intramuscular y rectal es de 71-96% y 73-93%, respectivamente, de la dosis oral equivalente (Ishizaki y cols., 1980).

Estudios en ratas han demostrado que el ketoprofeno por vía oral se absorbe rápidamente a través del tracto gastrointestinal, alcanzando la C_{max} alrededor de 15 a 30 minutos, y alrededor de las 3 a 4 horas después de la ingestión aparece un rebote de las concentraciones, fenómeno que indica una posible absorción estomacal así como gastrointestinal. Se ha observado que tras la administración de dosis entre 1 a 5 mg/kg, las C_{max} obtenidas en plasma son de 1.2 a 10 mg/l (Julou y cols., 1976; Satterwhite y Boudinot, 1992; Radwan, 2000).

b) Distribución

El ketoprofeno al igual que otros AINEs, se une ampliamente a proteínas plasmáticas (>90%) principalmente a la albúmina (Ishizaki y cols., 1980; Netter y cols., 1987; Williams y Upton., 1988). De tal manera que su distribución es principalmente en el compartimento plasmático. El volumen de distribución es aproximadamente de 0.1 a 0.2 l/kg (Brater, 1988; Jamali y Brocks, 1990). Ketoprofeno también penetra a líquido sinovial. De acuerdo a varios estudios, se ha demostrado que los valores de C_{max} en este compartimento son menores que en plasma y ocurre a un mayor periodo de tiempo (Kennedy, 1976; Wallis y cols., 1983; McCrea y cols., 1986; Lima y cols., 1987; Netter y cols., 1989).

c) Metabolismo

Se ha demostrado en humanos y en ratas que el ketoprofeno se metaboliza extensamente por medio de enzimas microsomales en el hígado (Upton y cols., 1980; Graham y cols., 1984; Jamali y Brocks, 1990). Sufre una

glucoronidación, formándose ésteres glucorónicos inestables, los cuales son excretados a través de la orina (Fossgreen, 1976; Williams y Upton, 1988). El aclaramiento plasmático es alrededor de 1.16 ± 0.09 ml/kg min, cuando se administra por vía oral; mientras que por vía intramuscular y rectal este valor es similar o un poco mayor (Ishizaki y cols., 1980).

La vida media del ketoprofeno es de alrededor de 2 horas, lo cual indica que el compuesto sufre un rápido metabolismo y eliminación (Ishizaki y cols., 1980; Graham y cols., 1984; Houghton y cols., 1984; Kokki y cols., 2001). Como consecuencia de este dato, tenemos que no existe el problema de una posible acumulación de ketoprofeno durante periodos cortos o largos de tratamiento, salvo tener en cuenta cuando exista una insuficiencia hepática, que el ketoprofeno se metaboliza principalmente en el hígado.

d) Eliminación

El ketoprofeno se elimina rápidamente a través de los riñones (Julou y cols., 1976; Fossgreen, 1976; Ishizaki y cols., 1980). En voluntarios sanos se ha demostrado que KP posee un aclaramiento renal de alrededor de 0.15 ± 0.04 ml/min kg, esto con una dosis oral de 100 mg. El ketoprofeno se elimina a través de la orina en forma de conjugados glucorónicos principalmente (Ishizaki y cols., 1980; Jamali y cols. 1990). Por otro lado, se ha reportado que la eliminación de ketoprofeno puede ser modificada por efectos circadianos (Ollagnier y cols., 1987).

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar del amplio uso de los AINEs, existen algunas cuestiones no del todo exploradas en lo concerniente a su eficacia y seguridad. Al igual que otros medicamentos, su uso clínico puede ser mejorado por el entendimiento de su mecanismo de acción, así como el de sus propiedades farmacocinéticas. (Castañeda, 2002).

Los ejemplos de la utilidad de un modelo FC-FD de varios grupos de medicamentos son cada vez más abundantes en la literatura médica, sin embargo, existe información escasa acerca de la relación farmacocinética-farmacodinámica de los AINEs, esto debido en gran parte a lo complejo que puede resultar medir el dolor.

En el caso del KP, se han reportado modelos FC-FD midiendo analgesia en humanos (D'Arienzo y cols., 1984; Kohler y cols., 1985), mientras que en animales, se han medido los parámetros farmacocinéticos de los enantiómeros y la mezcla racémica de este fármaco y se comparan con la liberación de mediadores químicos de la inflamación en exudados obtenidos de becerros, caballos y ovejas (Landoni y cols., 1995, 1996; Arifah y cols., 2001). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes donde se haya evaluado la relación entre la analgesia y las concentraciones sanguíneas del ketoprofeno en la rata. Por lo anterior, en esta tesis se plantea determinar el tipo de relación entre la farmacocinética y el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en ratas empleando el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata.

3. OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la relación entre la farmacocinética y el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en ratas utilizando el modelo de retiro de la pata por estimulación térmica.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar curvas dosis – respuesta del ketoprofeno empleando el modelo de retiro de la pata por estimulación térmica.
2. Realizar el montaje y validación de un método para la cuantificación de ketoprofeno en micromuestras de sangre de rata.
3. Caracterizar la farmacocinética del ketoprofeno a las dosis que produce su efecto antihiperalgésico.
4. Caracterizar la relación entre la farmacocinética y el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en la rata.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

El ketoprofeno fue proporcionado por Merck, S.A. de C.V. (México). La carragena λ se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos los reactivos empleados en este estudio fueron grado analítico y para cromatografía.

4.2 EQUIPOS

Para evaluar el efecto antihiperálgico del ketoprofeno se utilizó el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata.

Las concentraciones sanguíneas de ketoprofeno en rata se determinaron mediante un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución.

4.3 ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar hembra de 9-10 semanas de edad, con un peso de 180-220 g provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. Se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) un día antes del estudio. Se les retiró el alimento 12 horas antes de los experimentos, sin embargo se les mantuvo con libre acceso al agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Guías sobre aspectos éticos para la investigación de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Cada rata se utilizó solo una vez y posteriormente se sacrificó.

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

a) Curvas dosis-respuesta

Los animales (n= 42) se asignaron aleatoriamente en siete grupos experimentales, cada uno de los cuales se conformó por el mismo número de animales.

Grupo control 1

Se le administró p.o. el vehículo del fármaco (solución salina al 0.9%) y recibió una administración subcutánea de carragenina (50 µl, 10 mg/ml) en el cojinete plantar de la pata trasera derecha.

Grupo control 2

Solamente se le administró p.o. el vehículo del fármaco (solución salina al 0.9%).

Efecto antihiperalgésico del ketoprofeno:

Se conformaron 5 grupos. A cada uno se les administró una de las siguientes dosis de ketoprofeno (vía oral): 0.32, 1.0, 3.2, 10 y 32 mg/kg. En todos los casos, se aplicó a los animales subcutáneamente carragenina (50 µl, 10 mg/ml) en el cojinete plantar de la pata trasera derecha inmediatamente antes de la administración del fármaco.

b) Farmacocinética del ketoprofeno.

Se emplearon ratas Wistar hembra (n=18), con un peso entre 180 y 220 g y se asignaron aleatoriamente en tres grupos experimentales (cada uno de los cuales

conformado por el mismo número de animales), los cuales recibieron el ketoprofeno vía oral a dosis de 1.0, 3.2 y 10 mg/kg. Previamente estos animales fueron canulados en la arteria caudal de la cola para la obtención de las muestras.

c) Relación entre la farmacocinética y el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno.

Tres grupos tratados de la misma manera que en el punto anterior, pero previo a la administración del ketoprofeno se les administró carragenina tal como se indica en el inciso a). Se les midió el tiempo de latencia en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata e inmediatamente después se les tomó una muestra de sangre.

d) Modelo de retiro de la pata por estimulación térmica

Para evaluar la hiperalgnesia térmica en las ratas, se utilizó el estimulador térmico de retiro de la pata descrito previamente por Dirig y cols. (1997). El equipo consta de una superficie de vidrio sobre la cual fueron colocadas las ratas de manera individual en cubículos Plexiglass. Dicha superficie se mantuvo a una temperatura de $30 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. El estímulo térmico es originado de un foco que se encuentra montado sobre un brazo mecánico por medio del cual el haz luminoso puede ser dirigido con mayor facilidad hacia la zona de la pata de la rata ya que puede ser manipulado en dos dimensiones. Además, cuenta con un pequeño espejo para facilitar la colocación justa del haz luminoso. El foco se coloca debajo de la pata trasera derecha del animal. El estímulo térmico, de 5.5 amperios, produce una temperatura inicial de 30°C e incrementa rápidamente hasta alcanzar los 42.5°C a los doce segundos aproximadamente. Al mismo tiempo que se inicia el estímulo

térmico, es decir al encender el foco, se activa un cronómetro. En el momento que la rata sienta el estímulo y retire su pata de él, automáticamente el estímulo y el cronómetro se detienen por medio de sensores de movimiento. El tiempo transcurrido desde el inicio del estímulo hasta que el animal retira la pata, se le llama tiempo de latencia. En todos los casos, el tiempo máximo de exposición al estímulo fue de 20 segundos, al cual automáticamente se apaga el foco.

Previamente, las ratas fueron ambientadas en el equipo al colocarlas por espacio de 30 minutos en los cubículos individuales, esto con el fin de evitar variaciones en la medición de la latencia originadas por estrés.

La evaluación del efecto antihiperalgésico fue llevada a cabo inmediatamente antes de la administración del fármaco y de la carragenina (tiempo cero) y cada 30 minutos, hasta completar 6 horas después de la administración. La administración de la carragenina se llevó a cabo en todos los casos 5 minutos antes de la administración del ketoprofeno.

Al finalizar los experimentos las ratas fueron sacrificadas en una cámara saturada con CO₂.

e) Análisis de los datos de la evaluación del efecto antihiperalgésico.

Los datos se expresaron como el promedio del tiempo de latencia para cada grupo experimental (n=6) de los diferentes grupos \pm el error estándar. Se realizaron curvas de latencia contra tiempo para cada grupo. Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para determinar el % del efecto antihiperalgésico observado.

$$\text{EAH (\%)} = [(\text{TL}_K - \text{TL}_C) / (\text{TL}_S - \text{TL}_C)] 100$$

Donde:

TL_K : Tiempo de latencia observado en ratas tratadas con ketoprofeno, previa administración de carragenina, al tiempo t .

TL_C : Tiempo de latencia observado en ratas tratadas con ketoprofeno, previa administración de carragenina, al tiempo t .

TL_S : Tiempo de latencia observado en ratas control, tratadas solamente con solución salina sin carragenina, al tiempo t .

Con los resultados obtenidos, se realizaron gráficas del %EAH versus dosis empleada y se obtuvieron el efecto máximo observado (E_{maxObs}), el tiempo al que se alcanzó el E_{maxObs} (T_{EmaxObs}), y el área bajo la curva del %EAH ($\text{ABC}_{\%EAH}$) por el método de los trapecoides.

f) Montaje y validación de un método cromatográfico para la determinación de ketoprofeno en micromuestras de sangre de rata

Previo al análisis de muestras provenientes de las ratas que participaron en los experimentos, se desarrolló un método analítico por medio del cual el ketoprofeno fue determinado utilizando un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución. El método analítico fue previamente validado, es decir, cumplió con la evaluación de los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

g) Método de semipurificación de muestras para la obtención de ketoprofeno en sangre de rata.

En viales Eppendorf de 2 ml, se colocaron 100 μ l de sangre (ya sea sangre libre de fármacos, sangre a la que se le añadieron concentraciones conocidas de KP o muestras provenientes de las ratas que recibieron el ketoprofeno). Se le adicionó 40 μ l de ácido perclórico al 70% para precipitar proteínas y se agitó en vortex a máxima velocidad por 1 minuto. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomaron 50 μ l y se inyectaron al sistema cromatográfico.

i) Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación del ketoprofeno
El sistema cromatográfico fue marca Waters (Waters y Assoc. Milford, MA; EUA), constó de una bomba modelo 1515, un inyector modelo 7725, un detector de absorbencia modelo 2487 y un sistema de manejo de datos Breeze. La separación de los compuestos se realizó en una columna Symmetry C₁₈ de 15 cm de longitud x 3.9 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo – solución de fosfato monobásico de potasio 0.1 M, ajustado a un pH de 3.5 con ácido acético en proporciones 48:52 (v/v)). El flujo se mantuvo constante a 1 ml/min y la detección de los compuestos se llevó a cabo por absorbencia UV a una longitud de onda de 260 nm.

j). Obtención de muestras sanguíneas

La obtención de las muestras sanguíneas para determinar ketoprofeno en sangre de rata se llevó a cabo de la manera como se muestra en la figura 8.

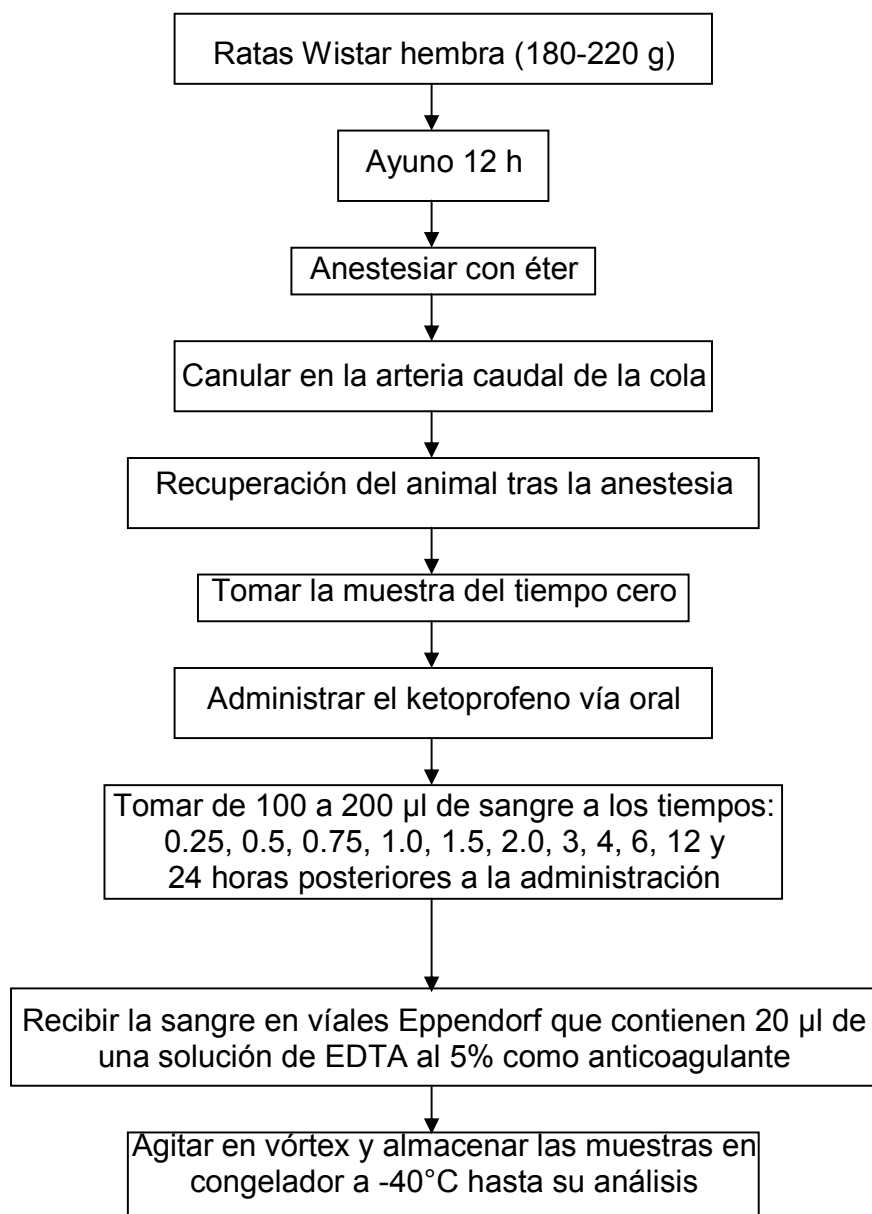


Figura 8. Metodología para la obtención de muestras sanguíneas en ratas.

j) Validación del método analítico

1. Selectividad

Para que el método sea “selectivo”, éste debe demostrar que en la matriz biológica (sangre) no aparecen compuestos que puedan interferir con la correcta cuantificación del ketoprofeno. Por lo tanto se analizaron tres muestras de sangre provenientes de distintos animales que estuvieron sometidos a las mismas condiciones en las que estarían los animales de experimentación. En dado caso de que apareciera el pico de algún compuesto desconocido, las condiciones cromatográficas se modificarán (proporciones de la fase móvil) para eliminar este obstáculo. En cambio, si no aparecen interferencias, entonces se procede a evaluar la linealidad del método.

2. Intervalo de calibración

Para determinarlo, se administró una dosis de 1 mg/kg a una rata y se obtuvieron muestras sanguíneas a diferentes tiempos y se establecieron que concentraciones se obtienen a esta dosis y se extrapoló a dosis mayores.

3. Linealidad del método

Se determinó preparando seis curvas de calibración independientes en sangre de rata libre del fármaco y sometiéndolas al proceso de semipurificación ya descrito anteriormente. Las seis curvas se prepararon por sextuplicado el mismo día. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la intersección (b). La linealidad del método se acepta solo si r es igual o mayor a 0.990 en todas las curvas de calibración, además, durante el análisis de

las muestras provenientes de ratas del experimento farmacocinético, esta premisa debe ser cumplida igualmente.

4. Exactitud y Precisión

Se evaluaron en las curvas de calibración empleadas en la linealidad del método. Pero, además, también se evaluaron a los controles de calidad, o sea, a las concentraciones baja, intermedia y alta en un mismo día (seis determinaciones) y en tres días consecutivos (duplicado por día). Estos parámetros son satisfactorios si se encuentran dentro de los rangos permitidos para estudios farmacocinéticos (85-115%).

Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación es la concentración mínima que es cuantificada con exactitud y precisión aceptables.

5. RESULTADOS

5.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO EN EL MODELO DE ESTIMULACIÓN TÉRMICA DE RETIRO DE LA PATA. EABORACIÓN DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA

Para evaluar el efecto hiperalgésico provocado por la carragenina en la pata trasera de la rata empleando el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata, se administró 50 μ l de una solución de carragenina (10 mg/ml) en el cojinete plantar vía subcutánea. La figura 9 describe el curso temporal de los tiempos de latencia observados para los grupos control (solución salina y solución de carragenina).

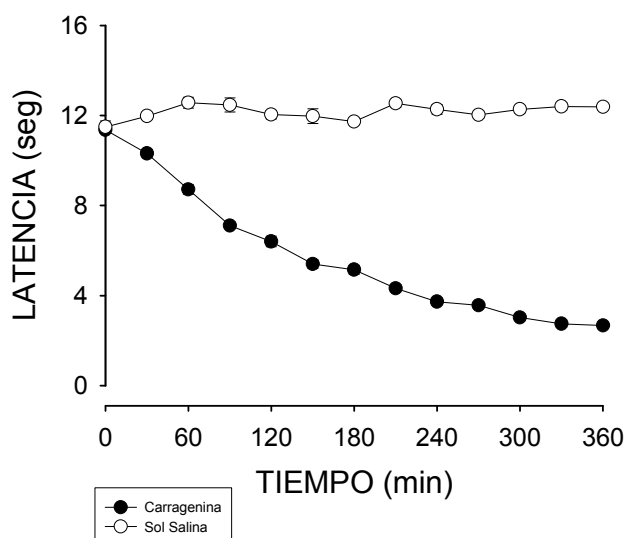


Figura 9. Tiempos de latencia de grupos control. Se muestra el curso temporal de la latencia tras la aplicación intraplantar de solución salina y carragenina. El efecto hiperalgésico de la carragenina se manifiesta como la disminución en el tiempo de latencia (n=18).

Para evaluar el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata en ratas se emplearon las dosis de 0.32, 1.0, 3.2, 10 y 32 mg/kg, y se obtuvieron los cursos temporales del efecto antihiperalgésico para cada una de las dosis probadas.

La figura 10 describe los cursos temporales de los tiempos de latencia observados para los grupos tratados con ketoprofeno.

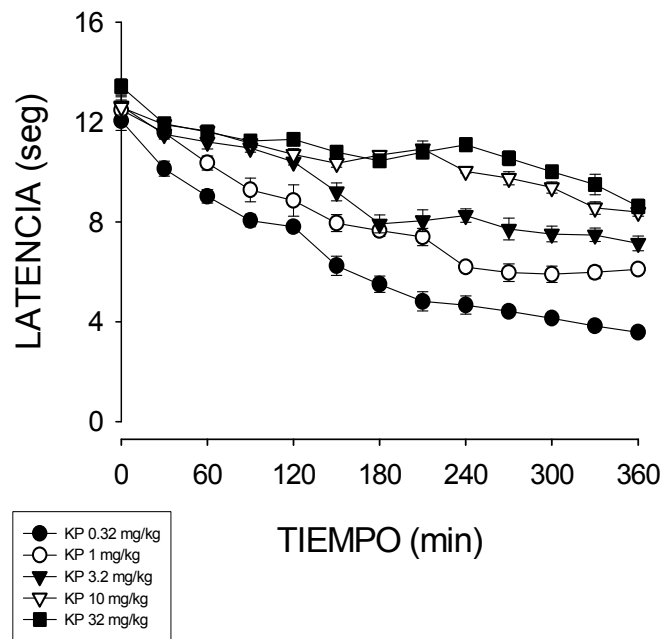


Figura 10. Tiempos de latencia para ketoprofeno. Se muestra el curso temporal de la latencia para los diferentes grupos que recibieron carragenina (50 μ l) vía s.c. y diferentes dosis de ketoprofeno p.o. Cada punto representa el promedio de al menos seis ratas por grupo \pm el error estándar.

Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de efecto antihiperalgésico (EAH) y se elaboró una gráfica de EAH (%) en función del tiempo. En la figura 11 se puede apreciar la gráfica obtenida.

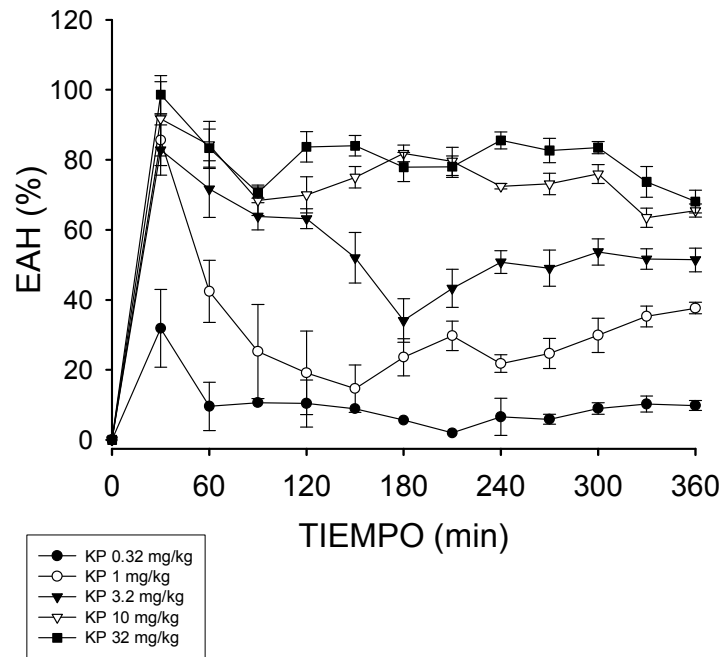


Figura 11. Cursos temporales del efecto antihiperalgésico obtenido con la administración de ketoprofeno p.o. a distintas dosis, previa administración de carragenina s.c. en el cojinete plantar. Cada punto representa el promedio de al menos seis ratas \pm el error estándar.

En función de los resultados obtenidos al hacer la transformación de tiempos de latencia a porcentaje de efecto antihiperalgésico, se calcularon los parámetros farmacodinámicos, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Parámetro	Dosis (mg/kg)				
	0.32	1.0	3.2	10.0	32.0
Emax Obs (%) ± e.e	31.83 ± 11.1	78.76 ± 4.6	84.85 ± 6.38	97.16 ± 10.6	98.64 ± 5.4
T _{Emax} (h) ± e.e	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
ABC _{EObs} ± e.e	1901.05 ± 56.7	10789.4 ± 410.1	19312.01 ± 306.7	26084.7 ± 318.2	26354.25 ± 285.71

Tabla 2. Parámetros farmacodinámicos obtenidos para el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata. Cada resultado es el promedio de al menos seis determinaciones ± el error estándar.

Posteriormente se graficó el área bajo la curva del %EAH en función del logaritmo de la dosis. En la figura 12 se puede apreciar la formación de la sigmoïdal característica de una curva dosis-respuesta. El Emax del ABC calculado fue de 27029.85 ± 1263.39 y la DE₅₀ fue de 1.47 ± 0.21 mg/kg

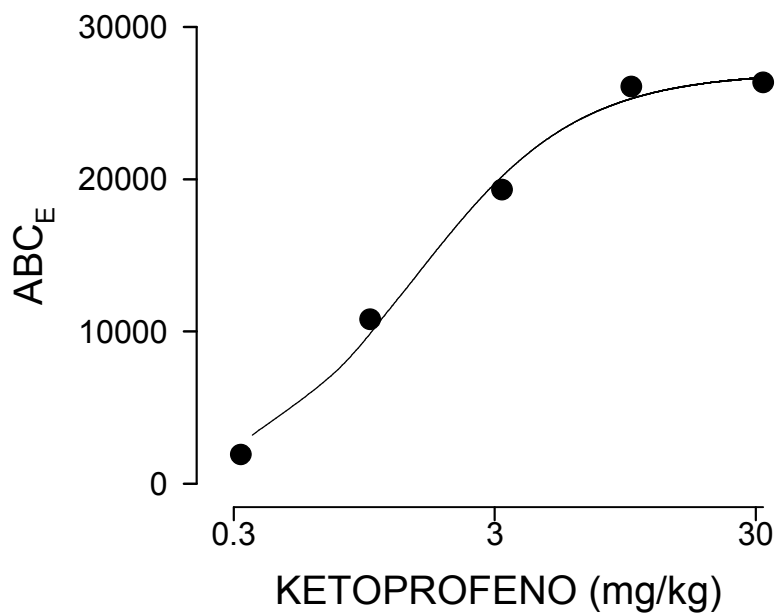
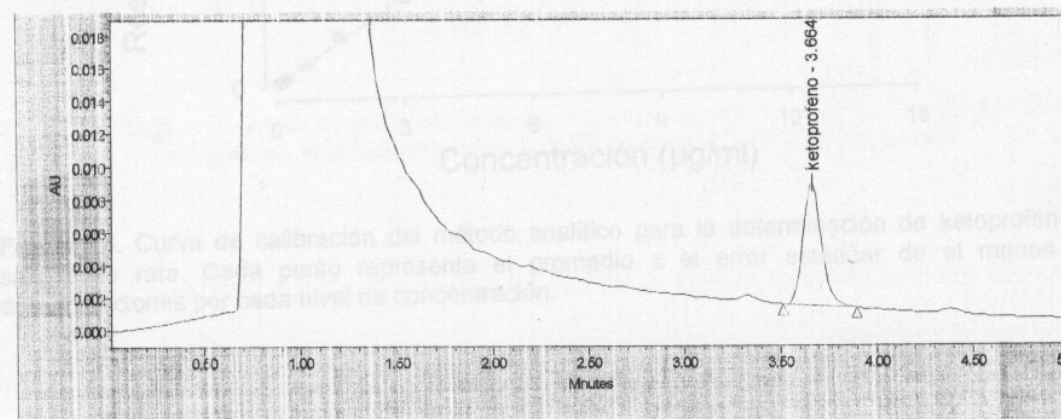
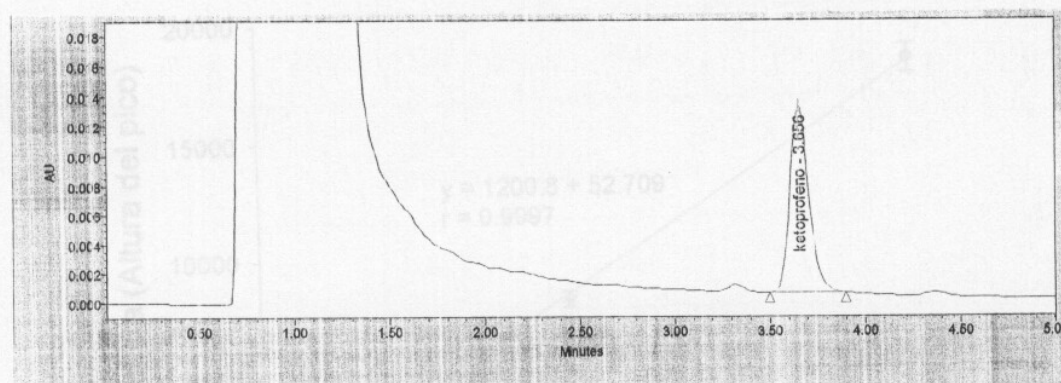
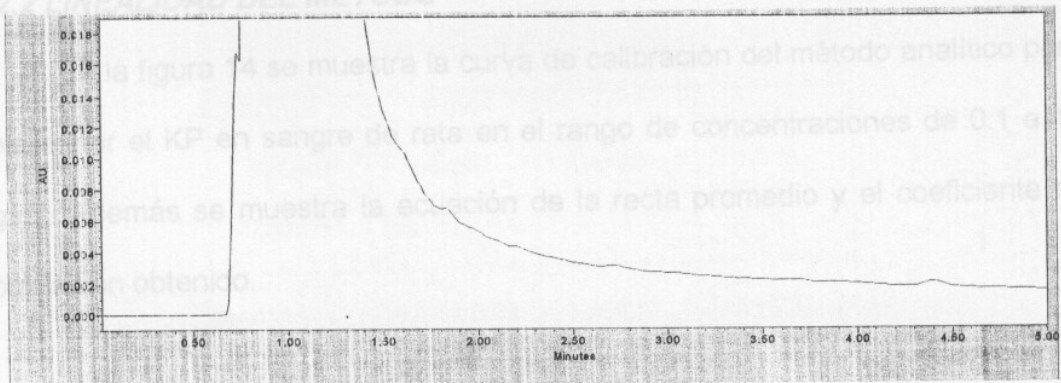


Figura 12. Curva dosis-respuesta de ketoprofeno, considerando la relación de área bajo la curva del efecto antihiperálgico.

5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE KETOPROFENO EN MICROMUESTRAS SANGUÍNEAS DE RATA

5.2.1 SELECTIVIDAD

En la figura 13 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos tras la inyección de extractos sanguíneos al sistema cromatográfico de: sangre libre de ketoprofeno (parte superior); sangre adicionada con un estándar de ketoprofeno (7.5 µg/ml) (parte media); y sangre obtenida de una rata después de la administración oral de 3.2 mg/kg de ketoprofeno (parte inferior). El tiempo de retención (TR) para el ketoprofeno fue de 3.5 min aproximadamente. Se puede apreciar que no aparecen picos de sustancias endógenas que puedan interferir con la determinación de ketoprofeno.



5.2.3 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Figura 13. Cromatogramas típicos obtenidos tras la inyección de extractos sanguíneos de rata al sistema cromatográfico.

5.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En la figura 14 se muestra la curva de calibración del método analítico para determinar el ketoprofeno en sangre de rata en el rango de concentraciones de 0.1 a 15 µg/ml. Además se muestra la ecuación de la recta promedio y el coeficiente de correlación obtenido.

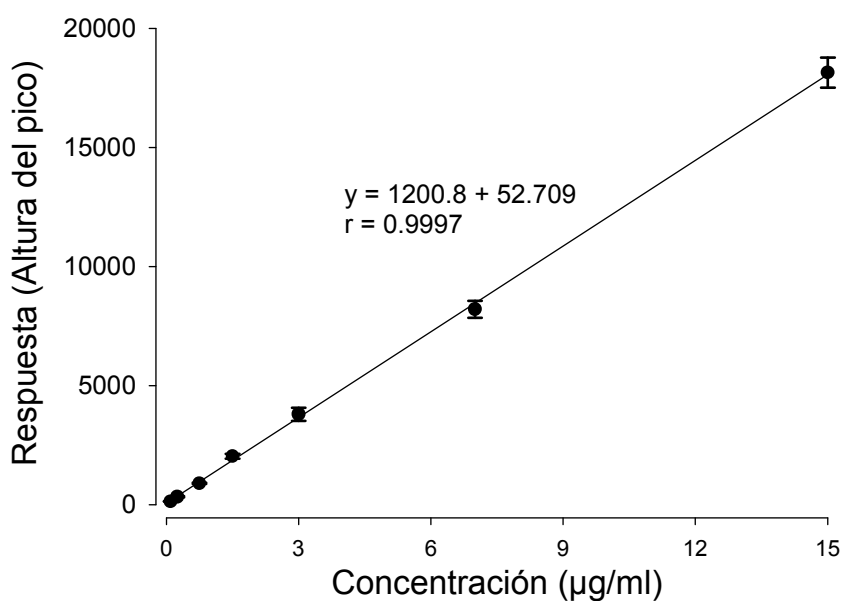


Figura 14. Curva de calibración del método analítico para la determinación de ketoprofeno en sangre de rata. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de al menos seis determinaciones por cada nivel de concentración.

5.2.3 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la precisión y exactitud del método analítico intra e interdía a tres niveles de concentración: 0.5, 2.0 y 12 µg/ml, correspondientes a concentración baja, media y alta, respectivamente.

Precisión y Exactitud Intradía			
Conc. Teórica (µg/ml)	Conc. Medida (µg/ml) ± e.e.	Exactitud (%)	C. V. (%)
0.5	0.51 ± 0.03	102.3	13.5
2.0	1.99 ± 0.07	99.6	9.1
12.0	11.76 ± 0.31	98.0	6.5
Precisión y Exactitud Interdías			
0.5	0.52 ± 0.02	103.0	8.3
2.0	2.02 ± 0.08	101.0	9.8
12.0	11.9 ± 0.2	99.6	5.1

Tabla 3. Precisión y exactitud intra e interdías del el método analítico. La concentración medida representa el promedio de seis determinaciones para cada nivel ± el error estándar.

5.3. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DEL KETOPROFENO EN RATAS

En la figura 15 se muestran los cursos temporales de las concentraciones sanguíneas promedio del ketoprofeno en la rata después de la administración de dosis orales de 1, 3.2 y 10 mg/kg p.o. En todos los casos se observó una rápida absorción, alcanzando la C_{max} promedio de 1.30, 3.21 y 11.54 µg/ml en 0.29, 0.29 y 0.25 horas, respectivamente. Posteriormente a la C_{max} , las concentraciones

sanguíneas decaen significativamente obteniendo una vida media terminal de alrededor de 7.38 a 8.90 horas. En la Tabla 4 se observan los parámetros farmacocinéticos obtenidos con las diferentes dosis.

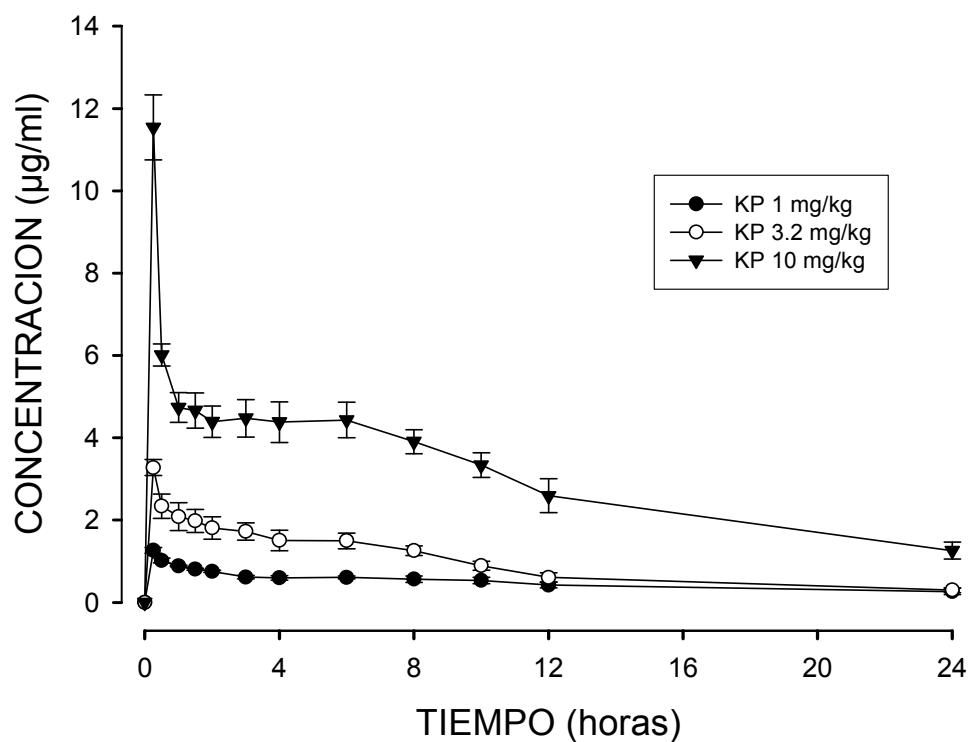


Figura 15. Curso temporal de las concentraciones sanguíneas de ketoprofeno en sangre de rata tras la administración de 1.0, 3.2 y 10 mg/kg p.o. Los datos se expresan como el promedio de al menos seis determinaciones \pm el error estándar.

DOSIS (mg/kg)	1.0	3.2	10
C _{max} ± e.e.(µg/ml)	1.30 ± 0.05	3.21 ± 0.46	11.54 ± 0.79
T _{max} ± e.e (h)	0.29 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.25 ± 0.00
ABC ± e.e (µg h/ml)	11.10 ± 1.46	27.39 ± 6.82	69.99 ± 6.28
t _{1/2} ± e.e (h)	7.80 ± 1.2	7.38 ± 0.48	8.90 ± 0.79

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticas obtenidos después de la administración de diferentes dosis de ketoprofeno p.o. en ratas. Los datos representan el promedio de seis determinaciones ± el error estándar.

5.4. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS Y EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DEL KETOPROFENO

Se determinaron los tiempos de latencia y se tomaron muestras de sangre inmediatamente después en grupos tratados con ketoprofeno a dosis de 1.0, 3.2 y 10 mg/kg p.o. A los 15 y 30 minutos fueron los dos primeros tiempos de muestreo. Posteriormente cada 30 minutos hasta completar los 360 minutos. En la figura 16 se muestran las concentraciones sanguíneas de ketoprofeno y los porcentajes de efecto antihiperálgico obtenidos en función del tiempo a dosis de 1.0, 3.2 y 10 mg/kg p.o. En los tres grupos se observó la rápida absorción de ketoprofeno, donde la C_{max} se alcanzó alrededor de los 15 minutos, mientras que el T_{Emax}

observado fue igualmente alrededor de los 15 minutos tal como se señaló anteriormente.

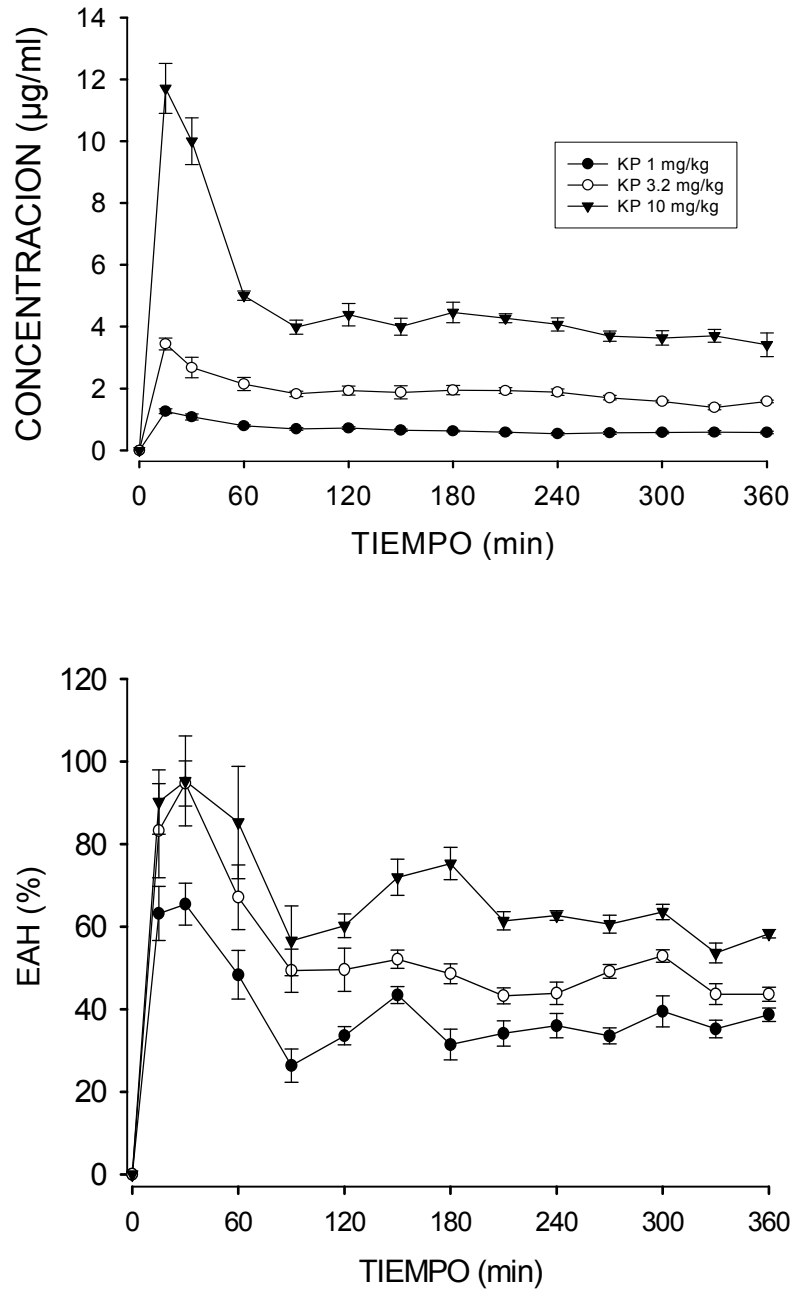


Figura 16. Cursos temporales de las concentraciones sanguíneas del ketoprofeno (parte superior) y el efecto antihiperalgésico observado (parte inferior), en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de seis determinaciones \pm el error estándar.

Posteriormente, para establecer si existe algún tipo de relación entre el efecto antihiperalgésico con respecto a las concentraciones sanguíneas del ketoprofeno, se elaboró una gráfica donde se relacionan ambas gráficas. La figura 17 muestra la gráfica obtenida.

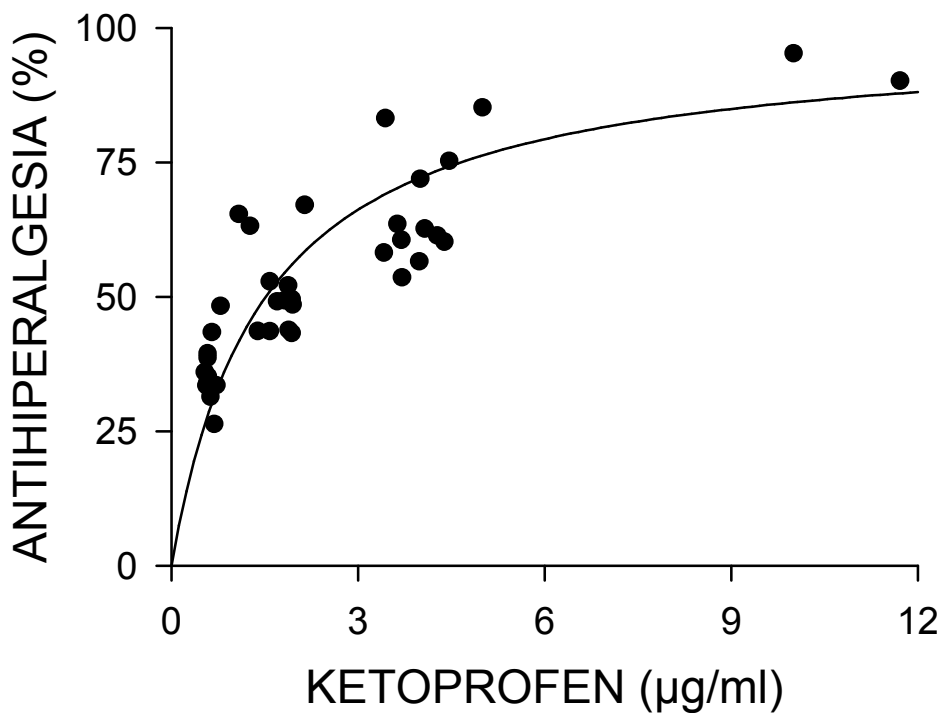


Figura 17. Relación entre el efecto antihiperalgésico (%) y la concentración sanguínea en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata en ratas. Cada punto representa el promedio de seis determinaciones. Los errores estándar fueron omitidos por claridad.

Como se puede observar en la figura 17, existe una relación del tipo directa entre el % de efecto antihiperalgésico y las concentraciones sanguíneas del ketoprofeno. La ecuación que mejor ajustó para la descripción de esta relación fue el modelo del efecto máximo:

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{CE_{50} \cdot C}$$

Los valores de E_{\max} y CE_{50} fueron calculados con el programa WinNonlin Professional. En la Tabla 5 se muestran los parámetros farmacodinámicos calculados.

Parámetro	Valor calculado \pm e.e.
E_{\max} (%)	99.01 ± 7.21
CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	1.49 ± 0.21
$r =$	0.85

Tabla 5. Parámetros farmacodinámicos calculados en la relación concentración – efecto del ketoprofeno en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata en ratas.

Sustituyendo estos valores en la ecuación del efecto máximo, obtenemos la siguiente ecuación:

$$E = \frac{99.01 \cdot C}{1.49 \cdot C}$$

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1 EFECTO ANTIHIPERLAGÉSICO DEL KETOPROFENO

Está bien demostrado que el ketoprofeno produce efecto antinociceptivo y antiinflamatorio en diversos modelos experimentales en animales (Turek y cols., 1988 ; Sunshine y cols., 1988; Landoni y cols., 1995; Herrero y cols., 1997; Ghezzi y cols., 1998; López y cols., 1998; Arifah y cols., 2001; Díaz-Reval y cols., 2002; Lees y cols., 2003), así como en la terapéutica clínica en humanos (Willer y cols., 1989; Dib y cols., 2002; Leman y cols., 2003; Wnek y cols., 2004; Mazieres y cols., 2005). En este estudio se observó que el ketoprofeno fue capaz de producir efecto antihiperalgésico en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata en ratas. Dicho efecto fue dosis-dependiente. Con estos datos obtenidos se refuerzan las observaciones realizadas previamente por otros autores en las que señalan que los AINEs son capaces de disminuir la hiperalgnesia térmica.

En el caso particular del ketoprofeno el efecto antihiperalgésico que presenta se puede deber principalmente a la inhibición no selectiva de la COX y consecuentemente de la producción de PGs, ya que cómo se mencionó anteriormente, durante la aparición y desarrollo de la hiperalgnesia las PGs contribuyen en gran medida a la aparición y mantenimiento de este fenómeno. Sin embargo, otros mecanismos de acción no deben ser descartados.

De los datos obtenidos en la caracterización de la curva dosis respuesta, se observó que a partir de la dosis de 1 mg/kg de KP administrado vía oral, el %EAH es considerable, llegando casi al 100% con la dosis de 10 mg/kg, y éste ya no aumentó la dosis de 32 mg/kg. El efecto máximo observado fue de 98.64%,

mientras que la DE_{50} calculada fue de 1.47 mg/kg. En ese sentido, en otros modelos de dolor se han reportado valores del efecto máximo y de la DE_{50} similares al reportado en este estudio. Por ejemplo, Julou y cols. (1976), reportaron una DE_{50} de 2.4 mg/kg para la prueba de presión de la pata de la rata (modelo Randall-Selitto), y para el modelo de contorsiones abdominales en ratones (inyección intraperitoneal de fenilbenzoquinona) fue de 2.3 mg/kg. Por otro lado, Kido y cols. (1998) evaluaron la actividad analgésica del ketoprofeno en el modelo Randall-Selitto, reportando una DE_{50} de 1.03 mg/kg. Mientras que Díaz-Reval y cols. (2001), reportaron una DE_{50} de 7.2 mg/kg para el efecto antinociceptivo del ketoprofeno en el modelo de dolor PIFIR.

También se ha reportado que el ketoprofeno es efectivo en procesos inflamatorios, en ese sentido, Julou y cols. (1976), reportaron una DE_{50} de 1.0 mg/kg en el modelo de absceso por carragenina; mientras que Kido y cols. (1998), reportaron para el modelo de edema por carragenina una DI_{30} de 1.60 mg/kg. La actividad antipirética del ketoprofeno también ha sido evaluada. Cabré y cols. (1998), evaluaron el efecto antipirético del S (+) ketoprofeno, encontrando una DE_{50} de 1.6 mg/kg; mientras que Kido y cols. (1998) reportaron una DI_{50} de 3.04 mg/kg para ketoprofeno (rac).

Con estos datos se aprecia una considerable potencia del ketoprofeno como fármaco analgésico, antiinflamatorio y antipirético. Salvo en el caso del modelo PIFIR (Díaz-Reval y cols. 1998), la DE_{50} reportada es muy diferente a nuestro estudio y a otros reportes. Esto se puede deber quizás al tipo de dolor evaluado. Tal vez para ese modelo son necesarias dosis mayores ya que el dolor provocado podría ser más intenso.

6.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE KETOPROFENO EN SANGRE DE RATA

Una vez que se determinaron las dosis a las cuales el ketoprofeno produce un EAH considerable, se procedió a desarrollar y validar un método analítico para la semipurificación de muestras sanguíneas de rata y determinar así las concentraciones de ketoprofeno. Debido a que las referencias bibliográficas relacionadas con la determinación de este fármaco son escasas y a que en los últimos años se ha dedicado en gran medida a la determinación de los enantiómeros de ketoprofeno. Algunos autores han determinado el ketoprofeno empleando métodos complejos, los cuales incluyen solventes orgánicos para la separación de fases y procesos de evaporación (López y cols., 1998; Dionnea y cols., 1999; Radwan, 2000; Kokki y cols., 2003).

Nosotros desarrollamos y validamos un método que resultó ser rápido, sencillo y confiable. El método demostró ser selectivo tal como se pudo apreciar en los cromatogramas típicos. Además, fue lineal en el rango de concentración empleado (0.1 a 15 µg/ml). La precisión y exactitud intradía e interdías evaluadas cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación y el límite de cuantificación (0.1 µg/ml) cumplió con los límites de aceptación de exactitud y precisión establecidos de $\pm 20\%$. Por lo tanto, la validación del método analítico cumple con los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.

Una de las ventajas que ofrece este método fue el volumen pequeño de muestra biológica necesario para cuantificar ketoprofeno en sangre de rata. Además, solamente se requiere ácido perclórico al 70% para precipitar las proteínas, se

centrifuga y se inyecta una alícuota de 50 μ l del sobrenadante. El TR del ketoprofeno fue muy corto, 3.5 min. aproximadamente. Esto hace que nuestro método sea sencillo y rápido en comparación con otros que se han reportado. En ese sentido, Ballerini y cols. (1978) reportaron un método para determinar ketoprofeno en plasma humano o de rata utilizando 1 ml de muestra y con etanol precipitaban proteínas, centrifugaban y evaporaban para posteriormente reconstituir con un buffer, agitar 20 minutos y filtrar con un filtro de membrana. Satterwhite y Boudinot (1988) reportaron un método para la cuantificación de ketoprofeno en plasma de rata utilizando 100 μ l de muestra y posteriormente acidificando la muestra. Además de utilizar éter dietílico y agitar en vortex por 15 minutos a baja velocidad para después centrifugar, separar fases y llevar a cabo un proceso de evaporación. Radwan (2000) reportó un método para cuantificar ketoprofeno y diclofenaco simultáneamente en plasma de rata utilizando 200 μ l de muestra y acetonitrilo para precipitar proteínas, centrifugó, separó fases y posteriormente evaporó. De acuerdo con estos reportes, nuestro método ofrece más ventajas ya que resulta ser más sencillo, más rápido y por consiguiente, económico.

6.3 FARMACOCINÉTICA DEL KETOPROFENO EN RATAS

Se evaluó la farmacocinética del ketoprofeno por 24 horas con las dosis de 1, 3.2 y 10 mg/kg. Existen reportes escasos en los que se haya evaluado la farmacocinética del ketoprofeno en forma racémica tras una administración oral en ratas. En nuestro estudio se observó un incremento proporcional en la C_{max} y el ABC con las diferentes dosis utilizadas. Se pudo apreciar que el ketoprofeno se

absorbe rápidamente alcanzando una C_{max} alrededor de los 15 minutos y posteriormente las concentraciones sanguíneas decaen en función del curso temporal. Los parámetros farmacocinéticos reportados en este estudio son similares a los que señala Julou y cols. (1976) reportados para una dosis de 1 mg/kg.

Por otra parte, Radwan (2000) evaluó la farmacocinética del ketoprofeno con una dosis de 1 mg/kg por un periodo de 8 horas, sus resultados difieren con los nuestros en cuanto a la t_{max} observada ya que en su reporte se muestra una t_{max} a las 2 horas. Esto podría deberse a que su primer tiempo de muestreo fue a los 30 minutos eliminando con esto un muestreo a los 15 minutos que al parecer es el t_{max} promedio en ratas (Veys, 1991). Desafortunadamente, Radwan no reportó la vida media del ketoprofeno en su estudio, que resultaría interesante comparar con la reportada por nosotros. De acuerdo a la bibliografía, en humanos la vida media del ketoprofeno es relativamente corta, aproximadamente de 1 a 2 horas tras una administración oral de 100 mg. También se ha reportado que en humanos la C_{max} y la t_{max} promedio son de alrededor de 10.1 a 12.5 $\mu\text{g/ml}$ y de 1 a 2.5 horas, al administrar una dosis de 100 mg/ vía oral, respectivamente (Fossgreen, 1976; Ishizaki y cols., 1980). Por otro lado, Satterwhite y Boudinot (1992) reportaron un estudio farmacocinético de ketoprofeno administrado vía intravenosa en ratas macho jóvenes y longevas a dosis de 2.5 y 10 mg/kg. Ellos no encontraron diferencias significativas de la farmacocinética del ketoprofeno basándose en las concentraciones totales de plasma entre los dos grupos. También reportaron que la farmacocinética del ketoprofeno se comporta de manera dosis dependiente,

aunque solo probaron con dos dosis. La vida media que reportan está entre 9.5 y 12.8 horas para los dos grupos.

En nuestro estudio, observamos que existe un incremento de la C_{max} y del ABC proporcional con respecto a la dosis administrada, además, la vida media no se vio modificada significativamente. Esto nos indica que en este rango de dosis el ketoprofeno muestra una cinética lineal en la rata. Además, la vida media encontrada en las tres dosis se mantuvo entre 7.8 a 8.9 horas, es decir, no se modificó considerablemente al aumentar la dosis administrada.

6.4 RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS Y EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DEL KETOPROFENO

Existe un conocimiento limitado de la relación farmacocinética - farmacodinámica de los analgésicos en el ser humano (Inturrisi y cols, 1990; Suri y cols., 1997). Esto se puede deber en gran medida a que la evaluación del dolor es siempre subjetiva y está condicionada por experiencias previas (Maciewickz y Martin, 1991). Por otro lado, en el caso de los modelos animales ofrecen ser más objetivos. La relación concentración – efecto puede ser descrita por modelos farmacodinámicos relativamente simples, como en los que se encuentra una relación del tipo directa. En estos casos es posible utilizar el modelo del efecto máximo o el modelo sigmoidal (Venitz, 1995; Bellisant y cols., 1998). Sin embargo, también es posible no encontrar una relación directa, es entonces que se hace necesario la aplicación de modelos más complejos para tratar de explicar el retraso de la aparición del efecto con respecto a las concentraciones sanguíneas del fármaco. En el caso de los AINEs existen algunos reportes en los que si se ha

podido establecer una relación directa para este tipo de fármacos. Granados y cols. (1992) reportaron una relación directa entre las concentraciones plasmáticas del paracetamol y su efecto analgésico en ratas utilizando el modelo de dolor PIFIR. Dicha relación se ajustó bien a la ecuación del modelo sigmoidal. Asimismo, Granados y cols. (1995), utilizando este mismo modelo, encontraron una relación directa del ketorolac, la cual se describe bien por la ecuación del modelo sigmoidal. Por otro lado, también se ha dado el caso de modelos FC-FD de relación indirecta en AINEs. En ese sentido, Torres-López y cols. (1997), reportaron una relación indirecta entre las concentraciones sanguíneas y el efecto antinociceptivo del diclofenac en ratas utilizando el modelo PIFIR. Flores Murrieta y cols. (1998) reportaron un modelo de relación indirecta entre el efecto antinociceptivo y las concentraciones sanguíneas del tolmetín en ratas.

En el caso particular del ketoprofeno, se han reportado varios estudios para el establecimiento de modelos FC-FD en distintas especies de animales. Landoni y cols. (1995) evaluaron las propiedades antiinflamatorias del ketoprofeno en becerros. Utilizando un modelo de inflamación aguda y determinando las concentraciones plasmáticas de los enantiómeros del ketoprofeno en plasma y exudado después de la administración i.v. de 3 mg/kg de ketoprofeno (rac) y evaluando el efecto de los enantiómeros sobre el tromboxano sérico (TxB₂), y sobre la PGE₂, el LTB₄ y la B-glucoronidasa en el exudado, encontraron una relación directa entre las concentraciones plasmáticas del S (+)ketoprofeno y la inhibición de las sustancias mencionadas la cual se ajustó al modelo del efecto máximo. El efecto máximo observado estuvo entre 86.18 y 102.86% para todos los efectos evaluados y la CI₅₀ para PGE₂ fue de 0.086 µg/ml para ketoprofeno (rac) y

de 0.042 $\mu\text{g/ml}$ para S(+) ketoprofeno. Posteriormente (1996), este mismo grupo de investigadores evaluaron la relación FC-FD del ketoprofeno en caballos. El modelo experimental fue el mismo; encontrando también una relación directa ajustada al modelo del efecto máximo. Los valores del Emax observado para la inhibición de PGE_2 fue de 100 % para ketoprofeno (rac) y de 94 % para S (+)ketoprofeno; mientras que la CI_{50} para ketoprofeno (rac) fue de 0.057 $\mu\text{g/ml}$ y 0.033 $\mu\text{g/ml}$ para S (+) ketoprofeno. Por otra parte, Arifah y cols. (2001) llevaron a cabo un estudio utilizando el modelo de inflamación aguda en ovejas y midieron los niveles de TxB_2 , y PGE_2 en exudado, administrando 3 mg/kg de ketoprofeno (rac), 1.5 mg/kg S (+)ketoprofeno y 1.5 mg/kg de R (-) ketoprofeno; todos por administración i.v. También determinaron ketoprofeno (rac) y sus enantiómeros en plasma y en el exudado, encontrando un buen ajuste al modelo del efecto máximo al relacionar las concentraciones plasmáticas con respecto a la inhibición de los mediadores de la inflamación en el exudado; excepto para el R (-) ketoprofeno ya que en ovejas sufre una bioinversión al S (+)ketoprofeno. El Emax observado estuvo entre 110 y 155%. Mientras que la CI_{50} de la PGE_2 fue de 0.0065 $\mu\text{g/ml}$ para el ketoprofeno (rac) y 0.019 para el S (+) ketoprofeno. Posteriormente, Arifah y cols., (2003) realizaron otro estudio idéntico solo que en esta ocasión utilizaron cabras. La relación encontrada entre las concentraciones plasmáticas del ketoprofeno y la inhibición de los mediadores químicos de la inflamación en el exudado también se pudo ajustar al modelo del efecto máximo. Se encontró un Emax entre 94 y 110% y la CI_{50} para PGE_2 fue de 0.039 $\mu\text{g/ml}$ para ketoprofeno (rac) y 0.003 $\mu\text{g/ml}$ para S (+) KP.

Desafortunadamente, en estos reportes no existen gráficas que relacionen el efecto inhibitorio en función de las concentraciones plasmáticas del KP, lo cual hubiera sido de gran interés para dar mayor sustento de la dilucidación del modelo. En estos reportes se pudo observar que las CE_{50} que encontraron para ketoprofeno y sus enantiómeros en estos modelos de inhibición de mediadores fueron valores muy pequeños. No se midió el efecto analgésico o antiinflamatorio de ketoprofeno, aunque es obvio entender en medida de los conocimientos que se tienen, que al propiciar la inhibición de la síntesis de PGs y TxB_2 , el dolor y la inflamación disminuyen. Sin embargo, esa disminución no es de alguna manera medible en este tipo de experimentos. La percepción propia del dolor en el animal, involucra toda una cascada de eventos y no solo depende de PGs y TxB_2 ; de tal manera que quizá los valores son pequeños debido que solo se midió la inhibición de estos dos tipos de mediadores participantes en procesos inflamatorios.

Nosotros evaluamos la relación concentración – efecto antihiperalgésico del ketoprofeno utilizando el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata, del cual hasta el momento no existen reportes donde se utilice este modelo experimental de dolor para el establecimiento de un modelo FC-FD. El modelo de estimulación térmica de retiro de la pata resultó ser un dispositivo adecuado para establecer un modelo de relación FC-FD, que en este caso es la evaluación de la disminución de la hiperalgesia provocada por la administración intraplantar de carragenina y la posterior administración de ketoprofeno. Se pudo observar que tanto las concentraciones sanguíneas como el %EAH observado se incrementaron conforme se aumentó la dosis administrada. Resultó interesante que tanto la C_{max} y el E_{max} observado se alcanzaron alrededor del mismo tiempo (0.25 h) y

tanto las concentraciones como el efecto permanecen significativos en función del tiempo. Esto nos indica un comportamiento paralelo entre la concentración y el efecto. De tal modo que cuando se graficó el %EAH en función de las concentraciones se observó una relación directa y se pudo ajustar al modelo farmacodinámico del efecto máximo, en el cual se obtuvo un Emax calculado de 99% y una CE₅₀ de 1.49 µg/ml. El hecho de haber encontrado una relación directa entre concentración - %EAH, nos puede indicar que existe un equilibrio muy rápido entre la concentración del ketoprofeno en sangre y su concentración en el sitio efector. EL mecanismo de acción más importante, más no el único, es la inhibición de la síntesis de PGs. Está bien establecido que éstas juegan un papel muy importante en la aparición y desarrollo de este fenómeno y que los AINEs son efectivos en condiciones de hiperalgesia relacionada con la inflamación (Ferreira, 1979).

Los resultados aquí obtenidos muestran que el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno depende de la dosis administrada, ya que aumenta conforme se incrementan las concentraciones sanguíneas. En base a esto, se puede tratar de establecer un mejor uso clínico de este fármaco y con ello evitar, en la medida de lo posible, los efectos indeseables que provoca el ketoprofeno al igual que otros AINEs.

7. CONCLUSIONES

1. El ketoprofeno produjo un efecto antihiperalgésico en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata en ratas. El efecto observado fue dosis dependiente. El efecto máximo se alcanzó con la dosis de 10 mg/kg y no cambió significativamente al aumentar la dosis.
2. El método analítico para la determinación de ketoprofeno en micromuestras de sangre de rata por cromatografía de líquidos de alta resolución demostró ser confiable. El método es selectivo, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de 0.1 a 15 µg/ml.
3. Se evaluó la farmacocinética del ketoprofeno administrado por vía oral en ratas. Demostrando una rápida absorción en el rango de dosis estudiado. Estos resultados coinciden de manera general con otros reportes.
4. Se caracterizó la relación entre la farmacocinética y el efecto antihiperalgésico del ketoprofeno en el modelo de estimulación térmica de retiro de la pata. Encontrando una relación de tipo directa la cual se ajustó bien al modelo del efecto máximo.

8. REFERENCIAS

- Aarons L. (1997). Preface in: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis. Gabrielsson J. & Weiner D. Swedish Pharmaceutical Press.
- Abramson S., Weissmann G. (1989). The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Clin Exp Rheumatol. Suppl* 3:163-170.
- Addams S., Bresloff P., Mason C., (1976). Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-) isomer. *J Pharm Pharmacol.* 28:256-257.
- Aloe L., Moroni R., Angelucci F., Fiore M. (1997). Role of TNF-alpha but not NGF in murine hyperalgesia induced by parasitic infection. *Psychopharmacology* 134: 287-292.
- Arifah A., Landoni M., Frean S., Lees P. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in sheep. *Am J Vet Res.* 2001, 62: 77-86.
- Arifah A., Landoni M., Lees P. (2003). Pharmacodynamics, chiral pharmacokinetics and PK-PD modelling of ketoprofen in the goat. *J Vet Pharmacol Ther.* 26(2):139-150.
- Arifah A., Landoni M., Frean S., Lees P. (2001). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in sheep. *Am J Vet Res.* 62(1):77-86.
- Ballerini R., Cambi A., Del Soldato P., Melani F., Meli A. (1978). Determination of ketoprofen by direct injection of deproteinized body fluids into a high-pressure liquid chromatographic system. *J Pharm Sci.* 68(3):366-368.
- Bannwarth B., Lapique F., Netter P. (1988). The effect of food on the systemic availability of ketoprofen. *Eur J Clin Pharmacol.* 33:643-645.
- Basbaum A., Woolf C. (1999). Pain. *Curr Biol.* 17; (12): R429-431
- Bellisant E., Sebile V., Paintaud G. (1998). Methodological issues in pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling. *Clin Pharmacokinet.* 35 (2):151-166.
- Belmonte C. (2001). El dolor: ¿Mecanismo de defensa o castigo? www.larebotica.com.es
- Bendtzen K., Muller K., Herner EB., Stagg A., Woo P. (1998). Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol.* 37(5): 562-569.
- Bizzarri C., Pagliei S., Brandolini L., Mascagni P., Caselli G., Transidico P., Sozzani S., Bertini R. (2001). Selective inhibition of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by ketoprofen isomers. *Biochem Pharmacol.* 61:1429-1437.
- Bley K., Hunter J., Eglen R., Smith J. (1998). The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci.* 19(4):141-147.
- Brater D. (1988). Clinical pharmacology of NSAIDs. *J Clin Pharmacol.* 28:518-523.
- Byers y Bonica, (2003). Mecanismos de dolor periférico y nplasticidad de nociceptores. En: Bonica. *Terapéutica del dolor.* 3ª Ed. Vol I. McGrawHill. pp. 30-83
- Cabré F., Fernández M., Calvo L., Ferrer X., García L., Mauleón D. (1998). Analgesic, Antiinflammatory, and Antipyretic Effects of S(+)-Ketoprofen in vivo. *J Clin Pharmacol.* 38:3S-10S.

- Cashman JN. (1996). The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*. 52 Suppl 5:13-23.
- Castañeda G., Favari L., Hoyo C. (1995). Relationship between naproxen plasma concentration and its antiinflammatory effect in experimental hepatitis. *Arzneimittelforschung*. 45(5):585-589.
- Castañeda G., The use of pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling to optimize NSAID efficacy and safety. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 2002, 45: 239.
- Cerveró F., Laird J. (1996). Mechanism of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*. 68: 13-23.
- Chapman CR., Gavrin J. (1999). Suffering: The contributions of persistent pain. *Lancet*. 353: 2233-2237.
- Coda B., Bonica J. (2003). Consideraciones generales sobre el dolor agudo. En: *Bonica. Terapéutica del dolor*. 3ª Ed. Vol I. McGrawHill. pp. 266-288.
- Coderre T., Vaccarino A., Melzack R. (1990) Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*. 535(1):155-158.
- Coderre T., Katz J., Vaccarino A. (1993). Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*. 52: 259-285.
- Colburn W. (1987). Perspectives in pharmacokinetics: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling: What it is! *J. Pharmacokinetic and Biopharmaceutics*. 15: 545-555.
- Cooper S. (1988). Ketoprofen in oral surgery pain: a review. *J Clin Pharmacol*. 28: 40-46.
- D'Arienzo M., Pennisi M., Zanolò G., Borsa M. (1984). Ketoprofen lisyn: ketoprofen serum levels and analgesic activity. *Drugs in Exp Clin Res*. 10: 863-866.
- Dayneka N., Garg V., Jusko W., Comparison of four Basic Models of Indirect Pharmacodynamic Responses . *J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1993, 21: 457-463.
- Di Rosa M., Sorrentino L. (1970). Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. *J Pharmacol*. 38: 214-220.
- Díaz M., Ventura R., Hernández G., Domínguez A., López F. (2001) Effect of caffeine on antinociceptive action of ketoprofen in rats. *Arch Med Res*. 32(1):13-20.
- Dib M., Massiou H., Weber M., Henry P., Garcia S., Bousser M. (2002). Efficacy of oral ketoprofen in acute migraine: a double-blind randomized clinical trial. *Neurology*. Jun 11;58(11):1660-1665.
- Dionne R., Gordon S., Tahara M., Rowan J., Troullos E. (1999). Analgesic efficacy and pharmacokinetics of ketoprofen administered into a surgical site. *J Clin Pharmacol*. 39 (2):131-138.
- Dirig D., Salami A., Rathbun M., Ozaki G., Yaksh T. (1997). Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods*. 76(2):183-191.
- Dirig D., Isakson P., Yaksh T. (1998). Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharm Exp Ther*. 285 (3): 1031-1038.

- Dray A., Urban L. (1994). New pharmacological strategies for pain relief. *Rev Pharmacol Toxicol* 36: 253-280.
- Duarte I., dos Santos I., Lorenzetti B., Ferreira S. (1992). Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 217: 225-227.
- Ferreira S, Moncada S, Parson M, Vane JR. (1974). The concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Br J Pharmacol.* 47(5):53 1-8.
- Ferreira S. and Nakamura Meire., Prostaglandin hyperalgesia: The peripheral analgesic activity of morphine, enkephalines and opioid antagonists. *Prostaglandins*, vol 18. No. 2, 1979. 191-199.
- Ferreira S. (1980). Are macrophages the body's alarm cells? *Agents Action* 10: 229-230.
- Ferreira S. (1990). A classification of peripheral analgesics based upon their mode of action. In Sandlers M, Collins GM. *Migraine. Spectrum of ideas.* Oxford University Press. 59-72.
- Ferreira S., Lorenzetti B., Cunha F. (1993). Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents Action.* 38: C7-C9.
- Flores F., Ko H., Flores D., López F., Jusko J., Sale M., Castañeda G. (1998). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tolmetin antinociceptive effect in the rat using an indirect response model: a population approach. *J Pharmacokinet Biopharm.* 26 (5): 547-557.
- Fossgreen J. (1976) Ketoprofen. A survey of current publications. *Scand J Rheumatol* 14:7-32.
- Furst D., Caldwell J. (2002). Guidelines for the treatment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 61(5):476:477.
- Gallin J., Fletcher M., Seligmann B., Hoffstein S., Cehrs K., Mounessa N.. (1982). Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood.* 59(6):1317-1329.
- Ghezzi P., Melillo G., Meazza C., Sacco S., Pellegrini L., Asti C., Porzio S., Marullo A., Sabbatini V., Caselli G., Bertini R. (1998). Differential contribution of R and S isomers in ketoprofen anti-inflammatory activity: Role of cytokine modulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 287: 969-974.
- Graham G., Day R., Champion D., Lee E., Newton K. (1984). Aspects of the clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Rheum Dis.* 190: 229-249.
- Granados V., Flores F., López F., Salazar L., Villarreal J., Castañeda G. (1992). Relationship between paracetamol plasma levels and its analgesic effect in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 44: 741-744.
- Granados V., Lopez F., Hong E., Flores F. (1995). Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of ketorolac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 272(1):352-356.
- Granados V., López J. (2001). Participación de la ciclo-oxigenasa-1 en el dolor inflamatorio. *Universidad y Ciencia.* 17 (34): 73-81.
- Granados V., Torres J., Argüelles C., Ortiz M. (2002). The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacol.* 43: 917-923.
- Guyton A., Hall. (1999). Sensaciones somáticas II: dolor, cefalea, y sensaciones de temperatura.. En: *Tratado de fisiología médica.* 9ª Ed. McGraw Hill Interamericana. pp. 661-674.

- Henry D., Lim L., García L., Pérez S., Carson J., Griffin M., Savage R., Logan R., Moride Y., Hawkey C., Hill S., Fires J. (1996). Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ* 312. 1563-1566.
- Herrero J., Parrado A., Cervero F., (1997). Central and peripheral actions of the NSAID ketoprofen on spinal cord nociceptive reflexes. *Neuropharmacology*. 36(10): 1425-1431.
- Higgins A., Lees P. (1984). The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Equine Vet J*. 16(3):163-175.
- Higgs G., Flower R., Vane J. (1979). A new approach to anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol*. 28:1959-1961.
- Higgs GA, Mugridge KG. (1983). Inhibition of mononuclear leukocyte accumulation by the arachidonic acid lipoxygenase inhibitor BW755C. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 12:19-23.
- Holford NH., Sheiner LB. (1981). Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic/pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokin*. 6: 429-453.
- Houghton G., Dennes M., Rigler E., Parsons R., (1984). Urinary pharmacokinetics of orally administered ketoprofen in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*. 9: 201-204.
- Hyman S., Cassem N. (1995). Dolor en neurología. Ed. Científica Médica Latinoamericana. pp. 1-20.
- IASP: Pain terms: A current list with definitions and notes on usage. P (Supp.3) 1986. 215-221.
- Inturrisi C., Portenoy R., Max M., Colburn W., Foley K. (1990). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of methadone infusions in patients with cancer pain. *Clin Pharmacol Ther*. 47: 565-577.
- Ishizaki T., Sasaki T., Suganuma T., (1980) Pharmacokinetics of ketoprofen following single oral, intramuscular and rectal doses and after repeated oral administration. *Eur J Clin Pharmacol*. 18:407-414.
- Ito S., Okuda E., Minami T.(2001). Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin., *Neuroscience Research*. 41 (4): 299-332.
- Jamali F., Brocks D. (1990). Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers. *Clin Pharmacokin*. 19:197-217.
- Jamali F., Russell A., Foster R., Lemko C. (1990). Ketoprofen pharmacokinetics in humans : evidence of enantiomeric inversion and lack interaction. *J pharm Sci*. 79:460-461.
- Julius D., Basbaum A. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413: 203-210.
- Julou L., Guyonnet JC., Ducrot R., Fournel J., Pasquet J. (1976). Ketoprofen (19.583 R.P.) 2-(3-benzoylphenyl)-propionic acid) Main pharmacological properties. *Scand J Rheumatol. Suppl*. 14: 33-44.
- Kantor TG. (1986) Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. *Pharmacotherapy* 6:93-103.

- Kavanaugh A., Davis L., Nichols L., Norris S., Rothlein R., Scharschmidt L., Lipsky P. (1994). Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum.* 37(7):992-999.
- Kennedy A. (1976). Synovial fluid pharmacokinetics of ketoprofen. *Rheumatol Rehabil.* 12:20-21.
- Kido H., Murakami N., Ito A., Kimura K., Kodera N., Doi T., Naruse T. (1998). Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic effects of d-2-[4-(3-methyl-2-thienyl)phenyl]propionic acid (M-5011), a new non-steroidal anti-inflammatory drug, in rats and guinea pigs. *Jpn J Pharmacol.* 76(1):75-86.
- Kohler G., Primbs P., Morand J., Rubelt C. (1985). Correlation between ketoprofen plasma levels and analgesic effect in acute lumbar pain and radicular pain. *Clin Rheumatol.* 4: 399-404.
- Kokki H., Tuomilehto H., Karvinen M. (2001) Pharmacokinetics of ketoprofen following oral and intramuscular administration in young children. *Eur J clin Pharmacol.* 57: 643-647.
- Kokki H., Karvinen M., Suhonen P. (2003). Pharmacokinetics of intravenous and rectal ketoprofen in young children. *Clin Pharmacokinet.* 42(4):373-379.
- La Motte R., Shain C., Simone D. (1996). Neurogenic hyperalgesia : psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol.* 66: 190-211.
- Landoni M., Cunningham M., Lees P. (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in calves applying PK/PD modelling. *J Vet Pharmacol Ther.* 18(5):315-324.
- Landoni M., Lees P. (1996). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse. *Journal of veterinary Pharmacology Therapeutic.* 19: 466-474.
- Lázaro G., Torres J., Granados V. (2001). Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 426: 41-46.
- Lees P., Taylor P., Landoni F., Arifah A., Waters C. (2003). Ketoprofen in the cat: pharmacodynamics and chiral pharmacokinetics. *Vet J.* 165(1):21-35.
- Leman P., Kapadia Y., Herington J. (2003). Randomised controlled trial of the onset of analgesic efficacy of dexketoprofen and diclofenac in lower limb injury. *Emerg Med J.* 20(6):511-513.
- Lewellen O., Templeton R. (1976). The pharmacokinetics of ketoprofen in man during and after repeated oral dosing. *Scand J Rheumatol (Suppl 14)* 5:53-62.
- Lima D., Santos R., Fellet A., Andrade G., Maraes R., Pierangelo S. (1987). Comparison of ketoprofen levels in synovial fluid, plasma, and saliva after a single oral dose in patients with rheumatic disease. *Clin Exp Rheumatol.* 5:538.
- Loeser JD., Melzack R. (1999). Pain: an overview. *Lancet.* 352 (9164):1607-1609.
- López F., Ventura R., Díaz I, Fernández A., Tost D., Cabré F., Mauleon D. (1998). Antinociceptive effects of S(+)-ketoprofen and other analgesic drugs in a rat model of pain induced by uric acid. *J Clin Pharmacol.* 38:11S-21S.
- Maciewicz R., Martin J. (1991). Pain: Pathophysiology and management. En: *Harrison's Principles of internal medicine.* 20a. Ed. Vol. 1. pp. 93-98.
- Malmberg A., Yaksh T. (1992). Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science.* 257: 1276-1279.

- Mauleon D., (1996). Dexketoprofen trometamol. *Drugs Future*. 21: 587-592.
- Mazieres B., Rouanet S., Guillon Y., Scarsi C., Reiner V. (2005). Topical ketoprofen patch in the treatment of tendinitis: a randomized, double blind, placebo controlled study. *J Rheumatol*. 32(8):1563-70.
- McCrea J., Telford A., Kaye C., Boyd M. (1986). A comparison of plasma and synovial fluid profiles of standard and controlled-release formulations of ketoprofen in patients with rheumatoid arthritis. *Curr Med Res Opin*. 10:73-81.
- Millan MJ. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. 57: 1-164.
- Miyoshi R. (2003). Analgésicos sistémicos no opioides. En: Bonica. *Terapéutica del dolor*. 3ª Ed. Vol II. McGrawHill. pp. 1973-1991.
- Moretti MD, Gavini E, Peana AT. (2000). In vitro release and antiinflammatory activity of topical formulations of ketoprofen. *Boll Chim Farm*. 139:67-72.
- Netter P., Bannwarth B., Lopicque F., Harrewyn JM., Frydman A., Tamisier JN., Gaucher A., Royer R., (1987). Total and free ketoprofen in serum and synovial fluid after intramuscular injection. *Clin Pharmacol Ther*. 42 (5): 555-61.
- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998
- Ollagnier M., Decousus H., Cherrah Y. (1987). Circadian changes in the pharmacokinetics of oral ketoprofen. *Clin Pharmacokinet*. 12:367-378.
- OMS. (2000) Organización Mundial de la Salud. Boletín informativo.
- Radwan M. (2000). Zidovudine, diclofenac and ketoprofen pharmacokinetic interactions in rats. *J Pharm Pharmacol*. 52:665-669.
- Rao T., Currie J., Shaffer A., Isakson P. (1994). In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 269(3):917-925.
- Reyes G., Medina. R., Teran F., Castillo C., Vidal G., Caram N., Granados V. (2002). B vitamins increase the anti-hyperalgesic effect of diclofenac in the rat. *Proc West Pharmacol. Soc*. 45:147-9.
- Richardson J., Vasko M. (2002). Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 302(3):839-45.
- Robbins S., Cotran R., Kumar V. (1990). *Patología estructural y funcional*. 4ª. Ed. Interamericana McGraw Hill. Madrid, España. Vol. I. 11-14, 39-71. Vol. II. 994-998.
- Roberts L. 2nd, Morrow J. (1997). The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta*. 1345(2):121-35.
- Satterwhite J., Boudinot F. (1988). High-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen and naproxen in rat plasma. *J Chromatogr*. 431(2):444-449.
- Satterwhite J., Boudinot D. (1992). Pharmacokinetics of ketoprofen in rats: effect of age and dose. *Biopharm. & Drug Dispos*. 13:197-212.
- Schwinghammer T., Kroboth P., "Basic Concepts in Pharmacodynamic Modeling". *J. Clin. Pharmacol*. 1988; 28: 388-394.

Seibert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W., Lee L., Isakson P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(25):12013-12017.

Shargel L., Andrew B. (1985) Relationship between pharmacokinetic parameters and pharmacological response. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. Second Edition. Chapter 17. Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut.

Sorkin L., Xiao W., Wagner R., Myers R. (1997). Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*. 81(1):255-262.

Stock J., Shinjo K., Burkhardt J. (2001). The prostaglandin E EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest*. 107:325-331.

Stuart B. (1999). Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. En Wall PD and Melzack R. *Textbook of pain*. pp. 59-84.

Sunshine A., Olson N. (1988). Analgesic efficacy of ketoprofen in postpartum, general surgery, and chronic cancer pain. *J Clin Pharmacol*. S47-S54.

Suri A., Grundy BL., Derendorf H. (1997). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enantiomers of ibuprofen and flurbiprofen after oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 35(1):1-8.

The Merck Index. (1995). 11 th Ed. Boca Ratón FL., USA pp 1624.

Torres J., López F., Castañeda G., Flores F., Granados V. (1997). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharm Exp Ther*. 282 (2): 685-690.

Treede R. (1995). Peripheral acute pain mechanisms. *Ann Med*. 27(2):213-216.

Turek M., Baird W. (1988). Double-blind parallel comparison of ketoprofen (Orudis), acetaminophen plus codeine and placebo in postoperative pain. *J Clin Pharmacol*. 28:23-28.

Ucelay M., Lasheras B., Cenarruzabeitia E. (1988). Pharmacological study of the new nonsteroidal antiinflammatory agent 4'-acetamidophenyl-2-(5'-p-toluy-1'- methylpyrrole)acetate. *Arzneimittelforschung*. 38(4):546-51.

Upton R., Buskin J., Williams R., Holford N., Riegelman S. (1980). *J Pharm Sci*. 69:1254. Vannier E., Roch-Arveiller M., Molinie B., Terlain B., Giroud JP. (1988). Effects of ketoprofen and indomethacin on leukocyte migration in two models of pleurisy induced by carrageenan or zymosan-activates serum in rats. *J Pharmacol and Exp Ther*. 248(1): 286-291.

Vannier E, Roch-Arveiller M, Molinie B, Terlain B, Giroud JP. (1989). Effects of ketoprofen and indomethacin on leukocyte migration in two models of pleurisy induced by carrageenan or zymosan-activated serum in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 248 :286-91.

Venitz J. (1995). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of reversible drug effects. In: *Handbook of PK-PD correlation*. Edited by Derendorf H. and Hochhaus G. CRC Press. Boca Ratón, FL, USA. pp.1-3

Veys E.M. "20 years experience with ketoprofen" . *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 1991; 90: 1- 44.

- Wallis W., Simkin P. (1983). Antirheumatic drug concentrations in human synovial fluid and synovial tissue. Observations on extravascular pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 8(6):496-522.
- Weissmann G. (1991). The actions of NSAIDs. *Hosp Pract (Off Ed).* 26(8):60-68, 71-72, 75-76.
- Willer J., De Broucker T., Bussel B., Roby A., Harrewyn J. (1989). Central analgesic effect of ketoprofen in humans: electrophysiological evidence for a supraespal mechanism in a double-blind and cross-over study. *Pain.* 38: 1-7.
- Williams R., Upton R. (1988). The clinical pharmacology of ketoprofen. *J Clin Pharmacol.* 28: S13-S22.
- Williams K. (1990). Enantiomers in arthritic disorders. *Pharmacol Ther.* 46:273-295.
- Winter C., Risley E., Nuss G., (1962). Carrageenan-induced edema in hisn paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 111: 544-551.
- Wnek W., Zajackowska R., Wordliczek J., Dobrogowski J., Korbut R. (2004). Influence of pre-operative ketoprofen administration (preemptive analgesia) on analgesic requirement and the level of prostaglandins in the early postoperative period. *Pol J Pharmacol.* 56(5):547-552.
- Wook H., Cho H., Kwak J. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxigenases: Endogenous capsaicine-like substances. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 6155-6160.
- Woolf C., Ma P., Allchorne A. (1994). Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. *J Neurosc.* 8: 2716-2723.
- Woolf C., Costigan M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci.* 96:7723-7730.
- Woolf C., Salter M. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 9:288(5472):1765-1769.
- Woolf C. (1996). Phenotypic modification of primary sensory neurons: the role of nerve growth factor in the production of persistent pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*(1338):441-8. 448.
- Yaksh T., Dirig D., Conway C., Svensson C, Luo Z., Isakson P.. (2001) The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX2) but not COX-1. *J Neurosci.* Aug 15;21(16):5847-5853.
- Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations on experimental pain conscious animals. *Pain* 16: 109-110.