

00559
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES FARMACOCINETICAS DEL
DICLOFENAC, ADMINISTRADO POR VIA INTRAMUSCULAR
EN LA FASE CRONICA DE LA LESION TRAUMATICA DE LA
MEDULA ESPINAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(B I O F A R M A C I A)
P R E S E N T A
I.B.I. DIANA ~~SENE~~ GONZALEZ ESPARZA

DIRECTOR DE TESIS: DR GILBERTO CASTAÑEDA HERNANDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

OF. CPCQ.821/01

BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

Presente

Me es grato informarle que la alumna **DIANA SELENE GONZÁLEZ ÉSPARZA**, con número de cuenta 97809694 y expediente 5971084, presentará su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Biofarmacia), quien defenderá el proyecto de investigación titulado: **“Estudio de las alteraciones farmacocinéticas del diclofenac administrado por vía intramuscular en la fase crónica de la lesión traumática de la médula espinal”**, ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Camilo Ríos Castañeda	Inst. Nal. de Neurología
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Helgi Jung Cook	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dr. Francisco Javier Flores Murrieta	Escuela Superior de Medicina, IPN
Segundo suplente	Dra. Adriana Ganem Rondero	FES, Cuautitlán

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cd. Universitaria, D.F. a 06 de septiembre de 2001.

DR. RAYMUNDO CEA OLIVARES
Coordinador del Programa

c c p. Integrantes del Jurado
Presidente del SAO
Sección Escolar
Interesado
Expediente

Dr. Raymundo Cea Olivares
Tel /Fax 55 50 91 96
pcquimicas@dgep posgrado.unam.mx

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor, cariño y comprensión que siempre me han brindado y por que éste logro también es suyo.

A mi hermano, por que siempre me ha inspirado con su ejemplo, a mi amiga y cuñada Tamara y a la pequeña Zoe, que forman parte de mi vida.

A mis tíos Yolanda y Armando, por creer en mí, apoyarme y escucharme.
¡Gracias los quiero mucho!

A mi compañero y amigo de maratón Javier Fonseca.

A mis compañeros y amigos de la prepa: Marú, Juan José y Alejandro con quienes he pasado y compartido momentos agradables.

A mis queridos felinos: Tom, Colorina y Cristi que siempre estuvieron conmigo, y me acompañaron en mis desveladas.

y a todos los duendes que me he encontrado en mi camino, que me han orientado y motivado a seguir adelante. A todos ellos ¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Nacional Preparatoria por haberme dado esta valiosa oportunidad en seguir preparándome académicamente, al Arq. Héctor E. Herrera León y Velez, Director General y Presidente del H. Consejo Técnico, al Fís. Rafael Moreno y Albarrán, Secretario General, a la Comisión de Licencias y Becas del Consejo Técnico, por confiar en mi y fortalecer la preparación docente de los profesores de esta institución, que además engrandece nuestro compromiso por esta hermosa casa que es la Universidad para nosotros, gracias, y espero contribuir con mi esfuerzo cotidiano este apoyo.

A la Escuela Nacional Preparatoria Plantel No.2, a la Lic. Ilma Lecia Carrillo López, Directora, al Lic. Miguel Ángel Álvarez Torres, Secretario General, al Profr. Raúl Martínez Rosas, Secretario Académico, al Q.F.B. Jose Luis Buendía Uribe, Coordinador de Materias Experimentales, por todo el apoyo y facilidades que me brindaron, para la realización de este proyecto. ¡Gracias!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme, en la realización de mis estudios

Al Dr. Gilberto Castañeda, por brindarme su amistad, por la confianza que deposito en mi, y por el apoyo que me brindo en la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado por sus valiosas aportaciones en la revisión de esta tesis

Al Dr. Francisco Flores, por sus interesantes aportaciones a este proyecto y por brindarme su amistad.

Al Dr. José Pérez U. por su asesoría, amistad y paciencia, que siempre me brindo, y porque sin su valiosa ayuda, no hubiera terminado este proyecto. ¡Gracias Pepe de todo corazón!

A la Dra. Patricia García, por ser pionera en este campo, por su asesoría y amistad.

Al Dr. Gabriel Guizar, y a mis compañeros de laboratorio del Proyecto Camina, A.C. : Angélica, Leti, María Luisa, Fidel, y al Sr. Guillermo González, quienes me brindaron su valioso apoyo en esta institución

A la Dra. Isabel Balderas, por su asesoría, amistad y por compartir momentos...quizá un poco tormentosos, pero divertidos. ¡Gracias amiga!

A la M.C Leticia Cruz, ... Lety simplemente fuiste esencial en la terminación de esta tesis. ¡Gracias amiga!

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Lulú, Paty, Alma y Carlos, por apoyarme y por compartir su trabajo ¡Gracias por ser así!

A mi amiga Araceli Guarneros, por sus valiosas colaboraciones, en este largo... trayecto que fue mi tesis. ¡Gracias!

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ABREVIATURAS	<i>i</i>
ESQUEMAS	<i>ii</i>
FIGURAS	<i>iii</i>
TABLAS	<i>iv</i>
GRÁFICAS	<i>v</i>
RESUMEN	1
I. LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL (LTME)	2
1.1 Sección de la Médula Espinal y Choque Medular	6
1.2 Lesión Primaria	8
1.3 Lesión Secundaria	10
1.4 Modelos Experimentales de Lesión Medular	13
1.5 Monografía del Diclofenac Sódico	14
1.5.1. Farmacodinamia	19
1.5.2. Farmacocinética	21

II JUSTIFICACION	26
III. HIPOTESIS	26
IV OBJETIVOS	27
V METODOLOGIA	28
5.1. Método Analítico para la Cuantificación de Diclofenac Sódico en Sangre de Rata	28
5.2 Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Diclofenac Sódico en Sangre de Rata	32
5.3 Estudio Farmacocinético	34
VI RESULTADOS	
6.1 Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Diclofenac Sódico en Sangre de Rata	41
6.2 Estudio Farmacocinético	51
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
VIII CONCLUSIONES	70
IX BIBLIOGRAFIA	71
X APENDICE	80

ABREVIATURAS

ABC	AREA BAJO LA CURVA
AD INF	ADMINISTRACION INFERIOR
AD SUP	ADMINISTRACION SUPERIOR
AINE	ANALGESICO ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDAL
C_{MAX}	CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA MÁXIMA
COX	CICLOOXIGENASA
C_3	VÉRTEBRA CERVICAL 3
DCF	DICLOFENACO SÓDICO
FC	FASE CRÓNICA
IM	INTRAMUSCULAR
LM	LESIÓN MEDULAR
LTME	LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL
ME	MÉDULA ESPINAL
NPX	NAPROXENO SÓDICO
PGs	PROSTAGLANDINAS
SNA	SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO
SNC	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
T_{MAX}	TIEMPO AL CUAL SE ALCANZA C_{MAX}
$t_{1/2}$	VIDA MEDIA
$T_{8,9,5}$	VÉRTEBRA TORÁCICA (8,9,5)

ESQUEMAS

No		PÁGINA
1	DIVISIONES SIMPÁTICA Y PARASIMPÁTICA DEL SNA	7
2	INGRESO DE Ca^{2+} EXTRACELULAR AL INTERIOR DE LA CÉLULA	9
3	NEURONA DESREGULACIÓN IÓNICA Y NEUROTOXICIDAD POR RADICALES LIBRES	12
4	MODELO HIPOTÉTICO DEL SITIO RECEPTOR DE LA CICLOOXIGENASA	15
5	ANÁLISIS DE R-X DEL DICLOFENAC	18
6	SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS A PARTIR DEL ÁCIDO ARAQUIDONICO	20
7	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	31
8	DISEÑO EXPERIMENTAL	36
9	MÉTODO EXPERIMENTAL DE CONTUSIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL	38
10	VARIABLES EXPERIMENTALES EN MODELOS DE LESIÓN MEDULAR	63

FIGURAS

No		PÁGINA
1	CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS	41
2	LINEALIDAD DEL SISTEMA	42
3	LINEALIDAD DEL MÉTODO	44
4	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN	49
5	VALORES PROMEDIO PARA LOS PARÁMETROS ABC Y CMAX	65
6	AMPLIACIÓN DE LA GRÁFICA 1	66

TABLAS

No		PÁGINA
1	CURVA PATRON DE DICLOFENAC SÓDICO	30
2	LINEALIDAD DEL SISTEMA	43
3	LINEALIDAD DEL MÉTODO	44
4	PRECISIÓN	45
5	EXACTITUD	46
6	PRECISIÓN PUNTOS CONTROL	47
7	EXACTITUD PUNTOS CONTROL	48
8	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DE DETECCIÓN	49
9	ESTABILIDAD	50
10	VALORES PROMEDIO \pm E E DEL ABC	54
11	VALORES PROMEDIO \pm E E DE CMAX	54
12	VALORES PROMEDIO \pm E E DE TMAX	55
13	ANÁLISIS DE VARIANZA ABC	56
14	PRUEBA DE TUCKEY ABC	57
15	ANÁLISIS DE VARIANZA CMAX	59
16	PRUEBA DE TUCKEY CMAX	60
17	KRUSKAL-WALLIS TMAX	61
18	CAMBIOS METABÓLICOS EN LA FASE CRÓNICA DE LA LESIÓN MEDULAR	68
19-22	DATOS EXPERIMENTALES	80-81

GRAFICAS

No		PÁGINA
1	CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE DICLOFENAC EN RATA LESIONADA CON ADMINISTRACIÓN I M INFERIOR AL NIVEL DE LESIÓN	51
2	CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE DICLOFENAC EN RATA LESIONADA CON ADMINISTRACIÓN I M SUPERIOR AL NIVEL DE LESIÓN	52
3	CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE DICLOFENAC EN RATAS LESIONADAS CON ADMINISTRACIÓN I M INFERIOR Y SUPERIOR AL NIVEL DE LESIÓN	53
4	INTERACCIÓN DE MEDIAS, PARA EL PARÁMETRO ABC	57
5	INTERACCIÓN DE MEDIAS, PARA EL PARÁMETRO CMAX	59

RESUMEN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es uno de los trastornos clínicos con mayor impacto biopsicosocial; su estudio ha despertado un gran interés, integrando diversas disciplinas de investigación básica, clínica y social, que buscan mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados. Estudios clínicos realizados por Segal y Brunneman, 1989, en sujetos con LTME, señalan cambios en la biodisponibilidad de varios fármacos con respecto a individuos sanos. Estos resultados sugieren que los pacientes que padecen de lesión medular, deben ser considerados como una subpoblación terapéutica con requerimientos y necesidades especiales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las alteraciones farmacocinéticas en la absorción intramuscular del diclofenac, en la fase crónica (FC) de la lesión medular (LM). Se realizaron estudios con ratas hembra (*Sprague-Dawley*) que se sometieron a contusión de la médula espinal (ME) a nivel torácico (T8-T9). A los grupos control, sólo se les realizó la laminectomía (exposición de la médula espinal, sin lesión). Se administró una dosis única de diclofenac sódico 10 mg/kg de peso, a 35 días después del procedimiento quirúrgico. En un primer grupo de ratas lesionadas se les administró diclofenac, en el muslo de la pata trasera, inferior al nivel de lesión. A un segundo grupo de ratas con lesión, la dosis se administró en el bíceps, superior al nivel de lesión. Se obtuvieron muestras de sangre de 100µl, a diferentes intervalos de tiempo, durante un período total de 8 horas. Las muestras se analizaron en una columna de fase inversa C₁₈, empleando un detector electroquímico a un potencial fijo de 1.1 V. Se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos: ABC, C_{max}, T_{max}. Como resultado de este estudio, no se encontró diferencia estadística entre las ratas lesionadas con administración superior y su control. Las ratas lesionadas, con administración inferior presentaron diferencia significativa, en los parámetros de biodisponibilidad ABC y C_{max}. Estos resultados señalan que en la fase crónica de la lesión medular, la atrofia muscular y el deterioro del flujo sanguíneo son factores que alteran la biodisponibilidad de fármacos administrados por esta vía. Por lo anterior, se sugiere que al administrar fármacos por vía intramuscular a pacientes parapléjicos, se aplique la dosis en los músculos por arriba del nivel de lesión, ya que se mantienen activos con una buena irrigación sanguínea.

I. LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL (LTME)

El traumatismo de la médula espinal (ME), es causado generalmente por accidentes en los cuales se fractura o disloca alguna de las vértebras, causando una compresión o una deformidad angular de la ME, que puede ser a nivel cervical, dorsal o lumbar (Amzallag,1993). Posterior al trauma, se presenta un amplio espectro de alteraciones neurológicas que van desde síntomas transitorios, en muchos casos leves, hasta efectos permanentes como paraplejia o tetraplejia. En estos casos la interrupción de la señal nerviosa, provoca la pérdida motriz y sensorial de los músculos afectados por abajo del nivel de lesión.

Hasta mediados del siglo pasado, los pacientes con LTME morían a consecuencia de diversas complicaciones tempranas (Bedbrook,1987). En la actualidad gracias al desarrollo de disciplinas como la farmacología, la neurología, la rehabilitación, la neurocirugía, etc., ha disminuido la mortalidad y se ha elevado la calidad de vida del paciente. En nuestro país no contamos con datos epidemiológicos precisos, sin embargo, existen reportes de incidencia en lesión traumática: de 18.6 casos /1,000,000 de habitantes por año, sin considerar la estadística de algunos hospitales donde se atiende a pacientes con trauma raquímedular agudo, que incrementarían dicha cifra (Galicia,1998).

La investigación de la LTME integra diversas disciplinas. En el campo de la biofarmacia es importante comprender las alteraciones neurológicas, que se originan como consecuencia de la lesión medular, ya que pueden interferir en los mecanismos cinéticos de algunos fármacos. Los pacientes que sufren una lesión medular, no responden a la terapia farmacológica, con respecto a los sujetos sin lesión. Esto se entiende, porque el enfermo paralítico además de presentar inmovilidad y pérdida sensorial en los músculos, puede manifestar: disfunción del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), desregulación endócrina y cambios de flujo sanguíneo en órganos y tejidos (MC Donald ,1999)

En el tratamiento farmacológico de pacientes con lesión medular, dado que no se conoce el efecto de estas disfunciones neurológicas sobre los mecanismos cinéticos, no se tiene un tratamiento especializado. Esto implica, que la dosis administrada, es la recomendada para individuos sanos; cuando no se alcanza el efecto farmacológico deseado, la dosis se aumenta hasta que se observan signos de toxicidad. Este método de ensayo y error puede llevar a consecuencias peligrosas para los pacientes puesto que, a menudo, es difícil diferenciar los síntomas de toxicidad relacionados con el fármaco, de aquellos signos o síntomas ocasionados por los desórdenes subyacentes a la lesión (Segal y Brunnemann, 1989_b)

La situación clínica puede hacerse aún más compleja cuando un paciente recibe múltiples fármacos para controlar las patologías que cursan con la lesión medular, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca, los trastornos hepáticos, los trastornos renales, las anomalías gastrointestinales, las alteraciones hormonales e inmunológicas, entre otros.

Estudios clínicos en pacientes con lesión medular han reportado cambios en la farmacocinética de algunos fármacos pertenecientes al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos AINEs (Halstead et al., 1985). Uno de estos estudios ha demostrado que la absorción del acetaminofén está alterada en individuos con una LTME en fase crónica, no así la absorción de la riboflavina. Estos resultados sugieren que los fármacos con un mecanismo de absorción por difusión pasiva como el acetaminofén, presentan alteraciones en la absorción como consecuencia de una lesión medular. Sin embargo, fármacos cuyo mecanismo es a través de un transporte activo como la riboflavina, donde la absorción no se relaciona directamente con el vaciamiento gástrico, pueden no presentar alteraciones farmacocinéticas cuando se administran después de una lesión medular.

Otra de las vías importantes de administración en pacientes con LTME es la intramuscular. Cabe mencionar que aún cuando la administración por vía intramuscular es considerada comúnmente como una vía segura para conseguir un efecto terapéutico rápido y eficiente (Segal et al., 1986), depende en gran medida tanto de las propiedades fisicoquímicas del fármaco como de la permeabilidad de los capilares y el flujo sanguíneo. En la LTME los trastornos fisiológicos pueden alterar, el efecto terapéutico deseado.

En el CUADRO 1 se presentan algunas de las alteraciones farmacocinéticas que se han reportado como consecuencia de la lesión traumática de la médula espinal

CUADRO 1. Estudios Clínicos en pacientes con lesión medular, en fase crónica



Estas investigaciones demuestran alteraciones en la biodisponibilidad de algunos fármacos al ser evaluados, en pacientes con lesión medular

FARMACO	REFERENCIA	VIA DE AD.	OBSERVACIONES ¹
ACETAMINOFEN	Halstead et al , 1985	ORAL	↓ su absorción ↓ vaciamiento gastrico
AMIKACINA GENTAMICINA	Brunnemann y Segal 1991	I M	↑ su volumen de distribución ↓ flujo sanguíneo
LORAZEPAM	Segal et al , 1991	I V	↑ su Vd ↓ su eliminación
BACLOFEN	Aisen et al , 1992	ORAL	↓ su absorción y su eliminación ↓ vaciamiento gástrico
DANTROLENO	Segal y Brunnemann 1989 a	ORAL	↓ su absorción ↓ vaciamiento gástrico
TEOFILINA	Segal et al., 1987	ORAL	↓ su t _{1/2} ↓ vaciamiento gástrico

* ↑ = INCREMENTO , ↓ = DISMINUCION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ALTERACIONES GASTROINTESTINALES. Se han demostrado alteraciones farmacocinéticas de fármacos administrados por la vía oral, en pacientes con LTME crónica. Tal es el caso del acetaminofén, teofilina, dantroleno y baclofeno. Estas disfunciones se han atribuido a los cambios funcionales en el tubo digestivo, que se producen después de una lesión medular y que ocasionan retardo del vaciamiento gástrico (Fealey et al., 1984; García-López P et al., 1999).

ALTERACIONES EN LA ABSORCIÓN INTRAMUSCULAR. La administración de medicamentos por la vía intramuscular también presenta alteraciones en individuos con lesión. La gentamicina y las cefalosporinas administrados por vía i.m., además de presentar alteraciones en la absorción, presentan un retardo en la eliminación (Gilman et al., 1993). Este cambio se ha atribuido al deterioro del flujo sanguíneo, en los músculos paralizados. Otra posible explicación que se ha planteado a las bajas concentraciones alcanzadas después de la administración de fármacos por esta vía, es la dilución del fármaco en el volumen extracelular que habitualmente se encuentra incrementado en los tejidos y espacios intercelulares de estos pacientes (Segal et al., 1986).

ALTERACIONES METABÓLICAS. Además de las alteraciones en los procesos de absorción y distribución de fármacos, la capacidad metabólica puede afectarse como consecuencia de la lesión (Segal, 1991), ha reportado cambios en los niveles de catecolaminas circulantes, en pacientes con lesión de ME. Es factible que estos cambios, sean indicios de alteraciones en el metabolismo hepático. Estudios clínicos, han tratado de correlacionar los niveles de creatinina sérica como indicador de la funcionalidad renal, después de una lesión medular, sin embargo, la creatinina sérica no refleja la actividad renal en estos pacientes.

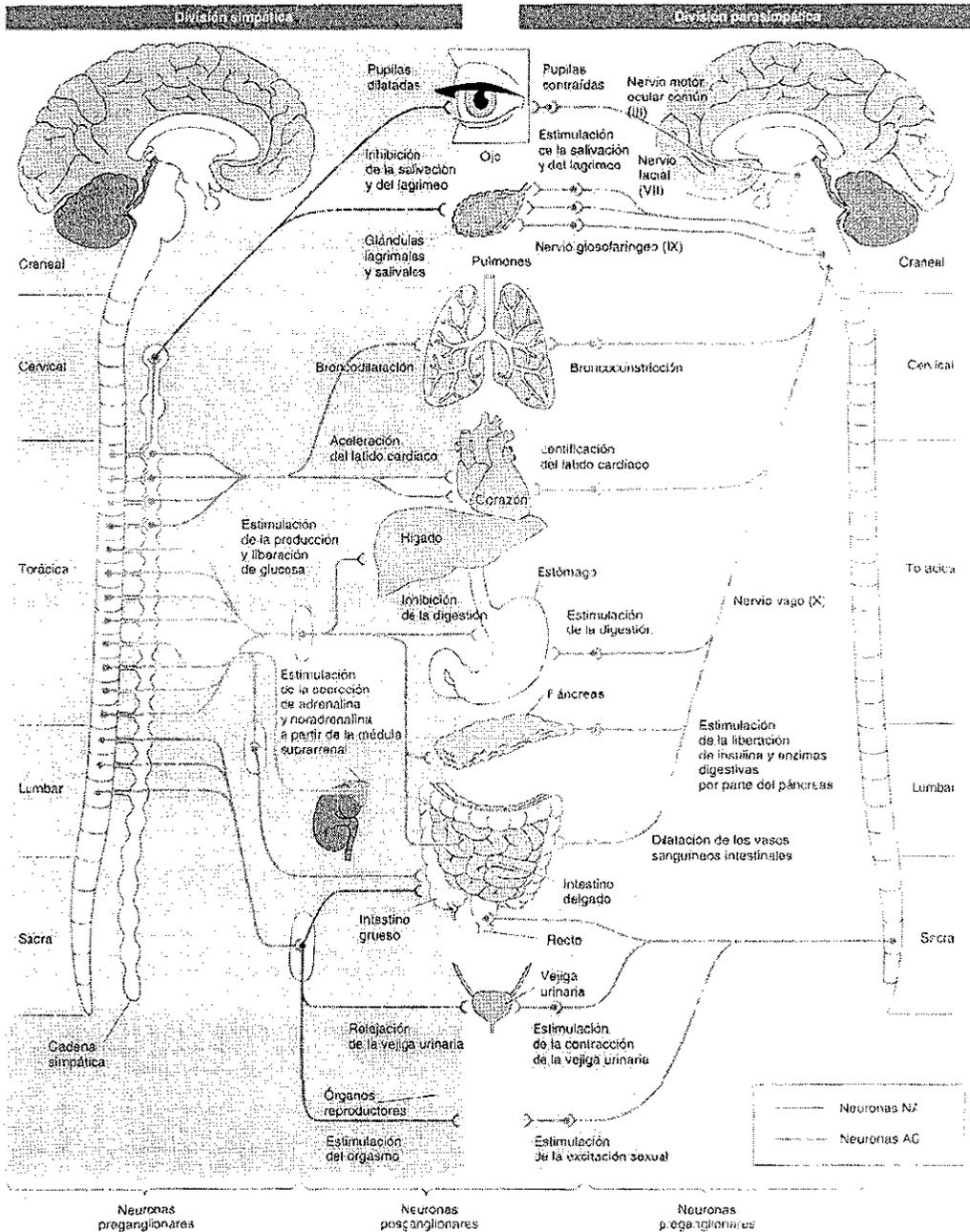
1.1. SECCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL Y CHOQUE MEDULAR

La médula espinal además de ser la conducción principal del sistema nervioso central, realiza una serie de complejas actividades, que son esenciales para la conservación del equilibrio homeostático del organismo. Estas funciones vitales se llevan en conjunto con el Sistema Nervioso Autónomo (SNA), que dirige y conduce desde la médula espinal toda la información sináptica aferente y eferente, proveniente de las células nerviosas de la piel, articulaciones y músculos. ESQUEMA 1

En el traumatismo de la médula espinal se produce una sección anatómica o fisiológica de las fibras nerviosas en el nivel de lesión. La irrigación medular también se deteriora, produciendo isquemia a partir del punto de la lesión vascular, como ocurre en los traumatismos torácicos y abdominales graves en los que la ruptura de las arterias intercostales puede producir un cuadro de isquemia medular grave con infarto (Colachis, 1992). La magnitud del daño va a depender de la intensidad y el nivel de lesión medular (Lehmann et al, 1987).

Las lesiones medulares agudas se caracterizan por arreflexia, flacidez, anestesia y parálisis autónoma abajo del nivel de la lesión. Invariablemente, hay hipotensión arterial cuando la sección es arriba de T₅ por pérdida del tono vascular simpático. Son comunes las anomalías hemodinámicas y disritmias cardíacas en los niveles cervicales y torácicos altos (Lehmann et al, 1987).

Si la lesión se produce en las primeras vértebras cervicales o torácicas, se provoca un choque medular, donde las funciones medulares incluidos los reflejos, se deprimen de forma inmediata hasta un punto del silencio total. Este cuadro clínico lleva a una alta mortalidad.



ESQUEMA 1. Divisiones simpática y parasimpática del SNA (Tomado de Connors, Neurociencia Ed Masson 1998)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1.2 LESION PRIMARIA

La lesión primaria se origina como consecuencia de la alteración inmediata que sufre la médula espinal y depende de la intensidad y características del trauma o manipulación mecánica que la provocan (Gulzar-Sahagún G, et al,1998) En esta etapa se pierden un gran número de axones, como resultado de una serie de eventos químicos y celulares. (MC Donald,1999)

Entre los eventos que caracterizan a la lesión primaria se tienen:

INTERRUPCIÓN DE LA CIRCULACION SANGUINEA / ISQUEMIA

En los primeros minutos después de la lesión, se forman pequeñas hemorragias lindantes a la ruptura o laceración de vasos sanguíneos, que propician la acumulación de sangre en el espacio extracelular, formando un hematoma en la zona de lesión. En consecuencia hay una pérdida de líquido, proteínas y células sanguíneas del sistema vascular hacia el tejido intersticial o espacios o cavidades virtuales. Este desequilibrio en los componentes del flujo vascular, altera la presión hidrostática y osmótica del plasma, favoreciendo un aumento del líquido intersticial y la formación de edema (Tator,1996; Mairov et al ,1998; Panters et al , 1990).

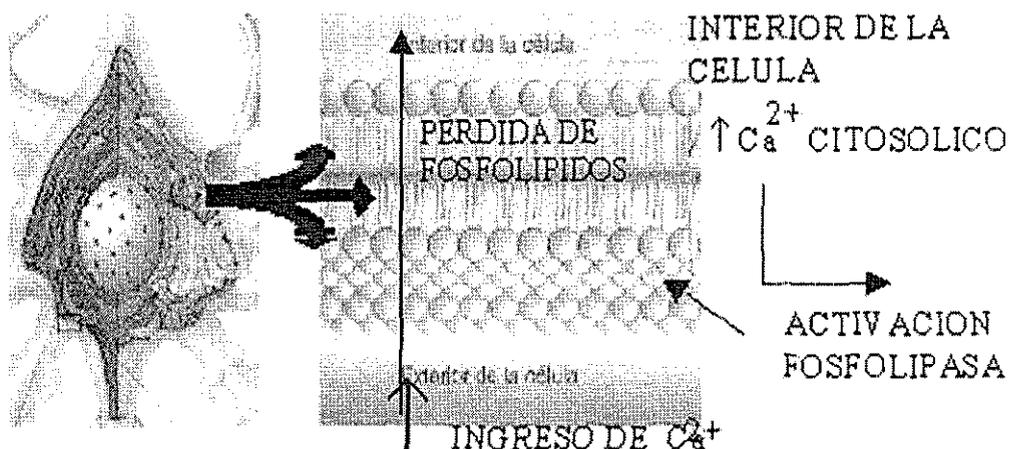
Por otra parte, la interrupción del flujo sanguíneo deteriora el intercambio de nutrientes y oxígeno a las células, provocando isquemia que es una de las causas fundamentales de lesión y muerte celular (Simpson et al,1990) Al ser insuficiente el flujo de oxígeno a las neuronas se produce hipoxia. La hipoxia afecta a la fosforilación oxidativa y, por lo tanto a la síntesis de ATP. Esta deficiencia de ATP afecta a la estructura y función de las membranas neuronales.

La consiguiente pérdida de la integridad de las membranas constituye uno de los factores centrales en la lesión celular irreversible, ya que se pierde la regulación del volumen intracelular, al aumentar la permeabilidad a las moléculas extracelulares.

En el ESQUEMA 2, se representa el ingreso de Calcio (Ca^{2+}), al interior de las células. Este elemento, es un importante mediador de alteraciones bioquímicas que conducen a la muerte celular como son: la inhibición de funciones mitocondriales, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa,

disminución de ATP y la activación de algunas enzimas intracelulares como proteasas y fosfolipasas que atacan la membrana. (Hogan,1986; MC Donald, 1999; Burr et al ,1993).

NEURONA



ESQUEMA 2 . Ingreso de Ca²⁺ extracelular al interior de la célula.
(Tomado de Connors, Neurociencia Ed. Masson 1998)

DISFUNCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO Y SOMÁTICO

Inmediatamente tras la sección de fibras nerviosas autónomas, el órgano inervado pierde su tono simpático o parasimpático. En el caso de los vasos sanguíneos, la sección de los nervios simpáticos causa inmediatamente vasodilatación con la consecuente disminución de la presión arterial (Holtz y Nystrom,1990). Sin embargo, el tono intrínseco del músculo liso puede aumentar progresivamente, debido a las adaptaciones químicas que realizan las fibras musculares, restableciendo una vasoconstricción casi normal (Ishikawa et al.,1995).

RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA

La respuesta inflamatoria es un conjunto de reacciones bioquímicas y metabólicas de los tejidos como consecuencia de la agresión. Se caracteriza por un aumento en la permeabilidad vascular, formación de edema y, participación del sistema inmunológico, a través de leucocitos y citocinas

(Cruse et al,1996) Las manifestaciones clínicas de dicho fenómeno son: rubor, calor, dolor, aumento de volumen y una pérdida de la función especializada.

Muchas de las respuestas celulares de la inflamación se inician por sustancias químicas que son liberadas localmente tras la agresión, y son las que influyen en los cambios de flujo y calibre vascular, denominados también cambios hemodinámicos (Steinmeyer y Kalbhen,1990)

No obstante, la respuesta inflamatoria se va extendiendo gradualmente por una serie de mediadores químicos que actúan conjunta o secuencialmente Sin embargo, esta reacción en cadena puede hacer que la respuesta inflamatoria sea potencialmente perjudicial, aumentando la intensidad e impacto de la lesión (Cruse et al ,1996)

1.3. LESION SECUNDARIA

Es importante mencionar que la lesión inicial es sólo el principio del problema, ya que las reacciones inmediatas al choque medular producen y liberan sustancias químicas, que propician una segunda onda de mecanismos lesivos en los minutos, horas y días subsecuentes, aumentando la dimensión de la lesión y por lo tanto, originando mayor disfunción (Faden y Simon,1988). Esta lesión secundaria, tiende a extenderse longitudinalmente a través de la sustancia gris antes de involucrar a la sustancia blanca; eventualmente la destrucción puede alcanzar varios segmentos por arriba y por debajo de la lesión original (Tator,1996)

La hipoperfusión de células y tejidos que se suscita por la lesión a los vasos sanguíneos llega a estados muy críticos en esta segunda etapa, debido a la disminución en el volumen de sangre o en el gasto cardíaco. Cuando disminuye la presión de perfusión por debajo del nivel crítico se produce una isquemia tisular cada vez mayor, que es seguida por la disminución progresiva del flujo sanguíneo (Atkinson y Atkinson,1996).

Los valores del flujo sanguíneo inicialmente permanecen en un intervalo normal, pero alcanzan un nivel crítico entre una y tres horas después de la lesión. En la sustancia blanca el nivel crítico se alcanza mas tardíamente. Muchos estudios (Hong et al ,1994) indican que inmediatamente después de la LTME hay un incremento transitorio de la presión sanguínea en el sitio del daño, posteriormente se presenta un período prolongado de hipotensión

sistémica debido a la disminución de la actividad simpática y predominio de la actividad parasimpática (Cruse et al., 1996). Finalmente la isquemia provoca otros mecanismos de lesión y muerte celular como la desregulación iónica, la excitotoxicidad por glutamato y aspartato, y la neurotoxicidad por radicales libres y peroxidación de lípidos (Tator, 1996)

DESREGULACIÓN IÓNICA

Después del trauma inicial, células neuronales y astrocitos son dañados y liberan grandes cantidades de glutamato. Los altos niveles de este neurotransmisor sobreexcitan a las neuronas vecinas, induciendo la incorporación de grandes cantidades de iones que posteriormente provocaran una serie de eventos destructivos en dichas células, incluyendo la producción de radicales libres. Las células de la sustancia gris y muchos axones de la sustancia blanca pierden el control intracelular de la regulación iónica y osmótica. Debido a esto hay un intenso movimiento iónico que está determinado por los gradientes de concentración y de carga. Entre otras alteraciones a nivel intracelular, ocurre un incremento de los iones sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}), con una disminución concomitante de los iones potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}). La alteración del gradiente iónico impide la conducción de impulsos nerviosos. (Hogan, 1986; Anderson, 1992)

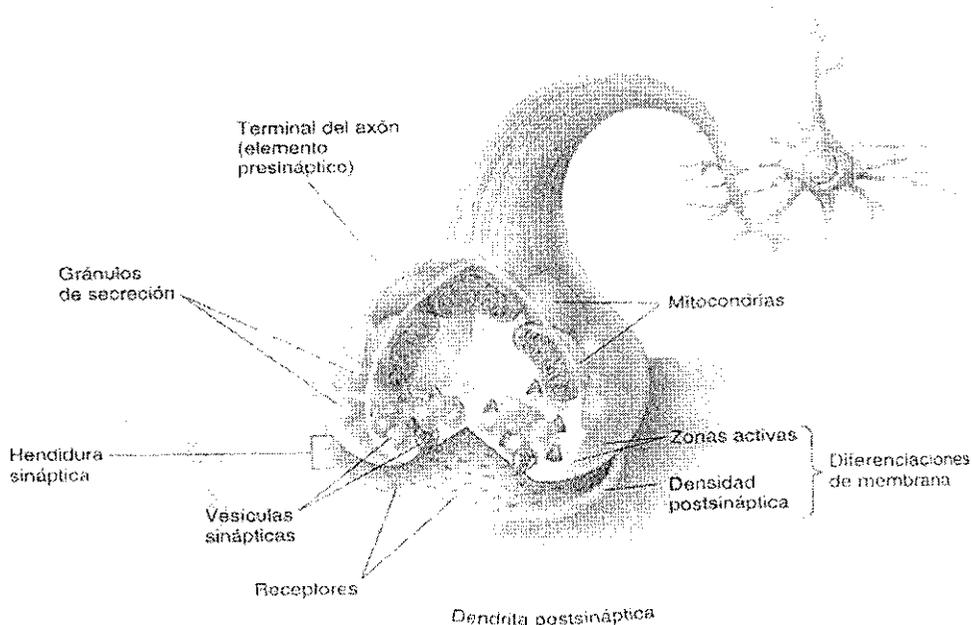
EXCITOTOXICIDAD

En el daño neuronal secundario participan aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato, los cuales están aumentados dependiendo de la intensidad del daño. Dichos aminoácidos, en condiciones normales, se encuentran almacenados en las neuronas para ser utilizados como neurotransmisores. Sin embargo, después del trauma se liberan en grandes cantidades como resultado de la lesión directa de la membrana celular que los contiene y pueden llegar a ser neurotóxicos. Los aminoácidos libres producen una extensa excitación de las neuronas viables y pueden dar lugar a la muerte celular (Holtz y Gerdin, 1991) ESQUEMA 3

NEUROTOXICIDAD POR RADICALES LIBRES Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Después de una LTME se producen abundantes radicales libres como anión superóxido y el radical hidroxilo (peróxido de hidrógeno como inductor). Estos radicales libres se originan en la cascada respiratoria mitocondrial, en

la auto-oxidación de catecolaminas y la invasión de leucocitos polimorfonucleares a la ME, principalmente a la sustancia gris. Los radicales libres son muy reactivos y conducen a la destrucción de la membrana celular, por activación de la fosfolipasa (Hall y Braugher, 1989; Demopoulos et al, 1980). En el siguiente esquema, se representa la estructura de una sinapsis axo-dendrítica. El axón, que es la fibra presináptica, posee en su extremo terminal una zona hinchada que carece de microtúbulos; esta terminación se caracteriza por la presencia de mitocondrias y de numerosas vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor. La dendrita, que es la fibra postsináptica está separada de la fibra presináptica por un espacio intercelular que es la hendidura sináptica. En este espacio los neurotransmisores se unen a sus receptores, que son proteínas integrales de la membrana postsináptica.



ESQUEMA 3 La llegada del estímulo nervioso a la terminación del axón, provoca la descarga por exocitosis del contenido de las vesículas sinápticas, donde se encuentran almacenados los aminoácidos glutamato y aspartato. En la LTME estos aminoácidos se liberan en grandes concentraciones, produciendo fenómenos excitatorios que afectan la integridad de la membrana y por consiguiente, la sinapsis química. (Tomado de Connors, Neurociencia Ed. Masson 1998)

1.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE LESION MEDULAR

Varios modelos experimentales de lesión medular, se han desarrollado para simular los eventos que se presentan después de un trauma de médula espinal (Faden,1992) Dichos modelos permiten trabajar con lesiones de ME bajo condiciones controladas y dan la posibilidad de probar diferentes tratamientos. Algunos de estos modelos son: lesión tipo contusión-compresión, corte limpio con cuchillo y lesión tipo laceración. Cada modelo tiene muchas variantes y en la literatura existen abundantes reportes en cuanto a la técnica, objetivos, ventajas y desventajas (Gopal,1989)

La lesión experimental de tipo contusión-compresión, se considera el modelo de lesión medular que más fielmente reproduce las alteraciones sistémicas y fisiopatológicas que se llevan a cabo, como consecuencia de la lesión de ME en humanos (Faden,1992) Esta técnica fue desarrollada por Allen A, 1911, con el objeto de inducir una lesión de ME de una manera cuantitativa.

En este modelo se supone que la fuerza del impacto y la intensidad del trauma son directamente proporcionales. De esta manera, se puede cuantificar el valor umbral del impacto, es decir, la fuerza con que se produce la lesión y el daño o alteración ocasionados.

Una vez producida la lesión en el modelo experimental de contusión, los efectos de la lesión primaria se distribuyen con base en un gradiente, que va desde la superficie de la ME hasta el interior de la misma. De igual forma, se llevan a cabo, los cambios patológicos de la lesión secundaria, como sangrado e inflamación, suspensión de la circulación arterial y falta de oxígeno.

La variabilidad en la naturaleza y la simetría del impacto, son factores que pueden limitar el análisis, e interpretación de resultados entre un animal y otro. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad, el modelo experimental de contusión, sigue siendo un método de lesión directo y accesible, que ha contribuido a esclarecer, la evolución de algunos mecanismos secundarios autodestructivos (Gopal,1989)

1.5 MONOGRAFÍA DEL DICLOFENAC SÓDICO

HISTORIA

En 1952 se introdujo *la fenilbutazona*, como el primer agente antiinflamatorio no esterooidal posterior al ácido salicílico. Una década más tarde, se colocaron en el mercado diversos compuestos competitivos tales como el ácido mefenámico, ibuprofeno e indometacina. Fue en ese tiempo, que el *Departamento de Investigación Química de la División Farmacéutica de CIBA-GEIGY*, decidió desarrollar un nuevo agente antiinflamatorio que tuviera una alta actividad y una tolerabilidad aceptable (Sallmann, 1986).

En primera instancia, se tomaron en cuenta las propiedades fisicoquímicas conocidas de los otros compuestos. La fenilbutazona, el ácido mefenámico, e indometacina, tenían tres características en común: 1) son ácidos débiles, con constantes de acidez entre 4 y 5. 2) tienen dos anillos aromáticos, que están girados uno en relación al otro. 3) tienen un cierto grado de liposolubilidad similar, que se refleja en sus coeficientes de reparto entre n-octanol y solución amortiguadora. CUADRO 2

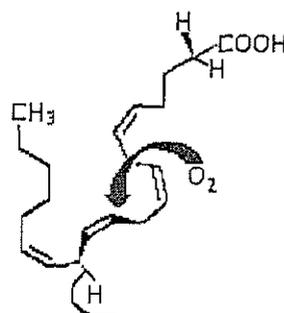
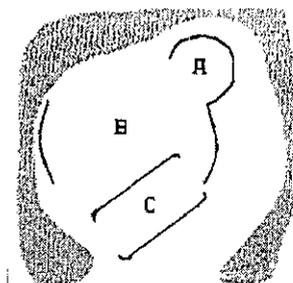
CUADRO 2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESTEREOESPECÍFICAS DE TRES AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

COMPUESTO	CONSTANTE ACIDA	COEFICIENTE DE REPARTO *	ANILLOS AROMATICOS GIRADOS
Fenilbutazona	4.8	5.0	+
Acido mefenámico	4.2	11.1	+
Indometacina	4.2	10.1	+

* n-Octanol/ sol buffer, pH 7.4

Posteriormente se propusieron modelos hipotéticos de receptores, para el ácido mefenámico, e indometacina, en donde se apreciaba que los anillos también soportaban las interacciones específicas con el receptor (Gund y Shen, 1977). Modelaron estructuras tridimensionales de algunos ácidos antiinflamatorios y encontraron características espaciales comunes. Estos autores propusieron un modelo del sitio del receptor para este tipo de compuestos, en donde el ácido araquidónico, podría incluso acomodarse en

la conformación que explica la conversión estereoespecífica del ácido en los endoperoxidos cíclicos ESQUEMA 4.



- A = Sitio catiónico
- B = Superficie hidrofóbica
- C = Espacio hidrofóbico

ACIDO ARAQUIDONICO

ESQUEMA 4. Modelo hipotético, sitio del receptor de la ciclooxigenasa

Finalmente con estas aportaciones se propuso que un agente anti-inflamatorio efectivo, debe tener las características siguientes: una constante de acidez entre 4 y 5, un coeficiente de reparto (n-octanol/solución amortiguadora, pH 7.4) de aproximadamente 10 que facilite su absorción a través de las membranas biológicas, y dos anillos aromáticos, girados uno en relación al otro. El resultado fue el diclofenac, la sal sódica o potásica del ácido o-[(2,6-dicloro-fenil)amino]fenil acético, el primero de una serie de derivados del ácido fenilacético que se desarrollaron como agentes antiinflamatorios. Tiene una constante de acidez de 4.0 y un coeficiente de partición de 13.4. Sus elementos estructurales incluyen un grupo ácido fenilacético, un grupo amino secundario y un anillo fenilo con dos átomos de cloro en posición orto, el cuál causa una máxima torsión en el anillo, los resultados experimentales y clínicos que se han obtenido indican que el diclofenac sódico fue sintetizado con principios bien fundamentados y específicos, es un anti-inflamatorio no-esteroidal (AINE) que comparte las propiedades de los miembros de éste grupo; antiinflamatorio, analgésico y antipirético. (Davies y Anderson 1997)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este compuesto se utiliza ampliamente en la clínica para el alivio del dolor. Se ha demostrado su eficacia para aliviar el dolor inflamatorio después de la cirugía dental, la dismenorrea, el dolor lumbar, el dolor de cabeza y dolor postoperatorio en general (Todd y Sorkin,1988; Davies y Anderson,1997). Los efectos del diclofenac también se han observado en modelos de dolor e inflamación aguda y crónica en animales. El diclofenac es más potente que la fenilbutazona, la aspirina, el ibuprofeno, la indometacina y el naproxeno, comparable al ketorolac y al piroxicam. En general, su eficacia clínica es similar a la de todos los AINEs y menor que la de los analgésicos opioides (Insel,1996).

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

- NOMBRES QUÍMICOS:

- ❖ Sal monosódica del ácido 2-[(2,6-Diclorofenil)amino] bencenoacético
- ❖ Sal sódica del ácido [0-(2,6-Dicloroanilino)fenil] acético
- ❖ Acetato de sodio[0-[(2,6-diclorofenil)amino] fenil]

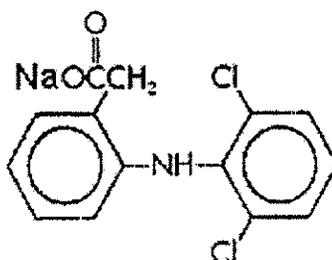
- NOMBRE GENÉRICO: Diclofenaco

- NOMBRES COMERCIALES MAS COMUNES:

Voltaren, Voltarol, Voldal, Voveran, Orthophen

- FORMULA CONDENSADA: $C_{14}H_{10}O_2NCl_2Na$ [15307-79-6]

- ESTRUCTURA QUÍMICA:



PESO MOLECULAR: 318.13 PUNTO DE FUSION: 283- 285° C

- APARIENCIA, COLOR, OLOR: Polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro, ligeramente higroscópico. contiene no menos del 99.0 % y no más del 101.1% de $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$, calculado como base seca

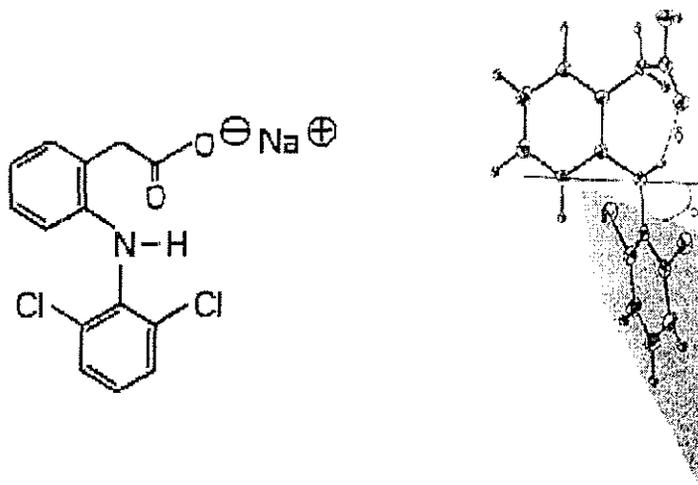
- SOLUBILIDAD:

El diclofenac sódico es un ácido débil, su grado de ionización está dado por el valor de su pKa (4.0) en agua, y el pH de la solución. Su coeficiente de partición en n-octanol-buffer de fosfatos a pH (7.4) es de 13.4. Es poco soluble en un medio ácido, similar al fluido gástrico [0.003 mg ml^{-1}] y altamente soluble en un medio básico, similar al fluido intestinal [13 mg ml^{-1}] CUADRO 3

CUADRO 3. Solubilidad del diclofenac sódico, en diferentes solventes a temperatura ambiente. Datos tomados (Klaus ,1990)

SOLVENTE	SOLUBILIDAD* (mg/ml)
METANOL	> 24
ACETONA	6
ACETONITRILO	<1
CICLOHEXANO	<1
pH 1.1 (HCL)	<1
pH 7.2 BUFFER DE FOSFATOS	6

- PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN:
 - a) Difracción de Rayos X. El análisis estructural del diclofenac sódico muestra dos anillos aromáticos que están girados uno con respecto al otro, el ángulo de torsión es de 69° y el enlace de hidrógeno es de $\delta = 2 \times 10^{-1} \text{ nm}$. Los dos átomos de cloro substituidos en el fenilo son responsables de la máxima torsión del anillo. El arreglo estérico de los anillos aromáticos facilita la interacción con el receptor ESQUEMA 5



ESQUEMA 5. Estructura de la molécula de diclofenac, de acuerdo con el análisis de R-X

- b) El espectro de absorción ultravioleta en dos solventes, metanol y solución amortiguadora de fosfatos a un pH 7.2, presenta una absorción característica de los compuestos aromáticos. Las longitudes de onda para la máxima absorción, en los dos solventes fue de 283 y 276 nm. (Klaus,1990)

- ESTABILIDAD:

Las tabletas de diclofenac sódico con recubrimiento de hidroxipropilcelulosa, son estables a 30°C y con un 80% de humedad relativa, durante un mes. La formulación en supositorios también se ha analizado, por cromatografía de capa fina y espectroscopia en ultravioleta, la formulación fue estable por 24 meses a temperatura de almacén (Landsdorp et al,1990). La estabilidad en fluidos biológicos

(plasma) se ha evaluado previamente, y se ha demostrado que el diclofenac sódico, es estable en esta matriz, puede ser congelado hasta 1 mes a (- 40 °C) sin que se presente degradación (Shield,1998).

1 5 1 FARMACODINAMÍA

- MECANISMOS DE ACCION DEL DICLOFENAC

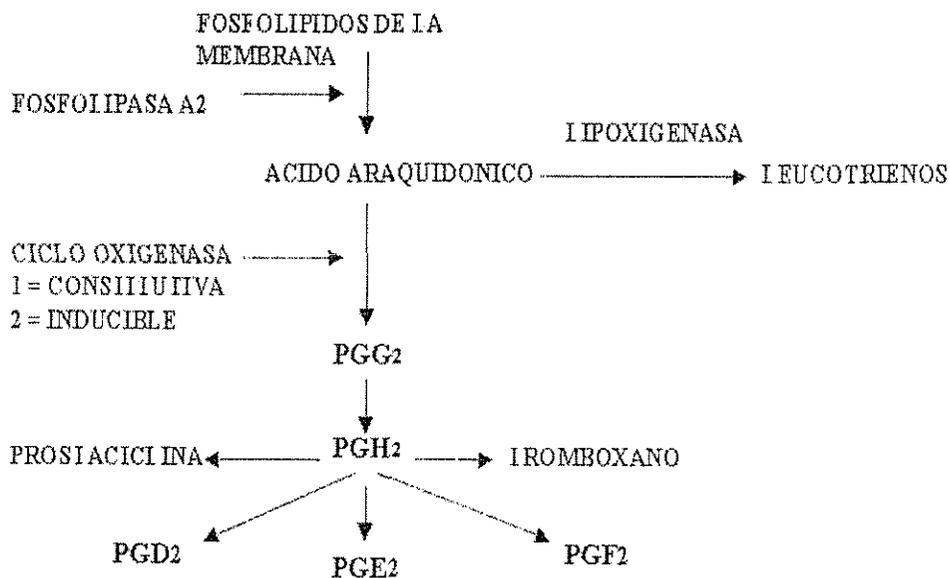
La base fisiológica del efecto terapéutico del diclofenac, es su capacidad para inhibir la biosíntesis de prostaglandinas. El diclofenac sódico, al igual que otros antiinflamatorios no esteroideos actúa específicamente sobre una enzima bifuncional llamada ciclooxigenasa (COX), la que es responsable de iniciar y limitar la velocidad de conversión del ácido araquidónico a prostaglandina G (PGG) y su subsecuente conversión en otros prostanoides. Las prostaglandinas son mediadores de los estados de hiperalgesia y nocicepción subsecuentes a la inflamación (Ku et al ,1986) ESQUEMA 6

Actualmente se sabe que existen dos isoenzimas de la COX, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es una enzima constitutiva, presente en endotelio, estómago, riñones, etc. De manera general se supone que la COX-1 produce prostaglandinas (PGs) importantes para la regulación fisiológica en condiciones normales. La COX-2 es una enzima inducible por citocinas proinflamatorias *in vitro* o durante el proceso inflamatorio *in vivo* (Fenner ,1997). Esto ha motivado a proponer que los efectos adversos de los AINEs se correlacionan con su capacidad para inhibir la COX-1, mientras que los efectos terapéuticos de estos agentes se deben a la inhibición de la COX-2 (Mitchell et al ,1990). Actualmente existen evidencias de que la COX-1 también participa de manera importante en el proceso inflamatorio, mientras que la COX-2 se localiza de manera constitutiva en el sistema nervioso central. El análisis de la inhibición diferencial de la COX ha revelado que muchos AINEs inhiben no selectivamente ambas enzimas. El diclofenac produce analgesia a nivel periférico y central. El efecto analgésico de este fármaco es debido a la inhibición periférica y espinal de la síntesis de PGs y de la activación de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc a nivel periférico. La activación de la vía descendente inhibitoria serotoninérgica participa de manera importante en la analgesia central producida por el diclofenac. Parece poco probable que la estimulación de la liberación de péptidos opioides endógenos tenga una participación relevante en el efecto analgésico del diclofenac (Fenner,1997).

- INHIBICION DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO

INHIBICION DE LA COX

Como otros AINEs, el diclofenac tiene la propiedad de inhibir la síntesis de prostaglandinas (PGs) tanto *in vitro* como *in vivo* (Ku et al ,1986). El diclofenac inhibe a la COX. La actividad inhibitoria del diclofenac sobre la enzima es competitiva y reversible. El diclofenac exhibe una selectividad ligeramente mayor por la COX-2 que por la COX-1 (CI_{50} : 0.075 μ M por la COX-1 y 0.038 μ M por la COX-2). Es poco probable que esta ligera diferencia en selectividad tenga algún impacto en el mejoramiento del perfil de toxicidad de diclofenac, ya que cuando la COX-2 está inhibida un 80%, la COX-1 está inhibida aproximadamente un 70% . Por lo tanto, la falta de especificidad para bloquear selectivamente la COX, puede explicar su toxicidad gastrointestinal. Sin embargo, también puede explicar su eficacia analgésica y antiinflamatoria, dado que la COX-1 también participa en el proceso inflamatorio (Warner et al.,1999).



ESQUEMA 6. Síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, que puede ser inhibida por uno o dos formas de la ciclooxigenasa: COX-1, una enzima constitutiva, o COX-2, una forma inducible. Los AINES, pueden inhibir tanto a la COX-1 y COX-2 (Larry y Moreland,1999)

1 5 2 FARMACOCINÉTICA

El diclofenac se puede administrar por la vía oral (p.o.), intravenosa, intramuscular, rectal y tópica. Este fármaco se presenta, en una gran variedad de formas farmacéuticas; ya sea en suspensión, cápsulas, tabletas, supositorios, geles, inyectables y soluciones oftálmicas (González P E et al.,1998).

El diclofenac se absorbe con rapidez y por completo después de la administración oral. En tabletas de 50 mg con capa entérica se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas entre 1 a 1.5 horas (De Bernardi et al.,1993). La absorción sistémica del diclofenac es proporcional a la dosis al menos en el rango de 1 - 10 mg/kg de peso en la rata y en el rango de 25 - 150 mg en el humano (Davis y Anderson,1997). En una formulación de liberación inmediata probada en ratón, la concentración plasmática máxima se alcanza en un intervalo de 15 min. (Bandarage et al.,2000). Su ingestión con los alimentos disminuye la velocidad de absorción, pero no influye en la cantidad absorbida de sustancia activa. Hay un sustancial efecto de primer paso, de modo que sólo alrededor del 50% del diclofenac está disponible en forma sistémica. La administración oral se recomienda para la terapia antiinflamatoria crónica (Kurowski M.,1988).

- ABSORCIÓN POR VÍA INTRAMUSCULAR (SOL INYECTABLE)

Después de la administración i.m., de 75 mg de diclofenac a pacientes, comienza de forma inmediata la absorción y, una vez transcurridos 20-30 minutos, se alcanza un pico en las concentraciones plasmáticas de aproximadamente 2.5 mg/ml. La administración i.m. de diclofenac sódico proporciona una rápida absorción, apropiada para los tratamientos analgésicos agudos (Kurowski,1988). Después de su completa absorción, se distribuye ampliamente, encontrándose las mayores concentraciones en el hígado y el riñón.

Cuando se administran 75 mg de diclofenac como infusión intravenosa durante más de dos horas las concentraciones plasmáticas máximas son de aproximadamente 1.9 µg/ml. Infusiones más breves provocan concentraciones máximas más altas, mientras que las infusiones más prolongadas alcanzan después de 3 a 4 horas concentraciones máximas estables proporcionales a la velocidad de infusión.

En cambio tras la inyección intramuscular, las concentraciones plasmáticas declinan rápidamente después de haber alcanzado el pico.

El área bajo la curva de la concentración (ABC) tras la administración intramuscular equivale aproximadamente al doble de la que se obtiene al administrarse la misma dosis por vía oral o rectal, ya que la sustancia activa se metaboliza casi al 50% en su paso por el hígado por estas vías

El comportamiento farmacocinético permanece inalterado tras la administración repetida. No se produce acumulación si se mantienen los intervalos posológicos recomendados (Todd y Sorkin, 1988)

- DISTRIBUCION

El diclofenac tiene un volumen de distribución relativamente bajo. Este bajo volumen de distribución indica que el fármaco está confinado al plasma y por lo tanto no cruza fácilmente la barrera hematoencefálica. Las concentraciones de diclofenac en líquido cefalorraquídeo son ~ 8% de las observadas en plasma (Davies N.M. y Anderson K., 1997). Dado que se requieren concentraciones mucho menores a nivel central que sistémico, es posible que esas concentraciones sean suficientes para bloquear la síntesis de prostaglandinas y por lo tanto actuar como antipirético. De hecho hay evidencia de que el efecto analgésico del diclofenac parece involucrar también un componente supraespinal (O'Neill y Lemis, 1989)

El fármaco se une en forma extensa a las proteínas plasmáticas (99.7%), principalmente a la albúmina (99.4%), su vida media plasmática es de 1 a 2 horas. El volumen aparente de distribución calculado es de 0.12 a 0.17 lt/kg.

El diclofenac se acumula en el líquido sinovial después de la administración oral, donde las concentraciones máximas se miden de 2 a 4 horas después de haberse alcanzado los valores plasmáticos máximos. La vida media aparente para la eliminación desde el líquido sinovial es de 3 a 6 horas. Dos horas después de alcanzarse los niveles plasmáticos máximos, las concentraciones de sustancia activa en el líquido sinovial son ya más altas que en el plasma y siguen siendo superiores hasta las 12 horas. Lo cual puede explicar la duración del efecto terapéutico en la artritis, que es mucho mayor que la vida media plasmática (Elmqvist et al, 1994)

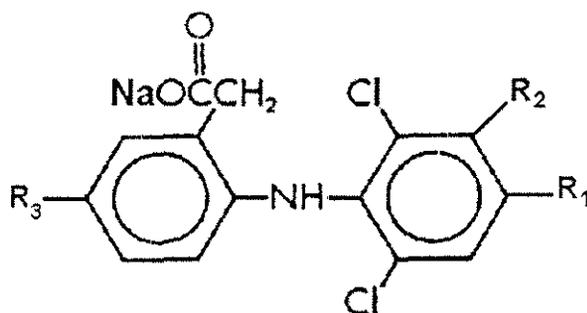
- BIOTRANSFORMACION

La biotransformación del diclofenac se efectúa en parte por glucuronidación de la molécula, intacta, pero ante todo por hidroxilación simple, múltiple y metoxilación que producen varios metabolitos fenólicos (3'-hidroxi, 4'-hidroxi, 5'-hidroxi, 4',5'-dihidroxi- y 3'-hidroxi-4'-metoxi-diclofenac), la

mayoría convertidos en conjugados glucurónicos, por la enzima hepática citocromo P450 subfamilia (CYP) 2C9. Dos de estos metabolitos fenólicos son biológicamente activos, aunque en mucho menor grado que el diclofenac (Shimamoto et al., 2000)

Sin embargo, se ha reportado (Lill et al., 2000) que la hepatitis no altera la farmacocinética del diclofenac. En un estudio clínico, realizado con voluntarios sanos y pacientes con daño hepático crónico, se encontró que los valores del ABC para el diclofenac y sus metabolitos no presentaron diferencias significativas entre los pacientes con hepatitis y los voluntarios

METABOLITOS DEL DICLOFENAC



Nombre	Fórmula	Metabolito	R ₁	R ₂	R ₃
4'-Hidroxiciclofenac	4'-OH-D	I	OH	H	H
5 -Hidroxiciclofenac	5 -OH-D	II	H	H	OH
4',5-dihidroxiciclofenac	4',5-OH-D	III	OH	H	OH
3'-Hidroxiciclofenac	3'-OH-D	IV	H	OH	H

Los metabolitos del diclofenac han sido identificados en la orina del hombre como conjugados. 3'-, 4'-, y 5 -Hidroxiciclofenac (3'-, 4'-, y 5 -OH-D) y 4',5-dihidroxiciclofenac (4',5-OH-D) se han cuantificado en un porcentaje menor del 5%, 20-30 %, 5-10 % y 5-10% respectivamente, de la dosis administrada. El Metabolito I El 4-hidroxiciclofenac es el principal metabolito en el hombre. Los metabolitos I y IV inhiben la síntesis de prostaglandinas pero con una potencia 30 veces menor que el diclofenac sódico. Los efectos de los metabolitos II y III son producidos solamente en dosis altas y no son relevantes.

- ELIMINACIÓN

Alrededor del 60% de la dosis administrada se excreta en la orina en forma del conjugado glucurónico de la molécula intacta y como metabolitos, también en su mayor parte en conjugados glucurónicos. Menos del 1% se excreta como sustancia inalterada. El resto de la dosis se elimina como metabolitos por la bilis y en las heces.

La vida media de eliminación es de 1 a 1.5 horas, la vida media de excreción urinaria en pacientes con insuficiencia renal moderada, es la misma que en pacientes con función renal normal (1 a 1.9 horas), pero se prolonga en pacientes con insuficiencia renal severa (Landsdorp et al, 1990)

La depuración sistémica total del diclofenac en plasma es 263 ± 56 ml/min (valor medio \pm DE). Cuatro de los metabolitos, inclusive los dos activos, tienen vidas medias breves en plasma, de 1 a 3 horas. Un metabolito, el 3'-hidroxi-4'-metoxi-diclofenac tiene una vida media plasmática mucho más prolongada. Sin embargo este metabolito es virtualmente inactivo.

- FACTORES FISIOLÓGICOS QUE INFLUYEN EN LA FARMACOCINÉTICA

No se han registrado diferencias relevantes tras la administración oral en la absorción, el metabolismo y la excreción, debidas a la edad del paciente. Sin embargo, en algunos sujetos de edad avanzada una infusión intravenosa de 15 minutos de duración produjo concentraciones plasmáticas superiores en un 50% a las esperadas en comparación con los datos de sujetos jóvenes sanos.

En los enfermos con función renal limitada no se puede inferir una acumulación de sustancia activa inalterada a partir de la cinética de dosis única cuando se aplica el esquema posológico normal. Cuando la depuración de creatinina es menor de 10 ml/min, los niveles plasmáticos de los hidroximetabolitos en el estado estacionario son unas cuatro veces mayor que en los sujetos sanos. No obstante, estos metabolitos se excretan finalmente por la bilis.

La cinética y el metabolismo del diclofenac en pacientes con hepatitis crónica o cirrosis sin descompensación discurren igual que en pacientes con hígado sano (Lill et al, 2000)

USOS TERAPÉUTICOS

El diclofenac sódico se utiliza para el tratamiento sintomático de largo plazo de artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. También es útil en el tratamiento a corto plazo del dolor músculo-esquelético, dolor postoperatorio, cefalea y dismenorrea. El diclofenac también se ha utilizado en dolor postoperatorio en niños.

TOXICIDAD

El diclofenac produce efectos adversos en aproximadamente 20% de los pacientes que toman este fármaco, siendo los efectos gastrointestinales los más comunes. Se ha observado sangrado y ulceración o perforación de la pared intestinal después de usar diclofenac. También se han observado elevaciones reversibles en las aminotransferasas. En un porcentaje menor se han observado casos de reacciones alérgicas, ronchas en la piel, efectos en el sistema nervioso central, retención de líquidos, edema y raramente afecta la función renal. La toxicidad de los AINEs parece deberse a su inespecificidad sobre la ciclooxigenasa inducible (COX-2) y constitutiva (COX-1). El diclofenac se ha asociado con misoprostol, un análogo de la prostaglandina E₁ para tratar de reducir su toxicidad. En combinación con misoprostol, el diclofenac mantiene su eficacia analgésica y reduce la incidencia de efectos adversos (Shield, 1998).

II. JUSTIFICACION

La fisiopatología de la lesión medular provoca alteraciones, que afectan los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. La importancia clínica de este hecho, es que desde el choque medular, hasta la etapa crónica de la lesión, a los pacientes lesionados se les dosifican diversos medicamentos, algunos de estos con un estrecho margen terapéutico.

De esta manera, se vuelve necesario caracterizar la farmacocinética de medicamentos en modelos experimentales que permitan caracterizar los eventos que se presentan a consecuencia del trauma medular. El empleo efectivo y seguro de estos fármacos puede coadyuvar al proceso de rehabilitación así como a disminuir la morbilidad y mortalidad de estos pacientes.

III. HIPÓTESIS

La biodisponibilidad del diclofenac sódico administrado por vía intramuscular en ratas parapléjicas, se verá disminuida cuando la dosis se administre en los músculos paralizados por el trauma medular, debido al deterioro del flujo sanguíneo en la fase crónica de la lesión y a la alteración en los mecanismos cinéticos de absorción y distribución de fármacos administrados por esta vía.

II. JUSTIFICACION

La fisiopatología de la lesión medular provoca alteraciones, que afectan los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. La importancia clínica de este hecho, es que desde el choque medular, hasta la etapa crónica de la lesión, a los pacientes lesionados se les dosifican diversos medicamentos, algunos de estos con un estrecho margen terapéutico.

De esta manera, se vuelve necesario caracterizar la farmacocinética de medicamentos en modelos experimentales que permitan caracterizar los eventos que se presentan a consecuencia del trauma medular. El empleo efectivo y seguro de estos fármacos puede coadyuvar al proceso de rehabilitación así como a disminuir la morbilidad y mortalidad de estos pacientes.

III. HIPÓTESIS

La biodisponibilidad del diclofenac sódico administrado por vía intramuscular en ratas parapléjicas, se verá disminuida cuando la dosis se administre en los músculos paralizados por el trauma medular, debido al deterioro del flujo sanguíneo en la fase crónica de la lesión y a la alteración en los mecanismos cinéticos de absorción y distribución de fármacos administrados por esta vía.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones farmacocinéticas del diclofenac sódico administrado por vía intramuscular en la fase crónica de la LTME en ratas hembra Sprague - Dawley.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un estudio farmacocinético en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con LTME a nivel de la vértebra torácica T8 en fase crónica, administrando el DCF en el muslo de la pata trasera, inferior al nivel de lesión.
- Realizar un estudio farmacocinético en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con LTME a nivel de la vértebra torácica T8 en fase crónica, administrando el DCF en el bíceps, superior al nivel de lesión

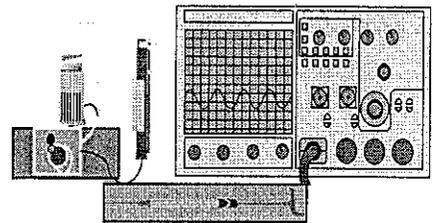
V. METODOLOGÍA

La metodología empleada en este estudio fue realizada en tres partes: 1) la primera parte, consiste en la determinación de las condiciones del método analítico para la determinación de diclofenac sódico en sangre de rata. 2) la segunda parte, consiste en la validación del método cromatográfico para la determinación de diclofenac sódico en sangre de rata. 3) la tercera parte, consiste en el estudio de las alteraciones farmacocinéticas del diclofenac administrado por vía intramuscular, en la fase crónica de la lesión traumática de la médula espinal.

5.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC SÓDICO EN SANGRE DE RATA

5.1.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Bomba Waters 510
- Inyector Rheodyne 7725, Asa: 20 μ l
- Detector electroquímico BAS LC-4B ,1.100 V
- Procesamiento de datos software MILLENIUM v. 3.15
- Columna Novapak C18; de 150 x 3.9 mm (D.I) y 4 μ m de tamaño de partícula
- Fase móvil: Acetonitrilo/ Sol. acetato de Na (0.08M) 41:59, pH: 3.4 (Ajustado con Ac. acético glacial) Flujo: 1.8 ml/min
- Temperatura: ambiente (25° C).Tiempo de corrida: 5 min.



5.1.2. REACTIVOS Y ESTÁNDARES

- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Agua desionizada Milli Q System
- Acetato de sodio anhidro R.A (J.T. Baker)
- Ac. acético glacial R.A (Merck)

- Diclofenac sódico R A (Ciba-Geigy)
- Naproxen sódico (estándar interno, Syntex S A)

5.1.3 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

SOLUCIÓN A DICLOFENAC SÓDICO [1.0 mg/ml]

Pesar 10 mg del estándar de referencia y transferir a un matraz volumétrico de 10 ml. Disolver y aforar con una solución de agua desionizada-acetonitrilo (80:20).

SOLUCIÓN B DICLOFENAC SÓDICO [100 µg/ml]

Tomar una alícuota de 1 ml, de la solución **A** y transferir a un matraz volumétrico de 10 ml. Aforar con una solución de agua desionizada-acetonitrilo (80:20)

SOLUCIÓN C NAPROXEN SÓDICO [1.0 mg/ml]

Pesar 10 mg del estándar interno de referencia, y transferir a un matraz volumétrico de 10 ml. Disolver y aforar con una solución de agua desionizada- acetonitrilo (80:20)

SOLUCIÓN D NAPROXEN SÓDICO [25 µg/ml]

Tomar una alícuota de 250 µl, de la solución **D** y transferir a un matraz volumétrico de 10 ml. Aforar con una solución de agua desionizada-acetonitrilo (80:20)

5.1.4 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE DICLOFENAC

A partir de la solución B, se hicieron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones de la curva de calibración. En la Tabla 1, se presenta en la primera columna, las concentraciones de la curva patrón de diclofenac

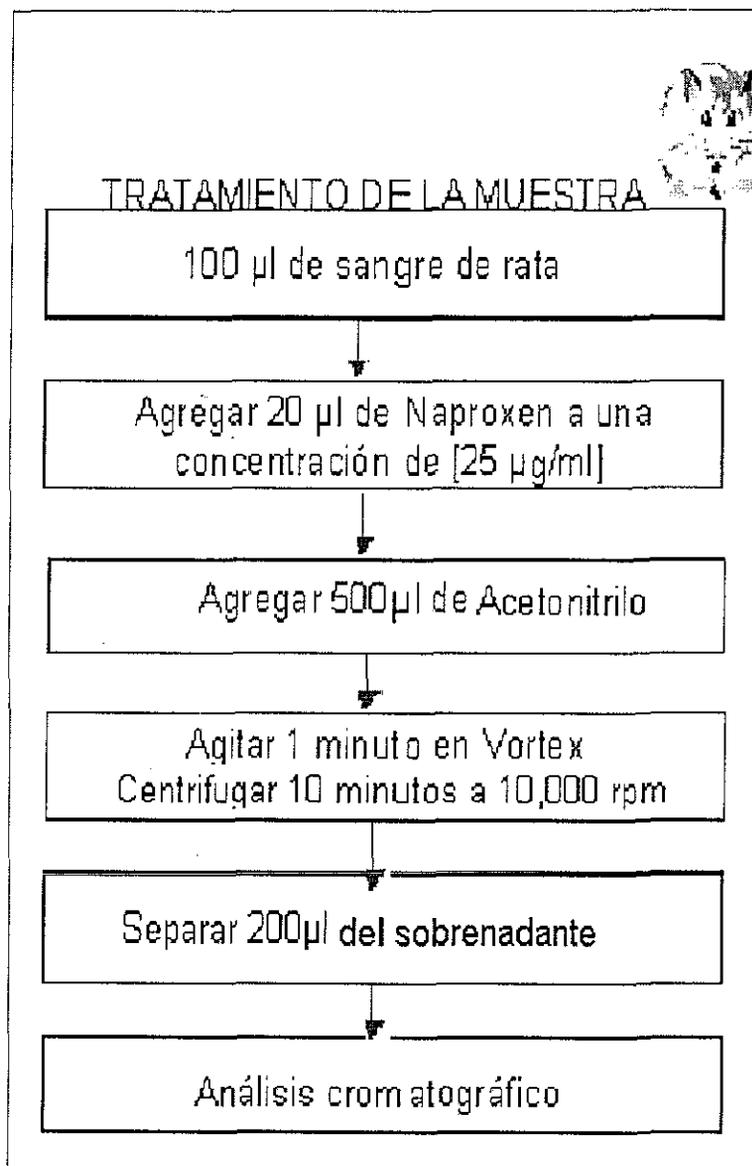
en sangre y los puntos control. En la segunda columna, se indican las alícuotas de la solución B, correspondientes a cada punto.

TABLA 1 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE DICLOFENAC SÓDICO EN SANGRE TOTAL.

CONCENTRACION [$\mu\text{g/ml}$]	ALICUOTA SOL.PATRON SOL. DFC B [$100 \mu\text{g/ml}$]	VOLUMEN FINAL AFORO SOL. $\text{H}_2\text{O} / \text{ACE} (80:20)$
$C_1 = 0.5$	50 μl	10 ml
PC₁ = 0.6	60 μl	10 ml
$C_2 = 1$	100 μl	10 ml
$C_3 = 2$	200 μl	10 ml
$C_4 = 5$	500 μl	10 ml
PC₂ = 6	600 μl	10 ml
$C_5 = 10$	1 ml	10 ml
$C_6 = 20$	2 ml	10 ml
PC₃ = 30	3 ml	10 ml
$C_7 = 40$	4 ml	10 ml

5.1.5 PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR DICLOFENAC SÓDICO EN SANGRE DE RATA

Las muestras biológicas se procesaron de la siguiente manera: A 100 μl de sangre de rata se le añadieron 20 μl de estándar interno a una concentración de [$25 \mu\text{g/ml}$] + 500 μl de acetonitrilo y se agitó 1 minuto en vortex. Posteriormente la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después de centrifugar se separaron 200 μl del sobrenadante y se inyectaron 60 μl al cromatógrafo. En el ESQUEMA 7 se indica este procedimiento.



ESQUEMA 7 . TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC SÓDICO EN SANGRE DE RATA

5.2.1 SELECTIVIDAD

Este parámetro se determinó evaluando la no interferencia de los componentes de la sangre en la cuantificación del diclofenac sódico y el estándar interno naproxen sódico

Para determinar la selectividad del método, se analizaron blancos de una mezcla de sangre de 3 ratas *Sprague-Dawley* hembras, que se encontraban bajo condiciones controladas (régimen alimenticio y sin medicación), y se verificó que no existieran picos debidos a sustancias endógenas que interfirieran con las señales de interés. Se trabajó por triplicado: muestras blanco, y muestras de sangre conteniendo los estándares de diclofenac y naproxen.

5.2.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

A fin de determinar la linealidad del sistema se prepararon tres curvas de calibración de diclofenac (DCF), en una solución H₂O: Acetonitrilo (80:20) En el intervalo de concentraciones de 0.5 a 40 µg/ml. Se gráfico la relación de alturas (DCF/E.I) con respecto a la concentración de DCF, determinando el coeficiente de variación ($CV \leq 1.5\%$), coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$) y el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$).

5.2.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se determinó preparando seis curvas patrón de diclofenac en sangre de rata, en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 40 µg/ml de acuerdo al procedimiento descrito (2.1.4) A cada curva se le realizó un análisis por mínimos cuadrados. Se gráfico la relación de alturas (DCF/E.I) con respecto a la concentración de DCF, determinando coeficiente de variación ($CV \leq 20\%$ para el punto más bajo de la curva y $CV \leq 15\%$ para los demás puntos)

Observando que la función respuesta: alturas (DCF/E.I) y la concentración del diclofenaco, en el intervalo de concentraciones de la curva, cumple con la relación $y = mx + b$ Se obtuvo la pendiente (m), la ordenada al origen (b),

coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$) y el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$).

5.2.4 EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

PRECISIÓN

La precisión del método se determinó analizando la curva de calibración por triplicado durante dos días para determinar la precisión interdía y por triplicado en un solo día para determinar la precisión intradía. Determinando que el coeficiente de variación fuera; $CV \leq 20\%$ para el punto más bajo de la curva y $CV \leq 15\%$ para los demás puntos.

EXACTITUD

Este parámetro se evaluó como el porcentaje de recobro, la cual se realizó comparando el promedio de tres curvas realizadas en un solo día, y seis curvas en dos días. De la respuesta alturas (DCF/E I) de cada concentración en sangre de rata, contra la correspondiente en acetonitrilo (para semejar las condiciones, en el tratamiento de la muestra 5.1.5). Determinando que el coeficiente de variación fuera; $CV \leq 20\%$ para el punto más bajo de la curva y $CV \leq 15\%$ para los demás puntos.

*Estos parámetros también se evaluaron considerando las concentraciones de los puntos control contempladas dentro del rango de la curva patrón: una cerca del límite de cuantificación [$0.6 \mu\text{g/ml}$], una cerca del centro [$6 \mu\text{g/ml}$], y otra cercana al límite superior de cuantificación [$30 \mu\text{g/ml}$]. Los puntos control se evaluaron en cada curva de calibración. Se analizaron por duplicado durante tres días (con tres curvas de calibración) para establecer la precisión inter análisis y por sextuplicado en un día para establecer la precisión intra análisis empleando las concentraciones antes mencionadas.

El parámetro de exactitud se evaluó como el porcentaje de recobro, con las muestras empleadas para el análisis de precisión.

5.2.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LDC)

El límite de cuantificación (LDC) del método analítico, se fijó como la concentración más baja de la curva de calibración [0.5 µg/ml], dado que cumplía con los criterios de precisión y exactitud.

5.2.6 LÍMITE DE DETECCIÓN (LDD)

El límite de detección (LDD), se estableció en [0.1 µg/ml] al comparar visualmente la señal del ruido, con la respuesta del analito.

5.2.7 ESTABILIDAD

La estabilidad del diclofenaco se evaluó durante 1 mes. Se prepararon muestras de 100 µl de sangre con los puntos control de la curva y se mantuvieron en congelación a una temperatura de -17 °C. Las muestras se analizaron por triplicado los días 7, 14 y 28 respectivamente. Con una curva de calibración preparada el día del análisis. Para evaluar la estabilidad del DCF en las muestras de sangre, el promedio de cada concentración (de las muestras almacenadas) se comparó con la concentración teórica inicial. Evaluando un CV ≤ 15%.

5.3 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

5.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratas hembra de la cepa *Sprague-Dawley* de 7-8 semanas con 240-260 gr de peso

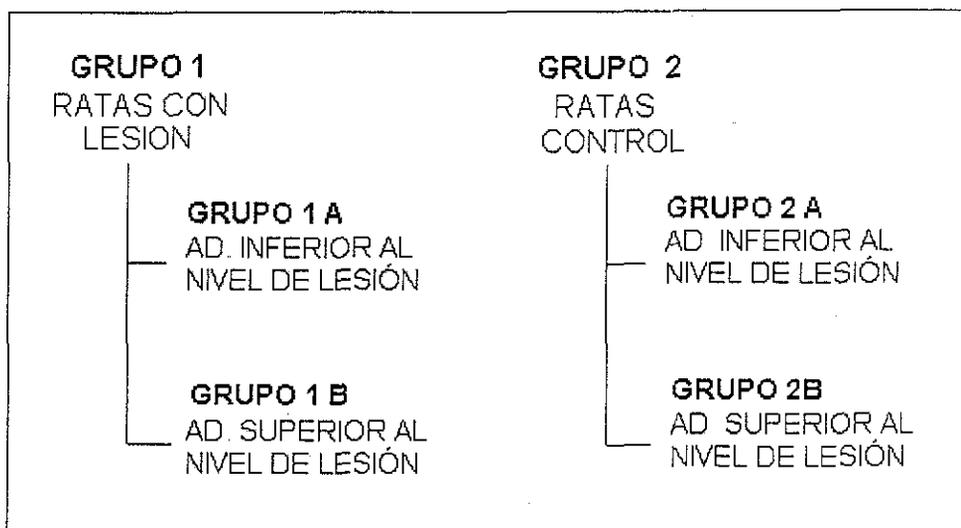
5.3.2 EQUIPO

- Bioterio con temperatura y humedad controlada
- Cuarto de quirófano
- Cuarto de esterilización
- Unidad de cuidados intensivos para pequeñas especies Schroer 1500

- Microscopio e instrumental de microcirugía
- Material quirúrgico
- Instrumento estereotáxico
- Balanza analítica Sartorius 1800
- Agitador vortex Thermolyne 16700
- Centrífuga Beckman J-21

5.3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio farmacocinético se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación del Proyecto Camina A C. Se formaron aleatoriamente 2 grupos de ratas hembra Sprague-Dawley de 7-8 semanas con 240-260 g de peso. Como se muestra en el ESQUEMA 8, cada grupo de ratas se dividió a su vez para administrar la dosis en los niveles inferior y superior al sitio de lesión. 12 hr antes de iniciar la cinética, al grupo de animales correspondiente, se les retiró el alimento y se les dejó con agua únicamente. Al inicio de la farmacocinética se les pesó, se evaluó la pérdida de peso, se canularon por la vena caudal de la cola, se tomó el blanco correspondiente y se les administró una dosis única de diclofenac 10 mg/kg en solución fisiológica.



ESQUEMA 8. Diseño experimental. **Grupo 1** Ratas con lesión medular a nivel (T8) **Grupo 2.** Ratas control con laminectomía. **Grupos A (1 y 2).** Administración i.m en el muslo de la pata trasera de la rata, inferior al sitio de lesión. **Grupos B (1 y 2).** Administración i.m en el bíceps de la rata, superior al sitio de lesión.

5.3.4 MÉTODO DE ANESTESIA

Para los procedimientos de lesión medular y laminectomía, se aplicó una dosis intramuscular de una mezcla de clorhidrato de ketamina (75 mg/kg) y xilazina (12.5 mg/kg).

5.3.5 MÉTODO PARA LAMINECTOMÍA Y CONTUSIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL

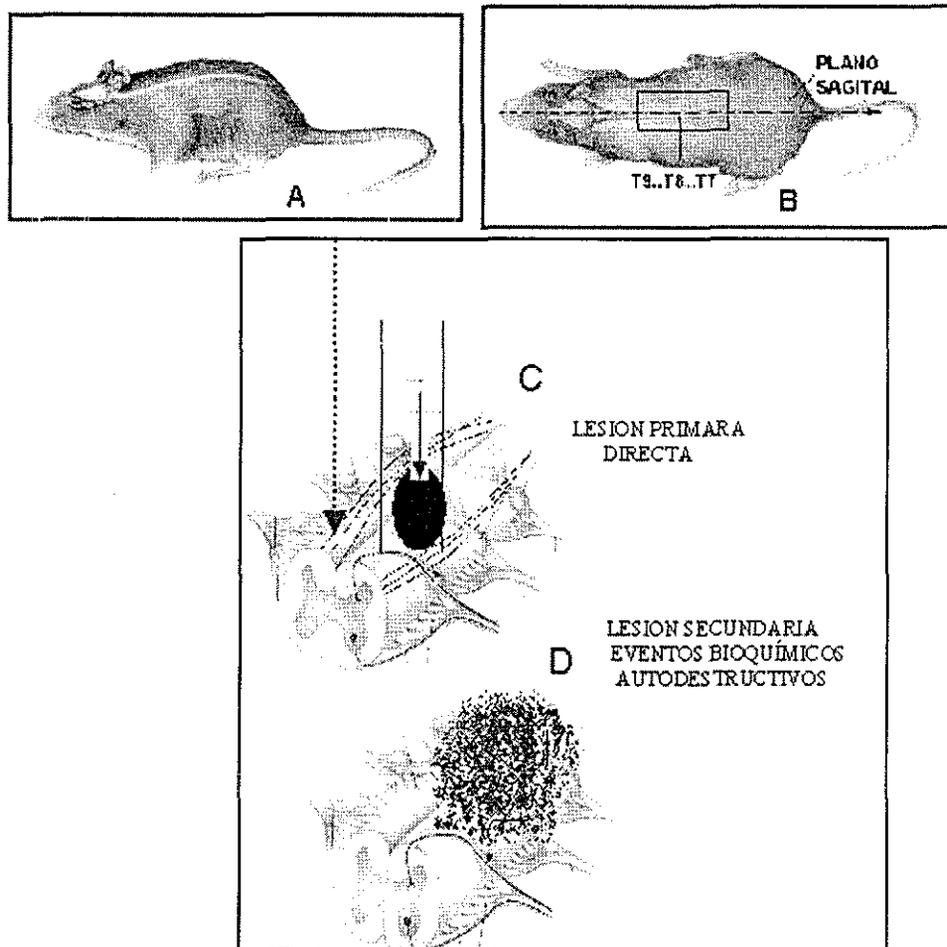
En el cuarto de quirófano bajo el efecto de la anestesia, se delimitó un rectángulo a la altura de la vértebra torácica T8 en el dorso de la rata. Incluyendo el campo de trabajo una vértebra arriba y otra abajo del sitio de lesión. Se rasuró y limpio perfectamente la zona **ESQUEMA 9.** Se practicó una incisión en la piel (en la región marcada anteriormente), seguida de una disección de los músculos paravertebrales y de las apófisis espinosas. Posteriormente, se separó el periostio de las láminas vertebrales y se

extirparon dos apófisis espinosas (T8 y T9) Con este campo de trabajo, se extrajo la lámina vertebral en los dos niveles T8 y T9, obteniendo una visualización amplia de la porción dorsal de la médula espinal

Este procedimiento se conoce como laminectomía (que es la exposición de la médula espinal). En esta técnica, se debe tener cuidado de que las meninges permanezcan intactas, de lo contrario se estaría lesionando a la médula.

Una vez concluida la laminectomía, los animales programados para lesión, se colocaron en un equipo de estereotaxia. La contusión de la médula espinal se realizó con la técnica de Allen 1911, modificada para ratas (García et al, 1995). Se dejó caer un cilindro de acero inoxidable (con peso de 15 g, con una punta roma de 1.7 mm de diámetro y 1 cm de largo) a una altura de 9 cm a través de un tubo guía sobre la médula espinal. La intensidad de lesión fue de 135 g/cm. Se confirmó el sitio del impacto a través de un microscopio quirúrgico mediante la observación de un hematoma central a nivel de la zona de contusión. Finalmente la incisión quirúrgica se suturó en dos planos: la fascia muscular y la piel con puntos simples.

MÉTODO EXPERIMENTAL DE CONTUSIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL



ESQUEMA 9. Método experimental de contusión de la médula espinal **A.** Vista lateral plano sagital en la ratona **B.** Vista dorsal plano sagital en la ratona. Además se representa, el campo de trabajo en las vértebras torácicas (T9, T8 y T7) **C.** Una vez realizada la laminectomía, se coloca y alinea el tubo guía, donde se deja caer el cilindro. La lesión primaria, es provocada directamente por el impacto que sufre la médula espinal. **D.** Los efectos de la lesión primaria se distribuyen con base en un gradiente, que va desde la superficie de la ME hasta el interior de la misma. La segunda onda de choque, la lesión secundaria, se acompaña de múltiples eventos autodestructivos que siguen a la lesión primaria y conducen a un grado de necrosis máxima (Feringa, 1988).

5.3.6 CUIDADOS POST-OPERATORIOS

Posteriormente, cada rata se coloca en una jaula individual, con aserrín estéril y se alimenta *ad libitum*. Permanecen en la unidad de cuidados intensivos, bajo observación, a temperatura y humedad controlada 23°C y 80% respectivamente, durante 24 hrs. Pasado el choque medular y el efecto de la anestesia se les administra 100 µl de penicilina de 600 unidades por vía intravenosa para evitar cualquier infección y se les traslada al bioterio donde permanecen 35 días hasta llegar al estadio crónico. El intestino y la vejiga se vacían con presión manual dos veces por día mientras se recupera el automatismo. La observación y cuidados post-operatorios son fundamentales en la supervivencia del animal.

5.3.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron todas las ratas lesionadas que al ser sometidas a contusión medular se corroborará la presencia de un hematoma en la zona central de la ME y que además, al recuperarse de la anestesia, presentaran parálisis flácida y completa por debajo del nivel de lesión (T8).

De los grupos control (ratas únicamente con laminectomía), se incluyeron todas las ratas que presentaron una marcha normal al recuperarse de la anestesia.

5.3.8 SOLUCIÓN FISIOLÓGICA CON DICLOFENAC SÓDICO PARA SU ADMINISTRACIÓN POR VÍA I.M.

Un día antes de iniciar el estudio en una balanza analítica bajo las mismas condiciones, se pesaron 10 estándares de diclofenac sódico entre 0.2 y 0.3 gr. Se etiquetaron en diferentes viales de 5ml. El día del estudio se tomaron los estándares necesarios, se disolvieron en 2 ml de solución fisiológica cada uno y según el peso de cada rata, se administró el volumen requerido para una dosis de 10 mg/kg de peso.

5.3.9 TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

El animal se colocó en posición de decúbito dorsal y se realizó la canulación de la arteria caudal, aproximadamente a 3 cm de la base de la cola con un catéter de polietileno PE-10 directo a la arteria; al extremo libre se le colocó un catéter PE-50 con el fin de facilitar la toma de muestras sanguíneas. El sistema se mantuvo heparinizado en el lapso entre la toma de

muestras, que fueron a los 0,5,10,15,20, 30 y 45 minutos y a las 1, 1.5, 2, 4, 6 y 8 horas. Cada muestra fue de 100µl de sangre. Las muestras se mantuvieron en congelación a (-17°C) hasta su análisis

VI. RESULTADOS

6.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENAC SÓDICO EN SANGRE DE RATA

6.1.1 SELECTIVIDAD

El método analítico fue selectivo, no se observaron interferencias en la región cromatográfica del diclofenac sódico y del estándar interno como se observa en la FIGURA 1.

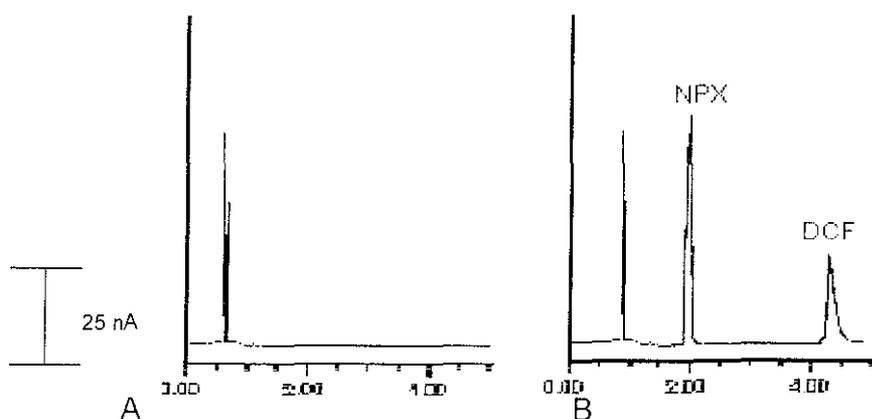


FIGURA 1. Cromatogramas representativos. Estos cromatogramas son una ampliación de los cromatogramas originales procesados por el software MILLENIUM v 3.15. La escala para ambos cromatogramas corresponde a 25 nA. A) blanco de sangre, B) muestra de sangre con diclofenac (2 $\mu\text{g/ml}$) + estándar interno (5 $\mu\text{g/ml}$). Los tiempos de retención fueron: Naproxen (NPX), T R: 1.9 min, Diclofenac (DCF) T R: 4.5 min.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6 1 2. LINEALIDAD SISTEMA

Al evaluar la linealidad del sistema, se obtuvo una buena correlación entre la concentración del diclofenac sódico y la señal del detector electroquímico. La ecuación de la curva promedio correspondiente a tres determinaciones fue: $Y = -0.0554 + 0.2081 X$. (FIGURA 2) El coeficiente de correlación y de determinación fue de $r = 0.999$ y $r^2 = 0.999$ respectivamente. Se obtuvo un coeficiente de variación $C.V < 15 \%$ para cada punto de la curva de calibración. TABLA 2

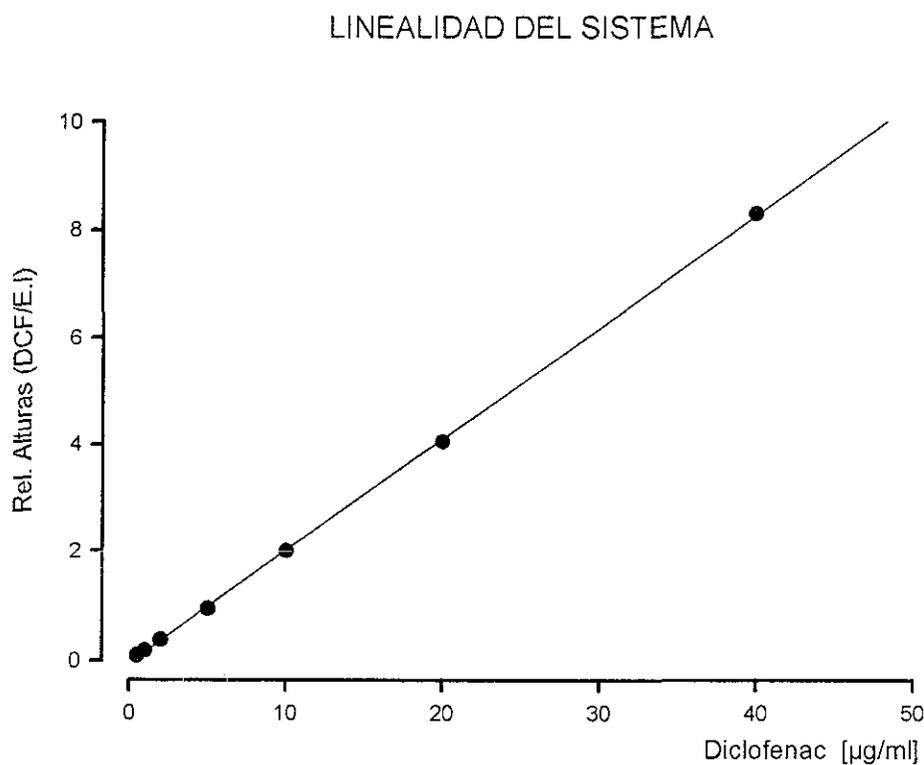


FIGURA 2 Linealidad del sistema para la cuantificación de diclofenac en una solución agua desionizada- acetonitrilo (80:20)

TABLA 2 Linealidad del sistema para la cuantificación de diclofenac en una solución agua desionizada- acetonitrilo (80:20)

	CONC. µg/ml	Curva 1 Alturas (DCF/E.I.)	Curva 2 Alturas (DCF/E.I.)	Curva 2 Alturas (DCF/E.I.)	PROM.	D.E.	%CV
C ₁	0.5	0.0925	0.0921	0.0923	0.0923	0.0001	0.2167
C ₂	1	0.1855	0.1849	0.1852	0.1852	0.0002	0.1620
C ₃	2	0.3767	0.3758	0.3712	0.3746	0.0017	0.7876
C ₄	5	0.9386	0.9346	0.9352	0.9361	0.0012	0.2304
C ₅	10	1.9984	2.002	1.9996	2.0000	0.0011	0.0917
C ₆	20	4.0678	4.0972	4.0012	4.0554	0.0284	1.2133
C ₇	40	8.2678	8.2948	8.3518	8.3048	0.0248	0.5164

	C1	C2	C3	PROM
m	0.2073	0.2082	0.2088	0.2081
b	-0.0495	-0.0514	-0.0653	-0.0554
r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999
r ²	0.9999	0.9999	0.9996	0.9998

6.1.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

El método analítico fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 40 µg/ml. La ecuación de la recta promedio correspondiente a seis determinaciones fue de: $y = .0093 + .168 X$ (FIGURA 3). El coeficiente de correlación y de determinación fue de $r = 0.999$ y $r^2 = 0.999$ respectivamente. El coeficiente de variación **C.V** fue menor al 6 % para cada punto de la curva.

En la tabla 3 se muestra la relación de alturas (DCF/E I) correspondiente a las 6 curvas de calibración.

TABLA 3 Linealidad del método para la cuantificación de diclofenac sódico en sangre de rata

CURVAS										
	CONC. µg/ml	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	PROM.	D.E.	C.V
C ₁	0.5	0.077	0.087	0.080	0.080	0.076	0.076	0.079	0.002	5.1
C ₂	1	0.155	0.175	0.165	0.168	0.165	0.156	0.164	0.003	4.6
C ₃	2	0.322	0.352	0.328	0.349	0.354	0.333	0.340	0.006	4.1
C ₄	5	0.853	0.910	0.852	0.879	0.826	0.825	0.858	0.013	3.8
C ₅	10	1.639	1.732	1.686	1.669	1.777	1.644	1.691	0.022	3.2
C ₆	20	3.154	3.466	3.439	3.521	3.457	3.337	3.396	0.054	3.9
C ₇	40	6.456	6.764	6.675	6.803	6.787	6.676	6.694	0.053	1.9

PROM							
m	0.1607	0.1692	0.1676	0.1708	0.1702	0.1671	0.1676
b	0.0056	0.0297	0.0099	0.0088	0.0119	-0.0103	0.0093
r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999	1.0000	0.9999
r ²	0.9998	0.9998	0.9998	0.9996	0.9998	1.0000	0.9998

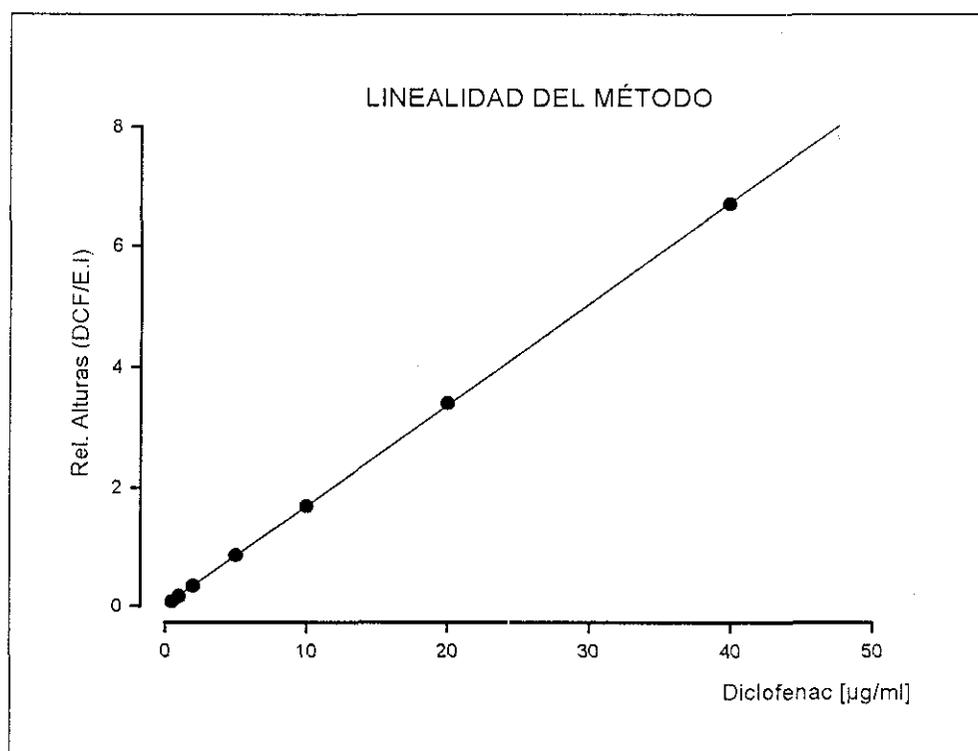


FIGURA 3 Linealidad del método para la cuantificación de diclofenac en sangre de rata

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.1.4. EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

El método analítico fue preciso y reproducible. Los coeficientes de variación para la precisión intradía (repetibilidad intradía) estuvieron dentro del rango de 4.5% a 5.4% y para la precisión interdía (repetibilidad interdía) de 3.3% a 7.5%. De esta manera se cumple con el criterio de aceptación para la precisión del método, ya que los coeficientes de variación obtenidos tanto para repetibilidad intra día como la repetibilidad interdía se encuentran por debajo del 15%. Tabla 4A,B. La media del porcentaje de recuperación fue de 103.5 Tabla 5A,B. Exactitud. Para los puntos control, las tablas de precisión y exactitud son: 6 A,B y 7 A,B correspondientemente.

TABLA 4,A PRECISION INTRADIA

DIA 1

CONC. [µg/ml]	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROM	D.E	CV %
0.5	0.0876	0.0803	0.0795	0.0825	0.0045	5.4126
1	0.1803	0.1806	0.171	0.1773	0.0055	3.0784
2	0.3712	0.3656	0.3445	0.3604	0.0141	3.9064
5	0.9957	1.0253	0.9751	0.9987	0.0252	2.5267
10	2.0684	2.0252	1.8846	1.9927	0.0961	4.8228
20	4.232	4.1983	3.7545	4.0616	0.2665	6.5612
40	8.5600	8.6642	7.9655	8.3966	0.3769	4.4891

TABLA 4,B PRECISION INTERDIA

DIA 1 DIA 2 R = REPLICAS

CONC [µg/ml]	R1	R2	R3	R4	R5	R6	PROM	D E	CV
0.5	0.0876	0.0803	0.0725	0.0856	0.0868	0.0769	0.0816	0.0061	7.4655
1	0.1803	0.1806	0.16681	0.1776	0.1814	0.1766	0.1772	0.0054	3.0625
2	0.3712	0.3656	0.3445	0.3642	0.3712	0.3724	0.3649	0.0105	2.8818
5	0.9957	1.0053	0.9751	1.032	1.0278	1.0359	1.0120	0.0241	2.3770
10	2.0684	2.0052	1.7846	2.0322	2.0603	2.0524	2.0005	0.1082	5.4078
20	4.232	4.1983	3.6545	4.2369	4.1953	4.1568	4.1123	0.2261	5.4991
40	8.5600	8.6642	7.9655	8.7549	8.4569	8.3956	8.4662	0.2783	3.2866

TABLA 5,A

EXACTITUD INTRADIA

DIA 1 % DE RECOBRO ABSOLUTO

CONC. [µg/ml]	% DE REC. CURVA 1	% DE REC. CURVA 2	% DE REC. CURVA 3	PROMEDIO
0.5	89.12	86.45	88.754	88.11
1	91.456	95.13	97.8300	94.81
2	99.457	97.942	98.93	98.78
5	100.12	99.956	98.26	99.45
10	97.565	98.912	101.2500	99.24
20	98.2560	100.125	102.23	100.20
40	99.568	101.236	100.125	100.31

TABLA 5,B

EXACTITUD INTERDIA

DIA 1 DIA 2 C= CURVA

CONC. [µg/ml]	% DE REC. C1	% DE REC. C2	% DE REC. C3	% DE REC. C4	% DE REC. C5	% DE REC. C6	PROM
0.5	89.12	86.45	88.754	90.125	87.13	88.231	88.30
1	91.456	95.13	97.8300	96.2350	95.24	95.23	95.19
2	99.457	97.942	98.93	97.023	98.24	96.23	97.97
5	100.12	99.956	98.26	93.024	99.46	99.235	98.34
10	97.565	98.912	101.2500	98.2650	97.53	98.125	98.61
20	98.256	100.12	102.23	97.256	99.57	99.235	99.45
40	99.568	101.23	100.125	98.2365	103.51	100.235	100.49

TABLA 6,A

PRECISION INTRADIA

CONCENTRACIONES OBTENIDAS R= REPLICAS

CONC. REAL [µg/ml]	R1	R2	R3	R4	R5	R6	PROM	D.E	CV %
0.6	0.647	0.56	0.626	0.561	0.656	0.630	0.613	0.042	6.908
6	6.539	5.798	6.544	5.851	6.375	6.264	6.229	0.331	5.308
30	30.39	29.73	30.77	29.36	31.58	30.77	30.43	0.799	2.625

TABLA 6,B

PRECISION INTERDIA

DIA 1 DIA 2
CONCENTRACIONES OBTENIDAS R= REPLICAS

CONC. REAL [µg/ml]	1	2	3	4	5	6	PROM	D.E	CV %
0.6	0.647	0.560	0.660	0.575	0.676	0.662	0.630	0.049	7.856
6	6.539	5.798	6.744	5.901	6.675	6.424	6.347	0.402	6.335
30	30.39	29.73	30.97	28.87	32.48	32.17	30.77	1.397	4.542

TABLA 7,A EXACTITUD INTRADIA

CONC. Teórica [µg/ml]	REPLICAS						% DE RECOBRO		
	1	2	3	4	5	6	PROM	D.E	CV %
0.6	107.8	93.33	104.3	93.50	109.3	105.0	102.2	7.061	6.908
6	109.0	96.63	109.1	97.52	106.3	104.4	103.8	5.510	5.308
30	101.3	99.10	102.6	97.87	105.3	102.6	101.4	2.663	2.625

TABLA 7,B EXACTITUD INTERDIA

CONC. Teórica [µg/ml]	REPLICAS						% DE RECOBRO		
	1	2	3	4	5	6	PROM	D.E	CV %
0.6	107.8	93.33	110.0	95.85	112.7	110.4	105.0	8.249	7.856
6	109.0	96.63	112.4	98.35	111.3	107.1	105.8	6.701	6.335
30	101.3	99.10	103.2	96.23	108.3	107.2	102.6	4.658	4.542

Los coeficientes de variación para la precisión intradía de los puntos control, estuvieron dentro del rango de 2.6% a 7% y para la precisión interdía de 4.5% a 7.8%. De esta manera se cumplió con el criterio de aceptación para la precisión del método.

Los coeficientes de variación tanto para la exactitud intradía como la exactitud interdía, de los puntos control cumplieron con el criterio de aceptación.

6.1.5 LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación (LDC) del método analítico, se fijó como la concentración más baja de la curva de calibración [0.5 µg/ml], dado que cumplía con los criterios de precisión y exactitud Tabla 8

El coeficiente de variación de las muestras adicionadas con la concentración mínima cuantificable 0.5 µg/ml fue de 5.95 %.

El límite de detección (LDD), se estableció en [0.1µg/ml] al comparar visualmente la señal del ruido, con la respuesta del analito. En la Figura 4, se representan los cromatogramas correspondientes al LDC y LDD

TABLA 8. Límites de cuantificación y de detección del diclofenaco sódico en sangre de rata.

	DICLOFENACO SÓDICO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0.5 µg/ml
LÍMITE DE DETECCIÓN	0.1 µg/ml

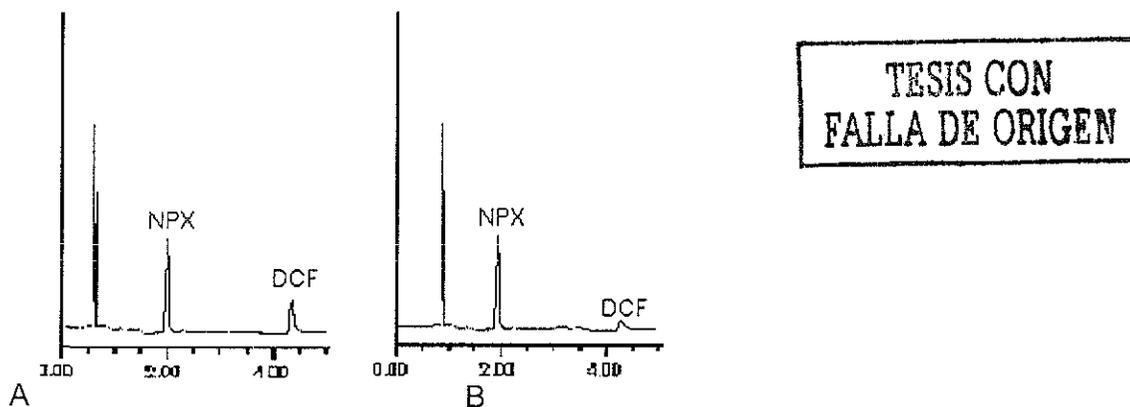


FIGURA 4 A) Concentración mínima cuantificable 0.5µg/ml.
B) Concentración mínima detectable 0.1µg/ml

6.1.6 ESTABILIDAD

La estabilidad del diclofenac se realizó durante un mes, periodo en que se realizó el estudio. Los porcentajes de recobro se mantienen cercanos al valor medio que se obtuvo en precisión, por lo que se consideró que las muestras fueron estables en los días 7, 14 y 28 en que se realizaron las pruebas, mantenidas en congelación a -17 °C. Tabla 9

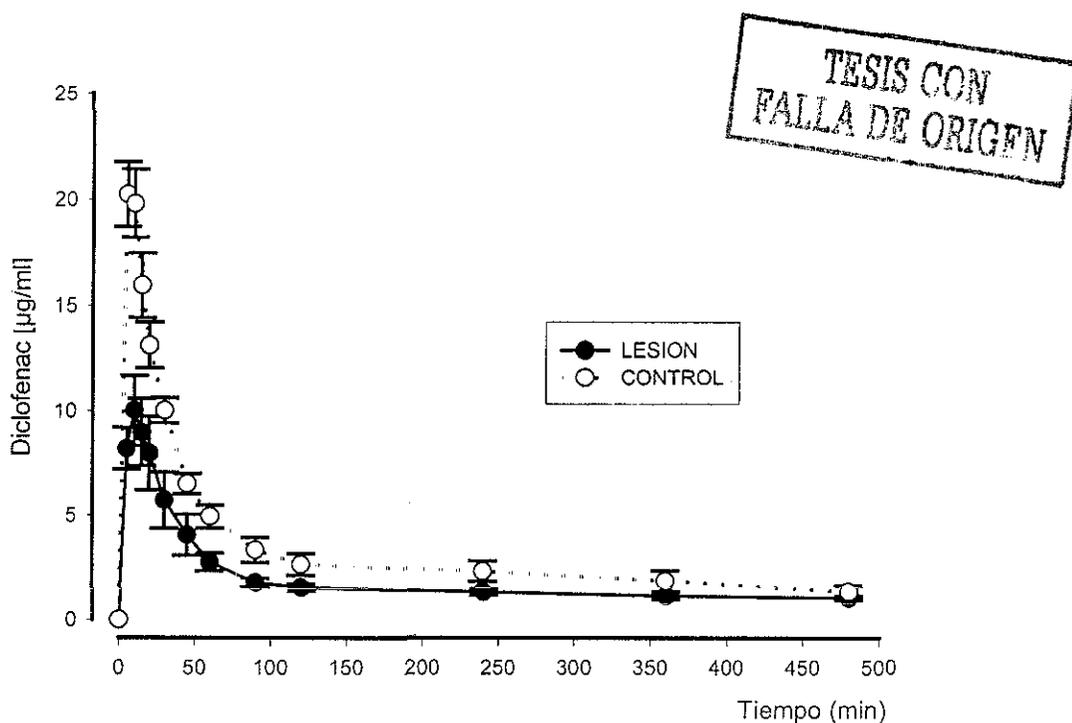
TABLA 9. Estabilidad de los puntos control*.

TIEMPO DE ANÁLISIS	PROMEDIO 3 REPLICAS	PROMEDIO 3 REPLICAS	PROMEDIO 3 REPLICAS
	PC1 [.6 µg/ml]	PC2 [6 µg/ml]	PC3 [30µg/ml]
Día 0	0.6256	5.9440	30.1540
Día 7	0.5896	5.9514	29.8690
Día 14	0.6160	5.8750	30.1570
Día 28	0.5963	5.8140	30.1285
PROMEDIO	0.6069	5.8961	30.0771
C.V	2.7663	1.0965	0.4633

* Cada punto, representa la media de 3 experimentos

6.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

En la siguiente gráfica se presentan las concentraciones sanguíneas del diclofenac en ratas lesionadas, con administración i.m en el muslo de la pata trasera.

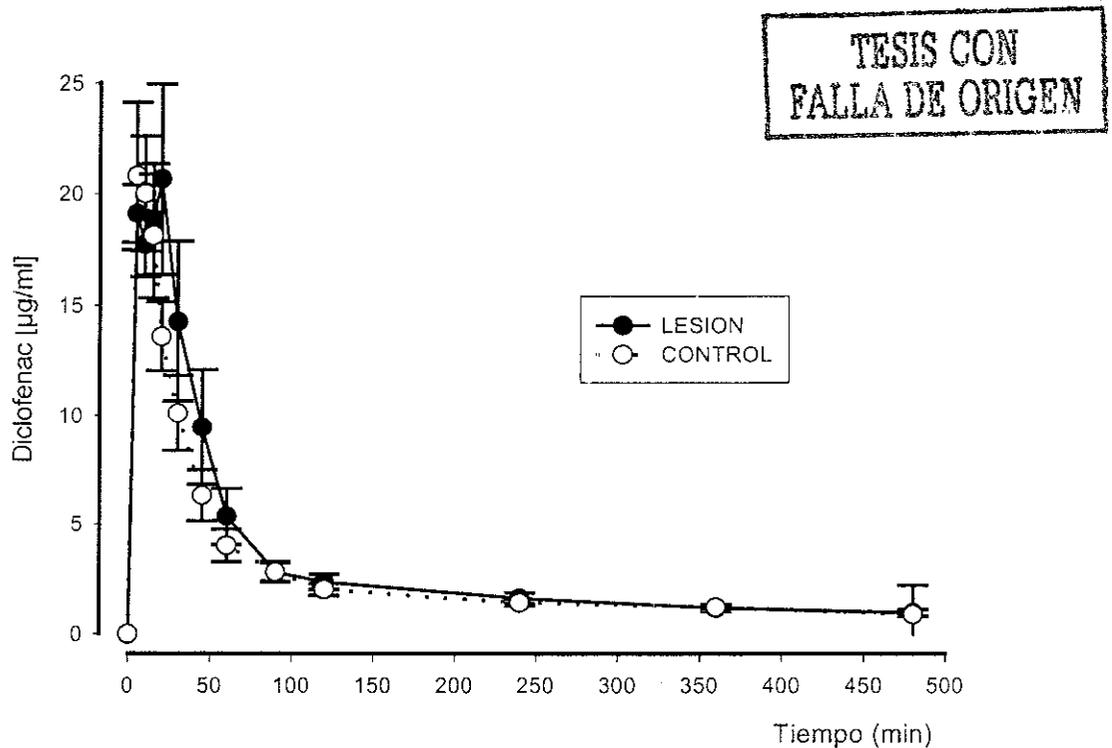


GRAFICA 1. Concentraciones sanguíneas de diclofenac, en ratas lesionadas y su grupo control. Después de 35 días de producida la lesión con una administración i.m de diclofenac 10 mg/kg, en el muslo de la pata trasera (abajo del nivel de lesión). Cada valor, representa la media \pm el error estándar de 7 controles y 7 lesionados

En esta gráfica, se puede observar que las ratas lesionadas absorben la mitad del diclofenac, con respecto al grupo control. No hay diferencia en el valor de T_{max} , entre las ratas parapléjicas y las ratas control.

NOTA: EN EL APÉNDICE 1 SE PRESENTAN LOS DATOS EXPERIMENTALES

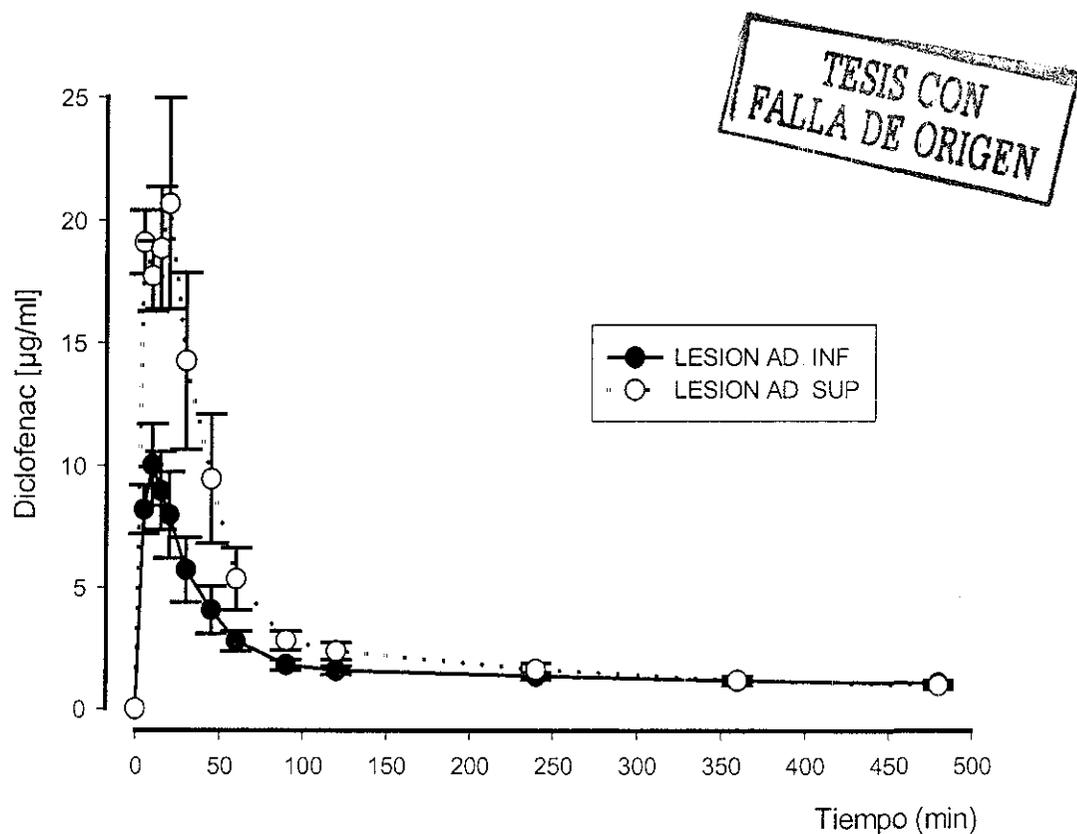
Las concentraciones sanguíneas del diclofenac en ratas lesionadas, con administración i.m en el bíceps, se presentan en la gráfica 2



GRAFICA 2. Concentraciones sanguíneas de diclofenac, en ratas lesionadas y su grupo control. Después de 35 días de producida la lesión con una administración i.m de diclofenac 10 mg/kg, en el bíceps, (superior al nivel de lesión) Cada valor, representa la media \pm el error estándar de 6 controles y 6 lesionados

En la gráfica 2 se observa, que tanto las ratas lesionadas como las del grupo control, presentan un perfil cinético similar, en los procesos de absorción, distribución y eliminación.

En la gráfica 3 se comparan los perfiles cinéticos de las ratas lesionadas en los dos niveles de administración.



GRAFICA 3. Concentraciones sanguíneas de diclofenac, en ratas lesionadas Después de 35 días de producida la lesión con una dosis única de diclofenac 10 mg/kg. (λ) administración i m inferior al nivel de lesión y (μ) administración i m, superior al nivel de lesión

En esta gráfica se observa, que la biodisponibilidad del diclofenac es menor en las ratas lesionadas, cuando la dosis se aplica en el muslo de la pata trasera Esta diferencia es similar a la encontrada en la primera cinética (gráfica 1), en donde las ratas lesionadas con administración inferior, absorben una proporción menor a la absorbida por el control.

6 2 1. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

En este estudio, se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: ABC, C_{max} y T_{máx}. Se decidió no reportar el tiempo de vida media, dado que el muestreo no fue el adecuado para obtener una buena estimación de este parámetro, como el reportado en la literatura por (Torres-López et al., 1997). Donde se obtiene un valor de t_{1/2} de 13.4 hr, para el diclofenac, con una administración oral de 10 mg/kg de peso en rata, con un tiempo de muestreo de 12 hr.

En las siguientes tablas (10 -12) se presentan los valores promedio ± error estándar (E.E.) de los parámetros farmacocinéticos: ABC, C_{max} y T_{max}. Clasificados en cuatro grupos: ratas lesionadas y grupo control, con administración inferior o superior.

TABLA 10. Valores promedio ± E.E. del ABC, después de la administración i.m. de diclofenac 10 mg/kg. El ABC se calculó por el método de los trapecios (tomando la última concentración)

ABC	GRUPO	
	LESIÓN	CONTROL
ADMINISTRACIÓN INFERIOR	919 ± 99 (n=7)	1594 ± 192 (n=7)
SUPERIOR	1520 ± 229 (n=6)	1307 ± 153 (n=6)

TABLA 11. Valores promedio ± E.E. de C_{max}, después de la administración i.m. de diclofenac 10 mg/kg. El parámetro C_{max} se calculó directamente de la gráfica.

C _{max}	GRUPO	
	LESIÓN	CONTROL
ADMINISTRACIÓN INFERIOR	10.82 ± 1.41 (n=7)	22.31 ± 1.39 (n=7)
SUPERIOR	24.25 ± 3.37 (n=6)	22.21 ± 2.85 (n=6)

TABLA 12. Valores promedio \pm E E de Tmax, después de la administración i m de diclofenac 10 mg/kg El parámetro Tmax se calculo directamente de la gráfica

Tmax		GRUPO	
ADMINISTRACIÓN	LESIÓN	CONTROL	
INFERIOR	10 7 \pm 2 02 (n=7)	7 9 \pm 1 49 (n=7)	
SUPERIOR	12 5 \pm 2 81 (n=6)	7 5 \pm 1 71 (n=6)	

6 2 2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las tablas (13 -16) se presenta el análisis de varianza factorial 2 x 2, para los parámetros farmacocinéticos: ABC y Cmax En las gráficas 4 y 5, se representa la interacción del valor promedio de cada parámetro Cuando las líneas de estas medias se cruzan se señala una interacción Posteriormente, como resultado de la interacción se presenta la prueba de Tukey para comparaciones múltiples

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA ABC

Intervalo de confianza para la media. 95%

Grupos	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Control Sup.	6	1306.67	374.08	152.72	914.10	1699.24
Control Inf.	7	1593.57	509.15	192.44	1122.68	2064.46
Lesión Sup.	6	1520.00	561.61	229.28	930.63	2109.37
Lesión Inf.	7	919.29	262.02	99.04	676.95	1161.62
TOTAL	26	1328.85	495.22	97.12	1128.82	1528.87

Grupos	Valor Mínimo	Valor Máximo
Control Sup.	737	1599
Control Inf.	1107	2646
Lesión Sup.	854	2542
Lesión Inf.	668	1407
TOTAL	668	2646

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS PARA EL ABC

Estadística de prueba	gl 1	gl 2	Significancia observada
.483	3	22	.698

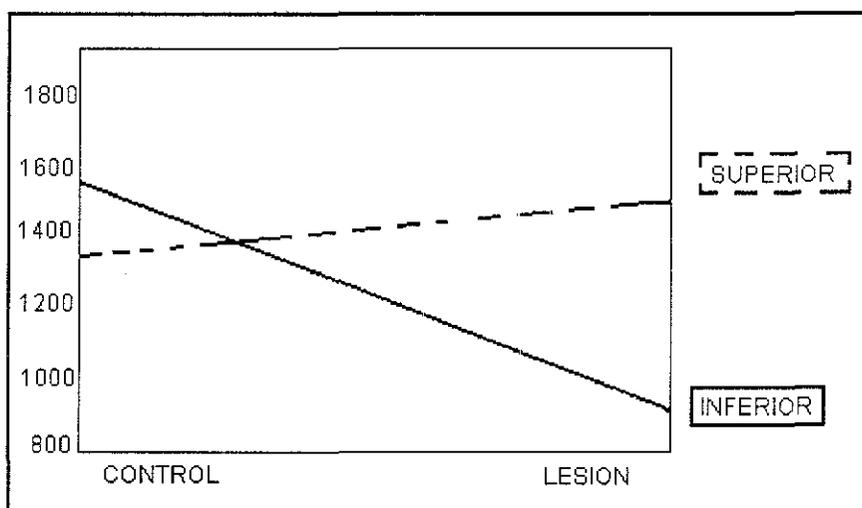
Conclusión: No se rechaza la hipótesis H_0 Las varianzas de los grupos son iguales

ANÁLISIS DE VARIANZA FACTORIAL 2 x 2 ABC

TABLA 13. Análisis de varianza factorial 2 x 2. Para el parámetro ABC

Grupos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado de la media	F	Significancia
Corrección de Modelo	1886924.908	3	628974.969	3.260	.041
Intercepto	46055446.520	1	46055446.520	238.740	.000
LESION	343232.234	1	343232.234	1.779	.196
ADMINIS.	159077.289	1	159077.289	.825	.374
LESION* ADMINIS.	1272709.158	1	1272709.158	6.597	.018
Error	4244038.476	22	192910.840		
Total	52042598.000	26			
Corrección Total	6130963.385	25			

Conclusión: Hay interacción entre las medias de los grupos



GRAFICA 4. Interacción de medias, para el parámetro ABC

En la gráfica 4 se puede observar, la diferencia en el valor promedio de ABC, con respecto al control inferior y lesión inferior. La interacción entre las líneas representa una interacción en ambos tratamientos y niveles de administración

COMPARACIONES MÚLTIPLES PRUEBA DE TUKEY ABC

TABLA 14. Comparaciones múltiples, prueba de Tukey Intervalo de confianza para la media. 95%

(I) TRAT	(J) TRAT	Diferencia de Medias (I-J)	Error Estándar	Sig.	Límite Inferior	Límite Superior
Control Sup.	Control Inf.	-286.90	244.36	.649	-965.45	391.64
	Lesión Sup.	-213.33	253.58	.834	-917.50	490.83
	Lesión Inf.	387.38	244.36	.407	-291.17	1065.93
Control Inf.	Control Sup.	286.90	244.36	.649	-391.64	965.45
	Lesión Sup.	73.57	244.36	.990	-604.98	752.12
	Lesión Inf.	674.29*	234.77	.041	22.36	1326.21
Lesión Sup.	Control Sup.	213.33	253.58	.834	-490.83	917.50
	Control Inf.	-73.57	244.36	.990	-752.12	604.98
	Lesión Inf.	600.71	244.36	.095	-77.83	1279.26
Lesión Inf.	Control Sup.	-387.38	244.36	.407	-1065.93	291.17
	Control Inf.	-674.29*	234.77	.041	-1326.21	-22.36
	Lesión Sup.	-600.71	244.36	.095	-1279.26	77.83

*La diferencia entre las medias tiene un nivel de significancia de .05

Conclusión: El promedio de ABC es diferente en los grupos: control inferior y lesión inferior

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA CMAX

Intervalo de confianza
para la media. 95%

Grupos	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Control Sup	6	22.33	7.09	2.89	14.89	29.77
Control Inf	7	22.29	3.73	1.41	18.84	25.73
Lesión Sup	6	21.67	10.48	4.28	10.67	32.67
Lesión Inf	7	11.00	3.79	1.43	7.50	14.50
TOTAL	26	19.12	8.01	1.57	15.88	22.35

Grupos	Valor Mínimo	Valor Máximo
Control Sup.	14	33
Control Inf.	19	29
Lesión Sup.	8	40
Lesión Inf.	6	16
TOTAL	6	40

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS CMAX

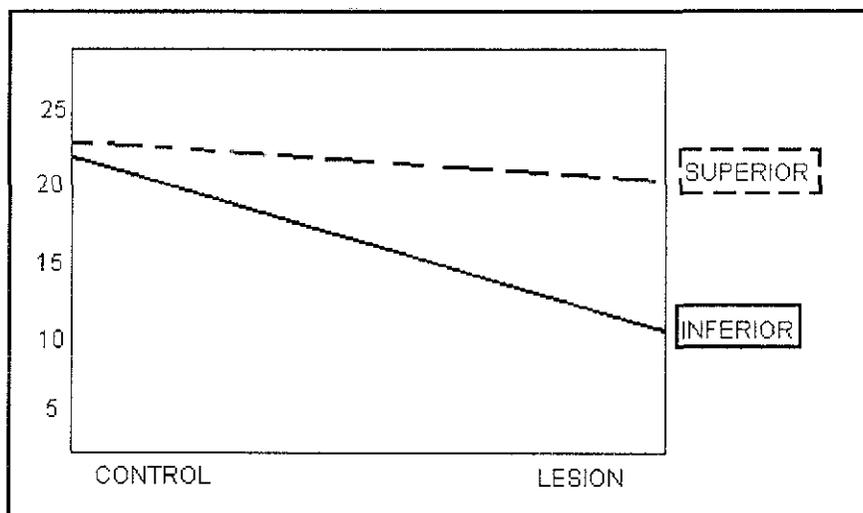
Estadística de prueba	gl 1	gl 2	Significancia
1.118	3	22	.363

Conclusión: No se rechaza la hipótesis H_0 . Las varianzas de los grupos son iguales

TABLA 15. Análisis de varianza factorial 2 x 2. Para el parámetro CMAX

Grupos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado de la media	F	Significancia
Corrección de Modelo	632.559	3	210.853	4.782	.010
Intercepto	9648.824	1	9648.824	218.818	.000
LESION	230.773	1	230.773	5.234	.032
ADMINIS.	185.440	1	185.440	4.205	.052
LESION* ADMINIS.	182.158	1	182.158	4.131	.054
Error	970.095	22	44.095		
Total	11103.000	26			
Corrección Total	1602.654	25			

Conclusión: Hay interacción entre las medias de los grupos



GRAFICA 5. Interacción de medias, para el parámetro CMAX

En la gráfica 5 se puede observar, la diferencia en el valor promedio de ABC, con respecto al control inferior y lesión inferior. Para el caso de la administración superior, en ambos grupos lesionados y controles hay un ligero decremento en el valor medio.

COMPARACIONES MÚLTIPLES PRUEBA DE TUKEY CMAX

TABLA 16. Comparaciones múltiples, prueba de Tukey.

		Intervalo de confianza para la media. 95%				
(I) TRAT	(J) TRAT	Diferencia de Medias (I-J)	Error Estándar	Sig.	Límite Inferior	Límite Superior
Control Sup	Control Inf.	4.76E-02	3.69	1.000	-10.21	10.31
	Lesión Sup	.67	3.83	.998	-9.98	11.31
	Lesión Inf.	11.33*	3.69	.027	1.07	21.59
Control Inf	Control Sup	-4.76E-02	3.69	1.000	-10.31	10.21
	Lesión Sup	.62	3.69	.998	-9.64	10.88
	Lesión Inf.	11.29*	3.55	.021	1.43	21.14
Lesión Sup	Control Sup	-.67	3.83	.998	-11.31	9.98
	Control Inf.	-.62	3.69	.998	-10.88	9.64
	Lesión Inf.	10.67*	3.69	.040	.41	20.93
Lesión Inf.	Control Sup.	-11.33*	3.69	.027	-21.59	-1.07
	Control Inf.	-11.29*	3.55	.021	-21.14	-1.43
	Lesión Sup.	-10.67*	3.69	.040	-20.93	-.41

* La diferencia entre las medias tiene un nivel de significancia de .05

Conclusión: La media del grupo lesión inferior difiere de manera significativa con las medias de los otros grupos

En la TABLA 17 se presenta el análisis de varianza de un factor completamente al azar por rangos o prueba H de KRUSKAL-WALLIS Para el parámetro Tmax

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR COMPLETAMENTE AL AZAR
 POR RANGOS O PRUEBA H DE KRUSKAL-WALLIS

TMAX

TABLA 17. Estadística de prueba KRUSKAL-WALLIS. Para el parámetro Tmax

VARIABLE 1	Variable 2	N	Media de rangos
	1	6	10.0
2	7	10.71	
3	6	19.50	
4	7	14.14	
TOTAL	26		

ji cuadrada	6.604
gl	3
Significancia	.086

H₀: No existe diferencia significativa del valor de Tmax entre los cuatro grupos

H_a: Existe diferencia entre los cuatro grupos

Conclusión: No se rechaza H₀. No existe diferencia significativa del valor de Tmax entre los cuatro grupos

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Se validó un método para cuantificar diclofenac sódico en micromuestras de sangre de rata por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica. Este método presenta principalmente la ventaja de emplear un volumen pequeño de muestra (100 µl de sangre), lo que facilita obtener cursos temporales de la cinética del fármaco en un mismo animal. Al extraer un volumen reducido de sangre (menor a 1 ml), no se corre el riesgo de provocar cambios hemodinámicos que puedan afectar la determinación de los parámetros farmacocinéticos. De igual forma, al requerir una pequeña muestra de sangre, el método puede también ser utilizado para estudios pediátricos en humanos o bien en medicina legal.

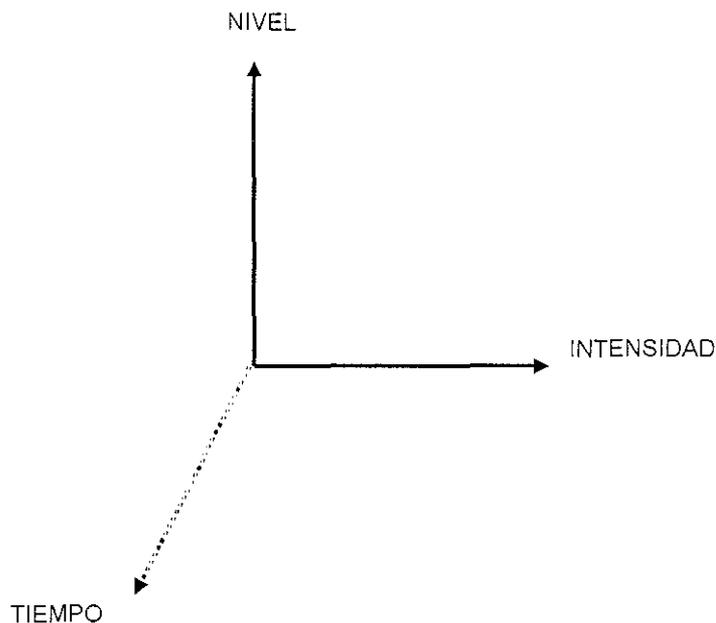
7.2 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

Las consecuencias sociales y económicas que presenta la lesión medular, como trastorno clínico, afectan tanto al paciente, como a las instituciones de salud, ya que en la terapia y rehabilitación de esta población, se requiere además de equipo e infraestructura avanzada, personal capacitado que interviene desde el momento del accidente hasta que el individuo se rehabilita (Stover y Fine, 1987).

En el tratamiento farmacológico de la lesión, se han presentado cambios en la biodisponibilidad de algunos fármacos, este aspecto se vuelve fundamental, dado que ha estos pacientes, se les dosifican múltiples fármacos, para controlar las patologías que cursan con el trauma medular.

Los estudios farmacocinéticos que se desarrollan en modelos experimentales de lesión medular tienen como objetivo principal comprender y evaluar las alteraciones que se presentan en la biodisponibilidad de algunos fármacos. Estos modelos, están comprendidos en el contexto de tres variables fundamentales que definen y delimitan un tipo de lesión (Das, 1989).

ESQUEMA 10



ESQUEMA 10. Variables experimentales, en modelos de lesión medular

Estas tres variables representan:

NIVEL O LOCALIZACIÓN El nivel o localización al que se produce la lesión puede abarcar desde las primeras vértebras cervicales, hasta las vértebras sacras. De este parámetro dependen las funciones del SNA que serán interrumpidas (Esquema 1, página 7).

INTENSIDAD. Esta variable está referida a la intensidad con que se produce la contusión medular. Y depende directamente: de la masa del cilindro y la altura de donde se deja caer.

TIEMPO. Esta última variable, define la evolución cronológica a la cuál se evalúa la lesión. La fase aguda representa la etapa más crítica, ya que en ella se definen los factores más importantes para el pronóstico de supervivencia y funcionalidad en la vida de los pacientes. En los modelos experimentales comprende las primeras 24 h después de la lesión. En la fase

crónica, se concentran los pacientes con lesión medular, que una vez superada la fase aguda requieren de una adecuada terapia farmacológica y de rehabilitación (Kliesch et al, 1987). En los modelos experimentales comprende de 25 a 30 días, posteriores a la lesión, tiempo en que el animal alcanza una recuperación estable y se adapta a sus nuevas condiciones (Guízar-Sahagún, 1998; Kruse et al ,1994)

En el análisis de varianza, para el parámetro de biodisponibilidad ABC (Tabla 10), se obtuvo una diferencia significativa en la interacción lesión x administración, con un valor de significancia de 0.18. La gráfica 4 representa la interacción en el valor promedio de este parámetro, para los grupos lesión y control, con los niveles de administración superior e inferior. De esta manera, en la prueba de Tukey de comparaciones múltiples (Tabla 11), se demostró que las ratas lesionadas con administración inferior presentaban un área bajo la curva significativamente menor, a la presentada por el grupo control con administración inferior. Esto evidencia que en la fase crónica de la lesión medular, las ratas lesionadas alcanzan una menor absorción, cuando el fármaco se les administra en un músculo inferior al nivel de lesión. En este sentido si se administra en un músculo sano, que no queda inmovilizado, se alcanza una mejor absorción.

Por otra parte, el efecto de la lesión medular en la absorción intramuscular de fármacos, también fue significativo en el parámetro C_{max}. El análisis de varianza de este parámetro indicó una diferencia significativa con un valor de .032 para el efecto de la lesión, es decir que las ratas lesionadas alcanzaron un valor de C_{max} menor al del grupo control. En el nivel de administración y la interacción lesión-administración se alcanzó un valor de significancia cercano a la región de rechazo, por lo cuál no quedó muy claro el efecto entre estos dos factores. En la gráfica 5 de interacción de medias, no se presenta una interacción entre los grupos lesión y control con ambos niveles de administración. En este sentido en la prueba de Tukey para C_{max}, se encontró diferencia significativa entre la media de la lesión con administración inferior, y la media de los otros tres grupos.

Con estos datos se puede concluir que la lesión medular afecta directamente en la absorción i_m de fármacos, sobre todo cuando se administra en los músculos inferiores al nivel de lesión, que sufren pérdida de la estimulación nerviosa y atrofia muscular. Si se administra el fármaco en un músculo sano superior al nivel de lesión, se alcanza una mejor absorción.

En la figura 5, se representa el resultado de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples de los parámetros ABC y Cmax. Cada barra representa los valores promedio \pm E E. Después de 35 días de producida la lesión con una dosis única de diclofenac 10 mg/kg

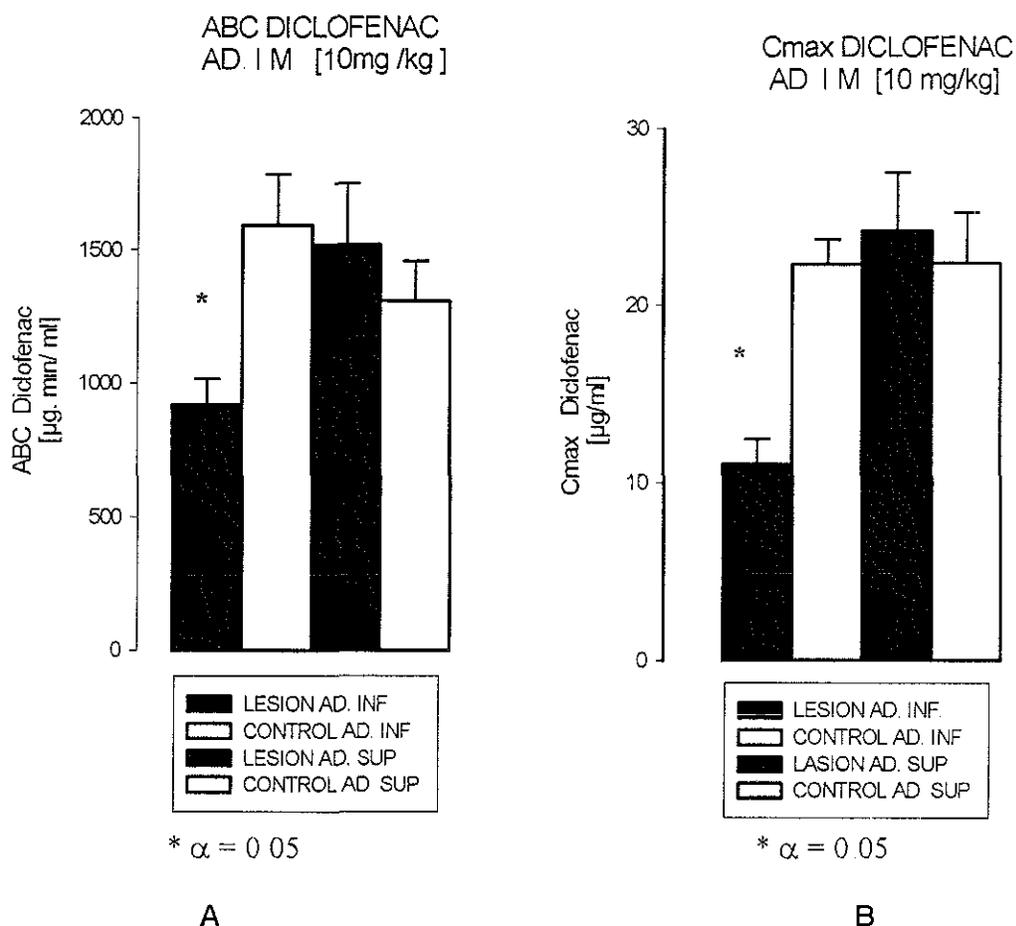


FIGURA 5. (A) Valores promedio del ABC En el valor medio del grupo lesión adm inferior se obtuvo una diferencia significativa para un $\alpha = 0.05$, con respecto a la media del grupo control adm inferior (B) Valores promedio de Cmax En el valor medio del grupo lesión adm inferior se obtuvo una diferencia significativa para un $\alpha = 0.05$, con respecto a la media de los otros grupos

En la siguiente figura 6 se representa un acercamiento de la gráfica 1, en los primeros 50 min

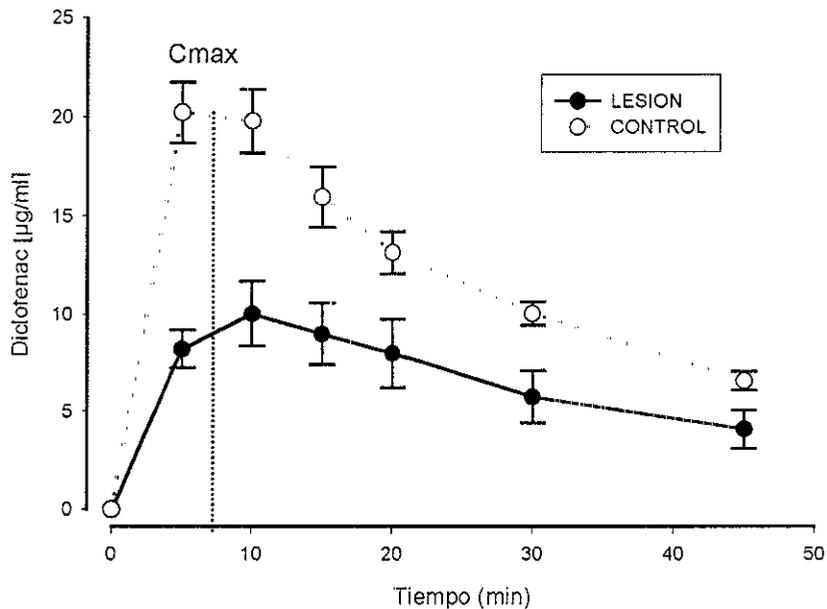


FIGURA 6. Concentraciones sanguíneas de diclofenac, en ratas lesionadas y su grupo control. Con una administración i.m. de diclofenac 10 mg/kg, en el muslo de la pata trasera, inferior al nivel de lesión (T8). Cada valor, representa la media \pm error estándar de 7 controles y 7 lesionados.

En la figura 6, se puede apreciar, que la proporción absorbida de diclofenac en las ratas parapléjicas, es apenas la mitad de lo absorbido por el grupo control. Esto es comprensible, dado que la fase crónica de la lesión medular, se caracteriza por ser un estado clínico, en el que los mecanismos de regulación y compensación del organismo alcanzan una nueva condición de equilibrio, limitado por los ajustes en el volumen celular, disminución del flujo sanguíneo, nutrición y estimulación trófica.

Los músculos paralizados por abajo del nivel de lesión, disminuyen su tamaño como respuesta a la hipoperfusión crónica e inactividad, conduciendo a atrofia muscular. La atrofia conlleva a una reducción de los componentes estructurales de las células, como: mitocondrias, miofilamentos y retículo endoplásmico. En consecuencia, los requerimientos de oxígeno y nutrientes se reducen. La importancia de esta irregularidad, es que la velocidad y cantidad de fármaco que se absorbe a partir de una administración intramuscular, puede alterarse, y no obtenerse los efectos terapéuticos deseados.

En la tabla 17 se realizó la prueba H de Kruskal-Wallis para el parámetro T_{max} . Como resultado de esta prueba no paramétrica, no se encontraron diferencias significativas entre el valor promedio de T_{max} para cada grupo.

En la figura 6 se observa, que las ratas lesionadas alcanzan un valor promedio de C_{max} , a los 10 min mientras que el grupo control obtuvo un valor de T_{max} a los 5 min. No obstante esta diferencia, no fue significativa. De hecho el parámetro T_{max} , no necesariamente es un buen indicador para la velocidad de absorción, pues depende en gran medida de los tiempos de muestreo (Endreny et al, 1991).

Es importante recordar, que al practicar la cirugía de la laminectomía al grupo control, se planteó, que la única diferencia en la absorción del fármaco entre este grupo y las lesionadas, consistió en la contusión de la médula espinal, y en las subsecuentes alteraciones provocadas por el impacto.

Los principales cambios metabólicos asociados con una parálisis motora y subsecuente atrofia muscular están relacionados con las alteraciones en la composición corporal tales como el balance de electrolitos y fluidos (Anderson, 1992; Cardus et al, 1984). En esta fase se distingue un incremento en el volumen extracelular, que puede repercutir en la terapia farmacológica, alterando el volumen de distribución del fármaco (Mc Donald, 1999) Tabla 18.

TABLA 18. Cambios metabólicos, que se provocan en la fase crónica de la lesión medular, a consecuencia de la parálisis motora y subsecuente atrofia muscular.

SISTEMA ALTERADO	ETAPA TEMPRANA DE LA LESIÓN (FASE AGUDA)	ETAPA TARDIA DE LA LESIÓN (FASE CRÓNICA)
Composición corporal	Pérdida progresiva de peso corporal	Disminución de grasa corporal
Balance de electrolitos y líquidos	Incremento del líquido extracelular con relación al volumen de líquido intracelular	Hiponatremia

Todas las células y tejidos del organismo dependen necesariamente de que su ambiente hídrico sea normal y de que su aporte sanguíneo sea adecuado. La regulación del volumen y la tonicidad de los líquidos corporales se establece mediante dos sistemas: el balance de sodio y el equilibrio del agua. Cualquiera de estos dos sistemas (o ambos) puede estar alterado, como consecuencia de una LTME y, por lo tanto, los desequilibrios hídricos (edema o deshidratación) y los trastornos hemodinámicos (hemorragia, trombosis, embolia e infarto) no solo son frecuentes sino que también pueden conducir a lesiones irreversibles (Lemke, 1987; Liebert, 1990; Barry et al, 1993)

Cuando se administró el diclofenac sódico en un músculo sano, superior al nivel de lesión, (gráfica 2) Se observó, que tanto las ratas lesionadas y el control presentaron el mismo perfil cinético. De hecho, en la prueba de Tukey que se realizó para los parámetros de biodisponibilidad C_{max} y ABC, no se encontró diferencia estadística entre el grupo de lesión con administración superior y el grupo control con administración superior. Lo interesante de este resultado, es que se pudo demostrar, que en la fase crónica de la lesión medular, a nivel de la vértebra torácica T8, los músculos superiores al nivel de lesión, que no son afectados por el trauma medular, no pierden la estimulación nerviosa y mantienen un saludable funcionamiento. Esta sana irrigación, facilita los mecanismos de transporte pasivo, en las membranas y capilares.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio, complementan el trabajo inicial de (García-López y Salas,1999) En este estudio, se realizó la farmacocinética del diclofenac sódico, administrado por vía intramuscular en la fase aguda de la lesión medular. Se trabajo con ratas hembra *Sprague-Dawley* con un modelo de contusión medular, a nivel de la torácica T8 Con un tiempo de muestreo total de 6 horas

En este estudio, no se obtuvieron diferencias significativas en los valores de Cmax y Tmax, entre las ratas lesionadas y sus controles. Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas en la vida media y el área bajo la curva. La t_{1/2} se prolongó y el ABC fue mayor en las ratas lesionadas que en el grupo control Estos resultados demuestran que el deterioro del flujo sanguíneo en la fase aguda de la lesión, no afecta de manera significativa la absorción intramuscular de fármacos

No obstante, a pesar de estos resultados, se esperaba que en la fase crónica de la lesión, la atrofia muscular y el deterioro del flujo sanguíneo alteraran de manera significativa la absorción de fármacos administrados por esta vía.

En este trabajo de tesis se comprobó este planteamiento y contribuyó a esclarecer, las alteraciones cinéticas que se padecen por este trastorno. De esta forma cada investigación sobre lesión medular que se realiza con modelos experimentales, aporta una información básica que ayuda a comprender los trastornos ocasionados por esta patología, dados un nivel, intensidad y tiempo en que se produce la lesión.

En síntesis podemos mencionar, que el estudio e investigación de la lesión medular, constituye hoy en día, un reto y un potencial de trabajo en disciplinas como; biofarmacia, farmacología, neurología, que buscan mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados. Para poder entender y predecir la manera en que las condiciones patológicas, pueden modificar la cinética de fármacos en la LTME, se requiere comprender las interrelaciones entre el nivel de lesión, intensidad, evolución cronológica del trauma, procesos bioquímicos y mecanismos moleculares, que en conjunto influyen en la biodisponibilidad de los agentes terapéuticos utilizados en estos pacientes (Kliot y Lustgarten, 1990)

VIII. CONCLUSIONES

- El método cromatográfico utilizado para la cuantificación del diclofenaco en micromuestras de sangre de rata, cumple con los criterios de validación que lo hacen confiable para poder ser utilizado en estudios de farmacocinética en pequeñas especies. El tratamiento de muestras por precipitación fue bastante práctico y económico con respecto a otros métodos de extracción, permitiendo a su vez trabajar varias muestras en un tiempo corto
- La administración intramuscular de diclofenac sódico en músculos inferiores a la lesión traumática de la médula espinal en ratas (Sprague-Dawley) reduce los parámetros de biodisponibilidad ABC y Cmax
- Con lo anterior, se recomienda ampliamente, que al administrar una dosis por vía intramuscular en pacientes parapléjicos, la dosis se administre, en los músculos superiores al nivel de lesión que no son afectados y que mantienen una buena vascularización. Sobre todo cuando el objetivo de una dosis intramuscular es la rápida absorción y un pronto efecto terapéutico, con respecto a la administración por vía oral, y en el caso de los analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos, que se requiere que su efecto sea casi inmediato

IX. BIBLIOGRAFIA

- AISEN ML., DIETZ MA, ROSSI P. (1992) **Clinical and pharmacokinetic aspects of high dose oral baclofen therapy.** *J Am Paraplegia Soc*; **15**:211-216
- ALLEN A. (1911) **Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column.** *J Am Med Assoc*; **57**: 878-880.
- AMZALLAG M. (1993) **Autonomic hyperreflexia.** *Int Anesthesiology Clin*; **31**:87-102.
- ANDERSON DK. (1992) **Chemical and cellular mediators in spinal cord injury.** *J Neurotrauma*; **9**:143-146.
- ATKINSON PP., ATKINSON JL (1996) **Spinal Shock.** *Clin Proc*; **71**:384-387
- BANDARAGE UK., CHEN L., FANG X. GARVEY DS., GLAVIN A., JANERO DR., LETTS LG., MERCER GJ., SAHA JK, SCHROEDER JD., SHUMWAY MJ.,TAM SW. (2000) **Nitrosothiol esters of diclofenac: synthesis and pharmacological characterization as gastrointestinal-sparing prodrugs.** *J Med Chem*; **43** (21): 4005-16
- BARRY MW., WILLIAMS HH, PRESLEY DN. (1993) **Vaopressin-independent alterations in renal water excretion in quadriplegia.** *Am J Physiol*; **265**: R460-R466
- BEDBROOK GM. (1987) **The development and core of spinal cord paralysis (1918-1986).** *Paraplegia*; **25**: 239-240.
- BRESSOLLE F., BROMET P., AUDRAN M. (1996) **Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics.** *J Chroma B*; **686**: 3-10
- BRUNNEMAN SR., SEGAL JL (1991) **Amikacin serum spinal protein binding in spinal cord injury.** *Life Sci*; **49**: 1-5.

- BURR RG , CHEM C , NOSEIBH I. (1993) **Creatinine, calcium, citrate and acid-base in spinal cord injured patients.** *Paraplegia*; **31** (11): 742-750.
- CARDUS MD , WESLEY O., MCTAGGART BS (1984) **The body water and its distribution in men with spinal cord injury.** *Arch Phys Med Rehabil*; **65**: 509-512
- CIPAM., “**Métodos Analíticos, Validación**” (1990): Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación Dirección General de Control de Insumos para la Salud México
- COLACHIS CS (1992) **Autonomic hiperreflexia with spinal cord injury.** *J Am Paraplegia Soc*; **15** (171): 171-186
- CONNORS (1998.) **NEUROCIENCIA** Ed Masson USA
- CRUSE JM , KEITH JC , BRYANT ML., LEWIS RE (1996) **Inmune system neuroendocrine dysregulation in spinal cord injury.** *Inmunol Res*; **15**: 306-314
- DAS G D. (1989) **Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals** *Brain Res*; **22**: 7-32.
- DAVIES N.M, ANDERSON K (1997) **Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls.** *Clin. Pharamcokinet*; **33**:184-213
- DE BERNARDI DI VALSERRA M., FELETTI F., TRIPODI AS , CONTOS S , CARABELLI A., MAGGI L , GERMOGLI R. (1993) **Pharmacokinetic studies in healthy volunteers on a new gastroprotective pharmaceuic form of diclofenac** *Arzneimittelforschung*; **43**(3):373-377
- DEMEPOULOS HB , FLAMM ES , PIETRONIGRO DD. (1980) **The free radical pathology and the microcirculation in the motor central nervous system disorders** *Acta Physiol Scand*; **492**: 91-119
- DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (1988) **Bioanalytical Methods Validation.** *Food & Drug Administration USA*; 1-13

- ELMQUIST WF , CHAN KK , SAWCHUK RJ (1994) **Transsynovial drug distribution: synovial mean transit time of diclofenac and other nonsteroidal antiinflammatory drugs.** *Pharm Res*; **11** (12): 1689-97
- ENDRENY L , FRITSCH S , YANE W. (1991) **C_{max}/AUC is a clearer measured than C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence.** *Inter J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; **29**: 394-399
- FADEN AI (1992) **Need for standardization of animal models of spinal cord injury.** *J Neurotrauma*; **9**(2): 172-176
- FADEN AI , SIMON RP (1988) **A potencial role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury.** *Ann Neurol*; **23**: 623-626
- FEALEY RD , SZURSZEWSKI HJ , MERRITT JL , OLMAGNO EP. (1984) **Effect of traumatic spinal cord transection on human upper gastrointestinal motility and gastric emptying.** *Gastroenterolog* ; **87**: 69-75
- FENNER H. (1997) **Differentiating among nonsteroidal antiinflammatory drugs by pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles.** *Semin Arthritis Rheum*; **26** (6 Suppl 1): 28-33
- FERINGA E.R (1988) **Loss of neurons in the red nucleus after spinal cord transection.** *Exp Neurol* ; **100**: 112-120
- GALICIA A SUSANA. (1998) **Epidemiología de la Lesión Medular Traumática en el Distrito Federal.** Tesis Posgrado, Facultad de Medicina U N A M
- GARCÍA-LÓPEZ P , PÉREZ-URIZAR J , IBARRA A , GUÍZAR-SAHAGÚN G. (1995) **An experimental model for the study of pharmacokinetic alterations induced by spinal cord injury.** *Pharm Sci* ; **1**:133-135
- GARCÍA-LÓPEZ P , GUÍZAR-SAHAGÚN G , CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ G (1999) **Effects of high and low thoracic spinal cord injury on the oral pharmacokinetics of paracetamol in rats.** *Pharm Pharmacol Commun* ; **5**: 579-581

- GARCÍA-LÓPEZ P , PÉREZ-URIZAR J, IBARRA A,, GRIJALVA I, (1996) **Comparison between Sprague-Dawley and Wistar rats as an experimental model of pharmacokinetic alterations induced by spinal cord injury.** *Arch Med Res* 1996; 27:453-457.
- GARCÍA-LÓPEZ P , SALAS R (1999) **Bioavailability of diclofenac after intramuscular administration to rats with experimental spinal cord injury.** *J Pharmacol Toxicol* ; 42:99-101
- GILMAN TM., BRUNNEMMAN SR , SEGAL JL. (1993) **Comparison of population pharmacokinetics models for gentamicin in spinal cord injured and able-bodied patients.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 37:93-99
- GONZALEZ P.E , ALDANA I , ESTERAS A , (1998) **Absorption of sodium diclofenac after ocular administration in rabbit.** *Arzneim*; 48 (9): 931-934
- GOPAL D.D. (1989) **Perspectives in Anatomy and Pathology of Paraplegia in Experimental Animals.** *Brain Research Bulletin*, ; 22: 7-32
- GUÍZAR-SAHAGÚN G , GRIJALVA I, MADRAZO, I (1998) **Pathophysiological mechanisms involved in systemic and metabolic alterations secondary to spinal cord injury** *Proc West Pharmacol Soc* ; 41:237-240
- GUND P , SHEN TY (1977) **A model for the prostaglandin synthetase cyclooxygenation site and its inhibition by anti-inflammatory aryl acetic acids.** *J Med Chem* ; 20:1146-1152
- HALSTEAD LS , WALKER JC , PATEL VC (1985) **Drug absorption in spinal cord injury.** *Arch Phys Med Rehab* ; 66:298-301
- HALL ED BRAUGHLER JM (1989) **Central nervous system trauma and stroke II. Physiological of oxigen radicals and lipid peroxidation.** *Free Radical Biol Med*; 6: 303-313
- HOGAN EL (1986) **Calcium-activated mediators of secondary injury in the spinal cord.** *Cent Nerv Syst Trauma*; 3: 175-179

- HOLTZ A , NYSTROM B (1990) **Neuropathological changes and neurological function after spinal cord compression in the rat.** *J Neurotrauma*; **7**: 155-167
- HOLTZ A , GERDIN B (1991) **Mk801, and OBS N.methyl-D-aspartate channel bloker, does not improve the functional recovery nor spinal cord blood flow after spinal cord compression in rats.** *Acta Neural Scan* ; **84**: 334-338
- HONG Y , CECHETTO DF , WEAVER LC (1994) **Spinal cord regulation of sympathetic activity in intact and spinal rats.** *Am J Physiol*; **266**:H1485-H1493
- ICH **International Conference on Harmonisation** (1997); Guileline on the Validation of Analytical Procedures Metodology, Department of Healt and Human services, Food and Drug Administration, May **62**: 27463-27467
- INSEL P A. (1996) **Analgesic-antipiretics and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout.** En Goodman & Gilman (Eds) "The Pharmacological Basis of Therapeutics" 9th edition p. 617-657
- ISHIKAWA M , YAMATAKA A , KAWAMOTO S (1996) **Hemodynamic changes in blood flow through the denervated liver in pigs.** *J Invest Surg* 1995; **8** (1): 95-100
- KLAUS FLOREY (1990) **Analytical Profiles of Drug Substances** Academic Press ,Vol 19 USA
- KLIESCH WI , CRUSE JM , LEWIS RE (1996) **Restoration of depressed inmune function in spinal cord injury patients receiving rehabilitation therapy.** *Paraplegia*; **34**: 82-90
- KLIOT M , LUSTGARTEN JH. (1990) **Strategies to promot regeneration and recovery in the injury spinal cord.** *Neurosurgery Clin North Am*; **1**: 751-759
- KRUSE MN , BENNET B , GROAT WC (1994) **Effect of urinary diversion of the recovery of micturition reflexes after spinal cord injury in the rat.** *J Urol* ; **151**:1088-1091

- KU E C , W LEE , H.V KOTHARI and D W SCHOLER. (1986) **Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade.** *Am J Med*; **80**(suppl 4B):18-23
- KUROWSKI M (1988) **Pharmacokinetics and biological availability of diclofenac preparations following intramuscular injection of 75 mg and oral administration of 150 mg of active drug.** *Z Rheumatol*; **47**(1):37-42
- LANDSDORP D , VREE TB , JANSSEN TJ , GUELEN PJ (1990) **Pharmacokinetics of rectal diclofenac and its hydroxy metabolites in man.** *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; **28**(7): 298-302
- LANG J , BOLTON S (1991) **A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications.** *J Pharm Bio Anal*; **9**(5): 357-361
- LARRY W , MORELAND MD (1999) **The Use Of Analgesics in The Management of Pain in Rheumatic Diseases.** *Rheumatic Disease Clinics of North America*; **25**(1): 153-189
- LEHMANN KG , LANE JG , PIEPMEIER JM. (1987) **Cardiovascular abnormalities accompanying acute spinal cord injury in humans: Incidence, time course and severity.** *J Am Coll Cardiol*; **10**: 46-52
- LEMKE M , DEMEDIUK D , MCINTOSH TK , FADEN AL (1987) **Alteration in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats.** *Bioch Bioph Res Com*; **147**: 1170-1175
- LIEBERT MA (1990) **Edema development and ion changes in rat spinal cord after impact trauma: injury dose- response studies.** *J Neurotrauma*; **7**: 41-54
- LILL JS , O SULLIVAN T , BAUER LA (2000) **Pharmacokinetics of diclofenac sodium in chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis.** *J Clin Pharmacol*; **40**(3): 250-257
- MAIROV DN , FEHELING MG , KRASSIOUKO AV (1998) **Relations between severity of spinal cord injury and abnormalities in neurogenic cardiovascular control in conscious rats.** *J Neurotrauma*; **15**: 365-374

- MC DONALD J (1999) **Repairing the damaged spinal cord.** *Scien Am* Sep; 55-63
- MITCHELL J.A., AKARASEREENONT C, THIEMERMANN RJ (1990) **Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cylooxygenase.** *Proc Natl Acad Sci USA*; **90**:11693-11697
- O'NEILL, L A J and G P. LEWIS (1989) **Inhibitory effects of diclofenac and indomethacin on interleukin-1-induced changes in PGE₂ release. A novel effect on free arachidonic levels in human synovial cells.** *Biochem Pharmacol*; **38**:3707-3711
- PANTERS SS, YUM SW, FADEN AL. (1990) **Alteration in extracellular aminoacids after traumatic spinal cord injury.** *Ann Neurol*; **27**: 96-99
- SALLMANN A (1986) **Chemical aspects of diclofenac International Symposium.** *Am J Med*; **80**: 30-32
- SECRETARIA DE SALUD (1999) **Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1.** *Diario Oficial. México*, 1998; 44-67
- SEGAL JL, BRUNNEMANN SR. (1989_a) **Pharmacological modification of dantrolene bioavailability in humans with spinal cord injury.** *J Clin Pharmacol*; **29**:835-838
- SEGAL JL, BRUNNEMANN SR (1989_b) **Clinical pharmacokinetics in patients with spinal cord injury.** *Clin Pharmacokinetics*; **17**(2): 109-129
- SEGAL JL, BRUNNEMANN SR, ELTORAI IM (1991) **Decreased systemic clearance of lorazepam in humans with spinal cord injury.** *J Clin Pharmacol*; **37**(7): 651-666
- SEGAL JL, BRUNNEMANN SR, GORDON SK (1986) **Impaired absorption of intramuscularly administered gentamicin in spinal cord injury.** *Curr Ther Res*; **39**:961-969
- SEGAL JL, GORDON SK, ELTORAI IM (1987) **Theophylline disposition in tetraplegic man.** *South Med J*; **80**: 720-724

- SEGAL JL (1991) **Altered catecholamine levels are associated with changes in hepatic oxidative metabolism in humans with spinal cord injury.** *J Clin Pharmacol*; **31**: 844-846
- SHAH P.V, MIDHA K K, DIGHE S, McGILVERAY I J, SHELLY J P, YACOBI A, LAYLOF T, VISWAHATHAN C T, COOK E, McDOWALL R D, PITTMAN K A, SPECTOR S (1992) **Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetics Studies.** *J Pharm Sci*; **81**(3):309-312
- SHIMAMOTO J, IEIRI I, URAE A, KIMURA M, IRIE S, KUBOTA T, CHIBA K, ISHIZAKI T, OTSUBO K, HIGUCHI S (2000) **Lack of differences in diclofenac (a substrate for CYP2C9) pharmacokinetics in healthy volunteers with respect to the single CYP2C9*3 allele.** *Eur J Clin Pharmacol*; **56**(1):65-8
- SHIELD M J. (1998) **Diclofenac/misoprostol: novel findings and their clinical potential.** *J Rheumatol* ; **51**(Suppl):31-41
- SIMPSON RK, ROBERTSON CS, GOODMAN JC (1990) **Spinal cord ischemia induced elevation of aminoacids extracellular measurement with microdialysis.** *Neurochem Res*; **15**: 635-639
- STEINMEYER, J. and D. KALBHEN. (1990) **Pharmacological influence on polymorphonuclear granulocytes elastase under various test conditions.** *Arzneim Forsch /Drug Research*; **40**:196-200
- STOVER SL, FINE PR. (1987) **The epidemiology and economics of spinal cord injury.** *Paraplegia*; **25**:225-228
- TATOR CH (1996) **Experimental and clinical studies of the pathophysiology and management of acute spinal cord injury.** *J Spinal Cord Med* 1996; **19**:206-214
- TODD P A, E M SORKIN (1988) **Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy.** *Drugs*; **35**:244-285

TORRES-LÓPEZ J.E., ROBLES M.B., PÉREZ-URIZAR J., FLORES-MURRIETA F.J., GRANADOS-SOTO V. (1997) **Determination of diclofenac in micro-whole blood samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection** *Arzneim Forsch/ Drug Res*; **47**:1040-1043

UNITED STATES PHARMACOPOEIA XXIII. 1994

INTERNATIONAL CONFERENCE OF HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (1993) **Validation of Analytical Procedures.** *Food & Drug Administration USA*, October **19**:151-155

WARNER T.D., F. GUILIANO, I. VOJNOVIC, A. BUKASA, J.A. MITCHELL, J.R. VANE (1999) **Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis** *Proc Natl Acad Sci USA*; **96**:7563-7568

X. APÉNDICE

ESTUDIO FARMACOCINETICO

En las tablas (19-22), se presentan las concentraciones sanguíneas de las ratas lesionadas y el grupo control Después de una dosis i m de [10mg/kg de peso] de diclofenac sódico en el muslo de la pata trasera A los 35 días de producida la lesión

TABLA 19 RATAS LESIONADAS ADMINISTRACION INFERIOR

tiempo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	PROM	CV
0 min	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 "	11.86	10.96	6.74	8.31	7.62	3.89	8.02	8.2	32.30
10 "	14.84	12.12	14.98	5.01	6.50	5.06	11.64	10.0	44.06
15 "	14.33	9.35	14.73	3.78	6.13	5.67	8.72	9.0	47.36
20 "	11.98	10.37	15.51	3.56	5.10	3.52	5.77	8.0	58.61
30 "	6.96	8.36	11.93	2.56	2.92	3.94	3.28	5.7	61.54
45 "	5.08	6.65	8.19	1.71	1.65	2.55	2.56	4.1	64.19
1 hr	3.68	4.13	3.84	1.61	1.45	2.45	2.16	2.8	40.20
1.5 "	1.80	2.84	1.96	1.20	1.33	1.88	1.45	1.8	30.89
2 "	1.39	2.40	1.92	1.17	1.23	1.42	1.32	1.6	28.87
4 "	1.15	2.23	1.01	1.14	1.18	1.30	1.30	1.3	30.78
6 "	0.64	2.09	0.68	1.13	1.14	1.12	1.28	1.2	41.59
8 "	0.62	1.44	0.64	1.10	1.10	1.12	1.26	1.0	29.33

TABLA 20 RATAS CONTROL ADMINISTRACION INFERIOR

tiempo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	PROM	CV
0 min	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 "	26.46	19.15	20.60	23.34	15.94	21.25	14.85	20.2	20.00
10 "	20.36	15.00	18.52	28.59	18.04	17.90	20.18	19.8	21.54
15 "	14.86	15.36	9.86	21.99	19.97	13.76	15.84	15.9	25.09
20 "	13.45	12.85	8.97	13.49	16.56	16.47	10.20	13.1	21.77
30 "	11.24	10.45	7.90	10.84	11.32	10.81	7.58	10.0	15.84
45 "	5.57	6.45	7.48	6.87	7.99	6.94	4.21	6.5	19.48
1 hr	4.90	4.35	7.29	4.58	5.87	4.90	2.66	4.9	28.73
1.5 "	2.34	2.89	6.65	2.78	3.79	3.17	1.73	3.3	47.87
2 "	1.39	2.60	5.52	2.35	2.93	2.20	1.57	2.7	51.91
4 "	1.38	2.12	5.06	1.85	2.77	1.60	1.44	2.3	56.12
6 "	1.07	1.80	4.65	0.86	2.17	1.25	1.23	1.9	70.31
8 "	0.82	1.28	3.00	0.80	1.19	1.23	1.14	1.4	55.66

TABLA 21 RATAS LESIONADAS ADMINISTRACION SUPERIOR

tiempo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	PROM	CV
0 min	0	0	0	0	0	0	0	0
5 "	18.97	15.14	20.41	15.59	23.15	21.35	19.10	16.75
10 "	17.51	21.03	17.39	16.16	12.19	21.97	17.71	19.92
15 "	22.90	29.09	14.53	16.58	12.50	17.49	18.85	32.47
20 "	23.19	40.32	10.21	14.89	17.89	17.44	20.66	50.93
30 "	15.57	30.98	5.75	11.57	12.10	9.57	14.26	61.76
45 "	8.08	21.78	2.65	8.07	9.33	6.80	9.45	68.42
1 hr	4.94	11.16	1.81	4.53	5.62	3.96	5.34	58.74
1.5 "	2.61	3.89	1.25	2.36	2.73	3.89	2.79	35.91
2 "	2.39	3.81	1.14	2.23	2.25	2.19	2.34	36.57
4 "	1.54	2.75	1.01	1.37	1.69	1.22	1.60	38.40
6 "	1.36	1.39	0.70	1.29	1.60	0.63	1.16	34.34
8 "	1.13	0.82	0.59	1.18	1.45	0.54	0.95	37.88

TABLA 22 RATAS CONTROL ADMINISTRACION SUPERIOR

tiempo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	PROM	CV
0 min	0	0	0	0	0	0	0	0
5 "	10.51	24.51	15.14	16.66	24.95	32.88	20.8	39.22
10 "	13.60	18.66	14.24	21.71	20.64	31.07	20.0	31.79
15 "	14.06	18.42	11.78	21.64	13.00	29.79	18.1	37.57
20 "	9.54	15.62	8.78	17.63	12.76	17.08	13.6	28.13
30 "	6.27	13.29	3.69	13.35	10.41	13.64	10.1	41.77
45 "	3.07	8.21	2.15	7.58	8.49	8.34	6.3	45.90
1 hr	2.25	4.40	1.65	5.63	6.25	3.58	4.0	46.06
1.5 "	1.55	2.90	1.30	3.88	4.06	2.85	2.8	41.58
2 "	1.35	2.45	1.15	2.66	2.68	1.78	2.0	33.66
4 "	1.23	1.67	0.85	1.35	1.97	1.47	1.4	26.91
6 "	1.13	1.67	0.73	1.10	1.19	1.23	1.2	25.64
8 "	1.01	1.41	0.59	0.63	0.60	0.98	0.9	37.50