

00582
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SIMULTÁNEA DE METAMIZOL
SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE MORFINA Y SU RELACIÓN CON
EL GRADO DE TOLERANCIA Y EFICACIA PRODUCIDA EN
TRATAMIENTO CRÓNICO EN RATAS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A

M. en C. ADRIANA MIRIAM DOMÍNGUEZ RAMÍREZ

TUTOR: DR. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ-MUÑOZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



**Ciencias
Químicas**

2003

1



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.

PAGINACION DISCONTINUA

Envío a la Dirección General de Biotecnología y
INAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo recabado
NOMBRE: Adriana Minom
Dominguez Ramirez
FECHA: 12 Mayo 2005
FIRMA: p.a.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Carlos Hoyo Vadillo
Primer vocal	Dr. Camilo Ríos Castañeda
Segundo vocal	Dra. Claudia Soto Peredo
Tercer vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro
Secretario	Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents
Primer suplente	Dra. Helgi Jung Cook
Segundo suplente	Dra. Rosa Ventura Martínez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio Dolor y Analgesia. Departamento de Farmacobiología. Unidad Sur. CINVESTAV.

Laboratorio de Investigación del Área Farmacocinética y Farmacodinamia. Departamento Sistemas Biológicos. UAMX.

Laboratorio de Biofarmacia. División de Estudios Posgrado. Facultad de Química. U.N.A.M.

Departamento de Neuroquímica. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de doctorado.

El Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados (Unidad Sur) y el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

La M. en C. Alma Rosa Cortés Arroyo por su valioso apoyo en el análisis estadístico de los resultados, la revisión final y edición del manuscrito y sus comentarios.

Mi esposo, Q.F.B. Heberto Gutiérrez Guzmán, por su invaluable ayuda en la elaboración de esta tesis, su apoyo en computación y principalmente por su paciencia y dedicación.

A la Dra. Martha Lila Castillo por guiarme en los momentos más difíciles

Al Dr. Francisco Javier López-Muñoz de manera muy especial, por la dirección de esta tesis, por sus enseñanzas, su amistad y principalmente por su gran calidad humana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN

***Con todo mi amor a mi esposo Heberto, a mis hijas Adriana y Miriam,
e hijos Guillermo y Ramón, por su amor, su tiempo y su espacio.
A mis padres, hermanos y amigos por formar parte de mi vida.***

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. DOLOR Y NOCICEPCIÓN	3
1.2. NEUROBIOLOGÍA DE LA NOCICEPCIÓN	3
1.2.1. Sistemas neurotransmisor y neuromodulador del dolor	5
1.3. ANALGÉSICOS	9
1.4. COMBINACIONES DE ANALGÉSICOS	11
1.5. GENERALIDADES DE METAMIZOL	12
1.5.1. Nombre químico	12
1.5.2. Fórmula empírica	13
1.5.3. Fórmula estructural	13
1.5.4. Propiedades fisicoquímicas	13
1.5.5. Farmacocinética de metamizol	14
1.5.6. Farmacodinamia de metamizol	16
1.5.7. Efectos adversos de metamizol	19
1.6. GENERALIDADES DE MORFINA	21
1.6.1. Nombre químico	21
1.6.2. Fórmula empírica	21
1.6.3. Fórmula estructural	21
1.6.4. Propiedades fisicoquímicas	22
1.6.5. Farmacocinética de morfina	22
1.6.6. Farmacocinética de morfina en rata	26
1.6.7. Farmacodinamia de morfina	27
1.6.8. Efectos adversos	30
1.6.9. Correlación farmacocinética-farmacodinámica de morfina	32
1.7. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR ANALGESIA (ANTINOCICEPCIÓN)	34
1.8. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MORFINA EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS	36
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38

3. HIPÓTESIS 40

4. OBJETIVOS 41

 4.1. OBJETIVO GENERAL 41

 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 41

5. MATERIALES Y MÉTODOS 42

 5.1. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA (ANTINOCICEPTIVA) 42

 5.2. MÉTODO ANALÍTICO EMPLEADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MORFINA EN PLASMA

 5.2.1. Selección de condiciones cromatográficas 44

 5.2.2. Extracción de morfina en plasma 44

 5.2.3. Instrumentación y condiciones cromatográficas 45

 5.2.4. Reactivos estándares 45

 5.2.5. Preparación de soluciones 46

 5.2.6. Preparación de la fase móvil 46

 5.2.7. Preparación de la curva de calibración de morfina 47

 5.2.8. Procedimiento 47

 5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO 49

 5.3.1. Selectividad 49

 5.3.2. Linearidad 49

 5.3.3. Precisión 49

 5.3.4. Exactitud 49

 5.3.5. Concentración mínima cuantificable (CMC) y concentración mínima detectable (CMD) 50

 5.3.6. Estabilidad de morfina en muestras plasmáticas 50

 5.4. ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS 50

 5.4.1. Presentación de datos y análisis estadístico 51

 5.5. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS 52

 5.5.1. Presentación de datos y análisis estadístico 53

6. RESULTADOS 55

 6.1. MÉTODO ANALÍTICO 55

 6.1.1. Selección del estándar interno 55

 6.1.2. Método de extracción 56

 6.1.3. Selectividad 56

 6.1.4. Linearidad 56

 6.1.5. Precisión 58

 6.1.6. Precisión en diferentes días 59

 6.1.7. Exactitud del método 60

 6.1.8. Concentración mínima cuantificable (CMC) 60

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

6.1.9. Estabilidad de muestras plasmáticas	61
6.2. ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS	61
6.3. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS.....	67
6.3.1. Farmacocinética de morfina en ausencia de metamizol en dosis única (5.6 mg/kg) y en tratamientos subcrónicos por 6 y 12 días	67
6.3.2. Farmacocinética de morfina (5.6 mg/kg) en combinación con metamizol (562.3 mg/kg) en dosis única.....	69
6.3.3. Farmacocinética de morfina (5.3 mg/kg) en combinación con metamizol (562.3 mg/kg) en tratamientos agudo y subcrónicos por 6 y 12 días	71
6.3.4. Relación entre concentraciones de morfina y el efecto observado	73
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
7.1. MÉTODO ANALÍTICO	76
7.1.1. Selectividad	76
7.1.2. Extracción de morfina.....	77
7.1.3. Linearidad y exactitud	77
7.1.4. Precisión	77
7.1.5. Estabilidad de muestras plasmáticas	78
7.2. ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS	78
7.3. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS.....	81
7.3.1. Farmacocinética de morfina en ratas después de la administración s.c. de morfina sola en tratamiento agudo y subcrónico por 6 y 12 días.	81
7.3.2. Farmacocinética de morfina en ratas después de la administración de morfina en combinación con metamizol en tratamiento agudo y subcró- nico por 6 y 12 días.....	84
7.3.3. Relación entre concentraciones de morfina y el efecto observado	86
7.4. Utilidad potencial de la combinación metamizol+morfina (562.3:5.6 mg/kg) en el tratamiento del dolor crónico.....	88
8. CONCLUSIONES	89
9. REFERENCIAS	90
10. ANEXO.....	111
10.1. Ajuste de los datos de concentración plasmática de morfina al modelo farmacocinético de 2 compartimentos.	111
10.2. Productos de trabajo derivados de la tesis doctoral	112
10.3. Artículo	114

ABREVIATURAS

AA	Aminoantipirina
AAA	4-Acetilaminoantipirina
AAEs	Aminoácidos excitatorios
AAINEs	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
AAS	Ácido acetilsalicílico
ABC _{0-∞}	Área bajo la curva de Cp de tiempo cero a infinito
ABC ₀₋₄	Área bajo la curva de Cp de tiempo cero a las 4 h
ABC ₀₋₂₄	Área bajo la curva de Cp de tiempo cero a las 24 h
ABCe	Área bajo la curva del efecto antinociceptivo
AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	3',5'-adenosina monofosfato cíclico
ANDEVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
β -END	β -endorfina
B.M.	Baño María
CDR	Curva dosis respuesta
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Cl _T	Depuración global o total
C _{max}	Concentración plasmática máxima
COX	Ciclooxigenasa
CT	Curso temporal
DYN	Dinorfina
E.E.	Error estándar
E _{max}	Efecto máximo observado
E _{4h}	Efecto observado a las 4 h después de la administración
ENK	Encefalina
FAA	4-Formilaminoantipirina
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido γ -aminobutírico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	3',5'-guanosina monofosfato cíclico
G.I.	gastrointestinal
Gi	Proteína G inhibitoria
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
i.a.	Vía intra-articular
i.c.v.	Vía intracerebroventricular
i.v.	Vía intravenosa
i.p.	Vía intraperitoneal
I.C.	Intervalo de confianza
IF%	Índice de funcionalidad porcentual
LC	Locus Coeruleus
L-NAME	Clorhidrato de N ^G -nitro-L-arginina metil ester
LTs	Leucotrienos
MAA	4-Monometil-amino-antipirina
MAO	Monoaminoxidasa
MAUC	Modelo abierto de un compartimento
MADC	Modelo abierto de dos compartimentos
M3G	Morfina-3β-glucurónido
M6G	Morfina-6β-glucurónido
MET	Metamizol
MOR	Morfina
MET+MOR	Combinación metamizol : morfina
NMDA	n-Metil-D-aspartato
NRM	Núcleo del rafe magnus
Nx	Naloxona
ON	Óxido nítrico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
PIFIR	Pain Induced Functional Impairment in Rat
p.o.	Vía oral (per os)
POMC	Propiomelanocortina
s.c.	Vía subcutánea
SGPA	Sustancia gris periacueductal

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

SNC	Sistema nervioso central
SON	Sintetasa de óxido nítrico
SP	Sustancia P
t.a.	Tratamiento agudo (dosis única)
$t_{E_{max}}$	Tiempo para alcanzar el efecto máximo
t_{max}	Tiempo en que se alcanza la concentración máxima
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TMR	Tiempo medio de residencia
u.a.	Unidad de área (% h)
UDP	Uridin-difosfato
UGT	Uridin-5'-difosfato-(UDP)-glucurosoniltransferasa
vs.	<i>versus</i> (contra)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Pag.
1 Sitio de administración intraarticular de ácido úrico en el modelo experimental PIFIR.	42
2 Esquema del sistema de registro empleado en el modelo PIFIR.	43
3 Voltagramas de morfina y naloxona.	55
4 Cromatogramas típicos de morfina, naloxona y metamizol.	57
5 Curva promedio de calibración de morfina.	58
6 Exactitud del método analítico para la cuantificación de morfina en plasma.	60
7 Cursos temporales del efecto antinociceptivo (analgésico) de metamizol, morfina y la combinación metamizol+morfina en tratamiento agudo.	62
8 Cursos temporales del efecto antinociceptivo metamizol, morfina y la combinación metamizol+morfina en tratamiento subcrónico 6 días.	63
9 Cursos temporales del efecto antinociceptivo de metamizol, morfina y la combinación metamizol+morfina en tratamiento subcrónico 12 días.	66
10 Cursos temporales de concentraciones plasmáticas de morfina después de la administración s.c. de morfina en t.a. y subcrónico por 6 y 12 días.	67
11 Cursos temporales de concentraciones plasmáticas de morfina después de la administración s.c. de morfina y de la combinación metamizol+morfina en t.a.	70
12 Cursos temporales de concentración plasmática de morfina después de la administración s.c. de la combinación metamizol+morfina por 6 y 12 días.	71
13 Relación entre concentraciones de morfina y el efecto antinociceptivo observado (histeresis).	73
14 Relación entre el ABC de concentraciones plasmáticas de morfina y el ABC acumulativa del efecto antinociceptivo, después de la administración de morfina en tratamiento agudo y subcrónico por 6 y 12 días.	75
15 Relación entre el ABC de concentraciones plasmáticas de morfina y el ABC del efecto antinociceptivo, después de la administración de la combinación metamizol+morfina en t.a. y subcrónico por 6 y 12 días.	75
16 Ajuste de los datos de concentración plasmática de morfina obtenidos después de la administración s.c. del fármaco en dosis única al modelo de dos compartimentos.	111
17 Ajuste de los datos de concentración plasmática de morfina después de la administración subcrónica por 6 días, al modelo de dos compartimentos.	111
18 Ajuste de los datos de concentración plasmática de morfina después de la administración subcrónica por 6 días, al modelo de dos compartimentos.	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pag.
I. Diseño de tratamientos	51
II. Selección del método de extracción de morfina	56
III.a. Precisión del método analítico para cuantificar morfina en plasma (rango 62.5-1000 ng/ml)	58
III.b. Precisión del método analítico para cuantificar morfina en plasma (rango 7.8-125 ng/ml)	59
IV. Precisión entre días	59
V. Estabilidad de morfina en plasma	61
VI. Parámetros farmacodinámicos en los tratamientos estudiados	64
VII. Parámetros farmacocinéticos de MOR en t.a., y subcrónicos.	68
VIII. Parámetros farmacocinéticos de MOR en ausencia y presencia de metamizol en t.a. y subcrónicos	72

RESUMEN

La morfina es uno de los fármacos de primera elección en el tratamiento del dolor severo crónico, sin embargo el control total del dolor no se logra sin causar serios efectos adversos. A su vez, el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico durante el tratamiento crónico complica el tratamiento del dolor y contribuye a variaciones en la respuesta. Por tanto, la identificación de fármacos que al ser administrados simultáneamente permitan incrementar la eficacia analgésica y contribuyan a atenuar o inhibir el desarrollo de tolerancia, representan una alternativa terapéutica importante. Con anterioridad se demostró que la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) administrada por vía subcutánea en dosis única, en ratas, presenta una eficacia antinociceptiva superior a la obtenida por los fármacos administrados individualmente y menores efectos adversos que una dosis equieficaz de morfina (10 mg/kg). Dicha combinación puede representar una alternativa terapéutica útil en el tratamiento crónico de dolor, ya que la dosis de morfina empleada en la combinación es pequeña y es probable que el metamizol disminuya el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de la misma. El objetivo del presente estudio fue realizar el análisis farmacodinámico y farmacocinético de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento subcrónico en ratas.

Se estudiaron la eficacia, sinergismo y tolerancia analgésica producidos por la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento agudo (dosis única) y después del tratamiento subcrónico (6 y 12 días) y los resultados se compararon con los obtenidos después de la administración de los fármacos solos, metamizol (562.3 mg/kg, s.c.) y morfina (5.6 mg/kg, s.c.), en los mismos tratamientos. Se utilizó el modelo experimental "*Disfunción inducida por dolor en ratas*" (modelo PIFIR, por sus siglas en inglés) para la medición del efecto analgésico (antinociceptivo). Paralelamente se estudió la farmacocinética de morfina en ausencia y presencia de metamizol, en los mismos animales. Para la determinación de las concentraciones plasmáticas de morfina se utilizó un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, de fase inversa y par iónico, con detección electroquímica, el cual fue desarrollado y validado previamente.

La eficacia antinociceptiva global medida por el Area Bajo la Curva del Efecto (ABCe), el efecto máximo alcanzado (E_{max}), así como la duración del efecto (E_{4h}) de la combinación metamizol+morfina (MET+MOR) estudiada, fueron mayores a los obtenidos por los componentes administrados individualmente ($p < 0.05$), manteniéndose en niveles adecuados de antinocicepción durante el tratamiento subcrónico (6 y 12 días). En contraste, la morfina

administrada sola presentó un marcado desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo después del tratamiento subcrónico ($p < 0.05$).

En los estudios farmacocinéticos, se encontró una marcada disminución en las concentraciones de morfina en plasma después de la administración subcrónica por 6 y 12 días del fármaco. Por el contrario, después de la administración simultánea de metamizol y morfina se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en las concentraciones de morfina, con el aumento correspondiente en los parámetros farmacocinéticos tales como área bajo la curva de concentraciones de morfina hasta las 4 h (ABC_{0-4}), área bajo la curva hasta las 24 h (ABC_{0-24}), concentración plasmática máxima (C_{max}) y concentración a las 4 h (C_{p4h}). Este incremento fue mayor aún después del tratamiento subcrónico por 6 y 12 días, originando una acumulación del fármaco ($p < 0.001$). Finalmente se confirmó la relación existente entre los efectos farmacológicos (antinocicepción y tolerancia) y las concentraciones encontradas de morfina en plasma, bajo las condiciones experimentales estudiadas.

No se investigaron los posibles mecanismos involucrados en la interacción de morfina y metamizol en la combinación, sin embargo es posible postular que los mecanismos atribuidos a ambos fármacos tanto a nivel central (i.e. activación del sistema opioide, activación de sistemas inhibitorios descendentes), como a nivel periférico (i.e. activación de la vía L-arginina-ON-GMPc), contribuyen al sinergismo presentado por la combinación estudiada. Otros mecanismos farmacodinámicos presentes en la acción del metamizol (i.e. antagonista a receptores de NMDA), pueden inhibir adicionalmente el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina. Considerando que una de las principales vías de eliminación de morfina es por biotransformación (glucuronidación al 3-glucurónido, con actividad antagonista a morfina), es posible pensar en una inhibición enzimática como consecuencia de la interacción con metamizol (i.e. glucuronosil-transferasas, UGTs), que a su vez inhiba el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la interacción entre metamizol y morfina (562.3 + 5.6 mg/kg, respectivamente), favorece la eficacia antinociceptiva y al mismo tiempo inhibe el desarrollo de tolerancia de morfina, después del tratamiento subcrónico. La utilidad clínica de la combinación deberá ser corroborada posteriormente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Morphine (opioid analgesic drug) remains the most effective therapy available for the treatment of moderate-to-severe pain, however the problems arising from unwanted side effects persist. A common undesired side effect of morphine is the development of analgesic tolerance after prolonged treatment that can complicate the therapy and contributes to the variation in analgesic response. Therefore, the identification of drugs that can attenuate or inhibit the development of analgesic tolerance to morphine and increase the analgesic efficacy, may lead to improved management of pain. In previous studies it was shown that the combination metamizol+morphine (562.3 : 5.6 mg/kg, s.c.) administered in single dose in rats, produced a greater analgesic effect than the individual components and presented a lower probability of potential side effects than those expected from an equally efficacious dose of morphine (10 mg/kg). In this case, the combination metamizol+morphine (562.3 : 5.6 mg/kg, s.c.) represents an alternative choice in chronic pain treatment since the dose of morphine in the combination is small. Therefore, it may be expected that the development of analgesic tolerance could be diminished by the presence of metamizol. The aims of the present study were to realize the complete analysis (pharmacodynamic and pharmacokinetic) of the benefits of the combination in subchronic treatment using rats.

The analgesic efficacy and the possible development of tolerance produced by the combination metamizol+morphine (562.3 : 5.6 mg/kg, s.c.) in acutely and subchronically treated rats (once a day, for 6 and 12 days) were studied. In addition, the results were compared with those obtained after the administration of the individual components of the combination, metamizol (562.3 mg/kg) and morphine (5.6 mg/kg, s.c.), after single and 6 and 12 days administration. On the 7th and 13th days, antinociceptive effects were assessed using a model of inflammatory nociception, pain induced functional impairment (PIFIR model). The pharmacokinetics of morphine in the presence and absence of metamizol, in the same animals was studied. A developed and validated ion-pair, reverse-phase high performance liquid chromatographic method, with electrochemical detector, for the determination of morphine in plasma samples was used.

The combination of metamizol+morphine (562.3 : 5.6 mg/kg) produced the maximum analgesic efficacy (ABCe), as well as the duration of effect (E_{4h}) when compared with morphine 5.6 mg/kg and metamizol 562.3 mg/kg. The efficacy was practically the same as the one produced by morphine 10 mg/kg. The results were essentially the same when the combination metamizol+morphine was administered either in single or subchronic treatment. Development of

tolerance to the analgesic effect was observed after 6 and 12 days of morphine 5.6 mg/kg administration. However, the analgesic effect produced by the metamizol+morphine combination remained constant (near 100%) during both subchronic treatments. The present data demonstrate that metamizol significantly attenuates the development of tolerance of morphine.

After the simultaneous administration of morphine+metamizol in single dose, a pharmacokinetic interaction was found, which markedly enhanced plasma concentrations of morphine ($p < 0.05$) and the corresponding pharmacokinetic parameters such as area under plasma concentrations-time curve until 4 h (AUC_{0-4}), the area under the plasma concentrations-time curve until 24 h (AUC_{0-24}), maximum plasma concentration (C_{max}) and the concentration at 4h ($C_{p_{4h}}$). While plasma concentrations of morphine markedly diminished after subchronic administration of the drug given alone, the subchronic treatment (6 and 12 days) of the combination metamizol+morphine produced an accumulation of the drug in plasma ($p < 0.001$). Finally, the relation between the pharmacological effects (antinociception and tolerance) and the concentrations of morphine found in plasma, under the experimental conditions established in the study, was confirmed.

No attempt was made in relation to the mechanism of action involved in the inhibition of tolerance development to the antinociceptive effect of the drugs (metamizol and morphine) when they act together. It might be possible that some of the central mechanisms attributed to both drugs (i.e. opioid system activation; descending inhibitor systems activation), as well as the peripheral mechanisms (i.e. L-arginine-ON-GMP system activation) contribute to the observed synergism when both drugs act together, and that this effect is predominant over any other adverse effect. Other pharmacodynamic mechanisms of metamizol can also attenuate the development of tolerance of morphine (i.e. antagonist of NMDA-receptors). As morphine is highly metabolized to its main metabolite, morphine-3 β -glucuronide (which presents antagonistic action to morphine), an enzymatic inhibition of the mechanisms responsible of the elimination of the drug (i.e. glucuronosyl- transferases, UGTs), could also inhibit the development of tolerance.

These findings demonstrate a significant interaction between metamizol and morphine in subchronically treated rats, suggesting that this combination could be useful for the treatment of chronic pain. Clinical usefulness of the combination metamizol+morphine remains to be determined.

INTRODUCCIÓN

Los fármacos analgésicos opioides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento del dolor; sin embargo, ambos compuestos producen efectos adversos que limitan su uso por tiempo prolongado. Los fármacos opioides (morfina) son los fármacos de elección para el tratamiento de síndrome del dolor de moderado a severo (Reisine y Pasternak, 1996), sin embargo producen efectos adversos cuando se administran en dosis altas (constipación y depresión respiratoria), además del desarrollo de tolerancia al efecto analgésico durante el tratamiento crónico (Bhargava, 1994). La aspirina (ácido acetilsalicílico) y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos semejantes (AINEs) son efectivos para algunos tipos de dolor de intensidad baja o moderada, pero su uso está limitado por la irritación gástrica que producen (Vane y Botting, 1996).

Una de las estrategias empleadas para atenuar los efectos adversos consiste en combinar dosis bajas de ambos tipos de compuestos (opioides y AINEs), lo cual puede dar como resultado una mejor respuesta terapéutica. Entre los fármacos AINEs, el metamizol (dipirona) representa una buena alternativa debido a su alta eficacia y buena tolerabilidad gástrica (Rodríguez y col., 1994; Planas y col., 1998) por lo que ha sido ampliamente utilizado en América Latina, Alemania y otros países europeos. En estudios preclínicos realizados previamente se demostró que la administración conjunta de metamizol con morfina aumenta la analgesia inducida por ésta (López-Muñoz, 1994). En dichos estudios se caracterizaron los efectos resultantes de la combinación de estos fármacos en el modelo de nocicepción inflamatoria "*Disfunción inducida por dolor en ratas*" (modelo PIFIR, por sus siglas en inglés), probando un amplio rango de dosis de metamizol (56.2 a 1000 mg/kg, s.c.) y de morfina (1 a 10 mg/kg, s.c.). Entre las 24 combinaciones estudiadas 13 produjeron efectos aditivos y 11 supraaditivos, siendo la combinación de 562.3 mg/kg de metamizol s.c., con 5.6 mg/kg de morfina s.c., administrada en una sola dosis, la que produjo el efecto antinociceptivo máximo (máxima eficacia analgésica).

En algunos casos, la combinación de fármacos opioides con AINEs no sólo puede potenciar los efectos analgésicos, sino también los efectos adversos (Montes y col., 2000). Como se mencionó previamente, el tratamiento prolongado con morfina da lugar al desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo producido. En este caso, se desconoce el efecto que pueda tener la administración conjunta de metamizol sobre el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico producido por morfina en tratamiento crónico. Por lo anterior, es indispensable

evaluar tanto el efecto antinociceptivo como el efecto de tolerancia producidos por la combinación metamizol+morfina de mayor eficacia (562.3 : 5.6 mg/kg), en tratamiento crónico.

Finalmente, se sabe que el efecto farmacológico obtenido con la combinación de dos fármacos puede ser el resultado de las diversas interacciones producidas no sólo a nivel farmacodinámico, sino también farmacocinético. Los estudios farmacocinéticos a su vez, pueden ser de gran utilidad para definir el grado de desarrollo de tolerancia a opioides.

Existe amplia evidencia de la relación que existe entre la farmacocinética de morfina y su principal metabolito, el 3- β -glucurónido de morfina (M3G), con el efecto analgésico así como con el desarrollo de tolerancia encontrado en ratas después del tratamiento crónico (Bhargava y col, 1991; Ekblom y col, 1993a, 1993b). Por tanto, se puede esperar que cualquier interacción originada en la farmacocinética de morfina altere su respuesta farmacológica, tanto en tratamiento agudo como en tratamiento crónico. Se ha demostrado previamente que la interacción con otros fármacos puede provocar la inducción de las enzimas responsables de la glucuronidación de morfina (glucuronosiltransferasas, UGTs), modificando la formación de metabolitos y a su vez el efecto analgésico de la misma (Bock y Bock-Henning, 1987; Mc Quay y col; 1990; Smith y col, 2000). También se sabe que el metamizol se metaboliza extensamente (Bacracheva, 1995) y que comparte algunas de las vías de biotransformación con morfina (glucuronidación y N- desmetilación), por lo cual es probable que compita por algunos de los mecanismos enzimáticos de ésta. Hasta el momento, no se ha realizado estudio alguno sobre la farmacocinética de morfina en presencia de metamizol, por lo cual es importante estudiar la farmacocinética de morfina (5.6 mg/kg) en combinación con metamizol (562.3 mg/kg), paralelamente a la medición del efecto antinociceptivo, tanto en tratamiento agudo como subcrónico (6 y 12 días), y comparar los resultados con los obtenidos después de la administración de morfina sola bajo las mismas condiciones.

TECNO CON
FALLA DE ORIGEN

1. MARCO TEÓRICO

1.1. DOLOR Y NOCICEPCIÓN

Una de las definiciones más aceptadas para el término dolor es la propuesta por la Asociación Internacional para el estudio del dolor: *"El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular actual, o potencial, o bien descrita en términos de tal daño"* (Merskey, 1979; Loeser y Melzack, 1999).

La nocicepción es un término neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neurales por los cuales se detectan los estímulos nocivos (Hyman y Cassem, 1995). La nocicepción es un proceso sensorial que requiere la activación del receptor (transducción), la conducción de la información desde la periferia hasta el sistema nervioso central (transmisión) y la actividad neural que da lugar al control de la vía de transmisión del dolor (modulación). Por tanto, la nocicepción no es un sinónimo de dolor; dicho proceso puede ser necesario para que ocurra el dolor, pero no es suficiente para que el dolor se presente clínicamente. La nocicepción es un fenómeno fisiológico, mientras que el dolor constituye una percepción, que involucra mecanismos más elevados del sistema nervioso central (Turck y Okifuji, 1999).

Las diferencias fisiológicas que afectan el umbral de la nocicepción no son suficientes para explicar las variaciones observadas entre pacientes ante un mismo estímulo. Las investigaciones realizadas en los últimos 30 años han demostrado que diversos factores cognitivos, de comportamiento y afectivos, suelen afectar la percepción del dolor (Turck y Okifuji, 1999; Forth y col., 1995), sin embargo aún no se sabe con exactitud como actúan éstos. Así mismo se han realizado investigaciones para establecer las estructuras del cerebro que puedan estar involucradas en la percepción del dolor (Casey y col., 1994).

1.2. NEUROBIOLOGÍA DE LA NOCICEPCIÓN

La nocicepción incluye 2 etapas, la transducción de los estímulos nocivos por las terminales de los nervios periféricos y la transmisión de dichas señales por el sistema nervioso central (Hyman y Cassem, 1995).

El término "nociceptor" es una abreviación de "noci-receptor" y denota a un receptor de un estímulo nociceptivo (Benedetti y Butler, 1990). Existe la idea de que no hay una estructura histológica específica que actúe como un receptor nociceptivo y de que el mensaje nocivo surge

de la activación de las células nerviosas no mielinizadas que se localizan en las estructuras cutáneas, musculares, viscerales y en ciertos tejidos.

El calor, el frío, la presión, la distensión y los estímulos químicos pueden activar directa o indirectamente a los nociceptores y exceder un determinado umbral. La activación de los nociceptores puede ocurrir a través de la liberación de sustancias endógenas que producen el dolor, o de iones provenientes de la célula, incluyendo la sustancia P, la bradiquinina, la serotonina, la histamina, las prostaglandinas (PGs), los leucotrienos (LTs), y iones H^+ o K^+ . Múltiples mediadores y receptores interactivos contribuyen a la integración y modulación (amplificación) de la señal nociceptiva en la periferia. Las PGs, particularmente la prostaglandina E_2 (PGE_2), actúan indirectamente por sensibilización de los nociceptores y disminución del umbral de dolor.

El mensaje nociceptivo es conducido al sistema nervioso central (SNC) a lo largo de dos tipos de fibras nerviosas: fibras delgadas mielinizadas ($A\delta$) y no mielinizadas (C), que difieren en su velocidad de conducción, aunque no necesariamente todas las fibras son nociceptores. El dolor agudo se transmite a lo largo de las fibras $A\delta$ a una velocidad relativamente alta de 20 m/s. Estas fibras entran a la médula espinal, a través del asta dorsal donde terminan principalmente en la lámina I. El dolor "sordo" se transporta por las fibras C no mielinizadas (Belemonte y Cervero, 1996), a una velocidad mucho más lenta (0.5 a 2 m/s). Se ha propuesto la existencia de nociceptores polimodales no-mielinizados, que responden a los estímulos térmicos, mecánicos y químicos, en tejido cutáneo en el hombre. Las fibras C también entran a la médula espinal a través del asta dorsal y terminan principalmente en las capas externas de la lámina II. El dolor sordo, que puede originarse en los vasos sanguíneos o las vísceras, es más difícil de localizar con exactitud o de cuantificar en términos de intensidad.

La modulación de los impulsos dolorosos puede ocurrir a todo lo largo de las vías neurales ascendentes en la médula espinal, en el cerebro medio y en el tálamo (Bonica, 1990; Melzack y Wall, 1983). Las neuronas de primer orden, provenientes de los nociceptores, se unen a las neuronas de segundo orden en el asta dorsal y continúan por la vía espinotalámica, sin embargo, también hacen sinapsis localmente dentro de la sustancia gelatinosa de la médula espinal. En los puntos de las ramificaciones iniciales pueden ocurrir reflejos locales mediados por la médula espinal.

Los impulsos dolorosos pueden ser modulados por diversos mecanismos durante la transmisión. Dicha modulación ha sido comparada con una "compuerta" inicial a través de la cual pasan los impulsos dolorosos hacia la corteza sensorial. Dependiendo de la situación,

dicha "compuerta" se abre más o menos para que la transmisión del impulso ocurra (Melzack y Wall, 1983).

Cuando las segundas neuronas alcanzan el núcleo ventral posterior del tálamo, algunos de los impulsos se transmiten a una tercera neurona y pasan directamente a la corteza cerebral donde se perciben espaciada y temporalmente. También en el tálamo puede ocurrir una modulación considerable, resultando en una modulación o en una inhibición de la proyección del impulso doloroso. Los impulsos dolorosos, conducidos vía el tracto espinotalámico, pueden también proyectarse lateralmente hacia otras áreas. De esta forma el sistema nervioso autónomo y las reacciones endocrinas pueden ser desencadenados por los estímulos dolorosos iniciales.

1.2.1. Sistemas Neurotransmisor y Neuromodulador del Dolor.

1.2.1.1. Opioides endógenos

El término opioide se usa para definir cualquier compuesto que actúa directamente sobre un receptor opioide produciendo acciones que son estereoespecíficamente antagonizadas por el antagonista opioide, naloxona (Terenius y Wahlström, 1975). Los mecanismos de los opioides pueden modular la transmisión del dolor en diversos niveles anatómicos del sistema nervioso central (Yaksh, 1981; Gebhart, 1982; Bonica, 1990).

Los opioides endógenos se derivan de tres moléculas precursoras principales o prohormonas, compuestas de 260 aminoácidos. Estas moléculas precursoras provienen de genes separados y dan lugar a tres familias de péptidos opioides. Así, la proopiomelanocortina (POMC) es el precursor de β -endorfina (β -END), al igual que para la acetilcolina (Ach) y tres péptidos similares. Otro precursor, proencefalina B, se convierte en dinorfina (DYN) y estructuras relacionadas. Finalmente, la proencefalina A genera la mayor parte de encefalinas (ENK) (Herz y Millan, 1988; Hite, 1991).

Las encefalinas son pentapéptidos que se unen a los receptores opioides y presentan una acción similar a la morfina. Las vías de las encefalinas, generalmente son más cortas y están distribuidas en el sistema nervioso central, con una localización consistente con los mecanismos que controlan el dolor (Gebhart, 1982). Una localización importante y clínicamente relevante es el asta dorsal de la médula espinal, donde los receptores de opioides se localizan en terminales centrales de las neuronas sensoriales aferentes y las neuronas del asta dorsal. Las encefalinas se encuentran también en la sustancia gris periacueductal (SGPA) y en el nucleus raphe magnus (NRM). Se ha encontrado que las encefalinas y dinorfinas coexisten con

la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) en algunas neuronas del asta dorsal (Glazer y col., 1981). En general, los diversos péptidos endógenos actúan principalmente dentro del sistema nervioso central como transmisores locales de neuronas específicas. Adicionalmente, la β -endorfina puede ejercer efectos similares a los opioides a través del torrente sanguíneo, comportándose de esta manera como una hormona.

El conocimiento temprano de los receptores opioides se derivó inicialmente del desarrollo de antagonistas opioides selectivos a ciertos receptores. Los tres tipos principales de receptores a opioides incluyen los receptores mu (μ), kappa (κ) y delta (δ) y se encuentran localizados en diversos niveles de las vías de conducción del dolor (asta dorsal de la médula espinal, cerebro medio y tálamo).

A los subtipos de receptores se les ha asignado empíricamente diferentes papeles funcionales. Los receptores μ se localizan principalmente en el tálamo, el hipotálamo, el bulbo raquídeo rostroventral y el asta dorsal de la médula espinal (Hedner y Nordberg, 1990) y han sido asociados principalmente con la analgesia espinal y supraespinal, depresión respiratoria, euforia, al igual que con inhibición periférica de musculatura lisa (Benedetti y Butler, 1990; Rang y Dale, 1991). Así mismo, la activación continua de los receptores μ ha sido relacionada con la adicción que se presenta después de la administración repetida de los agonistas opioides.

Los receptores tipo kappa (κ) se encuentran presentes en las mismas áreas que ocupan los receptores μ y también en las capas profundas de la corteza cerebral. Los agonistas de receptores kappa producen analgesia espinal, sedación y disforia. Los receptores tipo δ se localizan a lo largo de la neuraxis. Su activación no produce analgesia y es probable que estén involucrados en el desarrollo de tolerancia, náusea, vómito y depresión respiratoria (Benedetti y Butler, 1990; Rang y Dale, 1991). Otra clase adicional de receptores, a la cual se ha referido como tipo *sigma*, no es selectiva a los opioides. Se cree que éstos están asociados con los canales iónicos activados por glutamato y posiblemente representen el sitio de acción de algunos fármacos psicotomiméticos i.e. pentaclorofenol (Wood, 1982). También pueden estar involucrados en la disforia producida por algunos opioides. Su activación no causa analgesia, pero puede dar lugar a taquipnea, delirio y midriasis.

El compuesto sintético naloxona tiene una afinidad alta a los receptores mu, delta y kappa, pero carece de actividad intrínseca, por lo que actúa como antagonista a los receptores opioides. La naloxona bloquea las acciones de todos los péptidos opioides endógenos, al igual que aquellos fármacos opioides sintéticos y es ampliamente utilizada como una herramienta farmacológica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.1.2. Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) fue descrita originalmente en 1948 como una sustancia vasoconstrictora, la cual se forma por conversión enzimática del triptofano vía 5-hidroxitriptofano. La 5-HT es degradada vía desaminación oxidativa por la monoaminoxidasa (MAO) a ácido 5-hidroxiindolacético (Björkman y col., 1990).

La serotonina (5-HT) se identificó inicialmente en el tracto gastrointestinal y posteriormente se demostró que juega un papel importante como neurotransmisor en el SNC. Los cuerpos celulares de las neuronas 5-HT del cerebro se localizan en la línea media del núcleo rafe magnus (NRM) en el mesencéfalo y se proyectan difusamente al prosencéfalo y la médula espinal. La 5-HT actúa como una hormona local en el sistema vascular periférico. Se ha mostrado su coexistencia con la somatostatina, con la sustancia P, y con el polipéptido intestinal vasoactivo (PIV). A la fecha, se han identificado 3 subtipos principales de receptores a serotonina involucrados en la nocicepción: 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃. Los receptores 5-HT₁ han sido identificados principalmente en el SNC, neuronas entéricas, vasos sanguíneos, mucosa y el plexo coroide. Los receptores 5-HT₂ se encuentran principalmente en el SNC, músculos lisos y plaquetas, mientras que los 5-HT₃ se encuentran principalmente en el sistema nervioso periférico, en neuronas aferentes nociceptivas y neuronas entéricas.

La serotonina puede afectar los mecanismos del dolor de diferentes maneras. En los tejidos periféricos, la liberación de la 5-HT puede ser inducida por daño mecánico, calor, radiación, o por la acción de coproductos del daño tisular tales como trombina, colágeno y adrenalina, lo cual puede tener implicaciones para la activación nociceptiva periférica. En el SNC, las neuronas de 5-HT están involucradas en la transmisión nociceptiva al igual que en la inhibición del dolor inducida por los opioides agonistas. La 5-HT tiene un efecto inhibitorio sobre la transmisión del dolor en la médula espinal y en el cerebro. Sólo una parte de este efecto inhibitorio parece ser mediado por los receptores 5-HT₂, mientras que el efecto antinociceptivo inhibitorio dominante ha sido atribuido a los receptores de tipo 5-HT₁. Estudios electrofisiológicos han indicado que la activación de los receptores 5-HT_{1B} origina la inhibición selectiva de neuronas nociceptivas. Otros estudios sugieren que los agonistas de 5-HT_{1A} facilitan las respuestas nociceptivas, mientras que los agonistas 5-HT_{1B} producen una acción antinociceptiva (Lipp, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.1.3. Sustancia P

La sustancia P (SP) es un undecapéptido incluido en la familia de las taquicininas. Otras incluyen a la bradiginina y la neurocinina A y B. El papel exacto de la sustancia P en el control de los mecanismos del dolor no ha sido esclarecido. Se ha observado que tiene un papel algésico y que reduce el umbral del dolor. Sin embargo, aún cuando se ha considerado como neurotransmisor primordial de las vías nociceptivas periféricas aferentes, la SP no tiene un efecto algogénico cuando se administra localmente en las terminaciones cutáneas y no activa las vías aferentes nociceptivas. Por otro lado, la aplicación intratecal de sustancia P puede producir hiperalgesia; lo cual ha sido considerado como evidencia del papel neurotransmisor de la misma en las vías nociceptivas (Meller y Gebhart, 1993; Hunskaar y col., 1985; Sakurada y col., 1990; Lipp, 1991).

1.2.1.4. Aminoácidos excitatorios (AAEs)

Se ha reconocido durante muchos años que algunos aminoácidos como el glutamato, aspartato y posiblemente la homocisteína, existentes en altas concentraciones en el cerebro, pueden ejercer un efecto estimulador poderoso en la actividad neuronal. El L-glutamato y L-aspartato son los principales aminoácidos excitatorios (AAEs) en el sistema nervioso central. Las acciones de los AAEs son mediadas por distintos sistemas de receptores. Se han definido los tres tipos de receptores por sus acciones agonistas selectivas: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) y receptores a kainato. La activación de los receptores a NMDA en el asta dorsal resulta en un incremento de la excitabilidad y la transmisión del dolor (Ferreira y Lorenzetti, 1994). Los AAEs actúan como neurotransmisores nociceptivos en la médula espinal y el cerebro (Björkman, 1995).

1.2.1.5. Óxido nítrico (ON)

El óxido nítrico (ON) se forma durante la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina por la enzima sintetasa del óxido nítrico (SON). Se han descrito por lo menos 6 tipos diferentes de isoenzimas SON. La biosíntesis del ON se lleva a cabo en el endotelio vascular, leucocitos, células de Kuppfer, hepatocitos, fibroblastos y glándulas adrenales (Garthwaite, 1991). Las células endoteliales y células nerviosas contienen una SON dependiente de Ca^{2+} (Moncada, 1991). Se ha propuesto que en el sistema nervioso central el óxido nítrico se produce enzimáticamente en las estructuras postsinápticas como respuesta a la activación de los receptores de AAEs. Después de la formación enzimática, el óxido nítrico difunde para

actuar en los elementos celulares cercanos, probablemente en las terminaciones nerviosas presinápticas. En diversos nervios periféricos, en el asta dorsal y posiblemente en otras partes del SNC, el ON puede formarse presinápticamente y por tanto actuar como neurotransmisor. En cualquier caso, la principal acción del ON es activar la guanilato-ciclase soluble (GCs) y aumentar los niveles de la guanilato-monofosfatasa cíclica (GMPc) en las células.

La inhibición selectiva de la biosíntesis de óxido nítrico por el metiléster de la L-nitroarginina (L-NAME) resulta en una acción antinociceptiva en el ratón tanto después de la administración intraperitoneal (i.p.) como intracerebroventricular (i.c.v.) (Moore y col., 1991). Tanto este estudio como otras investigaciones sugieren que el óxido nítrico juega un papel fisiológico en la promoción de las respuestas dolorosas (Meller y Gebhart, 1993). De manera interesante, la formación del ON en la respuesta a la activación del receptor de NMDA implica que el óxido nítrico puede actuar también como un mediador de los efectos nociceptivos inducidos por el N-metil-D-aspartato (NMDA).

En contraste con lo anterior, otros autores han demostrado la participación local y supraespinal del óxido nítrico en el efecto antinociceptivo de algunos fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (metamizol, diclofenaco) y de morfina (Duarte y col., 1990; 1992; Ferreira y col., 1991). Es decir, a nivel espinal la activación de los receptores a NMDA y por tanto de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc produce nocicepción (el óxido nítrico es pronociceptivo), mientras que la activación de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc tanto a nivel supraespinal como a nivel periférico produce antinocicepción, es decir analgesia.

1.3. ANALGÉSICOS

El tratamiento ideal para aliviar el dolor requiere del uso de fármacos analgésicos que sean efectivos pero que al mismo tiempo no presenten efectos adversos, sin embargo a la fecha no existe el agente que cumpla adecuadamente con estas características.

En un principio, los fármacos analgésicos se clasificaron en agentes con acción central y agentes de acción periférica (Guzmán y Lim, 1968). Dicha clasificación se basó en los resultados obtenidos en un modelo animal de dolor visceral, en el cual la morfina inhibió la respuesta nociceptiva mediante su acción en el sistema nervioso central, mientras que la fenacetina (precursor del paracetamol), así como otros compuestos AAINes, como el ácido acetilsalicílico (aspirina) y derivados de pirazolonas, mostraron tener acciones periféricas.

El efecto analgésico periférico de los AAINes ha sido relacionado con la reducción en la formación de prostanoideos algogénicos (Ferreira y Vane, 1974; Ferreira y col., 1973, 1978,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Vane, 1987). Los AAINes inhiben la ciclooxigenasa en la periferia al igual que en la médula espinal disminuyendo la síntesis de prostaglandinas (PGs), lo cual favorece a su vez la disminución de la hiperalgesia producida por el daño provocado (McCormack, 1994). En la actualidad existe amplia evidencia que demuestra que los AAINes ejercen algunas de sus acciones analgésicas en el sistema nervioso central (Bannwarth y col., 1995; Sacerdote, 1985; Carlsson y col., 1986; Jurna y Brunne, 1990; Neugebauer y col., 1994; Björkman y col., 1990, 1992).

Para muchos tipos de dolor los AAINes proporcionan alivio, sin embargo su utilidad se limita generalmente a dolor de intensidad baja o moderada (Foley, 1985). Adicionalmente se sabe que la mayoría de los fármacos analgésicos tipo aspirina, cuando son empleados en dosis elevadas, son los causantes de graves problemas gastrointestinales tales como hemorragias, que llegan a causar la muerte principalmente en pacientes de edad avanzada (Pearson y Kelberman, 1996; Singh y col., 1996).

Algunos estudios han demostrado que la ciclooxigenasa (COX) existe en al menos 2 isoformas, la COX-1 y la COX-2. La inhibición de la COX-1 interfiere con la función renal, la integridad de la mucosa gástrica y la adhesividad plaquetaria. Diversos efectos adversos originados durante la administración de la mayoría de los AAINes se atribuyen a la inhibición de COX-1. La COX-2 se expresa generalmente después del daño tisular o la inflamación, por lo cual algunas investigaciones se han orientado al desarrollo de fármacos inhibidores selectivos de COX-2. Otros estudios indican que los AAINes no solo actúan sobre COX-1 y COX-2, sino también inhiben la transcripción nuclear del factor κ B que es crítico para la formación genética de citosinas (McCormack, 1994; Beeson, 1999).

Por otro lado, los fármacos opioides son la base para el manejo clínico del dolor postquirúrgico, especialmente en presencia de dolor de moderado a severo. Se ha demostrado que la morfina y otros opioides agonistas ejercen su acción a nivel central al unirse a los receptores μ en el asta dorsal de la médula espinal para impedir la transmisión de la nocicepción y a nivel supraespinal para activar las vías inhibitorias descendentes (Martin, 1984; Lipp, 1991). Sin embargo, la morfina también puede actuar a nivel periférico por distintos mecanismos (Ferreira, 1993; Ferreira y col., 1978; 1991). Se ha observado que la morfina tiene un efecto directo sobre los estados hiperalgésicos inflamatorios (Lorenzetti y Ferreira, 1982; 1985) y además se ha propuesto que la inyección de morfina en la pata de la rata, origina una regulación a la baja ("downregulation") de los receptores del dolor que parece estar mediada por la activación de la vía arginina-óxido nítrico-GMPc (Ferreira, 1993; Duarte y col., 1990; 1992; Ferreira y col., 1991). Por otro lado, existe evidencia del papel que juega la activación de las vías inhibitorias

bulboespinales adrenérgicas y serotoninérgicas en el efecto antinociceptivo de morfina (Yaksh y Rudy, 1978; Yaksh, 1979; Yeomans y col., 1992; Kawamata y col., 1993). Por lo anterior, actualmente se prefiere distinguir entre dos grandes grupos: fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) y fármacos opioides, ya que ambos pueden actuar por mecanismos tanto centrales como periféricos.

Entre los efectos adversos más importantes que presentan los opioides se encuentran: sedación, náusea, vómito, constipación y la depresión respiratoria. Uno de los factores más importantes que limita el uso de los opioides es su capacidad para desarrollar tolerancia farmacológica y dependencia durante su uso prolongado.

1.4. COMBINACIONES DE ANALGÉSICOS

Durante muchos años se han empleado mezclas de fármacos analgésicos a fin de incrementar la eficacia analgésica, logrando también reducir las dosis y con ello reducir los efectos colaterales indeseables (Cass y Frederick, 1962; Moertel y col., 1974; Calimlim y col., 1976, Forbes y col., 1984). Otras asociaciones muy utilizadas son aquéllas que contienen cafeína con fármacos AINEs (Laska y col., 1984; Díaz-Reval y col., 2001) y además se han probado nuevas combinaciones de analgésicos (Rockemann y col., 1996), sin embargo, la mayoría de ellas han sido utilizadas en humanos sin contar con suficientes evidencias preclínicas (farmacodinámicas y farmacocinéticas), acerca de sus ventajas potenciales. Esto, por muchas razones, entre ellas por el tipo de modelos experimentales disponibles para analizar estas interacciones, por el diseño experimental usado para analizar las combinaciones, por la sensibilidad y selectividad del método analítico empleado para determinar el curso temporal de las concentraciones del fármaco, etc.

En la clínica, se ha observado que la administración concomitante de metamizol con morfina reduce el consumo de ésta durante la terapia del dolor post-quirúrgico, permitiendo el control adecuado del dolor con baja incidencia de efectos adversos (Tempel y col., 1996); sin embargo, en la mayoría de estos estudios la selección de las dosis empleadas de ambos fármacos se ha llevado a cabo de manera empírica. En estudios previos López-Muñoz y col. (1993b, 1994, 1995) propusieron utilizar asociaciones de diversos analgésicos que actúan mediante diferentes mecanismos de acción, con el fin de "atacar" el dolor de manera más eficiente, e identificar la(s) combinación(es) "óptima(s)" que produzca(n) el mayor efecto analgésico o antinociceptivo por medio del "Análisis de Superficie de Interacción Sinérgica" (López-Muñoz, 1994, 1995; López-Muñoz y Salazar, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estos estudios se demostró que algunas combinaciones de metamizol+morfina pueden ser benéficas ya que dan lugar a un sinergismo de los efectos antinociceptivos y que estos resultados dependen de la relación de dosis empleada en la combinación (López-Muñoz, 1994; López-Muñoz y col., 1994). Al administrar morfina en cuatro dosis (1.8, 3.2, 5.6 y 10 mg/kg de peso) con seis dosis de metamizol (31.6, 56.2, 100, 177.8, 316.2 y 562.3 mg/kg), se obtuvieron 24 combinaciones distintas, las cuales produjeron efectos sinérgicos (aditivos y supraaditivos). La combinación metamizol (562.3 mg/kg) + morfina (5.6 mg/kg), administrada en dosis única por vía subcutánea, produjo el mayor efecto analgésico (antinociceptivo) de las 24 combinaciones estudiadas (López-Muñoz, 1994). Así mismo se demostró, que esta combinación, produjo un efecto antinociceptivo superior al de los compuestos administrados individualmente, en la misma dosis que aparecen en la combinación, e incluso superior al efecto producido por una dosis de morfina de 10 mg/kg (dosis más alta). Es importante hacer notar que el riesgo de efectos adversos observados con dicha combinación fue menor cuando se comparó con una dosis igualmente eficaz de morfina. Esta combinación, debido a la eficacia analgésica que produce, pudiera ser una alternativa en el tratamiento de dolor crónico, en donde es necesario el tratamiento prolongado con analgésicos y es probable que genere menor grado de tolerancia analgésica, debido a que la dosis de morfina que se emplea en la combinación es mínima.

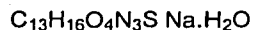
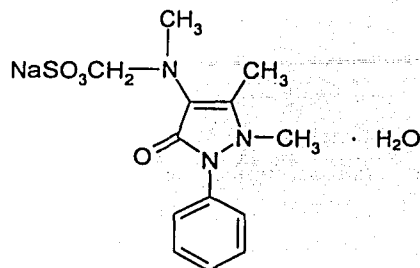
1.5. GENERALIDADES DE METAMIZOL

El metamizol (dipirona, sulpirina) pertenece al grupo de las pirazonas. Estos fármacos se encuentran dentro de los fármacos sintéticos más antiguos, tal como la antipirina sintetizada en 1883. La actividad terapéutica de la antipirina (fenazona) fue incrementada por la sustitución del hidrógeno en C-4 por un radical isopropilo de la propifenazona resultando en la aminofenazona, mejor conocida como aminopirina. Una desventaja de ésta es su relativa insolubilidad en agua. La búsqueda de un compuesto más soluble dio lugar al metamizol, la sal sódica del ácido antipiril-metilaminometano- sulfónico.

1.5.1. Nombre Químico.

Sal sódica monohidratada del ácido [(2-fenil-1,5-dimetil-3-oxo-2,3,-dihidro-1H-pirazol-4-il)(metil)amino] metanosulfónico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.5.2. Fórmula Empírica**1.5.3. Fórmula Estructural****1.5.4. Propiedades Fisicoquímicas****1.5.4.1. Descripción**

El metamizol es un polvo blanco cristalino, o casi blanco, ligeramente amargo.

1.5.4.2. Solubilidad

Fácilmente soluble en agua (1:15), soluble en metanol; ligeramente soluble en alcohol; casi insoluble en éter, acetona, benceno y cloroformo (Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 2000).

1.5.4.3. pH

Su solución acuosa al 10% (p/v) presenta un pH de 6.5 ± 0.3 .

1.5.4.4. Espectro de absorción

El metamizol en solución ácida (HCl 0.1N), presenta un máximo de absorción aproximadamente a una longitud de onda de 258 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.5.5. Farmacocinética de Metamizol

1.5.5.1. Absorción y biotransformación

Los estudios realizados con metamizol indican que éste es un "pro-fármaco" que se hidroliza en el tracto gastrointestinal después de su administración por vía oral y se convierte a su metabolito activo 4-mono-metilaminoantipirina, el cual se absorbe rápida y de manera casi completa como tal, alcanzando concentraciones máximas entre 1 y 1.5 h (Brogden, 1986).

Los datos de concentraciones plasmáticas de la 4-mono-metilaminoantipirina, obtenidos después de la administración oral de 1 000 mg de metamizol en tabletas (Novalgin, Hoesht) en voluntarios sanos, se ajustaron a un modelo de un compartimento con proceso de absorción de primer orden. La concentración máxima en plasma (C_{max}) de 4-mono-metilaminoantipirina fue de 7.52 a 14.99 $\mu\text{g/mL}$ y se alcanzó en las 2 primeras horas (t_{max}) después de la administración oral del metamizol (Asmardi y Jamali, 1983); no se detectaron concentraciones de fármaco inalterado en plasma. La farmacocinética del metamizol fue lineal en un rango de dosis de 750 a 1500 mg.

La 4-mono-metilaminoantipirina es metabolizada posteriormente en el hígado por oxidación (desmetilación) para formar 4-aminoantipirina (noraminopirina), que también presenta actividad, y posteriormente en 4-formil-aminoantipirina (Zylber-Katz y col., 1992). La 4-mono-metilaminoantipirina es metabolizada en hígado por el citocromo P_{450} , por medio de la isoforma CYP3A4 y probablemente también en el sistema nervioso central ya que esta enzima está presente en tejido cerebral (Brune, 1992; Ghersi-Egea y col., 1993).

La 4-aminoantipirina a su vez es acetilada por el sistema polimórfico N-acetiltransferasa a 4-acetil-aminoantipirina, sin embargo la linealidad de la cinética de los metabolitos no está influenciada por el fenotipo acetilador (Brune, 1992). Las concentraciones plasmáticas máximas de 4-aminoantipirina fueron mayores y aparecieron después en los acetiladores lentos que en los acetiladores rápidos. Por otro lado, las concentraciones máximas del metabolito inactivo acetilaminoantipirina, fueron menores en los acetiladores lentos. Los metabolitos activos 4-metilaminoantipirina (noraminopirina) y 4-aminoantipirina son escasamente detectados en plasma después de 24 h de administrada la dosis oral, sin embargo cerca de un 50% de las concentraciones máximas encontradas de acetilaminoantipirina, se encuentran aún a este tiempo).

Se considera que la 4-mono-metilaminoantipirina desempeña el papel principal en la acción analgésica del metamizol. La acción analgésica del metamizol se correlaciona con las concentraciones séricas tanto de la 4-mono-metilaminoantipirina como de la aminoantipirina,

mientras que la formil-aminoantipirina (FAA) y acetil-aminoantipirina (AAA) son inactivas (Weithmann y Alpermann, 1985; Brune, 1992). Las concentraciones de los metabolitos 4-mono-metilaminoantipirina y aminoantipirina, encontradas en saliva 20 minutos después de la ingestión de una solución de metamizol, fueron mayores que las observadas después de la administración de tabletas y correlacionaron adecuadamente con el inicio de la analgesia en sujetos a los cuales se indujo el dolor experimentalmente (Rohdewald y col., 1983).

La farmacocinética del metamizol es lineal en función de la dosis en un rango de 750 a 1500 mg.

1.5.5.2. Distribución

El porcentaje de unión a proteínas de la 4-metilaminoantipirina y la 4-aminoantipirina es de 58 y 48% respectivamente (Brogden, 1986; Zylber-Katz y col., 1985). Los metabolitos del metamizol pasan fácilmente a la leche materna, pero las concentraciones totales de los metabolitos son mínimas en el bebé (Brune, 1992). Se ha demostrado que los metabolitos activos del metamizol penetran al sistema nervioso central después de la administración sistémica del fármaco (Cohen y col., 1998).

1.5.5.3. Eliminación

La vida media promedio de la radioactividad total, después de la administración oral de metamizol- C^{14} fue de 6.9 h, cuando se determinó en un periodo de 8 h. La vida media de los metabolitos metil-aminoantipirina y amino-antipirina fue de 3.3 y 4.8 h respectivamente. La vida media de los metabolitos se ve incrementada durante el embarazo (Nöschel y col., 1980).

El valor promedio para el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de la 4-mono-metilaminoantipirina fue de 2.19 ± 0.23 h (Asmardi y Jamali, 1983; 1985). Valores similares han sido reportados por otros autores (Kraul y col., 1991).

En orina se obtuvo una recuperación total del metabolito 4-mono-metilaminoantipirina de 9.56 a 21 mg en 24 h. A partir de los datos de excreción urinaria se obtuvo un valor de vida media de eliminación comparable al valor obtenido a partir de muestras plasmáticas (1.6- 2.9 h) (Asmardi y Jamali, 1983). La vida media del complejo metilaminoantipirina/aminoantipirina (MAA/AA) es de aproximadamente 2.7 h y su excreción es principalmente renal (Vlahov y col., 1990; Levy y col., 1995). En orina se han detectado seis de los metabolitos de metamizol después de la administración oral. Los cuatro metabolitos identificables (4-formil-aminoantipirina, 4-acetil-aminoantipirina, 4-aminoantipirina y 4-metilaminoantipirina), son los

mismos que se encuentran en plasma y corresponden al 65% de metabolitos excretados en orina en las primeras 24 h después de la ingestión del metamizol (Volz y Kellner, 1980). Más del 90% de los metabolitos 4-metilaminoantipirina y 4-formil-aminoantipirina se excretan en orina (Vesell y col., 1975) y alrededor del 20% de metil-aminoantipirina se excreta en forma de glucurónido. Algunos de estos metabolitos también se eliminan en saliva (Welch y col., 1975), leche materna (Zylber-Katz y col., 1985) y en heces (Christ y col., 1973).

No se han observado cambios clínicamente relevantes en la farmacocinética de metamizol en sujetos de edad avanzada. En los fumadores se ha encontrado una disminución del 50% en el área de concentraciones plasmáticas de 4-metilaminoantipirina, después de la administración del fármaco (Brune, 1992). La eliminación de los metabolitos activos de metamizol, metil-aminoantipirina y aminoantipirina no se ve alterada en pacientes con insuficiencia renal. Sin embargo, la vida media de acetil-aminoantipirina (AAA) y 4-formil-aminoantipirina aumenta cuando la función renal está alterada. Consecuentemente, la excreción urinaria de estos últimos (25 y 12% de la dosis en voluntarios sanos), disminuye en relación directa al aclaramiento de creatinina (Brune, 1992). En pacientes con cirrosis hepática se han observado modificaciones significativas en los parámetros farmacocinéticos de vida media, aclaramiento total y aclaramiento renal de aminoantipirina, acetil-aminoantipirina y formil-aminoantipirina. La velocidad de eliminación de los principales metabolitos de metamizol (aminoantipirina total), también se redujo en pacientes cirróticos (Kraul y col., 1991).

1.5.6. Farmacodinamia de Metamizol

El metamizol es un derivado de la pirazolona ampliamente utilizado tanto en México como en otros países, para el tratamiento del dolor agudo y crónico de los procesos inflamatorios. Así mismo se ha demostrado su eficacia en diversas situaciones clínicas tales como migraña aguda (Bigal y col., 2001; Martínez-Martin y col, 2001), dolor postoperatorio (Lat, 1973; Stanskov y col., 1995; Martín-Duce y col., 1997), cólico renal (García-Alonso y col., 1991) odontalgias (Planas y col; 1998) y en pacientes con cáncer (Rodríguez y col., 1994). En el caso del dolor postoperatorio, el metamizol administrado intravenosamente en una dosis de 2.5 g, ha mostrado una eficacia analgésica equivalente a la dosis oral de 500 mg de ácido acetilsalicílico, 1 g de paracetamol y 50 mg de petidina siendo mejor tolerado que esta última, sin que se presente depresión respiratoria (Brogden, 1986). El metamizol ha sido utilizado también como una alternativa a morfina en el tratamiento del cólico biliar y uretral (Carrasco y col., 1993). En pacientes con cólico agudo uretral o biliar, una dosis de 2.5 g de metamizol administrado intravenosamente, presentó una eficacia similar a 50 mg de petidina. Una dosis de 500 mg de

metamizol presentó una eficacia antipirética comparable a una dosis de 100 mg de nimesulide y mayor que una dosis de 500 mg de ácido acetilsalicílico (Reiner y col., 1984).

La eficacia analgésica del metamizol parece deberse a su rápida biotransformación a su metabolito activo, la 4-monometilaminoantipirina. Tanto la 4-monometilaminoantipirina como la aminoantipirina, han mostrado una actividad antiinflamatoria comparable al ácido acetilsalicílico (aspirina) en estudios de "screening" (Weithmann y Alpermann, 1985). La actividad analgésica es aparente a dosis más bajas que las requeridas para el efecto antiinflamatorio. Una dosis de 0.5 mg/kg administrada intraperitonealmente (i.p.) inhibió significativamente la hiperalgesia inducida por carragenina; por el contrario, el edema fue controlado a dosis mayores a 40 mg/kg. Las dosis efectivas 50 (DE₅₀) para hiperalgesia y edema fueron de 19 mg/kg i.p. y 180 mg/kg i.p., respectivamente (Lorenzetti y Ferreira, 1985).

1.5.6.1. Mecanismos de acción

El metamizol es un derivado de pirazolona comúnmente clasificado como un fármaco que ejerce su acción a nivel periférico, ya que sus metabolitos principales actúan como inhibidores de la ciclooxigenasa (Tatsuo y col., 1994; Brogden, 1986; Brune and Alpermann, 1983), principalmente de la COX-2 (Campos y col., 1999). La buena tolerabilidad gastrointestinal del metamizol puede deberse a la falta de capacidad de la 4-metilaminoantipirina para inhibir la ciclooxigenasa de la mucosa gástrica (Weithmann y Alpermann, 1985).

Se sabe que el metamizol inhibe la síntesis de prostaglandinas tanto a nivel periférico como a nivel central (Abbate y col., 1990; Campos y col., 1999; Shimada y col., 1994). Así mismo, se ha propuesto que el metamizol puede producir un mayor efecto inhibitorio sobre la ciclooxigenasas del sistema nervioso central que sobre la de otros tejidos, lo cual surge de la capacidad del metamizol para inhibir la producción de prostaglandinas en los microsomas de cerebro (Deminska-Kiec y col., 1986). Sin embargo, dicha observación no necesariamente indica que la ciclooxigenasa es particularmente sensible al metamizol, sino más bien a la rápida generación del metabolito activo 4-metilaminoantipirina (noraminopirina), el cual inhibe la síntesis de prostaglandinas de manera similar al ácido acetilsalicílico.

La hipótesis de que la acción analgésica del metamizol se debe a la inhibición de prostaglandinas en el sistema nervioso central ha sido cuestionada por otros autores ya que la inhibición causada *in vivo* por el metamizol ocurre solamente a altas concentraciones por tanto, se considera que este mecanismo es el causante de la actividad antiinflamatoria débil del

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

metamizol, pero sus actividades más relevantes, analgésica y antipirética, deben ser independientes de este modo de acción.

El metamizol posee también actividad antipirética. En un estudio doble ciego, la dosis única de 500 mg de metamizol presentó una eficacia similar a una dosis de 500 mg de ácido acetilsalicílico para la reducción de la fiebre. Inclusive, se ha postulado recientemente que el metamizol, probablemente mediante sus metabolitos activos inhibe la síntesis de prostaglandinas para inducir tanto la antipiresis como la analgesia (Shimada y col., 1994). Algunos estudios en animales y en humanos han mostrado que el metamizol posee también una actividad antiespasmódica y presenta un efecto sobre la agregación plaquetaria secundaria.

Se ha sugerido que el metamizol actúa directamente sobre un evento hiperalgésico, ya sea inhibiendo la activación de la adenilciclase o causando un bloqueo directo del flujo del ión calcio hacia el nociceptor (Lorenzetti y Ferreira, 1985). Sin embargo, otros autores han propuesto que el efecto de metamizol probablemente resulta de un antagonismo de los efectos farmacológicos de las prostaglandinas y no de una inhibición en su síntesis (Weithmann y Alpermann, 1985).

Se ha demostrado que la activación de la vía arginina-óxido nítrico-GMPc, a nivel periférico, también está involucrada en el mecanismo de acción del metamizol (Duarte y col., 1992; Lorenzetti y Ferreira, 1985, 1996; López-Muñoz y col., 1996; Tonussi y Ferreira, 1994).

A diferencia de los derivados arilalcanoicos ácidos, el metamizol parece presentar actividad analgésica central, como se hace evidente por su actividad en la plancha caliente (Schiantarelli y col., 1979) y al aumentar el umbral de dolor en las patas inflamadas y normales de ratones, al usar la prueba de Randall-Selito, e inhibiendo la transmisión del impulso nociceptivo. En la actualidad existe amplia evidencia de los efectos del metamizol a nivel central, incluso se ha demostrado que sus metabolitos penetran al sistema nervioso central después de la administración sistémica del fármaco (Cohen y col., 1998).

El metamizol presenta también acción espinal y supraespinal (Beirith y col., 1998; Akman y col., 1996). Se ha postulado que metamizol produce efectos centrales antinociceptivos al activar las vías descendentes inhibitorias provenientes de la sustancia gris periacueductal y ejercer un efecto inhibitorio sobre la transmisión del impulso a nivel espinal (Carlsson y col., 1986, 1988; Carlsson y Jurna, 1987). La microinyección de metamizol en la sustancia gris periacueductal reduce la actividad de los axones ascendentes espinales, generada por la activación de las fibras C periféricas y produce antinocicepción en el modelo de "tail- flick"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Carlsson y Jurna, 1987; Carlson y col., 1986, 1988; Gelgor y col., 1992; Tortorici y Vanegas, 1994).

Neugebauer y col. (1994) investigaron los efectos periféricos y espinales de metamizol en un modelo de artritis experimental aguda en la rodilla de gato. Los resultados mostraron que el metamizol causa efectos antinociceptivos y analgésico no sólo mediante acción periférica sino también mediante un efecto central, sugiriendo que la médula espinal es el principal sitio de acción de este compuesto.

Los efectos centrales del metamizol han sido asociados al sistema opioide endógeno, ya que su efecto antinociceptivo es bloqueado por la administración de naloxona (Tortorici y col., 1996). Así mismo, existe evidencia de que el metamizol es capaz de estimular la liberación de β -endorfinas, tanto a nivel de pituitaria como de hipotálamo (Vlaskovska y col., 1989).

También se ha establecido una posible interferencia del metamizol con la actividad nociceptiva del glutamato a nivel central (Beirith y col., 1998), asociada parcialmente a una inhibición en los receptores a glutamato o bien, con la modulación pre y postsináptica de la liberación y/o acción del glutamato a nivel espinal.

1.5.7. Efectos Adversos de Metamizol

Los efectos adversos asociados con el uso del metamizol incluyen reacciones alérgicas cutáneas y broncoespasmos, shock anafiláctico, nefrotoxicidad e inhibición de la agregación plaquetaria (Weithmann y Alpermann, 1985). Existen reportes de alteraciones en la función plaquetaria y prolongación en el tiempo de protrombina cuando se administra concomitantemente con cumarínicos (Machin y Mackie, 1992).

La seguridad del uso del metamizol ha sido cuestionada por muchos años debido al posible riesgo de agranulocitosis mortal. En los años 70's el riesgo asociado al uso del metamizol fue de 0.1%, sin embargo la frecuencia de este efecto adverso fue sobrestimada inicialmente (Arellano y Sacristán, 1990). El Estudio Internacional de Agranulocitosis y Anemia Aplásica (1986) incluyó un estudio de control de casos basado en la población de Israel y en seis países de Europa. En este estudio se encontró que el metamizol (dipirona), los salicilatos, las butazonas y la indometacina aumentan el riesgo de agranulocitosis, variando desde 0.06 hasta 0.6 casos por millón de usuarios. El metamizol puede promover el desarrollo de agranulocitosis más frecuentemente que el ácido acetilsalicílico (aspirina) aún cuando la incidencia es muy baja (5 casos por millón), mientras que la hemorragia intestinal severa provocada por este último es un evento relativamente común (5 casos en 10 000). Por otro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lado, los salicilatos, la indometacina, el diclofenaco y el piroxicam aumentan el riesgo de anemia aplásica (0.08 a 0.3 por millón de usuarios).

En muchos países, incluyendo México, Brasil, España y Alemania, el metamizol es utilizado ampliamente y se considera seguro (Stanskov y col., 1995; García-Alonso y col., 1991; Bigal y col., 2001; Martínez-Martin y col., 2001). En algunos estudios clínicos controlados se ha demostrado que el riesgo de agranulocitosis asociado al uso del metamizol es menor a 1.1 por millón de usuarios y que el riesgo de anemia aplásica es cercano a cero (Kaufman y col., 1996; Van-der-Kauw y col., 1998). En otros estudios en los que han participado numerosos centros hospitalarios, se ha comprobado la seguridad del uso del metamizol durante tratamientos prolongados (Arellano y Sacristán, 1990; Kaufman y col., 1996; Van-der-Kauw y col., 1998).

A diferencia de otros AAINes, el metamizol presenta buena tolerabilidad gastrointestinal, debido a su baja capacidad para inhibir la ciclooxigenasa de la mucosa gástrica (Weithmann y Alpermann, 1985), además de inhibir preferentemente la COX-2 (Campos y col., 1999). El metamizol ha sido ampliamente utilizado por décadas en todo el mundo sin que se haya reportado ningún episodio hemorrágico específicamente documentado. Por el contrario, la información derivada de un estudio realizado en EEUU, Suecia y Hungría, mostró que el uso de salicilatos, piroxicam y naproxeno se asoció con hemorragias de vías digestivas altas en una proporción de 50 a 172 casos por millón de usuarios (Brune, 1992). En un estudio realizado en una población de diez millones de usuarios de fármacos AAINes, en Alemania, España y otros países, el número de muertes fue de 12.7, 1.4 y 2.5 para ácido acetilsalicílico, paracetamol y metamizol, respectivamente (Martínez y Hoechst, 1992).

Es importante notar que el uso del metamizol no representa un riesgo mayor que el del ácido acetilsalicílico u otros AAINes y que posee ventajas frente a diversas situaciones clínicas en las que otros compuestos no se pueden utilizar debido al perfil particular de riesgo que presentan y donde los opioides llegan a ser poco efectivos en tratamiento crónico (desarrollo de tolerancia). Únicamente el análisis racional de las ventajas y desventajas de los fármacos analgésicos será capaz de brindar una terapia mas adecuada al paciente, con mínimos riesgos de efectos adversos (Baar y col., 1992).

1.6. GENERALIDADES DE MORFINA

La morfina es el principal constituyente alcaloide del opio, se encuentra en el látex seco exudado por las cápsulas no maduras del *Papaver somniferum*. Sertürner, un farmacéutico alemán lo aisló por primera vez en 1805, y lo llamó *Morphia* (Morpheo, dios griego del sueño). El isómero levo es el enantiómero activo. La (-) morfina es el analgésico prototipo de los opioides, empleado en la práctica clínica y el cual es considerado como referencia para comparar otros fármacos analgésicos tanto opioides como no opioides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

1.6.1. Nombre Químico

- Morfinano-3,6-diol, 7,8-didehidro-4,5-epoxi-17-metil-(5 α ,6 $\alpha\alpha$)
- 7,8-Didehidro-4,5-epoxi-17-metil morfinano-3,6,diol
- 7,8-Didehidro-4,5 α epoxi-3,6- α dihidroxi-N-metil-morfinano(5R,6S)-4,5-epoxi-N-etilmorfin-7-eno-3,6-diol
- Morfinano-3,6-diol,7,8-didehidro-4,5-epoxi-17-metil-(5 α ,6 clorhidrato).
(Clorhidrato de morfina)

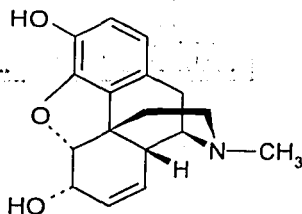
1.6.2. Fórmula Empírica

$C_{17}H_{19}NO_3$ (Morfina)

$C_{17}H_{20}ClNO_3$ (Clorhidrato de morfina)

$C_{34}H_{40}N_2O_{10}S$ (Sulfato de morfina anhidro)

1.6.3. Fórmula Estructural



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6.4. Propiedades Fisicoquímicas

1.6.4.1. Rango de fusión

La morfina funde entre 254-256.4°C con descomposición. El clorhidrato de morfina funde aproximadamente a 250°C con descomposición (Muhtadi, 1988).

1.6.4.2. Solubilidad

Un gramo de morfina se disuelve en aproximadamente 5 000 mL de agua, 1 100 mL de agua hirviendo, 210 mL de etanol, 98 mL de alcohol hirviendo, 1 220 mL de cloroformo, 6 250 mL de éter, 114 mL de alcohol amílico, 10 mL de metanol hirviendo, 525 mL de acetato de etilo (Muhtadi, 1988). Es fácilmente soluble en soluciones de hidróxidos, fenol, cresoles, moderadamente soluble en mezclas de cloroformo con alcoholes; ligeramente soluble en benceno y amoniaco.

1.6.4.3. pH y pKa

Una solución saturada de morfina presenta un pH de 8.5. La del clorhidrato de morfina un pH de 5.0 y la de sulfato de morfina de 4.8 (Kaufmann y col., 1975). La morfina y todos sus congéneres activos son bases orgánicas (aminas) con valores de pKa entre 8.0 y 9.5. El pKa de morfina es aproximadamente de 8.0 (Kaufmann y col., 1975).

1.6.4.4. Absorción al U.V.

El espectro de absorción de morfina monohidratada en etanol presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 286 nm ($E_{1\%,1\text{ cm}} = 59.44$) y en una solución de hidróxido de sodio (0.1N) a una longitud de onda de 250 nm ($E_{1\%,1\text{ cm}} = 175$) y a 298 nm ($E_{1\%,1\text{ cm}} = 75.6$) (Muhtadi, 1988).

1.6.5. Farmacocinética de Morfina

1.6.5.1. Absorción

La farmacocinética de morfina administrada por vía oral en solución o tabletas de liberación controlada, es bien conocida (Glare y col., 1991; Hasseltröm y Säwe, 1993). La biodisponibilidad absoluta de morfina no excede del 20% debido a un metabolismo intestinal considerable y a un efecto de primer paso hepático, el cual produce metabolitos polares, tanto activos (morfina-6 glucurónido o M6G) como inactivos (morfina-3-glucurónido o M3G) (Portenoy

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y col., 1991a, 1991b). El efecto producido varía dependiendo de la vía de administración (Osborne y col., 1990). Así, el efecto de una dosis dada por vía oral es menor que el alcanzado después de la administración parenteral de la misma dosis.

La morfina se absorbe rápidamente después de la administración intramuscular y subcutánea produciendo niveles de morfina inalterada entre los 15 min a 3 horas. Las concentraciones plasmáticas alcanzadas de morfina fueron casi idénticas en voluntarios que recibieron la misma dosis por vía subcutánea o intramuscular. También se absorbe a partir de la mucosa nasal (Glare y col., 1991).

1.6.5.2. Distribución

La morfina presenta una solubilidad baja en lípidos y un pKa de 8.0. En el pH fisiológico sólo alrededor de un 20% no está ionizada (Kaufmann y col., 1975). La unión a proteínas plasmáticas depende de la edad; en infantes prematuros menos del 20% se encuentra unida a proteínas (Bhat y col., 1990; Mc Rorie y col., 1992) y aproximadamente el 35% está unida en los adultos (Olsen, 1975). Esta proporción se ve reducida en pacientes con disfunción renal.

La morfina libre se distribuye rápidamente para acumularse en los tejidos parenquimatosos de riñón, hígado, pulmón y bazo. También se encuentra presente en el músculo esquelético, pero en menores concentraciones que en tejidos parenquimatosos. A las 24 horas después de la administración de la última dosis, las concentraciones plasmáticas son muy bajas. En comparación con otros opioides como codeína, heroína y metadona, la morfina atraviesa la barrera hematoencefálica en una proporción mucho menor, aunque se ha observado que sus metabolitos, morfina-3 β -glucurónido (M3G) y morfina-6 β -glucurónido (M6G), presentan la suficiente lipofiliidad para atravesar dicha barrera y alcanzar concentraciones considerables a nivel cerebral (Yoshimura y col., 1973; Carrupt y col., 1991; Wu y col., 1997). En los pacientes ancianos, el volumen de distribución es menor al obtenido en adultos jóvenes y las concentraciones plasmáticas iniciales de morfina son proporcionalmente mayores.

1.6.5.3. Biotransformación

La biotransformación de morfina en humanos se lleva a cabo en el hígado principalmente por conjugación con ácido glucurónico (fase II), catalizada por la enzima uridin-5'-difosfato-(UDP)-glucuronosiltransferasa (UGT) mediante la isoforma UGT2B7, para formar morfina-3 β -glucurónido (M3G) y morfina-6 β -glucurónido (M6G) (Coffman y col., 1997). En menor proporción se forma el 3,6-diglucurónido de morfina; o bien se conjuga con ácido

sulfúrico para dar el éter 3-sulfato de morfina. En el humano, después de la administración oral, la conversión de morfina a morfina-6 β -glucuronido representa aproximadamente del 8 al 10% de la dosis, mientras que morfina-3 β -glucuronido, principal metabolito de morfina, representa aproximadamente el 40% de la dosis, calculados con base a su recuperación en orina (Van Dongen y col., 1994). Otras vías metabólicas incluyen la N-desmetilación de la morfina para dar normorfina, mediante la enzima CYP3A4 (Fromm y col., 1997), que se conjuga posteriormente para dar 6-glucuronido de normorfina (Carrupt y col., 1991; Kroemer y Klotz, 1992).

En un estudio de perfusión en hígado, Dahlström y col. (1976) estimaron una extracción en el hígado del 75% empleando un flujo hepático de 60 mL/min/kg. Se ha reportado que la fracción de morfina excretada inalterada en orina es menor al 10% (van Crugten y col., 1991). Es probable que ocurra metabolismo extrahepático ya que la uridin-difosfato-glucuronosiltransferasa (UDPGT) que cataliza la glucuronidación de morfina, está presente en el hígado, el tracto gastrointestinal, los riñones y el cerebro (Boerner y col., 1975). Algunos estudios realizados en rata, perro, borrego y mono, indican que el hígado es un órgano importante, aunque no el único que interviene en la eliminación de morfina. Tanto el intestino de la rata (Mistry y Houston, 1987; Dahlström y Paalzow, 1978) como el hígado de la rata (Horton y Pollack, 1991), contribuyen significativamente a la eliminación metabólica de morfina en esta especie..

Los glucuronidos de morfina son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica debido a su alta lipofiliidad (Carrupt y col., 1991; Aasmundstad y col., 1995; Abbruscato y col., 1997) y producir efectos farmacológicos en el sistema nervioso central. Las concentraciones de morfina y sus metabolitos en plasma (Bhargava y col., 1991) y en líquido cefalorraquídeo (Bhargava y col., 1998) han sido correlacionadas con el efecto antinociceptivo observado en ratas.

La farmacocinética de los metabolitos de morfina, adicionalmente a la del compuesto inalterado, ha sido extensamente estudiada debido a la evidencia que existe acerca de la actividad agonista del M6G en animales (Pasternak y col., 1987; Gong y col., 1991; Milne y col., 1996) y en humanos (Peat y col., 1991; Osborne y col., 1992; Milne y col., 1996). Tanto en animales como en el humano, el M6G produce analgesia (Frances y col., 1992; Osborne y col., 1988; 1990; 1992) y se estima que su potencia es 4 veces mayor que la de morfina inalterada después de administración s.c., 45 a 200 veces en administración i.c.v. y 20 veces mayor administrado directamente en la sustancia gris periacueductal (Shimomura y col., 1971; Pasternak y col., 1987; Hanna y col., 1990). Por el contrario, se ha demostrado que el M3G presenta actividad antagonista (Smith y col., 1990) y puede causar hiperalgesia cuando se administra por vía intracerebroventricular e intratecal (Kroemer y Klotz, 1992). Así mismo se ha

encontrado que puede antagonizar la analgesia inducida por morfina y por M6G, además del papel potencial que se le ha atribuido en el desarrollo de tolerancia (Ekblom y col., 1993a, 1993b). Sin embargo, los estudios existentes a este respecto están limitados por las concentraciones sistémicas tan altas de M3G utilizadas, o porque el metabolito se administró directamente en el sistema nervioso central. Ninguna de estas situaciones es similar a la liberación de M3G al cerebro después de su formación sistémica a partir de morfina (Oullet y Pollack, 1997a, 1997b).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la farmacocinética de morfina en pacientes adultos, niños y recién nacidos (Neumann y col., 1982; Chay y col., 1992) para tratar de explicar diversos efectos observados después de la administración de morfina. Durante la administración crónica de morfina, ambos metabolitos se acumulan en mayor proporción que la morfina, con una relación de metabolito: fármaco inalterado de 34 y 3.9 para el 3- y 6-glucurónido respectivamente (Säwe y col., 1983; Säwe, 1986a, 1986b). Existe evidencia de la presencia de efectos tóxicos después de la administración de morfina, asociados con concentraciones altas de M6G en pacientes con daño renal (Somogyi y col., 1993).

1.6.5.4. Eliminación

Después de la administración de una dosis de 5 mg de morfina por vía intravenosa en voluntarios sanos, se obtuvo una vida media de eliminación (λ_2) de 1.8 ± 0.4 h y un valor promedio para la depuración global de 21.1 ± 3.4 mL/min/kg (1.27 ± 0.2 L/h/kg), asumiendo un modelo biexponencial (Hasseltröm y Säwe, 1993). Sin embargo, estos autores encontraron una fase terminal más lenta en algunos de los sujetos, tanto para morfina como para sus metabolitos, siendo las vidas medias para morfina, M3G y M6G de 15.1 ± 6.5 h, 11.2 ± 2.7 , y 12.9 ± 4.5 h respectivamente. En estos casos, la farmacocinética se representó por un modelo triexponencial y la vida media reportada se calculó tomando en cuenta la constante de velocidad de la última fase (λ_3). Los autores atribuyeron esta fase más lenta a la presencia de un ciclo enterohepático. Se sabe que los glucurónidos pueden ser hidrolizados nuevamente por la flora colónica después de ser excretados por vía biliar al lumen intestinal y que el compuesto original puede ser subsecuentemente reabsorbido, lo cual prolonga la vida media del fármaco. Tanto morfina como sus metabolitos M3G y M6G han sido encontrados en bilis de pacientes. Existe amplia evidencia acerca de recirculación enterohepática de la morfina en humanos. En algunos estudios realizados en voluntarios sanos se ha observado un incremento ligero en las concentraciones plasmáticas de morfina aproximadamente 4 h después de la administración del fármaco, lo cual es más marcado en formulaciones de liberación controlada (Bourget y col.,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1995). Este hecho ha sido descrito por diversos autores y se atribuye también a un ciclo enterohepático (Hasseltröm y Sawe, 1993; Horton y Pollack, 1991).

La farmacocinética de morfina después de la administración de un bolo intravenoso seguido de infusión intravenosa por 4h en voluntarios sanos fue adecuadamente descrita por un modelo biexponencial (Lötsch y col., 1998). Al aplicar este modelo se obtuvo un valor de depuración global (Cl_T) de 162 ± 32 mL/min (2.2 ± 0.4 mL/min/kg) para M6G y de 32.7 ± 6 mL/min/kg para morfina. El volumen de distribución al estado estacionario (V_{ss}) para M6G fue de 0.12 ± 0.02 L/h, y el V_{ss} para morfina fue de 1.8 ± 0.3 L/h, con lo cual se obtuvo un tiempo medio de residencia (TMR) de 1.8 ± 0.4 h para morfina. La vida media de eliminación de morfina ($t_{1/2}$) calculada por estos autores fue de 1.78 ± 0.4 h, lo que concuerda con el valor de 1.8 ± 0.4 h determinado por Hasseltröm y Sawe (1993) a partir de λ_2 (modelo biexponencial).

La morfina se excreta en un 90% en orina durante las primeras 24 horas después de su administración. Entre un 8.5 y 12% de la dosis se elimina en forma inalterada, mientras que entre un 11 a 60% se excreta en forma de metabolitos. El resto se elimina como otros metabolitos y/o sus glucurónidos correspondientes (normorfina, glucurónido de normorfina, 3,6-diglicurónido de morfina, etc.). La principal vía de eliminación de los metabolitos es por filtración glomerular, siendo la mayor proporción eliminada como morfina-3 β -glucurónido, aunque también existe evidencia de un proceso de secreción tubular.

1.6.6. Farmacocinética de Morfina en Rata

La farmacocinética de morfina y sus metabolitos en ratas, así como su relación con el efecto antinociceptivo y el desarrollo de tolerancia farmacológica, han sido ampliamente estudiadas por distintos autores (Bouw y col., 2000; Bhargava y col., 1991; Yoburn y col., 1985; Dahlström, y Paalzow, 1975; Dahlström y col., 1976, 1977, 1978).

Después de la administración intravenosa de una dosis de 2.5 mg/kg de morfina en ratas se obtuvo una concentración plasmática máxima de morfina (C_{max}) de 234.5 ± 36.76 ng/mL y un área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (ABC) de 298.08 ± 18.75 ngh/mL. Estos valores aumentaron proporcionalmente con las dosis empleadas de 5 y 10 mg/kg ($r = 0.998$). La morfina es metabolizada en su mayor parte en el hígado de la rata a morfina-3 β -glucurónido (M3G). A diferencia del humano, en rata no se ha detectado la presencia del metabolito morfina-6 β -glucurónido (Oguri y col., 1990; Kuo y col., 1991; Ekblom y col., 1993a, 1993b). Sólo del 6 al 7% de la dosis administrada aparece en orina como normorfina y alrededor del 2% en las heces, independientemente de la dosis administrada (Oguri y col., 1990).

Los valores para vida media de eliminación ($t_{1/2}$) obtenidos después de la administración de una dosis de 2.5 mg/kg de morfina (bolo intravenoso) en ratas fue de 5.6 ± 0.15 h, la constante de la fase terminal (o de eliminación) fue 0.124 ± 0.003 h⁻¹; el tiempo medio de residencia (TMR) fue de 4.29 ± 0.28 h, el volumen de distribución al estado estacionario (V_{ss}) fue de 26.88 ± 2.75 L/kg y la depuración total (Cl_T) de 104.37 ± 6.83 mL/h/kg (Bhargava y col., 1991). El valor para depuración global obtenido fue mayor que el valor de 70 mL/min/kg reportado previamente por otros autores (Dahlström y Paalzow 1975; Gabrielson y Paalzow, 1983; Iwamoto y Klasson 1977; Yoburn y col., 1985). Estas diferencias pueden deberse a distintos esquemas de muestreo o bien al método analítico empleado en la determinación de morfina (Ekblom y col., 1993b). Con el ajuste de un modelo de tres compartimentos a los datos obtenidos después de la administración intravenosa de morfina (bolo) en ratas se obtuvo un tiempo de vida media de eliminación (λ_3) de 6.2 ± 0.8 h (Ekblom y col., 1993b). Estos autores encontraron una diferencia ligera, aunque no significativa entre los valores de depuración global (Cl_T) después de la dosis intravenosa (148 ± 58 mL/min/kg) y el valor obtenido durante la infusión constante (108 ± 32 mL/min/kg).

La recirculación enterohepática de morfina en la rata ha sido documentada ampliamente por diversos autores (Dahlström y Paalzow, 1978; Horton y Pollack, 1991).

La falta de formación del 6-glucurónido de morfina en la rata y el hecho de que el 3-glucurónido antagoniza sólo en parte el efecto antinociceptivo de morfina, permiten que la rata sea considerada como un modelo ideal para estudiar el efecto antinociceptivo de morfina "per se" sin que se confundan los efectos de los metabolitos (Gardmark y col., 1993; Ekblom y col., 1993; Oullet y Pollack, 1997a; 1997b).

1.6.7. Farmacodinamia de Morfina

La morfina y sus congéneres son capaces de modificar los efectos de los impulsos dolorosos sobre el sistema nervioso central. En el hombre, los compuestos opioides producen analgesia, somnolencia, modificaciones en el estado de ánimo y embotamiento. Una característica importante de la analgesia es que se produce sin pérdida de conciencia (Harvey y Champu, 1992). En algunos pacientes puede producirse además euforia. La percepción del dolor puede mantenerse o disminuir, pero la capacidad de interpretar, integrar y reaccionar frente al dolor disminuye con efectos simultáneos de sedación, euforia y reducción de la ansiedad y el sufrimiento. El dolor sordo continuo se alivia con mayor efectividad que el dolor

agudo intermitente, pero con suficiente cantidad de morfina resulta posible aliviar incluso el dolor intenso que se asocia con cólico renal o biliar (Jaffe y Martin, 1996).

Cuando se administran dosis de morfina a un individuo normal que no presenta dolor, se producen comúnmente náuseas y en ocasiones también vómito. Existe sensación de somnolencia, dificultad de concentración, apatía y disminución de la actividad física. A medida que se aumenta la dosis, los efectos subjetivos, analgésicos y tóxicos, incluyendo la depresión respiratoria se hacen más pronunciados (Harvey y Champu, 1992).

De los restantes efectos de los opioides, el único útil es la supresión de la tos. A nivel periférico, la reducción de los movimientos propulsores del intestino resulta de utilidad en el control de ciertos tipos de diarrea, aunque en la mayor parte de los casos el estreñimiento es un efecto secundario frecuente (Harvey y Champu, 1992).

1.6.7.1. Mecanismos y sitios de acción de analgesia de morfina

La morfina y otros compuestos opioides agonistas inhiben selectivamente varios reflejos nociceptivos, sin que se vean afectadas otras modalidades no sensitivas (Yaksh y Noueihed, 1985). La morfina ejerce su acción actuando por el mismo mecanismo de la encefalina a distintos niveles en el sistema nervioso central, al unirse a receptores opioides específicos (receptores μ principalmente), tanto a nivel espinal como supraespinal (Martin, 1984; Jaffe y Martin, 1996; Lipp, 1991). El efecto analgésico de morfina y de su metabolito morfina-6-glucurónido resulta de la interacción con estos receptores, con una alta afinidad por el subtipo μ_1 a nivel supraespinal (Bodnar y col., 1988), mientras que a nivel espinal involucra receptores μ_2 (Paul y col., 1989), δ (Befortky- Kieffer, 1997) y κ (Simonin y col., 1995). Los receptores μ se encuentran acoplados a una proteína G inhibitoria (G_i) que cuando se activan disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa (AC), disminuyendo la concentración intracelular del 3',5'-adenosin-monofosfato cíclico (AMPC) e incrementando el 3',5'-guanoin-monofosfato cíclico (GMPc) intracelular (Minneman e Iversen, 1976).

Además activa receptores, disminuyendo el flujo de Ca^{2+} (Wang y col., 1989; Guerrero-Muñoz y col., 1979) y activando canales de K^+ sensibles a ATP (Beirith y col., 1998), resultando en una hiperpolarización de las neuronas (Behnehani y col., 1990; Dickenson, 1991). Los mecanismos de morfina en el asta dorsal de la médula espinal pueden ser pre y postsinápticos. Las neuronas presinápticas se hiperpolarizan y se inhibe la actividad de las fibras aferentes primarias, disminuyendo la liberación de neurotransmisores asociados con la transmisión del dolor como la sustancia P (Levine y col., 1993). Las neuronas postsinápticas se hiperpolarizan y

se inhibe la transmisión de la información nociceptiva a los centros superiores (Cesselin y col., 1999).

A nivel supraespinal la morfina activa la vía descendente inhibitoria de la nocicepción (Heinricher y col., 1992). Actúa en receptores μ localizados abundantemente en la sustancia gris periacueductal (SGPA) provocando una inhibición del ácido γ -aminobutírico (GABA) lo cual desencadena mecanismos serotoninérgicos y noradrenérgicos hacia médula espinal bloqueando la nocicepción. Existe evidencia abundante del papel que juega la activación de las vías inhibitorias bulboespinales adrenérgicas y serotoninérgicas (Yaksh, 1979; Yeomans y col., 1992; Kawamata y col., 1993). También induce analgesia vía el sistema adrenérgico descendente al inhibir la actividad neuronal en el LC (hiperpolarización de neuronas) con la consecuente disminución de GABA, lo cual aumenta la analgesia.

Adicionalmente se ha observado que la morfina tiene un efecto directo sobre los estados hiperalgésicos antiinflamatorios (Lorenzetti y Ferreira, 1982; 1985). Ferreira (1993) propuso que la inyección de morfina origina una "regulación a la baja" ("downregulation") de los receptores del dolor, que parece estar mediada por la activación a nivel periférico de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc (Duarte y col., 1990; Ferreira y col., 1991), sugiriendo que el incremento de GMPc bloquea la hiperalgesia directamente en los nociceptores (Duarte y col., 1990).

Los mecanismos por los cuales los opioides producen euforia, tranquilidad y otras alteraciones del estado de ánimo, no se han aclarado totalmente. Parece ser que la euforia es causada por estimulación del segmento ventral (Myceck y col., 1992). El locus coeruleus contiene neuronas noradrenérgicas y concentraciones altas de receptores opioides y se piensa que presentan un papel crítico en los sentimientos de alarma, pánico, miedo y ansiedad (Olivares y Beeson, 1988).

Los opioides modifican el punto de equilibrio de los mecanismos termorreguladores del hipotálamo, de modo que la temperatura corporal desciende levemente. Sin embargo las dosis crónicas elevadas aumentan la temperatura corporal (hipertermia).

La administración de opioides μ incrementa la concentración de prolactina en el plasma, probablemente por la inhibición dopaminérgica de su secreción. Si bien los agonistas κ inhiben la liberación de hormona antidiurética y provocan diuresis, la administración de agonistas opioides μ tiende a ejercer efectos antidiuréticos en el ser humano (Myceck y col., 1992.)

La morfina y la mayoría de los agonistas opioides μ y κ causan constricción de la pupila en el ser humano. La miosis se debe a la acción excitatoria sobre el segmento autónomo del núcleo del nervio oculomotor (Myceck y col., 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los opioides agonistas deprimen la respiración, la cual se atribuye, por lo menos en parte, a un efecto directo sobre los centros respiratorios del tallo encefálico (Martin, 1984). Las náuseas y los vómitos producidos por los opioides son efectos secundarios desagradables causados por la estimulación directa de la zona quimiorreceptora disparadora (ZQG) en el área posterior del bulbo. La morfina y algunos otros opioides inducen la liberación de histamina, que a veces desempeña un papel importante en la hipotensión (Howlet y Rees, 1986).

1.6.8. Efectos Adversos

La acción de la morfina tanto a nivel periférico, como a nivel del sistema nervioso central contribuye también a los efectos colaterales indeseables. Los más comunes son náuseas, vómito, anorexia, estreñimiento (Harvey y Champu, 1992), disminución de la secreción gástrica, efectos hipertérmicos (Bhargava y col., 1991), miosis, euforia o disforia (Echhardt y col., 1998), depresión respiratoria e hipotensión (Cosnier y col., 1976), además de la tolerancia farmacológica, dependencia física y psicológica que se presenta después del uso del fármaco en tratamiento prolongado (crónico) (Salem y Hope, 1999).

1.6.8.1. Tolerancia y dependencia

Dentro de las reacciones adversas, las que limitan de forma más crítica del empleo frecuente de los opioides son la tolerancia, la dependencia y la depresión respiratoria, que es la causa de fallecimiento por sobredosis de estos fármacos (Bhargava, 1994). La tolerancia es un cambio cuantitativo en la sensibilidad al fármaco y está indicado por la disminución del efecto farmacodinámico después de la exposición repetida al mismo. Lo anterior origina la necesidad de incrementar la dosis del opioide con el fin de conseguir el mismo nivel de analgesia. Aunque la dosis letal se altera en forma significativa en los individuos tolerantes, siempre existe una dosis capaz de producir la muerte por depresión respiratoria.

El mecanismo de tolerancia al efecto farmacológico puede atribuirse a cambios en la disposición (farmacocinética) del fármaco después de la exposición repetida al mismo, en cuyo caso se le ha denominado "**tolerancia farmacocinética**" o bien a una alteración celular o cambios adaptativos en el receptor refiriéndose en este caso a la "**tolerancia farmacodinámica**" (Cox, 1990; Andersson, 1986; Shargel y Yu, 1999). Los estudios farmacocinéticos realizados paralelamente a la medición del efecto farmacológico pueden ayudar a diferenciar entre tolerancia farmacodinámica y tolerancia farmacocinética (Commissaris y col., 1982; Johansson y col., 1992).

Algunos autores consideran que el mecanismo de aparición de tolerancia y dependencia física -presente después del tratamiento prolongado con opioides-, consiste en una verdadera respuesta celular adaptativa que resulta de los cambios originados en los sistemas del segundo mensajero relacionados con el flujo de Ca^{2+} , la inhibición de adenilciclasa y la síntesis de proteínas G. La exposición crónica y la tolerancia a los opioides se relacionan con un aumento del contenido intracelular de Ca^{2+} , a diferencia de la exposición aguda, que a menudo causa una disminución. El efecto parece estar relacionado también con un cambio en la capacidad del receptor para relacionarse con las proteínas G agrupadoras, la concentración alta de proteínas G y un sistema AMPc regulado a la alta. Existe evidencia que sugiere que la tolerancia a morfina implica cambios en la capacidad del receptor para modular la actividad de la adenilciclasa (Sharma y col., 1975), mientras que otras parecen implicar un papel adicional para determinados sistemas de neurotransmisores (Pao-Luh y col., 1993).

A pesar de que la administración repetida de morfina indudablemente involucra cambios bioquímicos a nivel del sitio del receptor y posiblemente en los sistemas de transducción, uno de los aspectos más interesantes del desarrollo de tolerancia a morfina son los estudios que implican los sistemas del óxido nítrico y NMDA (Bhargava, 1994; Pasternak y col., 1995). La inhibición de la enzima sintetasa del óxido nítrico (SON), misma que genera el óxido nítrico, bloquea la aparición de desarrollo de tolerancia a morfina (Babey y col., 1994; Bhargava y Zhao, 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que la actividad de las enzimas responsables de la desmetilación de los opiáceos es inhibida en las ratas que son tratadas crónicamente (Åxelrod, 1956; Cochin y Åxelrod, 1959). Se ha sugerido también que el producto desmetilado de morfina (normorfina) puede tener un papel importante en el efecto analgésico de los opiáceos, por lo que se ha especulado que el mecanismo de desarrollo de tolerancia a opiáceos puede atribuirse a la inhibición de las enzimas responsables de la desmetilación, después del tratamiento crónico (Lê y Khanna, 1989). Sin embargo, otros autores han establecido que no existe evidencia suficiente en el cambio de biotransformación de morfina paralelamente al desarrollo de tolerancia que apoye la hipótesis anterior (Lemberger y Rubin, 1976).

En diversos estudios se ha tratado de relacionar el desarrollo de tolerancia a morfina con los cambios existentes en la disposición (farmacocinética) del fármaco durante el tratamiento crónico. Algunos autores han encontrado concentraciones plasmáticas menores en animales tolerantes a morfina comparados con los animales control (Mulé y Woods, 1962, Mulé y col., 1968; Loh y col., 1969); sin embargo, existen controversias en lo relativo a la disminución de las concentraciones en cerebro después de la administración crónica de morfina. Por otro lado, se

ha propuesto que los niveles bajos de morfina encontrados en animales en los que se ha inducido tolerancia a morfina, pueden ser una consecuencia secundaria del desarrollo de tolerancia al opioide. En ratas tratadas crónicamente con infusión de morfina, las concentraciones de morfina alcanzaron un máximo a las 24 h en cerebro, y después empezaron a disminuir rápidamente a pesar de mantener la infusión; a su vez, la relación de morfina conjugada/libre en plasma se modificó paralelamente a los niveles de morfina en cerebro (Patrick y col., 1978).

Otros autores han sugerido que el grado de tolerancia a morfina está determinado por cambios en la farmacocinética del fármaco y/o sus metabolitos (Ekblom y col., 1993a, 1993b; Neumann y col., 1982; Chay y col., 1992; Hasseltröm y Sáwe, 1993). Algunos de estos estudios han demostrado que la presencia del metabolito M3G, puede tener una influencia importante en el desarrollo de tolerancia a morfina durante el tratamiento crónico (Ekblom y col., 1993a, 1993b). A pesar de esto, el mecanismo real de desarrollo de tolerancia a morfina no ha sido totalmente esclarecido y estudios recientes demuestran que la presencia del M3G durante el tratamiento crónico de morfina no es el único factor que afecta el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina (Ekblom y col., 1993a).

La dependencia farmacológica (física y psicológica) también se desarrolla con el uso prolongado de los opioides, pero únicamente se manifiesta después de suspendida la administración. Según el fármaco frente al que existe dependencia, y según la duración de su empleo y su dosificación, los síntomas del síndrome de abstinencia pueden incluir: anorexia, pérdida de peso, dilatación pupilar, escalofríos alternados con sudoración excesiva, calambres abdominales, espasmos musculares, hiperirritabilidad, lagrimación, piel de gallina y taquicardia (Walter y col., 1996).

En general existe un grado elevado de tolerancia y dependencia cruzada entre opioides que ejercen sus acciones en el mismo sitio de receptor, pero hay poca o ninguna tolerancia cruzada entre los que actúan en diferentes receptores en forma selectiva. La tolerancia cruzada entre los distintos opioides es variable porque la mayoría de los opioides disponibles no presentan una selectividad total y tienen una cierta afinidad para cada uno de los distintos receptores.

1.6.9. Correlación farmacocinético-farmacodinámica de Morfina

El interés por los estudios de la farmacocinética de morfina y de sus metabolitos (morfina-3 β -glucurónido y morfina-6 β -glucurónido), así como de la relación que existe entre la

farmacocinética de éstos y el efecto analgésico (antinociceptivo) observado, es evidente (Gustafsson y Post, 1986; Bhargava y col., 1991, 1998). Desde 1978, Dahlström y col. encontraron que las concentraciones de morfina existentes en el cerebro de ratas no estaban relacionadas de una manera "directa" al efecto analgésico producido, sino más bien de un modo "indirecto" y describieron la relación existente mediante un modelo farmacocinético-farmacodinámico que incluye un "compartimento de efecto" derivado. Bhargava y col. (1991) establecieron una relación directa entre el efecto acumulativo (ABCe) obtenido en ratas tratadas con morfina y el área bajo la curva acumulativa de concentración plasmática de morfina vs. tiempo (ABC). Los efectos, tanto analgésico como hipertérmico, fueron dependientes de la dosis de morfina y se correlacionaron con el área bajo la curva acumulativa de concentraciones plasmáticas ($r > 0.9$). La relación existente entre la intensidad de la analgesia y las concentraciones de morfina y sus metabolitos glucurónidos en el fluido extracelular cortical, determinados empleando la técnica de microdiálisis, también ha sido demostrada (Barjavel y col., 1995).

Los estudios farmacocinéticos también pueden ser de gran utilidad para definir el grado de desarrollo de tolerancia a opioides. Se sabe que el grado de analgesia obtenida con la morfina difiere entre pacientes como una consecuencia de las diferencias en la farmacocinética y el grado de tratamiento crónico, es decir, el grado de desarrollo de tolerancia (Ekblom y col., 1993a).

La farmacocinética y farmacodinamia del metabolito morfina-3 β -glucurónido (M3G) y su influencia sobre el efecto antinociceptivo de morfina en ratas, fueron estudiadas por Ekblom y col. (1993b). En este estudio se concluyó que el M3G constituye un factor importante en el desarrollo de tolerancia a morfina. Gardmark y col. (1993), utilizaron un modelo farmacocinético-farmacodinámico para describir la relación entre la farmacocinética, tanto de morfina como del M3G en ratas, y la respuesta antinociceptiva así como con la tolerancia desarrollada. En este caso se combinó un modelo farmacocinético de dos compartimentos con un compartimento de "efecto" y otro de "tolerancia". Las concentraciones plasmáticas de M3G obtenidas experimentalmente y las estimadas a partir del compartimento de "tolerancia" mostraron una correlación satisfactoria con el efecto analgésico obtenido; sin embargo, tampoco se pudo concluir que el M3G sea el único factor responsable del desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina.

También se ha postulado que el curso temporal del síndrome de abstinencia en humanos y en animales de laboratorio parece estar relacionado inversamente a la velocidad de eliminación del fármaco activo. Por ejemplo, en humanos la aparición espontánea del síndrome

de abstinencia con metadona ($t_{1/2} = 24$ h) es más lenta y de menor intensidad que con morfina ($t_{1/2} = 2$ h). Yoburn y col. (1985), observaron que la aparición del síndrome de abstinencia a morfina, en ratas, se correlaciona adecuadamente tanto con la concentración plasmática de morfina, como con la cantidad de morfina absorbida en un período de 24 h.

1.7. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR ANALGESIA (ANTINOCICEPCIÓN)

La comprensión de los mecanismos de analgesia y el desarrollo de nuevos fármacos analgésicos, depende en gran parte de los métodos disponibles para la evaluación cuantitativa del dolor. La mayoría de las pruebas tradicionales para determinación de la actividad analgésica, miden el dolor transitorio, más que continuo.

Algunos de los modelos experimentales empleados en la evaluación de la analgesia (antinocicepción) en animales de laboratorio, miden el tiempo de reacción o la emisión de una respuesta, generalmente refleja, que resulta de la aplicación de un estímulo, ya sea calor, como el modelo de "retiro de la cola" en rata ("tail flick"), descrito por D'Amour y Smith (1941) y el de la "plancha caliente" en ratón ("hot plate"), de Woolfe y McDonald (1944); presión sobre la cola, o la pata, como el de "pinzamiento de la cola" en ratón (Bianchi y Franceschini, 1954); "pinzamiento de los dedos" en cobayo ("toe pinch") propuesto por Collier y Roy (1961) y el método descrito por Randall y Selitto (1957); estimulación eléctrica de pulpa dentaria en conejo o perro (Türker y Türker, 1970), o en las orejas de conejo (Ayhan y col., 1983); administración de irritantes químicos, como estiramiento abdominal en ratón (Siegmond y col., 1957); poliartrosis inducida con adyuvante en rata (Pircio y col., 1975), artritis inducida con urato sódico en gato (Okuda y col., 1984) y administración subcutánea de formalina intraperitoneal o "prueba de la formalina" (Hunskaar y Hole, 1987). En la mayoría de los casos, los estímulos se aplican a los animales sanos, en ausencia de las alteraciones que ocurren comúnmente en pacientes que experimentan dolor, tales como hiperalgesia (sensibilidad extrema al estímulo doloroso), alodinia (dolor en respuesta a un estímulo mecánico no nocivo) e hiperestesia (sensibilidad anormal al estímulo sensorial). Muchos de los modelos anteriores no reflejan estados crónicos de dolor. El dolor crónico difiere del dolor agudo en términos de la persistencia del dolor y en algunos cambios adaptativos descritos en varios niveles del sistema nervioso central. Por lo anterior las investigaciones han sido encaminadas al desarrollo de modelos adecuados de dolor crónico, entre los que se incluyen el dolor inflamatorio y el dolor neuropático (De Castro y col., 1981; Beeson 1999).

Los modelos han sido clasificados de acuerdo a la naturaleza, intensidad y duración del estímulo y al tipo de dolor y respuesta que origina (Yaksh, 1977). Algunos de estos modelos

comprenden mecanismos espinales, mientras que otros involucran estructuras supraespinales. Algunas de las pruebas presentan buena sensibilidad para una clase en particular de analgésicos, pero otras producen con frecuencia resultados falso-positivos. El método aplicado también puede variar entre investigadores, lo cual puede dar lugar a controversias en la interpretación de resultados (Beeson, 1999). Por otro lado, es frecuente que se generen respuestas de aprendizaje o condicionamiento si se aplica el estímulo más de una vez sobre el mismo sujeto, lo cual dificulta el seguimiento del curso temporal del efecto.

Adicionalmente, se han realizado investigaciones genéticas para producir ratones transgénicos que puedan ser útiles para discernir la función de sistemas neurales complejos, sin embargo por lo general se requiere de estudios a gran escala para lograr una interpretación adecuada de los resultados (Beeson, 1999).

Diversos estudios que comprenden la aplicación de modelos farmacocinético-farmacodinámicos de morfina y/o sus metabolitos han utilizado la respuesta por vocalización, después de la estimulación eléctrica (Dahlstöm y col., 1978) y el método de retiro de la cola o "tail-flick" (Bhargava y col., 1991; Gårdmark y col., 1993, 1998; Ekblöm y col., 1993a; Oullet y Pollack, 1997a; Gabrielson y col., 2000). Aún cuando se han obtenido resultados satisfactorios, ya se mencionaron previamente algunas de las desventajas que presentan dichos modelos.

El modelo de "disfunción inducida por dolor en rata" o PIFIR por sus siglas en inglés (Pain Induced Functional Impairment in the Rat), fue propuesto en 1993 (López-Muñoz y col., 1993a). En este modelo se produce una inflamación aguda, disfunción motora y dolor tipo artritis gotosa para la evaluación objetiva del dolor y la analgesia. Este modelo establece un estado de dolor que se asemeja a una situación clínica, la artritis gotosa, al depositar ácido úrico en la articulación de la rata. La artritis aguda produce una "disfunción articular", que en función del dolor presente en el animal, limita el uso de la extremidad al caminar. Tanto el desarrollo de la condición patológica como el efecto analgésico del fármaco administrado, se realiza durante un periodo de tiempo representativo de la condición real del sujeto experimental. El modelo PIFIR evalúa la recuperación motora y no una conducta, proporcionando datos relevantes. Es sensible al efecto analgésico tanto de opioides como de AAINEs (López-Muñoz, 1994) y permite determinar la duración del efecto analgésico. Además, es posible hacer el seguimiento del curso temporal del efecto analgésico en un mismo sujeto experimental (4 h), simultáneamente a la determinación de las concentraciones plasmáticas del fármaco, por lo cual es útil para establecer modelos farmacocinético-farmacodinámicos de fármacos analgésicos y en particular para estudiar interacciones entre fármacos (Hoyo-Vadillo y col., 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.8. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MORFINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

En la literatura se han publicado numerosos métodos para la cuantificación de morfina en fluidos biológicos y tejidos, para ser utilizados en estudios de farmacocinética de MOR y/o sus metabolitos, tanto en humanos como en animales de laboratorio (i.e. ratas, cobayos, conejos, perros, etc.). Los métodos incluyen la cromatografía gas-líquido, previa derivatización (Dahlström y col., 1977; Jones y col., 1984; Stanski y col., 1982); cromatografía de líquidos en fase inversa, previa extracción en fase sólida, o extracción con solventes y su posterior detección electroquímica (Bolander y col., 1983; Joel y col., 1988; Svensson, 1986); UV-VIS (Svensson y col., 1982; Säwe y col., 1985; Milne y col., 1991); o detección fluorométrica (Svensson, 1986; Nelson y col., 1982; Venn y Michalkiewicz, 1990) o por radioinmunoensayo (RIA) (Bhargava y col., 1991; Frances y col., 1992).

Los resultados de algunos estudios de farmacocinética de morfina han sido poco relevantes debido a la codeterminación no intencional de los metabolitos conjugados de morfina. Por lo tanto un aspecto crítico es la selectividad del método. El análisis fluorométrico o con morfina marcada, por sí solo, carece de especificidad, a menos que se realice la separación previa por cromatografía de líquidos (Tagliaro y col., 1985). La cromatografía de gases combinada con espectroscopia de masas, ofrece una elevada selectividad y alta sensibilidad, además de la identificación inequívoca de morfina (Drost y Van Ooijen, 1984); sin embargo se requiere de equipo sofisticado y caro. Pacifici y col. (1995) propusieron un método, selectivo y sensible, por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas "electrospray", empleando como estándar interno naltrexona o codeína.

La detección por UV (Svensson y col., 1982; Milne y col., 1991) se prefiere cuando se requiere determinar tanto morfina, como sus metabolitos (M3G y M6G), sin embargo, muchos de los métodos existentes han utilizado la detección amperométrica para morfina inalterada con buena sensibilidad y selectividad (Todd y col., 1982; Turner y Murphy, 1988; Horton y Pollack, 1991). Recientemente se han utilizado métodos de detección en serie, con detección electroquímica, empleando un electrodo "dual" (coulométrico) para morfina y la posterior detección fluorométrica para el M3G, lo cual requiere de una instalación compleja del equipo. (Ekblom y col., 1993b; Svensson, 1986; Portenoy y col., 1992; Osborne y col., 1990; Bouquillon y col., 1992).

Varios de los procedimientos propuestos inicialmente para la extracción de morfina de fluidos biológicos incluían la extracción con solventes (líquido-líquido). La mayoría de estos métodos requiere una preparación muy prolongada de la muestra, con por lo menos dos pasos

de extracción y evaporación del solvente (Mc Lean y col., 1990). En el caso de derivatización se requiere remover el exceso de reactivo y aislar el derivado para su medición. Posteriormente, se han propuesto otros métodos rápidos y sencillos de extracción con solvente, como es la extracción en un sólo paso con alcohol isoamílico-hexano (1:1 v/v) a pH 8.9, evaporación de la fase orgánica y reconstitución en fase móvil para su posterior análisis por cromatografía de líquidos de fase inversa (Liaw y col., 1998). Durante los últimos años, el método de extracción en fase sólida (Sep Pack C₁₈) publicado por Svensson (1982; 1986), con algunas modificaciones propuestas por Joel y col. (1988) ha sido el más utilizado, por diversos autores, para la determinación de morfina (MOR) y/o sus metabolitos (M3G, M6G), en estudios de farmacocinética tanto en humanos (Portenoy y col., 1992; Osborne, 1986, 1988; 1990, 1992; Hasseltröm y Säwe, 1993), como en animales (Horton y Pollack, 1991; Ekblom y col., 1993a, 1993b; Gårdmark y col., 1993; Bouw y col., 2000).

Finalmente, cabe mencionar que una de las técnicas más recientes para administración y/o toma de muestras en estudios de farmacocinética en animales de laboratorio, comprende la técnica de microdiálisis (Bouw y col., 2000). En este caso no se requiere la extracción de la muestra (dializado), lo que permite la inyección de la misma directamente a la columna cromatográfica (cromatografía de líquidos de alta resolución), seguida de la detección adecuada (espectrofotométrica, electroquímica, fluorométrica, espectrometría de masas, etc.).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es la principal causa de búsqueda de asistencia médica u odontológica, y aunque es una sensación muy útil ya que previene al hombre de un daño inminente o potencial y generalmente indica la localización del daño, se transforma en un problema grave cuando se torna en un dolor de tipo crónico el cual es difícil tratar farmacológicamente.

Los analgésicos opioides suelen presentar una alta eficacia en el tratamiento del dolor intenso administrados en dosis única, pero cuando son empleados en tratamientos crónicos dejan de ser útiles debido a los efectos de tolerancia analgésica que pueden producir. Por otra parte, en estas condiciones de dolor, los compuestos analgésicos de tipo AAINES no son eficaces terapéuticamente. Por tal razón, ha sido necesario buscar alternativas terapéuticas útiles ante estas condiciones de dolor.

El uso de combinaciones de fármacos analgésicos que actúan por diferentes mecanismos puede resultar en una potenciación global del efecto, con lo cual es posible reducir las dosis y al mismo tiempo los efectos indeseables. En estudios realizados con anterioridad se demostraron las ventajas del uso de combinaciones de metamizol con morfina en ratas artríticas. Al administrar morfina en cuatro dosis (1.8, 3.1, 5.6 y 10 mg/kg de peso) con seis dosis de metamizol (31.6, 56.2, 100, 177.8, 316.2 y 562.3 mg/kg), se obtuvieron 24 combinaciones distintas, las cuales produjeron efectos sinérgicos (aditivos y supraaditivos). La combinación metamizol (562.3 mg/kg) + morfina (5.6 mg/kg), administrada en dosis única por vía subcutánea, produjo el efecto analgésico (antinociceptivo) máximo entre las 24 combinaciones estudiadas, siendo equivalente a la dosis más alta de morfina utilizada en el estudio (10 mg/kg).

El efecto farmacológico obtenido con la combinación de dos fármacos puede ser el resultado de las diversas interacciones producidas no sólo a nivel farmacodinámico, sino también farmacocinético. Los estudios farmacocinéticos a su vez, pueden ser de gran utilidad para definir el grado de desarrollo de tolerancia a opioides. La relación que existe entre el efecto antinociceptivo y la farmacocinética de morfina ha sido ampliamente demostrada e incluso se ha establecido la relación que guarda la cinética de su metabolito inactivo, el 3- β glucurónido (M3G), en el desarrollo de tolerancia a morfina durante el tratamiento crónico. Algunos fármacos que son administrados de manera simultánea con morfina pueden provocar la inducción o inhibición de las enzimas responsables de la glucuronidación de ésta (UGTs), modificando así la formación de los metabolitos y el efecto global de la misma. Se sabe que aproximadamente el 20% de la 4-metil-amino-antipirina, principal metabolito (activo) del metamizol, se elimina en forma de glucurónido,

además de otros compuestos conjugados (glucurónidos) que han sido encontrados. Se sabe también que ambos compuestos, metamizol y morfina, comparten otras vías metabólicas donde se encuentra involucrado el CY3A4, aún cuando esta vía es menos importante en el caso de morfina. Por lo anterior, es probable que el metamizol compita por los mismos mecanismos enzimáticos involucrados en la biotransformación de morfina y modifique el efecto antinociceptivo de ésta. A la fecha no se ha realizado estudio alguno acerca de la farmacocinética de morfina en presencia de metamizol y la posible relación que pueda existir con el efecto observado, por lo cual es necesario llevar a cabo estos estudios, tanto en tratamiento agudo como después del tratamiento subcrónico de la combinación.

En vista de que el perfil tóxico del metamizol es diferente al de la morfina, es posible suponer que los efectos adversos atribuibles al opioide en tratamiento crónico se vean disminuidos o inhibidos. Por lo anterior, la combinación de metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) puede representar una alternativa terapéutica en el tratamiento crónico del dolor y es probable que disminuya el desarrollo de tolerancia farmacológica permitiendo que el efecto se mantenga en niveles adecuados de analgesia.

El objetivo del presente estudio fue realizar el análisis farmacodinámico y farmacocinético de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento subcrónico en ratas, en comparación a los fármacos administrados individualmente, con la finalidad de evaluar las ventajas y desventajas de la combinación en estas condiciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. HIPÓTESIS

La combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) presenta una eficacia analgésica superior a la originada por los componentes individuales, metamizol (562.3 mg/kg) y morfina (5.6 mg/kg), tanto en administración aguda como en administración subcrónica en ratas.

La administración simultánea de metamizol (562.3 mg/kg) con morfina (5.6 mg/kg) incrementa la eficacia analgésica del opioide durante el tratamiento subcrónico en ratas y a su vez inhibe el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico (antinociceptivo) de morfina.

La administración simultánea de metamizol (562.3 mg/kg) con morfina (5.6 mg/kg) modifica la farmacocinética de morfina tanto en tratamiento agudo como subcrónico en ratas.

El sinergismo analgésico presentado por la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg), es consecuencia de la interacción farmacocinética de ambos compuestos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis farmacodinámico y farmacocinético de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg de peso) en tratamiento subcrónico en ratas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la eficacia, el sinergismo y el desarrollo de tolerancia analgésica producidos por la combinación de metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento subcrónico en ratas (6 y 12 días).

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos para la cuantificación de morfina en plasma.

Estudiar la farmacocinética de morfina en ausencia y presencia de metamizol, tanto en tratamiento agudo como en tratamiento subcrónico en ratas.

Analizar la relación entre la farmacocinética de morfina y los efectos producidos (eficacia analgésica y desarrollo de tolerancia al efecto analgésico) después de la administración de morfina sola y en combinación con metamizol, tanto en tratamiento agudo como en tratamiento subcrónico en ratas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA (ANTINOCICEPTIVA)

Los estudios se llevaron a cabo en ratas hembras Wistar [Cri:(WI)BR] de 180-220 g de peso. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones del Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (1980), así como los Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983).

Las ratas se mantuvieron en jaulas especiales (8 por caja), en un cuarto a temperatura constante (22°C), manteniendo un ciclo día/noche de 12 h. Doce horas antes del experimento, se les retiró el alimento a las ratas, permitiendo el libre acceso al agua (*ad libitum*). El número de animales de experimentación fue llevado al mínimo. Todos los experimentos fueron realizados durante la fase de luz, utilizado cada animal sólo una vez.

El efecto antinociceptivo se determinó utilizando el modelo PIFIR (*Pain Induced Functional Impairment Model in Rat*) propuesto por López- Muñoz y col. (1993). Las ratas se anestesiaron con éter etílico en un desecador de vidrio. El dolor se indujo el día del experimento mediante una inyección intra-articular de 0.05 mL de ácido úrico al 30%, suspendido en aceite mineral, en la extremidad derecha del miembro trasero, en la articulación fémur-tibio-rotular (Figura 1).

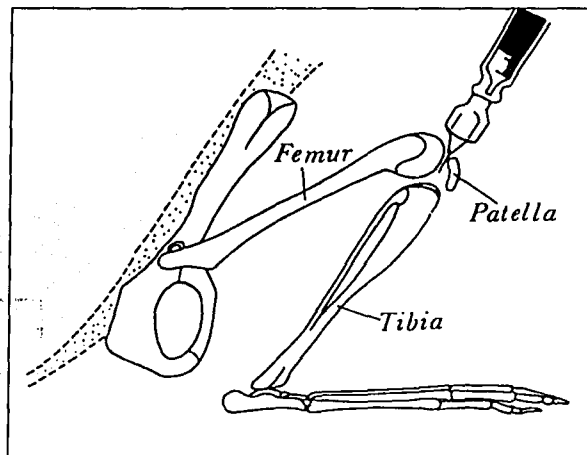
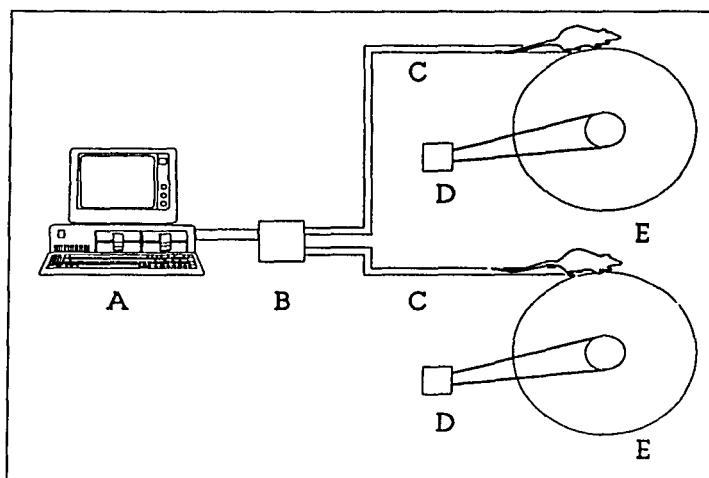


Figura 1. Sitio de administración intra-articular de la suspensión de ácido úrico en la extremidad posterior derecha de la ratita para producir artritis gotosa y nocicepción empleando el modelo experimental PIFIR.

La inyección intra-articular se aplicó utilizando una jeringa de 1 mL de vidrio con aguja del No. 22 de 4 mm de longitud. Inmediatamente después se colocó un electrodo en cada pata fijándolo con pegamento instantáneo Krazy Kola Loka y con una tira de cinta adhesiva alrededor de la pata. La extremidad izquierda se utilizó como control.

Después de que las ratas se recuperaron de la anestesia, se les colocó, una por carril, sobre un cilindro de acero inoxidable de 30 cm de diámetro (Figura 2). Los electrodos se conectaron a una computadora y el cilindro se hizo rotar a 4 r.p.m. (lo que lleva a las ratas a caminar) durante 2 minutos cada media hora (30 min).

La variable de medida fue el tiempo de contacto de cada una de las patas traseras de las ratas en el cilindro. Al hacer contacto el electrodo y el cilindro se cierra un circuito y la relación entre el tiempo de contacto de la pata lesionada con respecto a la no lesionada (Índice de funcionalidad), se registra en una computadora. La analgesia se estimó como la recuperación de la funcionalidad.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Esquema del sistema de registro del tiempo de contacto realizado con las extremidades traseras de la rata: A=dispositivo contador de tiempo, B=caja con switch de dos posiciones, C=electrodos, D=motor y E=tambores rotatorios.

Los datos obtenidos se expresaron como el índice de funcionalidad porcentual (IF%), que se obtiene por la siguiente relación:

$$IF\% = \frac{\text{tiempo de contacto de la extremidad lesionada}}{\text{tiempo de contacto de la extremidad control}} \times 100$$

Los fármacos individuales, metamizol (562.3 mg/kg), morfina (5.6 mg/kg), así como la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg respectivamente), se disolvieron en solución salina fisiológica y se administraron por vía subcutánea (s.c.) 2.5 h después de la administración de ácido úrico, ya que este es el tiempo aproximado en el cual el índice de funcionalidad porcentual es cero (IF% = cero). Este tiempo se consideró como tiempo cero para la medición del efecto analgésico. Una vez administrado(s) el (los) fármaco(s), se registró el tiempo de contacto cada 15 minutos durante las primeras 1.5 h y después cada 30 minutos, hasta las 4 h. Los experimentos se realizaron entre las 7.00 y las 14.00 h. El curso temporal del efecto se obtuvo graficando el índice de funcionalidad porcentual (IF%) vs. tiempo (h).

5.2. MÉTODO ANALÍTICO EMPLEADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MORFINA EN PLASMA

5.2.1. Selección de Condiciones Cromatográficas

Se probaron distintas condiciones experimentales hasta lograr la mayor sensibilidad para morfina, así como la mejor resolución de ésta respecto al metamizol. Igualmente se probaron algunos compuestos homólogos de morfina para la selección del estándar interno.

Los factores estudiados fueron:

- a) Composición de la fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M : Metanol (75:25 v/v, 80:20 v/v y 70:30 v/v)
- b) pH de la fase móvil (3.6, 4.6, 5.6)
- c) Naturaleza y concentración del par iónico empleado (dodecil-sulfato de sodio; octil sulfato de sodio)
- d) Velocidad de flujo de la fase móvil (0.8 a 1.2 mL/min)
- e) Detección del analito (morfina): Se utilizó un detector amperométrico. Se seleccionó el potencial más adecuado para la detección tanto de morfina como de naloxona (estándar interno)

5.2.2. Extracción de Morfina en Plasma

La extracción de morfina del plasma se llevó a cabo en fase sólida utilizando cartuchos Sep Pack C₁₈ (Millipore) de acuerdo al método de Drost y van Ooijen (1984), excepto que la morfina se eluyó con 2 mL de metanol y se variaron los solventes empleados para lavar la

muestra. Para la elución de los compuestos, se utilizó un sistema manual y otro con un dispositivo de vacío (Vac-Elute, Applied Separations, Modelo Speed-Mate 10), con objeto de seleccionar la velocidad de flujo óptima. Las muestras se evaporaron en Baño María, bajo atmósfera de nitrógeno a 45°C. El residuo se redisolvió en 100 µL de fase móvil y se inyectaron 20 µL al cromatógrafo.

Se analizaron por triplicado muestras de plasma adicionadas de una misma concentración de morfina (1000 ng/mL), empleando los distintos sistemas propuestos. Por último se establecieron las condiciones finales para el método tomando en cuenta el porcentaje de extracción y el menor coeficiente de variación obtenido en la extracción de las muestras analizadas.

5.2.3. Instrumentación y Condiciones Cromatográficas

Para el desarrollo e implementación del método se utilizó un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer Serie 400 equipado con bomba isocrática (Modelo LC 250) y una columna Absorbosphere C₁₈ (3 µm) Alltech de 100 mm × 4.6 mm. La fase móvil finalmente seleccionada consistió de una mezcla de 25% metanol y 75% de solución amortiguadora 0.1 M de NaH₂PO₄ pH 3.6, conteniendo 2.4 mM de octil sulfato de sodio y 2 mM EDTA·2Na, a una velocidad de flujo 0.8 mL/min. Se utilizó naloxona (solución acuosa de 3 µg/mL) como estándar interno (v. Resultados 6.1.1. Selección del estándar interno). Para la detección del analito y el estándar interno se empleó un detector electroquímico (amperométrico), marca Bioanalytical Systems (BAS) a un potencial de 0.85 V (oxidación), con una sensibilidad de 10 nA.

5.2.4. Reactivos y Estándares

- Metanol absoluto R.A., Merck
- Metanol grado cromatográfico, Mallincrodt
- Ácido bórico R.A., Merck
- Hidróxido de sodio R.A., Merck
- Cloruro de potasio R.A. Merck
- Clorhidrato de morfina, Merck Darmstadt (vía Secretaría de Salud, México)
- Metamizol, Hoechst México
- Metamizol estándar nacional de referencia (Laboratorio Nacional de Referencia, Secretaría Salud, México)
- Clorhidrato de naloxona, estándar secundario
- Agua grado cromatográfico, Mallincrodt

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.5. Preparación de Soluciones

Solución de hidróxido de sodio 1 M. Disolver 162 g de hidróxido de sodio R.A. en 150 mL de agua grado cromatográfico libre de CO₂ enfriar la solución y filtrar por papel grueso. Transferir 54.5 mL del filtrado claro y diluir con agua, aforando a 1000 mL.

Solución de hidróxido de sodio 0.2 M. Diluir un volumen adecuado de NaOH 1 M con suficiente agua para obtener una solución 0.2 M.

Solución de ácido bórico-cloruro de potasio 0.2 M. Disolver 12.37 g de ácido bórico y 14.91 g de cloruro de potasio en agua y aforar a 1000 mL.

Solución reguladora de boratos pH 9.0. Colocar 50 mL de solución de ácido bórico-cloruro de potasio 0.2 M en un matraz volumétrico de 200 mL y agregar 20.8 mL de hidróxido de sodio 0.2 M. Ajustar el pH a 9.0, y aforar a volumen con agua.

Solución patrón de naloxona (estándar interno). Pesar y disolver una cantidad suficiente de clorhidrato de naloxona (PM = 363.8), equivalente aproximadamente a 3 mg de naloxona base (PM = 327.3) y disolver en metanol, grado cromatográfico, aforando a 10 mL (c = 300 µg/mL). Esta solución es estable en refrigeración (-4°C) por una semana. La solución se diluye en agua en el momento de la preparación de las muestras para obtener una concentración final de 3 µg/mL (3.34 mg del clorhidrato equivale a aproximadamente 3 mg de naloxona base).

Solución patrón de morfina (stock). Pesar y disolver una cantidad suficiente de clorhidrato de morfina (PM = 321.83), equivalente a 2.5 mg de morfina (PM = 285.33) y disolver en metanol grado cromatográfico, aforando a 5 mL para obtener una concentración final de 500 µg/mL (2.82 mg de morfina equivale a aproximadamente 2.5 mg de morfina base). Esta solución es estable en refrigeración (-4°C) por una semana.

5.2.6. Preparación de la Fase Móvil

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M conteniendo 1 mM de EDTA·2Na y 2.4 mM de octil sulfato sódico, pH 3.6. Disolver 13.8 g de fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), 372.2 mg de sal disódica del ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA·2Na) y 1.1 g de octil sulfato sódico (OSD), en suficiente agua y transferir cuantitativamente a un matraz aforado de un litro. Agregar agua hasta aproximadamente 850 mL y mezclar. Ajustar el pH de la solución a 3.6 con ácido fosfórico. Aforar a volumen con agua y mezclar.

Fase móvil: Mezclar volúmenes adecuados de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M con metanol grado cromatográfico (Mallincrodt) según el volumen deseado de fase móvil,

guardando la relación adecuada 75:25 (v/v). Filtrar la fase por membrana de 0.25 micras y desgasificar en baño de ultrasonido por 10 minutos.

5.2.7. Preparación de la Curva de Calibración de Morfina

- a) Transferir un mL de la solución stock de morfina ($c = 500 \mu\text{g/mL}$) a un matraz volumétrico de 5 mL, diluir y aforar con agua ($c = 100 \mu\text{g/mL}$). Mezclar.
- b) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 5 mL, diluir y aforar con agua ($c = 10 \mu\text{g/mL}$). Mezclar.
- c) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 5 mL, diluir y aforar con agua ($c = 1 \mu\text{g/mL}$). Mezclar.
- d) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 0.5 \mu\text{g/mL} = 500 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- e) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 0.25 \mu\text{g/mL} = 250 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- f) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 0.125 \mu\text{g/mL} = 125 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- g) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 0.0625 \mu\text{g/mL} = 62.5 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- h) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 0.03125 \mu\text{g/mL} = 31.25 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- i) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 0.015625 \mu\text{g/mL} = 15.625 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- j) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 7.8125 \text{ ng/mL}$). Mezclar.
- k) Transferir 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico y añadir 0.5 mL de plasma. ($c = 3.906 \text{ ng/mL}$). Mezclar.

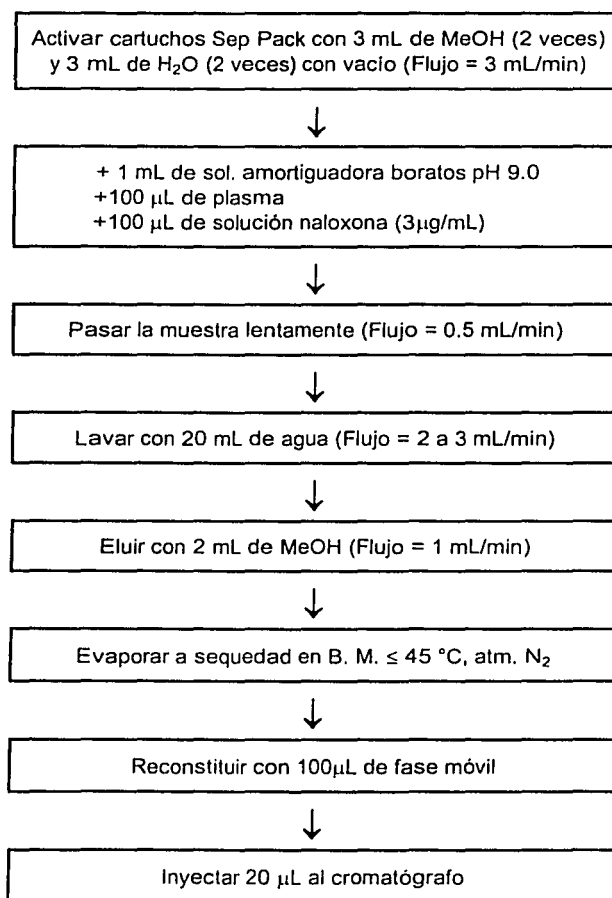
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.8. Procedimiento

Previamente a la extracción, se activa el cartucho Sep Pack C₁₈ con 3 mL de MeOH (2 veces) y 3 mL de agua HPLC (2 veces). Se agrega 1 mL de solución amortiguadora de boratos 0.2 M (pH 9.0), se adicionan 100 μL de la muestra de plasma y 100 μL de solución acuosa de estándar interno de naloxona (3 $\mu\text{g/mL}$) y se deja pasar lentamente por el cartucho. Se lava con

20 mL de agua grado cromatográfico, con ayuda de vacío. Se elimina completamente el agua y los compuestos de interés se eluyen con 2 mL de MeOH, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El solvente se evapora a sequedad en Baño María a 45°C bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se reconstituye en 100 µL de fase móvil y se inyectan 20 µL al cromatógrafo (Esquema 1). El método puede aplicarse también a muestras de 50 µL de plasma adicionando un volumen igual de estándar interno (50 µL) y reconstituyendo al final con 50 µL de fase móvil.

Esquema 1. Método empleado en la extracción y purificación de morfina en plasma



5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para la validación del método analítico en plasma se evaluó la selectividad, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad de la morfina, de acuerdo a los siguientes procedimientos:

5.3.1. Selectividad

Se prepararon muestras blanco de plasma y muestras de plasma adicionadas de morfina, metamizol, y estándar interno (naloxona) y se analizaron por el método propuesto.

5.3.2. Linealidad

Con la finalidad de determinar si la relación de la respuesta obtenida (altura del pico de morfina/altura del pico de naloxona) presentaba un comportamiento lineal con respecto a la concentración de morfina en el rango seleccionado, se prepararon por lo menos 3 curvas de morfina en plasma (rango de 1 a 1000 ng/mL), calculando el coeficiente de determinación (R^2), pendiente e intercepto para cada una de ellas. Adicionalmente se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) de la regresión.

5.3.3. Precisión

Se prepararon soluciones de morfina en plasma en siete distintas concentraciones (7-1000 ng/mL) y se analizaron por quintuplicado (en un mismo día), cada una de ellas, obteniendo el coeficiente de variación para cada caso (precisión en un mismo día o intra-día).

Adicionalmente se seleccionaron las concentraciones de 500 y 1000 ng/mL para determinar la precisión en diferentes días y se analizaron en tres días, por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, utilizando un ANDEVA (precisión inter-día).

5.3.4. Exactitud

Se prepararon muestras de morfina en plasma en 5 concentraciones diferentes (30 a 1000 ng/mL), preparando a su vez una curva patrón y analizándolas por quintuplicado por el método propuesto. La exactitud se evaluó como la relación de la concentración recuperada entre la concentración adicionada, multiplicada por 100 (% de recuperación). Adicionalmente se graficó la cantidad de morfina recuperada vs. la cantidad de morfina adicionada por mL, para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

evaluar la exactitud del método, así como la linealidad del mismo. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando un análisis de varianza de la regresión.

5.3.5. Concentración Mínima Cuantificable (CMC) y Concentración Mínima Detectable (CMD)

Se prepararon por quintuplicado muestras de morfina en plasma a concentraciones de aproximadamente 1.5, 3, 6 y 12 ng/mL, analizándolas por el método propuesto y determinando el coeficiente de variación en cada caso.

5.3.6. Estabilidad de Morfina en Plasma

Aún cuando en la literatura existe información amplia respecto a la gran estabilidad de morfina en muestras plasmáticas guardadas en congelación, se prepararon muestras de morfina en plasma (500 ng/mL), las cuales se dividieron en tubos y se congelaron a -20°C. Se retiraron muestras del congelador y se analizaron por triplicado a las 0, 2, 4 y 8 semanas de almacenamiento.

5.4. ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS

Para determinar la eficacia, potenciación y el grado de tolerancia que se desarrolla por la administración crónica de la combinación metamizol+morfina estudiada se emplearon 72 ratas Wistar (hembras) de 180-220 g de peso, las cuales se distribuyeron al azar en 3 grupos de tratamiento. Cada grupo se subdividió a su vez en tres subgrupos (8 ratas cada uno). A cada grupo se le administró por vía subcutánea, una sola dosis de metamizol (562.3 mg/kg), morfina (5.6 mg/kg), o de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg, respectivamente) para el tratamiento agudo; o una dosis diaria de los mismos por 6 o 12 días en tratamiento subcrónico, de acuerdo a un diseño jerárquico (Tabla I). Adicionalmente se estudió el efecto analgésico de una dosis única de 10 mg/kg de morfina (tratamiento agudo). Esta dosis se consideró como un control, ya que previamente se demostró que produce el máximo efecto analgésico en el modelo PIFIR. Los fármacos se disolvieron en solución salina (0.9% NaCl) y se administraron por vía subcutánea a los animales previamente tratados con ácido úrico. En el caso de los grupos de tratamiento subcrónico, el dolor se indujo un día después de completar el número de administraciones, i.e. el séptimo día en el caso de tratamiento por 6 días o el

decimotercer día para el grupo de tratamiento de 12 días. Se determinó el índice de funcionalidad porcentual (IF%) a tiempo cero (2.5 h después de administrado el ácido úrico) y después de la administración de los fármacos a 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 2, 2.5, 3, 3.5. y 4 h, utilizando el modelo PIFIR.

Tabla I. Diseño de Tratamientos

subgrupo	GRUPOS		
	I MOR (5.6 mg/kg)	II MET (562.3 mg/kg)	III MET+MOR (562.3 : 5.6 mg/kg)
1	Dosis única	Dosis única	Dosis única
2	Subcrónico 6 d	Subcrónico 6 d	Subcrónico 6 d
3	Subcrónico 12 d	Subcrónico 12 d	Subcrónico 12 d

5.4.1. Presentación de Datos y Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en los estudios farmacodinámicos se representaron como el índice de funcionalidad porcentual (IF%). Este valor se determina dividiendo el tiempo de contacto de la extremidad derecha (lesionada) entre el tiempo de contacto de la extremidad izquierda (control) y multiplicando por 100. La analgesia se estimó durante el curso temporal de cada tratamiento. El curso temporal de efecto se representó graficando el IF% vs. tiempo (h) y el efecto analgésico máximo (E_{max}) se determinó directamente de la gráfica. El efecto analgésico acumulativo, durante el período completo de observación (4h) se estimó a partir del área bajo la curva del curso temporal del efecto (ABCe), a fin de analizar el efecto analgésico global producido por cada uno de los fármacos así como por la combinación metamizol+morfina, tanto en tratamiento agudo (dosis única) como después del tratamiento subcrónico por 6 y 12 días. El ABCe se calculó por el método de trapezoides (Gibaldi y Perrier, 1982; Rowland y Tozer, 1994). La actividad analgésica y el desarrollo de tolerancia durante los tratamientos subcrónicos se evaluaron utilizando estos dos parámetros farmacodinámicos y comparándolos con los valores obtenidos para los compuestos metamizol (562.3 mg/kg) y morfina (5.6 mg/kg), administrados individualmente en tratamiento agudo, en las mismas condiciones. El E_{max} se considera como un indicador de la eficacia analgésica y ABCe como una expresión de la actividad analgésica global durante el periodo completo de observación y comprende por tanto, la intensidad y la duración del efecto. Adicionalmente, se estimó el efecto analgésico al final del experimento (duración del efecto), como

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el efecto observado a las 4 h (E_{4h}), después de la administración del (los) fármaco(s). Los valores calculados representan la media de 8 ratas \pm E.E.

Los valores de ABCe, E_{max} y E_{4h} obtenidos a partir del curso temporal del efecto producido por la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en los distintos tratamientos (agudo y subcrónico), fueron comparados con los valores de metamizol (562.3 mg/kg) y morfina (5.6 mg/kg) administrados individualmente (tratamientos agudo y subcrónico), utilizando un ANDEVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls. Una diferencia significativa entre medias se indicó por un valor de $p \leq 0.05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.5. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

Paralelamente a la medición del efecto analgésico se estudió la farmacocinética de morfina, después de su administración (aguda y subcrónica) tanto sola como en combinación con metamizol (Grupos I y III, Tabla I). Para la toma de muestras de sangre se colocó una cánula en la vena caudal de las ratas el día del estudio, aproximadamente media hora antes de la administración del ácido úrico y 3 horas antes de la administración del (los) fármaco (s). Una vez anestesiadas las ratas, se insertó una cánula PER-10 de 0.28 mm de diámetro interno y 0.6 mm diámetro externo (Clay Adams, Parsipany, N.J., U.S.A.) en la arteria caudal, conectándola a otra cánula PE-50. La cánula se mantuvo heparinizada y tapada con un alfiler para evitar la coagulación de la sangre hasta el momento de la toma de la muestra. Este procedimiento ha sido utilizado por otros autores para estudiar el curso temporal de concentraciones plasmáticas de algunos analgésicos paralelamente a la medición del efecto antinociceptivo (modelo PIFIR) en el mismo animal (Hoyo-Vadillo y col., 1995).

La recolección de las muestras de plasma se llevó a cabo paralelamente a la medición del efecto analgésico. En los grupos de tratamiento agudo (Grupo I subgrupo 1 y Grupo III subgrupo 1, Tabla I), la cánula se colocó el mismo día en que se indujo el dolor, antes de la administración del fármaco. En los grupos de tratamiento subcrónico (Grupo I, subgrupos 2 y 3, y Grupo III subgrupos 2 y 3, Tabla I), la cánula se colocó al día siguiente de finalizado el tratamiento previo con el (los) fármaco(s) por 6 o 12 días (i.e. el séptimo o decimotercer día respectivamente), día en que se indujo el dolor, antes de la administración del fármaco.

El día del estudio y una vez que las ratas se recuperaron de la anestesia, se determinó el índice de funcionalidad inicial (basal) y se recolectó la muestra de sangre a tiempo cero. Inmediatamente después se administró la dosis de morfina (Grupo I) o de la combinación

metamizol+morfina (Grupo III). Por tanto, el tiempo cero de muestreo corresponde al tiempo previo a la administración del (los) fármaco(s), donde el efecto también es cero (IF% = 0). Posteriormente se recolectaron muestras de sangre de 100 μ L en tubos heparinizados a las 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 h y de 150 μ L a las 4, 6, 8 h y 24 h después de la administración del (los) fármaco (s). La cánula se retiró después de las 8 h y se suturó la cola de la rata, cubriéndola con tela adhesiva. La muestra de sangre de las 24 h se recolectó por punción cardiaca y se sacrificó inmediatamente al animal. En todos los casos, cuando el intervalo de tiempo entre una muestra y otra fue mayor o igual a 30 min, se inyectó un volumen de solución salina igual al volumen de sangre extraída a fin de evitar la descompensación fisiológica del animal (Bhargava y col., 1993). Las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 min y el plasma separado se guardó en congelación a -20°C hasta el momento del análisis. Las concentraciones de morfina en plasma se determinaron empleando el método analítico por cromatografía de líquidos de fase inversa, desarrollado y validado previamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.5.1. Presentación de Datos y Análisis Estadístico

Se determinó el curso temporal de las concentraciones de morfina en plasma en las ratas después de la administración de morfina sola (Grupo I, Tabla I) y en presencia de metamizol (Grupo III, Tabla I), después de una dosis única o bien después del último día de tratamiento subcrónico (6 o 12 días). El análisis farmacocinético de los datos del Grupo I se llevó a cabo empleando el paquete estadístico PCNONLIN Versión 4.0. En todos los casos se consideró la suma de cuadrados de los residuales y el coeficiente de determinación para la selección del mejor modelo. A partir de éste se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos de área bajo la curva durante las 4 h siguientes a la administración del fármaco (ABC_{0-4}), área bajo la curva de tiempo cero a infinito ($ABC_{0-\infty}$), constante de velocidad de la fase terminal de eliminación (λ_z ; i.e. β), tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2\lambda_z}$; i.e. $t_{1/2 \beta}$), volumen de distribución del compartimento central (V_c), aclaramiento o depuración total (Cl_T) y tiempo medio de residencia (TMR). La concentración plasmática máxima alcanzada (C_{max}), así como el tiempo en el que se alcanzó dicha concentración (t_{max}) se obtuvieron directamente de las curvas individuales de concentración plasmática para cada tratamiento y se calculó la media geométrica (Julious y Debarnot, 2000).

En el caso de la administración de la combinación de metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento agudo y subcrónico (Grupo III, Tabla I) se determinaron los parámetros de área bajo la curva durante 4 h (i.e. ABC_{0-4}) y 24 h (i.e. ABC_{0-24}) posteriores a la administración de

los fármacos tanto en dosis única, como después del tratamiento subcrónico por 6 y 12 días, en el último intervalo de dosificación. La C_{max} y el t_{max} se obtuvieron directamente de los datos individuales de cada tratamiento y se calculó la media geométrica (Julious y Debarnot, 2000).

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de los distintos tratamientos fueron comparados entre sí, previa transformación logarítmica de los datos (Shargel y Yu, 1999) utilizando ANDEVA seguido de la prueba de Dunnet T3 (Tabachnick y Fidell, 2001), empleando el programa estadístico SPSS v. 10. Una diferencia significativa entre las medias se indicó por una $p \leq 0.05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. RESULTADOS

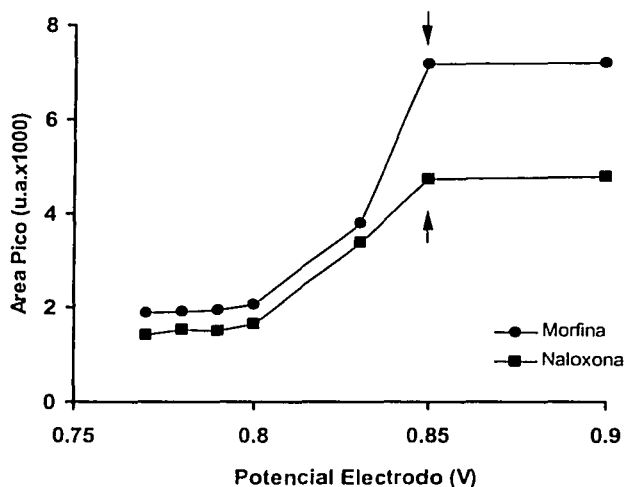
6.1. MÉTODO ANALÍTICO (Dominguez y col., 1997)

La selección de las condiciones óptimas para extracción de morfina en plasma y su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de par iónico y fase inversa, con detección electroquímica (amperométrica), se resumen a continuación.

6.1.1. Selección del estándar interno

De los estándares internos que comúnmente han sido utilizados en otros métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución publicados en la literatura, se probaron naloxona, nalbufina, nalorfina e hidromorfona. La mejor respuesta (resolución de picos, simetría, tiempo de retención, etc.) se obtuvo con naloxona, por lo que fue seleccionada como estándar interno.

Con objeto de seleccionar el potencial más adecuado para la detección de ambos compuestos (morfina y naloxona), se midió la respuesta obtenida después de variar el potencial de electrodo (oxidación). La respuesta se representó como el área del pico obtenido en cada caso vs. el potencial empleado (voltaje). Los voltagramas obtenidos para ambos compuestos se muestran en la Figura 3. La mejor respuesta para ambos compuestos se observó a 0.85 V.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Voltagramas obtenidos para morfina y naloxona.

6.1.2. Método de extracción

Los resultados obtenidos para la extracción de las muestras bajo diferentes condiciones experimentales, se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Selección del método de extracción de morfina en plasma

Método	Relación áreas (CV%)	Relación alturas (CV%)
I Manual/agua	0.270 (12.0)	0.812 (8.1)
II Vacío/agua	0.210 (8.7)	0.732 (4.7)
III Vacío/boratos 0.005M	0.260 (11.4)	0.933 (10.7)
IV Vacío/agua/OSD	0.235 (8.6)	0.689 (8.6)

Morfina 1000 ng/mL ($n = 3$); Nx = 10 μ g/mL

6.1.3. Selectividad

En la Figura 4 se presentan los cromatogramas obtenidos al aplicar el método propuesto a muestra blanco de plasma y plasma añadido de morfina, metamizol y naloxona. Los tiempos de retención para morfina (MOR), metamizol (MET) y el estándar interno naloxona (Nx) fueron 7.6, 11.8 y 16.5 minutos respectivamente.

6.1.4. Linearidad

La respuesta obtenida expresada como relación de alturas de los picos (altura morfina/altura naloxona) se graficó vs. la concentración de morfina. La curva promedio ($n = 3$) se presenta en la Figura 5. A partir de la regresión lineal de los datos, se calculó el valor de la pendiente, intercepto y el coeficiente de determinación (R^2).

Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico de la regresión a fin de determinar la confiabilidad de la linearidad. El método presentó una linearidad significativa ($p < 0.001$) en un rango de concentración de morfina de 1 a 1000 ng/mL ($R^2 = 0.9976$). El I.C. 95% para el intercepto fue de -0.019 a 0.067.

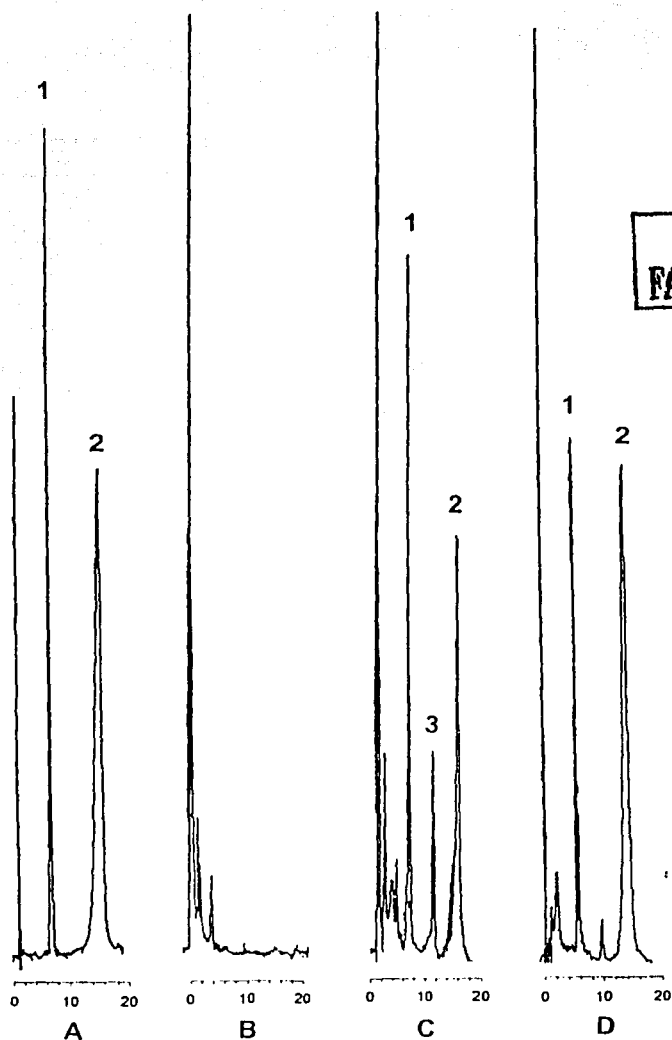


Figura 4. Cromatogramas típicos: A= Estándares de morfina (1) y naloxona (2) en fase móvil; B= Blanco de plasma de rata; C= Plasma añadido de morfina (1), naloxona (2) y metamizol (3); D= muestra de rata administrada con morfina y analizada por el método propuesto.

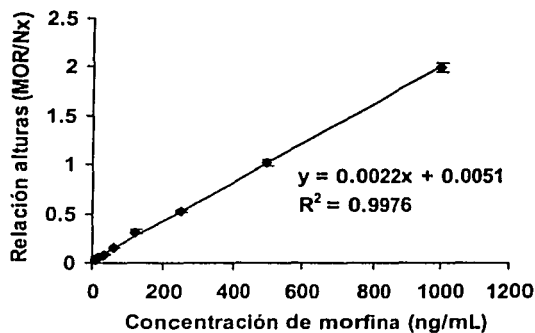


Figura 5. Curva de calibración de morfina obtenida por el método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector amperométrico. Media \pm d.e., $n = 3$.

6.1.5. Precisión

Los resultados obtenidos en cuanto a la precisión (intra-día) del método estudiado se presentan en la Tabla III.a.

Tabla III.a. Precisión del método analítico para cuantificar morfina en plasma (rango 62.5-1000 ng/mL)

Concentración (ng/mL)	R Alturas (MOR/Nx)	% Extracción (% C.V.)*
1000	1.991	98.8 (4.7)
500	1.019	99.2 (6.1)
250	0.530	104.2 (5.9)
125	0.313	91.3 (7.9)
62.5	0.155	98.2 (8.2)

* $n = 5$; $Nx = 3 \mu\text{g/mL}$

A fin de lograr una mayor exactitud en el análisis de muestras con concentraciones más bajas, fue necesario emplear una curva de calibración en un rango menor de concentraciones. Se redujo el volumen final para reconstituir la muestra (a $50 \mu\text{L}$) y se evaluó la linealidad del método con el análisis estadístico de la regresión lineal de la relación de la respuesta (altura

pico morfina/altura pico naloxona) vs. concentración de morfina; así como la precisión de los datos (%C.V.). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.b.

Tabla III.b. Precisión del método analítico para cuantificar morfina en plasma (rango 7.8-125 ng/mL)

Concentración (ng/mL)	R Alturas (MOR/Nx)	C.V. (%)*
125.0	0.2367	6.85
62.5	0.1442	3.15
31.25	0.0942	4.20
15.625	0.0469	2.70
7.813	0.0230	8.30

* $n = 5$; $Nx = 3 \mu\text{g/mL}$

6.1.6. Precisión en Diferentes Días

Los resultados obtenidos en 3 días diferentes (precisión inter-día), para el análisis de muestras de plasma que contenían 1000 ng/mL de morfina, se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Precisión entre días (inter-día). Concentración 1000 ng/mL

Día 1	Día 2	Día 3
1.872	1.704	2.060
1.624	2.015	1.808
1.608	1.782	1.752
$\bar{x} = 1.703$	$\bar{x} = 1.834$	$\bar{x} = 1.873$
%C.V. = 8.7	%C.V. = 8.8	%C.V. = 8.75

% C.V. = 8.74 ($n = 9$); $F_{\text{cal}} = 0.977$ ($p > 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para las muestras de 500 ng/mL analizadas por triplicado en tres días diferentes se obtuvo un %C.V. de 6.9% y una $F_{\text{cal}} = 0.716$ ($p > 0.05$).

6.1.7. Exactitud del Método

Se analizaron muestras de morfina en plasma en el rango de 30 a 1000 ng/mL por quintuplicado, utilizando el método propuesto y se determinó la concentración recuperada de cada muestra comparando la respuesta obtenida en cada caso con una curva de calibración en plasma analizada e inyectada el mismo día de análisis. La cantidad adicionada de morfina por mL de plasma se graficó vs. la cantidad de morfina recuperada. Los resultados se muestran en la Figura 6.

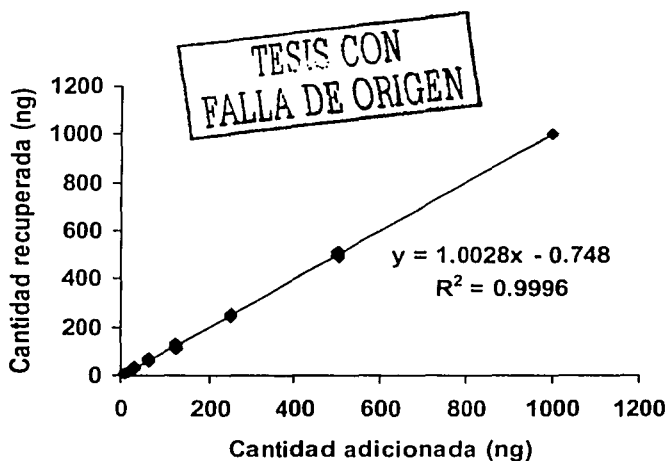


Figura 6. Exactitud del método de cromatografía de líquidos para la cuantificación de morfina en plasma ($n = 5$).

Los datos anteriores fueron sometidos al análisis de varianza de la regresión ($B = 1$, $p > 0.05$), la pendiente representa el promedio de la relación entre la cantidad recuperada y la cantidad adicionada de morfina (fracción extraída), a su vez el coeficiente de determinación obtenido (R^2) corrobora la linealidad del método de extracción.

6.1.8. Concentración mínima cuantificable (CMC)

La concentración mínima detectable fue de 1.5 ng/mL y la concentración mínima cuantificable (CMC) fue de 3.9 ng/mL con un C.V. < 10%.

6.1.9. Estabilidad de muestras plasmáticas

Los resultados obtenidos en el análisis de muestras mantenidas en congelación (-20°C), expresados en porcentaje de morfina presente en las muestras, después de 2, 4 y 8 semanas de almacenamiento, se muestran en la Tabla V. Estos resultados fueron analizados por ANDEVA de una sola vía. No se encontraron diferencias en las 8 semanas de estudio ($p > 0.05$).

Tabla V. Estabilidad de morfina en plasma.
Porcentaje de fármaco en la muestra

% Inicial	SEMANA		
	2	4	8
100.8	98.6	101.8	98.4
102.0	100.2	100.0	100.2
99.2	99.0	98.4	98.2
99.8	98.4	98.6	100.4
100.1	100.9	101.2	98.6

$n = 5$; $F_{\text{cal}} = 1.0624$; $p = 0.3926$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2. ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS

El ácido úrico provocó la disfunción completa de la pata derecha en 2.5 h, lo que correspondió a un IF% igual a cero. Las ratas que fueron tratadas con el vehículo solo, no mostraron recuperación alguna durante las 4h que duró el experimento (datos no presentados). No se observaron efectos adversos con las dosis de morfina y metamizol empleadas en el estudio.

Los cursos temporales del efecto analgésico (IF% vs. tiempo), obtenidos después de la administración subcutánea de una sola dosis de 562.3 mg/kg de metamizol (MET), 5.6 mg/kg de morfina (MOR) y la combinación de metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg, respectivamente), (MET+MOR), están representados en la Figura 7.

La morfina (5.6 mg/kg) produjo un incremento en el IF% que alcanzó un máximo de aproximadamente el 68% (E_{max}) en 1 h y el efecto analgésico disminuyó después gradualmente hasta alcanzar un IF% del 46% a las 4 horas. El metamizol (562.3 mg/kg) produjo un E_{max} del 86% a las 0.75 h, permaneciendo constante durante las primeras 2 h, con una disminución despreciable a las 2.5 h después de la administración. El efecto para metamizol al final del experimento ($E_{4\text{h}}$) fue del 79%. La combinación de metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) originó una recuperación rápida y significativa de la funcionalidad, alcanzándose un IF% alrededor del 100% a las 0.75 h y este efecto se mantuvo constante hasta las 4 h.

Como una consecuencia de la diferencia tanto en la duración como en la intensidad del efecto analgésico producidos por la combinación metamizol+morfina se obtuvo una marcada diferencia en el ABCe (Tabla VI). El ABCe de la combinación fue de 353.4 ± 24.7 u.a. (IF% h), mientras que para metamizol (562.3 mg/kg) el ABCe obtenida fue de 262.8 ± 10.2 u.a. y para morfina administrada sola (5.6 mg/kg) el ABCe fue de 196.6 ± 35.3 u.a.

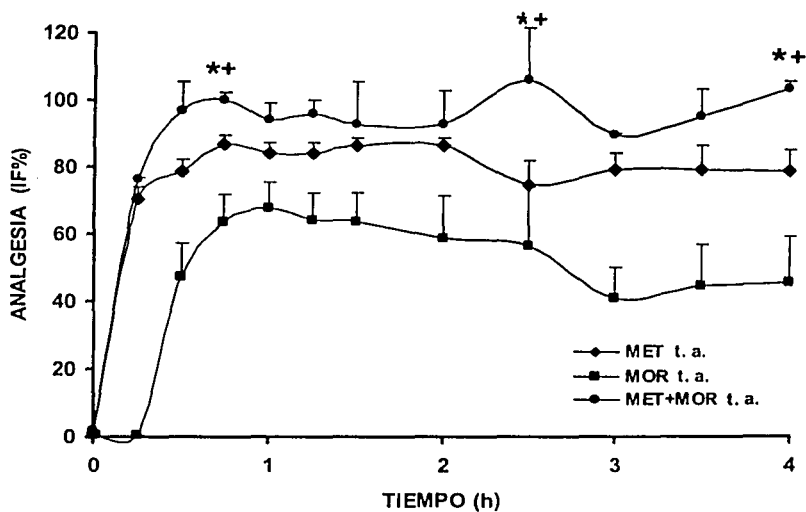


Figura 7. Cursos temporales del efecto antinociceptivo (analgésico) observado después de la administración s.c. de una sola dosis (t.a.) de la combinación metamizol+morfina 562.3:5.6 mg/kg (MET+MOR) y los componentes individuales metamizol 562.3 mg/kg y morfina 5.6 mg/kg (MOR). Media de 8 ratas + E.E.
* $p < 0.05$ combinación vs. morfina; + $p < 0.05$ combinación vs. metamizol.

Al comparar el efecto antinociceptivo (analgésico) de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg, respectivamente) con el de morfina (5.6 mg/kg) y metamizol (562.3 mg/kg) administrados en forma individual, utilizando un ANDEVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls (SNK), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en ABCe ($F_{cal} = 88.9$); E_{max} ($F_{cal} = 4.23$) y E_{4h} ($F_{cal} = 9.49$). Sin embargo, al comparar la combinación estudiada con una dosis de morfina de 10 mg/kg (dosis equieficaz), no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en estos parámetros (Tabla VI).

Los cursos temporales del efecto (CTs) obtenidos después del tratamiento subcrónico durante 6 días de morfina (5.6 mg/kg), metamizol (562.3 mg/kg) y su combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) se muestran en la Figura 8.

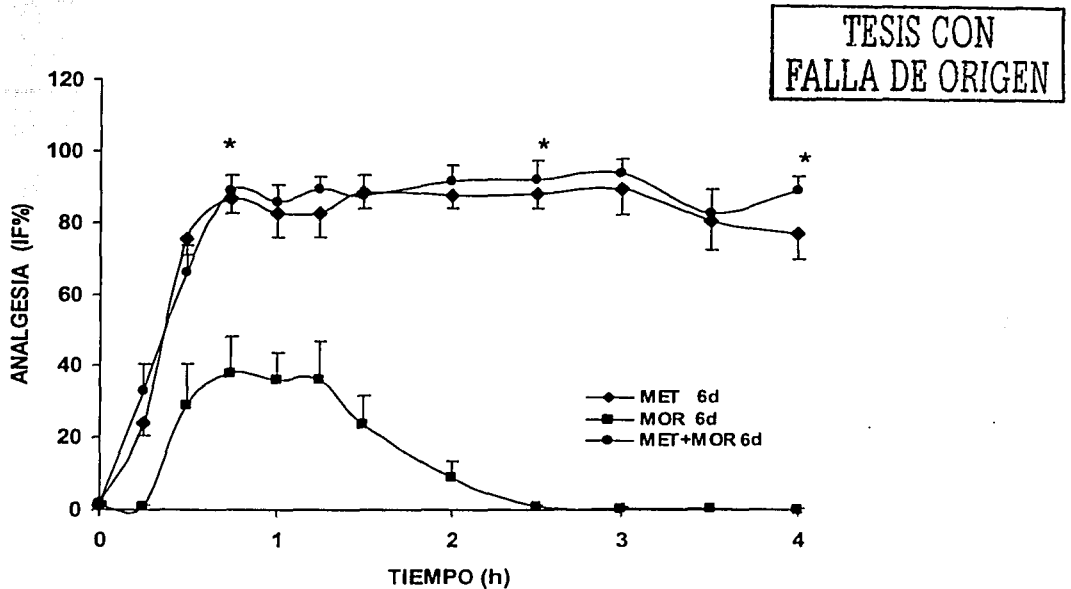


Figura 8. Cursos temporales del efecto antinociceptivo (analgesia) observado después de la administración subcrónica por 6 días de metamizol 562.3 mg/kg (MET 6d), morfina 5.6 mg/kg (MOR 6d) y la combinación metamizol+morfina, 562.3 : 5.6 mg/kg respectivamente (MET+MOR 6d). Media de 8 ratas \pm E.E. * $p < 0.05$ combinación vs. morfina.

En esta figura se observa que el efecto analgésico disminuye marcadamente después del tratamiento subcrónico de morfina administrada sola, lo cual era de esperarse ya que este fármaco genera importantes efectos de tolerancia analgésica cuando se administra en dosis repetidas. En este caso, el E_{max} alcanzado fue de tan sólo un 38% del IF a las 0.75 h, con una reducción aproximada del 50% del efecto al ser comparado con una dosis única de morfina (5.6 mg/kg). Después de este tiempo, el efecto desapareció rápidamente alcanzando un valor de cero a las 2.5 h. Por otro lado, la recuperación del IF% después de la administración de metamizol (562.3 mg/kg) por 6 días, fue prácticamente la misma que la de una sola dosis del mismo compuesto con un IF% de aproximadamente del 90% a las 0.75 h (E_{max}) permaneciendo en este valor hasta las 3 h y disminuyendo a 76% a las 4 h. Cuando la combinación

metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) se administró durante 6 días se alcanzó un IF% del 93% a las 0.75 h, manteniéndose alrededor del 90% hasta las 4 h. En este caso el efecto analgésico global obtenido con la combinación (ABCe) fue de 325.4 ± 13.1 u.a., mientras que para morfina administrada sola se obtuvo un ABCe de 49.6 ± 14.3 u.a. El ABCe de metamizol fue de 313.4 ± 14.5 u.a. (Tabla VI).

Tabla VI. Parámetros farmacodinámicos obtenidos después de la administración s.c. de morfina 5.6 mg/kg (MOR 5.6), 10 mg/kg (MOR 10), metamizol 562.3 mg/kg (MET) y la combinación de metamizol 562.3+morfina 5.6 mg/kg (MET+MOR) en tratamiento agudo y subcrónico por 6 y 12 días

Tratamiento	Eficacia Global ABC _e (%h)	T _{max} (h)	E _{max} (IF%)	E _{4h} (IF%)
Agudo				
MOR 10	$316.6 \pm 31.0^{n.s.}$	1.25 ± 0.09	$98.1 \pm 7.7^{n.s.}$	$53.9 \pm 14.1^*$
MOR 5.6	$196.6 \pm 35.0^*$	1.00 ± 0.07	$67.5 \pm 7.9^*$	$45.6 \pm 13.6^*$
MET 562.3	262.8 ± 10.2	0.75 ± 0.10	$77.9 \pm 2.6^*$	$67.2 \pm 4.4^*$
MET+MOR	353.4 ± 24.7	0.75 ± 0.12	97.0 ± 9.5	96.1 ± 4.8
6 días				
MOR 5.6	$49.6 \pm 14.3^*$	0.75 ± 0.05	$37.9 \pm 10.4^*$	$0.2 \pm 0.1^*$
MET 562.3	$313.4 \pm 14.5^{n.s.}$	0.75 ± 0.11	$88.3 \pm 4.4^{n.s.}$	$76.7 \pm 7.3^{n.s.}$
MET+MOR	325.4 ± 13.1	1.00 ± 0.14	93.5 ± 4.1	89 ± 3.9
12 días				
MOR 5.6	$56.6 \pm 0.9^*$	0.75 ± 0.08	$42.1 \pm 8.1^*$	$2.6 \pm 1.6^*$
MET 562.3	$258.8 \pm 23.7^*$	0.75 ± 0.09	$75.1 \pm 10.7^*$	$75.1 \pm 10.7^{n.s.}$
MET+MOR	354.5 ± 9.6	1.00 ± 0.11	100.6 ± 3.9	83.5 ± 4.7

*p<0.05, prueba Student Neuman-Keuls (fármacos solos vs. combinación de metamizol+morfina)

n.s. p>0.05; Los datos representan la media de 8 ratas \pm E.E.

Al comparar los resultados anteriores utilizando un ANDEVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el ABCe ($F_{cal} = 124.2$), el E_{max} ($F_{cal} = 19.6$) y el E_{4h} ($F_{cal} = 16.2$), entre la combinación metamizol+morfina y morfina sola (5.6 mg/kg), sin embargo no se encontraron diferencias en eficacia global (ABCe) ni en duración del efecto (E_{4h}) entre la combinación y metamizol (562.3 mg/kg). Por otro lado, la eficacia analgésica acumulativa (ABCe) de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) después de ser administrada por 6 días, fue equivalente (p>0.05) a la de la combinación en tratamiento agudo. Cabe mencionar que la

eficacia analgésica global de la combinación en tratamiento subcrónico por 6 días fue también igual que a la de una dosis de 10 mg/kg de morfina mientras que la duración del efecto (E_{4h}) fue mayor que la de ésta (Tabla VI).

Los cursos temporales (CTs) del efecto analgésico después de la administración por 12 días de morfina (5.6 mg/kg), metamizol (562.3:5.6 mg/kg) y la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) se muestran en la Figura 9. En ella se pueden apreciar claramente las ventajas de la combinación frente a los componentes administrados de manera individual en tratamiento subcrónico. La morfina generó un IF% del 42% (E_{max}) a las 0.75 h y este efecto disminuyó prácticamente a cero después de 2.5 h. El metamizol produjo una recuperación en el IF% de aproximadamente el 67% a 0.75 h observándose una ligera disminución en el efecto a 1h (IF% de 52), sin embargo después de este tiempo, el efecto se recuperó hasta alcanzar un 75% del IF y se mantuvo en este valor hasta las 4h. Por el contrario, la combinación metamizol+morfina produjo alrededor del 100% de efecto en un inicio (0.75 h) y se mantuvo en este valor hasta las 2.5 h. Después el efecto disminuyó gradualmente para alcanzar un IF del 85% a las 4h. El ABCe después de 12 días de tratamiento fue de 56.6 ± 1.0 u.a. para morfina (5.6 mg/kg), 258.8 ± 23.7 u.a. para metamizol (562.3 mg/kg) y 354.5 ± 9.6 u.a. para la combinación de metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg). Al realizar el ANDEVA se encontraron diferencias significativas en el ABCe ($F_{cal} = 90$) y E_{max} ($F_{cal} = 12.9$) entre la combinación y los componentes morfina y metamizol, sin embargo la duración del efecto de la combinación a los 12 días de tratamiento (E_{4h}) fue mayor que la obtenida con morfina ($F_{cal} = 15.5$), pero prácticamente igual a la de metamizol ($p < 0.05$) (Tabla VI).

Por último, el efecto analgésico de la combinación después de tratamiento agudo y subcrónico (6 y 12 días), fue comparado con el efecto producido por una dosis de morfina de 10 mg/kg. Los resultados se presentan en la Tabla VI. La eficacia analgésica global (ABCe) de la combinación aún después del tratamiento por 12 días fue equivalente a la de la dosis de 10 mg/kg de morfina.

En el caso de morfina (10 mg/kg), la duración del efecto fue menor y éste disminuyó hasta un 50% respecto del valor inicial al final del experimento (4h). Por el contrario, en todos los casos el efecto producido por la combinación metamizol+morfina estudiada se mantuvo arriba del 80% durante 4 h.

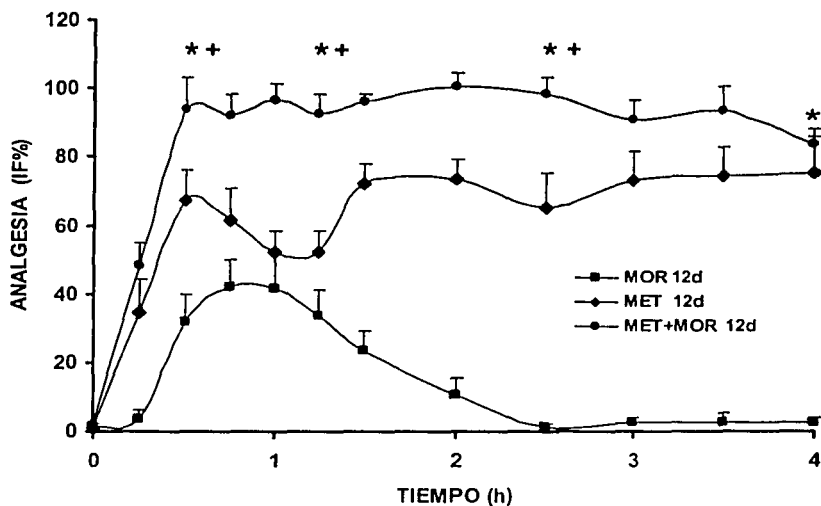


Figura 9. Cursos temporales del efecto antinociceptivo (analgesia) observado después de la administración s.c. de MET (562.3 mg/kg); MOR (5.6 mg/kg) y la combinación MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) durante 12 días de tratamiento. Los datos representan la media de 8 ratas \pm E.E.
 * $p < 0.05$ combinación vs. morfina; + $p < 0.05$ combinación vs. metamizol.

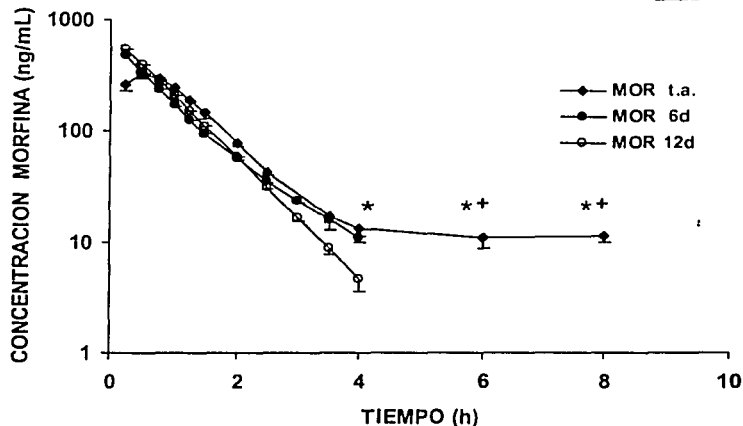
Los resultados anteriores confirman la utilidad de la combinación metamizol+morfina (562.3:5.6 mg/kg) durante el tratamiento subcrónico, bajo las condiciones experimentales estudiadas. Sería muy importante confirmar que los resultados en clínica fueran semejantes, ya que el uso de la combinación metamizol+morfina sería más útil que la misma morfina en el tratamiento crónico del dolor intenso. Cabe mencionar que no se observaron efectos adversos en las ratas durante los tratamientos subcrónicos de metamizol, morfina o la combinación metamizol+morfina (i.e. alteración de la actividad locomotora, coordinación muscular, tono muscular, flacidez, excitabilidad o muerte).

6.3. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

El promedio de la concentración de morfina presente en plasma después de la administración subcutánea de 5.6 mg/kg de morfina en ausencia y presencia de metamizol (562.3 mg/kg) en una sola dosis (t.a.) y después de la administración subcrónica por 6 y 12 días, se representó gráficamente en función del tiempo. En todos los casos se presentan solamente los datos de 6 ratas (para cada tratamiento) ya que en algunas ratas se perdieron muestras de sangre y no fue posible determinar el perfil.

6.3.1. Farmacocinética de morfina en dosis única (5.6 mg/kg) y en tratamiento subcrónico por 6 y 12 días

En la Figura 10 se presenta el curso temporal de concentraciones promedio de morfina en plasma, después de la administración de morfina sola (5.6 mg/kg) en los tres tratamientos (agudo y subcrónico por 6 y 12 días). Aún cuando se tomaron muestras hasta las 24 h, no se detectaron concentraciones de morfina después de las 8 h, por lo que únicamente están representados los datos hasta este tiempo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Cursos temporales de concentraciones plasmáticas de morfina después de la administración s.c. de 5.6 mg/kg de morfina en dosis única (MOR t.a.) y en tratamientos subcrónicos por 6 (MOR 6d) y 12 días (MOR 12d). Media de 6 ratas \pm E.E. * $p < 0.05$ t.a. vs. 6 d; * $p < 0.05$ t.a. vs. 12 d.

En el caso de la administración de morfina sola (tratamiento agudo) se obtuvo una ligera fase ascendente, que pudiera caracterizar la fase de absorción después de la administración subcutánea. En la porción logaritmo-lineal de la fase descendente, los datos mostraron una curva biexponencial, por lo cual el mejor ajuste se obtuvo para el modelo de dos compartimentos (Anexo 10.1). En las ratas tratadas previamente por 6 y 12 días (subcrónicos) no fue posible observar la fase de absorción. Los parámetros farmacocinéticos calculados para cada tratamiento se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII. Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración s.c. de MOR (5.6 mg/kg) en t.a. y tratamiento subcrónico por 6 y 12 días (MOR 6d y MOR 12d)

PARÁMETRO	MOR t.a.	MOR 6d	MOR 12d
$ABC_{0-\infty}$ (ngh/mL)	976.77 ± 53.53	537.25 ± 23.97	712.83 ± 66.45
t_{max} (h)	0.75 ± 0.05	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00
C_{max} (ng/mL)	365.11 ± 35.55	467.09 ± 44.76	578.27 ± 48.73
C_{p4h} (ng/mL)	22.78 ± 1.95	4.97 ± 0.86*	5.11 ± 1.70*
β (h^{-1})	0.36 ± 0.04	1.19 ± 0.06*	1.06 ± 0.31*
$t_{1/2 \beta}$ (h)	1.93 ± 0.18	0.58 ± 0.03*	0.66 ± 0.19*
TMR (h)	2.54 ± 0.26	0.76 ± 0.06*	0.78 ± 0.03*
$\dot{V}\beta/F$ (L/kg)	16.01 ± 0.93	8.79 ± 1.62	7.45 ± 0.74
Cl/F (L/h/kg)	5.73 ± 0.33	10.42 ± 2.07*	7.86 ± 0.78*

* $p < 0.05$ vs. MOR t.a. Los valores representan la media ± E.E. ($n = 6$)

Los parámetros así obtenidos, previa transformación logarítmica, fueron comparados utilizando un ANDEVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet T3 (Tabachnick y Fidell, 2001), empleando el programa SPSS Versión 10. No se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) ni en el $ABC_{0-\infty}$ después del tratamiento previo de morfina por 6 y 12 días (subcrónicos) al ser comparados con los valores del tratamiento agudo (Tabla VIII). Sin embargo, en las ratas tratadas previamente durante 6 días (MOR 6d) y 12 días (MOR 12d), se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la eliminación global del fármaco. La constante de eliminación global (β) aumentó de manera significativa de $0.36 \pm 0.04 h^{-1}$ en el tratamiento agudo, hasta $1.19 \pm 0.06 h^{-1}$ para MOR 6d y $1.06 \pm 0.31 h^{-1}$ para MOR 12d ($p < 0.05$). La depuración global (Cl_T) aumentó de 5.73 ± 0.33 l/h/kg (95.5 ± 5.5 mL/min/kg) para morfina en dosis única hasta 10.42 ± 2.07 l/h/kg (173.66 ± 34.5 mL/min/kg) para MOR 6d y a 7.86 ± 0.78 l/h/kg (131 ± 13 mL/min/kg)

para MOR 12d ($F_{cal} = 46.57$). La vida media de eliminación en el caso de los tratamientos subcrónicos disminuyó a una tercera parte del valor obtenido con el tratamiento agudo ($F_{cal} = 708.37$).

La vida media obtenida después de los tratamientos subcrónicos de MOR 6d y MOR 12d, comparada con la de la administración de morfina en t.a., fue de 0.58 ± 0.03 h vs. 1.93 ± 0.18 h y de 0.66 ± 0.19 vs. 1.93 ± 0.18 h, respectivamente. El tiempo medio de residencia (TMR) también disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) de 2.54 ± 0.09 h para morfina (t.a.) a un valor de 0.76 ± 0.06 h en el caso de la administración de MOR 6d y de 0.78 ± 0.03 h para MOR 12d ($p < 0.05$). La concentración plasmática a las 4 horas (C_{p4h}) se redujo de 22.28 ± 1.95 ng/mL (t.a.) hasta 4.97 ± 0.86 ng/mL para MOR 6d y hasta 5.11 ± 1.7 ng/mL para MOR 12d ($p < 0.05$). Cabe mencionar que como una consecuencia de lo anterior, en el caso de los tratamientos subcrónicos no se encontraron concentraciones detectables de morfina en plasma después de las 4 horas de la administración de la última dosis.

6.3.2. Farmacocinética de morfina (5.6 mg/kg) en combinación con metamizol (562.3 mg/kg) en dosis única.

Los valores promedio ($n = 6$) de concentraciones plasmáticas de morfina encontradas después de la administración de morfina (5.6 mg/kg) sola y en combinación con metamizol (562.3 mg/kg) en dosis única (t.a.) se muestran en la Figura 11. En esta figura se observa una marcada interacción farmacocinética entre los dos fármacos, lo cual originó un incremento considerable en las concentraciones de morfina en plasma.

A partir de los datos obtenidos después de la administración de morfina en combinación con metamizol se calculó el área bajo la curva durante las 4 h (ABC_{0-4}) y el área bajo la curva durante 24 h siguientes a la administración del fármaco (ABC_{0-24h}) en el último intervalo de dosificación. Los valores de t_{max} , C_{max} y C_{p4h} , se obtuvieron directamente de los datos individuales y se calculó la media (Tabla VIII). Algunos autores (Julious y Debarnot, 2000) han propuesto el cálculo de la media geométrica para estos parámetros (i.e. t_{max} , C_{max}), considerando que no siguen una distribución normal. Sin embargo, el resultado final del análisis estadístico de los datos no se modificó, independientemente del valor utilizado (media aritmética o media geométrica). Todos los parámetros farmacocinéticos fueron transformados logarítmicamente antes de realizar el análisis estadístico, logrando así una aproximación mayor a la distribución normal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

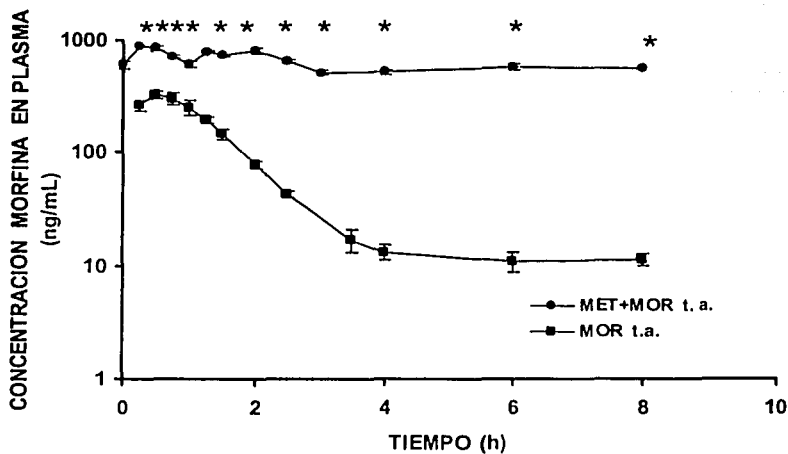


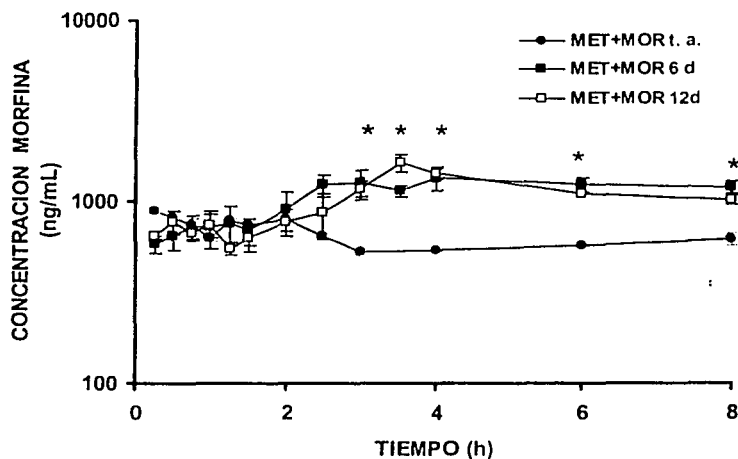
Figura 11. Curso temporal de concentraciones plasmáticas de morfina después de la administración s.c. de morfina 5.6 mg/kg sola y la combinación metamizol+morfina 562.3 : 5.6 mg/kg respectivamente en tratamiento agudo. Los datos representan la media de 6 ratas \pm E.E.
 * $p < 0.05$ combinación MET+MOR vs. MOR.

Los parámetros obtenidos con la combinación de metamizol+morfina (t.a.) fueron comparados con los de la administración de morfina sola (t.a.), utilizando un ANDEVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet T3, demostrándose que el $ABC_{0.4}$, el $ABC_{0.24h}$, la concentración plasmática máxima alcanzada (C_{max}) y la concentración de morfina presente en plasma 4 h después de la administración (C_{p4h}), aumentaron de manera significativa en presencia de metamizol ($p < 0.05$), lo cual corrobora la interacción farmacocinética entre estos dos fármacos. La C_{max} obtenida después de la administración de morfina sola (365.11 ± 35.55 ng/mL) aumentó en más del 246% en presencia de metamizol (898.13 ± 22.09 ng/mL). De la misma forma, el $ABC_{0.4}$ de morfina aumentó de manera significativa de 466.26 ± 31.47 ngh/mL a 2640.83 ± 50.12 ngh/mL en presencia de metamizol ($p < 0.05$) y el $ABC_{0.24h}$ aumentó casi 10 veces, de 514.17 ± 29.7 hasta 4963.99 ± 118.64 ($p < 0.05$). El t_{max} para morfina sola fue de 0.75 h mientras que para el caso de morfina en presencia de metamizol, este tiempo se desplazó hasta 2.0 h, sin embargo desde los tiempos

iniciales de muestreo (0.25 h), se encontraron concentraciones elevadas de morfina. También se encontraron diferencias significativas en la C_{p4h} (Tabla VI). Adicionalmente se comparó el perfil de concentración de morfina en presencia de metamizol vs. morfina sola, utilizando un ANDEVA, encontrándose diferencias significativas en todos los tiempos ($p < 0.05$).

6.3.3. Farmacocinética de morfina (5.6 mg/kg) en combinación con metamizol (562.3 mg/kg) en tratamientos agudo y subcrónicos por 6 y 12 días

En la Figura 12 está representado el curso temporal de concentraciones de morfina en plasma después de la administración de la combinación de morfina (5.6 mg/kg) con metamizol (562.3 mg/kg), tanto en tratamiento agudo como en tratamiento subcrónico (6 y 12 días). En contraste a la administración de morfina sola (Figura 10), donde el tratamiento subcrónico dio lugar a una disminución en las concentraciones de morfina en plasma, el tratamiento subcrónico de morfina en combinación con metamizol originó una acumulación del fármaco. En este caso, los niveles de morfina (en el último intervalo de dosificación), alcanzaron una meseta a las 2.5 h después de la administración y se mantuvieron en concentraciones constantes hasta las 24 h.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Cursos temporales de concentraciones plasmáticas de morfina después de la administración s.c. de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento agudo (MET+MOR t.a.) y subcrónico por 6 (MET+MOR 6d) y 12 días (MET+MOR 12d). Media de 6 ratas \pm E.E. * $p < 0.05$ subcrónicos vs. t.a.

A partir de estos datos se calcularon los parámetros de ABC_{0-4} , ABC_{0-24h} , C_{max} y t_{max} (Tabla VIII). Los parámetros obtenidos para morfina+metamizol en tratamiento subcrónico (MET+MOR 6d y MET+MOR 12d) se compararon con los parámetros calculados después del tratamiento agudo de morfina en combinación con metamizol (MET+MOR t.a), así como con los parámetros obtenidos para morfina en ausencia de metamizol, tanto en dosis única (MOR t.a.), como después de los tratamientos subcrónicos por 6 y 12 días (MOR 6d y MOR 12 d, respectivamente), utilizando un ANDEVA, seguido de la prueba de Dunnett T3 (Tabla VIII).

Tabla VIII. Parámetros farmacocinéticos de morfina obtenidos en ratas después de la administración s.c. de 5.6 mg/kg de morfina sola (MOR) y en combinación con metamizol (MET+MOR) en tratamiento agudo y subcrónicos de 6 y 12 días

TRATAMIENTO	ABC_{0-4} (ngh/mL)	ABC_{0-24} (ngh/mL)	$C_{p_{max}}$ ng/mL	$C_{p_{4h}}$ ng/mL
Agudo				
MOR	466.26 ± 31.47	514.17 ± 29.70	365.11 ± 35.55	22.28 ± 1.95
MET+MOR	2640.83 ± 50.12*	4963.99 ± 118.64*	898.13 ± 22.09*	540.82 ± 14.51*
6 días				
MOR	443.91 ± 24.71	443.91 ± 24.91	467.09 ± 44.78	4.97 ± 0.86
MET+MOR	3742.58 ± 390.18*	29746.2 ± 599.24*	1688.98 ± 190.73*	1907.98 ± 114.76*
12 días				
MOR	483.04 ± 29.67	497.73 ± 28.32	578.27 ± 50.90	5.11 ± 1.70
MET+MOR	3550.62 ± 251.88*	30092.61 ± 320.60*	1679.06 ± 111.69*	1788.98 ± 134.73*

* $p < 0.05$ (metamizol+morfina vs. morfina). Media ± E.E. ($n = 6$)

Las concentraciones de morfina en presencia de metamizol después del tratamiento subcrónico por 6 días fueron mayores que las obtenidas cuando la combinación se administró en una sola dosis ($p < 0.05$). La C_{max} se incrementó hasta alcanzar un valor de 1688.98 ± 190.73 ng/mL, prácticamente el doble (188%) que la alcanzada en el tratamiento agudo con la combinación metamizol+morfina que fue de 898.13 ± 22.09 ng/mL ($p < 0.05$). Por otro lado, la C_{max} obtenida después de 12 días de tratamiento con la combinación fue prácticamente la misma que la del tratamiento subcrónico de 6 días (1679.06 ± 111.69 ng/mL). El ABC_{0-4} para la combinación aumentó de 2640.83 ± 50.12 ngh/mL (en una sola dosis) hasta 3742.58 ± 390.18 ngh/mL después del tratamiento por 6 días ($p < 0.05$) y a 3550.62 ± 251.88 ngh/mL después de 12 días de tratamiento (Tabla VIII, Figura 12). Adicionalmente el ABC_{0-24} aumentó de 4963.99 ± 118.64 (t.a.) hasta 29746.2 ± 599.24 y 30092.61 ± 320.91 para la combinación administrada por 6 y 12 días respectivamente. Estas diferencias fueron aún más marcadas ($p < 0.001$) cuando se

se compararon los valores obtenidos para la combinación en tratamiento subcrónico con los de morfina administrada sola por 6 y 12 días (Tabla VIII).

6.3.4. Relación entre concentraciones de morfina y el efecto observado.

Con la finalidad de analizar la relación existente entre las concentraciones plasmáticas de morfina y el efecto antinociceptivo (analgesia) producido después de la administración de morfina en los diferentes tratamientos, se graficó el valor promedio del IF % vs. el promedio de concentración de morfina obtenida a cada tiempo, durante las 4 h posteriores a la administración. Las gráficas obtenidas con los tres tratamientos de morfina administrada sola están representadas en la Figura 13. En esta figura se aprecia un tiempo de latencia entre la aparición del efecto antinociceptivo y las concentraciones de morfina existentes inicialmente. En todos los casos se observó un comportamiento de histeresis en contra de las manecillas del reloj ("counterclockwise").

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

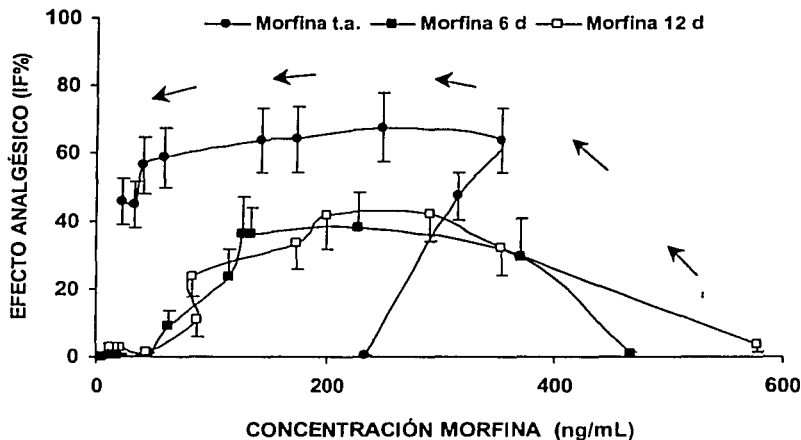


Figura 13. Relación entre las concentraciones de morfina y el efecto antinociceptivo (IF%) determinado en el modelo PIFIR en ratas ($n = 6$). Las flechas indican la secuencia del tiempo de muestreo (histeresis en contra de las manecillas del reloj (counterclockwise)).

A partir de los datos obtenidos en el presente estudio, se calculó el área bajo la curva de efecto (ABCe acumulativa) y se graficó vs. el área bajo la curva de concentraciones de morfina en plasma (ABCCp acumulativa). Los datos anteriores fueron ajustados a diferentes funciones, representando una función lineal, logaritmo lineal y el modelo sigmoideo de E_{max} , empleando el programa GraphPad Prism v. 3.03. El mejor ajuste ($R^2 > 0.99$) se obtuvo con el modelo sigmoideo de E_{max} en el que la relación entre la concentración de morfina y el efecto antinociceptivo está representada por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$$

donde:

E = Efecto global observado (representado por el ABCe acumulativa)

E_{max} = Efecto global máximo observado

C = Concentración de morfina en plasma (ABC acumulativa)

EC_{50}^γ = Concentración a la cual se alcanza el 50% del efecto máximo

γ = Factor de respuesta

En la Figura 14 se muestra la relación que existe entre el ABCCp y el ABCe después de la administración de morfina sola (5.6 mg/kg) en los tres tratamientos, bajo las condiciones del presente estudio. En esta figura están representados los valores promedio obtenidos durante las primeras cuatro horas siguientes a la administración del fármaco ya que se ha encontrado que durante este tiempo la medición del efecto es confiable. En todos los casos se obtuvo un coeficiente de determinación satisfactorio ($R^2 > 0.99$) para el ajuste de los datos de morfina (administrada sola), al modelo de E_{max} . El ABCe para morfina en tratamiento agudo, alcanzó un valor de aproximadamente 200 u.a. (IF%h) para un ABCCp de morfina de alrededor de 400 ng/h/mL. Sin embargo, en el caso del tratamiento subcrónicos por 6 días, para el mismo valor de ABCCp el efecto global alcanzado (ABCe) disminuye a una cuarta parte del obtenido con morfina sola y todavía más en el caso del tratamiento subcrónico de 12 días.

En la Figura 15 se resumen los valores promedio de la relación ABCe vs. ABC de concentraciones plasmáticas de morfina obtenidas después de la administración de la combinación metamizol+morfina en los tres tratamientos (agudo y subcrónico por 6 y 12 días). En todos los casos se obtuvo un coeficiente de determinación $R^2 > 0.99$, para el ajuste de los datos al modelo sigmoideo de E_{max} .

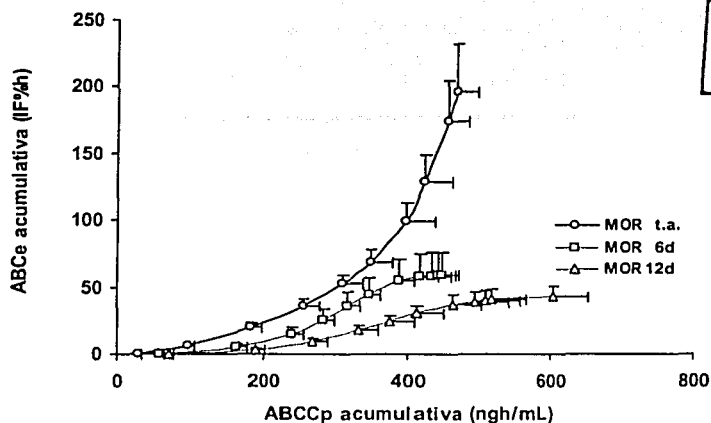


Figura 14. Ajuste de los datos de concentración-efecto al modelo sigmoideo de E_{max} después de la administración de morfina sola en tratamiento agudo (MOR t.a.) y subcrónico (MOR 6d y MOR 12d). Los símbolos representan la media de 6 ratas \pm el error estándar. La línea continua representa la función de ajuste al modelo empleado.

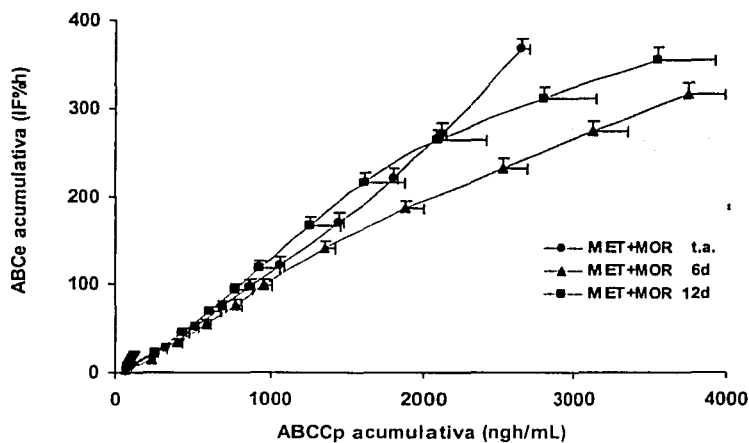


Figura 15. Ajuste de los datos de concentración-efecto de morfina en presencia de metamizol al modelo sigmoideo de E_{max} en tratamiento agudo (MET+MOR t.a.) y subcrónico (MET+MOR 6d y MET+MOR 12d). Los símbolos representan la media de 6 ratas \pm el error estándar. La línea continua representa la función de ajuste al modelo empleado.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. MÉTODO ANALÍTICO

En la literatura han sido publicados numerosos métodos analíticos para la cuantificación de morfina en plasma para ser utilizados en estudios de farmacocinética tanto en humanos como en animales (i.e. ratas). Sin embargo, a la fecha no se ha estudiado la farmacocinética de morfina después de la administración simultánea de metamizol. El método desarrollado en el presente trabajo es selectivo, sensible, rápido y utiliza un volumen de 100 μ L de muestra, lo cual permite determinar el curso temporal de concentraciones plasmáticas de morfina en el mismo animal paralelamente a la medición del curso temporal del efecto antinociceptivo (analgésico). De los resultados de validación del método se encontró lo siguiente:

7.1.1. Selectividad y sensibilidad

El método analítico propuesto resultó ser selectivo, ya que no presentó interferencias con componentes endógenos del plasma, con metamizol, con metabolitos de morfina u otros compuestos estudiados. El método de detección empleado (amperométrico) es selectivo para morfina inalterada, puesto que el metabolito principal que se forma en ratas, el 3-glucurónido de morfina (M3G), no es detectado debido a que el grupo fenólico que es oxidado se encuentra conjugado formando el glucurónido (Todd y col., 1982; Turner y Murphy, 1988; Horton y Pollack, 1991). Adicionalmente se probó que no existe interferencia alguna con la 4-aminoantipirina (principal metabolito del metamizol) bajo las condiciones descritas, por lo cual el método puede ser utilizado para la cuantificación de morfina en presencia de metamizol.

El método propuesto en el presente trabajo, permitió la detección de concentraciones de morfina tan bajas como 1.5 ng/mL (concentración mínima detectable) y la cuantificación de 3.98 ng/mL (concentración mínima cuantificable) con una precisión satisfactoria (C.V.<10%). Estos valores se encuentran dentro de las concentraciones mínimas encontradas por otros autores después de la administración de una dosis de morfina de 5 mg/kg de peso en ratas (Bhargava y col., 1991).

El método utiliza volúmenes de plasma de 50 o 100 μ L (micrométodo) por lo cual es posible obtener un número suficiente de muestras en el mismo animal para definir la farmacocinética de morfina, sin provocar la descompensación fisiológica del animal (Ekblom y col., 1993a; Bhargava y col, 1993). Por lo anterior, se puede considerar que el método propuesto es lo suficientemente sensible para los fines del estudio farmacocinético de morfina en ratas.

7.1.2. Extracción de morfina

Los procedimientos de extracción de morfina a partir de los especímenes biológicos, previamente al análisis cromatográfico, inicialmente incluían la extracción con solventes (líquido-líquido). La mayoría de estos métodos requieren una preparación de muestra muy prolongada, con por lo menos dos pasos de extracción y evaporación del solvente (Mc Lean y col., 1990). Durante los últimos años, el método de extracción publicado por Svensson (1982; 1986), con ligeras modificaciones propuestas por Joel y col. (1988) ha sido el más utilizado en estudios de farmacocinética en humanos (Portenoy y col., 1992; Osborne y col., 1986, 1988, 1990), y en animales (Horton y Pollack, 1991, Ekblom y col., 1993a, 1993b; Gardmark y col., 1993).

El método de extracción en fase sólida utilizado permitió obtener una buena recuperación de los compuestos a partir de una muestra de plasma 100 μL (micrométodo), evitando el uso de grandes volúmenes de soluciones amortiguadoras y varios pasos de extracción. Por lo anterior se consideró que el método de extracción propuesto puede ser utilizado satisfactoriamente para el tratamiento de muestras obtenidas en el estudio farmacocinético en ratas.

7.1.3. Linearidad y Exactitud

El método presentó una linearidad satisfactoria en un rango de concentración de 1 a 1000 ng/mL ($R^2 = 0.999$). El método es exacto ya que el porcentaje de fármaco recuperado se encuentra entre el 91-104% (Tabla III.a.). Lo anterior también se demostró al graficar la cantidad de morfina recuperada vs. morfina adicionada (Figura 4) donde a partir del análisis de varianza de la regresión se obtuvo una pendiente de 1.0028 con un I.C._{.95%} de 0.986 a 1.028, un intercepto de -0.748 con un I.C._{.95%} de -2.19 a 1.69 y un $R^2 = 0.9996$. La linearidad del método se mantuvo en el intervalo adecuado aún cuando se varió el volumen de reconstitución de la muestra en el rango de concentración más pequeño (7 a 125 ng/mL) (Tabla III.b.).

De acuerdo a los resultados anteriores, el método cumple con los criterios establecidos de linearidad y exactitud para métodos analíticos en fluidos biológicos en el rango de concentraciones estudiadas.

7.1.4. Precisión

De acuerdo a las Tabla III.a. y III.b., el máximo coeficiente de variación obtenido en el análisis de muestras en un mismo día (precisión intra-día) fue de 8.2% para la concentración de

62.5 ng/mL y de 8.3% para la concentración de 7.8 ng/mL. Dado que estos valores son menores al 15%, se considera que el método es preciso. Al comparar los resultados del análisis de muestras de 500 ng/mL y 1000 ng/mL en tres días diferentes (precisión inter-día) utilizando un ANDEVA no se encontraron diferencias significativas entre días ($p > 0.05$) por lo cual el método cumple con los criterios de precisión (inter-día) para métodos analíticos en fluidos biológicos.

En vista de los resultados obtenidos en cuanto a selectividad, linealidad, precisión y exactitud, es posible considerar que el método desarrollado en el presente trabajo es confiable para los fines propuestos y puede ser utilizado en el estudio farmacocinético de morfina en ratas después de la administración del fármaco solo y en presencia de metamizol.

7.1.5. Estabilidad de Muestras Plasmáticas

El ANDEVA de los datos obtenidos para las muestras guardadas en congelación mostró que no existen diferencias entre las concentraciones de morfina en plasma después de 2 meses de almacenamiento a -20°C y las concentraciones iniciales ($p > 0.05$). Así mismo, otros autores han confirmado la estabilidad de morfina en congelación a -20°C , hasta por 2 años (Milne y col., 1991), por lo cual se considera que las muestras en plasma pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo, sin degradación aparente de morfina.

7.2. ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS

Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar la eficacia analgésica de la combinación así como el posible efecto de desarrollo de tolerancia producidos por la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg), después del tratamiento subcrónico en ratas, empleando el modelo experimental PIFIR. Los datos obtenidos después de la administración s.c. aguda y subcrónica (6 y 12 días) de la combinación fueron comparados con los de los componentes individuales, metamizol (562.3 mg/kg) y morfina (5.6 mg/kg).

La combinación metamizol+morfina fue seleccionada para este estudio tomando como base otras investigaciones. En estudios anteriores, la administración de una sola dosis de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) produjo el efecto analgésico máximo entre 24 combinaciones diferentes de metamizol+morfina estudiadas (López-Muñoz, 1994). También se comprobó que la eficacia de esta combinación, es mayor a la producida por la dosis más alta de metamizol, ácido acetilsalicílico, paracetamol y morfina (Dominguez y López-Muñoz, 1997).

En el presente estudio, se confirmaron dichos resultados, ya que la eficacia analgésica global (representada como el ABCe) de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) en tratamiento agudo fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la observada después de la administración de los componentes individuales en la misma dosis que se emplea en la combinación (Dominguez y col., 2000).

El uso de combinaciones de fármacos analgésicos que actúan a distintos niveles (tanto central como periférico) puede resultar en un sinergismo de los efectos individuales. En este caso, se sabe que la morfina ejerce su acción actuando a distintos niveles en el sistema nervioso central, al unirse a receptores específicos opioides (receptores μ principalmente), tanto a nivel espinal como supraespinal por el mismo mecanismo de la encefalina (Martín, 1984; Jaffe y Martín, 1996; Lipp, 1991). Existe evidencia además, del papel que juega la activación de las vías inhibitorias bulboespinales adrenérgicas y serotoninérgicas (Yaksh, 1979; Yeomans y col., 1992; Kawamata y col., 1993). Adicionalmente, se ha observado que la morfina tiene un efecto directo sobre los estados hiperalgésicos inflamatorios (Lorenzetti y Ferreira, 1982; 1985). Ferreira (1993) propuso que la inyección de morfina origina una atenuación ("regulación a la baja") de los receptores del dolor, que pudiera estar mediada por la activación de la vía arginina-óxido nítrico-GMPc (Duarte y col., 1990; Ferreira y col., 1991). Por otro lado, el metamizol es un derivado de pirazolona comúnmente clasificado como un fármaco que ejerce su acción a nivel periférico, ya que sus metabolitos principales (metilamino-antipirina y aminoantipirina) actúan como inhibidores de la ciclooxigenasa (Brogden, 1986; Brune y Alpermann, 1983). Sin embargo, el metamizol es mucho más efectivo como agente antipirético que como un agente antiinflamatorio *in vivo*, además de que se ha demostrado que produce efectos analgésicos a nivel central (Neugebauer y col., 1994). Al igual que otros fármacos AAINes como el diclofenaco, el efecto analgésico del metamizol involucra la activación de la vía arginina-óxido nítrico-GMPc (Duarte y col., 1992; Lorenzetti y Ferreira, 1985; López-Muñoz y col., 1996). Existe también evidencia experimental que avala la hipótesis de que el metamizol produce efectos centrales antinociceptivos al activar las vías descendentes inhibitorias provenientes de la sustancia gris periacueductal (SGPA) y ejerce un efecto inhibitorio sobre la transmisión del impulso doloroso a nivel espinal (Carlsson y col., 1986, 1988; Carlsson y Jurna, 1987). Es probable que los efectos centrales que se han atribuido a metamizol contribuyan a la elevada eficacia de este fármaco. La eficacia analgésica de dosis altas de metamizol (2 g cada 8 h) en el tratamiento de dolor crónico en pacientes con cáncer, ha sido demostrada clínicamente siendo comparable a la de morfina (Rodríguez y col., 1994). Igualmente, su uso ha permitido reducir la frecuencia de la administración de morfina en cirugías abdominales

mayores (Rockemann y col., 1996). La eficacia de metamizol en dichas circunstancias, puede explicar también el efecto sinérgico observado con la combinación estudiada.

En el presente estudio no se investigaron los posibles mecanismos involucrados en la potenciación de los efectos analgésicos producidos por la combinación de metamizol con morfina durante la administración única o subcrónica, ya que no era la finalidad de esta tesis, sin embargo es factible postular posibles niveles de interacción. Se sabe que los efectos centrales del metamizol han sido asociados al sistema opioide endógeno, debido a que su efecto antinociceptivo ha sido bloqueado por naloxona (Tortorici y col., 1996), además existe evidencia de que el metamizol, al igual que otros fármacos AAINes, es capaz de estimular la liberación de β -endorfinas hipotalámicas y de la pituitaria (Sacerdote y col., 1985; Vlaskova y col., 1989). Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto (1999), postularon la participación de un mecanismo a nivel periférico por activación de la vía L- arginina-ON-GMPc, para explicar la potenciación del efecto antinociceptivo de morfina por metamizol en la prueba de la formalina en rata, sin embargo estos resultados no pudieron ser confirmados en otros estudios (Hernández-Delgadillo y col., 2002). Las diferencias encontradas en dichos estudios pueden ser atribuidas a diferencias en las dosis empleadas y en los modelos experimentales utilizados para medir antinocicepción.

Adicionalmente, se ha demostrado que el efecto antinociceptivo producido por la combinación de metamizol con morfina puede ser antagonizado en parte por naloxona, lo cual sugiere una participación parcial del sistema opioide en el sinergismo presentado por estos fármacos (Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 1999; Hernández- Delgadillo y col., 2002). Sin embargo, se requiere investigación adicional destinada a confirmar la participación de tales mecanismos en el caso de la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg). Finalmente, cabe mencionar que la eficacia analgésica obtenida con la combinación estudiada puede ser también el resultado de otras interacciones, tanto farmacodinámicas como farmacocinéticas, que existan entre los componentes, ya sea en administración única o subcrónica. Más adelante se analizan las interacciones farmacocinéticas que pueden presentarse.

En el presente estudio también se evaluó el posible desarrollo de tolerancia producido por la administración repetida de morfina, metamizol y la combinación morfina metamizol durante 6 y 12 días. La duración de los tratamientos subcrónicos se seleccionó tomando como base otros estudios en animales en los que se demostró que la administración repetida de morfina por 6 o 12 días es suficiente para desarrollar tolerancia al efecto antinociceptivo de la misma.

El desarrollo de tolerancia a morfina se confirmó aún a la dosis baja que fue utilizada (5.6 mg/kg), sin embargo cuando ambos fármacos fueron administrados conjuntamente, la alta

eficacia analgésica presentada por la combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) se hace evidente, y cualquier disminución en el efecto por el uso prolongado de los fármacos queda anulado. No existe diferencia alguna en la intensidad del efecto, ni en la duración del mismo para el caso de la combinación aún después de 12 días de tratamiento ($p > 0.05$). Puede ser posible que aunque se observa un efecto de tolerancia marcado (morfina por 6 y 12 días) o despreciable (metamizol por 12 días) con los compuestos solos, el sinergismo analgésico que resulta de la combinación de ambos fármacos es predominante sobre cualquier efecto adverso (Domínguez y col., 2000).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el metamizol atenúa significativamente el desarrollo de tolerancia a morfina, modulando los procesos farmacodinámicos responsables de ésta. Estos resultados confirman la utilidad de la combinación de fármacos que muestran diferentes mecanismos de acción, tanto en lo que se refiere al efecto analgésico, como al efecto de desarrollo de tolerancia. Lo anterior resulta de gran importancia también, ya que en la mayoría de los casos, el tratamiento clínico del dolor crónico involucra el uso de analgésicos por tiempo prolongado.

Se desconoce el mecanismo por el cual el metamizol pueda inhibir el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina. Se sabe que la inhibición de la enzima sintetasa del óxido nítrico (SON), bloquea la aparición de desarrollo de tolerancia a morfina (Babey y col., 1994; Bhargava y Zhao, 1996). En estudios preclínicos se ha encontrado que los antagonistas a receptores de NMDA previenen la tolerancia analgésica a morfina. Así mismo, se ha mencionado que el metamizol puede originar el "apagado" de los nociceptores "activados" durante la inflamación (Ferreira, 1993), probablemente por un bloqueo del influjo de Ca^{2+} hacia el nociceptor. Es posible pensar entonces que estos mecanismos representan niveles de interacción que pueden conducir a inhibir el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina. Sin embargo, deberán realizarse estudios posteriores para confirmar el mecanismo involucrado en este proceso.

7.3. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

7.3.1. Farmacocinética de morfina en ratas después de la administración s.c. de morfina sola (5.6 mg/kg) en tratamiento agudo y subcrónico por 6 y 12 días

La concentración de morfina presente en el sitio de acción a un determinado tiempo dependerá tanto de la disposición sistémica de morfina (farmacocinética) como de su disposición en el sistema nervioso central. Así, cualquier alteración en la disposición del

fármaco modificará las concentraciones de morfina en el sistema nervioso central y por lo tanto el grado de analgesia (antinocicepción) producida.

Los estudios farmacocinéticos también pueden ser de gran utilidad para definir el grado de desarrollo de tolerancia a opioides, por lo cual en el presente estudio se investigaron los posibles cambios en la farmacocinética de morfina en ratas que pudieran explicar el grado de desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo producido después del tratamiento subcrónico por 6 y 12 días de morfina (5.6 mg/kg). Para lograr lo anterior se estudió la farmacocinética de morfina después de su administración en tratamiento subcrónico (6 y 12 días) y se comparó con la farmacocinética del fármaco después de su administración en dosis única.

En el caso de la administración de morfina (5.6 mg/kg) en dosis única (t.a.), los datos de concentración plasmática del fármaco inalterado fueron representados adecuadamente por un modelo de dos compartimentos, lo cual concuerda con otros estudios realizados en diversas especies animales, en los que la farmacocinética de morfina ha sido descrita en términos de un modelo multicompartimental, en su mayoría de dos compartimentos (Ekblom y col., 1993b; Bhargava y col., 1998; Bouw y col., 2000).

Los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de morfina en dosis única se muestran en la Tabla VII. En este caso, se alcanzó una C_{max} de 365 ng/mL aproximadamente a las 0.75 h (45 min). En otros estudios realizados en roedores y en perros se han encontrado concentraciones máximas de morfina en plasma entre los 30-60 min después de administrado el fármaco por vía s.c. o i.p. (Mulé y Woods, 1962; Loh y col., 1969; Berkowitz y col., 1974; Patrick y col., 1975; Ekblom y col., 1993). La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) promedio fue de 1.93 ± 0.18 h (media de 6 ratas \pm E.E.). Este valor es comparable al encontrado en ratas por algunos autores (Iwamoto y Klassen, 1977), sin embargo difieren de los obtenidos en otros estudios; por ejemplo, Ekblom y col. (1993a) obtuvieron una $t_{1/2}$ de 6.2 ± 0.8 h después de la administración de un bolo intravenoso de una dosis de 5 mg/kg, mientras que Bhargava y col. (1998), obtuvieron una vida media de 3.71 h.

El valor de depuración global (Cl_T/F) determinado en el presente estudio fue de 95.55 ± 5.5 mL/min/kg, el cual se encuentra dentro del intervalo de valores reportados por otros autores de 99 ± 13 mL/min/kg (Gardmark y col., 1993) y de 148 ± 58 mL/min/kg (Ekblom y col. 1993b), después de la administración de un bolo intravenosos rápido en ratas; sin embargo, también se ha reportado un valor para Cl_T de 70 mL/min/kg (Dahiström y Paalzow 1975; Gabrielson y Paalzow 1983; Iwamoto y Klasson 1977; Yoburn y col., 1985). Las diferencias encontradas en los valores reportados pueden ser explicadas por diferencias en los esquemas de muestreo, en la duración de éste, en los métodos analíticos empleados en el análisis de muestras, etc. (Ekblom y col., 1993,

Bhargava y col., 1991). Otro factor que también puede influir es la variabilidad interindividual, sin embargo la variación encontrada en el presente trabajo se encuentra dentro de los valores comúnmente obtenidos por otros investigadores.

Cabe mencionar que en algunas de las ratas, se encontró un "doble pico" en el curso temporal de las concentraciones de morfina en plasma, lo cual puede ser una consecuencia de la recirculación enterohepática de morfina previamente demostrada por otros autores (Horton y Pollack, 1991).

Dado que los valores de tiempo de vida media y depuración global obtenidos en el presente estudio concuerdan con los de otros autores que han utilizado esquemas de muestreo y metodología analítica semejantes (Iwamoto y Klassen, 1977; Gardmark y col., 1993), es posible considerar que el diseño utilizado en el estudio farmacocinético fue adecuado ya que permitió una estimación confiable de los parámetros farmacocinéticos.

El curso temporal promedio de concentraciones de morfina en plasma después de la administración subcrónica por 6 y 12 días del fármaco solo (5.6 mg/kg) por vía s.c. fue representado adecuadamente por un modelo de dos compartimentos. Al comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración subcrónica por 6 y 12 días con los de la administración de una sola dosis de morfina (5.6 mg/kg) utilizando un ANDEVA, se demostró que las concentraciones de morfina disminuyeron marcadamente en el caso de los tratamientos subcrónicos, por lo cual no se detectaron niveles de morfina en plasma después de las 4 h siguientes de la administración (último intervalo dosificación). La disminución encontrada en las concentraciones de morfina en las ratas tratadas subcrónicamente, concuerda con los resultados de otros autores (Patrick, 1978), quienes demostraron una marcada disminución en las concentraciones del fármaco en plasma y cerebro de ratones tratados con morfina por 3 y 6 días y en los que se desarrolló tolerancia al efecto analgésico. Así mismo, Yoburn y col. (1985), establecieron una correlación entre la aparición del síndrome de abstinencia a morfina en ratas y la concentración de morfina en plasma, así como con la cantidad absorbida de ésta en un periodo de 24 h (ABC). A su vez, Ekblom y col. (1993), demostraron la relación existente entre el efecto antinociceptivo o de tolerancia y el curso temporal de concentraciones de morfina en plasma.

Con el análisis anterior se demostró que la farmacocinética de morfina se modifica durante el tratamiento subcrónico (6 y 12 d) dando lugar a un aumento en la depuración sistémica del fármaco. El aumento en la depuración sistémica de morfina encontrado después del tratamiento subcrónico, puede ser atribuido a una autoinducción de los sistemas enzimáticos, específicamente la UDG-glucuronosiltransferasa involucrada en la biotransformación de morfina al 3-glucurónido (principal metabolito en rata). Se sabe que la morfina es un sustrato para la UGT2B1 en rata y que

este sistema es inducible. En otros estudios, tanto en humanos como en animales, se ha encontrado que las concentraciones de los metabolitos (3 y 6-glucurónidos) aumentan y se acumulan en sangre durante el tratamiento crónico con morfina. El desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina ha sido relacionado frecuentemente a las concentraciones del metabolito 3-glucurónido (M3G) en plasma (Ekblom y col. 1993) ya que se ha demostrado que éste metabolito presenta un efecto antagónico al efecto antinociceptivo de morfina (Smith y col., 1990) y del metabolito activo 6-glucurónido (Gong y col., 1992). Sin embargo, otros autores han mostrado que el M3G suprime tan sólo en cierto grado (aunque significativamente) el efecto de morfina al ser administrado intravenosamente (Ekblom y col., 1993a, 1993b).

Puesto que diversos autores han establecido la relación que existe entre la concentración de morfina en circulación sistémica con la concentración en el sitio de acción por un lado y por otro con el efecto global observado, es factible postular que los cambios originados en farmacocinética del fármaco durante el tratamiento subcrónico contribuyen de manera importante al desarrollo de tolerancia al efecto analgésico (antinociceptivo) encontrado.

7.3.2. Farmacocinética de morfina en ratas después de la administración de morfina en combinación con metamizol en tratamiento agudo y en subcrónico por 6 y 12 días.

Cuando se administró morfina (5.6 mg/kg, s.c.) simultáneamente con metamizol (562.3 mg/kg, s.c.) en dosis única, las concentraciones de morfina en plasma aumentaron de manera considerable, observándose una clara interacción farmacocinética entre estos fármacos (Figura 11). Esta interacción originó un incremento en los niveles plasmáticos máximos de morfina en más del doble, con lo cual el ABC_{0-4} se incrementó de manera significativa en más de 5 veces.

El incremento en las concentraciones y en el $ABCC_p$ de morfina, después de la administración simultánea de morfina y metamizol, pueden deberse a un efecto inhibitorio en la depuración global de la misma, probablemente relacionado a una inhibición enzimática que reduce la biotransformación del fármaco a su metabolito inactivo (3-glucurónido de morfina). La biotransformación de morfina al metabolito 3-glucurónido representa la principal vía de eliminación de morfina. Horton y Pollack (1991) demostraron que aproximadamente el 60% de la depuración sistémica de morfina en ratas se puede atribuir al metabolismo hepático (formación del glucurónido), mientras que alrededor de un 30% se atribuye al metabolismo renal y menos del 10% de morfina se elimina como fármaco inalterado por vía biliar. Por lo anterior, la inhibición de esta vía de biotransformación puede dar lugar al aumento del fármaco inalterado en plasma.

Estudios previos han mostrado la existencia de una interacción en la glucuronidación de

morfina con otros fármacos que se administran simultáneamente. Los UGTs (UDP-glucuronosiltransferasas) son las principales enzimas involucradas en el metabolismo de morfina. Recientemente se ha reportado que una variante de la UGT, la UGT2B7, la cual metaboliza el estriol, el ácido hidioxicólico y algunos fármacos AAINes (Jin y col., 1993), está involucrada también en la glucuronidación de morfina (Coffman y col., 1997), sin embargo existe evidencia de que más de una UGT cataliza la glucuronidación de ésta, i.e. UGT2B1 en rata (Coughtrie y col., 1989; Burchell y col., 1995). Por tanto la interacción con otros fármacos (Bock y Bock-Hennig, 1987), o diversos factores (Bock y col., 1994), puede provocar la inducción o inhibición de las diferentes UGTs, modificando así la formación de los metabolitos y a su vez el efecto global de morfina. Se sabe que aproximadamente el 20% de la 4-metil-amino-antipirina, principal metabolito (activo) del metamizol, se elimina en forma de glucurónido en orina (Bacacheva, 1995); e incluso se han detectado otros compuestos conjugados (glucurónidos). Es probable entonces que el metamizol compita por los mismos mecanismos enzimáticos que morfina. La proporción de dosis empleada de metamizol con respecto a la de morfina en la combinación estudiada (100 : 1) pudiera ser la responsable de una competencia marcada con respecto a los sitios de unión de morfina con las enzimas involucradas en la glucuronidación.

Aún cuando no se ha comprobado el efecto del metamizol en la formación del glucurónido inactivo de morfina (3-glucurónido), la interacción de otros fármacos en la glucuronidación de morfina ha sido ampliamente estudiada. Wahlström y col. (1988) publicaron que el oxazepam y varios compuestos opioides inhiben *in vitro* la glucuronidación de morfina y Mc Quay y col. (1990) estudiaron la interacción de la ranitidina con la UGT involucrada en el metabolismo de morfina. También se demostró la existencia de una interacción metabólica entre naloxona y morfina *in vitro* ya que ambos compuestos actúan como inhibidores competitivos de la 3-glucuronidación del otro sustrato (Wahlström y col., 1989). Igualmente, se ha encontrado que la coadministración de morfina (intravenosa) con cloranfenicol (inhibidor *in vitro* de la glucuronidación de morfina a su metabolito inactivo el 3-glucurónido) aumenta el efecto antinociceptivo del opioide así como la duración del mismo y disminuye el desarrollo de tolerancia (Smith y col., 2000).

Por último, cabe mencionar que la morfina se metaboliza en baja proporción a normorfina (Caraco y col., 1996), sin embargo es probable que también exista interacción entre metamizol y morfina en la formación de este metabolito ya que la enzima CYP3A4 es la responsable de la biotransformación (Fase I) de ambos compuestos. En este caso, sería necesario realizar estudios adicionales para confirmar el mecanismo involucrado en la interacción farmacocinética de los mismos.

7.3.3. Relación entre concentración de morfina y el efecto observado

Cuando se graficó directamente el efecto antinociceptivo vs. las concentraciones de morfina encontradas después del tratamiento agudo de morfina sola, se observó un comportamiento de histeresis, es decir un retraso en la aparición del efecto en relación a la aparición de las concentraciones del fármaco en plasma (Figura 13). La histeresis ha sido demostrada en ratas después de la administración i.v. de morfina por otros autores (Dahlström y col., 1978; Bhargava y col., 1991; Ekblom y col., 1993; Bouw y col., 2000). Esta falta de paralelismo entre las concentraciones en plasma y la aparición del efecto máximo del fármaco, es común en el caso de fármacos en los cuales existe un desequilibrio temporal entre la circulación sistémica y el sitio de acción (efecto indirecto), el cual se atribuye a un tiempo de retraso en la distribución del fármaco hacia el sitio donde se produce el efecto (sitio efector). La morfina es poco liposoluble y por tanto se espera un tiempo de retraso entre la C_{max} en cerebro y el E_{max} alcanzado (antinocicepción). Por lo menos en tres estudios diferentes realizados en ratas se ha demostrado también un tiempo de retraso entre la concentración máxima en cerebro y el efecto analgésico observado (Paalzow y Paalzow, 1971; Kissin y col., 1991; Mulé y col., 1968). Este comportamiento también se puede presentar después de la administración epidural de morfina, de tal manera que el curso temporal de analgesia se relaciona directamente a la aparición del fármaco en el líquido cefalorraquídeo (Nordberg, 1984), pero no en suero (Weddel y Ritter, 1981; Youngstrom y Cowan, 1982).

De la misma forma, en el caso de los tratamientos subcrónicos de 6 y 12 días se presentó un comportamiento de histeresis (Figura 13), además de una disminución del efecto en el tiempo independientemente de la presencia de concentraciones iguales de morfina en plasma (proteresis), lo cual confirma el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de ésta. En otros modelos empleados para desarrollar tolerancia en ratas se han obtenido resultados similares (Ekblom y col., 1993).

Por último, cuando la relación entre ABCe acumulativa y el ABCCp acumulativa, obtenida para los diferentes tratamientos de morfina sola, se ajustó al modelo sigmoideo de E_{max} , se encontró una excelente correlación entre ambos parámetros ($R^2 > 0.99$). El ABCe se considera como una expresión de la actividad analgésica global durante el periodo de observación, al igual que el ABC de concentraciones se refiere a la cantidad total disponible de fármaco en circulación sistémica en el mismo intervalo de tiempo, por lo cual ambos parámetros pueden ser relacionados en el caso de fármacos que presentan efectos indirectos (Dingemans y col., 1988; Bhargava y col., 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los resultados de otros autores que demostraron una correlación satisfactoria ($R > 0.9$) entre el

ABC acumulativa del efecto antinociceptivo determinado con el modelo del "tail-flick" y el ABC acumulativa de concentraciones de morfina en plasma (Bhargava y col., 1991), o entre el $\log_{10}ABC_{0-300 \text{ min}}$ de concentraciones de morfina en fluido cerebroespinal y el $ABC_{0-300 \text{ min}}$ de la respuesta analgésica en ratas (Bhargava y col., 1998).

La pendiente de la curva así como el efecto acumulativo (ABCe) máximo alcanzado después de los tratamientos subcrónicos por 6 y 12 días disminuyeron de manera significativa en comparación a los valores obtenidos en el tratamiento agudo, lo cual refleja el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina. Por otro lado, los resultados obtenidos después de 6 días son semejantes a los del tratamiento de 12 días, con lo cual se corroboró que es posible desarrollar tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina con el tratamiento propuesto (5.6 mg/kg s.c., cada 24 horas por 6 días).

Cuando la relación del ABCe acumulativa vs. el ABCCp acumulativa de morfina, obtenida después de la administración simultánea de morfina y metamizol, se ajustó al modelo de E_{\max} (Figura 15), se observó una correlación satisfactoria entre ambos parámetros ($R^2 > 0.99$). La pendiente también disminuyó ligeramente en este caso después de la administración subcrónica durante 6 días y 12 días comparada con la de la combinación en tratamiento agudo, lo cual podría atribuirse a un desarrollo de tolerancia farmacológica, sin embargo en ambos casos la disminución es despreciable y el efecto analgésico global máximo alcanzado en los tres tratamientos es cercano al valor máximo que se puede esperar en el modelo PIFIR (ABCe = 375 u.a.). Es importante hacer notar que aún cuando las concentraciones de morfina se incrementaron marcadamente en presencia de metamizol, el factor de respuesta (γ) disminuyó por lo que se puede deducir que el efecto producido por la combinación no sólo depende de la interacción farmacocinética sino del efecto producido por el metamizol.

El hecho de que tanto los niveles plasmáticos de morfina como el efecto antinociceptivo alcanzado se vean incrementados sin que existan síntomas severos de toxicidad en los animales tratados subcrónicamente con la combinación de metamizol+morfina, puede representar una alternativa útil para el tratamiento crónico del dolor. Sin embargo, lo anterior deberá ser confirmado en estudios clínicos en humanos.

7.4. Utilidad potencial de la combinación MET+MOR (562.3 : 5.6 mg/kg) en el tratamiento del dolor crónico

Es indudable que el efecto analgésico de un fármaco, solo o en combinación, dependerá del tipo de dolor así como de su intensidad. Consecuentemente, el tratamiento adecuado involucra cambios tanto en la dosis como en el tipo de analgésico empleado.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el metamizol favorece la eficacia analgésica de morfina y atenúa el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo durante el tratamiento subcrónico. Estos resultados confirman la utilidad de la combinación de fármacos que muestran diferentes mecanismos de acción, tanto en lo que se refiere al efecto analgésico como a los efectos adversos.

En preclínica no se tienen modelos perfectos de cada alteración que sufre el humano, así los analgésicos generalmente han sido evaluados en modelos animales en donde se emplea un estímulo ya sea químico, mecánico, térmico o eléctrico y esto ha permitido detectar sustancias útiles para el hombre. En este caso, el modelo experimental (PIFIR) es un modelo más cercano a una alteración que se presenta clínicamente en el hombre, por lo cual a partir de los resultados obtenidos se podría pensar en la combinación de metamizol+morfina estudiada como una alternativa útil para el tratamiento del dolor crónico.

El mecanismo de interacción farmacodinámica no pudo ser determinado con los datos que aporta este trabajo, por lo que se justificaría la realización de investigaciones posteriores al respecto.

Cabe mencionar que la interacción farmacocinética demostrada en el presente estudio, permite explicar en parte la eficacia analgésica observada con la combinación, tanto en tratamiento simple como en tratamiento subcrónico, sin embargo, es indispensable analizar el tipo de interacción existente entre estos fármacos en el hombre, sobre todo considerando las diferencias que existen en la rata con respecto a los metabolitos formados. A pesar de esto, los resultados obtenidos en el presente estudio pueden aportar información útil para sentar las bases de futuras investigaciones.

Lo anterior indica que es indispensable realizar el estudio completo (farmacodinámico y farmacocinético) de las combinaciones de fármacos analgésicos en humanos, ya que éstas constituyen una mejor aproximación al tratamiento adecuado del dolor crónico. Tales estudios permitirán seleccionar las dosis más bajas de cada analgésico que se pueda emplear en la combinación. Con esto, se logrará obtener la máxima eficacia analgésica, así como disminuir el riesgo de efectos adversos.

8. CONCLUSIONES

La combinación metamizol+morfina (562.3 : 5.6 mg/kg) administrada en tratamiento subcrónico presenta ventajas con respecto a la administración de los componentes solos ya que favorece la eficacia analgésica y al mismo tiempo inhibe el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina. Estos resultados confirman la utilidad de la combinación de fármacos que muestran diferentes mecanismos de acción, tanto en lo que se refiere al efecto analgésico como a los efectos adversos.

En el presente estudio se confirmó el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de morfina (5.6 mg/kg) después de los tratamientos subcrónicos por 6 y 12 días. Los cambios encontrados en la disposición (farmacocinética) de morfina después del tratamiento subcrónico contribuyen aparentemente al desarrollo de tolerancia al efecto (antinociceptivo) de ésta.

La administración simultánea de metamizol (562.3 mg/kg) con morfina (5.6 mg/kg), origina un aumento significativo en los niveles plasmáticos de ésta, tanto en administración aguda como después de la administración subcrónica por 6 y 12 días. El efecto analgésico alcanzado después de la administración de morfina sola y en combinación metamizol, en tratamiento subcrónico, está relacionado con las concentraciones de morfina encontradas en plasma.

No se observaron efectos colaterales atribuibles a la administración simultánea de metamizol y morfina durante el período de tiempo en el cual se administraron, de tal manera que la administración de la combinación de ambos fármacos puede ser una alternativa útil en el tratamiento crónico del dolor. La utilidad clínica de la combinación, en una relación de dosis adecuada para el tratamiento del dolor en humanos, deberá ser evaluada en un futuro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. REFERENCIAS

- Aasmundstad TA, Morland J y Paulsen RE (1995). Distribution of morphine glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by *in vivo* microdialysis sampling. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 435-441.
- Abbate R, Gori AM, Pinto S, Attanasio M, Paniccia R, Coppo M, Castellani S, Giusti B, Boddi M y Neri SGG (1990). Cyclooxygenase and lipooxygenase metabolite synthesis by polymorphonuclear neutrophils: *in vitro* effect of dipyron. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 41: 89-93.
- Abbruscato TJ, Thomas SA, Hruby VJ y Davis TP (1997). Blood brain permeability and bioavailability of a highly potent and selective opioid receptor antagonist CTAP: comparison with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 280(1): 402-409.
- Aguirre-Bañuelos P y Granados-Soto V (1999). Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyron. *J Pharmacol Toxicol* 42: 79-85.
- Akman H, Aksu F, Gultekin I, Ozbek H, Oral U, Doran F y Baysal F (1996). A possible central antinociceptive effect of dipyron in mice. *Pharmacology* 53: 71-78.
- Andersson KE (1986). Tolerance development as a pharmacological problem. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 59 Suppl 6: 27-33.
- Arellano F y Sacristán JA (1990). Metamizole: reassessment of its therapeutic role. *Eur J Clin Pharmacol* 38: 617-619.
- Asmardi G y Jamali F (1983). High performance liquid chromatography of dipyron and its active metabolite in biological fluids. *J Chromatogr Biomed Appl* 277: 183-189.
- Asmardi G y Jamali F (1985). Pharmacokinetics of dipyron in man: role of administration route. *Pharmacokinet* 10: 121-125.
- Axelrod J (1956). The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 117: 322-350.
- Ayhan IH, Turker RK y Mellii M (1983). A new method for the rapid measurement of analgesic activity in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 262: 215-250.
- Baar HA, Brune K y Rust M (1992). El Uso de la Dipirona. En: Simposio "Actualización en Investigación de Analgésicos No-Narcóticos". Fiuggi, Italia.
- Babey AM, Kolesnikov Y, Cheng J, Inturrisi CE, Triffilietti RR y Pasternak GW (1994). Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 33: 1463-1470.
- Bacacheva N (1995). Lack of interaction between zidovudine and 4-methyl-amino-antipyrine, the active metabolite of metamizole, in human liver *in vitro*. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 17 (5): 299-301.
- Bannwarth BF, Demotes-Mainard F, Schaeferbeke L, Labat L y Dehais J (1995). Central analgesic

- effects of aspirin-like drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 9: 1.
- Barjavel MJ, Schermann J-M y Bhargava HN (1995). Relationship between morphine analgesia and cortical extracellular fluid levels of morphine and its metabolites in the rat: a microdialysis study. *Br J Pharmacol* 116: 3205-3210.
- Beeson, JM (1999). The neurobiology of pain. *Lancet* 353: 1610-1615.
- Befortky-Kieffer BL (1997). Structure-activity relationships in the δ -opioid receptor. *Pain* 41: 100-121.
- Behnehani MM, Jiang M y Chandler SD (1990). The effect of [Met] enkephalin on the periaqueductal gray neurons of the rat: an *in vitro* study. *Neuroscience* 38(2): 373-380.
- Beirith A, Santos ARS, Rodrigues ALS, Creczynski-Pasa TB y Calixto JB (1998). Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 345: 233-245.
- Belemonte C y Cervero F (1996). *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford University Press Oxford. p. 531.
- Benedetti C y Butler SH (1990). Systemic analgesics. En: *The Management of Pain*. Bonica K, Loeser JD, Chapman CR y Fordyce WE (Eds.) 2nd Edition Lea & Febinger. Philadelphia, London. p. 1640.
- Berkowitz BA, Cerreta KV, Soector S. (1974). The influence of physiologic and pharmacologic factors on disposition of morphine determined by radioimmunoassay. *J Pharmacol Exp Ther* 191: 527-534.
- Bhargava HN (1994). Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome and self-administration behavior. *Pharmacol Rev* 46: 293-324.
- Bhargava HN y Zhao GM (1996). Effect of nitric oxide synthetase inhibition on tolerance to the analgesic action of D-Pen², D-Pen⁵ enkephalin and morphine in the mouse. *Neuropeptides* 30: 219-223.
- Bhargava HN, Villar VM, Gulati A y Chan G (1991). Analgesic and hyperthermic effects of intravenously administered morphine in the rat are related to its serum levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 258: 511-518.
- Bhargava HN, Rahmani NH, Villar VM y Larsen AK (1993). Effects of naltrexone on pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenous administered morphine in the rat. *Pharmacology* 46: 66-74.
- Bhargava HN, Villar VM, Cortijo J y Morcillo EJ (1998). Analgesic and thermic effects and cerebrospinal fluid and plasma pharmacokinetics of intracerebroventricularly administered morphine in normal and sensitized rats. *J Pharmacokin Biopharm* 6(1): 41-53.
- Bhat R, Chari G y Gulate A (1990). Pharmacokinetics of a single dose of morphine in preterm infants during the first week of life. *J Pediatr* 117: 477-81.
- Bianchi C y Franceschini J (1954). Experimental observations on Haffner's method for testing analgesic drugs. *Br J Pharmacol* 9: 280-284.
- Bigal ME, Bordini CA y Speciali JG (2001). Intravenous metamizol (Dipyron) in acute migraine treatment and episodic tension-type headache- a placebo-controlled study. *Cephalgia* 21: 90-95.

- Björkman R (1995). Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Experimental studies in the rat. Acta Anaesthesiol Scand* 39 (Suppl. 103): 9-44.
- Björkman R, Hedner J, Hedner T y Henning M (1990). Central, naloxone-reversible antinociception by diclofenac in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342: 171-176.
- Björkman R, Hedner T, Hallman KM, Henning M y Hedner J (1992). Localization of the central antinociceptive effects of diclofenac in the rat. *Brain Res* 590: 66-73.
- Bock KW y Bock-Hennig BS (1987). Differential induction of human liver UDP-glucuronosyltransferase activities by phenobarbital-type inducers. *Biochem Pharmacol* 36: 4137-4143.
- Bock KW, Schrenk D, Forster A, Griese EU, Mörike K, Brockemeier D y Eichelbaum M (1994). The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics* 4: 209-218.
- Bodnar RJ, Williams CL, Lee SJ y Pasternak GW (1988). Role of μ_1 -opiate receptors in supraspinal opiate analgesia: a microinjection study. *Brain Res* 447: 25-34.
- Boerner U, Abbott S y Roe R (1975). The metabolism of morphine and heroin in man. *Drug Metab Rev* 4: 39-73.
- Bolander H, Kourtopoulos H, Lundberg S y Persson S (1983). Morphine concentration in serum, brain and cerebrospinal fluid in the rat after intravenous administration of a single dose. *Pharm Pharmacol* 35: 656-659.
- Bonica J (1990). Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. En: *The Management of Pain. Vol I.* Bonica K, Loeser JD, Chapman CR y Fordyce WE (Eds.) 2nd Edition Lea & Febinger. Philadelphia, London p. 28.
- Bourget P, Lesne-Hulin y Quinquis-Desmaris (1995). Study of the bioequivalence of two controlled-release formulations of morphine. *Int J Clin Pharmacol Ther* 33(11): 588-594.
- Bouquillon AI, Freeman D y Moulin DE (1992). Simultaneous solid-phase extraction and chromatographic analysis of morphine and hydromorphone in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 577: 354-357.
- Bouw RM, Gardmarck M y Hammarlund-Udenaes M (2000). Pharmacokinetics-Pharmacodynamic Modelling of morphine transport across blood-barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats- A microdialysis study. *Pharm Res* 17: 1220-1227.
- Brogden RN (1986). Pyrazolone derivatives. *Drugs* 32: 60-70.
- Brune K (1992). Dipyrrone: recent investigations on its mode of action, pharmacokinetics, and clinical use. Basel, Berlin.

- Brune K y Alpermann H (1983). Non-acidic pyrazoles: Inhibition of prostaglandin production, carrageenin oedema and yeast fever. *Agents Actions* 13: 360-363.
- Burchell B, Brierley CH y Rance D (1995). Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* 57: 1819-1831.
- Calimlim JF, Wardell WM, Davis HT, Lasagna L y Gillies AJ (1976). Analgesic efficacy of an orally administered combination of pentazocine and aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 21: 34-43.
- Campos C, de Gregorio R, García-Nieto R, Gago F, Ortiz P y Alemany S (1999). Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *Eur J Pharmacol* 378: 339-347.
- Caraco Y, Tateishi T, Guengerich FP y Wood AJJ (1996). Microsomal codeine N-demethylation: cosegregation with cytochrome P4503A4 activity. *Drug Metab Dispos* 24: 761-764.
- Carlsson KH y Jurna I (1987). The role of descending inhibition in the antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dipyrone) and aminophenazone ("Pyramidon"). *Naunyn Schmiedenberg Arch Pharmacol* 335(2): 154-159.
- Carlsson KH, Helmeich J y Jurna I (1986). Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). *Pain* 27: 373-390.
- Carlsson KH, Monzel W y Jurna I (1988). Depression by morphine and the non-opioid analgesic agents, metamizol (dipyrone), lysine-acetylsalicylate and paracetamol activity in rat thalamus neurones evoked by electrical stimulation of nociceptive afferents. *Pain* 32: 313-326.
- Carrasco CM, Rodríguez-Vázquez M y Palacios-García R (1993). A double-blind study of the analgesic efficacy in kidney colic of the combination of dypirone and spasmolytic with ketorolac trometamol. *Arch Esp Urol* 46: 763-768.
- Carrupt PA, Testab, Bachelary A, El Tavar N, Descas P y Perrisoud D (1991). Morphine 6-glucuronide and morphine-3 glucuronide as molecular chameleons with unsuspected lipophilicity. *J Med Chem* 34: 1272-1275.
- Casey K, Minoshima S, Berger K, Koeppe P, Morrow T y Frey K (1994). Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimulus. *J Neurophysiol* 71: 802-807.
- Cass LJ y Frederick WJ (1962). The augmentation of analgesic effect of aspirin with phenacetin and caffeine. *Curr Ther Res Clin Exp* 4: 583.
- Cesselin F, Benoliel JJ, Bourgoin S, Collin E, Pohl M y Hamon M (1999). Spinal mechanisms of opioid analgesia. En: *Opioids in Pain Control*. Chritoph Stein (Ed.) Cambridge University Press. London.
- Chay PC, Duffy BJ y Walker JS (1992). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of morphine in neonates. *Clin Pharmacol Ther* 51: 334-342.

- Christ VO, Kellner HM, Ross G, Rupp W y Schwarz A (1973). Biopharmazeutische und pharmakokinetische untersuchungen nach gabe von metamizol-¹⁴C (Novalgin ^{R14} C) an ratte, hund and mensch. *Arzneimittel-Forsch* 23(12): 1760-1767.
- Cochin J y Axelrod J (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 125: 105-110.
- Coffman BL, Rios GR, King CD y Tephly TR (1997). Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 25: 1-4.
- Cohen O, Zykliber-Katz E, Caraco Y, Granit L y Levy M (1998). Cerebroespinal fluid and plasma concentrations of dipyron metabolites after a single oral dose of dipyron. *Eur J Clin Pharmacol* 54(7): 549-553.
- Collier HOJ y Roy AC (1961). Multiple toe-pinch method for testing analgesic drugs. *Br J Pharmacol* 17: 28-40.
- Commissaris RL, Semeyn DR y Rech RH (1982). Dispositional without functional tolerance to the hypothermic effects of pentobarbital in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 220(3): 536-539.
- Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (1980). Ethical Standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain* 9: 141-143.
- Cosnier D, Hache J, Labrid C y Rispat G (1976). General pharmacological properties of a new non-opiate antitusive: zipeprol (3024 CERM). *Arzneimittel-Forschung* 26(5): 848-855.
- Coughtrie MWH, Ask B, Rane A, Burchell B y Hume R (1989). The enantioselective glucuronidation of morphine in rats and humans. Evidence for the involvement of more than one UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme. *Biochem Pharmacol* 38: 3273-3280.
- Cox BM (1990). Drug tolerance and physical dependence. En: *Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology*. Chapter 10. Pratt WB y Taylor P (Eds.) Churchill Livingstone. N.Y.
- Dahlström BE y Paalzow LK (1975). Pharmacokinetics of morphine in plasma and discrete areas of the rat brain. *J Pharmacokin Biopharm* 3: 293-302.
- Dahlström BE, Jonsson J y Paalzow LK (1976). Metabolism of morphine in the perfused rat liver. *Acta Pharmacol Toxicol* 39: 46-52.
- Dahlström B, Paalzow L y Edlund PO (1977). Simultaneous determination of codeine and morphine in biological samples by gas chromatography with electron capture detection. *Acta Pharmacol Toxicol* 41: 273-279.
- Dahlström BE, Paalzow LK, Segre G y Agren AJ (1978). Relation between morphine pharmacokinetics and analgesia. *J Pharmacokin Biopharm* 6: 41-53.
- D'Amour FE y Smith DL (1941). A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*

72: 74-79.

- De Castro-Costa MC, De Sutter P, Gybels J y Van Hees J (1981). Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible animal model for chronic pain. *Pain* 10: 35-44.
- Deminska-Kiec A, Zmuh A y Krupirilus J (1986). Inhibition of prostaglandin synthetase by aspirin-like drugs in different mycosomal preparations. En: *Pyrazolone Derivatives*. Brogden RN. *Drugs* 32 (Suppl. 4): 60-70.
- Díaz-Reval MI, Ventura-Martínez R, Hernández-Delgadillo GP, Domínguez-Ramírez AM, López-Muñoz FJ (2001). Effect of caffeine on antinociceptive action of ketoprofen in rats. *Arch Med Res* 32: 13-20.
- Dickenson AH (1991). Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids. *Br Med Bull* 47(3): 690-702.
- Dingemans J, Danhof M y Breimer DD (1988). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of CNS drug effects: an overview. *Pharmacol Ther* 38: 1-52.
- Domínguez RA y López-Muñoz FJ (1997). Comparación de la eficacia analgésica de las asociaciones metamizol-morfina con aspirina, metamizol, acetaminofén y morfina en administración simple. *Reporte de Investigación* 76. U.A.M.X., ISBN 970-654-040-7: 3-13.
- Domínguez RA, Ríos CC y López-Muñoz FJ (1997). Método analítico selectivo para la determinación de niveles de morfina en presencia de metamizol. *Reporte de Investigación* 77. U.A.M.X., ISBN 970-654-041-5.
- Domínguez RAM, Delgadillo HGP, Ventura MR, Díaz RMI y López-Muñoz, FJ (2000). Analgesic efficacy of the combination metamizol+morphine after subchronic treatment in rats. *Drug Dev Res* 51: 260-267.
- Drost RH y Van Ooijen RD (1984). Determination of morphine in serum and cerebrospinal fluid by gas chromatography and selective ion monitoring after reversed-phase column extraction. *J Chromatogr* 310: 193-198.
- Duarte IDG, Lorenzetti BB y Ferreira SH (1990). Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 186: 289-293.
- Duarte IDG, Dos Santos IR, Lorenzetti BB y Ferreira SH (1992). Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 217: 225-227.
- Eklblom M, Gårdmark M y Hammarlund-Udenaes M (1993a). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of morphine-3-glucuronide in rats and its influence on the antinociceptive effect of morphine. *Biopharm Drug Disp* 14: 1-11.
- Eklblom M, Hammarlund-Udenaes M y Paazlow LK (1993b). Modeling of tolerance development and

- rebound effect during different intravenous administrations of morphine to rats. *J Pharmacol Exp Ther* 266(1): 244-252.
- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 7a. Edición. México. p. 959.
- Ferreira SH (1993). Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. *ANN Ins Super Sanità* 29(3): 367-373.
- Ferreira SH y Lorenzetti BB (1994). Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology* 33 (11): 1479-1485.
- Ferreira SH y Vane JR (1974). New aspects in the mode of action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Ann Rev Pharmacol* 14: 57-73.
- Ferreira SH, Moncada S y Vane JR (1973). Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br J Pharmacol* 49: 86-97.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB y Correa FMA (1978). Central and periphereal antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53: 39-48.
- Ferreira SH, Duarte IDG y Lorenzetti BB (1991). The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201: 121-122.
- Foley KM (1985). The treatment of cancer pain. *New Engl J Med* 313: 84-95.
- Forbes JA, Kolodny AL, Chachich BM y Beaver WT (1984). Nalbuphine, acetaminophen, and their combinations in posoperative pain. *Clin Pharmacol Ther* 35: 843-851.
- Forth W, Martin E y Peter K (1995). *El alivio del dolor* 1ª Ed Editorial Hoescht, S.A., México, D.F. p. 1.
- Frances B, Gout R, Monsarrat B, Cros J y Zajac JM (1992). Further evidence that morphine-6-glucuronide is a more potent opioide sgonist than morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 262(1): 25-31.
- Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schanzle G, Mikus G y Eichelbaum M (1997). Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain* 72: 261-267.
- Gabrielson JL y Paalzow LK (1983). A physiological pharmacokinetic model for morphine disposition in the pregnant rat. *J Pharmacokinet Biopharm* 11: 147-163.
- Gabrielson J, Jusko WJ y Alari L (2000). Modeling of dose-response-time data: four examples of estimating the turnover parameters and generating kinetic functions from response profiles. *Biopharm Drug Disp* 21: 41-52.
- García-Alonso F, Gonzalez de Suso MJ, López-Alvarez M, Palop R (1991). Comparative study of the efficacy of dipyrrone, diclofenac sodium and pethidine in acute renal colic. *Eur J Clin Pharmacol* 40: 543-546.
- Gårdmark M, Ekblom M, Bouw R y Hammarlund-Udenaes M (1993). Quantification of effect delay and

- acute tolerance development to morphine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 1061-1067.
- Gårdmark M, Höglund AU y Hammarlund-Udenaes M (1998). Aspects on tail-flick, hot-plate and electrical simulation tests for morphine antinociception. *Pharmacol Toxicol* 83: 252-258.
- Garthwaite J (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14: 60-63.
- Gebhart GF (1982). Opiate and opioid peptide effects on brain stem neurons: relevance to nociception and antinociceptive mechanisms. *Pain* 12: 93-95.
- Gelgor L, Cartmell S y Mitchell D (1992). Intracerebroventricular-injections of non-steroidal drug abolish reperfusion hyperalgesia in the rat's tail. *Pain* 50: 323-329.
- Gherzi-Egea JF, Perrin R, Leninger-Muller, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Siest G y Minn A. (1993). Subcellular localization of cytochrome P450 and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochem Pharmacol* 45(3): 647-658.
- Gibaldi M y Perrier D (1982). *Pharmacokinetics*. Marcel Dekker Inc. N.Y. p. 409.
- Glare PA y Walsh TD (1991). Clinical pharmacokinetics of morphine. *Ther Drug Monit* 13: 1-23.
- Glare PA, Walsh TD y Pippinger CE (1991). A simple method for the simultaneous determination of morphine and its principal metabolites in plasma using high-performance liquid chromatography and fluorometric detection. *Ther Drug Monitor* 13: 226-232.
- Glazer EJ, Steinbush H, Verhofstad A y Basbaum A (1981). Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paraventricular nucleus of the cat contain enkephalin. *J Physiol* 77: 241.
- Gong QL, Hedner T, Hedner J, Björkman R y Norberg G (1991). Antinociceptive and ventilatory effects of morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. *Eur J Pharmacol* 193: 47-56.
- Gong QL, Hedner J, Björkman R y Hedner T (1992). Morphine-3-glucuronide may functionally antagonize morphine-6-glucuronide induced antinociception and ventilatory depression in the rat. *Pain* 48: 249-255.
- Guerrero-Muñoz F, Cerreta KV, Guerrero ML y Way EL (1979). Effect of morphine on synaptosomal Ca uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 209(1): 132-136.
- Gustafsson LL y Post C (1986). The degree of analgesia correlates to spinal morphine concentration after intrathecal administration in rats. *Acta Pharmacol Toxicol* 58: 243-245.
- Guzmán F y Lim RK (1968). The mechanism of action of the non-narcotic analgesics. *Med Clin North Am* 52: 3-14.
- Hanna MH, Peat SJ, Woodham M, Knibb A y Fung C (1990). Analgesic efficacy and CSF pharmacokinetics of intrathecal morphine-6-glucuronide. *Br J Clin Pharmacol* 64: 547-550.

- Harvey RA y Champu PC (1992). Opioid Analgesics and Antagonists Lippincott's Illustrated Revision: Pharmacology. Lippincott Company, U.S.A. p. 131.
- Hasseltröm J y Säwe J (1993). Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contributions to active opioid concentration. *J Clin Pharmacokinet* 24: 344-354.
- Hedner T y Nordberg G (1990). Opioids receptors: types, distribution and pharmacological profiles. En: Management of Pain. Rawal N y Coombs DW (Eds.) Kluwer Acad Pub. U.S.A. p. 1.
- Heinricher MM, Morgan MM y Fields HL (1992). Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience* 48(3): 533-543.
- Hernández-Delgado GP, Ventura MR, Díaz RMI, Domínguez RAM y López-Muñoz FJ (2002). Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *Eur J Pharmacol* 441: 177-183.
- Herz A y Millan MJ (1988). Endogenous peptides in the descending control of spinal dorsal horn neurons. En: Pain Modulation. Fields HL y Besson JM (Eds.) Elsevier. N.Y. p. 263.
- Hite GJ (1991). Analgesics. En: Principles of Medicinal Chemistry. Foye, WO. 2nd Edition Lea & Febiger. Philadelphia, PA, U.S.A. p. 272.
- Horton TL y Pollack GM (1991). Enterohepatic recirculation and renal metabolism of morphine. *J Pharm Sci* 80: 1147-1152.
- Howlett TA y Rees LH (1986). Endogenous opioid peptides and hypothalamo-pituitary function. *Annu Rev Physiol* 48: 527-537.
- Hoyo-Vadillo C, Pérez-Urizar JT y López-Muñoz FJ (1995). Usefulness of the pain-induced functional impairment model to relate plasma levels of analgesics to their efficacy in rats. *J Pharm Pharmacol* 47(6): 462-465.
- Hunskar S y Hole K (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103-114.
- Hunskar S, Fasmer OB y Hole K (1985). Acetylsalicylic acid, paracetamol and morphine inhibit behavioural responses to intrathecally administered substance P or capsaicin. *Life Sci* 37: 1835-1837.
- Hyman SE y Cassem NH (1995). Dolor en: Neurología. Editorial Científica Médica Latinoamericana. México. p. 1.
- Iwamoto K y Klasson CD (1977). First-pass effect of morphine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 200: 236-244.
- Jaffe JH y Martin WR (1996). Opioid Analgesics and Antagonists En: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman GA, Rall TW, Allan SN y Palmer T (Eds.) 3rd Edition. Pergamonn Press. N.Y. p. 485.

- Jin C, Miners JO, Lilywhite K J y Mackenzie PI (1993). Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucurodiating carboxylic acid-containing drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 475-479.
- Joel SP, Osborne RJ y Slevin ML (1988). An improved method for the simultaneous determination of morphine and its principal metabolites. *J Chromatogr* 430: 394-399.
- Johansson EK, Tucker SM, Ginn HB, Martin BR, Aceto MD (1992). Functional and dispositional tolerance develops during continuous cocaine exposure. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 17(2): 155-162.
- Jones AW, Blom Y y Bondesson U (1984). Determination of morphine in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Biomed Appl* 309: 73-80.
- Julious SA y Debarnot AM (2000). Why are pharmacokinetic data summarized by arithmetic means? *J Biopharm Stat* 10(1): 55-71.
- Jurna I y Brune K (1990). Central effect of the non-steroid antiinflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and diclofenac determined in C fibre-evoked activity in single neurons of the rat thalamus. *Pain* 41: 71-80.
- Kaufmann JJ, Samo NM y Koski WS (1975). Microelectrometric titration measurement of pKas and partition and drug distribution coefficients of narcotics and narcotic antagonists and their pH and temperature dependence. *J Med Chem* 18: 647-655.
- Kaufman DW, Kelly JP, Jurgelon JM, Anderson T, Issaragrisil S y Wilkom BE (1996). Drugs in the aetiology of agranulocytosis and aplastic anemia. *Eur J Haematol Suppl* 60: 23-30.
- Kawamata M, Omote K, Namiki A e Ishitani K (1993). Contribution of descending inhibitory and spinal cholinergic systems to visceral antinociception of morphine. *Anaesthesiology* 79: A701.
- Kissin I, Brown PT, Robinson A y Bradley EL (1991). Acute tolerance in morphine analgesia: continuous infusion and single injection in rats. *Anaesthesiology* 74: 166-168.
- Kraul H, Truckenbrodt J, Huster A, Töpfer R y Hoffmann A (1991). Comparison of *in vitro* and *in vivo* biotransformation in patients with liver disease of differing severity. *Eur J Clin Pharmacol* 41: 475-480.
- Kroemer HK y Klotz U (1992). Glucuronidation of drugs. A re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors. *Clin Pharmacokinet* 23: 292-310.
- Kuo CK, Hanioka N, Hoshikawa Y, Oguri K y Yashimura H (1991). Species difference of site selective glucuronidation of morphine. *J Pharmacobiodyn* 14: 187-193.
- Laska EM, Sunshine A, Mueller F, Elvers WB, Siegel y Rubin A (1984). Caffeine as an analgesic adjuvant. *JAMA* 251: 1711-1718.
- Lat L (1973). Dipyron for treatment of post-operative pain. *Anaesthesia* 28: 43-47.

- Lé AD y Khanna JM (1989). Dispositional mechanisms in drug tolerance and sensitization in *Psychoactive Drugs. Tolerance and Sensitization*, Goudie AJ y Emmett-Oglesby MW Eds. Humana Press. Clifton New Jersey, p. 305.
- Lemberger L y Rubin AC (1976). Physiologic Dispositin of Drugs of Abuse. *Monographs in Pharmacology and Physiology*, Vol. 1; Vesell ES y Garattini S (Eds.) Spectrum Public Inc., N.Y.
- Levine JD, Fields HL y Basbaum AI (1993). Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13(6): 2273-2286.
- Levy M, Zylber-Katz E y Rosenkranz B (1995). Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinetic* 9: 1-7.
- Liaw WJ, Ho ST, Wang JJ, Hu OYP y Li JH (1998). Determination of morphine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B* 714: 237-245.
- Lipp J (1991). Review: Possible mechanism of morphine analgesia. *Clin Neuropharmacol* 14: 131-147.
- Loeser JD y Melzack R (1999). Pain: an Overview. *Lancet* 353: 1607-1609.
- Loh HH, Shen FH y Way EL (1969). Inhibition of morphine tolerance and physical dependence development and brain serotonin synthesis by cycloheximide. *Biochem Pharmacol* 18: 2711-2721.
- López-Muñoz FJ (1994). Surface of synergistic interaction between dipyrone and morphine in the PIFIR model. *Drug Dev Res* 33: 26-32.
- López-Muñoz FJ (1995). Profile of analgesic interaction between aspirin and d-propoxyphene obtained by means of the surface of synergistic interaction. *Drug Dev Res* 35(1):13-19.
- López-Muñoz FJ y Salazar LA (1995). Determination of analgesic interaction between acetaminophen and d-propoxyphene obtained by means of the surface of synergistic interaction. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 17(5): 311-320.
- López-Muñoz FJ, Salazar LA, Castañeda-Hernández G y Villarreal JE (1993a). A new model to assess analgesic activity: Pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 28(2): 169-175.
- López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Villalón CM, Terrón JA y Salazar LA (1993b). Analgesic effects of combination opioid drug with either aspirin or acetaminophen in the rat. *Drug Dev Res* 29(4): 299-304.
- López-Muñoz FJ, Villalón CM, Terrón JA y Salazar LA (1994). Analgesic interactions produced by dipyrone and either morphine or d-propoxyphene in the Pain-Induced Functional Impairment model in the rat *Drug Dev Res* 32: 50-57.
- López-Muñoz FJ, Villalón CM, Terrón JA y Salazar LA (1995). Doses of acetyl salicylic acid and morphine in combination which provided either maximal levels of analgesia or the highest potentiation effect in the rat. *Drug Dev Res* 35: 94-101.

- López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Torres-López JE, Picazo YF, Flores-Murrieta FJ y Granados-Soto V (1996). Differences in the mechanism of antinociceptive action of non-steroidal antiinflammatory drugs in the rat. *Pharm Sci* 2: 189-190.
- Lorenzetti BB y Ferreira SH (1982). The analgesic effects of quaternary analogues of morphine and nalorphine. *Braz J Med Biol Res*, 15: 285-290.
- Lorenzetti BB y Ferreira SH (1985). Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 114: 375-381.
- Lorenzetti BB y Ferreira SH (1996). Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res* 45: 308-311.
- Lötsch J, Weiss M, Kobal G y Geisslinger G (1998). Pharmacokinetics of morphine-6-glucuronide and its formation from morphine after intravenous administration. *Clin Pharmacol Ther* 63(6): 629-639.
- Machin SJ y Mackie IJ (1992). El Sistema de Coagulación Sanguínea y los Analgésicos. En: "Simposio Actualización en Investigación de Analgésicos No-Narcóticos". Fiuggi, Italia.
- Martin WR (1984). Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev* 35: 283-323.
- Martín-Duce A, Moreno J, Puerta J, Ortiz P (1997). Effectiveness of metamizol in the management of pain after abdominal surgery: comparison of 1 or 2 g by the intramuscular or intravenous route. *Pain Clinic* 10: 27-34.
- Martínez C y Hoechst AG (1992). Efectos adversos de los analgésicos no-narcóticos. En: "Simposio Actualización en Investigación de Analgésicos No-Narcóticos". Fiuggi, Italia.
- Martínez-Martin P, Raffaelli EJ, Titus F, Despuig J, Fragoso YD, Díez-Tejedor E, Liaño H, Leira R, Cornet ME, van Toor BSJ, Cámara J, Peil H, Vix JM, Ortiz P y the Co-operative Study Group (2001). Efficacy and safety of metamizol vs. acetylsalicylic acid in patients with moderate episodic tension-type headache: a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled, multicentre study. *Cephalalgia* 21: 604-610.
- McCormack K (1994). Non-steroidal antiinflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain* 59: 9-44.
- McLean CF, Mather LE, Odontiadis J y Sloan PA (1990). Improved method for morphine determination in biological fluids and tissues: rapid, sensitive and selective. *J Pharm Pharmacol* 42: 669-671.
- McQuay HJ, Carroll D, Faura CC, Gavaghan DJ, Hand CW y Moore RA (1990). Oral morphine in cancer pain: influences of morphine and metabolite concentration. *Clin Pharmacol Ther* 48: 236-244.
- McRorie TI, Lynn AM y Necpeks MK (1992). The maturation of morphine clearance and metabolism. *Am J Dis Child* 146: 972-976.
- Melzack R y Wall PD (1983). *The challenge of Pain*. New York: Basic Books.

- Meller ST y Gebhart GF (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52: 127-136.
- Merskey H (1979). Pain terms; a list of definitions and a note usage. Recommended by the International Association for the Study of Pain (IASP). Subcommittee on Taxonomy 6: 249-252.
- Milne RW, Nation RL, Reynolds GD, Somogyi AA y Van Crugten JT (1991). High-performance liquid chromatographic determination of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites: improvements to the method and application to stability studies. *J Chromatogr Biomed Appl* 565: 457-464.
- Milne RW, Nation RL y Somogyi AA (1996). The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in human and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev* 28: 345-372.
- Minneman KP e Iversen LL (1976). Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature* 262: 313-314.
- Mistry M y Houston JB (1987). Glucuronidation *in vitro* and *in vivo*; comparison of intestinal and hepatic conjugation of morphine, naloxone and buprenorphine. *Drug Metab Dispos* 15: 710-717.
- Moertel CG, Ahmann DL, Taylor WF y Schwartz N (1974). Relief of pain by oral medications. A controlled evaluation of analgesic combinations. *JAMA* 229: 55-59.
- Moncada S, Palmer RM y Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Montes A, Warner W y Puig MM (2000). Use of intravenous patient-controlled analgesia for the documentation of synergy between tramadol and metamizol. *Br J Anaesth* 85(2): 217-223.
- Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P y Hart SL (1991). L-Nitro^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 102: 198-202.
- Muhtadi FJ (1988). Analytical profile of morphine. En: *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol 17. Florey K (Ed.) Academic Press Inc. N.Y. p. 259.
- Mulé SJ y Woods LA (1962). Distribution of N-C¹⁴ methyl labeled morphine in central nervous system of nontolerant and tolerant dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 136: 232-241.
- Mulé SJ, Clements TH, Layson RC y Haertzen CA (1968). Analgesia in guinea pigs: a measure of tolerance development. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 173: 201-212.
- Mycek MJ, Gertner SB y Menna PM (1992). Opioid analgesics and antagonists. Chapter 14. En: *Pharmacology*. Harvey RA y Champe PC (Eds.) Lippincott Co. U.S.A. p. 1.
- Nelson PE, Nolan SL y Bedford KR (1982). High-performance liquid chromatography detection of morphine by fluorescence after post-column derivatisation. *J Chromatogr* 234: 407-414.

- Neugebauer V, Schaible H-G, He X, Lücke T, Gündling P y Schmidt RF (1994). Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of metamizol. *Agents Actions* 41: 62-70.
- Neumann PB, Henriksen H, Grosman N y Christensen BC (1982). Plasma morphine concentrations during chronic oral administration in patients with cancer pain. *Pain* 13: 247-252.
- Nordberg G (1984). Pharmacokinetic aspects of spinal morphine analgesia. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 28 (Suppl. 79): 1-8.
- Nöschel H, Peiker G, Voigt R, Meinhol P, Muller B, Schroder S y Bonow A (1980). Research on pharmacokinetics during pregnancy. *Arch Toxicol* 4: 380-384.
- Oguri K, Hanioka N y Yoshimura H (1990). Species differences in metabolism of codeine: Urinary excretion of codeine glucuronide, morphine 3-glucuronide, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in mice, rats, guinea pigs and rabbits. *Xenobiotica* 20: 683-688.
- Okuda K, Nakahama H, Miyakawa H y Shima K (1984). Arthritis induced in cat by sodium urate: a possible model for tonic pain. *Pain* 18: 287-297.
- Olivares JL y Beeson JM (1988). Stimulation produced analgesia in animals behavioural investigation. En: *Pain Modulation*. Fields HL y Besson JM (Eds.) Elsevier. N.Y. p. 141.
- Olsen GD (1975). Morphine binding to human proteins. *Clin Pharmacol Ther* 7: 31-35.
- Osborne RJ, Joel SP y Slevin ML (1986). Morphine intoxication in renal failure: the role of morphine-6-glucuronide. *Br Med J* 292: 1548-1551.
- Osborne R, Joel S, Trew D y Slevin M (1988). Analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Lancet* 1: 828-831.
- Osborne R, Joel S, Trew D y Slevin M (1990). Morphine and metabolite behaviour after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite-6-glucuronide. *Clin Pharmacol Ther* 47: 12-19.
- Osborne R, Thompson P, Joel S, Trew D, Patel N y Slevin M (1992). The analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Br J Clin Pharmacol* 34: 130-134.
- Ouellet DM y Pollack GM (1997a). Pharmacodynamics and tolerance development during multiple intravenous bolus morphine administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 713-720.
- Ouellet DM y Pollack GM (1997b). Effect of prior morphine-3-glucuronide exposure on morphine disposition and antinociception. *Biochem Pharmacol* 53 (10): 1451-1457.
- Paalzow L y Paalzow G (1971). Blood and brain concentration of morphine and its relation to the analgesic activity in mice. *Acta Pharm Suec* 8: 329-332.

REFERENCIAS

- Pacifici R, Pichini S, Altieri I, Caronna A, Passa AR y Zuccaro P (1995). High-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric determination of morphine and its 3- and 6-glucuronide: Application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr Biomed Appl* 664: 329-334.
- Pao-Luh, Chia-Rong L, Pin Yee L y Loh HH (1993). The interaction of mu-opioid receptor and G protein is altered after chronic morphine treatment in rats. *Naunyn-Sch Arch Pharmacol* 348: 504-508.
- Pasternak GW, Bodnar RJ, Clark JA e Inturrisi CE (1987). Morphine 6-glucuronide, a potent mu agonist. *Life Sci* 41: 2845-2849.
- Pasternak GW, Kolesnikov YA y Babey AM (1995). Perspectives on the N-methyl-D-aspartate nitric oxide cascade and opioid tolerance. *Neuropsychopharmacol* 13: 309-313.
- Patrick GA, Dewey WL, Spaulding TC y Harris LS (1975). Relationship of brain morphine levels to analgesic activity in acutely treated mice and rats, and in pellet-implanted mice. *J Pharmacol Exp Ther* 193: 876-883.
- Patrick GA, Dewey WL, Huger FP, Daves ED y Harris LS (1978). Disposition of morphine in crónically infused rats: relationship to antinociception and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 205(3): 556-562.
- Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE y Pasternak GW (1989). Pharmacological characterization of morphine 6- β -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther* 251(2): 477-483.
- Pearson SP y Kelberman I (1996). Gastrointestinal effects of NSAIDs. Difficulties in detection and management. *Postgrad Med* 100: 131-132, 135-136, 141-143.
- Peat SJ, Hanna MH, Woodham M, Knibb AA y Ponte J (1991). Morphine-6-glucuronide: effects of ventilation in normal volunteers. *Pain* 45: 101-104.
- Pircio AW, Fedele CT y Bierwagen ME (1975). A new method for the evaluation of analgesic activity using adjuvant-induced arthritis in the rat. *Eur J Pharmacol* 31: 207-215.
- Planas ME, Gay-Escoda C, Bagan JV, Santamaría J, Peñarrocha M, Donado M, Puerta JL, García-Magaz I, Ruiz J y Ortiz P (1998). Oral metamizol (1 and 2 g) versus ibuprofen and placebo in the treatment of the third molar surgery pain: randomised double-blind multicentre study. *Eur J Clin Pharmacol* 53: 405-409.
- Portenoy RK, Foley KM, Stulman J, Khan E, Adelbardt J, Layman M, Cerbone DF e Indurrisi CE (1991a). Plasma morphine and morphine-6-glucuronide during chronic morphine therapy for cancer pain: plasma profiles, steady-state concentrations and the consequences of renal failure. *Pain* 41: 13-19.
- Portenoy RK, Thaler HT e Inturrisi CE (1991b). The metabolite morphine-6-glucuronide contributes to the analgesia produced by morphine infusion in patients with pain and normal renal function. *Clin Pharmacol Ther* 51: 422-431.
- Portenoy RK, Thaler HT, Inturrisi CE, Friedlander-Klar H y Foley KM (1992). The metabolite morphine-6-

- glucuronide contributes to the analgesia produced by morphine infusion in patients with pain and normal renal function. *Clin Pharmacol Ther* 51: 422-431.
- Randall LO y Sellitto JJ (1957). A method of measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111: 409-419.
- Rang HP y Dale MM (1991). Drugs used to suppress inflammatory and immune reactions. *En Pharmacology*. Rang HP y Dale MM Eds. Edinburgh, London. Churchill Livingstone. p. 281.
- Reiner M, Massera E y Magni E (1984). Nimesulide in the treatment of fever: A double-blind crossover clinical trial. *J Int Med Res* 12: 102-107.
- Reisine T y Pasternak G (1996). Opioid analgesics and antagonists. *En: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman AG (Ed.) McGraw-Hill. New York, NY. p. 521-555.
- Rockemann MG, Seeling W, Bischof C, Börstinghaus D, Steffen P y Georgief FM (1996). Prophylactic use of epidural mepivacaine/morphine, systemic diclofenac and metamizol reduces postoperative morphine consumption after major abdominal surgery. *Anaesthesiology* 84(5): 1021-1024.
- Rodríguez M, Barutell C, Rull M, Gálvez J, Vidal F, Aliaga L, Moreno J, Puerta J y Ortiz P (1994). Efficacy and tolerance of oral dipyron versus oral morphine for cancer pain. *Eur J Cancer* 30A(5): 584-587.
- Rohdewald P, Drehsen G, Milschmann E y Derendorf H (1983). Relationship between saliva levels, metabolites, bioavailability and analgesic efficacy. *Arzneimittel-Forschung* 33: 985-988.
- Rowland M y Tozer TN (1994). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*. 3rd Edition. Lea Febiger, Philadelphia. p. 469.
- Sacerdote P, Monza G, Mantegazza P y Panerai AE (1985). Diclofenac and pirofen modify pituitary and hypothalamic beta-endorphin concentrations. *Pharmacol Res Commun* 17: 679-684.
- Sakurada T, Manome Y, Tan No K, Sakurada S y Kisara K (1990). The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking response induced by intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate in mice. *Br J Pharmacol* 101: 307-310.
- Salem A y Hope W (1999). Role of endogenous adenosine in the expression of opiate withdrawal in rats. *Eur J Pharmacol* 369: 39-42.
- Säwe J (1986a). Morphine and its 3- and 6-glucuronides in plasma and urine during chronic oral administration in cancer patients. *En: Advances in Pain Research and Therapy*. Vol 8. Foley KM y CE Inturrisi (Eds.) Raven Press. N.Y. p. 45-55.
- Säwe J (1986b). High-dose morphine and methadone in cancer patients. *Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment*. *Clin Pharmacokinet* 11: 87-106.
- Säwe J, Svensson JO y Rane A (1983). Morphine metabolism in cancer patients on increasing oral doses- no evidence for autoinduction or dose dependence. *Br J Clin Pharmacol* 16: 85-93.

REFERENCIAS

- Såwe J, Kager L, Svensson JO y Rane A (1985). Oral morphine in cancer patients: *in vivo* kinetics and *in vitro* hepatic glucuronidation. *Br J Clin Pharmacol* 19: 495-501.
- Schiantarelli P, Murmann W y Magi S (1979). Investigation of rocivenne plus dipyrone for antiespasmotic and analgesic interactions. *Arzneimittel-Forschung* 29: 760-765.
- Shargel L y Yu A (1999). *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 4th Ed. Mc Graw Hill N.Y. p. 573.
- Sharma SK, Klee WA y Nienberg M (1975). Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Nat Acad Sci, USA* 12: 3092-3096.
- Shimada SG, Otterness IG y Stitt JT (1994). A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. *Agents Actions* 41: 188-192.
- Shimomura K, Kamata O, Ueki K, Oguri K, Yoshimura H y Tsukamoto H (1971). Analgesic effects of morphine glucuronides. *J Exp Med* 105: 45-52.
- Siegmund E, Cadmus R y Lu G (1957). A method for the evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med* 95: 729-731.
- Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort, K, Matthes H, Lannes B, Micheletti G, Mattei MG, Charron G, Bloch B y Kieffer B. (1995). K-opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology and expression pattern in the nervous system. *Proc Nat Acad Sci, USA* 92: 7006-7010.
- Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT y Fries JF (1996). Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatic arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch Int Med* 156: 1530-1536.
- Smith MT, Watt JA y Cramond T (1990). Morphine-3-glucuronide: a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci* 47: 579-585.
- Smith MT, Nielsen CK, Lim-Fraser MY, Wright AW y Law M (2000). Systemic coadministration of cloramphenicol with IV but not intracerebroventricular morphine markedly increases antinociception and delays development of antinociceptive tolerance in rats. *Drug Metab Disp* 28: 236-244.
- Somogyi A, Nation RL, Olweny C, Tsirgiotis P, van Crugten J, Milne RW, Cleary JF, Danz C y Bochner F (1993). Plasma concentrations and renal clearance of morphine-6-glucuronide in cancer patients receiving morphine. *Clin Pharmacokinet* 24(5): 413-420.
- Stanski DR, Paalzow L y Edlund PO (1982). Morphine pharmacokinetics: GLC assay versus radioimmunoassay. *J Pharm Sci* 71: 314-317.
- Stanskov G, Schmeider G, Lechner Fj, Schunzel S (1995). Observer multicentre study with dipyrone versus tramadol in posoperative pain. *Eur J Pain* 16: 56-63.

- Stimmel B (1983). Pain, Analgesic and Addiction. En: The Pharmacological Treatment of Pain. Raven Press, U.S.A. p. 73.
- Svensson JO (1986). Determination of morphine, morphine-6-glucuronide and normorphine in plasma and urine with high performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr* 375: 174-178.
- Svensson JO, Rane A, Säwe J, Sjöqvist F (1982). Determination of morphine, morphine-3-glucuronide and (tentatively) morphine-6-glucuronide in plasma and urine using ion-pair with high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl* 230: 427-432.
- Tabachnick BG y Fidell LS (2001). *Computed Assisted Research Design and Analysis*. Ally Bacon. U.S.A. p. 132.
- Tagliaro F, Frigerio A, Lubli G y Marigo M (1985). Liquid chromatography with pre-column dansyl derivatisation and fluorometric detection applied to assay of morphine in biological samples. *J Chromatogr* 330: 323-331.
- Tatsuo MA, Carvalho WM, Silva CV, Miranda AE, Ferrerreira SH y Francischi JN (1994). Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. *Inflammation* 18: 399-405.
- Tempel G, von Hundelshausen B y Reeker W (1996). The opiate-sparing effect of dipyrone in post-operative therapy with morphine using a patient controlled analgesic system. *Intensive Care Med* 22(19): 1043-1047.
- Terenius L y Wahlström A (1975). Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol Scand* 94: 74-81.
- The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study (1986). Risks of Agranulocytosis and Aplastic Anemia. *JAMA* 256: 1749-1757.
- Todd RD, Muldoon SM y Watson RL (1982). Determination of morphine in cerebrospinal fluid and plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 232: 101-110.
- Tonussi CR y Ferreira SH (1994). Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 251: 173-179.
- Torrici V y Vanegas H (1994). Putative role of medullary off -and on- cells in the antinociception produced by dipyrone (metamizol) administered sistemically or microinjected into PAG. *Pain* 57(2): 197-205.
- Torrici V, Vasquez E y Vanegas H (1996). Naloxone partial reversal of the antinociception produced by dipyrone microinjected into periaqueductal gray of rats: possible involvement of medullary off -and on-cells. *Brain Res* 725: 106-110.

- Trachtenberg AJ (1994). Opiates for pain: patients, tolerance and society's intolerance. *JAMA* 271: 427-430.
- Türk DC y Okifuji (1999). Assessment of patients' reporting of pain: an integrated perspective. *Lancet* 353: 1784-1788.
- Türker MN y Türker RK (1970). Analgesic action of lidoflazine (R7904). *Eur J Pharmacol* 11: 90-95.
- Turner CA y Murphy R (1988). Rapid, high sensitivity method for measurement of morphine in guinea-pig serum. *J Chromatogr* 428: 383-387.
- van Crugten JT, Sallustio BC, Nation RL y Somogyi AA (1991). Renal tubular transport of morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide in the isolated perfused rat kidney. *Drug Metab Dispos* 19: 1087-1092.
- Van-der-Kauw MM, Wilson JHP y Stricker BHC (1998). Drug-associated agranulocytosis: 20 years of reporting in the Netherlands (1974-1994). *Am J Hematol* 57: 206-211.
- Van Dongen RTM, Crul BJP, Koopman-Kimenai PM y Vree TB (1994). Morphine and morphine-glucuronide concentration in plasma and CSF during long-term administration. *Br J Clin Pharmacol* 38: 271-273.
- Vane J (1987). The evolution of non-steroidal antiinflammatory drugs and their mechanism of action *Drugs* 33 (Suppl. 1): 18-27.
- Vane JR y Botting RM (1996). Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol* 25(102): 9-21.
- Venn RI y Michalkiewicz A (1990). Fast reliable assay for morphine and its metabolites using high-performance liquid chromatography and native fluorescence detection. *J Chromatogr* 525: 379-388.
- Vesell ES, Passananti GT, Glenwright PA y Dvorchik BH (1975). Studies on the disposition of antipyrine, aminopyrine and phenacetin using plasma, saliva and urine. *Clin Pharmacol Ther* 18(3): 259-272.
- Vlahov V, Badian M y Verho M (1990). Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after single oral dose of metamizol sodium. *Eur J Clin Pharmacol* 38: 61-65.
- Vlaskovska M, Surcheva S y Ovcharov R (1989). Importance of endogenous opioids and prostaglandins in the action of analgin (metamizole) and verapamil. *Farmakol Toksikol* 52: 25-29.
- Volz M y Kellner HM (1980). Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyrone). *British J Clin Pharmacol* 10: 2995-3085.
- Wahlström A, Pacifici GM, Lindström B y Rane A (1988). Human liver morphine UDP-glucuronyl transferase enantioselectivity and inhibition by opioid congeners and oxazepam. *Br J Pharmacol* 94: 864-870.

- Wahlström A, Persson K y Rane A (1989). Metabolic interaction between morphine and naloxone in human liver. *Drug Metab Dispos* 17: 218-220
- Wang JF, Han SP, Lu Z, Wang XJ, Hans JS y Ren MF (1989). Effect of calcium ion on analgesia of opioid peptides. *Int J Neurosci* 47: 279-285.
- Weddel SJ y Ritter RR (1981). Serum levels following epidural administration of morphine and correlation with relief of postsurgical pain. *Anesthesiology* 54: 210-213.
- Weithmann KU y Alpermann HG (1985). Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. *Arzneimittel-Forsch* 35(6): 947-952.
- Welch RM, De Angelis RL, Wingfield M y Farmer TW (1975). Elimination of antipyrine from saliva as a measure of metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther* 18: 249-258.
- Wood PL (1982). Multiple opiate receptors: Support for unique mu, delta and kappa sites. *Neuropharmacol* 21: 487-497.
- Woolfe G y McDonald AD (1944). The evaluation of the analgesic action of phetidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80: 300-307.
- Wu D, Kang YS, Bickel U y Pardrige WM (1997). Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab Dispos* 25: 768-771.
- Yaksh TL (1977). Preclinical models of nociception. En: *Anesthesia: Biologic foundations*. Yaksh TL, Lynch C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF y Saidman LL (Eds.) Lippincott-Raven Pub. Philadelphia. p. 685-718.
- Yaksh TL (1979). Direct evidence that spinal serotonin and noradrenalin terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res* 160: 180-185.
- Yaksh TL (1981). Spinal opiate analgesia: characteristics and principles of action. *Pain* 11: 193-346.
- Yaksh TL y Noueihed R (1985). CNS mechanism of pain. The physiology and pharmacology of spinal opiates *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 433-462.
- Yeomans DC, Clark FM, Paice JA y Proudfit HK (1992). Antinociception induced by electrical stimulation of spinally projecting noradrenergic neurons in the a7 catecholamine cell group of the rat. *Pain* 48: 449-461.
- Yoburn BC, Chen J, Huang T y Inturrisi CE (1985). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous morphine pellets in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 282-286.
- Yoshimura H, Ida S, Oguri K y Ytsukamoto H (1973). Biochemical basis for the analgesic activity of morphine-6-glucuronide-1: penetration of morphine-6-glucuronide in the brain of rats. *Biochem Pharmacol* 22: 1423-1426.

REFERENCIAS

- Youngström PC y Cowan RT (1982). Pain relief and plasma concentrations from epidural and intramuscular morphine in post-cesarean patients. *Anesthesiology* 57: 404-406.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110.
- Zylber-Katz E, Granit L y Levy M (1985). Plasma protein binding of dipyron metabolites in man. *Eur J Clin Pharmacol* 29: 67-71.
- Zylber-Katz E, Granit L y Levy M (1992). Formation and excretion of dipyron metabolites in man. *Eur J Clin Pharmacol* 42: 187-191.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. ANEXO

10.1. AJUSTE DE LOS DATOS DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MORFINA

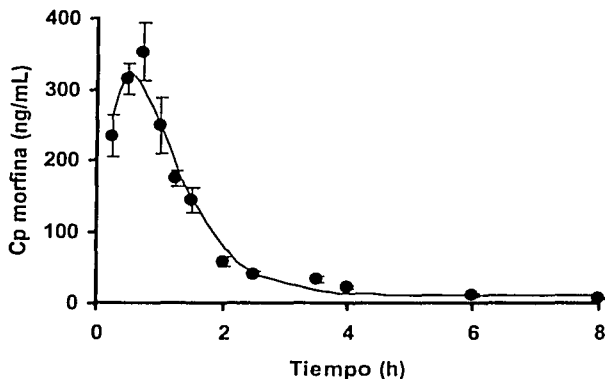


Figura 16. Farmacocinética de morfina después de la administración subcutánea de una sola dosis de 5.6 mg/kg). Los círculos representan el promedio de concentraciones observadas en rata ($n = 6$), la línea continua representa el ajuste al modelo de dos compartimentos.

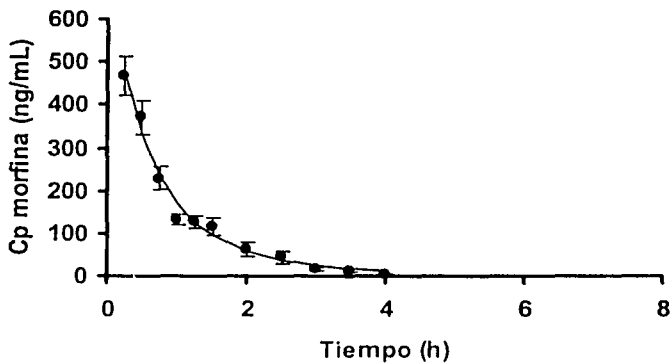


Figura 17. Farmacocinética de morfina después de la administración subcrónica de 5.6 mg/kg durante 6 días. Los círculos representan el promedio de concentraciones observadas en rata ($n = 6$), la línea continua representa el ajuste al modelo dos compartimentos.

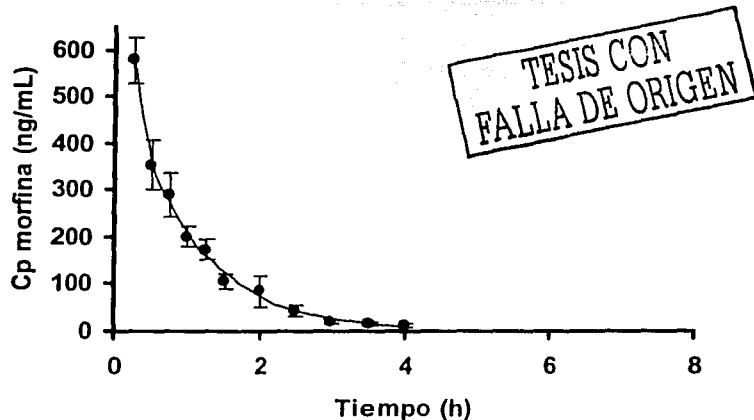


Figura 18. Farmacocinética de morfina después de la administración subcrónica de 5.6 mg/kg durante 12 días. Los círculos representan el promedio de concentraciones observadas en rata ($n = 6$), la línea continua representa el ajuste al modelo de dos compartimentos.

10.2. PRODUCTOS DE TRABAJO DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

Artículos en revistas indexadas

Domínguez RAM, Hernández DGP, Ventura MR, Díaz RI y López-Muñoz FJ (2000). Analgesic efficacy of the combination metamizol+morphine after subchronic treatment in rats. *Drug Dev Res* 51(10): 260-267.

Hernández-Delgadillo GP, Ventura MR, Díaz RMI, Domínguez RAM y López-Muñoz FJ (2002). Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *Eur J Pharmacol* 441: 177-183.

Domínguez-Ramírez AM, Ríos C, Hurtado PM, Cortés AR y López-Muñoz FJ. HPLC micromethod for the determination of morphine in plasma. Application to pharmacokinetic studies in rats. *J Pharm & Biopharm Analysis* (por publicar)

Domínguez-Ramírez AM, Hurtado PM, Cortés AR, López-Muñoz FJ y col. Effect of metamizol on the pharmacokinetics of morphine after acute and subchronic treatment in the rat. *Drug Dev Res* (por publicar).

Reportes de investigación

Domínguez RA, López-Muñoz FJ. Comparación de eficacia analgésica de las asociaciones metamizol-morfina en comparación a metamizol, acetaminofén, ácido acetilsalicílico y morfina en administración simple. *Reporte Investigación* 76:1-13, Enero 1997. ISBN-970-654-040-7. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Domínguez RA, Ríos CLC y López-Muñoz FJ. Método analítico para la determinación de niveles plasmáticos de morfina en presencia de metamizol. *Reporte de Investigación* 77: 1-12, Enero de 1997. ISBN 970-654-041-5. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Trabajos presentados en foros especializados

- Domínguez RA, Ríos CLC y López-Muñoz FJ Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de niveles plasmáticos de morfina en presencia de metamizol XI Reunión Anual de Investigación INNN, 23-24 de mayo de 1996.
- Domínguez RA, Ríos CLC y López-Muñoz FJ. Validación de un método analítico selectivo para la determinación de niveles plasmáticos de morfina en presencia de metamizol, aplicable a estudios farmacocinéticos en pequeñas especies" XXIX Congreso Nal. C. Farm., Acapulco, Gro. 27-31 Octubre, 1996.
- Domínguez RA, López-Muñoz FJ. Evaluación preclínica de la eficacia y grado de tolerancia producidos por la combinación metamizol:morfina en tratamiento crónico. XXX Congreso Nal. C. Farm. Cancún, Q. Roo. Diciembre 1997.
- Domínguez RA, Hurtado P Marcela, Medina L Raúl, Islas C Laura, Hernández Patricia y López-Muñoz Francisco J., "Estudio de la farmacocinética de morfina en tratamiento crónico en ratas y su relación con el efecto analgésico observado. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Octubre de 1999. Puerto Vallarta, Jal. **Trabajo que recibió el reconocimiento al "Mejor Trabajo Libre en su Especialidad"
- Gloria Patricia Hernández, Adriana M Domínguez y Francisco J López-Muñoz. "Comparación de la eficacia analgésica de la asociación MET+MOR de máxima potenciación en ratas de ambos sexos" XXII Congreso Nac. de Farmacología. Universidad Autónoma de Zacatecas. Marzo 4, de 1999. Zacatecas, Zac. **Trabajo que recibió el 2º. lugar al "Mejor Trabajo de Investigación.(Mención Honorífica)
- Domínguez RAM. Evaluación preclínica de la combinación metamizol+morfina (562.3+5.6 mg/kg). Trabajo presentado en el seminario de investigación de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas. U.A.M.X. 26 de septiembre, 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10.3. ARTÍCULO
Research Article

Analgesic Efficacy of the Combination Metamizol + Morphine After Subchronic Treatment in Rats

Adriana Miriam Domínguez Ramírez,^{1,2*} Gloria Patricia Hernández Delgadillo,³
Rosa Ventura Martínez,³ Ma. Irene Díaz Reval,³ and Francisco Javier López-Muñoz³

¹Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F.

²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

³Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, México, D.F.

Strategy, Management and Health Policy				
Venture Capital Enabling Technology	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

ABSTRACT In the present study, the analgesic efficacy and the possible development of tolerance produced by the combination metamizol + morphine (562.3:5.6 mg/kg) during subchronic treatment (6 and 12 days) in arthritic rats using the PIFIR model was evaluated. This combination of metamizol + morphine produced the maximum analgesic efficacy ($AUC_t = 353.4 \pm 24.7$ au) when compared with morphine 5.6 mg/kg ($AUC_t = 196.6 \pm 35.3$ au), metamizol 562.3 mg/kg ($AUC_t = 262.8 \pm 10.2$ au), and morphine 10 mg/kg ($AUC_t = 316.6 \pm 31.0$ au) given in a single dose. The results were essentially the same when the combination was administered for 6 ($AUC_t = 325.4 \pm 13.1$ au) or 12 days ($AUC_t = 354.5 \pm 9.6$ au). In addition, the duration of the effect was longer when the combination metamizol + morphine was administered either in single or subchronic treatment. Development of tolerance to the analgesic effect was observed after 6 and 12 days of morphine administration. However, the analgesic effect produced by the metamizol + morphine combination remained constant (near 100%) during both subchronic treatments. The present data demonstrate that metamizol significantly attenuates the development of tolerance to morphine. The mechanism involved in this effect of metamizol remains to be determined. *Drug Dev. Res.* 51:260-267, 2000. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Key words: synergism; analgesia; tolerance; pharmacodynamic interaction

INTRODUCTION

Opioids and nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are commonly used to treat pain. Among opioid agents, morphine is still the drug of choice. Narcotic analgesics represent the primary prescription for severe acute pain, such as that following acute myocardial infarction, renal and biliary colic, extensive surgical procedures, burns, and other traumas [Cherny, 1996; Carr and Goudas, 1999], as well as moderate to severe chronic pain associated with malignancies [Cherny, 1996; Rodríguez et al., 1994; WHO, 1996]. Although morphine is very useful as an analgesic, its clinical application in chronic pain is limited by the rapid development of tolerance [Johnstone and Smith, 1992; Trachtenberg, 1994]. An-

other disadvantage of opioids is their short duration of action, which requires frequent administration. In most cases, this leads to the use of high doses that are associated with severe adverse side effects such as respiratory depression [Cherny, 1996; Hill et al., 1990; Jaffe and Martin, 1990].

On the other hand, NSAIDs are effective and long-acting agents but their adverse side effects at high doses

*Correspondence to: Adriana Miriam Domínguez Ramírez, M.Sc., Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Calzada del Hueso # 1100, Colonia Villa Quietud, C.F. 04960 México, D.F.

Received 19 April 2000; accepted 9 October 2000

limit their degree of analgesia. For instance, a number of studies have demonstrated mucosal damage in 50–57% of arthritis patients treated with long-term NSAID therapy. Also, gastric and duodenal ulcers are present in 10–30% of all patients taking NSAIDs. The incidence of serious complications increases with age, especially in those older than 65 years [Pearson and Kelberman, 1996; Singh et al., 1996].

In order to increase the analgesic effects of drugs and to reduce their unwanted side effects, combinations of low doses of analgesic drugs that act through different pharmacological mechanisms have been employed extensively. This may result in an overall potentiation of the analgesic effect. In this regard, some combinations of opioid drugs with NSAIDs have been proposed [Bentley and Head, 1987; Calimlim et al., 1976; López-Muñoz et al., 1993b]. Nevertheless, information on the real benefits of such combinations in preclinical and clinical studies is still scarce.

In previous studies we have shown the potential therapeutic benefits of combinations of metamizol (MET) with morphine (MOR) in arthritic rats [López-Muñoz et al., 1994; López-Muñoz, 1994] using the "pain-induced functional impairment in the rat" model (PIFIR) [López-Muñoz et al., 1993a]. In addition to its usefulness for evaluating the analgesic efficacy of individual drugs, PIFIR represents a valid model to determine the efficacy of their combinations [López-Muñoz et al., 1993b, 1995; López-Muñoz, 1995; López-Muñoz and Salazar, 1995].

Thus, the combination of MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg, s.c.) produced the "maximum analgesic effect" (MAE) of 24 different combinations tested [López-Muñoz, 1994]. This is a significant finding given the high analgesic efficacy of the combination as compared to that exerted by the individual components. Furthermore, the probability of potential side effects is remarkably lower than expected from equally efficacious doses of the individual drugs.

As pointed out above, one of the major disadvantages encountered during long-term treatment, i.e., chronic, therapy with morphine and other opioid drugs is the development of tolerance. In this case, the combination MET+MOR that produced MAE in a single dose (acute treatment) represents an alternative choice since the dose of morphine in the combination is small. Therefore, it may be expected that the development of tolerance could be diminished. It also may be expected that as the toxic profiles of both drugs differ, adverse side effects would be avoided or diminished when low doses of both drugs are administered in combination, either as single or multiple doses. In this sense, it is necessary to demonstrate that, in addition to the pronounced efficacy of the combination of MAE in single dose, along with the absence of untoward effects, its characteristics re-

main constant during subchronic treatment. This is of great importance in the clinical situation, especially for chronic treatment of pain.

The aims of the present study were to evaluate the analgesic efficacy and the development of tolerance produced by the combination MET+MOR of MAE (562.3:5.6 mg/kg) during subchronic treatment (6 and 12 days) in arthritic rats using the PIFIR model. In addition, we compared these results with those obtained after administration of the individual components of the combination, MET (562.3 mg/kg) and MOR (5.6 mg/kg), after single and 6 and 12 days administration.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Analgesia experiments were performed using female Wistar rats [CrI: (WI)BR] (weight, 180–200 g) from the breeding facilities of CINVESTAV-IPN, México. All experimental procedures followed the recommendations of the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain [Covino et al., 1980] and the guidelines on ethical standards for investigations of experimental pain in animals [Zimmermann, 1983], and were carried out according to a protocol approved by the local animal Ethics Committee. The number of experimental animals was kept to a minimum. They were kept in an animal room at a constant temperature of 22°C, with a 12/h alternating light/dark cycle. Twelve hours before experiments, food was withheld but animals had free access to water. All experiments were performed during the light phase and animals were used only once.

Compounds

Uric acid was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and metamizol (MET) was obtained from Hoescht (Mexico City, Mexico). Morphine hydrochloride (MOR) was obtained from Mexican Secretariat of Health (Mexico City, Mexico). MET and MOR were dissolved in saline solution and administered subcutaneously. The doses mentioned in the text refer to the salts of substances.

Measurement of Analgesic Activity

Pain was induced and the analgesic effects of MET (562.3 mg/kg), MOR (5.6 mg/kg) and the combination MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) were measured in the PIFIR model, as previously described [López-Muñoz et al., 1993a]. Rats received an intraarticular injection of 0.05 mL of 30% mineral oil-suspended uric acid in the knee joint of the right hindlimb under light anesthesia with ether. An electrode was immediately fastened to each hindpaw between the plantar pad. Rats were allowed to recover from anesthesia and then placed on a stainless-steel cylinder, 30-cm diameter. The cylinder was rotated

at 4 rev/min, which forced the rats to walk. The variable measured in this method was the time of contact between each of the rat hindpaws and the cylinder. When the electrode placed on the animal's paw made contact with the cylinder floor, a circuit was closed and the time that circuit remained closed was recorded. The cylinder was rotated for 2-min periods, during which time recordings were made, allowing the rats to rest for 28 min between recording periods. Animals did not show any visible sign of severe discomfort, such as licking, rearing, biting, shaking, or vocalization. After the uric acid injection, rats developed a progressive dysfunction of the injured limb. This was recorded as a decreased time of contact between the right hindpaw and the cylinder. Data are expressed as the functionality index (FI%), i.e., the time of contact of the injured right limb divided by the time of contact of the control left limb, multiplied by 100. After approximately 2 h the FI was zero; that is, the injected limb made no contact with the cylinder. This time was considered time zero for measurements of analgesia and rats received the analgesic agents. Recordings were carried out for the next 4 h. Recovery of FI was considered the expression of the analgesic effect. For the purpose of the study, inducing nociception in the experimental animals was unavoidable. However, care was taken to avoid unnecessary suffering. At the end of the experiment the rats were immediately sacrificed.

Study Design

Animals were randomly distributed in three sets in which the analgesic effects produced by either MET (562.3 mg/kg), MOR (5.6 mg/kg), and the combination of MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) were studied after single dose (acute treatment) or after a 6-day and 12-day treatment (subchronic treatments). The schedule of dose treatment administration is shown in Table 1.

The analgesic effect of a single dose of 10 mg/kg of MOR was also studied. This dose was considered a control, as it has previously been demonstrated to produce MAE in the PIFIR model. Drugs were dissolved in saline solution (0.9% NaCl) and administered s.c. to animals previously injected with uric acid. Pain was induced the day

after completing the number of administrations, i.e., on the 7th day for the 6-day treatment group or the 13th day for the 12-day treatment group. FI was determined in all groups at 0 and after administration of the compounds, at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, and 4 h.

Data Presentation and Statistical Evaluation

Data are expressed as the percent of the functionality index (FI%) (i.e., the time of contact of the injured right hindlimb divided by the time of contact of the control left hindlimb multiplied by 100). The curves of time course (TC) were constructed by plotting FI(%) vs. time (h), and the maximal observed effect (E_{max}) was directly determined from these plots. The cumulative antinociceptive effect during the entire observation period (4 h) was determined as the area under the time course curve (AUC). The area under the effect-against-time curve (AUC_E) was estimated by the trapezoidal method rule [Rolland and Tozer, 1989]. Analgesic activity and tolerance development during subchronic treatments were evaluated using these two pharmacodynamic parameters. E_{max} is considered an indicator of analgesic efficacy and AUC_E as an overall expression of the analgesic action during the entire observation period and, hence, considering both the intensity and the duration of effect [López-Muñoz et al., 1993a]. Additionally, analgesic effect at the end of the experiment (duration of effect) was estimated by the observed effect at 4 h after the administration of the drug(s) (E_{4h}).

All values in the text and figures are shown as the mean \pm SEM of eight animals. The AUC_E , E_{max} , and E_{4h} values obtained from data for the analgesic effects produced by the combination under different treatments were compared with those obtained either by MET or MOR (assayed separately) by ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. Significant differences between means were indicated by $P \leq 0.05$.

RESULTS

Intraarticular injection of uric acid induced a complete dysfunction of the right hindlimb in 2 h, corresponding to an FI% of zero. Rats which received vehicle did not show any significant recovery of the FI during the 4-h observation period. Temporal courses (TCs) of the analgesic effect (FI% vs. time plots) obtained after acute s.c. administration (single dose) of MOR (5.6 mg/kg), MET (562.3 mg/kg), and the combination MET+MOR of MAE (562.3:5.6 mg/kg), are shown in Figure 1. MOR (5.6 mg/kg s.c.) induced an increase in FI which reached a maximum of about 70% (E_{max}) in an hour and then showed a gradual decrease to about 45% at 4 h. MET (562.3 mg/kg s.c.) produced an E_{max} of about 80% at 0.75 h. Thereafter, the time course of the effect remained practically constant during the 4-h experimentation period,

TABLE 1. Schedule Treatment

	Sets		
	I MOR (5.6 mg/kg)	II MET (562.3 mg/kg)	III MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg)
1	Acute treatment (one dose)	Acute treatment (one dose)	Acute treatment (one dose)
2	6 Days treatment	6 Days treatment	6 Days treatment
3	12 Days treatment	12 Days treatment	12 Days treatment

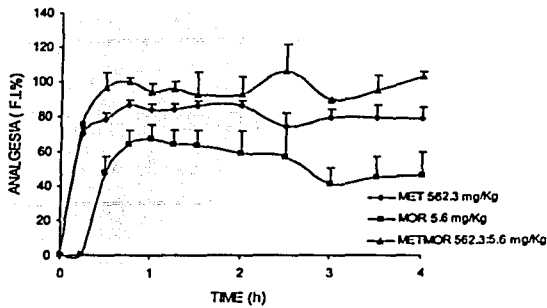


Fig. 1. Temporal courses of the antinociceptive effects (analgesia) observed expressed as the recovery of functionality index (FI%) against time (h), after s.c. administration of a single dose of the combination of MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) of MAE and of the individual components MET (562.3 mg/kg) and MOR (5.6 mg/kg) (CONTROLS). Data represent the mean \pm SEM of eight rats.

with a negligible decrease at about 2.5 h. The FI at the end of the experiment was around 70%. The combination of MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) was able to induce a rapid and significant recovery of the FI, reaching an E_{max} of about 100% at 0.75 h and this effect was maintained until the end of the experiment (4 h). As a consequence of the difference in duration and E_{max} of the drugs administered alone and that of the combination, there was a marked difference in the AUC_E (Table 2). The com-

bination MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) yielded an AUC_E of 353.4 ± 24.7 area units (au), whereas MET and MOR alone gave values of 262.8 ± 10.2 and 196.6 ± 35.3 au, respectively. Significant differences were found for AUC_E ($F_{cal} = 88.9$); E_{max} ($F_{cal} = 4.23$) and E_{4h} ($F_{cal} = 9.49$) between treatments. In addition, all these parameters showed statistical differences when the values obtained for the combination MET+MOR were compared to those of MOR (5.6 mg/kg) and MET (562.3 mg/kg), for pairwise multiple comparison by Student-Newman-Keuls method (Table 2). These results were comparable to those previously reported under the same circumstances [López-Muñoz et al., 1994].

TCs of the two components MOR, MET, and the combination MET+MOR after a 6-day subchronic treatment are shown in Figure 2. Clearly, the analgesic effect is markedly diminished in the case of MOR (5.6 mg/kg), so a rapid development of tolerance was observed. The E_{max} obtained in this case was only about 40% of FI at 0.75 h, with about a 50% reduction when compared with a single dose of MOR 5.6 mg/kg sc. The effect wore off rapidly, reaching a value of zero at 2.5 hr. On the other hand, the recovery of FI after chronic administration of MET (562.3 mg/kg) following a six-day treatment was practically the same as that obtained with a single dose of the same compound, producing an FI recovery of about 90% at 0.75 h (E_{max}), and this effect reached a value of about 76% at 4 h after administration. After subchronic

TABLE 2. Pharmacodynamic Parameters Obtained from Temporal Courses of the Analgesic Effect Observed With the Combination Metamizol+Morphine (562.3:5.6 mg/kg) in Comparison to Metamizol (562.3 mg/kg) and Morphine (5.6 mg/kg) in Acute and Subchronic Treatments (6 and 12 days) in Rats

Treatment	Global efficacy AUC_E (%h)	T_{max} (h)	E_{max} (FI %)	E_{4h} (FI %)
Acute				
MOR 10 mg/kg	316.6 (31) ^a N.K. n.s. ^b	1.25	98.1 (7.7) N.K. n.s.	53.9 (14.1) N.K. <.05
MOR 5.6 mg/kg	196.6 (35.3) N.K. $P < .05$	1.00	67.5 (7.9) N.K. <.05	45.6 (13.6) N.K. <.05
MET 562.3 mg/kg	262.8 (10.2) N.K. $P < .05$	0.75	77.9 (2.6) N.K. <.05	67.2 (4.4) N.K. <.05
MET+MOR 562.3:5.6 mg/kg	353.4 (24.7)	0.75	97 (9.5)	96.1 (4.8)
6 days				
MOR 5.6 mg/kg	49.6 (14.3) N.K. $P < .05$	0.75	37.9 (10.4) N.K. <.05	0.2 (0.1) N.K. <.05
MET 562.3 mg/kg	313.4 (14.5) N.K. n.s.	0.75	88.3 (4.4) N.K. n.s.	76.7 (7.3) N.K. n.s.
MET+MOR 562.3:5.6 mg/kg	325.4 (13.1)	1.00	93.5 (4.1)	89 (3.9)
12 days				
MOR 5.6 mg/kg	56.6 (10.9) N.K. <.05	0.75	42.1 (8.1) N.K. <.05	2.6 (1.6) N.K. <.05
MET 562.3	258.8 (23.7) N.K. <.05	0.75	75.1 (10.7) N.K. <.05	75.1 (10.7) N.K. n.s.
MET+MOR 562.3:5.6 mg/kg	354.5 (9.6)	1.00	100.6 (3.9)	83.5 (4.7)

^aData represents the mean \pm SEM of eight rats.

^bN.K. = significance for differences found in pairwise multiple comparison by Student-Newman-Keuls method (combination of MAE vs. individual components).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

117

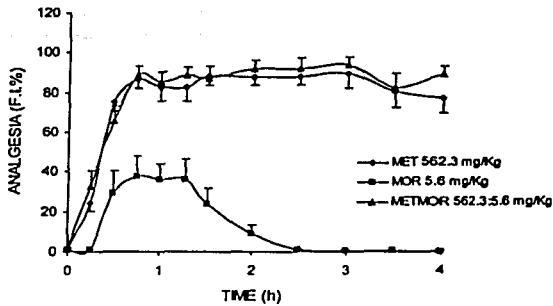


Fig. 2. Temporal courses of the antinociceptive effects (analgesia) observed after the s.c. administration of MET (562.3 mg/kg), MOR (5.6 mg/kg), and the combination MET+MOR of MAE (562.3:5.6 mg/kg) during 6 days of subchronic treatment. Data represent the mean \pm SEM of eight rats.

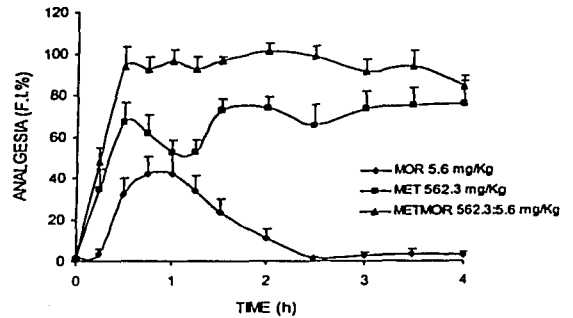


Fig. 3. Temporal courses of the antinociceptive effects (analgesia) expressed as recovery of functionality index (FI%) against time (h) after the s.c. administration of the two components MET (562.3 mg/kg), MOR (5.6 mg/kg), and the combination MET+MOR of MAE (562.3:5.6 mg/kg) during 12 days of subchronic treatment. Data represent the mean \pm SEM of eight rats.

treatment for six days, the combination produced an FI recovery of about 90% at 0.75 h, and the effect remained at this level after 4 h. In this case, the global effect reached by the combination rendered an AUC_E of 325.4 ± 13.1 au while MOR (5.6 mg/kg) and MET (562.3 mg/kg) gave an AUC_E of 49.6 ± 14.3 and 313.4 ± 14.5 au, respectively (Table 2). In this case, significant differences were found in AUC_E ($F_{cal} = 124.2$), E_{max} ($F_{cal} = 19.6$), and E_{4h} ($F_{cal} = 16.2$). Particularly, differences were established when the combination MET+MOR was compared with MOR (5.6 mg/Kg), while values obtained for MET were similar to those of the combination of MAE and no differences for MET were found by the Student-Newman-Keuls method. In addition, the cumulative analgesic efficacy obtained with the combination MET+MOR after subchronic treatment (6 days) was similar to that obtained by a single dose of MOR (10 mg/kg) $AUC_E = 316.6 \pm 31.0$ au, while the duration of the effect observed with the combination was longer than the one obtained by a single dose of 10 mg/kg of MOR and showed significant differences (Table 2).

TCs of analgesic activity for the individual components MOR (5.6 mg/kg), MET (562.3 mg/kg), and the combination of both MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg) after a 12-day subchronic treatment are shown in Figure 3. The advantages of the combination MET+MOR over the individual components is clearly demonstrated. MOR only improved an FI recovery of about 40% and its effect rapidly diminished to zero at about 2.5 h; MET produced only an FI recovery of about 75% at the same time and this effect remained at the same level until the end of the experiment (4 h). On the other hand, the analgesic effect reached by the combination of MET+MOR was about 100% and this effect remained constant for 2.5 h. After this time, the effect diminished gradually and reached a

value of about 85% at 4 h. The AUC_E after 12 days of treatment was 56.6 ± 10.9 au for MOR, 258.8 ± 23.7 au for MET and 354.5 ± 9.6 au for the combination of MET+MOR (562.3:5.6 mg/kg). ANOVA showed that statistical differences between treatments exist, as indicated by differences in AUC_E ($F_{cal} = 90$), E_{max} ($F_{cal} = 12.9$), and E_{4h} ($F_{cal} = 15.5$). When the values obtained for AUC_E , E_{max} , for MET and MOR (5.6 mg/Kg) given alone were compared by the Student-Newman-Keuls method, significant differences were also found. Differences for the duration of the effect, as evaluated by E_{4h} , were also found for MOR (5.6 mg/Kg).

The analgesic effects shown by the combination after acute and subchronic treatments were also compared with those observed after the s.c. administration of an equiefficacious dose of morphine (10 mg/kg) (single dose). These data are included in Table 2. The global analgesic (AUC_E) elicited by the combination was equivalent to the one observed after administration of 10 mg/kg morphine. Moreover, in the case of morphine (10 mg/kg) the duration of the effect was shorter and diminished to about 50% of the initial effect at the end of the experiment. On the contrary, the effect produced by the combination under study remained over 80% of FI during the duration of the experiment, either after acute or subchronic treatment for 12 days. These results confirmed the utility of the combination under the present experimental conditions and highlight the benefits of the combination MET+MOR vs. the individual treatments.

DISCUSSION

The aim of the present study was to assess the analgesic efficacy and development of tolerance produced by the combination MET+MOR of MAE (562.3:5.6 mg/

Kg) after subchronic treatment in arthritic rats using the PIFIR model. Data obtained after administration of the combination under acute and subchronic (6 and 12 days) treatments were compared with those of the individual components, MET (562.3 mg/kg) and MOR (5.6 mg/kg). It was hypothesized that this design could show the potential antinociceptive usefulness arising from the interaction of analgesic drugs that act through different mechanisms. This was visualized as a potentially superior approach for the chronic treatment of pain.

The combination MET+MOR (562.3:5.6 mg/Kg) was selected on the basis of previous studies in rats showing its ability to produce MAE between 24 different combinations under single administration protocols [López-Muñoz, 1994]. In the present study, these results were confirmed, as the cumulative analgesic efficacy (represented as the AUC₀₋₆) for the combination MET+MOR was significantly higher ($P < 0.05$) than the one shown by the individual components when administered at the same dose used in the combination (Fig. 1).

The combination of centrally and peripherally acting analgesics has theoretical justification because these compounds work through different mechanisms. MOR and other opioid drugs interact with μ opioid receptors and produce analgesia via the same mechanism as enkephalin. In addition, morphine can interact with opioid receptors located in supraspinal structures activating the supraspinal system [Martin, 1984; Jaffe and Martin, 1990; Lipp, 1991]. Several lines of evidence support a role for activation of bulbospinal noradrenergic and serotonergic inhibitory pathways [Yaksh, 1979; Yeomans et al., 1992; Kawamata et al., 1993]. In addition, morphine has a direct effect on inflammatory hyperalgesic states [Lorenzetti and Ferreira, 1982, 1985]. Ferreira [1993] proposed that a downregulation of pain receptors by injection of morphine or acetylcholine may be due to the activation of the arginine-nitric oxide-cGMP pathway [Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1991].

On the other hand, MET is a pyrazolone derivative which is often classified as a peripherally acting drug, as its major metabolites act as COX inhibitors [Brogden, 1986; Brune and Alpermann, 1983]. However, metamizol is much more effective as an antipyretic and analgesic than as an antiinflammatory agent *in vivo*, and it has also been shown to have central analgesic effects [Neugebauer et al., 1994]. Furthermore, it has been reported that the analgesic effect of MET involves activation of the arginine-nitric oxide-cGMP pathway in addition to prostaglandin synthesis inhibition [Duarte et al., 1992; Lorenzetti and Ferreira, 1985; López-Muñoz et al., 1996]. Experimental evidence supports the hypothesis that metamizol and aminophenazone (two pyrazolone derivatives) produce central antinociceptive effects by activating pathways discarded from the PAG and exerting an inhibitory

effect on nociceptive impulse transmission at the spinal level [Carlsson et al., 1986, 1988; Carlsson and Jurna, 1987]. This might provide an explanation for the high analgesic efficacy of MET observed after major abdominal surgery. It has also been shown to produce a great analgesic efficacy when compared to morphine at doses as high as 2 g every 8 h in cancerous patients [Rodríguez et al., 1994]. It has also reduced the frequency of administration of MOR after major abdominal surgery [Rockemann et al., 1996]. The great analgesic efficacy of MET in such types of pain might provide an explanation for the synergistic effect observed with the MET+MOR combination in the present study. No attempt was made to investigate the mechanism(s) involved in the potentiation of the analgesic effects produced by MET and MOR during single or subchronic treatment. Further experiments are required to elucidate these mechanisms. Additionally, the analgesic effects observed with the combination MET+MOR may also depend on the global pharmacodynamic/pharmacokinetic interactions between the components, either after acute or subchronic administration. Possible mechanism(s) of pharmacokinetic interactions remain to be determined.

It is well known that in addition to several adverse side effects, one of the major disadvantages of MOR and other opioid drugs under chronic treatment is the development of tolerance [Cherny, 1996; Johnstone and Smith, 1992]. Development of tolerance to MOR was confirmed in the present study and it occurred even when a small dose was used (5.6 mg/kg) in subchronic treatments. In contrast to the tolerance effects found with MOR alone, tolerance was not developed when the drugs were administered together, even after 12 days of treatment. This is of great importance as, in most instances, clinical treatment of chronic pain involves the use of long-term analgesic treatments. Thus, in this case it might be expected that an adequate combination for MET+MOR could be an alternative treatment with fewer side effects arising from the opioid component. Nevertheless, the potential clinical usefulness of the combination in an adequate ratio of doses must be evaluated in future studies.

No attempt was made in relation to the mechanism implicated in the inhibition of tolerance development to the antinociceptive effect of the drugs (MET and MOR) when they were administered together. It might be possible that, although a marked (MOR) or negligible tolerance effect (MET) could be present with both components, i.e., given alone, the synergism observed with the analgesic effects of both drugs when they act together is predominant over any other adverse effect. Several mechanisms have been proposed to explain the development of tolerance. Although repeated administration of MOR almost certainly leads to biochemical changes at the receptor level, and possibly its transduction systems,

some of the most interesting aspects of morphine tolerance have come from studies implicating both the NMDA and the nitric oxide systems [Bhargava, 1994; Pasternack et al., 1995]. Inhibition of NOS, the enzyme that generates NO, blocks the appearance of MOR tolerance [Babey et al., 1994; Bhargava and Zhao, 1996]. In this case, as mentioned above, it has been demonstrated that the arginine-nitric-oxide-cGMP pathway is involved in the antinociceptive activity of metamizol. It has also been mentioned that some drugs such as metamizol or diclofenac cause a direct downregulation of nociceptors already switched "on" during inflammation [Ferreira, 1993]. So it might be expected that these could represent levels of interaction that lead to the inhibition of tolerance development to the analgesic effect of MOR. Nevertheless, further studies are needed to confirm any of these hypotheses. The present results demonstrate that MET significantly attenuates tolerance development to MOR by modulating the pharmacological process responsible for tolerance development.

It is likely that the analgesic effect will be modified, depending on the type of pain and its intensity. The PIFIR model involves, in addition to inflammation, a type of pain very similar to the clinical situation encountered with gout. Thus, it is plausible to suggest that the combination MET+MOR of MAE could have potential therapeutic usefulness in the treatment of gout. In such cases, care must be taken when extrapolating findings obtained with the PIFIR and other preclinical models to clinical situations of pain. Further studies are necessary to determine the real benefits in similar clinical situations in humans. The potential usefulness of the combination employed in this method to treat other types of pain also remains to be determined.

Our findings show an enhanced analgesic effect and a diminished effect of tolerance development after subchronic treatment as the result of the adequate combination of MET and MOR, and indicate that the study of combinations of analgesic drugs in humans will be very important and constitute a superior approach in the treatment of chronic pain.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank L.A. Salazar, Ph.D., for statistical assistance; A. Huerta, L. Oliva, and F. Sánchez for technical assistance. A.M. Domínguez, M.Sc., G.P. Hernández, M.Sc., R.M. Ventura, M.Sc., and M.I. Díaz M.Sc. are CONACYT fellows.

REFERENCES

- Babey AM, Kolesnikov Y, Cheng J, Inturrisi CE, Trifilleti RR, Pasternack GW. 1994. Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 33:1463-1470
- Bentley KC, Head TW. 1987. The additive analgesic efficacy of acetaminophen, 1000 mg, and codeine, 60 mg, in dental pain. *Clin Pharmacol Ther* 42:634-640.
- Bhargava HN. 1994. Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome and self-administration behaviour. *Pharmacol Rev* 46:293-324.
- Bhargava HN, Zhao GM. 1996. Effect of nitric oxide synthase inhibition on tolerance to the analgesic action of D-Pen2, D-Pen5 enkephalin and morphine in the mouse. *Neuropeptides* 30:219-223.
- Brogden RN. 1986. Pyrazolone derivatives. *Drugs* 32:60-70.
- Brune K, Alpermann H. 1983. Non-acidic pyrazolones: inhibition of prostaglandin production, carrageenin oedema and yeast fever. *Agents Actions* 13:360-363
- Calimlim JF, Wardell WM, Davis HT, Lasagna L, Gillies AJ. 1976. Analgesic efficacy of an orally administered combination of pentazocine and aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 21:34-43.
- Carlsson KH, Jurna I. 1987. The role of descending inhibition in the antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dipyrone) and aminophenzazone ("Pyramidon"). *Naunyn Schmiedenberg Arch Pharmacol* 335:154-159.
- Carlsson KH, Helmeich J, Jurna I. 1986. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). *Pain* 27:373-390.
- Carlsson KH, Monzel W, Jurna I. 1988. Depression by morphine and the non-opioid analgesic agents, metamizol (dipyrone), lysine-acetylsalicylate and paracetamol activity in rat thalamus neurones evoked by electrical stimulation of nociceptive afferents. *Pain* 32:313-326.
- Carr BD, Goudas LC. 1999. Acute pain. *Pain. Lancet* 353:2051-2058.
- Cherny NI. 1996. Opioid analgesics: comparative features and prescribing guidelines. *Drugs* 51:713-737.
- Covino BG, Dubner R, Gybels J, Kosterlitz HW, Liebeskind JC, Sternbach RA, Vyclicky L, Yamamura H, Zimmermann M. 1980. Ethical standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain* 9:141-143.
- Duarte IDC, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1990. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 186:289.
- Duarte IDC, Dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1992. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 217:225-227.
- Ferreira SH. 1993. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. *ANN Ins Super Sanita* 29:367-373.
- Ferreira SH, Duarte IDC, Lorenzetti BB. 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201:121.
- Hill HF, Chapman CR, Saeger LS, Bjurstrom R, Walter MH, Schoene RB, Kippes M. 1990. Steady-state infusions of opioids in human. II. Concentration-effect relationships and therapeutic margins. *Pain* 43:69-79.
- Jaffe JH, Martin WR. 1990. Opioid analgesics and antagonists. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. Elmsford, NY: Pergamon Press. p 465-521.
- Johnstone RE, Smith DJ. 1992. Complete tolerance to opioids. *Anesth Analg* 75:467.
- Kawamata M, Omote K, Namiki A, Ishitani K. 1993. Contribution of descending inhibitory and spinal cholinergic systems to visceral antinociception of morphine. *Anesthesiology* 79:A701.

- Lipp J. 1991. Possible mechanism of morphine analgesia. *Clin Neuropharmacol* 14:131-147.
- López-Muñoz FJ. 1994. Surface of synergistic interaction between dipyrone and morphine in the PIFIR model. *Drug Dev Res* 33:26-32.
- López-Muñoz FJ. 1995. Profile of analgesic interaction between aspirin and d-propoxyphene obtained by means of the surface of synergistic interaction. *Drug Dev Res* 35:13-19.
- López-Muñoz FJ, Salazar LA. 1995. Determination of analgesic interaction between acetaminophen and d-propoxyphene obtained by means of the surface of synergistic interaction. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 17:311-320.
- López-Muñoz FJ, Salazar LA, Castañeda-Hernández G, Villarreal JE. 1993a. A new model to assess analgesic activity: pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 28:169-175.
- López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Villalón CM, Terrón JA, Salazar LA. 1993b. Analgesic effects of combination containing opioid drugs with either aspirin or acetaminophen in the rat. *Drug Dev Res* 29:299-304.
- López-Muñoz FJ, Villalón CM, Terrón JA, Salazar LA. 1994. Analgesic interaction produced by dipyrone and either morphine or d-propoxyphene in the pain-induced functional impairment model in rat. *Drug Dev Res* 32:50-57.
- López-Muñoz FJ, Villalón CM, Terrón JA, Salazar LA. 1995. Doses of acetyl salicylic acid and morphine in combination which provided either maximal levels of analgesia or the highest potentiation effect in the rat. *Drug Dev Res* 35:94-101.
- López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Torres-López JE, Picazo YF, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. 1996. Differences in the mechanism of antinociceptive action of non-steroidal antiinflammatory drugs in the rat. *Pharm Sci* 2:189-190.
- Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1982. The analgesic effect of quaternary analogues of morphine and nalorphine. *Braz J Med Biol Res* 15:285.
- Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1985. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesic. *Eur J Pharmacol* 114:375-384.
- Martin WR. 1984. Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev* 35:283-323.
- Neugebauer V, Schaible H-G, He X, Lücke T, Gündling P, Schmidt RF. 1994. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of metamizol. *Agents Actions* 41:62-70.
- Pasternak GW, Kolesnikov YA, Babey AM. 1995. Perspectives on the N-methyl-D-aspartate nitric oxide cascade and opioid tolerance. *Neuropsychopharmacology* 13:309-313.
- Pearson SP, Kelberman I. 1996. Gastrointestinal effects of NSAIDs. Difficulties in detection and management. *Postgrad Med* 100:131-132, 135-136, 141-143.
- Rockemann MG, Seeling W, Bischof C, Börstinghaus D, Steffen P, Georgief FM. 1996. Prophylactic use of epidural mepivacaine/morphine, systemic diclofenac and metamizol reduces postoperative morphine consumption after major abdominal surgery. *Anesthesiology* 84:1021-1024.
- Rodríguez M, Barutell C, Rull M, Gálvez J, Vidal F, Aliaga L, Moreno J, Puerta J, Ortiz P. 1994. Efficacy and tolerance of oral dipyrone versus oral morphine for cancer pain. *Eur J Cancer* 30A:584-587.
- Rolland M, Tozer TN. 1989. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications, 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Singh C, Ramey DR, Morfeld D, SHI H, Hatoum HT, Fries JF. 1996. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch Intern Med* 156:1530-1536.
- Trachtenberg AJ. 1994. Opiates for pain: patients, tolerance and society's intolerance. *JAMA* 271:427.
- WHO. 1996. Cancer pain relief and palliative care. Geneva: WHO.
- Yaksh TL. 1979. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenalin terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res* 160:180-185.
- Yeomans DC, Clark FM, Paice JA, Proudfit HK. 1992. Antinociception induced by electrical stimulation of spinally projecting noradrenergic neurons in the a7 catecholamine cell group of the rat. *Pain* 48:449-461.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN