

00550



15

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y LAS  
CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL TOLMETÍN EN RATAS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. ALMA ELENA IBARRA CÁZARES**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Ciencias  
Químicas**

**TUTOR: Dr. FRANCISCO J. FLORES MURRIETA**

**AÑO: 2003**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y LAS  
CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL TOLMETÍN EN  
RATAS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. ALMA ELENA IBARRA CÁZARES**

TUTOR: **Dr. Francisco J. Flores Murrieta**

JURADO: **Dr. Gilberto Castañeda Hernández (Presidente)**  
**Dra. Helgi Jung Cook (Vocal)**  
**Dr. Andrés Navarrete Castro (Secretario)**  
**M. en C. Inés Fuentes Noriega (Primer suplente)**  
**Dr. Vinicio Granados Soto (Segundo suplente)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



AÑO: 2003



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
NOMBRE: Alma E. López  
NOMBRE: Alma E. López  
FECHA: 27/01/03  
FIRMA: [Firma]

***EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LAS INSTALACIONES DE LA SECCIÓN DE TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL DEL CINVESTAV-IPN, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. FRANCISCO J. FLORES-MURRIETA, Y CON APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), ASÍ COMO DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# ***INDICE***



## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
GENERALIDADES .....	3
FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA .....	3
LA INFLAMACIÓN .....	5
INFLAMACIÓN AGUDA .....	5
INFLAMACIÓN CRÓNICA ... ..	10
MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN .....	11
MODELO EDEMA POR CARRAGENINA ....	12
ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS	
NO ESTEROIDEOS (AINES) .....	16
TOLMETÍN: PROPIEDADES Y USOS .....	21
MECANISMO DE ACCIÓN .....	22
FARMACOCINÉTICA DEL TOLMETÍN .....	22
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS ....	26

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





## Indice

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>A. REACTIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>B. EQUIPOS .....</b>	<b>27</b>
<b>C. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>27</b>
<b>D. PREPARACIÓN DE TOLMETÍN</b>	
<b>PARA ADMINISTRACIÓN ORAL .....</b>	<b>28</b>
<b>E. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y</b>	
<b>FASE MÓVIL .....</b>	<b>29</b>
<b>F. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO .....</b>	<b>31</b>
<b>G. EXTRACCIÓN DE TOLMETÍN</b>	
<b>EN MUESTRAS SANGUÍNEAS .....</b>	<b>32</b>
<b>H. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>I. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....</b>	<b>33</b>
<b>J. MODELO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA</b>	
<b>POR CARRAGENINA EN RATAS .....</b>	<b>35</b>
<b>K. ANÁLISIS DE DATOS .....</b>	<b>36</b>
<b>L. LUGAR DE REALIZACIÓN DE TESIS .....</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....</b>	<b>37</b>
<b>2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO</b>	
<b>EN EL MODELO DE INFLAMACIÓN ....</b>	<b>41</b>
<b>3. EVALUACIÓN DE LOS CURSOS TEMPORALES DE LAS</b>	
<b>CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS .....</b>	<b>44</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## Indice

---

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS .....	44
4. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE TOLMETÍN Y SU EFECTO ANTIINFLAMATORIO .....	48
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	51
1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	51
2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN EL MODELO DE EDEMA INDUCIDO POR CARRAGENINA .....	51
3. FARMACOCINÉTICA DEL TOLMETÍN .....	57
4. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE TOLMETÍN Y SU EFECTO ANTIINFLAMATORIO .....	59
CONCLUSIONES .....	61
BIBLIOGRAFÍA .....	62

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN







***LISTA  
DE  
ABREVIATURAS***



## LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

<b>AA</b>	ácido araquidónico.
<b>ABC y ABC<sub>E</sub></b>	área bajo la curva del perfil de concentraciones sanguíneas o del efecto farmacológico, respectivamente.
<b>AI</b>	efecto antiinflamatorio.
<b>AINEs</b>	fármacos antiinflamatorios no esteroideos.
<b>AJ</b>	artritis juvenil.
<b>AN</b>	efecto analgésico
<b>AR</b>	artritis reumatoide.
<b>C, Cs o Cp</b>	concentración en determinado biofluido: sangre, plasma, entre otros.
<b>CI<sub>50</sub> o CE<sub>50</sub></b>	concentración necesaria para alcanzar el 50% de inhibición de la respuesta.
<b>C<sub>max</sub></b>	concentración máxima
<b>COX</b>	ciclooxigenasa, puede presentarse en dos isoformas COX-1 y COX-2.
<b>D</b>	dosis.
<b>DI<sub>30</sub> o dE<sub>50</sub></b>	dosis necesaria para alcanzar el 30 o 50% de inhibición o efecto farmacológico deseado.
<b>E y E<sub>max</sub></b>	efecto farmacológico y efecto farmacológico máximo.
<b>EA</b>	espondilitis anquilosante.
<b>EI</b>	estándar interno.
<b>F</b>	fracción de dosis absorbida.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





<b>FC</b>	farmacocinética.
<b>FC/FD</b>	relación farmacocinética/farmacodinámica o concentración (C) / efecto (E).
<b>FD</b>	farmacodinamia.
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina o serotonina.
<b>HETE</b>	ácido hidroxiieicosatetranoico.
<b>HPETE</b>	ácido hidroperoxiieicosatetranoico.
<b>ISP</b>	inhibición de la síntesis de prostaglandinas.
<b>ka</b>	constante de absorción.
<b>ke</b>	constante de eliminación.
<b>KT</b>	trometamina de ketorolac.
<b>LO</b>	lipooxigenasa.
<b>LTs</b>	denominación general de los leucotrienos (ej. LTA <sub>4</sub> , es el leucotrieno A <sub>4</sub> ).
<b>Metab</b>	metabolismo.
<b>OA</b>	osteoartritis.
<b>ON</b>	óxido nítrico.
<b>P</b>	probabilidad.
<b>PGG<sub>2</sub></b>	endoperóxido de prostaglandina.
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostaciclina.
<b>PG<sub>s</sub></b>	designación general de las prostaglandinas (ej. PGE <sub>2</sub> , es la prostaglandina E <sub>2</sub> ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





<b>PIFIR</b>	siglas en inglés del modelo de disfunción inducida por dolor en ratas.
<b>PMNs</b> <b>R</b>	polimorfonucleares. respuesta farmacológica.
<b>RLO</b>	radicales libres de oxígeno.
<b>t<sub>1/2</sub></b>	tiempo de vida media.
<b>TGI</b>	tracto gastro-intestinal.
<b>TLM</b>	tolmetín.
<b>T<sub>max</sub> o</b> <b>T<sub>E</sub>max</b>	tiempo necesario para alcanzar C <sub>max</sub> o E <sub>max</sub> .
<b>TXA<sub>2</sub></b>	tromboxano A <sub>2</sub> .
<b>V<sub>d</sub></b>	volumen de distribución.
<b>λ<sub>z</sub> o k<sub>10</sub></b>	constante de eliminación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





***LISTA  
DE  
FIGURAS***



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Interacción del sistema biológico, entre las fases FC/FD .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Mediadores químicos en la inflamación ... ..	6
<b>FIGURA 3.</b> Metabolitos del ácido araquidónico en la inflamación .....	9
<b>FIGURA 4.</b> Curso temporal en la generación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria.....	15
<b>FIGURA 5.</b> Modelos de PGs derivadas de COX-1 y COX-2 en la inflamación y el dolor .....	15
<b>FIGURA 6.</b> Eventos fisiológicos en los que intervienen las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) .....	17
<b>FIGURA 7.</b> Interrelación de las vías de producción de eicosanoides por COX-1 o COX-2 .....	20
<b>FIGURA 8.</b> Estructura química del tolmetín .....	21
<b>FIGURA 9.</b> Representación compartimental de la distribución de los AINEs .....	24
<b>FIGURA 10.</b> Modelo de inflamación aguda, inducida por carragenina al 1%.....	36
<b>FIGURA 11.</b> Cromatogramas típicos obtenidos tras la inyección de extractos sanguíneos de rata .....	37
<b>FIGURA 12.</b> Curva de calibración del método analítico del tolmetín .....	38
<b>FIGURA 13.</b> Curva dosis-respuesta de tolmetín. Panel A: datos crudos (mm de Hg), Panel B: datos transformados (% de Protección) ..	42
<b>FIGURA 14.</b> Curva dosis-respuesta de tolmetín. Áreas bajo la curva (%P*h)	43
<b>FIGURA 15.</b> Influencia de la carragenina en la FC del tolmetín .....	45

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN





<b>FIGURA 16.</b> Curso temporal de las concentraciones sanguíneas de tolmetín (Panel A) y Relación de ABC de las concentraciones sanguíneas vs dosis de tolmetín (Panel B) .....	<b>47</b>
<b>FIGURA 17.</b> Curso temporal de las concentraciones sanguíneas de tolmetín (Panel A) y Curva dosis-respuesta del efecto antiinflamatorio del tolmetín (Panel B) .....	<b>49</b>
<b>FIGURA 18.</b> Relación entre las concentraciones sanguíneas y el efecto antiinflamatorio de tolmetín .....	<b>50</b>
<b>FIGURA 19.</b> Cursos temporales de los efectos antiinflamatorio y analgésico del tolmetín .....	<b>54</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





***LISTA  
DE  
TABLAS***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b>	Acciones de los metabolitos del ácido araquidónico .....	9
<b>TABLA 2.</b>	Modelos farmacológicos para evaluar inflamación en animales de experimentación .....	11
<b>TABLA 3.</b>	Clasificación química de los fármacos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. ....	19
<b>TABLA 4.</b>	Linealidad y repetibilidad del método analítico, (relación de alturas) .....	39
<b>TABLA 5.</b>	Repetibilidad y reproducibilidad del método analítico (PC) ...	39
<b>TABLA 6.</b>	Variabilidad intra e interdía para la curva de calibración .....	40
<b>TABLA 7.</b>	Variabilidad intra e interdía para los puntos control .....	40
<b>TABLA 8.</b>	Parámetros FD (efecto antiinflamatorio) del tolmetín .....	43
<b>TABLA 9.</b>	Parámetros FC (ajuste modelo-indep.) del tolmetín .....	44
<b>TABLA 10.</b>	Parámetros FC (ajuste simultáneo) del tolmetín .....	46
<b>TABLA 11.</b>	Estudios analgésicos y antiinflamatorios del tolmetín en diferentes modelos farmacológicos .....	52
<b>TABLA 12.</b>	Parámetros FD (efectos analgésico y antiinflamatorio) del tolmetín .....	55

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





# ***INTRODUCCIÓN***



## INTRODUCCIÓN.

### GENERALIDADES

Dentro de la patología, la inflamación es el proceso más frecuente y extendido del ser viviente; se encuentra en una u otra de sus formas, en la mayor parte de las enfermedades que aquejan a la humanidad. No es solo su frecuencia, sino también sus consecuencias, tanto en la vida como en la función de múltiples órganos y sistemas, lo que le brinda más importancia (Syntex, 1987). La respuesta inflamatoria se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de reparación, ya que sin la inflamación, las infecciones no serían controladas, ni curarían las heridas y los órganos lesionados tendrían úlceras permanentes (Smith, 1992). La inflamación destruye, diluye o aísla al agente lesivo y pone en marcha una serie de acontecimientos que, hasta donde es posible, reconstruyen el tejido lesionado. La inflamación participa principalmente en enfermedades que destruyen el tejido conjuntivo, y no existe órgano, aparato o estructura que no pueda ser alterada a través del tejido conjuntivo o intersticial. Estas patologías revisten tal complejidad, que hasta la fecha ha sido imposible actuar terapéuticamente en todos sus niveles y estadios y menos aún con efecto específico, ya que en la mayoría de ellas se desconoce su causa, aunque se vislumbren ciertas posibilidades etiopatogénicas.

El impacto causado por la inflamación en la vida del paciente es trascendental, desde la desorganización de sus actividades físicas, profesionales y demás, hasta el desequilibrio psicológico al sufrir incapacidad parcial o total. A todo ello se le añade el sufrimiento ocasionado por el dolor que acompaña inherentemente al proceso inflamatorio, mismo que puede ser ligero o intenso, localizado o extendido a la mayor parte de las estructuras del cuerpo humano.

No obstante su función restauradora, la inflamación y la subsecuente reparación, pueden ser potencialmente perjudiciales. Es precisamente debido a los efectos subyacentes a la inflamación (ya sea aguda, pero sobre todo tratándose de la inflamación crónica) que abundan en las farmacopeas los fármacos antiinflamatorios, que teóricamente limitan la respuesta inflamatoria (Syntex, 1987).

Dentro de estos agentes antiinflamatorios destacan los AINEs (analgésicos antiinflamatorios no esteroideos), un grupo de fármacos que la mayoría de las veces no guardan relación química, pero sí comparten características de actividad terapéutica y de efectos colaterales o secundarios (Roberts, JL y Morrow, JD 2001).

Los antiinflamatorios constituyen en la actualidad, la piedra angular de la terapia antirreumática. Pocas personas escaparán de algún proceso reumático en algún momento de su vida y muy pocas escaparán también del tratamiento con algún fármaco antiinflamatorio, (Syntex, 1989).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# PAGINACIÓN DISCONTINUA



Considerando que la magnitud de pacientes afectados por trastornos inflamatorios suma millones de personas alrededor del mundo, y que éstos son incapacitantes y varían en la frecuencia, duración e intensidad; la búsqueda de fármacos antiinflamatorios es continua y precisa la valoración del balance entre la eficacia, dosis y efectos adversos de un AINE (antiinflamatorio no esteroideo) ya que de 1982 a 1990 cuando menos ocho AINEs han sido restringidos o retirados del uso público en varios países europeos y de Norteamérica (Girwood, 1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.

Para producir su efecto un fármaco debe alcanzar concentraciones adecuadas en los sitios donde actúa. Esta concentración efectiva requiere de la integración de factores tales como la dosis administrada, la magnitud y velocidad de su absorción, su distribución a los diferentes tejidos, su metabolismo y posterior eliminación. Es decir, se requiere caracterizar la *farmacocinética* (FC) del fármaco.

La fase farmacocinética está en función principalmente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del estado fisiopatológico del organismo receptor, siendo el régimen de dosificación el único factor de "control" externo (Añache, 1983).

Por otra parte, el estudio de los efectos fisiológicos y bioquímicos de los fármacos, así como los mecanismos de acción que éstos presentan debido a la interacción entre el fármaco y enzimas, membranas u otros componentes celulares es denominado *farmacodinamia* (FD).

Desde una perspectiva integrativa el punto de partida para las fases farmacocinética y farmacodinámica, en el caso de fármacos de acción sistémica, es la presencia del fármaco en la sangre. Es decir, se asume que el efecto terapéutico del mismo está en función, directa o no, de la concentración en sangre, lo cual a su vez se relaciona con la *cantidad y velocidad* con que el fármaco llega al torrente circulatorio (Cárdenas-Rodríguez y Cortés-Arroyo, 1996).

Así, la interacción entre el fármaco, la forma farmacéutica en que se administra y el organismo vivo se denomina *sistema biológico* o *biosistema*, que puede dividirse en compartimentos, sin que estos correspondan necesariamente a un tejido u órgano. Esta interacción debe ser tal que se logre una farmacoterapia óptima y el modo de evaluarla consiste en el análisis de los parámetros farmacocinéticos y de biodisponibilidad del principio activo, relacionados con el biosistema.

El cálculo y análisis de los parámetros, se efectúa mediante modelos matemáticos. Estos son la representación abstracta de la interrelación de las variables de un sistema tales como: concentración plasmática, excreción urinaria o de actividad farmacológica de un fármaco. A partir de estas variables, el modelo debería ser capaz de caracterizar al sistema en estudio. Entre los parámetros característicos para definir la farmacocinética están: el tiempo de vida media de absorción y eliminación del fármaco, la depuración, el volumen de distribución, el área bajo la curva concentración-tiempo y la concentración máxima alcanzada (Cárdenas-Rodríguez, H y Cortés-Arroyo A., 1996).

Entonces, si consideramos que el sistema farmacocinético (FC) está constituido por mecanismos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (el sistema LADME), y que la estimulación al sistema es la dosis administrada, la respuesta obtenida será la concentración observada (C). Por otra parte, cuando el sistema biológico está constituido por mecanismos de interacciones fármaco-receptor (FD) y la estimulación es la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





concentración del fármaco en el sitio activo ( $C_e$ ), la respuesta será el efecto observado ( $R$ ) (figura 1).

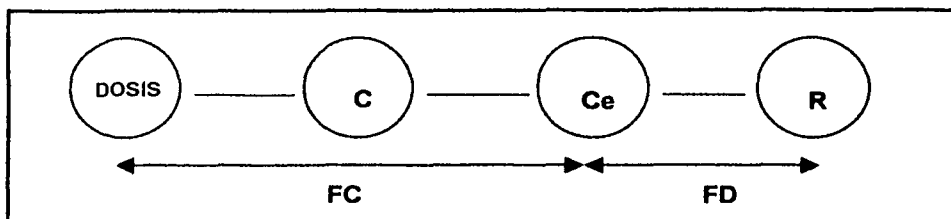


Figura 1. Interacción del sistema biológico, entre las fases farmacocinética y farmacodinámica (tomado de Holford y Sheiner, 1981).

La visión anterior refleja el enfoque integral del análisis simultáneo farmacocinético/farmacodinámico (FC/FD), una disciplina que relaciona las fases farmacocinética y farmacodinamia tal como lo describe Wagner, 1983: "El estudio de la evolución temporal de concentraciones y cantidades de fármaco y sus metabolitos en fluidos, tejidos y excretas biológicas, así como de la respuesta farmacológica observada y la construcción de modelos matemáticos para interpretar los datos obtenidos".

Es importante realizar estudios de la relación concentración-efecto, ya que éstos permitirían dilucidar mecanismos de acción de un mismo fármaco (p. ej. los efectos antiinflamatorio, antipirético y analgésico de los AINEs), explicar la variabilidad biológica del fármaco, definir aquellos fármacos que actúan a través de metabolitos. Además, son útiles en el diseño racional de regímenes de dosificación. Como resultado de lo anterior y debido a su trascendencia hacia la práctica clínica, los estudios que relacionan la farmacocinética/farmacodinamia de los fármacos se ha incrementado notablemente en los últimos diez años. Esto último ha sido posible gracias al desarrollo de los métodos analíticos que permiten determinar al fármaco en los fluidos biológicos, así como al progreso en los métodos no invasivos, y en nuevos modelos farmacodinámicos que permiten valorar el efecto, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Para elaborar modelos FC/FD adecuados, es necesario que el muestreo de las concentraciones en los fluidos biológicos y las mediciones del efecto farmacológico sean repetidas y consistentes y que se pruebe un rango amplio de diferentes dosis del fármaco. Asimismo, es importante que los métodos para evaluar el efecto y las concentraciones reúnan las características de especificidad, reproducibilidad, sensibilidad, precisión y exactitud establecidas (Bellisant *et al*, 1998). Finalmente, también debe subrayarse que la integración de los resultados, en ocasiones con un elevado número de observaciones, solo es posible a través de complejos programas de cómputo. La evolución de estos programas ha sido relativamente lenta y es una de las limitaciones para la realización de más estudios o que los que se elaboran cotidianamente sean *incompletos* – es decir, que sean solamente farmacocinéticos o farmacodinámicos (Bellisant *et al*, 1998).

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD



## LA INFLAMACIÓN.

La inflamación es una respuesta patológica/fisiológica fundamental diseñada para eliminar los estímulos nocivos introducidos en el huésped, que incluyen agentes químicos (toxinas y sustancias cáusticas), patógenos y endógenos (como aquellos producidos por el sistema inmune), así como para reparar las lesiones, radiaciones y quemaduras, entre otros. La respuesta inflamatoria se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de reparación. La inflamación destruye, diluye o aísla al agente lesivo y pone en marcha una serie de acontecimientos que, hasta donde es posible, reparan y reconstruyen el tejido lesionado. Sin embargo, la inflamación y consecuente reparación pueden ser potencialmente perjudiciales ya que comprende una serie de respuestas como la fagocitosis del agente lesivo, la captura del agente extraño por células especializadas y la neutralización del agente nocivo mediante la hipertrofia de la célula o sus organelos. Los signos clínicos clásicos que caracterizan a la inflamación son calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de la función (Robbins, 1990).

La inflamación se divide en aguda y crónica en términos de su duración, y por lo general conduce – al igual que el dolor – a una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada (Robbins, 1990; Smith, 1992).

La inflamación aguda tiene una duración relativamente corta, que va desde unos minutos, hasta varias horas o días y sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la migración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos. Por otra parte, la inflamación crónica es menos uniforme y obviamente, de mayor duración. Se asocia histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos y a la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo. Muchas de las respuestas celulares de la inflamación están mediadas por factores químicos derivados de la acción del estímulo inflamatorio sobre el plasma o las células que actúan conjunta o secuencialmente (Smith, 1992).

El campo de la respuesta inflamatoria es el tejido conectivo vascularizado, incluyendo el plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los componentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Las células circulantes que tienen importancia en la inflamación son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son las células cebadas, que están en íntima relación con los vasos sanguíneos, los fibroblastos, linfocitos y macrófagos del mismo.

### Inflamación aguda

El edema es una reacción inmediata o transitoria en la inflamación aguda, que suele comenzar inmediatamente después del estímulo lesivo, alcanza un máximo 5-10 minutos después y puede desaparecer en 15-30 minutos, si no existe otro estímulo o si no se desencadenan otros mecanismos. Esta reacción se caracteriza por 1) cambios de flujo y calibre vascular; 2) cambios de la permeabilidad vascular; y 3) exudación leucocitaria.

TESIS CON  
VALIA DE CUIENCA







La respuesta inflamatoria está mediada inicialmente por la histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos que son activados en fases consecutivas (ver Figura 2) (Robbins, 1990; Smith, 1992).

La migración de leucocitos – principalmente macrófagos y neutrófilos – es uno de los rasgos más importante de la reacción inflamatoria. Estos pueden a su vez prolongar la inflamación y aumentar el daño tisular por la liberación de enzimas, mediadores químicos y radicales libres tóxicos, entre otros. La secuencia de estos “acontecimientos leucocitarios” se divide en: marginación, adherencia, emigración según el estímulo quimiotáctico, fagocitosis y degradación intracelular y liberación de productos leucocitarios. La fagocitosis del estímulo dañino, es un fenómeno dependiente de energía, que estimula numerosos acontecimientos intracelulares y origina también la secreción de sustancias no sólo dentro del fagolisosoma, sino también al espacio extracelular, siendo las más importantes: enzimas lisosómicas, radicales libres de oxígeno (RLO) y productos del metabolismo del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas (PGs) y leucotrienos (LTs). Estos productos son mediadores poderosos de los efectos celulares y vasculares de la inflamación y lesión tisular, y amplifican los efectos del estímulo inflamatorio inicial (Smith, 1992).

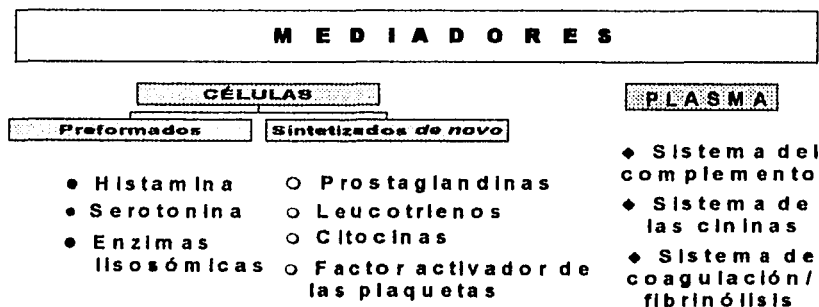


Figura 2. Mediadores químicos en la inflamación (adaptado de Robbins, 1990).

La histamina y la serotonina (5-hidroxitriptamina) son los mediadores químicos de la fase activa inmediata al incremento de la permeabilidad. En el hombre y en ciertos roedores, la histamina y la serotonina son producidas y almacenadas en los gránulos de las células cebadas, basófilos y plaquetas. Estas aminas producen vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, especialmente en las vénulas.

TESIS CON  
FALLA DE CEROEN



Muchos agentes producen la liberación de estas aminas a partir de las células cebadas: los agentes físicos, las reacciones inmunes, los fragmentos del complemento C3a y C5a (también llamadas anafilatoxinas) y los factores liberadores de la histamina, presentes en neutrófilos, monocitos y plaquetas, así como la interleucina-1. La concentración de histamina disminuye luego de los primeros 60 minutos del estímulo y los antihistamínicos no tienen efecto sobre la permeabilidad vascular en las fases retardadas (Syntex, 1987; Smith, 1992).

Por otra parte, las proteasas plasmáticas incluyen tres sistemas activos e interrelacionados entre sí: el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación o fibrinólisis. Al igual que las aminas anteriormente mencionadas, poseen actividades vasoactiva y quimiotáctica, que median el incremento en la permeabilidad vascular, el quimiotactismo sobre neutrófilos, eosinófilos y monocitos, la opsonización ante la fagocitosis y la lisis de los microorganismos. Las anafilatoxinas del complemento C3a y C5a, además de incrementar la permeabilidad vascular y la liberación de histamina de las células cebadas y plaquetas, poseen otros mecanismos que incrementan la respuesta inflamatoria. C5a también activa la vía de la lipooxigenasa (LO) para el metabolismo del ácido araquidónico (AA) en los neutrófilos y macrófagos (Robbins, 1990; Smith, 1992).

El sistema de las cininas da lugar a la formación de un nonapéptido vasoactivo, la bradicinina, un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular y que no posee actividad quimiotáctica. La bradicinina se forma también a partir de la calicreína y el cininógeno. La bradicinina tiene una acción corta, ya que se inactiva por la enzima cininasa. La calicreína tiene actividad quimiotáctica y produce agregación de los neutrófilos *in vitro* (Syntex, 1987).

En lo referente a los derivados oxigenados del ácido araquidónico (AA), los más importantes son las prostaglandinas y tromboxanos, considerados como autacoides u hormonas locales de acción corta, que se forman rápidamente, ejercen su efecto localmente y se degradan espontáneamente o son destruidas por la acción de enzimas. El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetranoico), que deriva directamente de la dieta o de la conversión del ácido graso linoleico. Existe de forma esterificada en los fosfolípidos de la membrana, particularmente en el carbono 2 de la fosfatidilcolina y fosfatidilinositol. Para que el AA sea utilizado por la célula para formar eicosanoides, tiene que ser antes liberado de los fosfolípidos, mediante la activación de las fosfolipasas celulares por estímulos mecánicos, físicos y químicos, o por otros mediadores (por ej. C5a). El AA es metabolizado principalmente por dos vías: la vía de la lipooxigenasa (LO) y la vía de la ciclooxigenasa (COX), siendo los productos formados de estas reacciones leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos, respectivamente (Robbins, 1990; Smith, 1992).

La ciclooxigenasa (COX) transforma rápidamente el AA en el endoperóxido prostaglandina PGG<sub>2</sub> que, a su vez es convertido enzimáticamente en PGH<sub>2</sub>. En esta conversión se genera un radical libre de oxígeno y entonces, la PGH<sub>2</sub> se convierte enzimáticamente en:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- a) Tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ), que se encuentra en las plaquetas y otras células, es un potente agregante plaquetario de vida media corta (segundos) y potente vasoconstrictor.
- b) Prostaciclina ( $PGI_2$ ), que se encuentra predominantemente en la pared vascular y es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y vasodilatador.
- c) Prostaglandinas (siendo las más estables:  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGD_2$ ), que se encuentran en muchos tejidos y ejercen diversas acciones sobre el tono y la permeabilidad vascular.

Por su parte la vía de la lipooxigenasa (LO) implica la conversión de AA en derivados hidroperóxidos (ácido hidroperoxieicosatetranoico – HPETE – en las plaquetas y 5-HPETE y 15-HPETE en los leucocitos), por la acción de LO en los ácidos grasos. El 5-HPETE puede sufrir peroxidación a ácido hidroxieicosatetranoico (HETE), un potente estímulo quimiotáctico para los neutrófilos. 5-HPETE también da lugar a los leucotrienos. Un derivado 5,6-epoxi, el leucotrieno  $A_4$  ( $LTA_4$ ) es luego convertido en leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ) o por la adición de un residuo de glutatión en leucotrieno  $C_4$  ( $LTC_4$ ).  $LTC_4$  es luego convertido en leucotrieno  $D_4$  ( $LTD_4$ ) y posteriormente en leucotrieno  $E_4$  ( $LTE_4$ ).  $LTB_4$  es un potente agente quimiotáctico que estimula la agregación de los leucocitos al endotelio vascular; mientras que  $LTC_4$ ,  $LTD_4$  y  $LTE_4$  producen vasoconstricción, broncoespasmo y aumento de la permeabilidad vascular, como se muestra en la figura 3 y en la tabla 1. De igual manera, los neutrófilos también producen metabolitos trihidróxidos del AA, denominados lipoxinas (Robbins, 1990).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

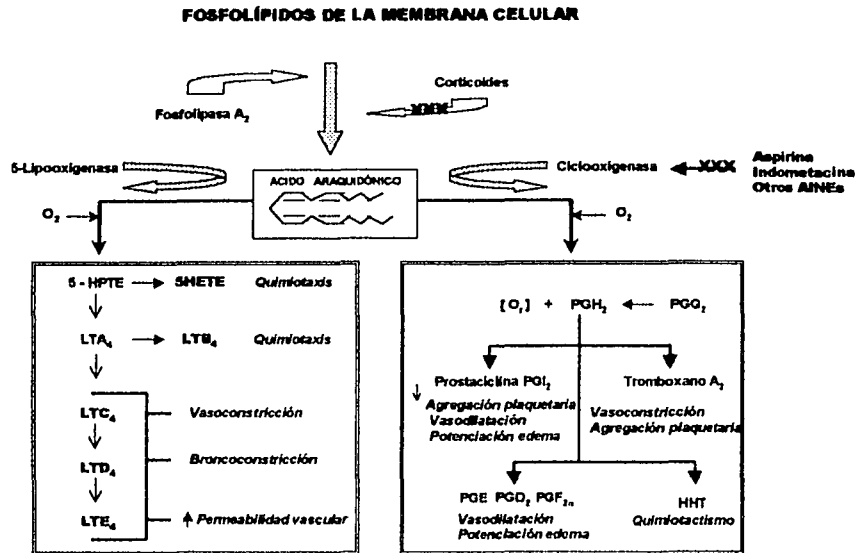


Figura 3. Metabolitos del ácido araquidónico en la inflamación (Adaptado de Robbins, 1990)

Tabla 1. Acciones de los metabolitos del ácido araquidónico.

ACCIÓN	METABOLITO
Vasoconstricción	Tromboxano A <sub>2</sub> , HPETE, endoperóxidos leucotrienos C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> .
Vasodilatación	PGI <sub>2</sub> , PGE, PGE <sub>2</sub> , PGD.
Aumento de la permeabilidad vascular	Leucotrienos C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> .
Quimiotaxis	Leucotrienos B <sub>4</sub> , HHT, HPETE, HETE, D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> .

(Adaptado de Robbins, 1990).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### Inflamación Crónica

Considerando que la respuesta inflamatoria aguda puede evolucionar hacia una resolución completa (recuperación normal de la zona inflamada), a una curación por cicatrización (con sustancial destrucción tisular), a una abscesificación (en infecciones por agentes piógenos) o en el peor de los casos, progresar en dirección a una inflamación **crónica**. De esta manera, la inflamación crónica se caracteriza por destrucción tisular y por una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada, de mayor duración que en la inflamación aguda, y puede generarse por:

1. Persistencia del estímulo lesivo o por alguna interferencia en la curación normal. Se caracteriza por destrucción tisular y por una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada, de mayor duración que en la inflamación aguda.
2. Brotes repetidos de inflamación aguda (con períodos de curación entre los brotes), como en los casos de pielonefritis y colecistitis.
3. Una forma *insidiosa*, como una respuesta prolongada de bajo grado, sin síntomas agudos. En esta categoría entran enfermedades tales como la artritis reumatoide, la tuberculosis y otras formas de patologías pulmonares crónicas, afecciones producidas bajo las siguientes circunstancias:
  - a) por infección persistente con microorganismos intracelulares, que poseen baja toxicidad, pero que producen respuestas inmunes.
  - b) por exposición prolongada a sustancias potencialmente tóxicas (sílice y asbesto).
  - c) por reacciones inmunes, ante los tejidos del propio individuo (enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide).

La inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas, por la proliferación de fibroblastos, células cebadas y pequeños vasos sanguíneos; así como por el incremento de tejido conectivo (fibrosis) y la destrucción tisular. Este acumulo de células, puede persistir durante largos períodos de tiempo, siendo el acopio de macrófagos la figura central de la inflamación crónica. Los productos tóxicos para los tejidos, que éstos generan incluyen radicales libres de oxígeno, proteasas plasmáticas y otros agentes quimiotácticos que contribuyen a la lesión tisular progresiva con consecuente alteración funcional (Robbins, 1990; Smith, 1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN

Los modelos inflamatorios en animales de laboratorio, permiten valorar cuantitativamente la potencia y efectividad antiinflamatoria de los fármacos antiirreumáticos. En los animales de laboratorio ha sido posible diseñar un importante número de modelos experimentales que representan con bastante fidelidad algunos procesos inflamatorios. En general, estos modelos son útiles para valorar la eficacia de los fármacos antiinflamatorios, ya que las sustancias proinflamatorias que se utilizan permiten, gracias a su estandarización, predecir con cierta seguridad la actividad terapéutica de los fármacos a prueba (Tabla 2).

**Tabla 2.** Modelos farmacológicos para evaluar inflamación en animales de experimentación. En estos estudios se utilizan agentes físicos, químicos, inmunogénicos, bacterias, virus y enzimas, entre otros, para inocularlos en las articulaciones o en las extremidades (cojinete plantar) de conejos, ratas, cobayos y otros animales de laboratorio, para producir alteraciones inflamatorias, que en forma similar, se presentan en los procesos de artritis, osteoartritis y artritis reumatoide (Modificado de Syntex, 1987).

MODELOS FARMACOLÓGICOS PARA EVALUAR INFLAMACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN		
<b>AGENTES FÍSICOS</b> - Dislocación articular	Conejo	Artritis
<b>AGENTES QUÍMICOS</b> - Carragenina - Sulfas - Colesterol - Caolina, dextrán y formalina	Rata Rata Conejo Rata	Artritis reumatoide Artritis, periartritis Artritis Artritis reumatoide
<b>AGENTES INFECCIOSOS</b> - Estreptococos - Diploestreptococos - Herpes simple	Ratón Rata Conejo	Artritis reumatoide Artritis reumatoide Artritis
<b>AGENTES INMUNÓGENOS</b> - Complejos inmunes - Adyuvantes (Freund) - Albúmina y levadura	Cobayo Rata Rata	Artritis Artritis reumatoide Artritis reumatoide
<b>OTROS</b> - Papaína - Enzimas hidrolíticas	Conejo Conejo	Artritis Artritis reumatoide

TESIS CON  
PLAZA DE COMPEN



### Modelo de edema inducido por Carragenina

El modelo de carragenina es uno de los más utilizados para desarrollar edema en modelos animales, porque presenta las siguientes ventajas (Syntex, 1987):

1. Que la sustancia agresora (carragenina) es estable y las cantidades necesarias para producir una artritis reumatoide similar a la humana.
2. Que puede emplearse como un modelo agudo, subagudo o crónico de inflamación.
3. La evolución de la inflamación es similar a la experimentada en el hombre (Zhang *et al*, 1997).
4. Es altamente reproducible y presenta baja variabilidad inter-sujetos.
5. Es un modelo que permite una valoración cuantitativa de la inflamación producida, de manera que las determinaciones no son subjetivas o indirectas (Di Rosa *et al*, 1968).

Las reacciones inflamatorias que intervienen en la respuesta inducida por carragenina forman la mayor parte de las pruebas de eficacia de AINEs *in vivo* e incluyen las siguientes pruebas: edema en el cojiente plantar, pleuresía inducida por carragenina y "bolsa de aire" inducida por carragenina-murina (Willoughby *et al*, 2001).

La carragenina es una mezcla de polisacáridos sulfatados extraídos de las algas marinas rojas *Rhodophyceae*. Posee la habilidad de formar geles termoreversibles y es soluble en solventes polares, la forma  $\kappa$  es soluble en solución concentrada y caliente de glucosa, en agua a  $\sim 60^\circ \text{C}$  y en solución salina diluida; es insoluble en soluciones salinas concentradas y solución alcohólica al 35%; la estabilidad óptima se obtiene a pH  $\sim 9.0$  y el grado de sulfatación varía de 25-30%. La forma  $\lambda$  es soluble en agua, solución concentrada y caliente de glucosa, en solución salina concentrada y solución alcohólica al 35%; la estabilidad óptima se obtiene a pH  $\sim 9.0$  y el grado de sulfatación de esta forma va de 32-39% (The Merck Index, 1995).

La dosis para producir el efecto inflamatorio agudo de carragenina varía entre 0.05 mL y 0.1 mL de una suspensión de carragenina en solución salina al 1%, aunque se obtiene variabilidad de un experimento a otro en función a la dosis y al tipo de carragenina empleado (ya sea  $\lambda$  o  $\kappa$ ). Casi todos los autores coinciden que la mejor vía de administración es la subcutánea en el cojinete plantar de la pata trasera de la rata. El efecto máximo se alcanza entre las 3-5 horas posteriores a la administración de carragenina y puede permanecer por varias horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



De acuerdo a lo descrito por Willoughby *et al*, la administración subcutánea en el cojinete plantar de la pata de la rata de 0.1 mL de carragenina en solución salina al 1%, produce una curva bifásica que describe los incrementos en el volumen del miembro lesionado. En esta curva, existe una fase inicial que se caracteriza por la rápida formación de edema y que se produce durante los treinta minutos posteriores a la administración de la carragenina; seguida de una segunda fase más lenta, pero sostenida respuesta inflamatoria, que es la que puede permanecer constante hasta 5 h o más. Después de este tiempo, la inflamación inducida por la carragenina tiende a desaparecer *per se*.

El mecanismo de producción de edema por la carragenina ha sido ampliamente estudiado, aunque los resultados obtenidos son controversiales. Algunos investigadores señalan que el edema es causado en la primera etapa, por la liberación de histamina, serotonina, y elementos del complemento, mientras que una segunda fase (2-3 h posteriores al estímulo lesivo) se produce por la presencia de leucocitos. En su conjunto, todos estos agentes son responsables del incremento en la permeabilidad vascular y del daño causado al tejido conectivo (Crunkhorn *et al*, 1971; Ferreira *et al*, 1974; Ucelay *et al*, 1988).

Considerando que las prostaglandinas potencian el edema producido por bradicinina, histamina y serotonina, se ha postulado que el mecanismo básico (más no el único) de acción de los AINEs es la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas (PGs) (Ferreira *et al*, 1974; Roberts, JL y Morrow, JD 2001).

En ese sentido, Seibert *et al*, en 1994 confirmaron investigaciones previas (Mitchel *et al*, 1993; Xie *et al*, 1992) y encontraron que son por lo menos 2 isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX), las responsables de la síntesis de PGs. Mientras que la COX-1 es constitutivamente expresada en muchos tejidos y es la encargada de mantener diversas funciones fisiológicas, la COX-2 se expresa de forma local ante el estímulo lesivo de ciertos agentes proinflamatorios, como la carragenina. Los mismos autores describieron que el tiempo necesario para que se produzca la máxima expresión de COX-2 es semejante al requerido para alcanzar el máximo efecto inflamatorio inducido por carragenina, es decir, entre los 60 minutos - 3 h posteriores al estímulo agresor (Seibert *et al* 1994; Kun-Yu, 1998). Así, las PGs formadas por COX-2 (PGE<sub>2</sub>) parecen ser de suma importancia en el mantenimiento de la respuesta hiperalgésica e inflamatoria en el sitio de acción. (Zhang *et al*, 1997).

A pesar de la correlación arriba mencionada, la distribución de las isoformas de la COX y los mecanismos de acción de los inhibidores-COX en este modelo no se han investigado sistemáticamente. Algunos inhibidores selectivos de COX-2, como el rofecoxib, han sido evaluados en este modelo, pero no se ha estudiado qué ocurre una vez transcurridas las tres horas posteriores a la administración de la carragenina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

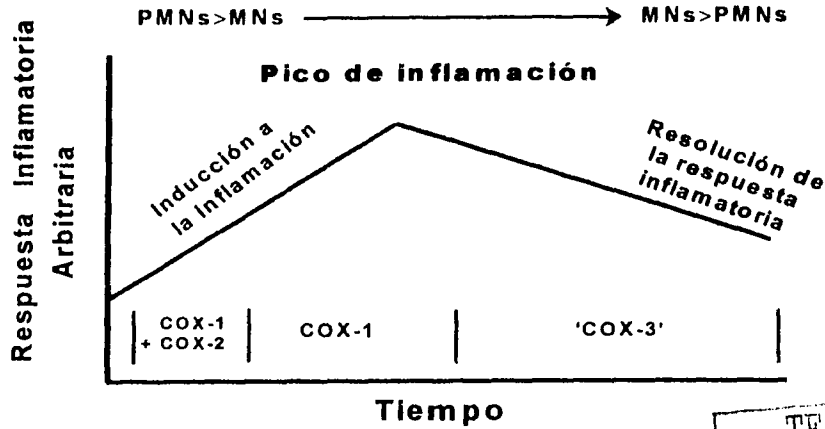




De hecho, los resultados obtenidos con los inhibidores selectivos de COX-2 en este modelo son controversiales, ya que se ha demostrado que nimesulide y otros AINEs requieren concentraciones que inhiben no sólo a COX-2, sino también a COX-1 para obtener un efecto antiinflamatorio significativo; como la dosis de SC-58125 que Seibert *et al* necesitaron para inhibir el edema causado en la pata de la rata (*in vivo*) que fue 1, 000 veces más alta que aquella necesaria para inhibir la síntesis de prostanoïdes en el tejido de la pata (*in situ*) (Willoughby *et al*, 2001). Sin embargo, algunos inhibidores selectivos de COX-1 como SC-560 no demostraron efecto antiinflamatorio en el modelo de carragenina, a dosis a las cuales inhiben la actividad de COX-1 *in vivo* (Smith *et al*, 1998).

Esto sugiere que la COX-1 es importante en este modelo a pesar de que se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos y no necesariamente ante el estímulo de agentes lesivos, como ocurre para COX-2; es decir, a pesar de que no es una enzima inducible como es el caso de COX-2, aunque es necesario realizar más estudios para determinar el papel que desempeña COX-1 en el edema inducido por carragenina, como puede observarse en las figuras 4 y 5 (Willoughby *et al*, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Curso temporal tentativo que muestra la relación entre COX-1, COX-2 y 'COX-3' en la generación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria. (Tomado de Willoughby *et al*, 2001).

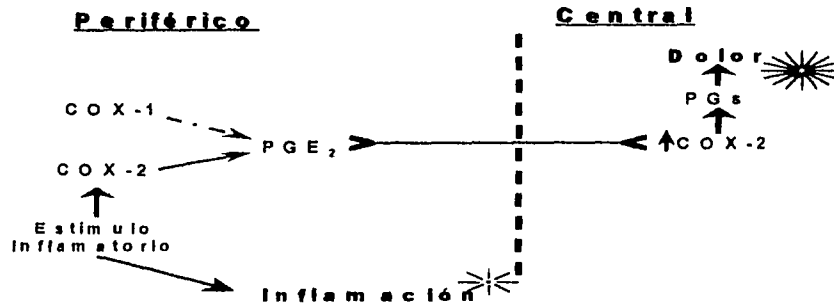


Figura 5. Modelo de PGs derivadas de COX-1 y COX-2 en la inflamación y el dolor. La señal inicial periférica inflamatoria, produce una sobre-regulación desde COX-2 y las PGs que median la extravasación de plasma y otras señales neurológicas hacia el CNS. Los mediadores inflamatorios incluidas la PGs incrementan el tráfico nervioso, lo que produce un incremento en la expresión de COX-2 en la médula espinal, lo que a su vez produce PGs que influyen en las señales de dolor a nivel central (Tomado de Smith *et al*, 1998).



## ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES).

Desde el punto de vista biológico, pueden distinguirse cuando menos tres componentes patológicos en la enfermedad reumática de localización articular: la sinovitis articular, que es la manifestación del proceso inflamatorio crónico, en el que la participación del sistema inmunológico es evidente. Como se mencionó anteriormente, este proceso inflamatorio crónico resulta de las alteraciones vasculares y celulares que se producen debido a la descarga de las enzimas proteolíticas de los fagocitos, que a la vez que producen inflamación aguda, poco a poco deterioran, degeneran y finalmente destruyen el cartilago articular, lo que permite la erosión ósea, con la consecuente inestabilidad física y deformación de la articulación (Syntex, 1987).

Es debido a los efectos subyacentes a la inflamación (ya sea aguda y sobre todo tratándose de la inflamación crónica) que abundan los fármacos antiinflamatorios, que teóricamente limitan la respuesta inflamatoria normal. A pesar de que todos los antiinflamatorios son capaces de modificar la inflamación, sólo lo hacen de forma paliativa y la mayoría de las veces, no tienen efectos sobre el proceso degenerativo (Robbins, 1990).

Los agentes farmacológicos más importantes que inhiben la respuesta inflamatoria son los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Estos fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos; constituyen un grupo de compuestos heterogéneo, que no guarda relación química entre sí (aunque muchos de ellos son ácidos orgánicos), y la mayor parte de éstos posee la capacidad de inhibir las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX), COX-1 y COX-2 y de ciertos autacoides relacionados (Roberts, JL y Morrow, JD 2001).

No obstante la diversidad química de las moléculas que conforman este grupo de fármacos, éstos compuestos comparten características terapéuticas y de efectos colaterales, siendo el más frecuente de los eventos adversos, la propensión a inducir ulceraciones gástricas o intestinales, que se acompañan la mayoría de las veces, por anemia resultante de la pérdida sanguínea. Todos los AINES presentan la tendencia a producir efectos secundarios que afectan el tracto gastrointestinal, que van desde la dispepsia y pirosis leves, hasta ulceraciones en estómago o duodeno.

La inhibición de COX-1 puede explicar en parte, los efectos adversos gástricos y renales de los AINES, mientras que la inhibición de COX-2 da como resultado la eficacia terapéutica de los fármacos antiinflamatorios, siendo su principal mecanismo de acción la inhibición de síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Mitchel *et al*, 1994), como puede observarse en las figuras 6 y 7.

Sin embargo, los AINES no suelen inhibir la formación de eicosanoides como los leucotrienos, que también contribuyen a la inflamación, ni afecta la síntesis de muchos otros mediadores que producen inflamación o dolor. Adicionalmente, los AINES se unen firmemente a las proteínas plasmáticas, por lo que pueden desplazar a ciertos fármacos de sus lugares de unión (Insel, 1996).



Los mecanismos de acción de los AINEs incluyen de forma global:

1. Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.
2. Desplazamiento de los péptidos antiinflamatorios de la albúmina.
3. Inhibición de las enzimas lisosómicas.
4. Inhibición de la quimiotaxis.
5. Inhibición de la liberación de serotonina e histamina.
6. Inhibición de la síntesis de cininas.
7. Hiperpolarización de las membranas neuronales.
8. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas

(Syntex, 1987).

Siendo la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, el mecanismo más importante y extensamente estudiado (Vane *et al*, 2001)

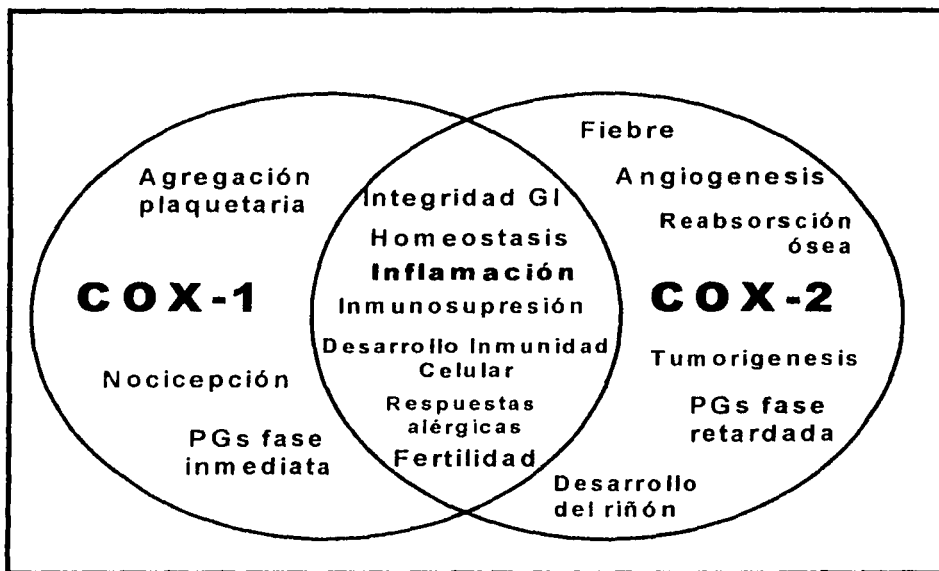


Figura 6. Eventos fisiológicos en los que intervienen las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). La conversión de ácido araquidónico (AA) a prostaglandinas H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), etapa obligada en la biosíntesis de prostanoides, es mediada por las dos isoformas de la COX. Mientras COX-1 se expresa de forma constitutiva, COX-2 es altamente inducible y ambas pueden ser inhibidas de manera selectiva.

Las dos isoformas de la COX están involucradas en diversos procesos fisiológicos y patológicos que van desde la homeostasis celular y la respuesta nociceptiva, hasta la regulación de la inflamación, la temperatura corporal y del sistema inmune entre otras.

Donde GI = gastrointestinal. (Modificado de Ballou *et al*, 2001).





Como se mencionó anteriormente, la enzima ciclooxigenasa es la responsable de convertir el ácido araquidónico (AA) a prostaglandinas (PG) H<sub>2</sub>, la cual es posteriormente metabolizada por otra enzimas a otras PGs, prostaciclina y tromboxanos. Las dos isoformas de COX tienen pesos moleculares muy similares (70 a 71 kDa) y la secuencia de aminoácidos es 60% homóloga entre una isoenzima y otra (Vane *et al*, 2001). La activación de COX-1 es responsable entre otros, de la producción de prostaciclina, la cual una vez liberada del endotelio, posee efectos antitrombogénico y vasodilatador, mientras que en la mucosa gástrica actúa como citoprotector. Por su parte COX-2 interviene en la producción de citocinas, mitógenos y endotoxinas (Mitchel *et al*, 1994, Vane *et al*, 2001).

El descubrimiento de las isoformas de la COX permitió una mejor interpretación de la teoría general que explicaba el mecanismo de acción de los AINEs, así como dilucidar los efectos adversos y terapéuticos que estos fármacos tiene en común. De esta forma, los AINEs pueden clasificarse de acuerdo a la selectividad con que inhiben una u otra isoenzima de COX (ver tabla 3), siendo los inhibidores selectivos de COX-2 los que presentan efectos antiinflamatorios notables, sin la alta incidencia de efectos adversos (ej. rofecoxib, celecoxib, meloxicam y nimesulide), mientras que los inhibidores de COX-1 (ej. aspirina, indometacina e ibuprofeno) son responsables de los efectos indeseables de los AINEs, tales como las ulceraciones y posteriores hemorragias gástricas y de los efectos tóxicos renales – ver figura 7 - (Vane *et al*, 2001).

Esta hipótesis, es controversial ya que no cuenta con el respaldo suficiente de estudios realizados en animales y los que existen difieren entre sí. Por el momento la evidencia clínica indica que los inhibidores selectivos COX-2 son mejor tolerados que los COX-1 (Mitchel *et al*, 1994, Vane *et al*, 2001).

Adicionalmente y a pesar de las potenciales ventajas terapéuticas de los inhibidores selectivos de COX-2, la isoforma COX-2 (inducible en las células expuestas a estímulo pro-inflamatorio) también se expresa de forma constitutiva en ciertas áreas del riñón y del cerebro (ver figura 6), por lo que no quedan exentos los inhibidores selectivos de COX-2, de producir daños durante sus uso en terapia crónica y razón por la cual Zunaid, K & Emery, P. 2001, sugieren diversos estudios a largo plazo para los diferentes procesos inflamatorios (artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante), en donde otros AINEs no selectivos constituyen la piedra angular de la terapia antiinflamatoria (Roberts, JL & Morrow, JD 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Tabla 3. Clasificación química de los fármacos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios.**

**INHIBIDORES NO SELECTIVOS DE COX**

*Derivados del ácido salicílico*

Aspirina, salicilato de sodio, trisalicilato de magnesio-colina, salsalato, diflusinal, sulfasalazina, olsalazina

*Derivados para-aminofenol*

Acetaminofén

*Derivados del ácido indólico o indeno*

Indometacina, suldac

*Ácidos heteroarílico-acético*

**Tolmetin**, diclofenac, ketorolac

*Ácidos aril-propiónico*

Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozín

*Ácidos antranílico (fenamatos)*

Ácido mefenámico, ácido meclofenámico

*Ácidos enólicos*

Oxicam (piroxicam, meloxicam)

*Alcanonas*

Nabumetona

**INHIBIDORES SELECTIVOS DE COX-2**

*Furanonas diaril-sustituidas*

Rofecoxib

*Furanonas diaril-sustituidas*

Celecoxib

*Ácido indol-acético*

Etodolac

*Sulfonamidas*

Nimesulide

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(Adaptado de Roberts, JL & Morrow, JD 2001).

La nueva generación de AINEs, los inhibidores selectivos de COX-2 del tipo *coxib* (celecoxib, rofecoxib) han demostrado ampliamente sus notables efectos antiinflamatorios, y en menor grado analgésicos y antipiréticos. Ambos *coxib* poseen eficacia analgésica similar a aspirina, ibuprofeno o naproxeno, para aliviar el dolor posterior a una extracción dental. Rofecoxib también ha demostrado actividad antipirética en humanos. Celecoxib y rofecoxib son equipotentes a naproxeno, ibuprofeno o diclofenac en el tratamiento de osteoartritis (OA) de cadera y rodilla, y en general de todo tipo de osteoartritis. Celecoxib es igual de eficaz que naproxeno y diclofenac, en el tratamiento de artritis reumatoide (AR) (Karim, Z & Emery, P.; 2001).



Tanto celecoxib como rofecoxib, han mostrado menor incidencia de dispepsia, úlceras pépticas y hemorragias gastrointestinales que con el uso de otros AINEs como apirina, indometacina e ibuprofeno. De hecho rofecoxib no ejerce efecto sobre la síntesis de PGs de la mucosa gástrica o sobre la permeabilidad del intestino delgado.

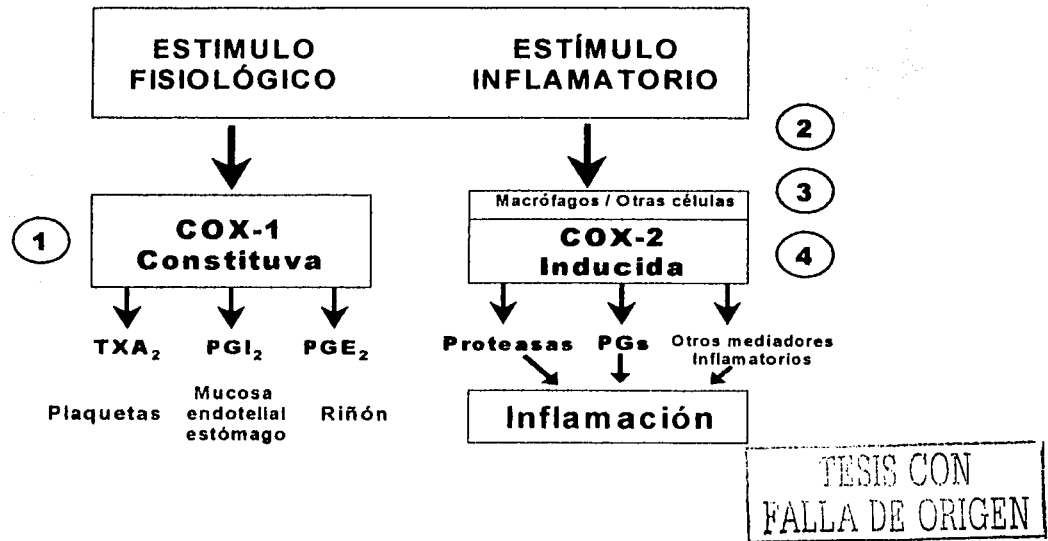


Figura 7. Interrelación de las vías de producción de eicosanoides por COX-1 o COX-2. Bajo condiciones fisiológicas, la activación de COX-1 en plaquetas, endotelio, mucosa gástrica o riñón produce la liberación de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA)<sub>2</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), o prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). La liberación de estos eicosanoides es selectivamente inhibida por fármacos tales como aspirina (1).

El estímulo inflamatorio libera citocinas, como la interleucina 1, que induce a la síntesis de COX-2 en las células, tales como los macrófagos, lo cual produce liberación de prostaglandinas (PGs). Esta liberación de PGs, adicionales a ciertas proteasas y otros mediadores pro-inflamatorios (ej. radicales libres de oxígeno) dan por resultado el **proceso inflamatorio**.

La vía de COX-2 puede ser interrumpida en diversas etapas o estadios por antagonistas o anticuerpos a citocinas y mitógenos (2), inhibidores que influyen en la inducción de COX-2 (ej. glucocorticoides) (3), o inhibidores selectivos de COX-2 como aquellos del tipo **coxib** (4). (Tomado de Mitchel *et al*, 1994).

Sin embargo, los AINEs tradicionales tales como diclofenac, meloxicam y naproxen; permanecen como los fármacos de elección primaria en el tratamiento de la AR y de otros procesos inflamatorios, ya que disminuyen la inflamación y el volumen



de líquido sinovial de la articulación afectada de manera eficaz, aunque presenten los efectos adversos antes mencionados (Zunaid, K y Emery, P. 2001).

**TOLMETÍN:**

ácido 1-metil-5-(4 metilbenzoil)-1-H-pirrol-2-acético.

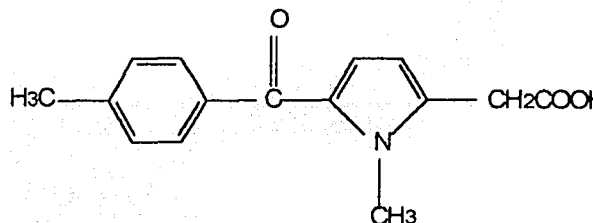
ácido 5-(*p*-tolouil)-1 metilpirrol-2-acético.

p.f. 155-157 °C, log P 2.79, pka 3.5,

λ en solución acuosa: 232 nm.

**C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>**. P.M. 257.29

*Tolectin, tolmene, reutol* (Index Merck, 11ª ed).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 8. Estructura química del tolmetín.**

Químicamente, el tolmetín es un miembro de la serie pirrólica/ácido acético, y por lo tanto, similar al zomepirac y a la indometacina (Goodman & Gilman, 1990). El tolmetín es una agente antiinflamatorio, analgésico y antipirético introducido a la práctica clínica en los E.U. y posteriormente al resto del mundo en 1976. La efectividad antiinflamatoria y analgésica del tolmetin en humanos se ha demostrado ampliamente en el tratamiento de artritis reumatoide (AR) crónica o aguda, artritis juvenil (AJ), osteoartritis (OA) y espondilitis anquilosante (EA), entre otras (Berkowitz *et al*; 1974; Goodman & Gilman, 1990). La dosis terapéutica usual es de 0.6 a 1.8 g de tolmetín diarios, divididos en tres o cuatro tomas (Guía Profesional, 1993).

El tolmetín sódico presenta diversos efectos adversos que van desde dispepsia, dolor abdominal, náusea, vómito, constipación y cefalea hasta anafilaxis y hemorragia gastrointestinal. Sin embargo, la incidencia de reacciones adversas, es más baja que con el uso de aspirina, indometacina y fenilbutazona; entre otros AINEs (Lewis, 1977; Berkowitz *et al* 1974; Maibach, 1976). No obstante lo anterior, posee la ventaja de ser bien tolerado y seguro, mostrando bajo índice de ulcerogenicidad en ratas (relación ulcerogenicidad/DE<sub>50</sub>) (Wong *et al*, 1973; Berkowitz *et al*, 1974).

En roedores el tolmetín es ~50 veces menos nocivo que los AINEs anteriormente mencionados, en la producción de lesiones gástricas e intestinales (Brogden *et al*, 1978). Adicionalmente, el tolmetín no afecta la función renal y se ha encontrado poca frecuencia de hemorragias gastrointestinales, presentando así, el mejor balance entre





efecto antiinflamatorio/analgésico y reacciones adversas, comparado con aquellos AINEs de uso común (Rainsford, 1985).

### MECANISMO DE ACCIÓN.

Como antiinflamatorio, tiene una eficacia similar a la de aspirina e indometacina, siendo 5 veces más potente que la fenilbutazona en las pruebas de edema inducido por carragenina y caolina en ratas (Carson *et al*, 1971). Ha resultado ser un valioso agente antiinflamatorio en las pruebas de abscesos agudos y subagudos producidos por carragenina y caolina, en la del granuloma inducido por *pellet* de algodón (Wong *et al*, 1973), en la prueba de eritema producido por luz ultravioleta en cobayos (Brogden *et al*, 1978); así como en la prueba de artritis crónica adyuvante, inhibiendo significativamente el desarrollo de poliartritis inducida por *Mycobacterium butyricum* e impidiendo y previniendo los cambios degenerativos osteogénicos en la prueba de artritis adyuvante crónica, antagonizando la infiltración celular inflamatoria, la erosión ósea y la fibrosis tisular (Wong *et al*, 1973).

Además, el tolmetín presenta actividad antipirética en la prueba de levadura (Wong *et al*, 1973) y analgésica en las pruebas de estimulación eléctrica en la pulpa dental en perros, prueba de contorsión abdominal con fenilquinona, ácido acético y acetilcolina en ratas y ratones (Brogden *et al*, 1978; Nakamura y Shimuzu, 1981), en la prueba de Haffner (pellizco en la cola de roedores; Rainsford, 1985) y más recientemente en el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas (Flores-Acevedo *et al*, 1995 y Flores-Murrieta *et al*, 1998).

En 1976, Taylor y Salata demostraron con estudios cinéticos que el tolmetín es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) *in vitro* (modelo de vesícula seminal bovina), actuando de forma reversible y competitiva sobre la ciclooxigenasa. El tolmetín es un inhibidor significativamente más potente que naproxeno, fenoprofeno, ibuprofeno, fenilbutazona y aspirina; y dos veces menos potente que el ácido mefenámico, ácido flufenámico, ketoprofeno y diclofenaco sódico, en este modelo.

### FARMACOCINÉTICA DEL TOLMETIN.

En humanos, el tolmetín se absorbe rápidamente 10-20 min después de una administración oral, con una  $K_a$  de  $4.18 \pm 3.95 \text{ h}^{-1}$ . Se excreta casi completamente por vía renal con una constante de eliminación de  $0.893 \text{ h}^{-1}$ , un  $t_{1/2}$  de 0.83 h; tiene un Vd de  $0.098 \pm 0.036 \text{ L/kg}$  y una unión a proteínas de 99% (Brogden *et al*, 1978).

Aunque presenta un alto grado de unión a proteínas, 60-70% de la dosis administrada se distribuye en los compartimentos extravasculares (Selley *et al*, 1975; Cressman *et al*, 1976). En ratas Wistar, el tolmetín tiene una  $t_{1/2}$  de 0.5-1 h, y una unión a proteínas de 99%, mientras que en ratones macho el  $t_{1/2}$  es de  $1.2 \pm 0.3 \text{ h}$  y en ratones hembra de 1 h (Migdalof *et al*, 1976). Para el tolmetín, se ha reportado que existen diferencias en sus parámetros farmacocinéticos (administración extravascular)



relacionadas con el sexo de los roedores (ratas hembras y machos) usados, siendo el área bajo la curva y el  $t_{1/2}$  los más afectados (Granados-Soto *et al*, 1996).

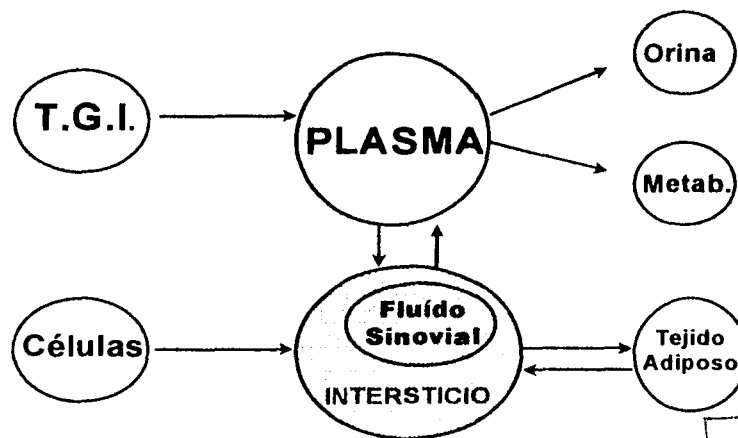
El tolmetín se metaboliza básicamente en el hígado, y el principal metabolito excretado por orina en humanos, monos y ratas (50-70% de la dosis) es el ácido dicarboxílico 5-*p*-carboxibenzoil-1-metil-1H-pirrol-2-acético (Sumner *et al*, 1975; Selley *et al*, 1975), el cual no posee actividad ulcerogénica o antiinflamatoria (modelo de inflamación inducida por carragenina). 10% del tolmetín se elimina por orina como conjugados del tolmetín, 3% como otros metabolitos (glucurónido de tolmetín y tolmetín-OH) y 17% como fármaco inalterado (Sumner *et al*, 1975; Brogden *et al*, 1978). Esencialmente, la cantidad administrada se recupera en orina, luego de 24 h (Rainsford, 1985).

El tolmetín sódico muestra persistente acumulación en el líquido sinovial, tejido conectivo y fluido extracelular (posterior a 8 horas después de administrado). Esta acumulación puede estar estrechamente relacionada con sus efectos antiinflamatorios (Hashimoto *et al*, 1979; Sydney *et al*, 1982). Asimismo, los niveles de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> en el líquido sinovial permanecen significativamente suprimidos en pacientes artríticos hasta por 24 h (Sydney *et al*, 1982).

Del mismo modo, se ha encontrado una marcada acumulación del tolmetín en el tejido inflamado (pata trasera de la rata) en el modelo de inflamación inducida por carragenina, concentración hasta dos veces mayor que en el control y al tiempo del efecto inflamatorio máximo que ésta presenta (3-5 h), esto sugiere que el tolmetín es depurado más lentamente en las ratas tratadas con fármaco, que en las ratas control. La captación y almacenamiento de fármaco en tejido inflamado, tras una administración oral, ha sido descrita para varios antiinflamatorios, como bumadizona, etofenamato y acemetacina (Wood *et al*, 1983).

Estos resultados sugieren que la cinética de los AINEs en plasma o sangre, no es buen indicador para evaluar la actividad biológica del mismo - ver figura 9- (Sydney *et al*, 1983; Rainsford, 1985).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Representación compartimental de la distribución de los AINEs. El fármaco entra al plasma a partir del tracto gastrointestinal (T.G.I.) y llega a la circulación sistémica. Durante la fase inicial, el fármaco difunde a los espacios intersticiales, incluido el fluido sinovial (en el cual, algunos AINEs como tolmetín muestran acumulación continua). Posteriormente, el fármaco difunde del espacio intersticial hacia el plasma.

Otros compartimentos importantes donde las concentraciones de fármaco se equilibran con las del espacio intersticial, son las células del tejido inflamado, donde se asume tiene lugar el efecto del fármaco; así como en el tejido adiposo, donde los fármacos altamente liposolubles, se encuentran en grandes concentraciones, y de donde son liberados continuamente (Tomado de Simkin, P. 1988).

El tolmetín muestra una cinética dosis-dependiente en los rangos terapéuticos probados en diferentes experimentos y especies (Selley *et al*, 1975; Cressman *et al*, 1976; Brogden *et al*, 1978). Basados en farmacocinética lineal, el  $t_{1/2}$  de tolmetín es de ~ 1 h; sin embargo, usando modelos no-lineales, el  $t_{1/2}$  de tolmetín se ve incrementado hasta ~ 5 h, y el Vd cambia de 7 L (0.098 L/kg) en la farmacocinética lineal, a 2.5 L (0.035 L/kg) en un modelo de eliminación no lineal (Brogden *et al*, 1978).

Los parámetros farmacocinéticos de tolmetín no cambian tras administraciones repetidas del fármaco (Selley *et al*, 1975; Furst *et al*, 1983), ni tampoco se encuentran diferencias significativas en el grado de absorción y eliminación, así como en las



concentraciones plasmáticas y sinoviales del tolmetín entre pacientes artríticos y voluntarios sanos en diferentes estudios clínicos (Selley *et al*, 1975; Furst *et al*, 1983).

No obstante, esta última acepción debe ser cuidadosamente interpretada, considerando que la artritis es una enfermedad sistémica que puede afectar las funciones hepática y renal, y producir alteración de las concentraciones plasmáticas de albúmina en los pacientes artríticos; así como las diferencias encontradas en el área bajo la curva entre los grupos que recibieron el tratamiento. Del mismo modo se debe considerar la relación indirecta que guarda el  $t_{1/2}$  corto del tolmetín, con su efectividad clínica prolongada (Brogden *et al*, 1978; Rainsford, 1985).

Aunque la relación existente entre los niveles plasmáticos del tolmetín y los encontrados en líquido sinovial, sea indirecta (Sydney *et al*, 1982), sí existe concordancia entre la concentración de tolmetín en exudados peritoneales (Nakamura & Hashimoto, 1981) y sangre total (Flores-Acevedo, 1995) con las encontradas en plasma (Wood *et al*, 1983).

El tolmetín potencia sus efectos antiinflamatorios, analgésicos e inhibitorios de la degeneración ósea, cuando se coadministra con acetaminofén o corticosteroides como prednisona (estos últimos a dosis estables fijas: Brogden *et al*, 1978; Wong y Gardocki, 1983), y se observan cambios en los parámetros farmacocinéticos del tolmetín (área bajo la curva, el Vd se incrementa hasta un 40%, aclaramiento y desplazamiento de albúmina - incremento de la fracción libre de tolmetín), cuando éste se administra concomitantemente con aspirina (Cressman *et al*, 1976). Por otro lado, la farmacocinética del tolmetín no se ve afectada con el uso concomitante de antiácidos que contienen hidróxidos de aluminio y magnesio (Brogden *et al*, 1978) ni con el hipoglicemiante oral glibenclamida (Wong y Gardocki, 1983). Además, en un estudio *in vitro* en cerebro de ratas, se observó la potenciación en la acción de cuatro quinolonas: norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacina y ácido pipemídico (Squires y Saederup, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## ***OBJETIVOS***





## OBJETIVOS

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

**OBJETIVO GENERAL.** Caracterizar la farmacocinética del tolmetín, así como su efecto antiinflamatorio en un modelo experimental en ratas.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Realizar curvas dosis-respuesta del tolmetín a las siguientes dosis: 1.0, 3.2, 10, 32, 56 y 100 mg/kg, empleando el modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas.
2. Validar un método analítico (cromatografía de líquidos de alta resolución) para la cuantificación del tolmetín en muestras sanguíneas.
3. Caracterizar los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos del tolmetín. Determinar los parámetros farmacocinéticos básicos, así como evaluar las diferencias entre los diferentes grupos tratados y el grupo control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



***MATERIALES***  
***Y***  
***MÉTODOS***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### A.- REACTIVOS.

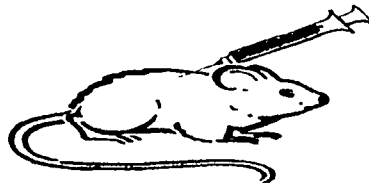
El tolmetín sódico dihidratado fue comprado a Sigma Chem. Co. (lote 107H1247). La trometamina de ketorolac (estándar interno) fue donada por Laboratorios Syntex (lote 9800002579). Se utilizó acetonitrilo grado cromatográfico (EM Sci; lote Ax0142-1) y el agua grado cromatográfico se obtuvo a través de un sistema Milli Q (Continental Waters Systems; El Paso, TX, EUA). La carragenina, fracción lambda (forma no gelatinizante) tipo IV se compró a Sigma Chem. Co. (lote 118H0665). Todos los demás reactivos fueron grado analítico.

### B.- EQUIPOS.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, equipado con una bomba Waters modelo 510, columna Novapak C18, 150 x 3.9 mm, 4  $\mu$ m de tamaño de partícula y detector de longitud de onda variable modelo 486.

Pletismógrafo constituido por cápsula de mercurio, transductor y polígrafo Grass modelo 7D (Quincy; Mass, EUA). Balanza analítica Ohaus AP110S, potenciómetro Beckman  $\Phi$  32 *pHmeter*, balanza semianalítica Sartorius PT1200. Centrífuga IEC (International Centrifuge, Boston, MA, EUA), pipetas volumétricas repetitivas (capacidad de volumen varios) Eppendorf y pipeta Finnpipette Digital B98924 (40-200  $\mu$ L).

C.- DISEÑO EXPERIMENTAL. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (ILAR, 1997) y de las recomendaciones del *forum* de 1997, "Beneficios y manejo ético de los animales de experimentación" (Rowan, 1997). Se emplearon ratas macho cepa Wistar entre 180-220 g de peso (provenientes del bioterio de la Sección de Terapéutica Experimental CINVESTAV- Tepepan), divididas en los siguientes grupos (n = 6):



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1. *Grupo control*: al cual se le administró p.o. el vehículo del fármaco (metilcelulosa al 0.5%) y recibió una administración subcutánea de carragenina (1%) en el cojinete plantar de la pata derecha.







2. *Efecto antiinflamatorio del Tolmetín:* 6 grupos que recibieron tolmetín (vía oral) en dosis de 1.0, 3.2, 10, 32, 56 y 100 mg/kg + carragenina al 0.1% (en el cojinete plantar de la pata trasera, vía subcutánea), mismos que se utilizaron para determinar el efecto antiinflamatorio del tolmetín.
3. *FC del Tolmetín:* 5 grupos que recibieron tolmetín (vía oral) en dosis de 3.2, 10, 32, 56 y 100 mg/kg. Estos animales fueron canulados en la arteria caudal de la cola para la obtención de muestras sanguíneas (100 µL) durante un periodo de 6 h.
4. *Efecto de la carragenina sobre la FC del Tolmetín:* 5 grupos tratados de manera semejante al punto anterior pero que recibieron simultáneamente con el fármaco, una administración subcutánea de carragenina (1%).

#### D.- PREPARACIÓN DE TOLMETÍN PARA ADMINISTRACIÓN ORAL.

Se pesó una cantidad de tolmetín sódico y se disolvió en una solución previamente preparada de metilcelulosa al 0.5%, de tal forma que al administrar oralmente a razón de 4 mL/kg de ésta, quedara una concentración final de 1, 3.2, 10, 32, 56 y 100 mg/kg.

Por ejemplo, para la dosis de 10 mg tolmetín/kg de peso y considerando que por vía oral se administra una relación de 4 mL/ kg de peso:

$$\begin{array}{l} \frac{10 \text{ mg/kg}}{4 \text{ mL/kg}} = 2.5 \text{ mg/mL} \\ \text{Si } 4 \text{ mL} \rightarrow 1000 \text{ g} \\ \text{x} \rightarrow 1500 \text{ g } (\pm \text{ promedio } 6 \text{ ratas}) \\ \text{x} = 6 \text{ mL} \end{array}$$

Por lo tanto 2.5 mg  $\rightarrow$  1 mL; para 6 mL, se pesaron 15 mg de tolmetín sódico + 6 mL de metilcelulosa al 0.5%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**E.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y FASE MÓVIL PARA EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.**

**Solución patrón y curva de calibración de tolmetín.** Se pesaron 10 mg de tolmetín y se aforaron a 10 mL con fase móvil, para obtener una solución con una concentración de 1 mg/mL. A esta solución se le denomina **solución A** y por diluciones secuenciales de esta solución, en fase móvil; se construyeron las soluciones requeridas para la curva de calibración y para los controles de calidad, de la siguiente manera:

SOLUCIÓN A	AFORO	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
3 mL	20 mL	150
1 mL	10 mL	100 (Soln B)
0.75 mL	10 mL	75
0.5 mL	10 mL	50
0.25 mL	10 mL	25

De la solución **B** (100 µg/mL) se tomaron:

SOLUCIÓN B	AFORO	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
1 mL	10 mL	10
0.5 mL	10 mL	5 (Soln C)
0.25 mL	10 mL	2.5 (Soln D)

De la solución **C** (5 µg/mL) se tomaron:

SOLUCIÓN C	AFORO	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
3 mL	10 mL	1.5
2.5 mL	10 mL	1.25 (Soln E)

De la solución **D** (2.5 µg/mL) se tomaron:

SOLUCIÓN D	AFORO	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
1 mL	10 mL	0.25

Finalmente de la solución **E** (1.25 µg/mL) se tomaron:

SOLUCIÓN E	AFORO	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
1 mL	10 mL	0.125



Como el tolmetín comercial se encuentra en forma de sal dihidratada, se realizó la corrección por el peso molecular, de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ g de tolmetín sódico dihidratado} \text{ ----} 315.30 \\ \times \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{----} 257.29 \text{ (P.M. tolmetín base seca)} \\ \hline \end{array}$$

$$x = 0.815$$

$$\frac{1 \text{ g tolmetín sódico dihidratado}}{0.815 \text{ g tolmetín}} = 1.2254 \text{ factor de corrección.}$$

**Solución del estándar interno.** Para la solución del estándar interno (trometamina de ketotorolac) se prepararon 10 mL de una solución inicial con una concentración de 1 mg/mL, y por dilución de 1:10 mL en fase móvil, se obtiene la solución final con una concentración de 100 µg/mL.

**Fase móvil.** La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo/solución acuosa de ácido fosfórico (1 mM, pH 3.0) en una proporción 38:62. La solución acuosa de ácido fosfórico 1 mM, se preparó colocando 67 µL de ácido orto-fosfórico al 85% (P.M. 98, δ rel. 1.71) en un matraz volumétrico de 1000 mL, llevando a volumen con agua HPLC. El ajuste del pH a 3.0 de esta solución, se llevó a cabo con unas cuantas gotas de NaOH 1 M.

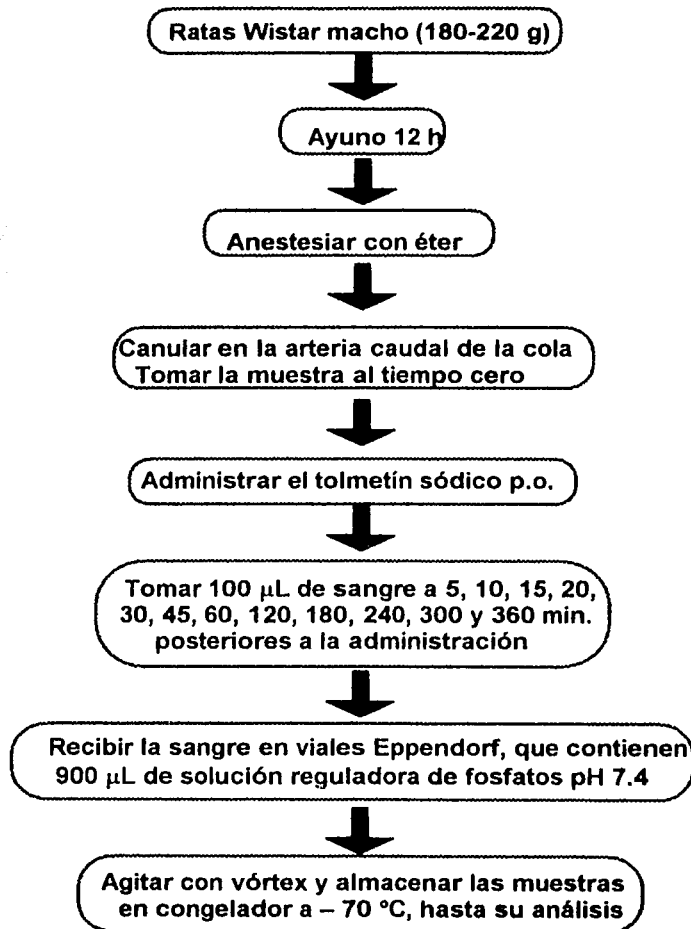
A 620 mL de esta solución acuosa de ácido fosfórico se le adicionaron 380 mL de acetonitrilo y a la mezcla resultante se le filtró a vacío a través de un filtro Millipore de 0.45 µm. Posteriormente se desgasificó la fase móvil con 15 minutos de ultrasonificación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





F.- ESTUDIO FARMACOCINÉTICO.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**G.- EXTRACCIÓN DEL TOLMETÍN EN MUESTRAS SANGUÍNEAS (Flores-Acevedo, 1995).**

100  $\mu$ L de sangre se mezclaron en vórtex con 900  $\mu$ L de una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.4. A cada tubo conteniendo la mezcla sangre-amortiguador de fosfatos se le adicionaron 100  $\mu$ L de una solución de 100  $\mu$ g/mL de trometamina de ketorolac (estándar interno), 200  $\mu$ L de acetato de sodio 0.5 M, pH 4.0 y 8 mL de éter etílico. Esta mezcla se agitó nuevamente en vórtex durante 1 minuto, luego de lo cual, se centrifugó durante 10 minutos a 4,000 rpm. Posteriormente se transfiere el sobrenadante a otro tubo, en el cual se evapora la fase orgánica hasta sequedad (bajo ligera corriente de nitrógeno) en baño de agua a 50 °C. Finalmente se reconstituyó el residuo final con 200  $\mu$ L de fase móvil, inyectando 100  $\mu$ L de muestra al sistema cromatográfico.

**H.- CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE TOLMETÍN (Flores-Murrieta *et al*, 1995).**

Se utilizó un sistema cromatográfico integrado por los siguientes componentes: cromatógrafo fabricado por Waters (Waters Assoc. Milford, MA, EUA), con bomba modelo 510, inyector U6K, columna Novapak C<sub>18</sub> de 150 x 3.9 mm de 4  $\mu$ m de tamaño de partícula, conectada a un detector con longitud de onda variable modelo 486 y un integrador modelo 4270 (Varian, Palo Alto, CA, EUA). La columna estuvo eluida por una mezcla de acetonitrilo/solución acuosa de ácido fosfórico (1 mM, pH 3.0) en una proporción 38:62 (v/v). El flujo se mantuvo a una velocidad constante de 1 mL/min y la detección se llevó a cabo por absorbancia a una  $\lambda$  de 313 nm. La sensibilidad fue de 0.1 AUFS (unidades de absorbancia de escala total), con una atenuación variable dependiendo de la cantidad de tolmetín esperada. Todos los ensayos se efectuaron a temperatura ambiente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





## I.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

1. **Selectividad:** Se demuestra por la no interferencia de los compuestos endógenos de la matriz biológica (en este caso sangre), productos de degradación y/o metabolitos del tolmetín con los tiempos de retención del mismo, así como del ketorolac (estándar interno). Para llevarlo a cabo se trabajaron en forma independiente y por sextuplicado, muestras blanco y muestras adicionadas con fármaco y estándar interno.

2. **Linealidad:** La linealidad del método se determinó preparando tres curvas de calibración independientes (con pesadas diferentes); preparadas en sangre de rata libres de fármaco, a la cual se le adicionaron concentraciones conocidas de tolmetín sódico en forma creciente en un rango de 0 a 150  $\mu\text{g/mL}$  y una concentración fija de estándar interno (trometamina de ketorolac) de 10  $\mu\text{g}$ ; aplicando después el procedimiento de extracción descrito anteriormente en el *inciso H*.

Las curvas se prepararon por triplicado en un mismo día (validación). La cuantificación se realizó por el método del estándar interno, en el cual se determinó la relación de alturas entre el tolmetín y el ketorolac (estándar interno), y se graficó esta relación vs la concentración del tolmetín en el intervalo mencionado anteriormente. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente ( $m$ ) y la ordenada al origen ( $b$ ).

Una vez demostrada la selectividad del método y simultáneamente a la construcción de las curvas de calibración, se prepararon los **controles de calidad**, que deben cubrir al menos tres concentraciones (en dos réplicas cada una), que representen el intervalo de trabajo. Estos controles de calidad se inyectaron a lo largo de la jornada y deben cubrir los criterios de precisión y exactitud establecidos ( $\pm 15\%$  C.V.).

3. **Repetibilidad y Reproducibilidad:** La repetibilidad se evaluó en un mismo día de trabajo, preparando 3 curvas de calibración en sangre de rata, determinando el promedio, la desviación estándar y el % de coeficiente de variación. La reproducibilidad se determinó construyendo tres curvas de calibración en sangre en tres días consecutivos y obteniendo el coeficiente de variación.

Además de lo anteriormente señalado, se evaluó la precisión y exactitud de los controles de calidad con seis determinaciones por punto de control de calidad en un mismo día (repetibilidad) y cada control de calidad por duplicado, en tres días consecutivos (reproducibilidad), como señalan Bressolle *et al* (1996).





4. **Exactitud:** La exactitud se calculó como el % de desviación del valor promedio de las determinaciones para cada nivel de concentración evaluados en el punto de repetibilidad y reproducibilidad:

$$\% \text{ de desviación} = \frac{[\text{valor nominal} - \text{valor verdadero}] * 100}{\text{valor nominal}}$$

5. **Límite de detección y límite de cuantificación:** El límite de detección se evaluó haciendo diluciones del último punto de la curva hasta que la señal detectable fuera tres veces la señal de ruido.

El límite de cuantificación se establece como la concentración mínima que es cuantificada con exactitud y precisión aceptables, bajo condiciones normales de operación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**J.- MODELO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR CARRAGENINA EN RATAS (Winter *et al*, 1962; modificado por Castañeda-Hernández *et al*, 1995).**

Las ratas se mantuvieron en ayuno (con libre acceso al agua) 12 horas antes de realizar el estudio. Durante el experimento, no se les proporcionó agua ni alimento. Los animales se pesaron y marcaron con tinta indeleble en el "codo" de la pata trasera derecha de la rata; esta marca sirve de referencia (tope) para introducir la pata al mercurio y para garantizar la reproducibilidad entre las mediciones (ver figura 9). En cada sesión, se calibró el poligrafo antes de comenzar el experimento, seguido de la toma de basales o volumen de la extremidad al tiempo cero.

Por vía oral se administró la metilcelulosa al 0.5% o el tolmetín sódico suspendido en metilcelulosa al 0.5%. Simultáneamente a esta administración, se aplicó por vía subcutánea 0.1 mL de una suspensión de carragenina al 1% en el cojinete plantar de la pata trasera derecha de la rata (jeringa plastipack 1 mL, aguja # 25, 22 x 4 mm largo). Finalmente, se procedió a medir el volumen del miembro dañado a los tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas posteriores a la lesión por carragenina.

Cuando se midió el efecto simultáneamente a la cinética, se siguió el procedimiento descrito posteriormente en el método para obtención de muestras sanguíneas.

La evaluación de la inflamación y del efecto antiinflamatorio, expresados como el % de incremento del volumen en el miembro lesionado y la protección (**P**) contra la inflamación inducida por carragenina, respectivamente; se determinaron con la siguiente ecuación:

$$P = | 1 - (VI_T / VI_C) | * 100 \quad \text{donde:}$$

**VI<sub>C</sub>** corresponde al incremento de volumen en el miembro lesionado, en las ratas control al tiempo *t* (es decir a los diferentes tiempos en que se midió el efecto) y

**VI<sub>T</sub>** es el aumento de volumen en el miembro lesionado, en las ratas tratadas con tolmetín al tiempo *t*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





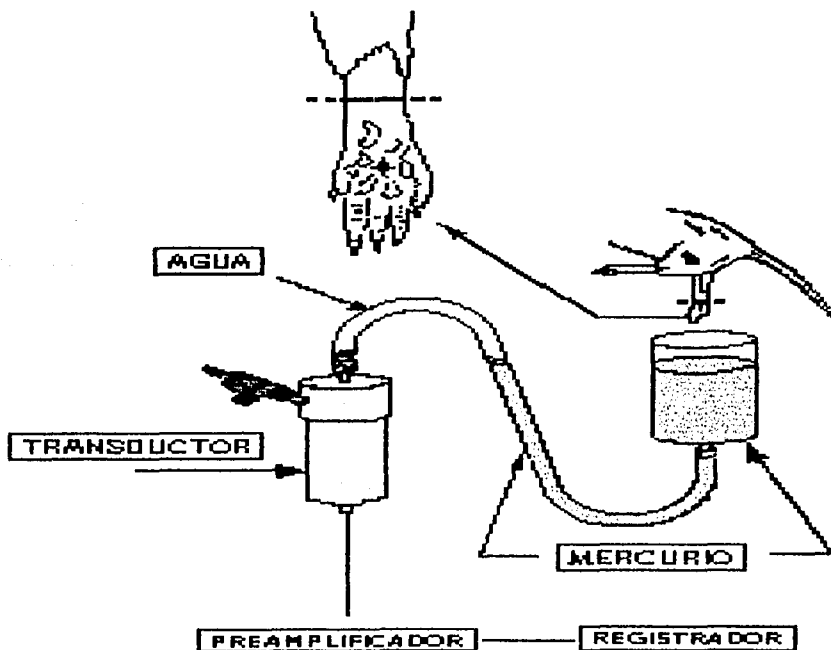


Figura 10. Modelo de inflamación aguda, inducida por 0.1 mL de carragenina al 1% en el cojinete plantar de la pata trasera de la rata.

**K.- ANÁLISIS DE DATOS .** Para estimar los parámetros farmacocinéticos básicos de concentración máxima ( $C_{max}$ ), tiempo para alcanzar ésta concentración ( $T_{max}$ ), el área bajo la curva (ABC) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) se empleó el paquete Winnonlin profesional, versión 1.5 (SCI Software, Lexington, KY).

Para probar las diferencias entre los parámetros farmacocinéticos antes mencionados, se utilizó una prueba "t" de Student para datos no pareados, con el paquete Sigma Stat Statistical Software, versión 2.03 (SPSS, Inc).

**L.- LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS.** Laboratorio de Farmacocinética de la Sección de Terapéutica Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Tepepan.





# ***RESULTADOS***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## RESULTADOS

### I. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

- a) **Selectividad.** En la figura 11 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos tras la inyección de extractos sanguíneos al sistema cromatográfico de: **A)** sangre libre de fármaco; **B)** sangre adicionada con 10  $\mu\text{g}$  de estándar interno: ketorolac (1) y 2.5  $\mu\text{g}$  de tolmetín (2); y **C)** sangre obtenida de una rata a las 5 horas posteriores a la administración oral de una dosis de 10 mg/kg. Los tiempos de retención para el estándar interno (ketorolac) y el tolmetín fueron de 2.8 y 4.2 min, respectivamente. Se puede observar que no aparecen picos de sustancias endógenas que puedan interferir en la determinación.

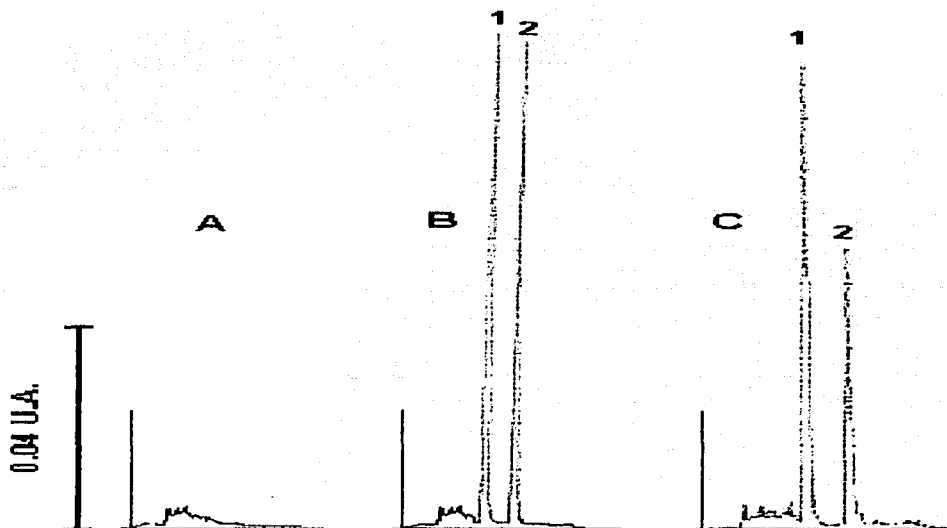


Figura 11. Cromatogramas típicos obtenidos tras la inyección de extractos sanguíneos de rata al sistema cromatográfico de: A) sangre libre de fármacos B) sangre adicionada con 10  $\mu\text{g}$  de estándar interno: ketorolac (1) y 2.5  $\mu\text{g}$  de tolmetín y C) sangre obtenida de una rata a las 5 horas posteriores a una administración oral de 10 mg/kg de tolmetín.



b) **Linealidad.** En la figura 12 se muestra la curva de calibración para el método analítico del tolmetín, y en el inserto de la misma, se observan los parámetros obtenidos para la linealidad del método; encontrándose una buena correlación. La ecuación de la recta promedio fue:  $y = 0.013 + 0.123x$  con un coeficiente de correlación de 0.9999.

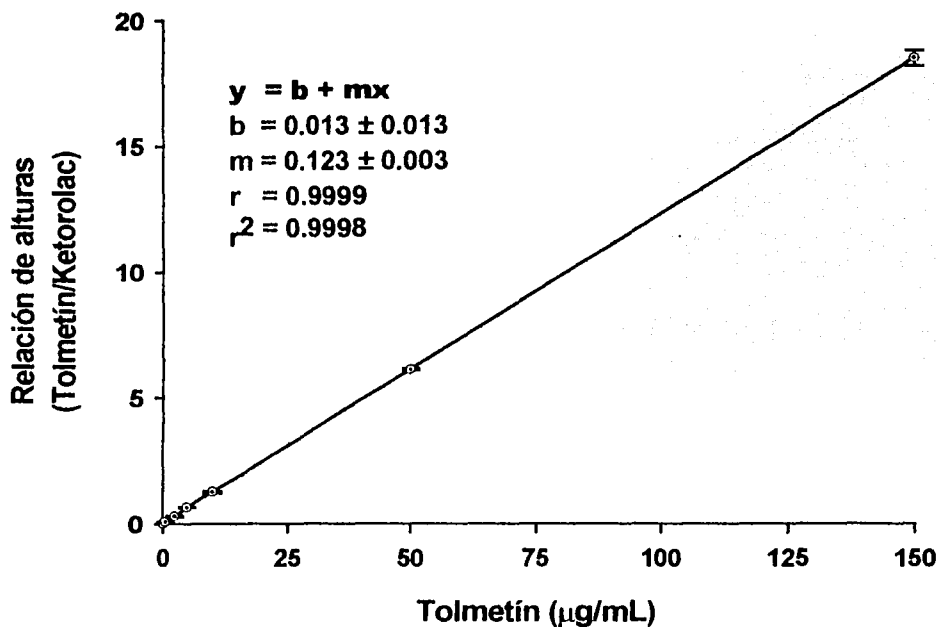


Figura 12. Curva de calibración del método analítico de tolmetín. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos seis determinaciones por cada nivel de concentración en tres réplicas.

c) **Precisión y exactitud.** En las tablas 4 a 7, se muestran los resultados de repetibilidad y reproducibilidad al analizar tres réplicas de cada concentración de la curva de calibración en el mismo día (repetibilidad) y para los controles de calidad en tres días diferentes con dos réplicas para cada concentración (reproducibilidad). Todos los coeficientes de variación, fueron menores al 20% y cumplen con los criterios establecidos para ambos parámetros.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**Tabla 4.** Datos para linealidad y repetibilidad del método de tolmetín. Relación de alturas (tolmetín/ketorolac) para la curva de calibración del método.

( $\mu\text{g/mL}$ )	Rel. Alt. CURVA 1	Rel. Alt. CURVA 2	Rel. Alt. CURVA 3	Promedio	D.E.	% C.V.
0.5	0.070	0.070	0.090	0.077	0.012	15.06
2.5	0.270	0.300	0.350	0.307	0.040	13.18
5	0.640	0.650	0.660	0.650	0.010	1.54
10	1.240	1.210	1.350	1.267	0.074	5.82
50	6.140	6.060	6.180	6.127	0.061	0.10
150	18.000	18.330	19.060	18.463	0.542	2.94

$$b = 0.013$$

$$m = 0.123$$

$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9998$$

**Tabla 5.** Datos para repetibilidad y reproducibilidad del método de tolmetín. Concentraciones observadas para los puntos de control de calidad.

#### Repetibilidad

PC11	1.11	PC21	8.22	PC31	99.67
PC12	1.08	PC22	8.59	PC32	110.08
PC13	1.07	PC23	8.22	PC33	100.13
PC14	1.10	PC24	8.22	PC34	94.19
PC15	1.11	PC25	8.93	PC35	107.90
PC16	1.07	PC26	7.84	PC36	101.50
Promedio	1.09		8.34		102.39
D.E.	0.02		0.38		6.50
% C.V.	1.86		4.52		6.35

#### Reproducibilidad

	DIA 1		DIA 2		DIA 3		% C.V.
PC11	1.11	1.39	1.10	0.98	0.96	1.14	13.85
PC12	1.08	1.43	1.10	1.00	0.97	0.97	15.96
PC21	8.22	8.26	8.14	6.83	7.92	8.24	7.02
PC22	8.59	9.10	8.40	7.60	7.64	7.98	7.13
PC31	99.67	92.27	85.72	96.02	99.66	97.57	5.65
PC32	110.08	97.51	105.21	93.02	107.38	100.45	6.30

PC: Son los puntos de control de calidad, donde PC1 tiene una concentración nominal de  $1 \mu\text{g/mL}$ , PC2 de  $8 \mu\text{g/mL}$  y PC3 de  $100 \mu\text{g/mL}$ . El segundo dígito de cada combinación corresponde al número de réplica analizada.

TRIS CON  
FALLA EN ORIGEN



Tabla 6. Variabilidad intra e interdía, obtenidos para la curva de calibración (seis niveles de concentración con tres réplicas por nivel) en muestras sanguíneas adicionadas con tolmetín.

Concentración Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Observada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intradía (% C.V.)	% Desviación concentración real	Exactitud
0.5	0.58	7.87	15.37	115.37
2.5	2.46	5.86	-1.53	98.47
5	5.27	6.55	5.39	105.39
10	10.32	10.14	3.21	103.21
50	48.90	6.33	-2.21	97.79
150	150.34	9.68	0.22	100.22

Concentración Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Observada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Interdía (% C.V.)	% Desviación concentración real	Exactitud
0.5	0.48	16.52	-3.70	96.30
2.5	2.45	14.51	-1.92	98.08
5	5.05	5.73	1.09	101.09
10	10.13	5.75	1.33	101.33
50	50.13	5.88	0.26	100.26
150	149.95	5.21	-0.04	99.96

Tabla 7. Variabilidad intra e interdía, obtenidos para los puntos de control de calidad (tres niveles de concentración con seis y dos réplicas por nivel, respectivamente), en muestras sanguíneas adicionadas con tolmetín.

Concentración Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Observada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intradía (% C.V.)	% Desviación concentración real	Exactitud
1	1.09	1.86	9.07	109.07
8	8.34	4.52	4.20	104.20
100	102.39	6.35	2.39	102.39

Concentración Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Observada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Interdía (% C.V.)	% Desviación concentración real	Exactitud
1	1.14	15.72	1.96	101.96
8	8.01	7.43	0.30	99.34
100	97.48	6.48	-1.21	97.48

d) **Límite de cuantificación.** El límite de cuantificación fue de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN EL MODELO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR CARRAGENINA.

Para evaluar el efecto antiinflamatorio del tolmetín en el modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas, se probaron las dosis de 1.0, 3.2, 10, 32, 56 y 100 mg/kg, obteniéndose el curso temporal del efecto antiinflamatorio de cada una de las dosis probadas y los siguientes resultados:

En la figura 13 (panel A) se describe el curso temporal del volumen desplazado para los grupos tratados con diferentes dosis de tolmetín, así como para el grupo control. Como puede observarse, el incremento máximo de volumen se obtuvo a las 3 horas en el grupo control y es aproximadamente 60% de aumento con respecto a la medición basal al tiempo cero (el incremento fue de 29.29 a 47.88 mm de Hg). Para las ratas tratadas con tolmetín, este desplazamiento de volumen tiende a sufrir incrementos moderados o a permanecer constante con respecto a la medición basal a medida que aumenta la dosis (ver tabla 8).

Así, cuando se transformaron los datos de desplazamiento de volumen a % de protección (Figura 13, panel B), se observó que a medida que se incrementó la dosis, aumentó el efecto antiinflamatorio, así como la duración del mismo. Se alcanzó la protección máxima con las dosis de 32 y 56 mg/kg, misma que ya no cambió significativamente al aumentar la dosis a 100 mg/kg. Interesantemente esta protección no fue significativamente diferente al valor teórico máximo (100%).

La relación anteriormente mencionada, así como el tiempo de máxima inflamación en el mismo modelo, son consistentes con lo obtenido por Ucelay *et al* (1988); cuando evaluaron el efecto antiinflamatorio de tolmetín y la potenciación del mismo con acetaminofén. El tiempo necesario para alcanzar la máxima protección en la mayoría las dosis probadas fue de 3 horas.

No obstante, este efecto antiinflamatorio presentó una tendencia a desaparecer transcurridas las tres horas, hasta casi alcanzar los valores del control para las dosis de 1, 3.2 y 10 mg/kg (ver figura 9) y disminuye gradualmente (formando una meseta) para las dosis de 32 y 56 mg/kg.

Cuando se graficó el área bajo la curva del efecto (expresado como % P • h) en función del logaritmo de la dosis se pudo apreciar la formación de la sigmoideal clásica de una curva dosis-respuesta (Figura 14).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

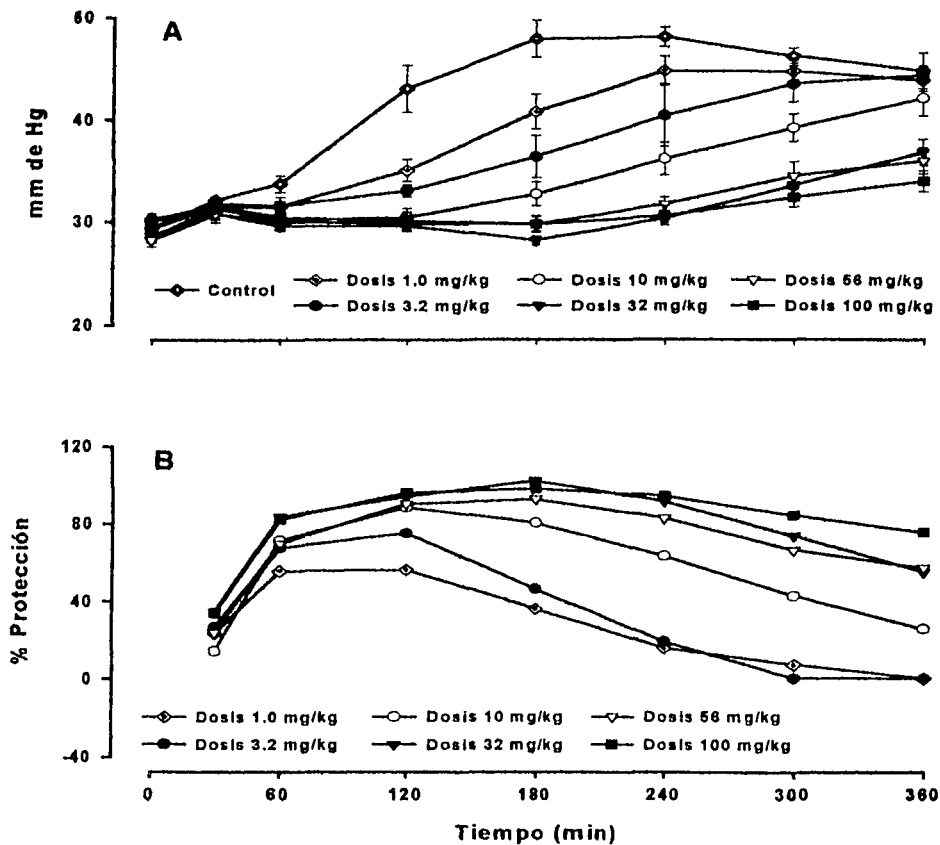


Figura 13. Curva dosis respuesta de tolmetín. En el panel A se muestran los incrementos en el volumen de mercurio, para las diferentes dosis de tolmetín probadas, así como para el grupo control.

En el panel B, se observan estos datos transformados a % de Protección y los respectivos cursos temporales del efecto antiinflamatorio para cada dosis. Cada punto representa el promedio de 12 determinaciones.

Por razones de claridad y debido a que es la misma escala de tiempo en el eje de x, los valores de tiempo se colocan en la parte inferior del panel B.

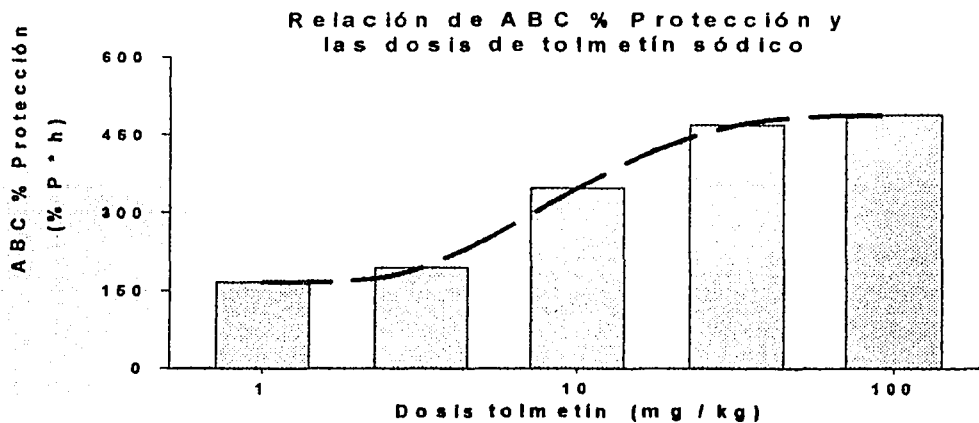




**Tabla 8.** Parámetros farmacodinámicos (efecto antiinflamatorio) del tolmetín sódico administrado p.o. en ratas. Los datos representan el promedio de al menos 12 determinaciones.

Dosis (mg / kg)	mm Hg basales	mm Hg (a la 6 <sup>a</sup> h)	% Protección a la 3 <sup>a</sup> h	ABC % Protección (%h)	% P a la 6 <sup>a</sup> h
1.0	30.25	43.67 (44.4%)	35.89	166.49	0.00
3.2	29.96	44.17 (47.4%)	50.63	194.17	0.00
10	28.42	41.92 (47.5%)	80.22	347.09	25.55
32	28.58	36.67 (28.3%)	102.03	468.44	54.95
56	28.17	35.83 (27.3%)	92.45	423.81	56.89
100	29.25	33.83 (15.6%)	97.98	488.12	75.26

P es la protección a la inflamación, ABC es el área bajo la curva del efecto antiinflamatorio (expresado como % protección\* h) y en la tercera columna se muestran entre paréntesis, los % de incremento en el volumen (relación del máximo desplazamiento alcanzado con respecto a sus mediciones basales a tiempo cero) para las diferentes dosis de tolmetín. El grupo control tiene una basal de 29.29 mm de Hg y sufre un incremento tope de 63.47% (47.88 mm de Hg).



**Figura 14.** Curva dosis-respuesta de tolmetín, considerando la relación de áreas bajo la curva del efecto antiinflamatorio.

Donde: P es la protección a la inflamación, ABC es el área bajo la curva del efecto antiinflamatorio (expresado como % protección\* h).



### 3. EVALUACIÓN DE LOS CURSOS TEMPORALES DE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS Y ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

Como puede observarse en la figuras 15 y 16, el tolmetín presenta una absorción rápida, alcanzándose las concentraciones sanguíneas máximas ~15 minutos posteriores a la administración del fármaco, luego de lo cual tiende a desaparecer con una constante de eliminación de  $\sim 0.01415$  minutos<sup>-1</sup>.

En lo que respecta a la influencia de la carragenina en la cinética del tolmetín (Figura 15 y tabla 9), ésta se ve influenciada por la co-administración de carragenina; mostrando diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) para la dosis de 10 mg/kg ( $p \leq 0.05$ ), así como el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima ( $T_{max}$ ) en las dosis de 56 y 100 mg/kg ( $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente).

Los demás parámetros farmacocinéticos no muestran diferencias significativas entre los grupos tratados con tolmetín y aquellos tratados con tolmetín + carragenina, ajustados de manera modelo-independiente y modelo-dependiente (tabla 9).

**Tabla 9.** Parámetros farmacocinéticos de tolmetín administrado *p.o.* en ratas, por ajuste modelo-independiente.

	TRATAMIENTO	DOSIS (mg / kg)				
		3.2	10	32	56	100
<b>T<sub>max</sub></b> (h)	TLM	0.19 ± 0.07	0.22 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.44 ± 0.13	0.28 ± 0.05
	TLM + CARRAG	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.28 ± 0.15	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02
<b>C<sub>max</sub></b> (µg/mL)	TLM	6.16 ± 1.48	21.89 ± 5.90	35.65 ± 8.85	74.96 ± 20.5	165.92 ± 42.1
	TLM + CARRAG	5.86 ± 0.85	19.19 ± 5.51	31.01 ± 7.80	124.74 ± 20.5	166.29 ± 37.1
<b>λ<sub>z</sub></b> (min <sup>-1</sup> )	TLM	0.015 ± .004	0.033 ± .006	0.012 ± .002	0.017 ± .004	0.016 ± .002
	TLM + CARRAG	0.018 ± .004	0.027 ± .009	0.011 ± .001	0.015 ± .002	0.017 ± .002
<b>t<sub>1/2</sub></b> (h)	TLM	0.77 ± 0.18	0.35 ± 0.08	0.96 ± 0.23	0.68 ± 2.23	0.72 ± 0.08
	TLM + CARRAG	0.64 ± 0.13	0.43 ± 0.18	1.05 ± 0.12	0.77 ± 0.15	0.68 ± 0.10
<b>ABC</b> (µg/mL·h)	TLM	6.16 ± 1.26	14.59 ± 3.16	49.39 ± 10.8	108.43 ± 15.2	202.42 ± 47.0
	TLM + CARRAG	6.92 ± 1.60	16.88 ± 1.10	52.25 ± 11.0	147.76 ± 12.5	177.94 ± 28.3

Donde  $T_{max}$  es el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima ( $C_{max}$ ),  $t_{1/2}$  es el tiempo de vida media,  $\lambda_z$  es la constante de eliminación y  $ABC$  es el área bajo la curva del curso temporal de las concentraciones sanguíneas de tolmetín.

En la columna de los tratamientos, TLM se refiere a los grupos tratados solamente con tolmetín y TLM + CARRAG a aquellos tratados con tolmetín y carragenina.





### Influencia de la carragenina en la farmacocinética de tolmetín

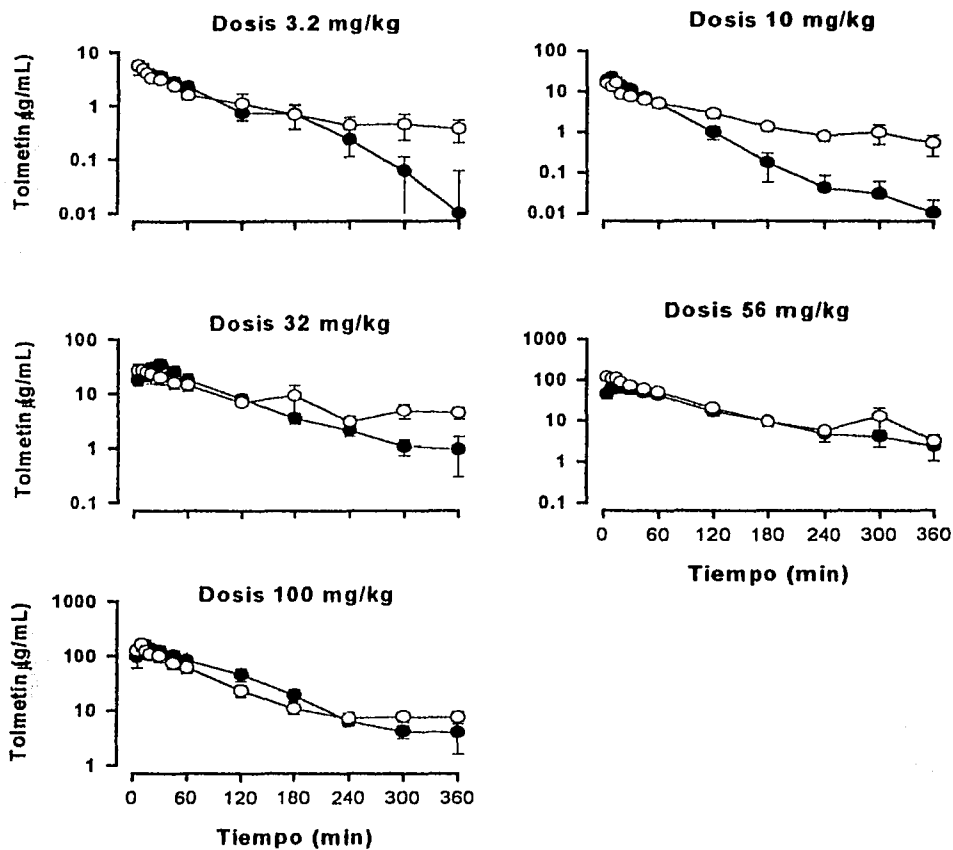


Figura 15. Influencia de la carragenina en la farmacocinética del tolmetín. Cursos temporales del tolmetín solo ● y tolmetín *plus* carragenina ○. Cada punto representa el promedio ± el error estándar de al menos 8 determinaciones.

Por razones de claridad, la escala de tiempo se coloca al final de cada columna.



De los resultados anteriores puede distinguirse cómo a medida que se incrementa la dosis, aumenta de manera proporcional el área bajo la curva de las concentraciones sanguíneas; como se puede apreciar en la figura 16-panel B.

Considerando que no se encontró una influencia significativa de la carragenina sobre la farmacocinética del tolmetín, se procedió a agrupar los datos de ambos tratamientos por cada dosis probada, y se estimaron los parámetros farmacocinéticos por ajuste simultáneo de todas las dosis. El modelo que mejor describió las observaciones experimentales fue un modelo abierto de dos compartimentos con administración extravascular. De este modo, se generó un solo juego de parámetros farmacocinéticos para todas las dosis probadas, del cual se obtienen la tabla 10 y la figura 16-panel A.

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos de tolmetín administrado *p.o.* en ratas, por ajuste simultáneo para las cinco dosis probadas.

DOSIS (mg / kg)	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC (µg/mL*h)
3.2	0.08	5.9	8.47
10	0.17	17.21	26.48
32	0.5	29.01	84.73
56	0.33	85.70	148.27
100	0.25	150.06	264.78

k 10 (min <sup>-1</sup> )	0.014 ± 0.0038
t ½ (h)	0.825 ± 0.0033
voumen / F (litros)	0.456 ± 0.0131
k 01 (min <sup>-1</sup> )	0.291 ± 0.0346
k 12 (min <sup>-1</sup> )	0.0015 ± 0.0029
k 21 (min <sup>-1</sup> )	0.0042 ± 0.0188

En todas las dosis hubo una buena correlación entre los valores observados y los predichos, con coeficientes de correlación superiores a 0.90.

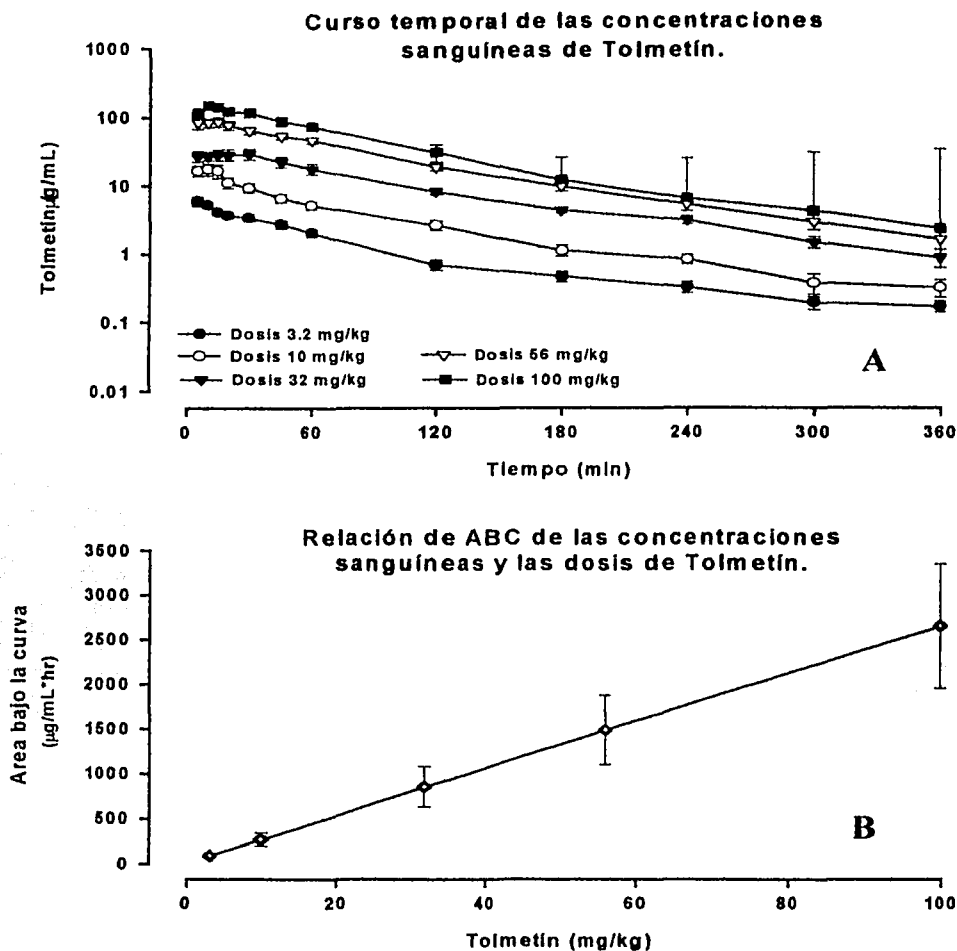


Figura 16. En el **panel A** se muestran los cursos temporales de las concentraciones sanguíneas de las diferentes dosis probadas de tolmetín, tras un ajuste simultáneo a un modelo abierto de dos compartimentos, administración extravascular. En el **panel B** se muestra la proporcionalidad en el área bajo la curva (ABC) de los perfiles farmacocinéticos, que guardan entre sí las dosis, en ajuste simultáneo de las cinco dosis probadas.



#### 4. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DEL TOLMETÍN Y SU EFECTO ANTIINFLAMATORIO

Cuando se relacionaron los datos de los cursos temporales de la concentración sanguínea del tolmetín y los del efecto antiinflamatorio (%P), fue evidente que existe un evidente retraso entre el tiempo necesario para alcanzar la concentración y efecto máximo en todos los niveles de dosis (Figura 17).

De hecho, mientras que las  $C_{max}$  de tolmetín aparecen entre los 10 a 30 minutos posteriores a la administración oral, el máximo efecto protector se presenta hasta las 2 o 3 horas posteriores a la administración del tolmetín.

Por otra parte, mientras que las concentraciones sanguíneas de tolmetín tienden a disminuir gradualmente en el transcurso del tiempo, el efecto comienza a aparecer lentamente, alcanza el máximo y permanece a lo largo del tiempo, formando una pequeña meseta de efecto sostenido. El tiempo para alcanzar el efecto máximo, así como el tamaño de la meseta, varían en función de la dosis.

Considerando lo anterior, puede suponerse que no existe una relación directa entre las concentraciones sanguíneas y el efecto antiinflamatorio del tolmetín, lo cual propicia la formación de curvas cóncavas (asas de histeresis antihoraria), cuando se describe gráficamente el efecto antiinflamatorio en función de las concentraciones sanguíneas (Figura 18).



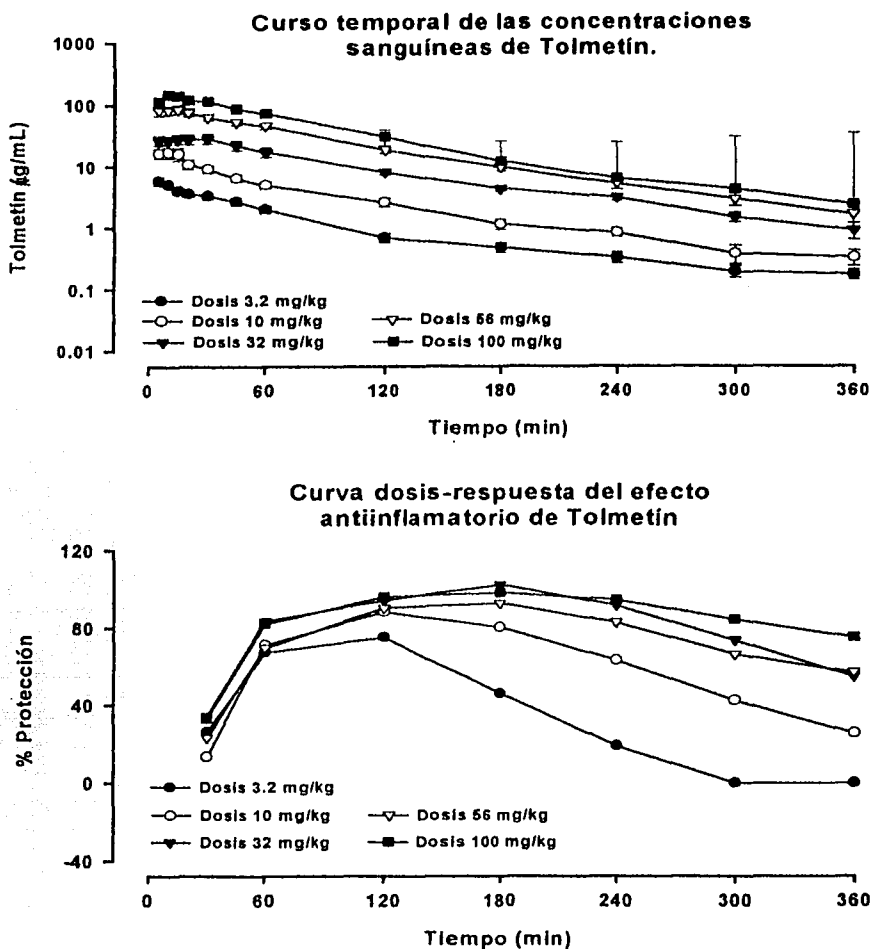


Figura 17. En la imagen superior, se muestran los cursos temporales de las concentraciones sanguíneas de tolmetín; mientras que en la parte inferior se pueden apreciar los cursos temporales del efecto antiinflamatorio (expresado como % de protección), para las diferentes dosis probadas. En esta figura se puede apreciar el evidente retraso entre la aparición del efecto (120 a 180 min), con respecto a las concentraciones sanguíneas (10 a 30 min) del tolmetín.





### Relación entre las concentraciones sanguíneas y el efecto antiinflamatorio de tolmetín

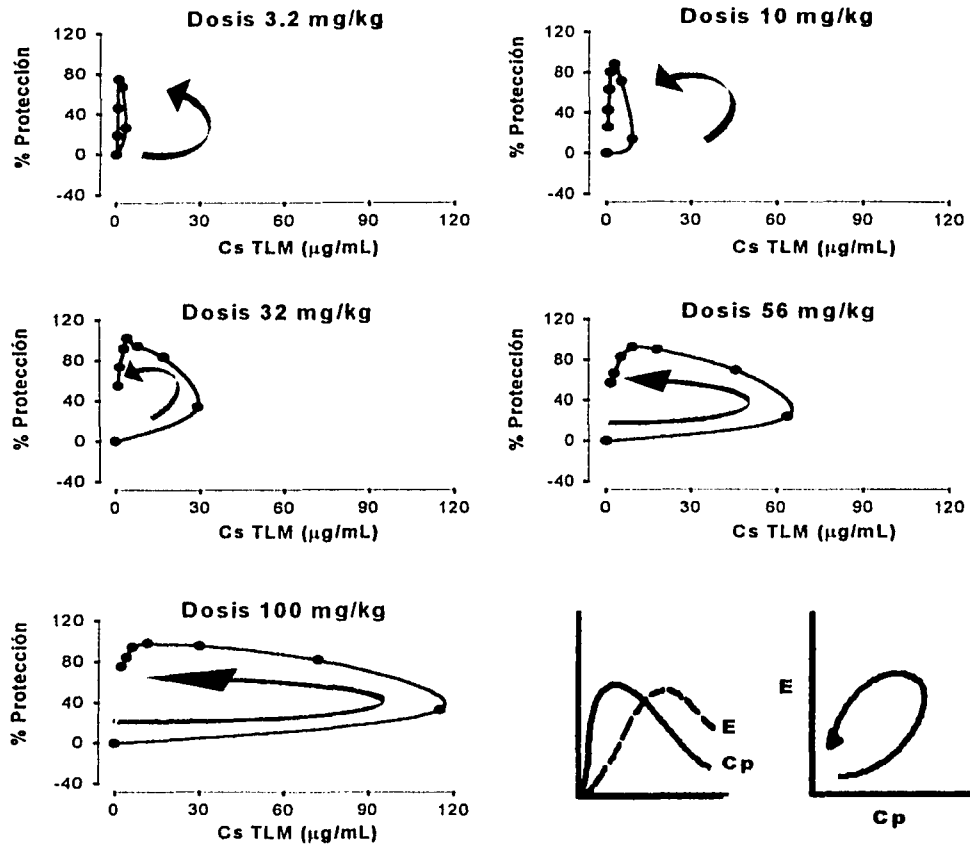


Figura 18. Relación entre las concentraciones sanguíneas (Cs) y el efecto antiinflamatorio (expresado como % de protección) del tolmetín (TLM) en ratas. Puede observarse que las curvas describen un comportamiento cóncavo hacia abajo (histeresis antihoraria), característico de las relaciones FC/FD indirectas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





***DISCUSIÓN  
DE  
RESULTADOS***



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Considerando que el tolmetín es un fármaco que se introduce a la práctica clínica a mediados de la década de los 70, las referencias bibliográficas relacionadas a su determinación en fluidos biológicos son escasas y la mayoría de las veces orientadas a análisis espectrofotométricos (Cressman, 1975) y cromatográficos (Selley *et al*, 1974; Desiraju *et al*, 1982; Hyneck *et al*, 1987; etc). En la mayoría de estos artículos, las cantidades necesarias de biofluidos (plasma, orina o líquido sinovial) van desde 0.5 mL hasta 1 mL. Además los métodos empleados son poco sensibles o carecen de selectividad, requieren procesos de extracción complejos y los tiempos de retención resultan largos.

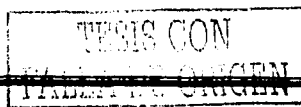
El método usado en el presente estudio, resultó lineal en el intervalo de concentración probado (0.25 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual manera los coeficientes de variación para repetibilidad y reproducibilidad cumplen con las especificaciones, por lo que el método resultó preciso y exacto. En lo que respecta a exactitud, los % de desviación de la concentración real son menores al 15%. El límite de cuantificación del método fue de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .

Adicionalmente, el método para cuantificar tolmetín requiere de un volumen pequeño de muestra biológica (0.1 mL de sangre) y los solventes para extraerlo de la matriz biológica y para el sistema cromatográfico son accesibles

De lo anteriormente expuesto, se concluye que el método cumple con los lineamientos de validación vigentes.

### 2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN EL MODELO DE EDEMA INDUCIDO POR CARRAGENINA.

En concordancia con lo encontrado por otros autores (Seibert *et al*, 1994), ninguna de las dosis probadas de tolmetín ejerce efecto antiinflamatorio durante la primera fase del curso temporal de la inflamación (0-60 minutos posteriores a la inducción con carragenina y a la administración simultánea con el fármaco). Esto puede deberse a que el estadio inicial de la inflamación está mediado principalmente por bradicinina, serotonina e histamina (Winter *et al*, 1962; Van Arman *et al*, 1965); sobre los cuales los AINEs no ejercen acción farmacológica. En cuanto comienza la segunda fase producida por prostaglandinas y otros mediadores (Crunkhorn *et al*, 1971; Ferreira *et al*, 1974), el tolmetín inhibe el desarrollo de la inflamación y de esta manera, la magnitud del efecto, así como su duración, son dependientes de la dosis (Ulcelay *et al*, 1988).





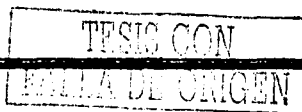
Con las dosis de 1.0, 3.2 y 10 mg/kg, el % de protección máxima se encuentra a nivel moderado (56.08, 74.94 y 88.23, respectivamente). Estos máximos se presentan a las 2 horas de haber administrado el fármaco. Ahora bien, para las dosis antes mencionadas, el efecto no se mantiene, sino que cae drásticamente luego de haber alcanzado el máximo. Por otra parte, el efecto máximo que se alcanza con la dosis de 32 mg/kg y con las subsecuentes dosis, es semejante (alrededor del 100%), aunque este valor se alcanza hasta las 3 horas y en general prevalece hasta el final del experimento (6 h).

Las dosis antiinflamatorias efectivas, encontradas en el presente estudio, se relacionan adecuadamente con las encontradas por otros autores en modelos farmacológicos que involucran la participación de prostaglandinas y otros mediadores, responsables de la inflamación y del dolor. En la tabla 11, se presentan los resultados de los mismos.

Tabla 11. Estudios analgésicos y antiinflamatorios del tolmétin sódico en diferentes modelos farmacológicos, que muestran la dosis efectiva para producir el 30 o 50% de inhibición o efecto máxima (DI<sub>30</sub> y DE<sub>50</sub> respectivamente).

Tipo Dosis empleado	Modelo Experimental	Valor obtenido (mg/kg)	Fuente
DI <sub>30</sub>	Inflamación aguda con carragenina <sup>A</sup> (ratas ♀)	31.4 (24.3-45.9)	Wong <i>et al</i> , 1973.
		11.0 (51.0-63.3)	Ulcelay <i>et al</i> , 1988.
		56.7 (51.0-63.3)	Wong <i>et al</i> , 1983.
DI <sub>30</sub>	Inflamación aguda con caolina <sup>B</sup>	7.8 (6.9-9.2)	Wong <i>et al</i> , 1973.
DI <sub>50</sub>	Absceso agudo con carragenina <sup>C</sup>	47.1 (39.6-60.1)	Wong <i>et al</i> , 1973.
DI <sub>50</sub>	Fiebre con levadura <sup>D</sup>	18.6 (16.3-25.9)	Wong <i>et al</i> , 1973.
		38.0	Brodgen <i>et al</i> , 1988.
DI <sub>50</sub>	Artritis adyuvante con adyuvante de Freund <sup>E</sup>	48.9 (31.6- 71.1)	Wong <i>et al</i> , 1983.
DI <sub>50</sub>	Contorsión abdominal con fenilquinolona <sup>F</sup> y acetilcolina <sup>G</sup>	32.0 (19- 54)	Wong <i>et al</i> , 1973.
		4.0 (3.2- 5.8)	
DE <sub>50</sub> (µg/kg)	Contorsión abdominal con ácido acético <sup>H</sup>	i.p. 1.42 (0.82-2.91)	Nakamura <i>et al</i> , 1981.
		i.v. 92 (57-140)	Nakamura <i>et al</i> , 1981.
		p.o. 3.01	Nakamura <i>et al</i> , 1979.
DE <sub>50</sub>	Contorsión abdominal con ácido acético (ratones ♂) <sup>H</sup>	5.6	Ulcelay <i>et al</i> , 1988.
DE <sub>50</sub>	Disfunción inducida por dolor en ratas (PIFIR, ratas ♀) <sup>I</sup>	9.0 (7.7 - 10.5)*	Flores-Acevedo DM, 1995.
		3.4 (1.9 - 4.8) **	
DE <sub>50</sub>	Inflamación aguda con carragenina <sup>A</sup> (ratas ♀)	8.3 (6.2 - 10.38) *	Presente estudio

Ver significados y explicaciones, en la siguiente página.





En la tabla 11, todos los modelos emplean ratas Wistar macho (165-220 g), excepto aquellos donde se especifique otra especie y sexo, el rango de las dosis probadas fue de 0.25 a 200 mg/kg, excepto el estudio de Nakamura *et al*, 1979 y 1981) para los diferentes modelos.

Las dosis se administraron vía oral (*p.o.*); salvo aquellas señaladas como i.p. (intraperitoneal), e i.v. (intravenosa). Los valores obtenidos se expresan como el promedio de al menos 10 determinaciones y entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza al 95%.

Donde:

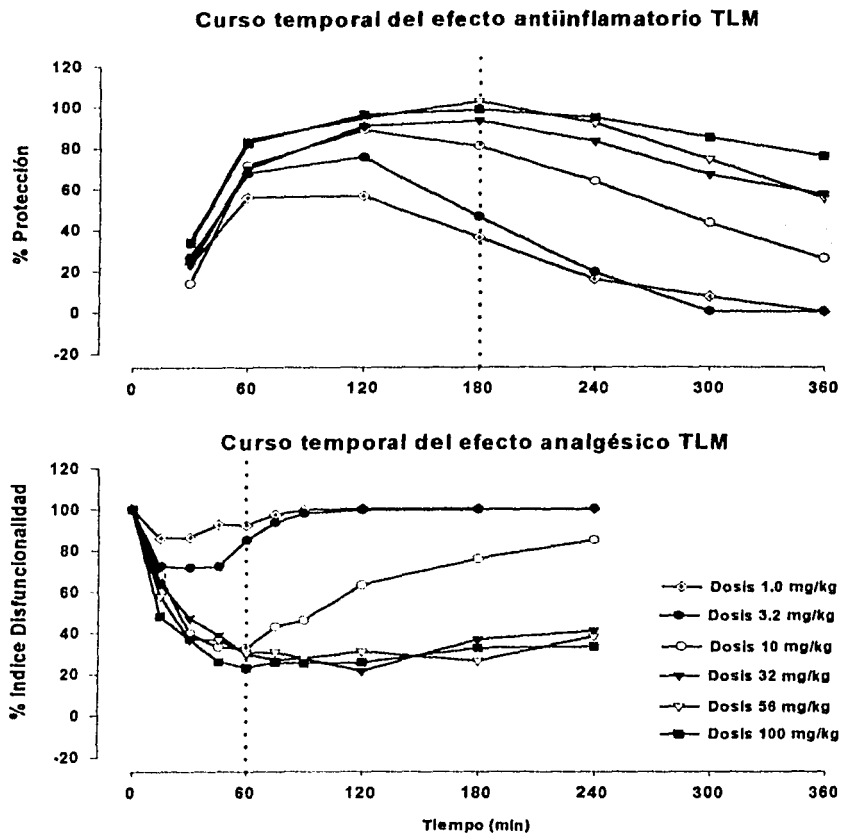
- A. Administración subcutánea (s.c.) de 0.1 mL de una suspensión de carragenina al 1%, en el cojinete plantar de la pata derecha.
- B. Administración s.c. de 0.1 de una suspensión de caolína al 10% (en el mismo lugar que en el punto A).
- C. Administración s.c. de 0.5 mL de una suspensión de carragenina al 2%, en la región dorsal lumbar.
- D. Administración s.c. de una suspensión de levadura de cerveza al 15% (10 mL/kg) en la región dorsal cervical.
- E. Inyección s.c. en el cojinete plantar de la pata izquierda de 0.75 mg de *Mycobacterium butyricum* (adyuvante de Freund).
- F. y G. no se especifican por los autores la vía y concentración de los dos agentes inductores.
- H. Inyección i.p. de 1 mL de solución acuosa de ácido acético al 1%.
- I. Administración intrarticular (articulación fémoro-tibio-rotular de la extremidad posterior derecha) de 0.05 mL de una suspensión en aceite mineral de ácido úrico al 30%.

- \*  $DI_{50}$  obtenida en base al área bajo la curva del efecto farmacológico y
- \*\*  $DI_{50}$  obtenida de acuerdo al efecto máximo observado.

**NOTA:** Todos los agentes antes mencionados, se suspenden o disuelven, según sea el caso en solución salina estéril al 0.85%; excepto donde se especifique otra condición.

Al comparar las dosis analgésicas efectivas en el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas -PIFIR- (Flores-Acevedo DM, 1995) y aquellas encontradas en el presente estudio; -modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas-, se encontró que los parámetros son semejantes, como puede observarse en la tabla 12.

Sin embargo, el tiempo máximo de *efecto analgésico* se alcanzó entre los 60 y 120 minutos posteriores a la administración del fármaco, mientras que el tiempo máximo de *efecto antiinflamatorio* se alcanza a las 3 horas (ver figura 19).



**Figura 19. Cursos temporales de los efectos antiinflamatorio y analgésico del tolmetín (TLM).**

En la imagen superior, se observa el efecto antiinflamatorio del tolmetín, expresado como % de protección; mientras que en la imagen inferior se observa el efecto analgésico, representado como el índice de disfuncionalidad; en el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas (más conocido como modelo PIFIR, por sus siglas en inglés).

La línea punteada señala el efecto máximo en ambos modelos: a los 180 minutos para el modelo de inflamación inducida por carragenina y a los 60 minutos para el modelo PIFIR.

La figura del panel inferior, se construyó con datos provenientes de Flores-Acevedo, 1995 y del artículo de Flores-Murrieta *et al.*, 1998.



Para fines comparativos, en la siguiente tabla se muestran los parámetros farmacodinámicos de tolmetín, obtenidos por Flores-Acevedo DM, 1995 (efecto analgésico en el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas); y los datos obtenidos en el presente estudio (efecto antiinflamatorio).

**Tabla 12.** Parámetros farmacodinámicos (efectos analgésico y antiinflamatorio) del tolmetín sódico administrado p.o. en ratas. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 7 determinaciones.

Dosis (mg/kg)	$E_{max}^{obs}$ (%)	Tmax (h)	ABC <sub>E</sub> (%*h)	$E_{max}^{obs}$ (%)	Tmax (h)	ABC <sub>E</sub> (%*h)
1.0	18.4 $\pm$ 7.1	0.38 $\pm$ 0.05	12.1 $\pm$ 4.7	56.08	2.0	166.49
3.2	38.4 $\pm$ 6.5	0.42 $\pm$ 0.09	28.4 $\pm$ 7.1	75.80	2.0	194.17
10	76.0 $\pm$ 9.9	0.78 $\pm$ 0.12	152.0 $\pm$ 40.2	88.23	2.0	347.09
32	86.2 $\pm$ 6.6	1.60 $\pm$ 0.30	253.8 $\pm$ 28.2	102.03	3.0	468.44
56	84.9 $\pm$ 8.1	1.57 $\pm$ 0.34	264.8 $\pm$ 37.3	92.45	3.0	423.81
100	89.8 $\pm$ 3.5	1.64 $\pm$ 0.38	275.3 $\pm$ 14.3	97.98	3.0	488.12

Donde:  $E_{max}^{obs}$  es el efecto analgésico o antiinflamatorio máximo observado, Tmax es el tiempo al cual se alcanza el efecto máximo y ABC<sub>E</sub> es el área bajo la curva del efecto analgésico. (Fuente: Flores-Acevedo DM, 1995, columnas en color gris y presente estudio columnas sin color al fondo).

Ahora bien, al realizar la comparación entre los efectos analgésico y antiinflamatorio, debe tomarse en consideración que el modelo PIFIR parte de la suposición de un estado estable del estímulo nociceptivo. Esto es, la disfunción inducida por la administración del ácido úrico es máxima, - y se mantiene así, en ausencia de fármaco-, mientras que en el caso del modelo de edema por administración de carragenina (inflamación), el volumen de la pata de la rata se incrementa de manera *transiente* hasta alcanzar un máximo alrededor de 3 h. Por lo tanto, al comparar un efecto protector *transiente* (edema por carragenina) con uno "terapéutico" (PIFIR), puede sugerirse que el tiempo requerido para alcanzar la máxima respuesta farmacológica difiera.

Sin embargo, el intervalo de dosis requerido para obtener ambas respuestas (analgésica y antiinflamatoria) es semejante como se ha venido exponiendo; lo que sugiere un mecanismo de acción común para la actividad farmacológica del tolmetín.

Como se mencionó anteriormente, los síntomas de la respuesta inflamatoria aguda son el resultado de la acción inmediata de agentes inflamatorios como la bradisinina, histamina, neurocininas, complementos y el óxido nítrico, los que se pueden originar localmente o desde células que se infiltran al sitio del daño



(Willoughby *et al*, 2001). Posteriormente, se producen elevados niveles de prostaglandinas, los cuales incrementan o prolongan las señales de los agentes pro-inflamatorios, aunque por sí mismas son incapaces de causar inflamación (Ferreira *et al*, 1978).

Algunos autores han descrito que la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2) es la responsable de la producción de PGE2 en los modelos de inflamación aguda LPS-Air Pouch y edema por carragenina, hallándose que la máxima expresión de la enzima se produce alrededor de 2 a 4 h posteriores a la administración del adyuvante inflamatorio. En estos modelos la administración profiláctica de inhibidores selectivos COX-1 no fue capaz de disminuir los niveles locales de PGs, el edema y la hiperalgesia. Sin embargo, cuando se administraron tanto *profiláctica* como *terapéuticamente* un inhibidor selectivo COX-2 y el AINE ketorolac, la inflamación se revierte y los niveles de PG, así como la hiperalgesia disminuyen. Lo anterior refiere que la inflamación en estos modelos es mediada por la COX-2 (Smith *et al*, Zhang *et al*, 1997).

En el caso de la hiperalgesia, Dirig *et al*, 1998, demostraron que la COX-2 expresada constitutivamente en la médula espinal, rápidamente sintetiza PGs que modulan y amplifican la sensación dolorosa en el modelo de hiperalgesia térmica por carragenina. Esta hiperalgesia es revertida por la administración sistémica de AINEs, o bien de inhibidores específicos de la COX-2, desde los primeros 60 minutos.

En base a lo anterior, se puede sugerir que el tolmetín, que es un inhibidor no selectivo de la COX-2, fue capaz de revertir "rápidamente" la actividad hiperalgésica de esta enzima a nivel espinal en el trabajo reportado por Flores-Murrieta *et al*, en 1998. En nuestro caso, en el modelo de inflamación, el tolmetín también inhibiría a la COX-2, pero como la respuesta evaluada es el edema, la isoenzima inhibida sería aquella que se induce "*transientemente*" a nivel local, por ello el retraso en el tiempo de efecto máximo ( $t_{E_{max}}$ ) en este modelo, con respecto al de Flores-Murrieta *et al*, 1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 3. FARMACOCINÉTICA DEL TOLMETÍN EN RATAS

Los datos farmacocinéticos obtenidos en este estudio, son similares a los obtenidos por Flores-Acevedo, 1995; Granados Soto *et al*, 1996 y Hashimoto *et al*, 1979; todos ellos en ratas. Como se mencionó anteriormente, la carragenina no influyó significativamente la farmacocinética del tolmetín; de acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio y a lo descrito por Brodgen *et al*, 1978.

Tampoco se observaron diferencias, cuando se promediaron los datos farmacocinéticos de los grupos tratados con tolmetín solo y tolmetín + carragenina, por lo que se realizó el ajuste simultáneo de los datos promediados. No se registraron diferencias entre los datos así obtenidos y aquellos derivados de los ajustes modelo-dependiente o modelo-independiente.

Sin embargo, estos resultados son diferentes a los encontrados por Wood *et al*, 1983, que observaron una marcada acumulación del tolmetín en el tejido inflamado en el mismo modelo farmacológico, dosis y vía de administración; lo cual afectaría la farmacocinética del tolmetín entre el sitio inflamado, el tejido sano y el plasma o compartimiento central. Motivo por el cual obtuvieron concentraciones hasta dos veces mayores en las ratas tratadas con tolmetín que en las ratas control (solo con carragenina). Esto sugiere que el tolmetín es depurado más lentamente a partir del tejido inflamado, donde se encuentra *almacenado* o en mayor concentración. Esta captación y almacenamiento de fármaco en tejido inflamado, tras una administración oral o tópica, ha sido descrita para varios fármacos antiinflamatorios, como bumadizona, etofenamato, diclofenaco y acetaminofén (Wood *et al*, 1983; Willoughby *et al*, 2001).

No obstante lo reportado por Wood *et al*, en lo referente a la influencia de la carragenina en la farmacocinética del tolmetín; tras una administración oral única de 100 mg/kg, ellos reportaron concentraciones de 142.5, 108.8 y 11.9  $\mu\text{g/mL}$  de tolmetín en plasma *versus* 72.1, 29.9 y 11.8  $\mu\text{g/mL}$ (\*) del fármaco en sangre; a los mismos tiempos de muestreo (60, 180 y 360 minutos), obtenidos en el presente estudio. Las diferencias reportadas por Wood *et al*, se deben a que comparan tejido inflamado *vs* tejido sano; y cuantifican tolmetín en plasma, solo como indicativo; pero no cuantificaron tolmetín en plasma de ratas sin carragenina y en ratas tratadas con tolmetín + carragenina, como en el presente estudio.

Por otra parte, en humanos, Selley *et al*, 1982, Sydney *et al*, 1975 y Furst *et al*, 1983, no han encontrado discrepancias en la farmacocinética del tolmetín entre pacientes artríticos y voluntarios sanos. No observaron diferencias ni en el grado de absorción y eliminación; así como entre las concentraciones plasmáticas y sinoviales.







Sin embargo, esta última acepción debe ser cuidadosamente interpretada, por todas las variables concomitantes a la artritis reumatoide.

(\*) Estos datos, se obtienen del promedio de las ratas tratadas con tolmetín solo y tolmetín + carragenina, por ajuste simultáneo (ver tabla 10 y figura 16-panel A). De hecho para esta dosis, se alcanzaron concentraciones entre 120 y 150  $\mu\text{g/mL}$ , pero a diferencia de Wood *et al*, éstas se obtienen durante los primeros 30 minutos del experimento y no hasta los 60 y 180 minutos.



#### 4. RELACION ENTRE LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DEL TOLMETÍN Y SU EFECTO ANTIINFLAMATORIO

Se observó un retraso entre la aparición del efecto farmacológico y las concentraciones sanguíneas de tolmetín, pues mientras las  $C_{max}$  del fármaco se alcanzan entre los 10 a 30 minutos posteriores a la administración del fármaco, el efecto protector máximo se observa hasta las 2 y 3 horas posteriores a la ingesta de tolmetín.

A pesar de que existen diversos reportes acerca de la actividad antiinflamatoria del tolmetín y la dosis efectiva 30 o 50, es escasa la información que relacione la concentración plasmática o en otro biofluido, con el efecto antiinflamatorio de AINEs o de otro tipo de analgésicos/antiinflamatorios.

En 1986 Dunagan *et al*, evaluaron la relación entre las concentraciones plasmáticas y el efecto de fenclofac en pacientes con artritis reumatoide, ajustando los datos resultantes a un modelo lineal y del efecto máximo; pero debido a la variabilidad intra e intersujetos, el modelo lineal ajustó mejor los datos obtenidos. Evidentemente, el valor predictivo de este ajuste y la consistencia de los resultados resultó pobre y carente de confiabilidad.

Por otra parte Derendorff (1995 y1997) realizó un par de revisiones de los artículos que han sido publicados sobre relación cinética-efecto de analgésicos antiinflamatorios (incluyendo los no esteroideos y otros opiodes, como la morfina); pero no se encuentran datos que relacionen efecto antiinflamatorio-concentración plasmática.

Para el tolmetín, Droogmole *et al*, 1982 señalaron que no se puede establecer una relación clara entre las concentraciones de tolmetín en el líquido sinovial y las concentraciones de prostaglandinas en el mismo, que pueda describir el fenómeno de retraso en la aparición del efecto antiinflamatorio, con respecto a la rápida aparición de tolmetín en el líquido sinovial.

Además para Derendorff (1995), los AINEs parecen actuar ejerciendo primero el efecto antiinflamatorio que la actividad analgésica, debido a que para producir el efecto analgésico se requiere de alcanzar altas concentraciones (con altos valores de  $CI_{50}$  concomitantemente) y por esta razón, las formulaciones de liberación sostenida de estos fármacos, no producen suficiente analgesia, luego de ser administradas en dosis únicas. En contraste, el efecto antiinflamatorio puede ser mejor controlado con dosis bajas de formulación sostenida. De hecho, en la práctica clínica es preferible el uso de estas formulaciones, con el objetivo de la supresión continua de los mediadores responsables de la inflamación.



En este trabajo, al igual que lo sucedido para la relación concentración sanguínea-efecto analgésico (Flores-Murrieta *et al*, 1998), el efecto antiinflamatorio del tolmetín aparece con evidente retraso con respecto a las concentraciones sanguíneas. **Este retraso es mayor para el efecto antiinflamatorio que para el analgésico** (60 minutos para el efecto analgésico y 180 minutos para la actividad antiinflamatoria). Además, el efecto antiinflamatorio tiende a permanecer por más tiempo ( ver figura 19).

Considerando lo anteriormente expuesto, es posible sugerir que el efecto antiinflamatorio sea mediado por el efecto analgésico de tolmetín, como lo indica Derendorff (1995), para ciertos AINEs. Hasta no obtener los datos correspondientes de CI50 para el efecto antiinflamatorio, que permita compararlos con aquellos ya existentes para el efecto analgésico (Flores-Murrieta *et al*, 1998), se podrá dilucidar con mayor precisión cual fenómeno se presenta primero.

Finalmente, debe señalarse que la relación indirecta que se presentó entre las concentraciones sanguíneas y el efecto antiinflamatorio de tolmetín (ver figura 18), puede resolverse por modelaje FC/FD indirecto o tiempo-dependiente como el del compartimento efector (Holford & Sheiner, 1981) o los modelos fisiológicos de respuesta indirecta (Dayneka *et al*, 1993; Jusko & Ko, 1994).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





# ***CONCLUSIONES***



## CONCLUSIONES

1. El método para cuantificar tolmetín en sangre, por cromatografía de líquidos de alta resolución fue selectivo, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de 0.5 a 150  $\mu\text{g/mL}$ . De manera que la determinación de tolmetín en sangre resultó confiable, porque el método analítico cumple con las especificaciones mínimas requeridas.
2. El efecto antiinflamatorio máximo, expresado como el mayor valor de % de protección, se alcanza con la dosis de 32 mg/kg y no se modifica significativamente, al aumentar la dosis. Esta dosis efectiva se encuentra en concordancia con las encontradas para el modelo de inflamación y para otros modelos de inducción del dolor.
3. En la mayoría de las dosis probadas, el efecto antiinflamatorio máximo se alcanza a las 3 horas posteriores a la administración del tolmetín. Después de esto, se crea una meseta o efecto sostenido, y finalmente, el efecto antiinflamatorio, tiende a desaparecer lentamente, al menos durante 6 horas; tiempo en el que se evaluaron los experimentos.
4. La carragenina (agente inductor de la inflamación en el modelo farmacológico empleado), no afecta significativamente la farmacocinética del tolmetín cuando se coadministra con el fármaco. Los parámetros farmacocinéticos no varían significativamente entre los grupos de ratas control (tolmetín) y aquellas tratadas con carragenina y tolmetín.
5. Se encontró una relación indirecta entre las concentraciones sanguíneas y el efecto antiinflamatorio que presenta el tolmetín. El efecto aumenta lentamente, alcanza un máximo y forma una pequeña meseta (de efecto sostenido), que difiere notablemente de la rápida aparición del fármaco en la circulación sistémica.

Debido a esta relación indirecta (con la consecuente formación de histeresis antihoraria), se sugiere el uso de modelajes indirectos o tiempo-dependientes como el del compartimento efector o los fisiológicos de respuesta indirecta para explicar la relación entre la farmacocinética y el efecto antiinflamatorio del tolmetín.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





# ***BIBLIOGRAFÍA***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## BIBLIOGRAFÍA

Aiache JM, *et al.* "Biofarmacia". Manual Moderno. México D.F. 1983 pags: 3-21.

Ballou, LR., Clark MB & Raghov R. "Elucidation of the pathophysiological functions of prostaglandins using ciclooxigenase gene deficient mice". En "Therapeutic roles of selective COX-2 Inhibitors" Edit. William Harvey Press. Londres, Inglaterra. 2001. Cap. 6, pags. 128-131, 144-146.

Beiche, F., Scheuerer S., Brune K, Geisslinger, G. & Goppelt-Struebe M. "Up-regulation of ciclooxigenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation." FASEB Letters (1996)390: 165-169.

Bellisant E, Sébile V. & Paintaud G. "Methodological issues in pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling". Clin. Pharmacokin (1998)Aug 35(2): 151-166.

Berkowitz SS, Bernhard G, Bilka PJ. "Tolmetin versus placebo for the treatment of rheumatoid arthritis: a sequential double-blind clinical trial." Current Therap. Res. (1974)16: 442-451.

Bressolle F, Bromet-Petit M & Audran M. "Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics". J. of chromatography B (1996)686: 3-10.

Brogden RN, Heel RC, Speight TM & Avery GS. "Tolmetin: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Rheumatic Diseases". Drugs (1978)15: 429-450.

Cárdenas-Rodríguez HL & Cortés-Arroyo AR "Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos". Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México D.F. 1996. Pags: 19-28, 110-132.

Carson JR, McKinstry DN & Wong S. "5-Benzoyl-1-methylpyrrole-2-acetic acids as antiinflammatory agents." J. Med. Chem. (1971)14: 646-647.

Castañeda-Hernández G, Favari L, & Hoyo-Vadillo C. "Relationship between naproxen plasma concentration and its antiinflammatory effect in experimental hepatitis." Arzneimittel-Forschung/Drug Research (1995)45 (1)5: 585-589.



Cressman WA; López B & Sumner D. "Determination of tolmetin in human plasma by GLC and spectrophotometric procedures". *J. Pharm. Sci.* (1975)**64** (12): 1965-1967.

Cressman WA, Wortham F, Plostnieks J. "Absorption and excretion of tolmetin in man". *Clin Pharmacol. Ther.* (1976)**19**: 224-233.

Crunkhorn P & Meacock CR. "Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin." *Br. J. Pharmacol.* (1971)**42**: 392-402.

Dayneka, NL; Garg, V. & Jusko, W. "Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses". *J. Pharmacokin. & Biopharm.* (1993)**21** (4): 457-477.

Derendorff, H & Hochaus, G. (editors). "Handbook of PK/PD correlation"; de la serie CRC Pharmacology and Toxicology. Edit. CRC Press. Boca Raton. Florida, USA. 1995. Cap. 6: Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation of analgesics". Pags. 141-169.

Derendorff, H & Hochaus, G. "Pharmacokinetic-pharmacodynamics relationship for analgesics". *Int. J. Clin. Pharm. Ther.* (1997)**35**(8): 307-323.

Desiraju RK, Sedberry D., & Kung-Tat, NG. "Simultaneous determination of tolmetin and its metabolites in biological fluids by high performance liquid chromatography." *J. Chromat. & Biomed. Appl.* (1982)**232**: 119-128.

Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. "Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats". *J. Pharm. Exp. Ther.* (1998)**285**:1031-1038.

Di Rosa M & Sorrentino L. "The mechanism of the antiinflammatory effect of carrageenin." *J. Pharmacol.* (1968)**4**: 340-342.

Di Rosa M & Sorrentino L. "Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat." *Br. J. Pharmacol.* (1970)**38**: 214-220.

Droogmole SH, Furst DE, Desiraju RK, Jirscenbaum MA & Paulus HE. "Tolmetin kinetics and synovial prostaglandin E levels in rheumatoid arthritis". *Clin. Pharmacol. Ther.* (1982)**37**: 371-377.

Dunagan FM, McGill PE, Kelman AW & Whiting B. "Quantitation of dose and concentration-effect relationships for fenclofenac in rheumatoid arthritis". *Br. J. Clin. Pharmacol.* (1986)**21**: 409-416.





Ferreira SH, Moncada S, Parson M & Vane JR. "The concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin". Br. J. Pharmacol. (1974) Jul 11-12; pags: 108-109.

Ferreira SH, Nakamura M, Abreu-Castro MS. "The hyperalgesic effect of protacyclin and PGE<sub>2</sub>". Prostaglandins (1978)16:31-37.

Flores Acevedo DM. "Estudio de la relación entre los niveles sanguíneos y el efecto analgésico del tolmetín en la rata". Tesis de maestría, Sección de Terapéutica Experimental del Departamento de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV. México D.F. 1995.

Flores-Murrieta FJ, Flores-Acevedo DM, Castañeda-Hernández G, López-Muñoz FJ "Potentiation of the analgesic effect of tolmetin, a potent non-steroidal antiinflammatory drug, by caffeine in the rat." Pharm. Sci. (1995)1: 441-444.

Flores-Murrieta FJ, Hui CK, Flores-Acevedo DM. *et al.* "Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tolmetin antinociceptive effect in the rat, using and indirect response model: A population approach." J. Pharmacokinet. Biopharm. (1998) 26 (5): 547-557.

Furst DE, Sydney HD, Desiraju RK & Paulus HE. "Clinical pharmacology of tolmetin: Comparisons in rheumatoid arthritis patients and normal volunteers". J. Clin. Pharmacol. (1983)23: 329-335.

Girwood RH, Petrie JC. "Terapéutica médica." 15ª ed. 1992. Edit. Manual moderno. México D.F. pags: 608-610.

Goodman & Gilman's. "The pharmacological basis of therapeutics." 8ª ed. 1990. Edit. Pergamon Press, New York; U.S.A pags: 638-340 y 663-380.

Granados-Soto V, Vidal-Cantú G & Flores-Murrieta FJ. "Sex related differences in the pharmacokinetics of oral tolmetin in the rat". Pharmaceutical Sciences (1996)2: 601-603.

Guía profesional de medicamentos. 4ª ed. 1993. Edit Manual moderno. México, D.F. pags: 216-217.

Hashimoto M, Miyazaki H, Fuji T, Nambu K & Tanaka K. "Studies on disposition and metabolism of tolmetin, a new anti-inflammatory agent, in rats and mice. I. Absorption, distribution and excretion of [<sup>14</sup>C] Tolmetin radioactivity". Drug Metabolism and Disposition (1979)7 (1): 14-20.



Holford NHG & Sheiner LB. "Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic/pharmacodynamic models". Clin. Pharmacokin. (1981)6: 429-453.

Hyneck M., Smith P., % Unsel, E. "Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic/pharmacodynamic models". Clin. Pharmacokin. (1981)6: 429-453.

Ialenti A, Ianaro A, Moncada S & Di Rosa M. "Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide". Eur. J. of Pharmacol. (1992)211: 177-182.

ILAR (Committee on Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources) "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio". Bethesda Maryland, EUA, 1997.

Insel PA. "Agentes analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, fármacos empleados en el tratamiento de artritis reumatoide y gota"; en "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" 9ª ed. Hardman JG, Limbird LE (editores). Edit. McGraw-Hill Co. Inc., New York, USA. 1996: 617-657.

Jusko, WJ & Ko, HC. "Physiological indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic responses". J. Pharmacokin. Biopharm. (1994)56: 406-419.

Karim, Z & Emery, P. "The future of cyclooxygenase-2 inhibitors" En "Therapeutics roles of selective COX-2 Inhibitors" Edit. William Harvey Press. Londres, Inglaterra. 2001. Cap. 26, pages. 560-570.

Kun-Yu WK. "Biochemical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs". Biochem. Pharmacol. (1998)55: 543-547

Lewis JR. "New antirheumatic agents". JAMA (1977) 237 (12): 1260-1261.

Maibach E. "European experiences with tolmetin in the treatment of rheumatic diseases." Current Therap. Res. (1976), 19 (3): 320-362.

Migdalof BH, Yorgey KA *et al.* "The time course of tolmetin and its metabolites in the plasma of individual rats and mice". Drug Metab. Dispo. Biol. Fate. Chem. (1976), 4(5): 468-473.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Mitchel, JA., Akarasereenont P., Thiemermann, C & Flower RJ. "Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994)**90**: 11693-11697.

Nakamura H, Ishii K, Motoyoshi S, Imazu C, Yokoyama Y. "Analgesic activity of a non-steroidal anti-inflammatory agent tolmetim sodium in experimental animals". *Nippon-Yakurigaku- Zasshi* (1979)**75**: 405-417.

Nakamura H & Shimizu M. "Site of analgesic action of a non-steroidal, antiinflammatory drug, tolmetin sodium in rats". *Brit. J. Pharmac.* (1981)**73**: 779-785.

Rainsford RD. "Antiinflammatory and Antyrheumatic Drugs". Vols I y II. Edit Mc Graw Hill. New York, USA. 1985. Vol I, pags 186-187. Vol II, Capitulo 12: Tolmetin sodium. Pags: 250-265.

Roberts, JL & Morrow, JD En "Fisiología y Fisiopatología" 4ª ed. Guyton, AC., Hall JE (editores). Edit. McGraw Hill, México D.F. 2001. pags. 47, 284-285 y 612 (Inflamación).

Robbins S, Cotran R & Kumar V. "Patología estructural y funcional vols I y II." 4ª ed. Edit Interamericana-Mc Graw Hill. Madrid, España 1990. Vol I pags: 11-14, 39-71; Vol II pags: 994-998.

Rowan A. "The Benefits and Ethics of Animal Research". (*Forum*). *Scientific American* (1997) February: 63-78.

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

Selley ML, Glass J *et al.* "Pharmacokinetic studies of tolmetin in man". *Clin. Pharmacol. Ther.* (1975)**17** (5): 599-605.

Selley ML, Thomas J & Triggs EJ. "A gas liquid chromatographic method for the quantitative determination of tolmetin in plasma and tolmetin and its major metabolite in urine." *J. Chromat.* (1974)**94**: 143-149.

Sengupta, S. "Cyclooxygenase-2: A new therapeutic target" *Indian J. of Pharm.* (1999)**31**: 322-332.

Simkin P. "Concentration-effect relationship of NSAIDs". *J. Rheumatol.* (1988)**15** (suplemento num. 17): 40-43.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Smith CM & Reynard AM. "Textbook of pharmacology." Edit. Saunder Co. Philadelphia, U.S.A. 1992. pags 401-430.

Smith CJ, Zhang, Y., Koboldt CM, Muhammad J, *et al.* "Pharmacological analysis of ciclooxigenase-1 in inflammation". Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998)95:13313-8.

Squires RF & Saederup E. "Indomethacin/Ibuprofen-like anti-inflammatory agents selectively potentiate the gamma-aminobutyric acid-antagonist effects of several norfloxacin-like quinolone antibacterial agents on t-butylcyclophosphothionate binding". Mol. Pharmacol. (1993)43 (5): 795-800.

Stacher G, Bauer P, Ehn I. "Effects of tolmetin, paracetamol and two combinations of tolmetin and paracetamol as compared to placebo on experimentally induced pain. A double blind study". Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. (1979)17 (6): 250-255.

Sumner DD, Dayton PG, Cucinell SA & Plostnieks J. "Metabolism of tolmetin in rat, monkey and man". Drug Metabolism and Disposition (1975)3:283.

Sydney HD, Furst DE, Desiraju RK, Ramchandra KN, Kirschenbaum MA & Paulus HE. "Tolmetin kinetics and synovial fluid prostaglandin E levels in rheumatoid arthritis". Clin. Pharmacol. Ther. (1982) Sep 32(3): 371-377.

Syntex Simposio: "Inflamación y antiinflamatorios: actualizaciones." Enero de 1987. Pags: 23-29, 61-83, 97-99.

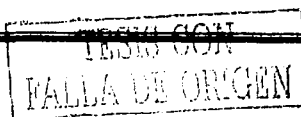
Taylor RJ, Salata JJ. "Inhibition of prostaglandin synthetase by tolmetin (tolectin, McN-2559), a new non-steroidal antiinflammatory agent." Biochem. Pharmacol. (1976)25: 2479-2484.

The Index Merck 11 th ed. Boca Raton/Florida, USA 1995. Pag 1624.

Ulcey M, Lasheras B & Cenarruzabeitia E. "Pharmacological study of the new nonsteroidal antiinflammatory agent 4'-acetamidophenyl-2-(5'-*p*-toluyl-1'-methylpyrrole)acetate". *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* (1988) 38(1): 546-551.

Vane JR & Botting R (editors). "Therapeutics roles of selective COX-2 Inhibitors" Edit. William Harvey Press. Londres, Inglaterra. 2001. Cap 1 "Formation and actions of prostaglandins and inhibition of their synthesis". Pags. 1-47.

Van Arman CG, Begany AJ *et al.* "Some details of the inflammation caused by yeast and carrageenin (with appendix on kinetics of the reactions)". *J. of Pharm. Exp. Therapeutics.* (1965)150: 328-334.





Wagner GJ. "Farmacocinética clínica". Editorial Reverté. Barcelona, España (1983) pags. 110-132.

Willoughby D, Lawrence T. & Colville-Nash P. "Cyclooxygenase-2 in experimental models of inflammation". En "Therapeutics roles of selective COX-2 Inhibitors" Edit. William Harvey Press. Londres, Inglaterra. 2001. Cap. 5, pags. 95-127.

Winter CA, Risley EA. "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1962)**111**: 544-547.

Wong S, Garddocks JF & Pruss TP. "Pharmacologic evaluation of tolectin (tolmetin McN-2559) and McN-2891 – two antiinflammatory agents". J. Pharmacol. Exp. Ther. (1973)**185**: 127-138.

Wong S, Garddocks JF. (1983). "Antiinflammatory and antiarthritic evaluation of acetaminophen and its potentiation of tolmetin". J. Pharmacol. Exp. Ther. (1983)**225** (2): 625-632.

Wood SG, John BA & Chasseaud LF. "Tolmetin uptake into inflamed tissue in the rat". *Arzneim-Forsch/Drug Res.* (1983) **33(II)**: 1570-1572.

Xie W, Robertson DL, Simmons DL. "Mitogen inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs." *Drug. Dev. Res.* (1992)**25**: 249-265.

Yaksh, TL & Svensson, C. "Role of spinal cyclooxygenase in nociceptive processing". En "Therapeutics roles of selective COX-2 Inhibitors" Edit. William Harvey Press. Londres, Inglaterra. 2001. Cap. 7, pags. 168-190.

Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K & Isakson PC. "Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E<sub>2</sub> production". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1997) **283**(3): 1069-1075.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN