

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA DE MORFINA
EN TRATAMIENTO AGUDO Y CRÓNICO EN RATAS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
L A U R A I S L A S C R U Z

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ADRIANA M. DOMÍNGUEZ RAMÍREZ
ASESOR DE TESIS: Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA**

MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL ÁREA DE FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS DE LA UAM-X. Y EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA DEL CINVESTAV-IPN.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios:
por permitirme terminar este trabajo.

A mis padres:
Isidoro y Alejandra por su amor, cariño
y apoyo que siempre me han brindado
para seguir adelante.

A mis hermanos:
Verónica, Víctor, Alejandra y Javier
por su cariño y apoyo que me han proporcionado
en todo momento.

A mis sobrinas:
Brenda Alejandra, Diana Isabel e Izaret Sarahí
por su alegría y entusiasmo que me han compartido.

Y a quienes con su cariño y afecto me dieron una palabra de aliento
para seguir adelante y me apoyaron en la realización de este
trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEORICA	4
2.1. Definición de dolor	7
2.2. Sistemas inhibidores del dolor mediado por péptidos opioides endógenos	8
2.3. Analgésicos	8
2.4. Analgésicos tipo no opioide o AAINEs	9
2.4.1. Propiedades farmacológicas	9
2.4.2. Mecanismo de acción	10
2.4.3. Toxicidad y efectos indeseables	10
2.4.4. Usos terapéuticos	11
2.5 Analgésicos tipo opioide: Morfina	11
2.5.1. Historia y composición del opio	12
2.5.2. Estructura química de la morfina	13
2.5.3. Propiedades fisicoquímicas de la morfina	14
2.5.4. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central	14
2.5.4.1 Efecto analgésico	15
2.5.5. Efectos farmacológicos periféricos	15
2.5.6. Receptores opiáceos	16
2.5.7. Mecanismo de acción	17
2.5.8. Farmacocinética de morfina	18
2.5.8.1. Absorción	19
2.5.8.2. Distribución	19
2.5.8.3. Biotransformación	19
2.5.8.4. Excreción	20
2.5.9. Toxicidad y efectos indeseables	21
2.5.10. Usos terapéuticos	22
2.5.10.1. Analgesia	22
2.5.11. Tolerancia	23
2.5.12. Dependencia física	26
2.5.13. Síndrome de abstinencia	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. OBJETIVOS	30
5. HIPÓTESIS	31
6. METODOLOGÍA	32
6.1. Material	32
6.2. Equipo	33
6.3. Reactivos y estándares	33
6.4. Método analítico	34
6.5. Estudio farmacocinético	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1. Evaluación del método analítico	42
7.2. Estudio farmacocinético	46
8. CONCLUSIONES	54
9. SUGERENCIAS	55
10. REFERENCIAS	56

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos analgésicos son utilizados ampliamente para aliviar el dolor, ya que la experiencia dolorosa, la incapacidad física y psicológica causada por el dolor deterioran la calidad de vida de un gran número de personas; por lo que el alivio del dolor es uno de los mayores objetivos desde la antigüedad hasta nuestros días. El tratamiento ideal del dolor requiere el uso de compuestos analgésicos que sean efectivos, y que al mismo tiempo presenten un mínimo de efectos indeseables.

En general, puede establecerse que existen dos grupos importantes de compuestos analgésicos: los de tipo no opioide o analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los de tipo opioide. Los analgésicos de tipo no opioide son menos potentes y generalmente menos eficaces, actúan principalmente por mecanismos de acción a nivel periférico, y son normalmente usados para el dolor que se origina en el músculo esquelético.

Los analgésicos de tipo opioide son potentes y eficaces, actúan sobre los receptores opiáceos que pueden localizarse tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico, así como en células implicadas en procesos inflamatorios e inmunes (Álamo y López-Muñoz, 2004). Se utilizan principalmente para aliviar el dolor proveniente de vísceras, lesiones graves, quemaduras, en la terapia del cáncer; así como también en el dolor neuropático (Braunwald y col., 2002).

La morfina es un analgésico potente y eficaz que actúa en diferentes tipos de dolor intenso y después de dosis repetidas o en tratamiento crónico, puede producir tolerancia o dependencia física y psicológica. Se han postulado diversos mecanismos para explicar el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina, entre ellos, se considera que la disminución de concentración de morfina puede explicar este fenómeno y se ha tratado de demostrar que también existen modificaciones en la farmacocinética después de la administración crónica.

El desarrollo de tolerancia como una consecuencia de cambios en la farmacocinética de morfina, es difícil de evaluar ya que se requiere de métodos analíticos rápidos, fáciles y fiables con una alta sensibilidad y selectividad que proporcionen de una manera oportuna datos confiables y seguros para la determinación de concentraciones de morfina y sus metabolitos en muestras de fluidos biológicos. Dentro de éstos, encontramos que muchos de los procedimientos publicados utilizan cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección ultra-violeta (UV), con fluorescencia, o con detector de diodos, así como también han sido descritos los métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (CLAR-RP), y acoplado a espectrometría de masas (CLAR-RP-MS) (Projean y col., 2003). La cromatografía de gases (CG), asociada con la espectrometría de masas (MS), y el radioinmunoensayo (RIA), son otros métodos empleados para la determinación de concentraciones terapéuticas (Bourquin y col., 1997; Liaw y col., 1998; Projean y col., 2003). Varios autores han propuesto el uso de CLAR con detección electroquímica (EQ), estos métodos son suficientemente selectivos y sensibles; sin embargo, se ha visto que se

requiere también de procedimientos sencillos altamente rápidos que permitan purificar las muestras por extracción en fase sólida o líquida-líquida (Liaw y col., 1998; Projean y col., 2003).

En la actualidad se buscan métodos que permitan la cuantificación de morfina y/o sus principales metabolitos con el uso de algún procedimiento sencillo y rápido de extracción seguido de CLAR, ya que también se busca utilizar equipo sensible y de bajo costo. De acuerdo a esto, en el presente trabajo se siguió un procedimiento de extracción en fase sólida (Sep Pack C₁₈); utilizando un cromatógrafo de líquidos con detector electroquímico para estudiar la farmacocinética de morfina en tratamiento agudo y crónico en ratas, determinando las concentraciones plásmaticas de morfina en un mismo animal, y empleando muestras de volúmenes pequeños de plasma (50-100 μ L); ya que es de gran importancia evaluar la relación que existe con el desarrollo de tolerancia y la farmacocinética del fármaco, sobre todo en el tratamiento crónico y así aportar mayores opciones terapéuticas para el tratamiento clínico del dolor, en beneficio del paciente.

2. FUNDAMENTACIÓN TEORICA

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable originada por la estimulación de nervios periféricos y a menudo asociada con un daño tisular actual o potencial (Silberstein, 2003). Se origina frecuentemente en el sistema nervioso periférico, por medio de la excitación de fibras aferentes nociceptivas, provenientes de la pared corporal y las vísceras; pasando por músculos de diferente tipo (liso ó estriado) y culmina con la percepción en la corteza cerebral, donde se hace conciencia de la sensación dolorosa.

La percepción del dolor puede ser suprimida o disminuida en varios niveles del sistema nervioso periférico y central; mediante la acción de compuestos analgésicos. Dentro de los fármacos analgésicos que tienen una limitada eficacia analgésica en determinados tipos de dolor de intensidad baja o moderada, están los AAINes. Los compuestos de tipo opioide como la morfina y sus análogos, tienen una alta eficacia analgésica en diferentes tipos de dolor intenso, pero producen efectos indeseables, ya que con la administración frecuente de dosis terapéuticas, hay una pérdida gradual de su eficacia. La reducción del efecto analgésico después de repetidas dosis se denomina tolerancia (De Barutell y col., 2003). Para reproducir la respuesta original, debe administrarse una dosis mayor; y posteriormente se presenta la dependencia física y psicológica; por lo tanto, la interrupción del fármaco producirá un síndrome de abstinencia. Si se suspende la administración del analgésico opioide cuando ya se ha producido tolerancia y dependencia física se ocasionan trastornos profundos; primero hay nerviosismo y

una intensa búsqueda del fármaco, después se producen bostezos, goteo nasal, lagrimeo y transpiración, escalofríos, fiebre, vómito y respiración jadeante, pérdida de apetito, insomnio, hipertensión, dolores, pérdida de peso e hiperactividad del sistema nervioso simpático; todo ello incluye elementos psicológicos conductuales y fisiológicos que generalmente suelen ser los opuestos a la acción de la morfina sobre los distintos órganos y sistemas sobre los que actúa (Álamo y López-Muñoz, 2004).

A la fecha, se han postulado diversos mecanismos para explicar el fenómeno de tolerancia al efecto analgésico de morfina. El paso inicial en todos estos procesos es la interacción del opioide con el receptor. Algunos autores consideran que estos mecanismos son mediados por segundos mensajeros y vías intracelulares, así como por neurotransmisores o neuromoduladores. La tolerancia, originada por decremento de concentración del fármaco, se presenta cuando un fármaco reduce su propia absorción o el ritmo de su paso a través de cualquier barrera biológica, o bien aumenta su propio ritmo de eliminación (Levine, 1996). En el caso de morfina, algunos autores han propuesto que la disminución de concentración plasmática de morfina puede explicar el desarrollo de tolerancia denominada como "tolerancia farmacocinética" (Shargel y Yu, 1999). Sin embargo, existen controversias en la literatura al respecto, posiblemente debidas a las diferencias en los métodos empleados en la determinación tanto del efecto analgésico, como de las concentraciones de morfina en muestras biológicas. Otros autores han propuesto que existe una relación entre las concentraciones del fármaco inalterado y/o el metabolito morfina-3 β -glucurónido (M3G), tanto con el

efecto analgésico como con el desarrollo de tolerancia, y además han propuesto modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (FC/FD) para demostrar dicha relación (Bhargava y col., 1991; Ekblom y col., 1993; Gårdmark y col., 1998b; Bouw y col., 2000).

En un estudio previo realizado en ratas, se demostró el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico del fármaco, después de la administración subcutánea de una dosis diaria de morfina de 5.6 mg/Kg de peso, por 6 y 12 días (Domínguez y col., 2000). Por lo anterior, sería conveniente investigar si existen cambios en la farmacocinética de morfina, utilizando los mismos esquemas de tratamiento. La determinación del curso temporal de concentraciones plasmáticas en un mismo animal, permite estudiar de manera más confiable la farmacocinética de morfina en ratas, tanto en tratamiento agudo como en crónico. Para esto, se requiere contar con métodos analíticos altamente confiables y sensibles, que requieran de muestras de volúmenes pequeños de plasma (micro método).

2.1. DEFINICIÓN DE DOLOR

El dolor es un concepto difícil de definir todavía en la actualidad, aun cuando todos nosotros hemos experimentado, con toda seguridad, ese tipo de experiencia. Es una de nuestras sensaciones más útiles, porque nos indica la presencia de enfermedad y con frecuencia su localización; y nos alerta contra la posibilidad de daño físico, sin embargo el dolor también tiene un importante componente psíquico emocional o afectivo, es decir el dolor no es simplemente una sensación física, sino que su percepción también depende de una reacción emocional a los estímulos, y es afectado por el estado de ánimo (Greene y Harris, 1993). Por lo que el dolor es subjetivo, y en su forma aguda, puede ser muy útil y salvarnos la vida; debido a que a menudo lleva a cabo una función protectora y, en su forma crónica puede ser muy destructivo, e irremediable; ya que muchas veces sobrepasa su función protectora. Actualmente el dolor ha sido definido por la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor, como "Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular actual, o potencial, o bien descrita en términos de tal daño" (Silberstein, 2003; Moreno, 2004). En esta definición identifica tres elementos: 1. El dolor se asocia con un daño tisular y "amenaza de daño", 2. Es una experiencia "desagradable y emocional" y 3. Es subjetivo. A pesar del consenso para la definición de dolor, se considera que es una experiencia emocional subjetiva, y recientemente se dice que tiene una dimensión afectiva que incluye los sentimientos inmediatos desagradables asociados con la sensación penosa y emociones negativas provocadas por el dolor (Feldman, 2004).

2.2 SISTEMAS INHIBIDORES DEL DOLOR MEDIADO POR PÉPTIDOS OPIOIDES ENDÓGENOS

Los péptidos opioides endógenos juegan un papel importante en la inhibición del dolor, dentro de las tres principales familias de péptidos están: las encefalinas, dinorfinas, y endorfinas, las cuales tienen un precursor diferente (preproencefalina, preprodinorfina y preproopiomelanocortina, respectivamente). Las encefalinas son pentapéptidos formados por 5 aminoácidos, entre ellos tenemos, la metencefalina y la leuencefalina. Las dinorfinas difieren en su longitud y las encontradas son dinorfina A, dinorfina B, alfa neoendorfina, y beta neoendorfina. Dentro de las endorfinas tenemos, la principal la beta endorfina, un péptido con 31 aminoácidos. Los péptidos opioides endógenos están distribuidos en el SNC y periférico además, parecen actuar como neurotransmisores, moduladores de la neurotransmisión o neurohormonas, su papel en el proceso fisiológico no se conoce totalmente (Hardman y Limbird, 2003).

2.3. ANALGÉSICOS

Los analgésicos son fármacos que actúan suprimiendo o disminuyendo la percepción del dolor, sin alterar otro tipo de sensaciones como la actividad refleja. La percepción del dolor puede ser suprimida o disminuida en varios niveles del sistema nervioso: periférico y central; así el tipo de analgésico empleado va a depender del origen, gravedad e intensidad del dolor. Por lo cual puede establecerse que existen dos grupos importantes de compuestos analgésicos: los de tipo no opioide o AAINes y los de tipo opioide.

2.4. ANALGÉSICOS TIPO NO OPIOIDE O AAINES

Los analgésicos tipo no opioide o AAINES, incluyen muy diversos compuestos que casi nunca tienen, relación química alguna (aunque casi todos son ácidos orgánicos), pero que comparten algunas actividades terapéuticas y efectos indeseables (Hardman y Limbird, 2003). Los AAINES, son eficaces contra el dolor de intensidad leve o moderada, además poseen efectos analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos y antitrombóticos (Saeb-Parsy y col., 1999).

2.4.1. Propiedades farmacológicas

Los AAINES son eficaces contra el dolor de intensidad leve o moderada. Sus efectos máximos son mucho menores, pero no originan las manifestaciones indeseables de los analgésicos opioides en el SNC, que incluyen principalmente depresión respiratoria y dependencia física (Hardman y Limbird, 2003), es decir tienen una acción analgésica moderada, pero consistente y mensurable, sin producir euforia o sedación, como los analgésicos opioides. Son eficaces frente a dolores de mediana intensidad, somáticos, o tegumentarios, no viscerales: cefaleas, odontalgias, mialgias y artralgias y no producen tolerancia a su acción en el uso crónico (Velasco y col., 1993). Los AAINES reducen la temperatura corporal en estados febriles; tienen efecto antiinflamatorio, sin embargo por administración oral producen efectos sobre la mucosa gastrointestinal, que es una barrera física y biológica a la penetración de péptidos. Físicamente, la mucosa gastrointestinal limita la penetración de péptidos hidrofílicos péptidos opioides a la vía paracelular, mientras que los péptidos hidrofóbicos pueden

atravesar esta membrana biológica por una vía transcelular. La barrera biológica componente de la mucosa gastrointestinal consiste de proteasas y peptidasas (Gudmundsson y col., 1999).

2.4.2. Mecanismo de acción

Los AAINEs poseen efectos analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, y antitrombóticos (Saeb-Parsy y col., 1999), actúan inhibiendo la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos a nivel periférico y central. Casi todos los antiinflamatorios inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa. No obstante, los AAINEs no suelen inhibir la formación de eicosanoides, como los leucotrienos, que también contribuyen a la inflamación, ni afectan la síntesis de muchos otros mediadores de la inflamación (Hardman y Limbird, 2003).

2.4.3. Toxicidad y efectos indeseables

Además de compartir muchos efectos terapéuticos, los AAINEs tienen en común algunos efectos indeseables tales como irritación, daño e inflamación a la mucosa gastrointestinal y ulceración (Staniscuaski y col., 1995), causados por un efecto directo entre la mucosa y los analgésicos y por un efecto indirecto, local por bloqueo de la inhibición plaquetaria (inhibición de la síntesis de tromboxano), inhibición de la motilidad uterina (prolongación de la gestación), inhibición de la función renal mediada por prostaglandinas, y reacciones de hipersensibilidad. El más frecuente es que tienden a inducir úlceras gástricas o intestinales, que a veces se acompañan de anemia por pérdida hemática resultante (Hardman y Limbird, 2003).

2.4.4. Usos terapéuticos

Los AAINEs ayudan al alivio sintomático de dolores leves y de mediana intensidad son útiles como analgésicos, antipiréticos, antitrombóticos y antiinflamatorios, además se utilizan en tratamiento reumático (fiebre reumática, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartrosis, polimialgia, etc.) ayudando a aliviar el dolor, reducir la inflamación y mejorar la función articular, evitando la rigidez matutina (Velasco y col., 1993).

2.5. ANALGÉSICOS TIPO OPIOIDE: MORFINA.

EL término opioide se empleó para designar compuestos derivados de opio, que son alcaloides naturales, así como a los compuestos sintéticos y semisintéticos de la morfina. La morfina es un analgésico potente y eficaz, que actúa sobre la percepción del dolor en el SNC y periférico, se emplea principalmente para aliviar el dolor agudo e intenso como en el infarto miocárdico, lesiones graves, quemaduras; es ampliamente usada en el dolor postquirúrgico y en enfermedades terminales, tal como el cáncer (Betbeder y col., 2000). Actualmente se dispone de numerosos compuestos que producen analgesia y otros efectos similares a los provocados por la morfina, pero ninguno de ellos ha demostrado ser superior para aliviar el dolor; por lo que, la morfina sigue siendo el patrón de referencia contra el cual se comparan los analgésicos de reciente aparición, en cuanto a potencia y eficacia (Hardman y Limbird, 2003).

2.5.1. Historia y composición del opio

La palabra *opio* deriva del nombre griego que significa “jugo”, ya que el compuesto se obtiene del jugo de las cápsulas de semillas verdes de la amapola, cuya denominación técnica es *Papaver* y cuya variedad más utilizada es *somniferum*. El jugo lechoso se torna pardo y endurece; formando una goma en forma de barra, la cual se pulveriza obteniéndose opio en polvo, que contiene más de 20 alcaloides. La base moderna de la farmacología fue establecida por Friederich Sertürner, farmacéutico alemán, quien en 1806, aisló una sustancia alcalina activa pura a partir del opio y la llamó Morfina (principal alcaloide del opio), en honor de Morfeo (Dios griego del sueño) (Katzung, 2002). Los alcaloides del opio se dividen en dos clases químicas, fenantrenos y benzilisoquinolinas. Los fenantrenos más importantes son morfina (10%), codeína (0.5%) y tebaína (0.2%). Las benzilisoquinolinas principales son papaverina (1%), y noscapina (6%) (Hardman y Limbird, 2003).

2.5.2. Estructura química de la morfina

La morfina es un alcaloide del opio, que pertenece a la clase química de los fenantrenos, cuya síntesis total en 1952 confirmó una estructura propuesta por Guiland y Robinson en 1925 que es la siguiente:

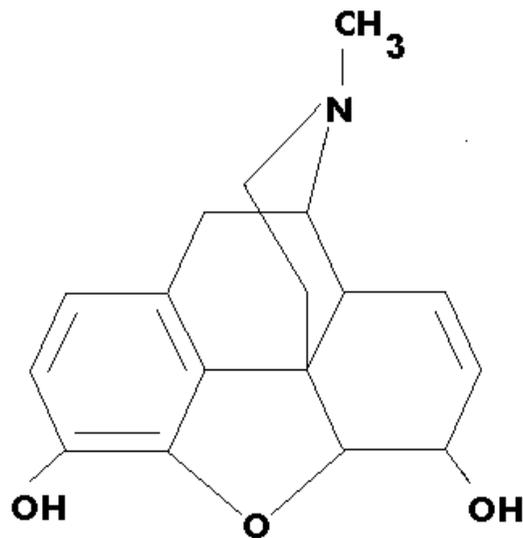


Figura 1. Estructura química de la morfina

Muchos derivados semisintéticos se preparan mediante modificaciones relativamente simples de la molécula de morfina. Entre las propiedades importantes de los opioides que pueden ser alterados por cambios estructurales se encuentran su afinidad por diversas especies de receptores opiáceos, actividad agonista *versus* antagonista, liposolubilidad y resistencia a la degradación metabólica (Hardman y Limbird, 2003). De igual forma, alteraciones moleculares relativamente pequeñas pueden cambiar drásticamente la acción de estos compuestos, de esta manera los agonistas parciales pueden actuar como

agonistas o antagonistas, debido a que hay diferentes receptores, es posible que algún compuesto tenga un efecto agonista en uno y en otro tenga un efecto antagonista parcial o antagonista (Katzung, 2002).

2.5.3. Propiedades fisicoquímicas de la morfina

La morfina es un opioide con un anillo aromático, y un anillo de piperidina, que posee un nitrógeno substituido con metilo y por lo tanto es una amina terciaria. Consta también de un puente de oxígeno y dos grupos hidroxilos, OH; uno fenólico en el anillo aromático y otro alcohólico en el anillo alicíclico. Tiene un pKa de 7.9, es ligeramente lipofílica y está ionizada en un pH fisiológico (Letrent y col., 1998; Betbeder y col., 2000). Considerando las características de la molécula de morfina necesarias para su acción analgésica, se sabe que el enantiómero activo es el isómero levo.

2.5.4. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central

Los principales efectos farmacológicos que producen la morfina y los analgésicos opioides sobre el SNC son: analgesia, euforia o disforia, sedación o sueño (aunque en algunas especies, por ejemplo el gato y el caballo, causan excitación), depresión del reflejo de la tos, depresión del centro respiratorio, depresión del centro vasomotor con hipotensión, depresión de algunos reflejos espinales y facilitación de otros, liberación de hormona antidiurética, causando oliguria, disminución de liberación de corticotrofina y hormona gonadotrófica

hipofisaria, miosis (pupila puntiforme), náuseas y vómitos por estimulación de la zona quimorreceptora desencadenante, seguida luego de depresión del centro del vómito, tolerancia y dependencia (Katzung, 2002). El efecto farmacológico más importante para nuestro interés es el analgésico.

2.5.4.1. Efecto analgésico

Las propiedades analgésicas de los opioides se relacionan con su habilidad para cambiar tanto la percepción del dolor, como la reacción del paciente a esta sensación desagradable.

El metabolito morfina-6 β -glucoronido (M6G) es más potente que la morfina cuando se ha administrado por vía intracerebroventricular (i.c.v.) (Smith y col., 1990; Ekblom y col., 1993, Gårdmark y Hammarlund-Udenaes, 1998a), por lo que la potencia de M6G con respecto a la morfina va a depender de la vía de administración, de la especie y del modelo usado (Gourlay, 1998). El metabolito M3G no muestra efectos analgésicos y antagoniza el efecto de morfina y del metabolito M6G en los receptores μ (Van Crugten y col., 1997; Lötsch y col., 1998; Stuart-Harris y col., 2000; Álamo y López-Muñoz, 2004).

2.5.5. Efectos farmacológicos periféricos

Los principales efectos farmacológicos que producen los analgésicos opioides y la morfina a nivel periférico son: disminución de la motilidad y aumento del tono de las vías digestivas con cierre de esfínteres, provocando estreñimiento, disminución de secreciones glandulares del tubo digestivo, y del páncreas, espasmo de vías biliares y contracción del esfínter de Oddi, aumento de tono del

músculo detrusor de la vejiga, causa de urgencia urinaria, pero incremento del tono del esfínter vesical que provoca dificultad para orinar; constricción de bronquios, en parte por liberación de histamina; solo de importancia en caso de insuficiencia respiratoria (por ejemplo asma o enfisema), dilatación de vasos sanguíneos cutáneos (incluyendo venas), especialmente de cara, cuello y parte alta de tórax, aumentó de la temperatura cutánea, acompañado de sudor y prurito, sobre todo de nariz; probablemente, en parte, dependiente de liberación de histamina, contracción de músculos erectos del pelo, causando piloerección, prolongación del parto y aumento de mortalidad neonatal (Katzung, 2002).

2.5.6. Receptores opiáceos

Diversos estudios de fijación y autorradiográficos de opioides en el cerebro y otros órganos sugieren la existencia de distintas clases de receptores que pueden reaccionar con los analgésicos opioides o péptidos opioides endógenos (Hardman y Limbird, 2003). Estos son las tres clases principales de receptores opiáceos μ (μ), kappa (κ) y, delta (δ) (Omote y col., 1990; Abbruscato y col., 1997; Besson, 1999), las cuales al interactuar con los analgésicos opioides o péptidos opioides endógenos producen un efecto farmacológico. Los receptores se encuentran en el asta dorsal, en las regiones espinales y supraespinales, en el locus coeruleus del tallo encefálico, área gris periacueductal del encéfalo medio (Katzung, 2002), es decir; en el cerebro, en el SNC a nivel supraespinal y espinal, en el asta dorsal de la médula espinal, en el hipotálamo, así como en la periferia y en el tracto gastrointestinal (Saeb-Parsy y col., 1999).

La morfina es un agonista puro y tiene su principal efecto en el receptor μ , sin embargo también tiene actividad con los receptores κ y δ (Olkola y col., 1995, Saeb-Parsy y col., 1999), los receptores μ tienen una amplia distribución en el SNC, están situados en ambos niveles supraespinal y espinal, son particularmente localizados en regiones del cerebro y médula espinal involucradas en la percepción del dolor; la distribución de los receptores μ a través del SNC es heterogénea y depende de la especie (Saeb-Parsy y col., 1999; Bouw y col., 2000).

2.5.7. Mecanismo de acción

El efecto analgésico de la morfina y de los péptidos opioides ocurre al unirse a los receptores opiáceos que pueden localizarse tanto en el SNC como en el periférico, así como en las células implicadas en procesos inflamatorios e inmunes (Waller y col., 2001; Álamo y López-Muñoz, 2004). La morfina no solo participa en la disminución o supresión de la sensibilidad dolorosa, sino también en el componente afectivo de desagrado y angustia que conlleva el dolor, sustituyéndolo por una sensación de bienestar (Velasco y col., 1993). El efecto analgésico de la morfina y fármacos opioides se debe a la unión principalmente con los receptores μ , que se encuentran tanto en las vías aferentes (ascendentes) que transmiten la información nociceptiva (dolor), como en las vías eferentes (descendente) que modulan la información nociceptiva (Velasco y col., 1993).

A nivel molecular, los receptores opiáceos están unidos a proteínas G, que disminuyen la concentración intracelular de AMPc por la adenilciclase, y por

tanto son capaces de actuar como compuertas de iones, organizar el calcio intracelular y fosforilar proteínas. Los opioides actúan modificando las permeabilidades iónicas en las neuronas, ya que pueden cerrar los conductos de calcio (Ca^{2+}) dependiendo del voltaje en las terminales nerviosas presinápticas y, en consecuencia, reducir la liberación de transmisores, o hiperpolarizar e inhibir así las neuronas posinápticas al abrir los conductos de potasio (K^+).

El efecto analgésico de la morfina esta mediado importantemente por la liberación de sustancias endógenas o neurotransmisores en estructuras supraespinales, como péptidos opioides endógenos, serotonina e histamina. En el tallo y la corteza cerebral encontramos dopamina, noradrenalina y serotonina, por lo que se sugiere que la morfina interactua con el sistema noradrenérgico y serotoninérgico para producir analgesia. A nivel de médula espinal la sustancia P, las encefalinas y la serotonina están involucradas (Smith y Reynard, 1993).

2.5.8. Farmacocinética de morfina

Estudios farmacocinéticos de morfina y sus metabolitos han sido extensamente evaluados en humanos y en algunas especies animales. La variabilidad en los parámetros farmacocinéticos reportados, dependen de varios factores tales como la edad, la presencia de disfunción renal, la dosis, la vía de administración, la duración del tratamiento, el fluido biológico, la duración del muestreo y la sensibilidad del método para estimar los niveles de morfina en el suero o plasma, así como la variabilidad interindividual (Bhargava y col., 1991; Van Crugten y col., 1997; Faura y col., 1998).

2.5.8.1. Absorción. Los analgésicos opioides son absorbidos fácilmente por el tracto gastrointestinal, por la mucosa rectal, nasal y bucal. Así como después de aplicar una inyección subcutánea, intramuscular, o intravenosa, o pueden ser absorbidos por vía transdérmica. Para la mayoría de los analgésicos opioides, incluyendo la morfina, el efecto es menor por vía oral que por vía parenteral, debido al metabolismo de primer paso que experimentan los analgésicos opioides en el hígado después de su absorción (Hardman y Limbird, 2003).

2.5.8.2. Distribución. Después de penetrar en el torrente sanguíneo, los opioides, entre ellos la morfina libre no ionizada, se distribuyen rápidamente desde la sangre a los tejidos como son: riñón, pulmón, hígado, y bazo; en los cuales se encuentran en mayor concentración. El músculo esquelético; debido a la masa que constituye, capta la fracción principal, aunque la concentración de los opioides, entre ellos la morfina, sigue siendo menor que en otros tejidos. En comparación con la mayor parte de los demás órganos, las concentraciones de opioides en el cerebro, por lo general, son pequeñas y la penetración en él es limitada, por lo que solo una parte relativamente pequeña de la dosis administrada atraviesa la barrera hematoencefálica llegando al SNC (Katzung, 2002).

2.5.8.3. Biotransformación. La transformación metabólica de los analgésicos opioides en humanos y animales tiene lugar básicamente en el hígado (Milne y col., 1997), por lo que la vía principal para el metabolismo de la morfina es su conjugación con el ácido glucorónico para formar metabolitos glucurónidos,

M6G y M3G (Horton y Pollack, 1991; Van Crugten y col., 1997); por otra parte la N-desmetilación metaboliza una pequeña cantidad a normorfina (Gourlay, 1998). En humanos, después de la administración oral, la conversión de morfina a M6G representa aproximadamente del 8 al 10% de la dosis, mientras que M3G, representa aproximadamente el 40% de la dosis, calculados con base a su recuperación en orina (Gourlay, 1998). El metabolito M6G posee potentes propiedades analgésicas; y en animales es antinociceptivo (Oullet y Pollack, 1997; Milne y col., 1997; Lötsch y col., 1998; Álamo y López-Muñoz, 2004). El metabolito M3G en humanos es inactivo ya que no muestra efecto analgésico, y es antagonista al efecto analgésico de la morfina y M6G, al igual que en experimentación animal, ha mostrado una cierta actividad antagonista al efecto antinociceptivo de la morfina y M6G (Ouellet y Pollack, 1997; Milne y col., 1997; Álamo y López-Muñoz, 2004). La morfina y sus metabolitos, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer sus efectos farmacológicos en el SNC (Ouellet y Pollack, 1997; Álamo y López-Muñoz, 2004). La vida media plásmatica de la morfina es de unas 2 h y la duración de la acción es de 4 a 5 h (Saeb-Parsy y col., 1999; Hardman y Limbird, 2003).

2.5.8.4. Excreción. Una vez que la morfina se conjuga formando los metabolitos glucurónidos M3G y M6G, éstos son excretados principalmente con la orina; después de ser filtrados por el glómerulo. Los túbulos renales secretan una pequeña cantidad de morfina libre y de morfina conjugada; otra pequeña cantidad pasa a la bilis y es eliminada con las heces. Aproximadamente, el 90% de la excreción total de morfina tiene lugar durante las primeras 24 h siguientes a su

administración (Hardman y Limbird, 2003). Los estudios en humanos han demostrado que entre un 8.5 y 12% de la dosis de morfina administrada por vía intravenosa u oral se excreta en la orina sin metabolizar, mientras que entre un 11 a 60% se excreta en forma de metabolitos. Los metabolitos más importantes en humanos son M3G y M6G (Milne y col., 1997), mientras que en ratas el metabolito M6G no se forma, solo se encuentra el metabolito M3G, lo cual permite que sea un modelo animal de elección en estudios farmacocinéticos (Ekblom y col., 1993; Gårdmark y col., 1998b).

2.5.9. Toxicidad y efectos indeseables

Los efectos indeseables de los analgésicos opioides y la morfina, son extensiones directas de sus acciones farmacológicas; éstos incluyen comportamiento inquieto, temblores, disforia, hiperactividad, depresión respiratoria, náusea, vómito, anorexia, aumento de la presión intracraneal, hipotensión, estreñimiento, disminución de la secreción ácida gástrica, retención urinaria, urticaria, constipación, sedación, somnolencia, perturbación mental, miosis, espasmo biliar, euforia, alteraciones en el sistema nervioso autónomo y endocrino, vértigo, obnubilación, también produce efectos hipertérmicos, tolerancia, dependencia física y psicológica (Liaw y col., 1988, Bhargava y col., 1991, Katzung, 2002). El efecto indeseable fundamental de la morfina es la depresión respiratoria. La intoxicación aguda grave por morfina se observa a consecuencia de una dosis excesiva de la misma. La triada de coma, pupila puntiforme y depresión intensa de la respiración suele permitir el diagnóstico de

intoxicación. Poco después de aparecer este cuadro la piel está pegajosa y pálida, para más tarde ponerse cianótica. La respiración es lenta, superficial e irregular. La frecuencia cardíaca es lenta y la presión arterial algo baja, pero el "schok", suele presentarse únicamente como fenómeno terminal. El antagonista opioide puro naloxona suprime rápidamente la intoxicación por morfina (Craig y Stitzel, 1990).

2.5.10. Usos terapéuticos

El uso terapéutico fundamental de la morfina o de un analgésico opioide es su acción analgésica en la disminución o supresión del dolor, como en el caso de: cólico biliar o renal, infarto miocárdico, intervenciones quirúrgicas extensas, quemaduras, lesiones graves; así como también para aliviar el dolor visceral, traumático y neuropático. La morfina y fármacos relacionados también pueden estar indicados para tratar el dolor crónico intenso que acompaña a enfermedades terminales. El dolor sordo continuo, se alivia mucho mejor que el dolor intermitente agudo, por lo que es necesario seleccionar un analgésico apropiado tanto al tipo de dolor como a la intensidad del mismo; con lo cual se evaluará cual será la vía de administración idónea, la duración del efecto, la eficacia máxima, la duración del tratamiento y la experiencia anterior con opioides (Katzung, 2002).

2.5.10.1. Analgesia. El dolor intenso constante, usualmente es bien controlado con los analgésicos opioides más eficaces, pero para un dolor intermitente agudo, no parece poder ser controlado. El dolor asociado con el cáncer y con otros padecimientos terminales debe tratarse en forma adecuada y

las consideraciones acerca de la tolerancia y dependencia deberán desecharse a cambio de hacer que el enfermo esté tan confortable como sea posible. El dolor agudo intenso se presenta en un cólico renal o biliar, y a menudo requiere un opioide agonista potente para un alivio adecuado (Katzung, 2002).

El uso de analgésicos opioides en el dolor crónico no maligno es controvertido en lo referente a su eficacia y seguridad y la posibilidad de dependencia y tolerancia. Se ha sugerido que su uso en ciertos pacientes con este tipo de dolor muestran, tras la terapia con opioides reducción del dolor de forma mantenida, aumento del rendimiento físico y psicológico y retorno a la actividad laboral, con la correspondiente disminución de efectos tóxicos, dependencia y tolerancia; por lo que su aceptación se va haciendo cada vez más generalizada (Nava y col., 2004).

2.5.11. Tolerancia

Los compuestos de tipo opioide como la morfina y sus análogos tienen una alta eficacia analgésica, pero producen efectos indeseables, tal como la tolerancia que no es sino la reducción del efecto analgésico después de repetidas aplicaciones, con la necesidad de aumentar la dosis para mantener el mismo efecto terapéutico (De Barutell y col., 2003). La tolerancia a la morfina es bien conocida como un fenómeno en el cual la respuesta analgésica disminuye como consecuencia de la administración continua del fármaco (Gårdmark y col., 1993). Aunque el desarrollo de tolerancia comienza con la primera dosis de estos opioides, por lo general no se manifiesta clínicamente hasta después de 2-3

semanas de repetir la experiencia con dosis terapéuticas ordinarias. La tolerancia se desarrolla con más facilidad cuando se administran dosis grandes a intervalos cortos y se reduce mucho por la administración de dosis pequeñas del analgésico con intervalos más grandes entre ellas (Katzung, 2002).

A la fecha, se han postulado diversos mecanismos para explicar el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina. Estos mecanismos ocurren tras la interacción de los péptidos opioides con los receptores opiáceos. Algunos autores consideran que el desarrollo de tolerancia y dependencia física, puede atribuirse a una verdadera respuesta celular adaptativa que resulta de los mecanismos mediados por segundos mensajeros y vías intracelulares (Álamo y López Muñoz, 2004). Se ha indicado que la acumulación de calcio neuronal que sigue al desarrollo de tolerancia es debido en parte a la administración crónica del opioide que incrementa los canales de calcio en el SNC; y dicho elemento químico a su vez antagoniza fácilmente los efectos de este compuesto. La tolerancia a la morfina se ha relacionado con la disminución de la actividad de la adenilciclase, así como de la Proteincinasa C (PKC) dependiente del Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC) (Álamo y López Muñoz, 2004). Además también se sabe que está involucrado el N-metil-D-aspartato (NMDA) de los receptores de glutamato y los canales de calcio, porque el bloqueo de estos sistemas de receptores reduce el desarrollo de tolerancia y dependencia que se produce con la administración crónica de opioides (Smith y Reynard, 1993). También se comprueba que la tolerancia y la dependencia están interrelacionadas probablemente debido al fenómeno

resultante de los cambios en la funcionalidad de los receptores opiáceos durante la continua administración de opioides (Waller y col., 2001).

En el caso de morfina, algunos autores han tratado de relacionar el desarrollo de tolerancia a morfina con los cambios en la farmacocinética del fármaco durante el tratamiento crónico (denominada como tolerancia farmacocinética). Es decir, la tolerancia, por decremento de concentración del fármaco, se presenta cuando un compuesto reduce su propia absorción o el ritmo de su paso a través de cualquier barrera biológica, o bien aumenta su propio ritmo de eliminación (Levine, 1996). Algunos autores han encontrado concentraciones plasmáticas menores en animales tolerantes a morfina comparados con los animales control. En ratas tratadas crónicamente con infusión de morfina alcanzaron un máximo a las 24 h en cerebro, y después empezaron a disminuir rápidamente a pesar de mantener la infusión. Esto comprende un incremento en la conjugación de morfina, incremento en la eliminación fecal, ó incremento del fármaco en el músculo o tejido peritoneal, lo que nos indica un cambio en la farmacocinética del fármaco (Patrick y col., 1978). La tolerancia farmacocinética ocurre cuando hay cambios en el metabolismo o en la distribución del fármaco y se observa con dosis repetidas. La reducción del efecto es debido a la disminución de la concentración del fármaco en el cuerpo (White e Irvine, 1999).

La presencia del metabolito M3G ha sido discutido como un factor que contribuye al desarrollo de tolerancia a la morfina, debido a que antagoniza los efectos tanto de ésta, como del metabolito M6G durante la administración

continua de morfina (Ekblom y col., 1993, Oullet y Pollack, 1997, Gårdmark y col., 1998b). Así mismo, estos autores han propuesto modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (FC/FD) que relacionan el efecto analgésico de morfina y/o del metabolito M3G, con la farmacocinética de los mismos. Sin embargo, también han postulado que aún cuando el metabolito M3G contribuye al desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de morfina, no es el único responsable del mismo, sino que existen otros factores farmacodinámicos, ya mencionados previamente. Por lo anterior, se concluye que el mecanismo de tolerancia involucra a los sistemas de neurotransmisores y péptidos opioides, así como también a posibles cambios en algunos procesos tales como el metabolismo, lo cual puede modificar las concentraciones del fármaco (farmacocinética) y consecuentemente, su efecto.

2.5.12. Dependencia física

El desarrollo de dependencia física, después de la administración repetida es una propiedad característica de todos los analgésicos opioides (Hardman y Limbird, 2003). La dependencia del tipo opioide se caracteriza por tolerancia, un síndrome de abstinencia relativamente específico y deseo vehemente y pronunciado, o dependencia psicológica. De hecho, el uso de opioides como analgésicos de forma cuidadosa, razonada y supervisada, causa muy pocos casos de dependencia psicológica en paciente sin historia previa de abuso de sustancias, existiendo más riesgos en aquellos pacientes que tenían el hábito de abuso de sustancias (Álamo y López Muñoz, 2004).

2.5.13. Síndrome de abstinencia

El síndrome de abstinencia se presenta cuando se suspende la administración del fármaco, se disminuye bruscamente la dosis, o se administra un antagonista (June y col., 1995; Álamo y López Muñoz, 2004); por lo que se ocasionan trastornos psicológicos y fisiológicos que incluyen ansiedad, miedo, nerviosismo, e irritabilidad, hostilidad, vómito, diarrea, calambres dolorosos en piernas y abdomen, micciones, rinorrea, lagrimeo, escalofríos, piloerección, aumenta la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la temperatura corporal, hiperventilación, hipertermia, midriasis (las pupilas se dilatan), insomnio, sueño inquieto, temblores, dolores articulares y musculares, anorexia, bostezos, deshidratación, cetosis, pérdida de peso, hipoforia, la glucemia y el metabolismo basal aumentan (Smith y Reynard, 1993). Con la morfina, los trastornos por lo general comienzan 6-10 h después de la última dosis. Los efectos máximos se observan en 36-48 h, después de las cuales la mayoría de los trastornos ceden gradualmente. Después de 5 días, la mayoría de los efectos han desaparecido, pero algunos pueden persistir por meses (Katzung, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los compuestos analgésicos son utilizados ampliamente para el alivio del dolor. El tipo de analgésicos empleados depende de su origen y de la gravedad e intensidad del dolor, el cual puede ser modificado por la edad, sexo, raza, nivel sociocultural, miedo, estrés, sueño y depresión (Valls, 1991).

Dentro de los fármacos analgésicos que tienen una alta eficacia analgésica en diferentes tipos de dolor intenso está la morfina. Los compuestos de tipo opioide como la morfina y sus análogos son usados con cautela debido a la serie de efectos indeseables que pueden producir, y cuando son empleados con frecuencia después de dosis repetidas o en tratamiento crónico pueden producir tolerancia o dependencia física y psicológica. Algunos autores han tratado de relacionar el desarrollo de tolerancia a morfina con los cambios en la farmacocinética del fármaco durante el tratamiento crónico. Sin embargo, existen controversias en la literatura, posiblemente debidas a las diferencias en los métodos empleados en la determinación tanto del efecto analgésico, como de las concentraciones de morfina en muestras biológicas. Con anterioridad, se demostró que después de la administración subcutánea de una dosis diaria de morfina, de 5.6 mg/kg de peso, por 6 y 12 días, en ratas Wistar hembra, se desarrolló tolerancia al efecto analgésico del fármaco. Por lo anterior, en el presente trabajo se estudió el curso temporal de la morfina en ratas Wistar hembra en tratamiento agudo una dosis de 5.6 mg/kg de peso y crónico una dosis diaria de 5.6 mg/kg de peso por 6 y 12 días, con el fin de investigar si existen también cambios en la farmacocinética de

morfina, utilizando dichos tratamientos. Las concentraciones de morfina se determinaron por un método de CLAR con detector electroquímico; (desarrollado previamente). El presente estudio se realizó con la finalidad de contar con información que permita sentar las bases para posteriores estudios clínicos y optimizar la terapia medicamentosa.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la farmacocinética de morfina en ratas Wistar hembra en tratamiento agudo (una dosis) y crónico (dosis diaria por 6 y 12 días), con la finalidad de contar con información adecuada para posteriores estudios clínicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Evaluar el método analítico por CLAR, propuesto para la cuantificación de morfina.

Estudiar el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de morfina de las muestras obtenidas en ratas Wistar hembra, en tratamiento agudo y crónico.

Analizar la farmacocinética de morfina, después de la administración subcutánea en ratas Wistar hembra, en tratamiento agudo y crónico.

5. HIPÓTESIS

Con el fin de analizar la farmacocinética de morfina en tratamiento agudo y crónico se planteó la siguiente hipótesis:

Existen diferencias en la farmacocinética de morfina en ratas Wistar hembra después del tratamiento crónico (dosis diaria de 5.6 mg/kg de peso, por 6 y 12 días), en comparación con un tratamiento agudo de una sola dosis.

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIAL

Ratas Wistar hembra [Cr1:(WI)BR] con un peso de 180–220 g

Plasma de rata libre de fármaco

Matraz volumétrico 5, 10, 100, 200, 500, 1000 mL (PYREX)

Matraz erlenmeyer 250 mL (PYREX)

Vaso de precipitado 50, 100, 250, 500, 1000 mL (PYREX)

Probeta graduada de vidrio 25, 50, 100 mL (PYREX)

Probeta graduada de plástico 500 mL (NALGENE)

Jeringa de vidrio sin punta 25 μ L (HAMILTON COMPANY)

Pipeta pasteur de vidrio con bulbo de plástico

Tubos de ensaye con tapa de rosca 20 mL (PYREX)

Tubos de ensaye 10 mL (PYREX)

Tubos de plástico endorff de 1.5 mL (NALGENE)

Frasco de vidrio transparente 1000 mL (WHEATON)

Frasco de vidrio ámbar 1000 mL (WHEATON)

Termómetro -20 a 150°C (TAYLOR)

Gradilla de acero inoxidable

Soporte Universal

Pinza de tres dedos

Pipeta endorff 200, 1000 μ L (GILSON MEDICAL ELECTRONICS)

Puntas de plástico para pipeta endorff 200, 1000 μ L

Tubos cónicos endorff (CIENFICA GAHL)

Jeringa de plástico 5 mL (PLASTIPLACK)

Tapones de hule de diferentes tamaños

Pizeta de plástico 250 mL

Agitador magnético

Membranas de 0.45 μ m (SARTORIUS)

Cartuchos de fase sólida Sep Pack C₁₈ (WATTERS)

Espátula de acero inoxidable

Papel parafilm (CAN COMPANY) (AMERICA)

Papel aluminio (KIMBERLY-CLARK CORPORATION)

Cinta adhesiva (TESA)

Marcadores de tinta indeleble (ESTERBROOK)

6.2. EQUIPO

Equipo de sonicación y desgasificación (BRANSON 3210)
Equipo de filtración (Millipore Kontes Ultra-Ware)
Centrifuga
Potenciometro (CORNING 340)
Parrilla de agitación magnética (CORNING)(Maxi Mix 1)
Balanza analítica (Mettler AE 163)
Balanza granataria (OHAUS)
Vortex thermolyne type 16700 Mixer
Equipo de filtración a vacío (Manifold) (Applied Instruments)
Tanque de nitrógeno (PRAXAIR)
Refrigerador (Acros)
Estufa (ELISA)
Cronómetro (General Electric)
Campana de extracción
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (PERKIN-ELMER) (serie 400)
Detector electroquímico amperométrico (BAS LC-4B) con celda electroquímica CC5 BAS
Integrador (PERKIN- ELMER) (LCI-100)
Bomba isocrática (PERKIN-ELMER)(LC 250)
Regulador (TDE) (RXCA-2000)
Columna: Adsorbosphere catecholamine 3U C₁₈ (3 μm) Alltech 28916 de 100 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno.

6.3. REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Ácido etilendiamino tetraacético, sal de sodio, R.A. (MERCK)
Octil sulfato de sodio, R.A. (SIGMA)
Fosfato de sodio monobásico, R.A. (MERCK)
Hidróxido de sodio, R.A. (J.T. BAKER)
Ácido bórico, R.A. (J.T. BAKER)
Cloruro de potasio, R.A. (J.T. BAKER)
Cloruro de potasio 4 M, R.A. (SIGMA)
Ácido fosfórico, R.A. (J.T. BAKER)
Clorhidrato de morfina (Estándar secundario)
Clorhidrato de naloxona (Estándar secundario)
Solución buffer pH 7.0 (Beckman)
Solución buffer pH 4.0 (Beckman)
Solución buffer pH 10.0 (Beckman)
Metanol HPLC (Mallinckrodt)
Agua HPLC (Mallinckrodt)
Agua destilada

6.4. MÉTODO ANALÍTICO

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE MORFINA EN PLASMA

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN DE MORFINA (STOCK)

Se pesó una cantidad de clorhidrato de morfina (Mor) (PM = 321.83 g/mol), equivalente a 2.5 mg de morfina (PM = 285.33 g/mol) y se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL, disolviendo y aforando a 5 mL con metanol HPLC (Concentración = 500 µg/mL).

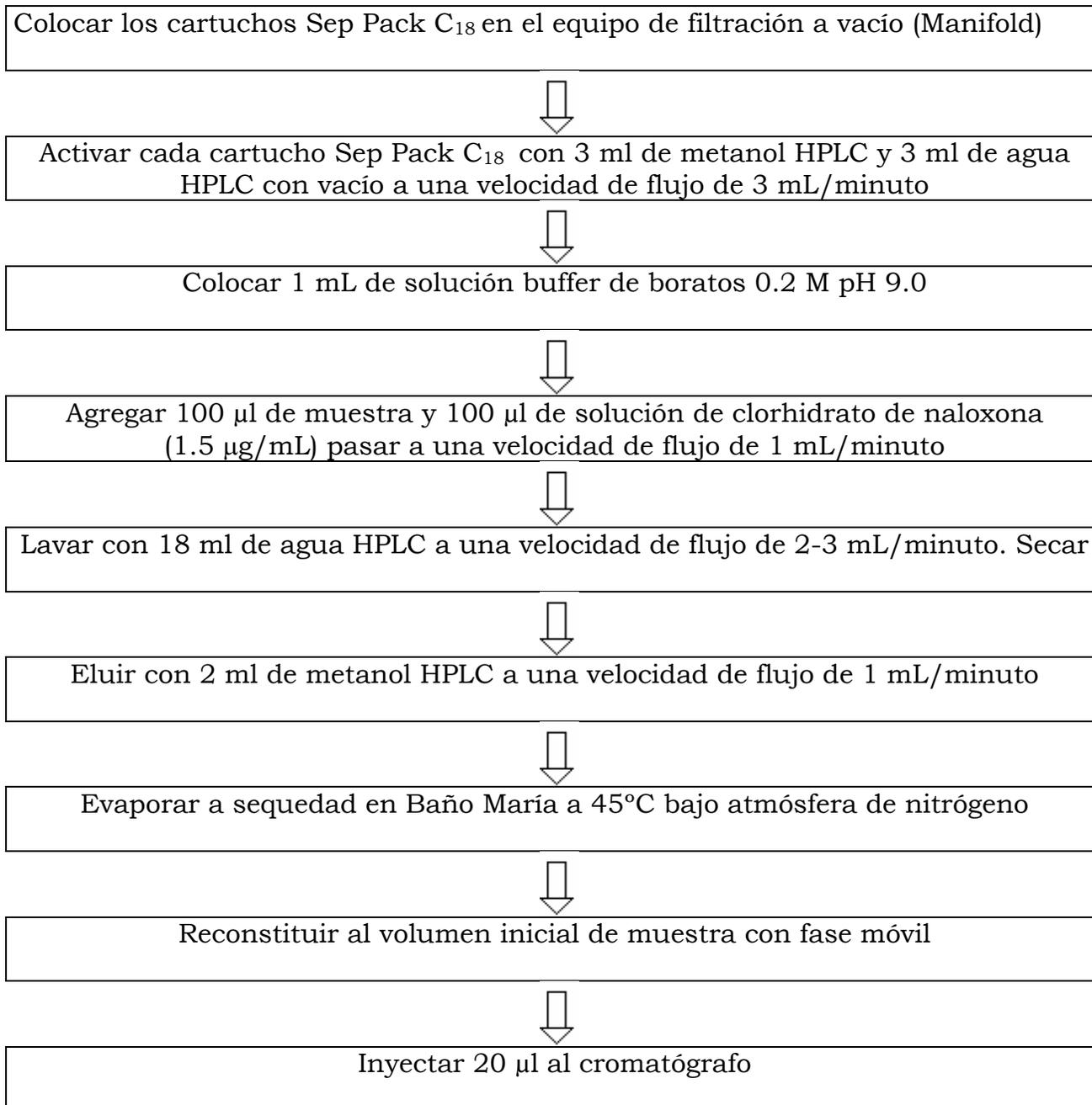
PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE MORFINA A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN (STOCK).

- a) Se transfirió 1 mL de la solución stock de morfina (C = 500 µg/mL) a un matraz volumétrico de 5 mL, se diluyó y aforó con agua HPLC (C = 100 µg/mL).
- b) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 5 mL, se diluyó y aforó con agua HPLC (C = 10 µg/mL).
- c) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 5 mL, se diluyó y aforó con plasma y se mezcló (C = 1 µg/mL).
- d) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 0.5 µg/mL = 500 ng/mL).
- e) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 0.25 µg/mL = 250 ng/mL).
- f) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 0.125 µg/mL = 125 ng/mL).
- g) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 0.0625 µg/mL = 62.5 ng/mL).
- h) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 0.03125 µg/mL = 31.25 ng/mL).
- i) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 0.015625 µg/mL = 15.625 ng/mL).
- j) Se transfirió 0.5 mL de la solución anterior a un tubo cónico endorff, se añadió 0.5 mL de plasma y se mezcló (C = 7.8125 ng/mL).

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE MORFINA EN FASE SÓLIDA

Se colocaron los cartuchos de fase sólida Sep-Pack C₁₈ en el equipo de filtración a vacío (Manifold), se activaron con 3 mL de metanol HPLC y 3 mL de agua HPLC, los cuales se hacen pasar con ayuda de vacío a una velocidad de flujo de 3 mL/min. Posteriormente se colocó 1 mL de solución buffer de boratos 0.2 M pH 9.0, se agregaron 100 µL de muestra más 100 µL de solución de clorhidrato de naloxona (Nx) como estándar interno y se pasó por el cartucho, con ayuda de vacío, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se lavó cada cartucho con 18 mL de agua HPLC a una velocidad de flujo de 2 a 3 mL/min; se tiró el agua de lavado, y se secó el equipo. Se colocaron los tubos, previamente identificados, en la gradilla del equipo, para recibir los compuestos de interés (clorhidrato de morfina y clorhidrato de naloxona), y se eluyeron con 2 mL de metanol HPLC a una velocidad de flujo de 2 mL/min. El solvente se evaporó a sequedad en Baño María a 45°C, bajo atmósfera de nitrógeno. Se reconstituyó, al volumen inicial de muestra, con solución buffer de fosfatos-metanol (Fase Móvil) y se inyectaron 20 µL al cromatógrafo (Ver método de extracción de morfina en fase sólida).

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MORFINA EN FASE SÓLIDA



NOTA: Las muestras pueden ser de la curva de calibración de morfina en plasma ó muestras de plasma de rata, obtenidas antes y después de la administración de 5.6 mg de morfina/kg de peso.

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Para el desarrollo e implementación del método se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución PERKIN ELMER serie 400, con detector electroquímico amperométrico (BAS LC-4B) y celda electroquímica CC5 BAS, utilizando un potencial de 0.80 V (oxidación), una bomba isocrática PERKIN ELMER (LC 250) y un integrador PERKIN ELMER (LCI-100). La separación de los compuestos se realizó en una columna Adsorbosphere catecholamine 3U C₁₈ (3 µm), Altech de 100 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno. La fase móvil consistió de una mezcla de solución buffer de fosfatos 0.1 M, conteniendo 2.0 mM de EDTA·2Na y 2.4 mM de octil sulfato de sodio, pH 3.6 y metanol HPLC, en una proporción 75:25 (v/v), a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. El estándar interno que se utilizó fue clorhidrato de naloxona (solución acuosa de 1.5 µg/mL), y el volumen de inyección fue de 20 µL.

EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Especificidad del método analítico

Para evaluar la especificidad del método, se analizaron muestras blanco de plasma de rata (libre de fármaco) y muestras de plasma adicionadas de estándares de Mor y Nx, siguiendo el procedimiento de extracción descrito y se inyectaron al cromatógrafo utilizando las condiciones cromatográficas indicadas. Paralelamente se inyectaron muestras de estándares (Mor y Nx), disueltos en fase móvil, a fin de comparar los tiempos de retención de los picos obtenidos y detectar posibles interferencias atribuibles a componentes endógenos del plasma.

Linealidad del método analítico

Se prepararon cinco curvas de calibración de morfina en plasma a diferentes concentraciones 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 ng/mL, cada una fue a partir de una misma solución stock; las cuales se sometieron al método descrito de extracción de morfina en fase sólida. A partir de los resultados obtenidos se gráfico la respuesta, como relación de alturas (RH), esto es, altura del pico de Mor/altura del pico de Nx, contra la concentración de morfina. Se calculó, por el método de estimación por mínimos cuadrados, el valor del coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y, la ordenada al origen (b). Adicionalmente se realizó el ANDEVA de la regresión lineal, para determinar si la regresión es significativa, y se calculó el intervalo de confianza al 95% (I.C. 95%) para el valor de la pendiente y la ordenada al origen. El coeficiente de correlación de la regresión debe ser mayor o igual a 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que 3%.

Precisión del método analítico

Se prepararon soluciones de morfina en plasma por quintuplicado a diferentes concentraciones 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 ng/mL, las cuales fueron sometidas al método de extracción en fase sólida. A partir de los datos obtenidos se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V. %). El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%, a excepción del límite menor de cuantificación donde se acepta hasta un 20% de C.V.

Exactitud del método analítico

Se prepararon soluciones de morfina en plasma por quintuplicado en el rango de concentraciones de 30 a 1000 ng/mL, y una curva de calibración de morfina en plasma; las cuales se sometieron al método de extracción propuesto. Se determinó la concentración recuperada de cada muestra, comparando la respuesta obtenida en cada caso, con una curva de calibración analizada e inyectada el mismo día de análisis. La exactitud se obtuvo al graficar la cantidad de morfina recuperada contra la cantidad de morfina adicionada. El valor promedio de las determinaciones de cada nivel de concentración debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

6.5. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

Animales en experimentación

El estudio de la farmacocinética de morfina se llevó a cabo utilizando ratas Wistar hembra [Crl:(WI)BR] con un peso de 180-220 g, siguiendo las recomendaciones del Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (1980), así como los "Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales" (Zimmermann, 1983). Las ratas se dividieron en tres grupos (6 ratas por grupo). El Grupo I (tratamiento agudo), al que se administró una sola dosis de morfina de 5.6 mg/kg de peso, por vía subcutánea (s.c.), el Grupo II (tratamiento crónico, por 6 días), al que se administró una dosis diaria de 5.6 mg/kg de peso, s.c., por 6 días, y, el Grupo III (tratamiento crónico, por 12 días); al que se administró una

dosis diaria de 5.6 mg/kg de peso, s.c., por 12 días. Los animales se mantuvieron en jaulas adecuadas para roedores (6 ratas por jaula), en un cuarto especial y a temperatura constante (22°C), con ciclos luz/obscuridad alternados de 12 h. Doce horas antes del experimento, se les retiró el alimento, pero se mantuvo libre acceso al agua.

Preparación de tubos

Se preparó una solución de heparina a una concentración de 1mg/mL (1 mg equivale a 100 U.I.) en solución salina isotónica (0.9% de NaCl). Se agregó a cada tubo de plástico ependorff 0.02 mL de solución de heparina y se colocaron en la estufa a 50°C, se dejó evaporar a sequedad (para no diluir la muestra). Igualmente las jeringas que se utilizaron en la toma de muestras se enjuagaron con la misma solución (succionando y vaciando inmediatamente) para evitar que se coagularan las muestras.

Canulación de los animales

Se canularon las ratas en la arteria caudal mediante una cánula de 0.28 mm de diámetro interno, y 0.61 mm de diámetro externo, conectada a una cánula PE-50 (la cánula se mantuvo heparinizada y tapada con un alfiler).

Estudio farmacocinético

Se administró a cada una de las ratas 5.6 mg de morfina/kg de peso, s.c., según el tratamiento indicado y se tomaron muestras de sangre (100-150 µL), a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 24 h, en tubos heparinizados (ver preparación de tubos).

Al tomar cada una de las muestras, se quitó la aguja y se vació en el tubo resbalando por la pared (para no hemolizar). Se mezcló con cuidado, invirtiendo ligeramente el tubo con suavidad. Se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 minutos. Se succionó el plasma con pipeta ependorff y se colocó en otro tubo ependorff (sin heparina), perfectamente rotulado por número de rata y número de muestra correspondiente a cada tiempo. Los tubos de una misma rata se envolvieron en papel aluminio y todos los correspondientes a un mismo tratamiento se colocaron en una bolsa de plástico etiquetada con el nombre del tratamiento, número de rata, fecha y se guardaron en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

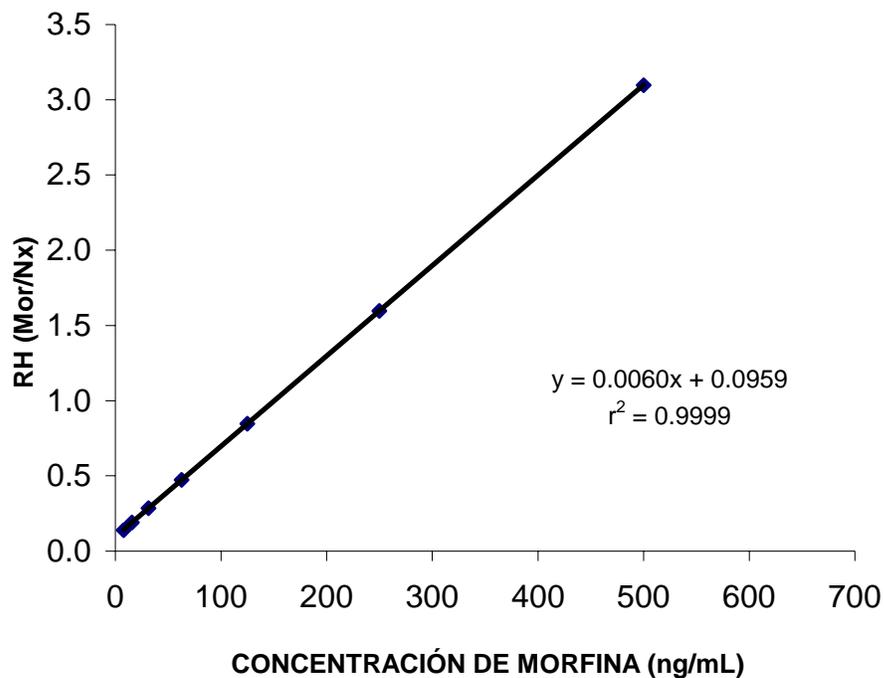
Especificidad del método analítico

El cromatograma obtenido al inyectar los estándares disueltos en fase móvil, bajo las condiciones descritas, presentó picos finos bien definidos, con buena resolución de los compuestos (Mor y Nx). Se consideró que el método analítico es específico, ya que no presentó interferencias de componentes endógenos del plasma. El método de detección empleado (amperométrico) también es específico para morfina inalterada, puesto que el metabolito principal que se forma en ratas, M3G, no se detecta debido a que el grupo fenólico que es oxidado se encuentra conjugado (Todd y col., 1982). Por otro lado se sabe que el metabolito M6G, no se forma en la rata, por lo que el método únicamente cuantifica morfina inalterada.

Linealidad del método analítico

La linealidad del método se determinó a partir de cinco curvas de calibración de morfina en plasma en un rango de concentración de 7.8125 a 500 ng/mL, analizadas por el procedimiento mencionado y con los resultados obtenidos se gráfico la respuesta (RH) contra la concentración de morfina en plasma. Se trabajó con RH en vez de relación de área (RA), debido a que las alturas daban una mejor correlación. En la gráfica 1, se muestra el promedio de los resultados para la linealidad del método, en el intervalo de concentraciones de morfina en plasma de 7.8125 a 500 ng/mL.

Con base a los resultados obtenidos pendiente $m=0.0060$, ordenada al origen $b=0.0959$, coeficiente de correlación $r=0.9999$, y coeficiente de determinación $r^2=0.9999$; se observa que al compararlos con los criterios de aceptación para la linealidad de métodos analíticos ($r^2=0.999$, $b=0$) existe una relación lineal entre las variables concentración de morfina y relación de altura, por lo que se concluye que el método es lineal, ya que cumple con los criterios para la linealidad que están establecidos oficialmente (FNEUM, 2000).



Gráfica 1. Linealidad del método de cromatografía de líquidos para la cuantificación de morfina en plasma ($n = 5$).

Se realizó también el ANDEVA de la regresión en donde el valor de F calculado fue de 2149122.361 y comparándolo con el valor de F en tablas que es de 2.80317E-15, con un error relativo de 0.001797729. Esto indica que la regresión es significativa ($p < 0.05$); ya que el error relativo es $< 0.1\%$; y se obtuvo

una r^2 de 0.9999; el comportamiento matemático de los resultados se explica con la ecuación de la línea recta: $y = mx + b$. También se calcularon los intervalos de confianza al 95% (I.C. 95%) para el valor de la pendiente y de la ordenada al origen.

El I.C. 95% para el valor de la pendiente va de 0.0059 a 0.0060.

El I.C. 95% para el valor de la ordenada al origen va de 0.0936 a 0.0982.

Por lo tanto se concluye que los resultados cumplen con los criterios para la linealidad del método.

Precisión del método analítico

Los resultados para la precisión del método analítico se presentan en la Tabla 1, en la cual se observa que el coeficiente de variación (C.V.), en el intervalo de concentraciones evaluadas, es menor al 15%, y el coeficiente de variación promedio es de 7.9064%. Puesto que el criterio para la precisión de métodos analíticos acepta un coeficiente de variación límite del 15% (FNEUM, 2000) se considera que el método es preciso.

Tabla 1 Resultados promedio de la precisión del método de CLAR para morfina en plasma

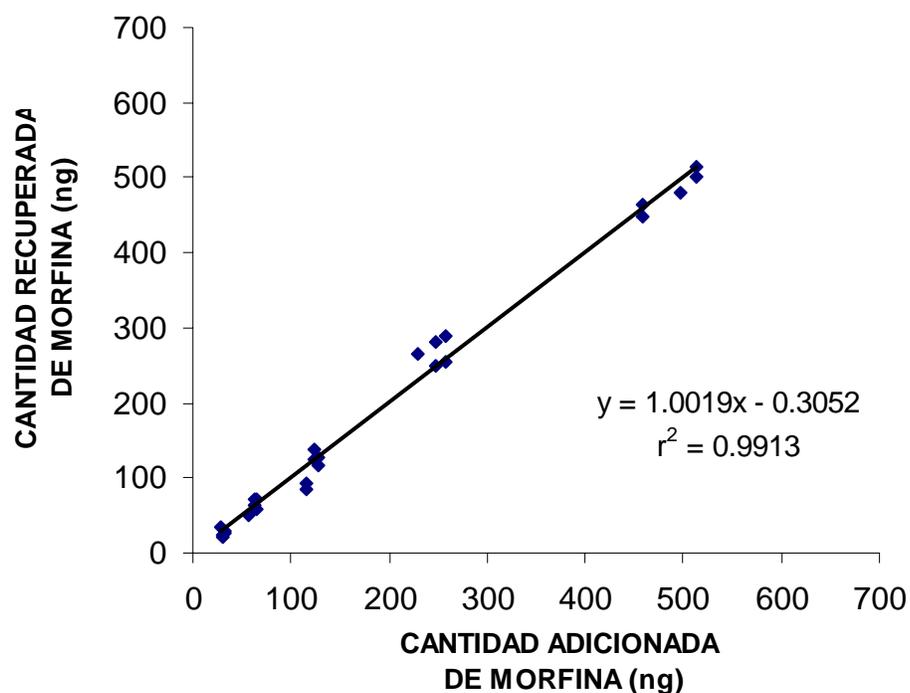
Concentración de morfina (ng/mL)	Relación de Altura (RH) Morfina/Naloxona (Mor/Nx)	Desviación Estándar (D.E.) %	Coficiente de variación (C.V.) %
7.8125	0.1393	0.0089	6.3601
15.625	0.1908	0.0141	7.4100
31.25	0.2845	0.0215	7.5497
62.5	0.4721	0.0377	7.9850
125	0.8471	0.0713	8.4207
250	1.5972	0.1393	8.7211
500	3.0974	0.2756	8.8983
		Promedio de C.V.	7.9064

La concentración más baja del intervalo evaluada con el método propuesto fue de 7.8125 ng/mL con la cual se obtiene un coeficiente de variación de 6.3601% y este valor es inferior al valor límite (20%), por lo que la determinación a este nivel de concentración es confiable. Con esto se concluye que la precisión del método está dentro de los valores límite establecidos, y por lo tanto cumple con los criterios de aceptación.

Exactitud del método analítico

Se analizaron por quintuplicado muestras de morfina en plasma en el rango de 30 a 1000 ng/mL utilizando el método de extracción propuesto y se determinó la concentración recuperada de cada muestra comparando la respuesta obtenida en cada caso con una curva de calibración en plasma analizada e inyectada el mismo día de análisis. La cantidad adicionada de morfina, se gráfico contra la cantidad recuperada de morfina. Los resultados se muestran en la Gráfica 2.

El valor de la pendiente fue de 1.0019, lo cual indica que el valor promedio de recuperación es prácticamente del 100%. Se calculó también el valor promedio de las determinaciones (% recuperado) en cada uno de los niveles de concentración analizados. Todos los datos estuvieron dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración, por lo que el método es exacto.

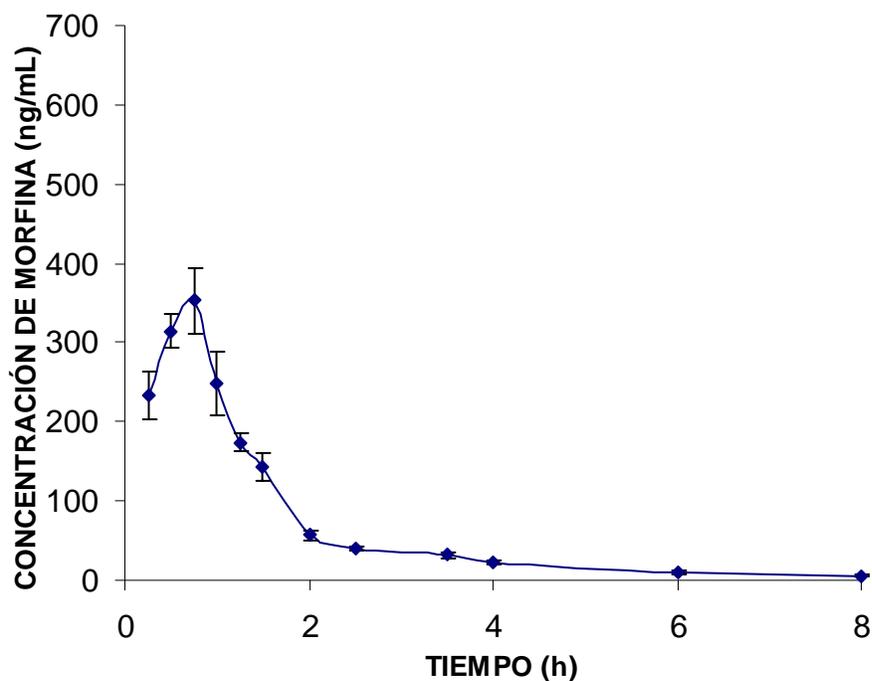


Gráfica 2. Exactitud del método de cromatografía de líquidos para la cuantificación de morfina en plasma ($n = 5$).

7.2 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

Se estudió la farmacocinética de morfina en ratas Wistar hembra con un peso de 180 a 220 g, después de la administración, s.c., de una dosis de morfina de 5.6 mg/kg de peso divididas en tres grupos. El Grupo I (tratamiento agudo), el Grupo II (tratamiento crónico, por 6 días) y, el Grupo III (tratamiento crónico, por 12 días), cada uno con 6 ratas; las cuales fueron canuladas (vía caudal), tomándose muestras de sangre (100-150 μ L) a 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 24 h en tubos heparinizados. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 10 minutos para separar el plasma, el cual se guardó en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

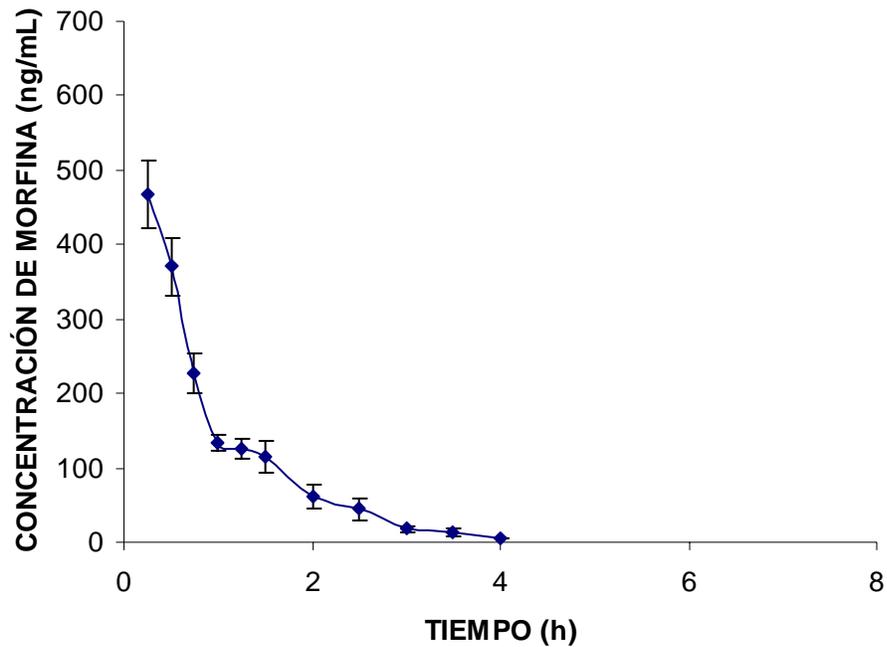
El análisis de las muestras se realizó empleando el método CLAR, de fase inversa con detector electroquímico, previamente evaluado en el laboratorio. El día de análisis de las muestras, se preparó una curva de calibración de morfina en plasma, la cual se extrajo en fase sólida al igual que las muestras de plasma de rata. La concentración de morfina en cada muestra se obtuvo al interpolar los resultados obtenidos de los cromatogramas, para cada uno de los grupos, en la curva de calibración preparada el mismo día. Con los datos de concentración, graficados contra el tiempo, se obtuvieron los cursos temporales de concentración plasmática para cada rata. En la gráfica 3 se muestra el promedio de los resultados de seis ratas en tratamiento agudo, a las cuales se les administró una sola dosis de 5.6 mg/kg de morfina. En el eje de las abscisas está representado el tiempo en horas (h) y el eje de las ordenadas corresponde a la concentración plasmática de morfina (ng/mL). Los datos se ajustaron adecuadamente a un modelo de dos compartimentos.



Gráfica 3. Resultados promedio de concentraciones plasmáticas de morfina en función del tiempo, después de la administración de 5.6 mg/kg en tratamiento agudo (t.a.) en ratas Wistar hembra.

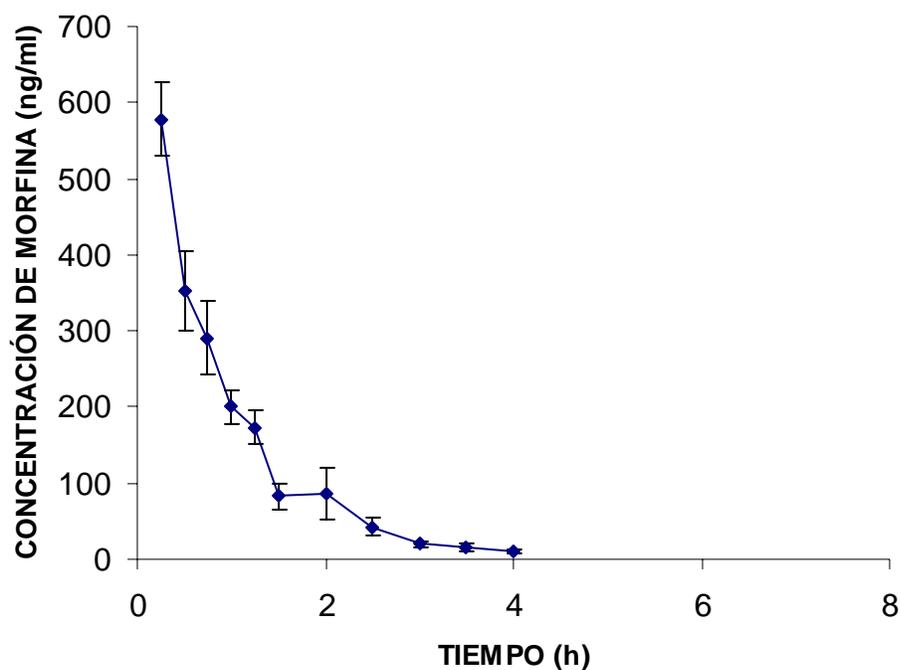
A partir de la fase lineal terminal, al graficar el log de la concentración *versus* tiempo se obtuvo la pendiente m , que corresponde a la constante de eliminación (K_e). El valor obtenido fue $0.37 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ ($r=-0.9917$).

En la gráfica 4 se muestran los resultados de concentraciones plasmáticas de morfina en función del tiempo, después de administrar una dosis de 5.6 mg/kg de peso por 6 días, en tratamiento crónico, en ratas Wistar hembra. Los datos se ajustaron a un modelo de dos compartimentos y se obtuvo un valor de K_e de $1.14 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ ($r=-0.9928$).



Gráfica 4. Resultados promedio de concentraciones plasmáticas de morfina en función del tiempo, después de la administración de 5.6 mg/kg en tratamiento crónico (t.c.) por 6 días en ratas Wistar hembra.

En la gráfica 5 se muestran los resultados del tratamiento crónico en ratas Wistar hembra después de administrar una dosis de 5.6 mg/kg de peso por 12 días. Al graficar el logaritmo de la concentración de morfina en ng/mL contra tiempo en h, se obtuvo de la fase lineal terminal una K_e de $1.05 \pm 0.31 \text{ h}^{-1}$ ($r=-0.9899$). Los datos se ajustaron a un modelo de dos compartimentos.



Gráfica 5. Resultados promedio de concentraciones plasmáticas de morfina en función del tiempo, después de la administración de 5.6 mg/kg en tratamiento crónico (t.c.) por 12 días en ratas Wistar hembra.

A partir de los resultados de concentración plasmática anteriores, para cada uno de los grupos en experimentación, se obtuvieron los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos, los cuales se muestran en la tabla 2. En el Grupo II (tratamiento crónico, por 6 días), y en el Grupo III (tratamiento crónico, por 12 días), solo se determinaron las concentraciones durante las 4 h siguientes a la administración del fármaco, debido a que no fueron detectables después de este tiempo, por lo que se determinó el área bajo la curva de tiempo cero a 4 h ($ABC_{0 \rightarrow 4}$), por el método de trapezoides. En el Grupo I (tratamiento agudo), se determinaron las concentraciones hasta las 8 h siguientes a la administración del fármaco. La concentración plasmática máxima ($C_{p_{máx}}$), así como el tiempo

máximo ($t_{m\acute{a}x}$) en el que se alcanzó dicha concentración, se obtuvieron directamente a partir de la respuesta más alta al graficar la concentración plasmática de morfina (ng/mL) contra el tiempo (h), para cada tratamiento y se calculó el valor promedio de seis ratas ($n=6$).

Tabla 2 Resultados promedio de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de los grupos en experimentación ($n=6$)

TRATAMIENTO	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$C_{p_{m\acute{a}x}}$ (ng/mL)	K_e (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	$ABC_{0\rightarrow t}$ (ngh/mL)	$ABC_{0\rightarrow\infty}$ (ngh/mL)	Cl_T (mL/kg/h)
GRUPO I TRATAMIENTO AGUDO (t.a.)	0.75 ± 0.05	352.74 ± 35.55	0.37 ± 0.04	1.87 ± 0.18	521.36 ± 51.87	538.00 ± 53.53	10.74 ± 0.33
GRUPO II TRATAMIENTO CRÓNICO (t.c.) (6 DÍAS)	0.25 ± 0.00	467.09 ± 44.46	1.14 ± 0.06	0.61 ± 0.03	443.91 ± 23.74	448.28 ± 23.97	12.62 ± 2.07
GRUPO III TRATAMIENTO CRÓNICO (t.c.) (12 DÍAS)	0.25 ± 0.00	578.27 ± 48.73	1.05 ± 0.31	0.66 ± 0.19	515.78 ± 47.97	526.36 ± 48.73	10.86 ± 0.78

Con los parámetros farmacocinéticos obtenidos se realizó un ANDEVA, para evaluar si existe diferencia significativa entre el tratamiento crónico (6 y 12 días) y el tratamiento agudo con un $\alpha = 0.05$ y, después se compararon por una prueba de Dunnet T3 (comparaciones múltiples), empleando para los cálculos el paquete estadístico SPSS versión 10; y así poder establecer si existe diferencia significativa de los tratamientos crónicos por 6 y 12 días con respecto al tratamiento agudo. Una diferencia significativa entre las medias se indicó por una $p < 0.05$.

Posteriormente se compararon $C_{p_{m\acute{a}x}}$ y $t_{m\acute{a}x}$ del tratamiento crónico contra el tratamiento agudo. La $C_{p_{m\acute{a}x}}$ en el tratamiento agudo se alcanza en un tiempo de 0.75 h y es de 352.74 ± 35.55 ng/mL, y en el tratamiento crónico se alcanza a un

tiempo menor, que es de 0.25 h a 6 y 12 días lo que corresponde a los valores de 467.09 ± 44.46 ng/mL y 578.27 ± 48.73 ng/mL respectivamente, por lo que se demostró que las concentraciones de morfina aumentaron ligeramente, lo cual era de esperarse por la acumulación del fármaco en tratamiento crónico, sin embargo, los niveles en tratamiento crónico (6 y 12 días) descendieron rápidamente; por lo que no se observaron concentraciones detectables después de las 4 h siguientes a la administración ($p < 0.05$). La disminución encontrada en las concentraciones de morfina en las ratas tratadas crónicamente, concuerda con los resultados de otros autores (Patrick y col., 1978), quienes demostraron una marcada disminución en las concentraciones del fármaco en plasma y cerebro de ratones tratados crónicamente con morfina y en los que se desarrolló tolerancia al efecto analgésico. El $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ que corresponde a la cantidad disponible de fármaco, se analizó por el ANDEVA para establecer si existe diferencia significativa en cada tratamiento con un $\alpha = 0.05$, por lo que encontramos que en el tratamiento agudo se presentó un $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ de 538.00 ± 53.53 ngh/mL si hay diferencia significativa con respecto al tratamiento crónico a los 6 días que es de 448.28 ± 23.97 ngh/mL ($p < 0.05$). Con respecto al tratamiento crónico a los 12 días cuyo valor es de 526.36 ± 48.73 ngh/mL estadísticamente no se encontró diferencia significativa en comparación con el tratamiento agudo ($p > 0.05$).

Al aplicar la prueba de Dunnet T3 y utilizando el paquete estadístico SPSS versión 10 para comparar los tratamientos no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las $C_{p_{m\acute{a}x}}$ ni en el $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ después del tratamiento crónico a 6 y 12 días al ser comparados con los valores del tratamiento agudo.

En el tratamiento crónico por 6 y 12 días, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la eliminación del fármaco. La k_e aumentó de manera significativa de $0.37 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ en el tratamiento agudo, hasta $1.14 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ a los 6 días y $1.05 \pm 0.31 \text{ h}^{-1}$ a los 12 días en el tratamiento crónico; por lo que el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) después de los tratamientos crónicos, comparado con el de la administración de morfina en el tratamiento agudo, disminuyó de $1.87 \pm 0.18 \text{ h}$ hasta $0.61 \text{ h} \pm 0.03 \text{ h}$ para el tratamiento de 6 días y hasta $0.66 \pm 0.19 \text{ h}$ para el tratamiento por 12 días ($p < 0.05$). En el tratamiento agudo la K_e es aproximadamente una tercera parte con respecto al tratamiento crónico por lo que en la misma proporción el $t_{1/2}$ para ambos tratamientos crónicos, es una tercera parte con respecto al tratamiento agudo. Debido a esto, la concentración plasmática a las 4 h (C_{p4h}) se redujo de $22.28 \pm 1.95 \text{ ng/mL}$ t.a. hasta $4.97 \pm 0.86 \text{ ng/mL}$ para t.c. a 6 días y hasta $11.11 \pm 1.7 \text{ ng/mL}$ para t.c. a 12 días ($p < 0.05$). Estos datos concuerdan con la disminución del efecto a las 4 h de administrado el fármaco en tratamiento crónico (6 y 12 días) al ser comparados con el tratamiento agudo (Domínguez y col., 2000). Puesto que diversos autores han establecido la relación que existe entre la concentración de morfina en circulación sistémica con la concentración en el sitio de acción por un lado y, por otro con el efecto global observado, es factible postular que los cambios originados en la farmacocinética del fármaco con respecto al $t_{1/2}$, K_e , y Cl_T durante el tratamiento crónico contribuyen de manera importante al desarrollo de tolerancia al efecto analgésico.

8. CONCLUSIONES

El método analítico para la cuantificación de morfina es lineal, preciso, exacto, y específico; ya que cumple con los criterios de aceptación establecidos oficialmente.

Existen diferencias en la farmacocinética de morfina en ratas después del tratamiento crónico de una dosis diaria de morfina de 5.6 mg/kg durante 6 y 12 días, con respecto al tratamiento agudo, principalmente en lo que se refiere al $t_{1/2}$, K_e y Cl_T .

Los cambios en la farmacocinética de morfina, observados durante el tratamiento crónico por 6 y 12 días pueden estar relacionados con el desarrollo de tolerancia.

El método analítico empleado nos ha permitido estudiar la farmacocinética de morfina mediante la purificación de las muestras por extracción en fase sólida, y la utilización de CLAR con detector electroquímico, en ratas Wistar hembra; con la finalidad de aportar información útil que nos lleve a un mejor tratamiento del dolor en humanos.

9. SUGERENCIAS

Para determinar el curso temporal de las concentraciones plasmáticas, se requiere de métodos analíticos altamente confiables y sensibles, que permitan estudiar la farmacocinética de morfina y sus metabolitos, empleando equipo sensible y de bajo costo; por lo que se sugiere:

1. Qué se debería emplear métodos analíticos que sean suficientemente selectivos y sensibles para determinar las concentraciones plasmáticas de morfina y sus metabolitos, como puede ser CLAR con detección electroquímica.
2. Emplear un procedimiento sencillo altamente rápido que permita la purificación de las muestras por extracción en fase sólida, puesto que este ha dado mejores resultados.
3. Debido a la dificultad que existe de evaluar la farmacocinética de morfina y sus metabolitos en los animales, se sugiere estudiar el comportamiento de éstos al efecto condicionado, para posteriormente realizar todos los análisis en un mismo animal.
4. El desarrollo de tolerancia durante el tratamiento crónico con analgésicos opioides, es hoy en día una problemática, por lo que se debería de dar continuación a este estudio con morfina y/o la combinación de ésta, con algún AAINEs, con la finalidad de aportar información para posteriores estudios clínicos que ayuden a aliviar el dolor.

10. REFERENCIAS

- (1) Abbruscato TJ, Thomas SA, Hruba VJ, y Davis TP. (1997) Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and μ -selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 280 (1): 402-409.
- (2) Álamo C, y López-Muñoz FJ. (2004) Morfina. *Dolor*, 19: 64-88.
- (3) Besson JM. (1999) The neurobiology of pain. *Lancet*, 353: 1610-1615.
- (4) Betbeder D, Sperandio S, Latapie JP, de Nadai J, Etienne A. Zajac JM. y Frances B. (2000) Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm Res*, 17 (6): 743-748.
- (5) Bhargava HN, Villar VM, Gulati A, y Chari G. (1991) Analgesic and hyperthermic effects of intravenously administered morphine in the rat are related to its serum levels. *J Pharmacol Exp Ther*, 258 (2): 511-516.
- (6) Bourquin D, Lehmann T, Hämmerling R, Bühner M, y Brenneisen R. (1997) High-performance liquid chromatographic monitoring of intravenously administered diacetylmorphine and morphine and their metabolites in human plasma. *J Chromatogr B*, 694: 233-238.
- (7) Bouw MR, Gårdmark M, y Hammarlund-Udenaes M. (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats-a microdialysis study. *Pharm Res*, 17 (10): 1220-1227.

- (8) Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS, Longo DL, Kasper DL, Jameson JL. (2002) Harrison: Principios de medicina interna. 15^a ed. México: Edit. McGraw-Hill Interamericana, pp. 71-72.
- (9) Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (1980) Ethical Standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain*, 9: 141-143.
- (10) Craig CR, y Stitzel RE. (1990) Modern pharmacology. 3^a. ed. United States of America: Little, Brown and Company, pp. 517-532.
- (11) De Barutell FC, Rivera CMV, Martínez P, Mora ML, Nava OTA, y Mesas IA. (2003) Tolerancia a opioides en tratamientos a largo plazo en dolor crónico no maligno. *Dolor*, 19 (2): 125-130.
- (12) Domínguez RAM, Delgadillo HGP, Ventura MR, Díaz RMI, y López-Muñoz FJ. (2000) Analgesic efficacy of the combination metamizol+morphine after subchronic treatment in rats. *Drug Dev Res*, 51: 260-267.
- (13) Ekblom M, Gårdmark M, y Hammarlund-Udenaes M. (1993) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of morphine-3-glucuronide in rats and its influence on the antinociceptive effect of morphine. *Biopharm Drug Disp*, 14: 1-11.
- (14) Faura CC, Collins SL, Moore RA, y McQuay HJ. (1998) Systematic review of factors affecting the ratios of morphine and its major metabolites. *Pain*, 74: 43-53.
- (15) Feldman JB. (2004) The neurobiology of pain, effect and hypnosis. *American J Clin Hypnosis*, 46: 187-200.

- (16) FNEUM Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. (2000) Comisión Permanente de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud, 7^a. ed. México. pp. 959, 1730-1731.
- (17) Gårdmark M, y Hammarlund-Udenaes M. (1998a) Delayed antinociceptive effect following morphine-6-glucuronide administration in the rat pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Pain*, 74: 287-296.
- (18) Gårdmark M, Karlsson MO, Johnson F, y Hammarlund-Udenaes M. (1998b) Morphine-3-glucuronide has a minor effect on morphine antinociception pharmacodynamic modelling. *J Pharm Sci*, 87 (7): 813-820.
- (19) Gårdmark M, Ekblom M, Bouw R, y Hammarlund-Udenaes M. (1993) Quantification of effect delay, and acute tolerance development to morphine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 267 (3): 1061-1067.
- (20) Gourlay GK. (1998) Sustained relief of chronic pain. *Drug Disp*, 35 (3): 173-190.
- (21) Greene RJ, y Harris ND. (1993) Pathology and therapeutics for pharmacists. 5^a. ed. London: Edit. Chapman & Hall, pp. 445-447, 453-460.
- (22) Gudmundsson OS, Nimkar K, Gangwar S, Siahaan T, y Borchardt RT. (1999) Phenylpropionic acid-based cyclic prodrugs of opioid peptides that exhibit metabolic stability to peptidases and excellent cellular permeation. *Pharm Res*, 16 (1): 16-23.
- (23) Hardman JG, y Limbird LE. (2003) Goodman y Gilman A.: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10^a. ed. México: Edit. McGraw-Hill Interamericana, pp. 577-628, 697-742.

- (24) Horton TL, y Pollack GM. (1991) Enterohepatic recirculation and renal metabolism of morphine in the rat. *J Pharm Sci*, 80 (12): 1147-1152.
- (25) June HL, Stitzer ML, y Cone E. (1995) Acute physical dependence: time course and relation to human plasma morphine concentrations. *Clin Pharmacol Ther*, 57 (3): 271-280.
- (26) Katzung BG. (2002) Farmacología básica y clínica. 8ª ed. México: Edit. El Manual Moderno, pp. 577-598.
- (27) Letrent SP, Pollack GM, Brouwer KR, y Brouwer KLR. (1998) Effect of GF120918, a potent P-glycoprotein inhibitor, on morphine pharmacodynamics in the rat. *Pharm Res*, 15 (4): 559-605.
- (28) Levine RR. (1996) Pharmacology. 5ª. ed. London: Edit. The parthenon Publishing Group, pp. 287-322.
- (29) Liaw WJ, Ho ST, Wang JJ, Hu OYP, y Li JH. (1998) Determination of morphine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B*, 714: 237-245.
- (30) Lötsch J, Weiss M, Kobal G, y Geisslinger G. (1998) Pharmacokinetics of morphine-6-glucuronide and its formation from morphine after intravenous administration. *Clin Pharmacol Ther*, 63 (6): 629-639.
- (31) Milne RW, Jensen RH, Larsen C, Evans AM, y Nation RL. (1997) Comparison of the disposition of hepatically-generated morphine-3-glucoronide and morphine-6-glucoronide in isolated perfused liver from the guinea pig. *Pharm Res*, 14 (8): 1014-1018.

- (32) Moreno ME. (2004) Tratamiento del dolor crónico. *En Profund*, 55-61.
- (33) Nava OTA, Rivera CMV, Mora ML, De Barutell FC, y Mesas IA. (2004) Los opioides mayores como terapéutica analgésica inicial en el dolor crónico. *Dolor*, 19 (2): 118-124.
- (34) Olkkola KT, Hamunen K, y Maunuksela EL. (1995) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of opioid analgesics in infants and children. *Clin Pharmacokinet*, 28 (5): 385-404.
- (35) Omote K, Kitahata LM, Collins JG, Nakatani K, y Nakagawa I. (1990) The antinociceptive role of μ - and δ -opiate receptors and their interactions in the spinal dorsal horn of cats. *Anesth Analg*, 71: 23-28.
- (36) Ouellet DMC, y Pollack GM. (1997) Effect of prior morphine-3-glucuronide exposure on morphine disposition and antinociception. *Biochem Pharmacol*, 53 (10): 1451-1457.
- (37) Patrick GA, Dewey WL, Spaulding TC, y Harris LS. (1978) Disposition of morphine in chronically infused rats: relationship to antinociception and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*, 205 (3): 556-562.
- (38) Projean D, Tu The M, y Ducharme J. (2003) Rapid and simple method to determine morphine and its metabolites in rat plasma by chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 787: 243-253.
- (39) Saeb-Parsy K, Assomull RG, Khan FZ, Saeb-Parsy K, y Kelly E. (1999) Instant pharmacology. Canadá: Edit. Jhon Wiley & Sons, pp. 38-41, 117, 118, 265.

- (40) Shargel L, y Yu A. (1999) Applied Biopharmaceutics and pharmacokinetics. 4^a. ed. N.Y.: Edit. Mc Graw Hill Interamericana, pp. 573.
- (41) Silberstein SD. (2003) Neurotoxins in the neurobiology of pain. *Headache*, 43 (1): S2-S8.
- (42) Smith CM, y Reynard AM. (1993) Farmacologia. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana, pp. 231-253.
- (43) Smith MT, Watt JA, y Cramond T. (1990) Morphine-3-glucuronide: a potent antagonist of morphine analgesia *Life Sci*, 47 (6): 579-585.
- (44) Staniscuaski Guterres S, Fessi H, Barratt G, Puisieux, y Devissaguet JP. (1995) Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm Res*, 12 (10): 1545-1547.
- (45) Stuart-Harris R, Joel SP, McDonald P, Currow D, y Slevin ML. (2000) The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronide metabolites after subcutaneous bolus injection and subcutaneous infusion of morphine. *J Clin Pharmacol*, 49 (3): 207-214.
- (46) Todd RD, Muldoon SM y Watson RL. (1982) Determination of morphine in cerebrospinal fluid and plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr*, 232: 101-110.
- (47) Valls JM. (1991) Dolor en el niño: mecanismos de transmisión y respuesta. *Cir Ped*, 4 (2): 57-59.

- (48) Van Crugten JT, Somogyi AA, Nation RL, y Reynolds G. (1997) The effect of old age on the disposition and antinociceptive response of morphine and morphine-6 β -glucuronide in the rat. *Pain*, 71: 199-205.
- (49) Velasco Martín A, Lorenzo Fernández P, Serrano Molina JS, y Andrés-Trelles F. (1993) *Farmacología*. 16^a. ed. Madrid: Edit. McGraw-Hill Interamericana, pp. 471-497.
- (50) Waller DG, Renwick AG, y Hillier K. (2001) *Medical pharmacology and therapeutics*. España: Edit. W.B. Saunders, pp. 225-233.
- (51) White JM, e Irvine RJ. (1999) Mechanism of fatal opioid overdose. *Addiction*, 94 (7): 961-972.
- (52) Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110.