

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DE
RACÉMICO, R(-) Y S(+) KETOPROFENO EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ARTRITIS EN EQUINOS**

AUTOR: VERDE, Claudio Raúl

DIRECTOR: LANDONI, María Fabiana

**LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata.**

MIEMBROS DEL JURADO

Dr HUGO LUIS SCIPIONE

Dr HECTOR BUSCHIAZZO

Dr CARLOS LANUSSE

**A mis padres, a quienes
les debo casi todo lo bueno
que poseo**

Agradecimientos:

Especialmente a la Dra Maria Fabiana Landoni,

de quien aprendí tanto por sus dichos como por sus silencios

Verde, C R; Simpson, M I; Frígoli, A; Landoni, M F

Modificaciones clínicas en un modelo experimental de sinovitis aguda en equinos

Revista Electrónica Veterinaria. Vol V, Nº 10 Art 101004

Verde, C R; Simpson, M I; Frigoli, A; Landoni, M F

Enantioselective pharmacokinetics of ketoprofen in plasma and synovial fluid of horses with acute synovitis

J. Vet.Pharmacol. Therap. 24: 179-186

Tabla de contenidos

Resumen

1.	INTRODUCCIÓN	6
1.1	El proceso inflamatorio	6
1.1.1	Generalidades	6
1.1.2	Tipos de inflamación	7
1.1.3	Mediadores químicos de la inflamación	9
1.2	Artritis	16
1.2.1	Generalidades	16
1.2.2	Anatomía y fisiología de las articulaciones sinoviales	17
1.2.3	Respuesta articular a la injuria	18
1.3	Modelos experimentales	21
1.4	Drogas antiinflamatorias no esteroideas	22
1.4.1	Ketoprofeno. Descripción	22
1.4.2	Quiralidad	22
1.4.3	Mecanismo de acción	24
1.4.4	Farmacocinética	25
1.4.5	Toxicidad	26
1.4.6	Usos y contraindicaciones	27
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1	Diseño experimental	29
2.1.1	Animales	29
2.1.2	Manejo	29
2.1.3	Diseño	29
2.1.4	Artritis experimental	30
2.2	Parámetros clínicos	31
2.2.1	Temperatura corporal	31
2.2.2	Circunferencia carpiana	31
2.2.3	Ángulo carpiano en reposo	31

2.2.4	Ángulo carpiano en máxima flexión	31
2.2.5	Largo de paso	32
2.3	Parámetros bioquímicos	32
2.3.1	Concentraciones plasmáticas y sinoviales de Ketoprofeno	32
2.3.2	Análisis farmacocinético	33
2.3.3	Concentraciones sinoviales de Leucocitos	36
2.3.4	Concentraciones sinoviales de Proteínas	36
2.3.5	Concentraciones sinoviales de IL-1 β	38
2.3.6	Concentraciones sinoviales de PGE ₂	39
2.3.7	Concentraciones sinoviales de GAGs	41
2.3.8	Concentraciones séricas de TXB ₂	44
2.3.9	Análisis estadístico	46
3.	RESULTADOS	
3.1	Validación de métodos	48
3.1.1	Validación del método cromatográfico para la cuantificación de R(-) y S(+) KTP	48
3.1.2	Validación del método colorimétrico para la cuantificación de GAGs	49
3.2	Variables farmacocinéticas	50
3.2.1	Administración de la mezcla racémica	50
3.2.2	Administración de R(-)	52
3.2.3	Administración de S(+) KTP	53
3.3	Variables farmacodinámicas	55
3.3.1	Temperatura corporal	55
3.3.2	Circunferencia carpiana	57
3.3.3	Angulo carpiano en reposo	57
3.3.4	Angulo carpiano en flexión	59
3.3.5	Largo de paso	59
3.3.6	Concentraciones sinoviales de leucocitos	61
3.3.7	Concentraciones sinoviales de Proteínas	62

3.3.8	Concentraciones sinoviales de IL-1 β	63
3.3.9	Concentraciones sinoviales de PGE ₂	64
3.3.10	Concentraciones sinoviales de GAGs	65
3.3.11	Concentraciones séricas de TXB ₂	66
4.	DISCUSIÓN	
4.1	Modelos experimentales	67
4.2	Farmacocinética	69
4.3	Parámetros clínicos	72
4.3.1	Temperatura corporal	72
4.3.2	Circunferencia carpiana	73
4.3.3	Angulo carpiano en reposo	73
4.3.4	Angulo carpiano en flexión	74
4.3.5	Largo de paso	75
4.4	Parámetros bioquímicos	76
4.4.1	Leucocitos	76
4.4.2	Proteínas	78
4.4.3	IL-1 β	79
4.4.4	PGE ₂	81
4.4.5	GAGs	83
5.	CONCLUSIONES	87
6.	BIBLIOGRAFIA	89

ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DE RACÉMICO, R(-) Y S(+) KETOPROFENO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS EN EQUINOS

PALABRAS CLAVE: Ketoprofeno; quiralidad; artritis; equinos; inflamación; enantiómeros

RESUMEN

Ketoprofeno es una droga antiinflamatoria no esteroidea del grupo de los ácidos 2-arilpropiónicos y como tal, en su estructura química posee un carbono asimétrico que lo transforma en un compuesto quiral. Por lo tanto existen dos enantiómeros de ketoprofeno, R(-) y S(+) que deben considerarse como drogas diferentes, aunque en la actualidad se comercializan únicamente en su forma racémica (50:50). Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ketoprofeno fueron estudiadas administrando de forma individual tanto los enantiómeros R(-) o S(+) como la forma racémica a equinos con una artritis aguda experimental. Se aplicó un diseño de cross-over de cuatro etapas que permitió administrar a cada animal, en cada período, un tratamiento diferente. Una inyección intracarpal de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* se utilizó al comienzo de cada etapa para provocar una sinovitis aguda en todos los animales mientras que, simultáneamente, uno de los enantiómeros de ketoprofeno, la mezcla racémica, o un volumen equivalente de solución fisiológica fueron administrados como tratamiento único por vía intravenosa. Muestras sanguíneas y sinoviales fueron utilizadas para establecer mediante análisis cromatográfico las curvas de disposición de los enantiómeros de ketoprofeno, y así determinar las variables farmacocinéticas. Las propiedades farmacodinámicas de las drogas fueron evaluadas mediante el estudio sistemático y secuencial tanto de parámetros clínicos (la temperatura corporal, el largo del paso, la circunferencia de la articulación inflamada, el ángulo en reposo y en flexión de la articulación artrítica) como de parámetros bioquímicos (concentraciones sinoviales de prostaglandina E₂, Interleukina 1β, leucocitos, proteínas y glucosaminoglicanos totales), además de la producción sérica *ex vivo* de tromboxano B₂.

La inyección intracarpal de lipopolisacáridos provocó signos clínicos de artritis aguda durante 72 horas en todos los animales, independientemente del tratamiento, con mínimos efectos clínicos sistémicos. Se observó inversión quiral unidireccional del

enantiómero R(-) a su antípoda óptica S(+), siendo el porcentaje de inversión calculado del 19.9 %. Este valor es marcadamente menor al reportado en animales sanos, así como, en caballos aplicando el modelo de inflamación en caja tisular. Estas diferencias reflejarían la influencia de la severidad del proceso inflamatorio provocado en este estudio sobre el metabolismo hepático de los arilpropionatos.

Las tres formas de KTP provocaron una significativa inhibición en la liberación de PGE₂ en líquido sinovial siendo el enantiómero S(+) el más potente. Las concentraciones sinoviales de IL-1 β aumentaron en los cuatro grupos experimentales tras la inyección de LPS, pero interesantemente el tratamiento con enantiómero S(+) provocó el aumento más marcado. Las tres formas de ketoprofeno inhibieron parcialmente la síntesis y/o liberación de glucosaminoglicanos al líquido sinovial.

No hubo diferencias significativas entre grupos en los parámetros clínicos aunque el enantiómero S(+) fue el que más aminoró los signos clínicos de artritis relacionados con el dolor, como el largo del paso y la flexión forzada del carpo.

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF RACEMIC, R(-) AND S(+) KETOPROFEN IN HORSES WITH EXPERIMENTAL ARTHRITIS

KEY WORDS: Ketoprofen; chirality; arthritis; horses; inflammation; enantiomers

SUMMARY

Ketoprofen is a 2-arylpropionic derivative nonsteroidal antiinflammatory drug containing a single asymmetric carbon atom. It, therefore, is a chiral compound, existing as two enantiomers R(-) and S(+). Enantiomers must be considered as different drugs and not different configurations of the same compound, although most of the products in the market are racemic mixtures (50:50). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in arthritic horses were studied after administration of the racemic mixture as well as each individual enantiomer. A four-ways cross-over design was applied, allowing studying each treatment in each animal. Acute synovitis was induced administering LPS from *E. coli* at the beginning of each period. At the same time animals were dosed intravenously with rac-KTP, S(+)-KTP, R(-)-KTP or an equivalent volume of physiological solution. Blood and synovial samples were withdrawn and analyzed chromatographically for building disposition curves and estimated the corresponding pharmacokinetic parameters. Pharmacodynamics of these compounds was evaluated through the systematic and sequential study of clinical parameters (body temperature, stride length, inflamed joint circumference, and joint angle at rest and at maximum flexion) as well as synovial biochemical parameters (PGE₂, IL-1 β , leucocytes, proteins and total GAGs). Also, *ex vivo* serum TxB₂ production was studied.

Intracarpal LPS injection induced, independently of the administered treatment, clinical signs of arthritis in all the animals up to 72 h, with minimal systemic effects. Chiral inversion of R(-) KTP to its optical antipode was observed, the inversion percentage being 19.9%. This value is significantly lower to that reported for healthy horses, as well as for horses when a subcutaneous tissue cage model is applied. These differences could reflect the influence that the severity of the inflammatory reaction has on the hepatic metabolism of arylpropionates.

All three ketoprofen compounds has induced a significant inhibition on PGE2 release into synovial fluid, S(+)**KTP** being the most potent. IL-1 β synovial concentrations increased in all the experimental groups, the highest increase was induced by S(+)**KTP**. All three **KTP** compounds partially inhibited synthesis and/or release of GAGs.

No statistically significant differences were observed amongst groups on clinical parameters. Although, S(+)**KTP** treated group showed less severe clinical signs, specially those related to pain such as, stride length and joint angle at maximum flexion.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL PROCESO INFLAMATORIO

1.1.1 Generalidades

El proceso inflamatorio es una reacción de los tejidos vascularizados para proteger a los organismos vivos ante una injuria física, química o infecciosa. La reacción involucra componentes celulares - Elie Metchnikoff, 1908 - (150; 173), humorales - Paul Ehrlich, 1900 - (150) y tisulares, que provocan una serie de eventos la mayoría de los cuales están relacionados y son secuenciales (41). La magnitud y el tipo de respuesta están gobernados por una variedad de sustancias endógenas denominadas mediadores químicos de la inflamación - Sir Thomas Lewis, 1927 - (41; 140). Estas sustancias se liberan o sintetizan en el foco inflamatorio, aunque rara vez pueden circular a altas concentraciones por el torrente sanguíneo y provocar una reacción generalizada o sistémica (anafilaxia) que cause la muerte del individuo (25). La respuesta tisular inicial es un aumento del flujo sanguíneo local o hiperemia, provocada por la dilatación de los esfínteres precapilares que congestiona las vénulas post-capilares y altera la permeabilidad de la microcirculación - Boerhaave, 1700 (150; 41). Esto provoca la extravasación de plasma que trae como consecuencia un aumento en la concentración celular y estasis en los pequeños vasos - Julius Cohnheim, 1839-1884 - (150; 41). El aumento temprano y pasajero de la permeabilidad es iniciado por la acción de aminas vasoactivas, fundamentalmente la histamina, almacenada y liberada rápidamente desde los mastocitos. Si la reacción tisular ante el insulto continúa, se presenta una segunda etapa, con una duración de dos a cuatro horas, durante la cual aumenta la permeabilidad vascular. Esto permite que los leucocitos y las proteínas plasmáticas lleguen al foco inflamatorio atravesando las uniones entre las células endoteliales. Este proceso de transferencia es facilitado, en parte, por el enlentecimiento del flujo sanguíneo, pero fundamentalmente por la interacción que existe entre los leucocitos (al comienzo polimorfonucleares neutrófilos y luego eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos) y las células endoteliales (41). Dicha interacción se debe a la expresión de moléculas de adhesión tanto en la superficie de las células endoteliales (como P-selectina, ICAM-1 2 y 3, VCAM-1, E-selectina, PECAM-1, MadCAM-1, CD34, GlyCAM-1) como su correspondiente molécula receptora ubicada en la membrana de los leucocitos (B₂-integrinas en todos los leucocitos, L-selectinas en linfocitos, neutrófilos y

eosinófilos, VLA-4 en monocitos, eosinófilos y linfocitos, entre otras) (41; 81; 172; 200). Una vez adheridos al endotelio los leucocitos pueden migrar entre las células endoteliales hacia el tejido intersticial ya que sufren una deformación citoplasmática que les permite disminuir hasta diez veces su ancho. Ya en el espacio extravascular los leucocitos migran hacia el foco inflamatorio; este fenómeno se denomina quimiotaxis y es inducido por la presencia de proteínas de bajo peso molecular, producidas por microorganismos, o bien fibroblastos, macrófagos u otras células residentes. El grupo más importante de sustancias quimioatrayentes lo forman las quimiokinas que son selectivas, es decir que atraen determinado tipo de células, hecho que las transforma en un grupo de sustancias de extremo interés (43, 111). De esta forma los elementos extravasados, además de los liberados por el tejido injuriado, forman el exudado inflamatorio. Este momento del proceso se denomina inflamación aguda y clínicamente se caracteriza por la presencia de tumor, rubor, calor y dolor - Cornelius Celsus, Siglo I, AD- (150), además de la pérdida total o parcial de la función del órgano injuriado - Rudolf Virchow, 1858- (150). Las células blancas que alcanzaron el foco inflamatorio pueden migrar, fagocitar partículas y liberar mediadores químicos o enzimas (52). La fagocitosis y/o la liberación de enzimas son los eventos que justifican la llegada de leucocitos al foco inflamatorio. La fagocitosis es un mecanismo particularmente importante frente a infecciones bacterianas, mientras que las enzimas pueden provocar cambios estructurales irreversibles, particularmente sobre tejidos con nula o baja capacidad regenerativa como por ejemplo el cartílago articular (46). Las partículas que serán fagocitadas sufren un tratamiento previo denominado opsonización, por medio del cual se favorece la digestión posterior. Las sustancias involucradas son las opsoninas y dentro de ellas los anticuerpos constituyen el grupo más importante (41; 172). Una vez que el daño es controlado se remueven los elementos extravasados y se remodela el tejido mediante regeneración, reemplazo por una cicatriz o ambos. Durante éste período la respuesta tisular es clínicamente menos perceptible debido a la ausencia de cambios vasculares y el único signo presente de aquellos de la fase aguda suele ser el dolor.

1.1.2 Tipos de inflamación

Tanto el tipo de injuria como las características del tejido afectado condicionan la respuesta inflamatoria. El análisis de la severidad, distribución, duración y

localización anatómica de la respuesta además del tipo de exudado inflamatorio permiten caracterizar el proceso. De esta manera se lo denomina enfatizando aquello que permite reconocerlo por sus detalles histopatológicos y clínicos. La severidad hace referencia a la cuantía del daño al órgano afectado y en definitiva el daño potencial al paciente, el cual puede ser mínimo, leve, moderado o severo. Si la distribución en el tejido afectado es completa se dice que la inflamación es difusa, si abarca solamente una zona del órgano se denomina localmente extensiva, mientras que si el área afectada es única y pequeña la lesión es focal y multifocal si son varios focos rodeados de tejido normal. El tiempo de evolución del proceso es clínicamente detectado a través de los cambios vasculares. La etapa hiperaguda comienza con vasodilatación y dura pocas horas. La fase aguda se caracteriza por los siguientes signos clínicos: tumor, es el aumento de tamaño producto de la edematización, linfadenitis e infiltración celular (predominantemente neutrófilos y ocasionalmente mononucleares); calor, provocado por la hiperemia; rubor, debido al enrojecimiento que produce la congestión y/o hemorragia y dolor, básicamente por la sensibilidad aumentada de las terminaciones nerviosas debido a la presencia de mediadores químicos de la inflamación. Durante la fase subaguda los cambios vasculares son menos notorios, además si bien predominan los neutrófilos, aumenta el número de células mononucleares (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas). La inflamación crónica ocurre únicamente cuando el proceso se mantiene por varios días debido a que el insulto continúa (trauma, infección, etc.). En estas circunstancias los cambios vasculares son menos notorios siendo los cambios histopatológicos los que caracterizan esta etapa, básicamente la infiltración celular de mononucleares (macrófagos) y/o fibroblastos; fibrosis; remodelación y neovascularización. Las características del exudado inflamatorio, como su concentración proteica y celular además del tipo de células infiltradas conforman una herramienta histopatológica muy importante para determinar la duración, la severidad o incluso el tipo de agente causal. Así, cuando el exudado contiene pus la inflamación se denomina supurativa y se caracteriza por poseer neutrófilos cuyas enzimas han degradado tejidos del hospedador, este tipo de inflamación es frecuente cuando el agente causal es una bacteria. Se denomina exudado fibrinoso cuando en la fase aguda del proceso inflamatorio el líquido extravasado contiene fibrina, esto ocurre comúnmente dentro del pericardio y del saco pleural. Cuando el líquido inflamatorio contiene grandes cantidades de proteína el exudado se denomina seroso y es más traslúcido que el

exudado fibrinoso y que el supurativo. Cuando el exudado inflamatorio contiene glóbulos rojos se denomina hemorrágico; necrótico cuando contiene tejido necrotizado; mucoide cuando presenta moco; por último, algunos exudados contienen características histopatológicas de dos tipos diferentes, de manera que se denominan de acuerdo a ambas, como la inflamación fibrinonecrótica o la mucopurulenta. Algunas reacciones inflamatorias contienen exudados con una célula que lo caracteriza, como el exudado eosinofílico (común en alergias) o el exudado linfocítico en algunas infecciones virales. La localización anatómica hace referencia al órgano afectado, como una carpitis al carpo.

1.1.3 Mediadores químicos de la inflamación

Debido a que dentro del proceso inflamatorio se han detallado tanto eventos vasculares como celulares, un mediador químico de la inflamación podría definirse como una sustancia que promueve los eventos vasculares y/o la llegada de leucocitos activados al foco inflamatorio (41). Químicamente la gran mayoría son proteínas, pero pueden ser lípidos, aminas o glucoproteínas. Los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana son potentes inductores de la inflamación de origen exógeno, promoviendo tanto los eventos vasculares como celulares. Una gran variedad de sustancias endógenas posee una o ambas propiedades. Cada mediador químico puede realizar más de una función y no existe ningún paso en el proceso inflamatorio que dependa exclusivamente de un solo mediador, esto garantiza la respuesta inflamatoria (172). Su distribución es uniforme en todo el organismo de forma tal que los mediadores químicos pueden estar presentes en el foco inflamatorio cualquiera sea el tejido afectado. Como un sistema de protección de los individuos, los mediadores químicos de la inflamación poseen vidas medias cortas, y además para la mayoría de ellos se ha identificado una sustancia inhibitoria presente en el plasma y en los tejidos (41; 172).

Algunos mediadores químicos de la inflamación son sintetizados *a priori* y permanecen almacenados en el tejido hasta su liberación, es el caso de las aminas vasoactivas como histamina y serotonina (almacenadas en los mastocitos y basófilos) cuya liberación temprana durante la respuesta inflamatoria provoca vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso (25). Otro grupo de mediadores es el de las quininas, que se activan mediante una reacción enzimática que, en el caso de la bradiquinina, transforma a un polipéptido plasmático

en una cadena de solo nueve aminoácidos. Esta reacción es activada por el "factor contacto" también responsable de la cascada de la coagulación. Las quininas poseen efecto vasodilatador o vasoconstrictor, además de provocar broncoconstricción, por lo tanto aumentan la permeabilidad vascular; asimismo, estimulan la liberación de histamina y activan la cascada del ácido araquidónico promoviendo la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (140). Por último, la bradiquinina puede provocar dolor en el foco inflamatorio.

Las quimiokinas son un grupo muy amplio de pequeñas proteínas quimioatrayentes recientemente identificado. Ellas poseen una gran variedad de receptores para asegurar la migración leucocitaria al foco inflamatorio, pero además, son de extremo interés ya que cada una es sumamente selectiva con relación a la célula atraída. Su presencia es vital en el proceso inflamatorio fundamentalmente en respuesta a infecciones bacterianas (43).

Las citokinas comprenden un grupo de sustancias capaces de regular de manera positiva o negativa los procesos de transcripción intracelulares de diferentes genes. De esta manera, aquellas que favorecen la reacción tisular frente a la injuria son capaces de iniciar, mantener y terminar el proceso inflamatorio (41; 43). El subgrupo más importante lo forman las interleukinas (IL) aunque también se incluyen en este grupo a los factores de crecimiento. Si bien químicamente son glucopéptidos pequeños, su síntesis no es sencilla lo que garantiza que no alcancen concentraciones elevadas en los tejidos (43). Las citokinas ejercen su acción de diferentes maneras: de forma endócrina llegando vía sanguínea a células remotas, de manera parácrina en células cercanas liberándose en el medio circundante a la célula blanco, actuando también en células adyacentes y por último, de manera autócrina actuando sobre las células que le dieron origen (41; 43). Dentro de las citokinas, la interleukina 1 (IL-1) ha sido la más estudiada. IL-1 se aisló de exudados inflamatorios en la década del '40, y fue denominada "pirógeno endógeno" ya que su inyección en diferentes especies provocaba fiebre (49). Su purificación en 1970 (47) permitió descubrir su efecto potenciador de la respuesta de los leucocitos frente a mitógenos y antígenos (77). Luego, debido a que más datos confirmaban esos hallazgos se la denominó interleukina, término que ahora incluye otras citokinas proinflamatorias. IL-1 se presenta en dos isoformas diferenciadas en principio por su punto isoeléctrico, ellas son IL-1 alfa y beta. Interesantemente, IL-1 α y β poseen una homología en su secuencia de aminoácidos de solo el 30% aunque tanto sus acciones como sus

receptores parecen ser similares (78; 258). IL-1 posee una variedad de propiedades biológicas, entre ellas la respuesta de fase aguda fundamentalmente en el hígado (205), el efecto catabólico tanto sistémico como local, la estimulación de la médula ósea para liberar neutrófilos, la iniciación y progresión de lesiones vasculares, la estimulación de los linfocitos, etc. IL-1 ha sido estudiada tanto *in vitro* como *in vivo*, fundamentalmente la producida por los condrocitos, sinoviocitos y osteocitos (242; 259) aunque también es liberada por células endoteliales (141; 83), monocitos, macrófagos y linfocitos B entre otras células (52). El agregado de LPS a medios de cultivos de distintas líneas celulares provoca la liberación de IL-1. Básicamente este mediador químico es un activador del recambio estructural (*turn-over*) de la matriz tisular, por lo tanto, en teoría, su presencia en los tejidos a muy bajas concentraciones sería un hallazgo fisiológico. Además en la respuesta inflamatoria articular es un potente inductor de la síntesis de prostaglandina E₂ en los condrocitos, sinoviocitos (155) y osteocitos (146), así como de radicales superóxido, del activador del plasminógeno tisular, de colagenasa e IL-6; todos eventos relacionados con el incremento en la destrucción de la matriz cartilaginosa (122). El factor de necrosis tumoral (TNF) es otro péptido mediador de la inflamación (27). *In vitro*, los macrófagos, entre otras células, estimulados por TNF liberan al medio de cultivo tanto IL-1 como PGE₂ (22).

La importancia de los metabolitos del ácido araquidónico, es decir los eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) como mediadores químicos en el proceso inflamatorio fue comprendida a partir de las investigaciones realizadas por Sir John Vane en los años '70 (254; 255). Este investigador demostró que las drogas antiinflamatorias no esteroideas como la aspirina interferían la actividad de la enzima ciclooxigenasa, la cual cataliza la síntesis de los endoperóxidos cíclicos PGG₂ y PGH₂ a partir del ácido araquidónico. Este campo de investigación adquirió un gran impulso en los inicios de la década del 90 tras la identificación de las diferentes isoformas de ciclooxigenasa (COX-1, COX-2 y COX-3) (42; 223).

El ácido araquidónico (C_{20:4} eicosatetraenoico) es un miembro de la serie omega 6 de los ácidos grasos esenciales. Es un típico ácido graso esencial derivado del ácido linoleico (C_{18:2} ω 6) de la dieta a través de reacciones bioquímicas de desaturación y elongación de cadena. El ácido araquidónico es el substrato para la conversión enzimática de diferentes mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PG), los leucotrienos (LT), el tromboxano (TX) y PAF. Se acepta que el ácido araquidónico

primero debe ser liberado desde la membrana para ser sustrato de los diferentes sistemas enzimáticos (99; 100). Esta liberación desde la membrana puede ser mediada por Fosfolipasa A2 o bien por la acción combinada de Fosfolipasa C y Fosfolipasa D. La actividad de la enzima endoperóxido sintetasa (ciclooxigenasa o COX) consiste en dos funciones catalíticas relacionadas. En primer lugar COX posee una actividad ciclooxigenasa que cataliza la formación de prostaglandina (PG) G2, y en segundo término una actividad peroxidasa que cataliza una reducción de 2 electrones de PGG2 dando origen a PGH2 (99).

Ciclooxigenasa es una proteína situada principalmente en las membranas microsomales aunque también se encuentra en la cubierta nuclear y frecuentemente en la membrana plasmática. Por consiguiente, la producción celular de prostaglandinas está regulada tanto por la liberación de ácido araquidónico mediante la actividad de Fosfolipasa A2 (o Fosfolipasa C y D) como por la acción de varios mitógenos, hormonas u otros factores biológicos (255). La reacción inicial ciclooxigenasa sugiere la incorporación de oxígeno molecular dentro de la molécula de PGH2, ya que esta reacción no puede llevarse a cabo en ausencia de O2. Esta reacción inicial es catalizada por bajas cantidades de hidroperóxidos de ácidos grasos (tono peróxidos) y es suicida, ya que la incorporación de oxígeno molecular por la enzima resulta en la inactivación de su actividad enzimática (100).

El segundo paso en la conversión de ácido araquidónico a PGH2 por COX es la actividad peroxidasa que cataliza la reducción de una variedad de hidroperóxidos a alcoholes a expensas de reducción de co-sustratos. Si bien la actividad peroxidasa reduciría todo tipo de peróxidos independientemente de su origen, existe una cierta preferencia para la reducción de los hidroperóxidos de ácidos grasos, incluyendo PGG2 (99).

Aunque PGH2 tiene efectos biológicos (fundamentalmente estimulación de la agregación plaquetaria) los prostanoideos con actividad biológica de importancia, tanto fisiológica como patológica, son formados por actividad enzimática a partir de PGH2. Por lo expuesto PGD2 es el resultado de la actividad de PGD sintetasa; PGE2 por acción de PGE sintetasa o isomerasa; PGI2 por acción de PGI sintetasa; PGF2 por acción de PGF sintetasa y TXA2 por acción de tromboxano sintetasa (99).

Por lo tanto, la presencia de estas enzimas es la que determina cuales eicosanoides formará cada célula; por ejemplo la plaqueta y el músculo liso bronquial poseen como

enzima principal (además de COX) tromboxano sintetasa, por lo tanto el eicosanoide que se formará en estas células será preferentemente TXA₂ (197).

Las prostaglandinas son producidas por una amplia gama de tejidos, conduciendo a un amplio rango de respuestas biológicas. Las prostaglandinas se dividen en subgrupos identificados con letras, desde la A hasta la J, basado en la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo ciclopentano. La presencia y el número de dobles ligaduras en la cadena lateral alquilo son indicadas por el número subíndice. Las prostaglandinas se identifican como de series 1, 2 y 3 de acuerdo al ácido graso precursor, de ahí

Serie 1: a partir del ácido eicosatrienoico 20:3 (oleico)

Serie 2: a partir del ácido araquidónico (eicosatetraenoico) 20:4 (linoleico)

Serie 3: a partir del ácido eicosapentaenoico 20:5 (linolénico)

La serie 2 incluye las prostaglandinas de mayor importancia biológica en los organismos eucariotas. Numerosos estudios demuestran que las prostaglandinas intervienen en un amplio rango de funciones fisiológicas y patológicas, entre ellas, respuesta a injuria, inflamación, vasodilatación/vasoconstricción, función renal, mitosis, transformación celular, regulación de la respuesta inmune, diferenciación celular, reabsorción ósea, implantación y ovulación (222).

Identificación de COX2

Si bien la identificación de la segunda isoforma de ciclooxigenasa es reciente (222; 125; 126), la existencia de dos unidades enzimáticas diferentes se sospechaba desde hacía 10 años. Existen reportes de 1983 donde se observaba un comportamiento diferente de COX especialmente en la inflamación, aunque en ese momento las teorías que se postulaban para explicar esta diferencia se basaban fundamentalmente en las diferencias en el contenido de sustrato de las diferentes células (100). Los primeros datos concisos sobre la existencia de dos isoformas de COX surgen en 1990 cuando se clona COX de origen murino y humano (222; 125; 126).

Los estudios de Kujubu et al. (125), demuestran que células epiteliales de traquea en condiciones de crecimiento estimulado tiene una importante elevación en su actividad ciclooxigenasa. Sin embargo cuando se aisló la proteína de 70 Kd correspondiente a COX y su correspondiente mRNA (2.8 Kb) sus niveles no se correlacionaban con el incremento de la actividad celular observada. De hecho a través de Northern blots se detectó un mRNA de 4.0 Kb que mostraba una importante correlación con el aumento

de actividad enzimática observado. Otros grupos de investigación comenzaron a informar los mismos hallazgos (222; 224). Posteriormente se observó que la capacidad de IL-1, LPS y mitógenos de inducir la síntesis de COX era inhibida por glucocorticoides, pero que este tratamiento tenía efecto nulo sobre el nivel basal de la enzima (126). Son estas observaciones las que dieron base a la teoría de la existencia de dos isoformas de ciclooxigenasa; una de ellas constitutiva y otra inducible.

En el año 2002 Chandrasekhara y colaboradores (40) demostraron la existencia de una tercera isoforma de COX, denominada COX3. Si bien se ha descrito su estructura de manera completa, no existen reportes claros sobre su rol fisiológico. A la fecha solo se ha demostrado su alta concentración a nivel del SNC, lo que hace sospechar un posible rol relacionado al efecto analgésico central de algunos AINEs, como acetaminofeno (40).

Comparación entre COX1 y COX2

COX1 es la isoforma constitutiva de ciclooxigenasa. Esta fue inicialmente purificada y clonada a partir de células de vesícula seminal de carnero. Como su nombre lo indica está constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos y en plaquetas sanguíneas. COX1 está probablemente involucrada en la síntesis del pool de eicosanoides (PGs y TX) encargados del control "housekeeping" celular, como la coordinación de la acción de las hormonas circulantes y la regulación de la homeostasis vascular (255).

COX2 o isoforma inducible está expresada solo en células que han sufrido activación celular. Su biosíntesis es estimulada por suero, factores de crecimiento y lipopolisacáridos. Esta expresión como dijimos antes puede ser inhibida por los glucocorticoides. Todos estos datos llevaron a postular que COX2 está encargada de catalizar la síntesis de las prostaglandinas involucradas en los procesos inflamatorios. COX1 y COX2 comparten un 65-70% de la secuencia aminoacídica. En general todas las características básicas de actividad enzimática observadas para COX1 se mantienen en la isoforma inducible. Sin embargo existen características que hacen a ambas isoformas entidades diferentes (222; 125; 126).

a.- Principalmente, el hecho de que el gene de COX2 puede ser inducido por la mayoría de los mitógenos, de una manera inmediata, mientras que en el caso de COX1 es pobremente inducida por mitógenos.

b.- El mRNA para COX2 se expresa en células específicas (macrófagos, células endoteliales, fibroblastos) en presencia de compuestos inductores, mientras que el mRNA de COX1 tiene expresión más amplia (255).

c.- El mRNA que codifica COX1 es de 2.8 Kb, mientras que el que codifica COX2 es de 4.0 Kb (255).

d.- Otra diferencia se observa en la longitud del péptido de señal N-terminal que el caso de COX1 es de 23 a 26 aminoácidos y en COX2 es más corto, alrededor de 17 (224).

Consecuencias de la inhibición específica COX2

La identificación de las dos isoformas de COX ha despertado gran interés en la investigación farmacológica y, especialmente en la industria farmacéutica. Los datos actuales indican que cuando se usan antiinflamatorios no esteroideos se inhiben ambas isoformas, siendo la inhibición de COX2 la que conduce a las acciones terapéuticas mientras que la inhibición de COX1 es el mecanismo que produce los efectos tóxicos (255). Por lo tanto, en teoría, un inhibidor específico COX2 permitiría tratar el proceso inflamatorio sin provocar efectos secundarios, especialmente irritación y ulceración gástrica. Es importante remarcar que la mayoría de los AINEs en el mercado no son específicos y en muchos casos son más potentes inhibidores COX1 que COX2 (40; 223; 255).

Con relación a lo expuesto anteriormente, en los últimos años se ha introducido un nuevo grupo de drogas antiinflamatorias no esteroideas conocido como COXIBs que incluye compuestos con actividad específica sobre COX2 (celecoxib, rofecoxib, etc.) (255). Sin embargo, se debe remarcar que si bien los inhibidores COX2 específicos poseen ventajas terapéuticas comparados con los inhibidores duales, sus acciones biológicas poseen muchos puntos oscuros para investigar, fundamentalmente por el hecho de que aparentemente, su alcance no se limita a los procesos inflamatorios. En este sentido, datos preliminares obtenidos en ratones a los que se les ha retirado el gene de COX2 muestran que estos animales poseen un desarrollo anormal del riñón, además de fibrosis cardíaca y fallas en la ovulación que provocan infertilidad en las hembras (142). Además, interesantemente se ha demostrado de manera experimental que estos compuestos retardan la reparación de las fracturas (264), dato que ha conducido a la reducción marcada de su uso en pacientes con artritis. Asimismo, graves efectos a nivel cardiovascular han conducido a la eliminación de

Rofecoxib (Vioxx®) del mercado farmacéutico humano, quizás, como preámbulo a la eliminación completa del grupo.

Otro mediador de gran importancia es el óxido nítrico (ON). Esta es la molécula más pequeña conocida capaz de facilitar el proceso inflamatorio (31). Se origina a partir de un aminoácido, la L-arginina, el cual en presencia de oxígeno y por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS) libera el nitrógeno para formar ON y L-citrulina (153). El ON tiene acción vasodilatadora y colabora con los mecanismos de defensa frente a determinados patógenos (5). Puede ser sintetizado por diferentes tipos celulares (básicamente células endoteliales, macrófagos, monocitos, hepatocitos, además de células de los tejidos articulares) y participar tanto en procesos fisiológicos como patológicos (66). Para su síntesis, de manera similar a lo observado para las prostaglandinas, existen dos isoformas de ONS, una constitutiva (ONSc) y una inducible (ONSi), esta última presente durante el proceso inflamatorio (55; 229). Varias sustancias pueden inducir la síntesis de ON durante el proceso inflamatorio, entre ellas las más importantes son las citocinas como interferón alfa, interleukina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (228). El ON produce daño en los tejidos al combinarse con moléculas libres de oxígeno, formando radicales libres con capacidad oxidativa, básicamente sobre las proteínas que contienen átomos de Fe y S. No obstante el daño tisular sobre el hospedador es limitado ya que al igual que otros mediadores químicos el ON posee vida media corta y se inactiva en presencia de sangre.

1.2 ARTRITIS

1.2.1 Generalidades

La inflamación articular es un problema clínico relevante tanto en humanos como en perros y caballos. En seres humanos la enfermedad es más frecuente en pacientes de edad avanzada aunque existe un tipo de poliartritis inmune que afecta a los jóvenes (artritis reumatoidea). En la clínica equina, la claudicación es la causa más importante que termina prematuramente con la campaña deportiva de los caballos pura sangre de carrera (214; 184) así como de caballos que realizan otras actividades deportivas. La enfermedad articular es la causa más común de claudicación y la entidad patológica que genera más consultas a los profesionales veterinarios de la actividad hípica en Argentina. El impacto económico que generan los problemas articulares no ha sido estudiado en nuestro país, pero considerando que las carreras de caballos representan el 17% del ingreso bruto pecuario, su incidencia debe ser importante.

1.2.2 Anatomía y fisiología de las articulaciones sinoviales

Una articulación es la unión de dos o más huesos o cartílagos por medio de otros tejidos. Las articulaciones que integran el esqueleto apendicular de los equinos son en su mayoría del tipo sinovial y se caracterizan por la amplitud de sus movimientos. *Las superficies articulares* óseas son lisas, están formadas por hueso compacto (lámina ósea subcondral) y cubiertas por cartílago hialino (cartílago articular). La cápsula articular es el medio de unión, tiene la forma de un tubo y está compuesta por una capa externa fibrosa y una capa interna que es la membrana sinovial. El espacio limitado por los cartílagos articulares y la membrana sinovial se denomina *cavidad articular* y está ocupada por el *líquido sinovial* (223). El aporte sanguíneo surge de los vasos articulares que atraviesan la cápsula fibrosa y se ramifican en el subsinovia acompañados por vasos linfáticos y nervios (248). La función de una articulación es amortiguar el peso y permitir la locomoción. El hueso esponjoso, la placa de hueso subcondral y el cartílago articular disipan la concusión, la cápsula fibrosa y los ligamentos son los medios de unión, mientras que la membrana sinovial produce el líquido sinovial el cual nutre al cartílago y lubrica la articulación. El líquido sinovial no solamente nutre al cartílago articular sino que también es el medio donde éste vuelca sus desechos metabólicos, de modo que la composición química del líquido sinovial puede ser utilizada para evaluar la salud del cartílago articular (72).

La cápsula articular está compuesta principalmente por tejido conectivo con baja celularidad. La matriz es predominantemente colágeno, proteoglicanos, proteínas no colágenas y agua. La membrana sinovial tiene una lámina propia de tejido conectivo y una íntima formada por un estrato incompleto de una a cuatro capas de sinoviocitos sin membrana basal. Los sinoviocitos tienen función secretoria y fagocítica, siendo los responsables de la secreción de hialuronato que se incorpora al líquido sinovial, de lubricina que es una glicoproteína que lubrica la superficie del cartílago articular, así como de otros compuestos que forman parte de la matriz de la membrana sinovial (96).

El líquido sinovial es un filtrado plasmático, la mayoría de sus iones y moléculas están presentes en el plasma a excepción del ácido hialurónico que se encuentra a altas concentraciones (0.5 mg/ml) (215). La permeabilidad sinovial a las pequeñas moléculas está regulada por el espacio entre los sinoviocitos y por su matriz extracelular (96). El líquido sinovial contiene menos de 500 células nucleadas por μl ;

las mononucleadas son las más abundantes, ya que los sinoviocitos, monocitos y linfocitos constituyen el 90 % mientras que el resto son leucocitos polimorfonucleares (201).

El cartílago articular es de tipo hialino, su apariencia lisa y traslúcida y sus propiedades elásticas son consecuencia de su alto contenido en agua (70 a 80%). Su estructura microscópica varía mucho de acuerdo a la edad del animal y a la articulación que se estudie pero en general se trata de una densa malla de fibras de colágeno (que forman el 50 % de la materia seca) con una escasa población de células distribuidas en cuatro estratos. El estrato superficial posee abundantes condrocitos aplanados y fibras de colágeno paralelas a la superficie articular, en la zona intermedia existen menos condrocitos y el colágeno se orienta oblicuamente, el tercer estrato tiene los condrocitos dispuestos en columnas y el colágeno perpendicular a la superficie articular, y por último, el estrato de condrocitos más profundo está rodeado de matriz calcificada. Si bien los condrocitos forman solo del 1 al 10 % de la masa total del tejido y tienen una capacidad muy limitada para multiplicarse, son metabólicamente muy activos ya que sintetizan los componentes de la matriz entre los que se encuentran la malla de colágeno ya mencionada, un 35 % de proteoglicanos, 10 % de glicoproteínas, además de minerales y lípidos (249). Los proteoglicanos son estructuras complejas formadas por un corazón proteico al que se le adhieren subunidades de carbohidratos sulfatados dispuestos en forma de cepillo limpiatubos. Los carbohidratos se denominan glucosaminoglicanos (GAGs) y pueden ser de dos tipos, a) los sulfatados como condroitín sulfato (CS, que es el predominante) y keratán sulfato y b) los no sulfatados como el ácido hialurónico. Los proteoglicanos quedan atrapados y uniformemente distribuidos en la malla de colágeno ya que su corazón proteico se une al ácido hialurónico y éste a su vez se une al colágeno (Fig. 1). Los GAGs tienen la propiedad de repelerse entre sí y atraer grandes volúmenes de agua lo que expande la malla de colágeno y le otorga al cartílago propiedades físicas que le permiten soportar la concusión.

1.2.3 Respuesta articular a la injuria

La artritis puede originarse por un trauma, una infección o por alteraciones del crecimiento (169). Cualquiera sea el origen, los cambios inflamatorios articulares son respuestas únicas o combinadas de la membrana sinovial (195) el cartílago articular (46) y/o el hueso subcondral (117). Dependiendo de la severidad y la duración del

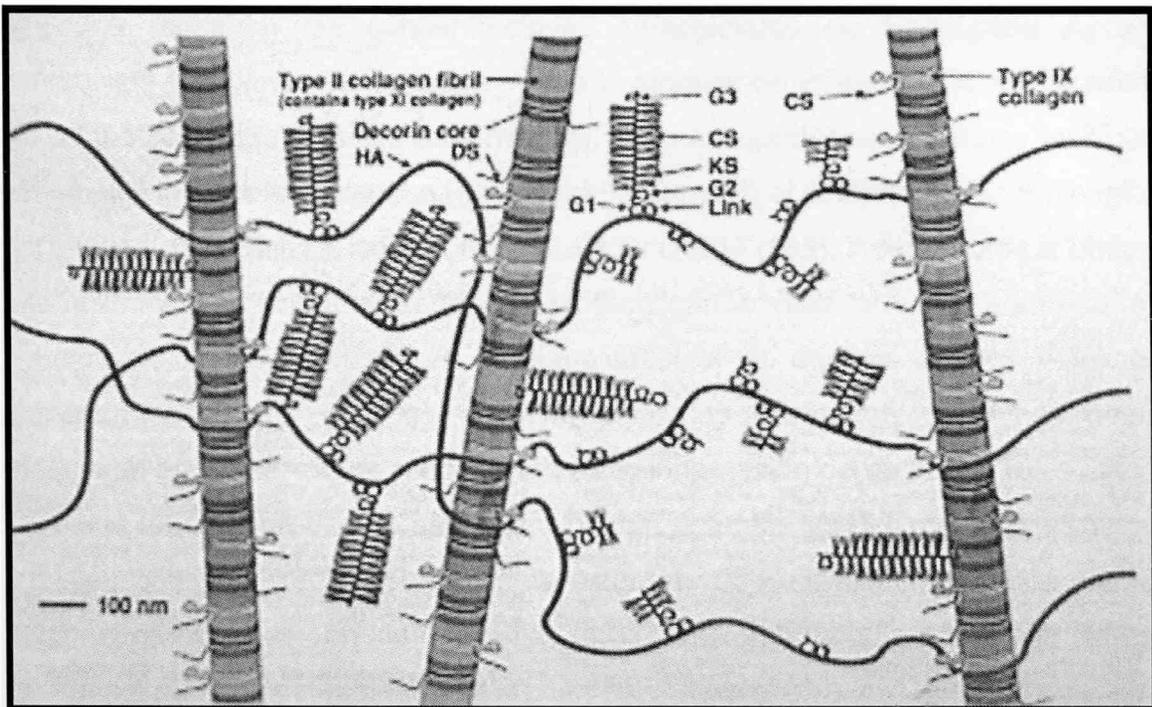


Fig. 1 Representación esquemática de la ultraestructura del cartílago articular equino

insulto puede establecerse una artritis crónica u osteoartritis, término que lleva implícito una alteración progresiva y permanente del cartílago articular (166).

La *sinovitis* es un cambio común en las articulaciones de los caballos de deporte; así, el insulto a la cápsula articular estimula al sinoviocito para que libere enzimas (metaloproteinasas y otras) (225), citokinas (IL1 y TNF), (22) y prostaglandinas (PGE₂) (80). El origen de los eicosanoides en articulaciones inflamadas incluye la síntesis a partir de leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, plaquetas, macrófagos infiltrados y fagocitos tipo A de la membrana sinovial (234). La infiltración de monocitos, linfocitos y neutrófilos en la membrana sinovial está aumentada por la acción de citokinas sobre la síntesis de sustancias quimioatrayentes (IL-8, proteína quimotáctica de macrófagos (MCP-1)) por las células del endotelio vascular, así como por el aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1) en la superficie de las células endoteliales (152). Estas proteínas de adhesión son específicamente reconocidas por integrinas en monocitos, linfocitos y neutrófilos.

Los cambios en la ultraestructura del cartílago articular dependen del equilibrio entre procesos anabólicos y catabólicos mediados por citokinas (203). La acción primaria de IL-1 y TNF α es la estimulación de la síntesis de metaloproteasas en los condrocitos

articulares (138), sinoviocitos, (236), macrófagos sinoviales, fibroblastos, macrófagos y neutrófilos infiltrados. (43). El mecanismo de acción que se ha propuesto señala que IL-1 podría aumentar las concentraciones intracelulares de Fosfolipasa A_2 en los condrocitos resultando en un aumento de la síntesis de PGE_2 vía COX o leucotrienos vía 5-Lipooxigenasa (82). De esta manera, las metaloproteasas liberadas (colagenasa, estromelina y proteoglicanasa [gelatinasa]) degradan el colágeno y los proteoglicanos del cartílago articular así como del hueso subcondral (183). Además se ha observado una disminución en la síntesis de proteoglicanos más que un aumento en su catabolismo, particularmente en cartílago articular de equinos adultos (203). Se ha demostrado también que los inhibidores de las enzimas proteolíticas dejan de producirse en presencia de mediadores de la inflamación como IL-1, TNF u ON (198). La fuente más importante de estas citocinas en la artritis son los macrófagos sinoviales y los leucocitos infiltrados. En casos de osteoartritis y artritis reumatoidea una fuente adicional de citocinas son los osteocitos (43). También ha sido reportada la síntesis de citocinas a partir de osteoblastos (211).

Las concentraciones de IL-6 se ven aumentadas en líquido sinovial procedente de articulaciones inflamadas (19); además se postula que IL-6 posee un importante rol en la respuesta inmune frente a infecciones articulares (194). El rol de esta interleukina en el proceso inflamatorio articular no es claro. Los niveles séricos de IL-6 se elevan en forma importante durante los procesos inflamatorios (incluido artritis), por lo que se sugiere que su acción sería sistémica y no local.

Los radicales de oxígeno son gases que demostraron tener poder destructivo sobre proteoglicanos, colágeno y ácido hialurónico. El rol del óxido nítrico (ON) en enfermedades articulares se hizo evidente en los últimos años. La producción de ON en las articulaciones es un fenómeno local, siendo fuentes potenciales de producción las células endoteliales de la cápsula sinovial, leucocitos infiltrados y células mesenquimatosas residentes de la articulación (231). En las articulaciones inflamadas los neutrófilos, linfocitos, mastocitos y especialmente los macrófagos son considerados las fuentes intrarticulares más importantes de ON. Recientemente se ha demostrado que los condrocitos (228) y los fibroblastos sinoviales (231) tienen la capacidad de sintetizar cantidades importantes de ON; en ambos casos la forma inducible de óxido nítrico sintetasa (ONSi) parece responsable de la síntesis. Los efectos de ON en la articulación no son enteramente conocidos. Sin embargo se ha propuesto a esta molécula como un inductor de apoptosis en condrocitos (24) al igual que un inhibidor de

la proliferación *in vivo* de condrocitos (23). Además, existen evidencias de su rol como inductor de metaloproteasas latentes (228). Adicionalmente, se postula una acción directa o indirecta (a través de un metabolito) aumentando la degradación de ácido hialurónico, el cual es conocido por su susceptibilidad a daños por radicales libres (232). Todas las acciones mencionadas conducen a la destrucción de la matriz peri y extracelular del cartílago en el proceso inflamatorio articular. Esto último se hace evidente a través de estudios comparativos de los niveles de ON en articulaciones normales e inflamadas (116; 233; 58) así como, por la potenciación de la destrucción de la matriz cartilaginosa observada cuando se administra un agonista de ON (L-arginina) y el efecto protector de los compuestos inhibidores de ONS (107; 230; 159; 193).

1.3 MODELOS EXPERIMENTALES

Numerosos modelos experimentales *in vivo* han sido diseñados para el estudio del proceso inflamatorio (212; 62) y sus resultados han facilitado el entendimiento del componente inflamatorio de la artritis. Además los modelos experimentales de inflamación han sido utilizados para evaluar el efecto antiinflamatorio de algunas drogas (4; 99; 241; 132; 10; 256).

Los primeros trabajos de investigación *in vivo* sobre artritis se realizaron en animales de laboratorio (53), pero más recientemente se han utilizado diferentes modelos experimentales de artritis en equinos que permitieron estudiar los cambios inflamatorios articulares, incluyendo el tipo de células y los mediadores químicos involucrados (7; 59; 29; 105; 245; 14; 87; 60; 256). La inflamación aguda de la membrana sinovial o sinovitis, provocada por la inyección intraarticular de lipopolisacáridos (LPS), ha sido utilizada como un modelo experimental para el estudio de la artritis en equinos (59; 94 ; 194; 256; 257) caracterizada por la liberación a la cavidad articular de leucocitos, proteínas, prostaglandinas (fundamentalmente PGE₂) y citokinas (IL1 y TNF) lo que se manifiesta clínicamente por calor, rubor, hinchazón y dolor en la articulación inyectada. Las modificaciones clínicas son notorias desde las primeras horas luego de la inyección, disminuyen a partir de las 12 horas y desaparecen luego de 96 h por lo que la inyección intrarticular de LPS puede repetirse en la misma articulación luego de cierto tiempo (256). La inyección intrarticular de LPS puede provocar modificaciones clínicas sistémicas como pirexia, depresión y anorexia, aunque estas manifestaciones son transitorias y claramente dosis dependientes. Por tanto, la inyección intracarpal de pequeñas dosis de LPS permite trabajar sobre un modelo

más humano de artritis experimental en equinos, de corta duración y evolución benigna (256)

1.4 DROGAS ANTINFLAMATORIAS NO ESTEROIDEAS

1.4.1 Ketoprofeno. Descripción

Ketoprofeno (KTP) [ácido \pm 2-(3-benzoilphenyl)propiónico] es un antiinflamatorio no esteroide perteneciente al grupo de los ácidos carboxílicos, subgrupo derivados del ácido 2 arilpropiónico (112). Ketoprofeno, al igual que el resto de los miembros de este subgrupo, posee un carbono asimétrico y, en consecuencia, es un compuesto quiral.

KETOPROFENO [ácido \pm 2-(3-benzoilphenyl)propiónico]

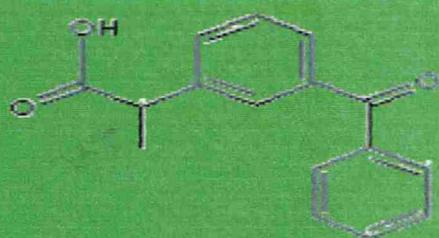
Nº CAS 22071-15-4

Nº EINECS 244-759-8

FORMULA $C_{16}H_{14}O_3$

PESO MOLECULAR

254.28



PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

ESTADO FISICO Polvo cristalino de color blanco

PUNTO DE FUSION 94 – 97 °C

SOLUBILIDAD EN AGUA Insoluble

pk 4.7

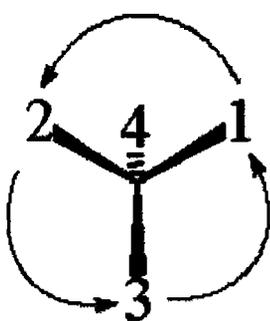
ESTABILIDAD Estable a temperatura ambiente

1.4.2 Quiralidad

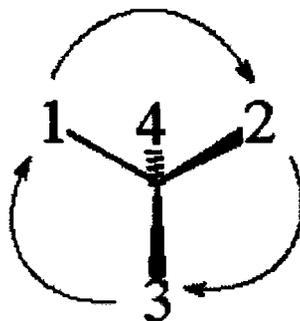
Pasteur introdujo el concepto de estereoquímica en 1848 cuando propuso que la actividad óptica de las soluciones orgánicas está determinada por la asimetría de las moléculas que la componen. La simetría o asimetría es una característica de las figuras geométricas de dos o más dimensiones (35). Dado que las moléculas se presentan como figuras tridimensionales, pueden existir en formas simétricas o asimétricas. La base más común de la asimetría molecular es la presencia de un átomo de carbono tetravalente unido a cuatro ligandos diferentes. Este carbono es, consecuentemente, el centro de asimetría y por lo tanto la molécula es quiral. Si la molécula y su imagen especular son no superponibles la relación entre las mismas es enantiomérica y los dos estereoisómeros son denominados enantiómeros (35). Aún cuando cada miembro del par de enantiómeros difiere del otro en el ordenamiento espacial de los ligandos unidos

al centro quiral, sus propiedades físicas (punto de fusión, punto de ebullición, índice de refracción, solubilidad, etc.) son idénticas. La diferencia más importante entre los isómeros de un par de enantiómeros es la manera en que éstos interactúan con la luz polarizada. En la luz polarizada el componente eléctrico y los campos magnéticos oscilan como en la luz común, excepto en que están contenidos entre dos planos perpendiculares. Cuando el componente eléctrico interactúa con una molécula asimétrica, la dirección del campo sufre una rotación. Las sustancias que provocan esta rotación son denominadas "ópticamente activas". Dado que los enantiómeros existen como imágenes especulares, interactúan con la luz polarizada de manera cuantitativamente equivalente pero opuesta (36).

Dos sistemas de nomenclatura han sido desarrollados para describir la configuración absoluta de las moléculas asimétricas. El primero de ellos utiliza dos compuestos de referencia, el enantiómero natural levorotatorio de serina (designado como L-serina) y el enantiómero natural dextrorotatorio de gliceraldehído (designado como D-gliceraldehído). El segundo sistema de nomenclatura fue introducido por Cahn et al. en 1956 (34). Este sistema se basa en un conjunto de reglas para asignar un orden de prioridad decreciente a cada uno de los ligandos unidos al carbono asimétrico, siendo el peso atómico el más simple. De esta manera, la molécula es vista con el ligando de menor prioridad más alejado del observador. Si la dirección de rotación desde el ligando de mayor prioridad al de menor prioridad es a la izquierda el enantiómero se denomina S (siniestro) mientras que si la dirección de la rotación es hacia la derecha la molécula es R (rectus).



S configuration



R configuration

Dado que los enantiómeros tienen propiedades fisicoquímicas similares es muy difícil distinguirlos en medios aquirales (239). Sin embargo en medios quirales como el

organismo, ellos exhiben claras diferencias (35). De hecho, la mayoría de los procesos naturales son estereoespecíficos (35). La estereoespecificidad puede ocurrir en los procesos farmacocinéticos, en particular en aquellos que utilizan transportadores proteicos, un receptor o una enzima. Por lo tanto, la estereoespecificidad puede ser observada en la distribución, unión a proteínas plasmáticas, biotransformación, excreción renal, etc. Además, la estereoespecificidad también puede ocurrir en los procesos farmacodinámicos de manera que las diferencias entre enantiómeros pueden ser tanto cualitativas como cuantitativas (35). Desde el punto de vista cualitativo, cada enantiómero puede producir un efecto diferente, por ejemplo, en el caso de los barbitúricos el enantiómero R es anestésico mientras que el S es convulsivante; otro ejemplo es talidomida ya que el enantiómero R es sedante y el S teratogénico. Desde el punto de vista cuantitativo ambos enantiómeros pueden producir el mismo efecto pero con diferente intensidad, o sea potencia. Así, el enantiómero que provoca la mayor intensidad de respuesta se denomina eutómero mientras que el de menor efecto es el distómero. En el caso específico de los arilpropionatos el eutómero para la inhibición de ciclooxigenasa es el enantiómero S. (130)

El índice eudísmico se define como la razón entre las dosis (estudios *in vivo*) o concentraciones (estudios *in vitro*) que producen efectos de la misma intensidad (35). Por ejemplo para naproxeno el índice eudísmico *in vitro* para la inhibición de COX es de 70 (130).

1.4.3 Mecanismo de Acción

Las acciones de los AINEs han sido atribuidas principalmente a su capacidad de inhibir prostaglandina endoperóxido sintetasa (ciclooxigenasa) (254). Tal como se describió anteriormente, ciclooxigenasa es la enzima que cataliza la conversión del ácido araquidónico a los endoperóxidos cíclicos, es decir prostaglandina (PG) G_2 y PGH_2 y a partir de éstos la síntesis de los eicosanoides proinflamatorios PGE_2 y PGI_2 . En los comienzos de la década de 1990, aparecieron los primeros reportes de la existencia de dos isoformas de ciclooxigenasa. Ciclooxigenasa 1 (COX-1) es la forma constitutiva de la enzima. Esta fue inicialmente purificada y clonada a partir de glándulas seminales ovinas. COX-1 se halla constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos y plaquetas (222). Esta isoforma está implicada, probablemente, en las funciones reguladoras celulares o "housekeeping" como la coordinación de la actividad de las hormonas circulantes y de la homeostasis vascular (24; 118; 224).

Ciclooxigenasa 2 (COX-2) o inducible comparte cerca del 62% de homología aminoacídica con COX-1 (255) pero a diferencia de COX-1 se expresa solo tras la activación celular (263; 125; 42). De esta manera, la biosíntesis de COX-2 es estimulada por suero, factores de crecimiento y lipopolisacáridos (222). Las observaciones que demostraron que COX-2 es inducida por mitógenos y mediadores de la inflamación y que su expresión es inhibida por glucocorticoides (126; 28) sugieren que COX-2 puede producir los prostanoídes involucrados en el proceso inflamatorio (255; 115).

Existe un gran número de reportes acerca de otras acciones de los AINEs independientes de la inhibición de ciclooxigenasa. Por ejemplo, ha sido demostrada la capacidad de este grupo de fármacos de modificar el estallido oxidativo inducido por un amplio rango de estímulos en neutrófilos humanos (246) y bovinos (132). También su potencial para inhibir la liberación de β -glucuronidasa por neutrófilos humanos (258), bovinos (127) y equinos (128) además de sinoviocitos equinos estimulados con lipopolisacáridos (96) ha sido reportado. Además, una acción disruptiva de estas drogas en las interacciones moleculares dentro de la membrana plasmática e interrupción de la transducción a nivel de proteína G han sido propuestas como mecanismos de acción alternativos (3).

1.4.4 Farmacocinética

Con respecto a su farmacocinética todos los AINEs son químicamente ácidos débiles por lo que se encuentran en forma no ionizada en medios ácidos, como el estómago. En consecuencia tienen buena absorción oral, llevándose a cabo principalmente en el estómago. Aún cuando en equinos se administran tanto por vía enteral como intravenosa, la biodisponibilidad de estos compuestos es generalmente alta, independientemente de la vía de administración (136). Estas drogas, por ser ácidos débiles, se encuentran en forma disociada en plasma lo que reduce su capacidad de atravesar membranas. Asimismo y quizás más importante es el alto grado de unión a proteínas plasmáticas de los AINEs. Para la mayoría de ellos el porcentaje de unión a proteínas, fundamentalmente albúmina, supera el 90%. Esto último, en principio podría parecer una desventaja, sin embargo no lo es. Recordemos que estos fármacos se indican para el tratamiento de la inflamación y que un sitio inflamado posee aumentada la irrigación sanguínea como consecuencia de la vasodilatación inducida por los mediadores de la inflamación. Es por esta razón que durante el

proceso inflamatorio las membranas endoteliales son atravesadas por estructuras de mayor tamaño como las albúminas, las cuales traen asociadas las moléculas de AINEs. Esto hace que el aumento de la permeabilidad vascular provoque una "administración directa" en la zona de acción (130).

Debido a su distribución, los AINEs acceden al hígado, órgano primario para su metabolización. En general, estos fármacos sufren metabolismo de fase I, principalmente oxidación, seguido por reacciones conjugativas de fase II, fundamentalmente conjugación con ácido glucurónico y glicina. Para la mayoría de los AINEs los metabolitos producidos tras la oxidación son inactivos. Adicionalmente, los profenos en particular (incluido KTP), sufren un proceso metabólico de inversión quiral a nivel hepático que determina la transformación del enantiómero R(-) a su antípoda óptica S(+). El mecanismo de inversión quiral ha sido propuesto por Nakamura et al. en 1981 (186), y consiste en la conversión enantioselectiva del enantiómero R(-) a su acilCoA tioester, este proceso resulta en la activación del protón α -metín el cual es tanto esterático como benzílico. El acilCoA puede, entonces, seguir uno de los siguientes tres procesos, a saber: a) Racemización del centro quiral. En este caso el racemato acilCoA producido, se hidroliza para dar una mezcla de enantiómeros R y S del arilpropionato original (106); b) Hidrólisis con retención de la configuración, por lo que se produce el R-propionato original (106) o c) Acil transferencia del profeno a un triglicérido híbrido, provocando la retención del propionato en el tejido adiposo (261).

Tras la metabolización, los AINEs se excretan fundamentalmente por filtración renal. De esta manera, debido a que son ácidos débiles, cuando la orina es alcalina la excreción aumenta en forma notoria, por eso la vida media de estos compuestos es más corta en los herbívoros comparado con los carnívoros.

1.4.5 Toxicidad

Con respecto a sus efectos secundarios o tóxicos, es importante recordar que las prostaglandinas son compuestos ubicuitarios y la capacidad para su síntesis está ampliamente distribuida en el organismo. Todas las células, con excepción de los eritrocitos, poseen el sistema enzimático que les permite sintetizar prostaglandinas. Las prostaglandinas tienen una amplia gama de funciones, tanto fisiológicas como patológicas, y como se ha mencionado previamente, algunas son mediadas por COX-1 y otras por COX-2. Los efectos tóxicos más estudiados de estos compuestos son

aquellos relacionados a la inhibición de COX-1 y son particularmente importantes en el hombre. De esta manera, si los AINEs son utilizados en dosis adecuadas los problemas de toxicidad en equinos son poco comunes (136). La irritación gástrica tras la administración de AINEs puede ser consecuencia de una disminución local en la concentración de PGs, tanto de las encargadas de inducir la liberación del mucus protector y de bicarbonato (PGE_2), así como de las encargadas de modular la irrigación de la mucosa gastrointestinal (PGI_2). Otro sitio donde la actividad de la prostaglandina es imprescindible es en el riñón, específicamente cuando se ha activado el sistema adrenérgico (por ejemplo en casos de deshidratación). En tales casos, las prostaglandinas modulan la actividad vasoconstrictora de los mediadores adrenérgicos impidiendo el desencadenamiento de una insuficiencia renal (130).

1.4.6 Usos y contraindicaciones

Los AINEs son utilizados ampliamente en la clínica veterinaria tanto en caninos como en equinos e incluso bovinos (85; 86). Una gran variedad de procesos patológicos son tratados mediante el uso de estas drogas ya que sus efectos clínicos son útiles tanto como terapia resolutoria de los procesos inflamatorios agudos, como preventivos en el período prequirúrgico, así como paliativos en procesos crónicos por su poder analgésico (33; 137; 260). En equinos de deporte su utilización es muy amplia fundamentalmente en las patologías músculo-esqueléticas y entre ellas la artritis es sin dudas la más común. Por tal motivo algunos AINEs son particularmente estudiados investigando sus efectos sobre el cartílago articular ya que su uso prolongado podría dañar la matriz cartilaginosa. Además sus efectos antipiréticos son beneficiosos en animales con fiebre, de esta manera se utilizan como terapia de apoyo durante las infecciones. Un grupo pequeño de AINEs tiene efecto beneficioso frente a cuadros clínicos de endotoxemia que son muy frecuentes en equinos. Por último, el potencial para inhibir la síntesis de tromboxano A_2 en plaquetas (fundamentalmente de aquellos AINEs que inhiben COX-1) ha intentado ser aprovechado clínicamente en el tratamiento de procesos isquémicos en equinos. Sin embargo, el efecto inhibitor de la coagulación es raramente observado con dosis terapéuticas.

Por lo expuesto en cuanto a su mecanismo de acción, las drogas AINEs están contraindicadas en pacientes con úlcera gástrica o con alto riesgo de padecerla (potros lactantes). Además los animales deshidratados (como los que padecen cólico,

diarrea, hemorragias, etc.) pueden sufrir un cuadro de isquemia renal. Además, debido a su metabolismo hepático los AINEs deben dosificarse criteriosamente en pacientes con enfermedad hepática avanzada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1 Animales

Para este estudio se utilizaron seis equinos mestizos, cinco hembras (animales A, B, C, D y E) y un macho castrado (animal F) sin signos previos de enfermedad articular, con un peso promedio de 285 ± 45 kg y edades entre 3 y 9 años.

2.1.2 Manejo

Los equinos fueron estabulados en pesebres contiguos de cemento de 6 m² de superficie, con paredes de 1.5 m de alto y cama de viruta de madera blanca. La ración de concentrados (granos de avena a razón del 1% del peso de cada equino) fue suministrada dos veces al día (5 y 17 h) mientras que el heno de alfalfa y el agua fueron administrados *ad libitum*. Con el propósito de adaptar los animales a sus nuevas condiciones de vida, los equinos fueron incluidos en un plan de adiestramiento que consistió en paseos y ensayos de mansedumbre durante un período de 40 días previos al inicio de la experiencia. Durante la última semana de este período, en forma diaria, se procedió a evaluar los diferentes parámetros clínicos (ver luego) a efectos de crear una línea basal de registros para cada uno de ellos.

2.1.3 Diseño

Se utilizó un diseño de cross-over de cuatro períodos en el cual cada caballo recibió un tratamiento diferente en cada etapa, a saber: tratamiento placebo (solución fisiológica a la dosis de 1 ml cada 100 kg), ketoprofeno racémico (Ketofen 10%, Rhône-Merieux) a la dosis de 2.2 mg/kg, R(-)KTP a la dosis de 1.1 mg/kg y S(+KTP a la misma dosis (los enantiómeros de ketoprofeno fueron provistos por Laboratorios Menarini, España y preparados al 10% en una solución 50/50 de alcohol y agua). Todos los tratamientos fueron administrados en forma de bolo mediante una inyección intravenosa, a tiempo 0, en la vena yugular izquierda. El tiempo transcurrido entre cada etapa del cross-over fue de 30 días. La siguiente tabla sintetiza la secuencia utilizada para la administración de los tratamientos

PERÍODO	TRATAMIENTO			
	placebo	Rac-KTP	R(-)KTP	S(+KTP
I	A	B	D E	C F
II	D E	A	C F	B
III	C F	D E	B	A
IV	B	C F	A	D E

A, B, C, D, E y F: código de identificación de los animales

Rac-KTP: ketoprofeno racémico

2.1.4 Artritis experimental

Una sinovitis aguda fue inducida en todos los animales, en cada etapa del cross-over a tiempo 0, inyectando la articulación intercarpal (izquierda en los períodos I y III o derecha en los períodos II y IV) con una solución salina que contenía 1 µg/ml de lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* 055 B5 (Sigma Chemical Co, St Louis USA) a la dosis de 0.01 µg/kg. Para ello, la piel de la región carpal fue depilada y desinfectada con una solución de iodopovidona al 5%; una mordaza colocada en el labio superior fue utilizada como método físico de sujeción. Un abordaje dorsal (entre los tendones de los músculos carporadial y extensor digital común) o dorsomedial (hacia medial del extensor carporadial) con el miembro en semiflexión facilitó la introducción del líquido a través de una aguja calibre 21/1" (Becton Dickinson Ind. Cibür. LTDA).

Muestras sanguíneas. Las muestras sanguíneas (5 ml) fueron extraídas de la vena yugular derecha a través de un catéter N° 18 (1.35 x 50 mm, Nipro Medical Industries Ltd, JAPAN) fijado previamente en el tercio superior del cuello.

Las muestras fueron obtenidas a los 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h luego de la administración del tratamiento y depositadas en tubos heparinizados refrigerados a 4°C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. El plasma fue retirado y almacenado a -20 °C hasta la realización del ensayo que determinaría las concentraciones plasmáticas de R(-) y S(+) ketoprofeno.

Adicionalmente 2 ml de sangre fueron depositados en tubos de vidrio a tiempo 0, 15, 30 y 45 minutos y 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 horas post-tratamiento. Estas muestras fueron incubadas durante 1h a 37°C en baño térmico para inducir la producción *ex vivo* de tromboxano B₂ (TXB₂). Posteriormente fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, el suero separado y almacenado a -20 °C hasta la realización del ensayo que determinaría las concentraciones de Tromboxano B₂.

Muestras de líquido sinovial. Las muestras de líquido sinovial fueron obtenidas realizando una artrocentesis (con aguja de 0.8 x 40 mm y jeringa de 5 ml) de la articulación inflamada utilizando el mismo procedimiento que el descrito para la inyección intraarticular de LPS. Un volumen de 1 a 1.5 ml fue extraído a tiempo 0 y a las 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h post-tratamiento. Las muestras fueron depositadas en tubos conteniendo EDTA, mezcladas en vortex; una fracción de 100µl fue utilizada inmediatamente para realizar el conteo leucocitario total. El líquido restante fue almacenado a -20 °C hasta el momento en el que se realizaron los diferentes ensayos, a saber: determinación de las concentraciones de R(-) y S(+) ketoprofeno, PGE₂, IL-1, proteínas totales y glucosaminoglicanos totales.

2.2 PARÁMETROS CLÍNICOS

Las modificaciones clínicas inducidas tras la administración intraarticular de LPS fueron evaluadas mediante el estudio de cinco parámetros clínicos, obtenidos a 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h posteriores a la inyección intraarticular respetando el siguiente orden:

2.2.1 Temperatura

Este parámetro fue obtenido apoyando un termómetro de máxima de tipo digital, con una sensibilidad de 0.1°C, sobre la mucosa de la boca. La medición fue registrada en grados centígrados (°C).

2.2.2 Circunferencia carpiana

Con el miembro a evaluar apoyado, el carpo fue envuelto con una cinta métrica inmediatamente por debajo del relieve más prominente que produce el hueso accesorio del carpo en la cara palmar de la articulación. La medición fue registrada en centímetros.

2.2.3 Angulo carpiano en reposo

Se obtuvo con un goniómetro, apoyando una de sus dos ramas paralela a la cara lateral del antebrazo y la otra rama sobre la cara lateral de la caña. La medición fue registrada en grados (°).

2.2.4 Angulo carpiano en máxima flexión

Para obtener este valor se utilizó el goniómetro mencionado anteriormente y, colocándolo en la misma posición utilizada para medir el ángulo carpiano en reposo, se lo acompañó lentamente junto a la flexión manual del carpo hasta que el animal manifestó el primer signo de disconformidad con la maniobra (una contracción leve de la musculatura de la espalda). La medición fue registrada en grados (°).

2.2.5 Largo de paso

Una cinta de papel de 1 metro de ancho y 20 metros de largo fue extendida y adherida sobre un piso de cemento sin ondulaciones próximo a los pesebres. Luego, un trozo rectangular de goma espuma de 5 x 3 x 1 centímetros, previamente humedecido en tinta, fue pegado longitudinalmente sobre la muralla del casco en la región de la pinza, de modo que tiñera el papel cuando el miembro se apoyara en el piso. A continuación un asistente tomó al equino del bozal y caminó junto a él hasta cubrir la extensión del papel. Así, la distancia (en metros) entre dos marcas de tinta estableció el largo de un paso. El promedio de los valores obtenidos en toda la cinta de papel (exceptuando el primero y el último) se registró como largo de paso.

2.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

2.3.1 Determinación de las concentraciones plasmáticas y sinoviales de ketoprofeno

Las concentraciones plasmáticas de ketoprofeno fueron dosadas utilizando cromatografía líquida de alta presión. Debido a que KTP es un compuesto quiral, las concentraciones de cada enantiómero fueron medidas en forma separada. Para ello se realizó la derivatización de los enantiómeros antes de inyectarlos en el cromatógrafo, este método transforma los enantiómeros en diastereoisómeros, los que al poseer diferentes propiedades fisicoquímicas son fácilmente separados en la columna cromatográfica (63).

Extracción y derivatización de las muestras

A una alícuota de 0.5 ml de muestra, acidificada con 50 µl de HCl 1 N, se le agregaron 3 ml de dietileter. La solución obtenida fue mezclada en un vortex por 5 minutos. Posteriormente se procedió a centrifugar la mezcla durante 5 minutos a 10.000 rpm. La fase orgánica fue recuperada y transferida a un tubo de vidrio limpio. Este procedimiento fue repetido a efectos de aumentar el porcentaje de extracción. El pool final orgánico fue desecado en baño térmico a 40°C bajo atmósfera de nitrógeno. El desecado fue resuspendido en 100 µl de trietilamina 50 mM en acetonitrilo,

aplicando mezclado y vortex por 2 minutos. A esta mezcla se le adicionaron, con intervalo de 30 segundos, 50 µl de etilcloroformiato 60mM en acetonitrilo y 50 µl de una mezcla ana/ana de L-leucinamida 1M y trietilamina 1M en metanol. Luego de 2 minutos la reacción fue detenida con la adición de 50 µl de agua.

Alícuotas de 20 µl fueron inyectadas en un sistema cromatográfico compuesto por una bomba digital Konik serie 11 (Konik Instruments, Suecia), un detector de absorbancia ultravioleta (Konik 200, Konik Instruments, Suecia) y un integrador SP4600 (Thermo Separation Products, CA USA). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna cromatográfica Spherisorb RPC₁₈ 7 µm (250 x 4.6 mm) y una precolumna Spherisorb RPC₁₈ 5 µm. La fase móvil utilizada fue PO₄H₂K 60 mM acetonitrilo : trietilamina (60:40:0.01), siendo la velocidad de flujo 1 ml/min. La detección se fijó a una longitud de onda de 275 nm con una sensibilidad de 0.1 AUFS.

2.3.2 Análisis farmacocinético

Discriminación del modelo farmacocinético

La discriminación del modelo farmacocinético con mejor ajuste a las curvas de disposición plasmática de S(+) y R(-)KTP fue realizado aplicando el Criterio de Información Akaike (AIC) (6) y su aplicación para la discriminación de modelos farmacocinéticos reportada por Yamaoka et al. (265), conformando el test MAICE (Minimun Akaike Information Criterion estimation). El criterio Akaike es definido por la siguiente expresión:

$$AIC = N \ln Re + 2p$$

Donde, N es el número de observaciones, P es el número de parámetros, Re es la suma del cuadrado de las residuales entre concentraciones experimentales y estimadas, expresado como:

$$Re = \sum_{i=1}^n W_i (C_{est} - C_{obs})^2$$

Donde, C_{est} es la concentración estimada, C_{obs} es la concentración observada y W_i es el factor de ponderación de cada observación.

La estimación de los parámetros cinéticos, concentraciones teóricas y la suma de cuadrados residual de acuerdo a los diferentes modelos fue realizada por regresión no lineal utilizando las ecuaciones diferenciales propias de cada modelo y el algoritmo Gauss-Newton con la modificación de Levenberg y Hartley (93; 73).

Análisis de la curva de disposición

Modelos monocompartimentales.

Estos son los modelos más simples. El organismo es considerado como una unidad homogénea. Son aplicables para la descripción de fármacos que al acceder a la circulación sistémica se distribuyen rápidamente entre la sangre y el resto del organismo. Se representa con la siguiente ecuación:

$$C(t) = C_0 e^{-kt}$$

Donde C_0 es la concentración a tiempo 0 (ordenada en el origen), e es la base de los logaritmos naturales y k es la constante de tasa de eliminación (pendiente de la recta).

Modelos multicompartimentales.

En estos modelos se asume que el organismo representa la suma de varios compartimentos. El número de compartimentos dependerá del fármaco así como del diseño de toma de muestras aplicado. Debido a que la distribución es altamente dependiente del flujo sanguíneo los órganos más perfundidos como el hígado y los riñones alcanzarán el equilibrio más rápidamente que el resto del organismo. La sangre y los órganos de alta perfusión pueden ser considerados como una entidad cinética homogénea llamada en conjunto compartimiento central. Los tejidos más pobremente irrigados como el músculo y la grasa pueden ser considerados como un compartimiento periférico. Estos modelos se definen de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$$

$$C(t) = A e^{-\alpha t} + P e^{-\pi t} + B e^{-\beta t}$$

Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

La curva de disposición plasmática expresa la declinación de las concentraciones de fármacos como función del tiempo. Luego de una administración única endovenosa las concentraciones plasmáticas pueden ser descritas matemáticamente a través de la siguiente ecuación poliexponencial:

$$C(t) = Y_i \exp(-\lambda_i t)$$

Donde $C(t)$ es la concentración plasmática a tiempo t , Y ($\mu\text{g/ml}$) es el coeficiente al término i^n y λ_i ($1/h$) es el exponente. Para la administración intravenosa se seleccionó un modelo biexponencial de acuerdo a un modelo abierto de dos compartimientos

$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1 t) + Y_2 \exp(-\lambda_2 t)$$

Donde $C(t)$ ($\mu\text{g/ml}$) representa la concentración plasmática de S(+) o R(-)KTP a tiempo t ; Y_1 y Y_2 ($\mu\text{g/ml}$) son las concentraciones extrapoladas a tiempo 0 de la primera y segunda fase de la curva de disposición y λ_1 y λ_2 ($1/h$) son las pendientes de las fases de distribución y eliminación respectivamente.

La mayoría de los parámetros cinéticos fueron calculados usando ecuaciones clásicas asociadas al análisis farmacocinético compartimental (79; 15; 16).

La vida media de distribución ($t_{1/2 \alpha}$) y eliminación ($t_{1/2 \beta}$) fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$t_{1/2 \alpha} = 0.693 / \lambda_1$$

$$t_{1/2 \beta} = 0.693 / \lambda_2$$

El área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo ($AUC_{(0-\infty)}$) y el tiempo medio de residencia (MRT) fueron calculados aplicando la regla de los trapecoides con extrapolación al infinito. El área de extrapolación fue estimada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$AUC_{(clast-\infty)} = C_{last} / \lambda_2$$

Donde C_{last} es la última concentración medida.

El Clearance corporal (CIB) fue estimado aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{CIB} = \text{Dosis} / \text{AUC}_{(0-\infty)}$$

y el volumen de distribución en estado estacionario:

$$\text{Vd}_{(ss)} = \text{CIB} \times \text{MRT}$$

El porcentaje de inversión quiral (transformación metabólica de R(-)KTP a su antípoda óptica fue calculado aplicando la siguiente ecuación (196; 18):

$$\% \text{ de inversión quiral (PIQ)} = \frac{\text{AUC (S(+)) luego de R(-)} \times \text{Dosis S (+)}}{\text{AUC (S(+)) luego de S(+)} \times \text{Dosis R (-)}} \times 100$$

2.3.3 Determinación de las concentraciones sinoviales de leucocitos

Para realizar el conteo total de glóbulos blancos en el líquido sinovial se utilizó el método de Neubauer. Para ello, una fracción de líquido sinovial de 100 μl fue diluida en solución fisiológica con azul de metileno al 1 % para facilitar el reconocimiento de los leucocitos. Luego se empleó una pipeta de dilución hemocitométrica (pipeta de Thomas) para cargar una fracción de sinovia diluida y rellenar la cámara de Neubauer. El conteo se realizó utilizando los cuatro cuadrados mayores de las esquinas de la cámara, de una manera similar a lo realizado rutinariamente para el conteo de leucocitos en sangre. De esta manera, como cada cuadrado mide 1 mm x 1 mm x 0.1 mm, o sea 0.1 mm^3 , y como son cuatro cuadrados el volumen de sinovia que contenía los leucocitos contados era de 0.4 mm^3 . Luego, se multiplicó el número de células por 2.5 para expresar el resultado en 1 mm^3 (0.4 x 2.5 = 1). Por último se corrigió multiplicando por el factor de dilución que varió de acuerdo a las concentraciones esperadas.

2.3.4 Determinación de las concentraciones sinoviales de proteínas

Fundamentos del ensayo

Para dosar las proteínas presentes en líquido sinovial se utilizó el método colorimétrico propuesto por Schacterle & Pollack (217). Estos investigadores

simplificaron el ensayo basándose en los estudios previos realizados Lowry y colaboradores en 1973 (148). El ensayo se fundamenta en la reacción de reducción que se produce entre las proteínas presentes en la muestra (líquido sinovial) y el fenol (reactivo de Folin) luego de un pretratamiento con cobre en un medio alcalino. El método es útil para dosar las proteínas en el líquido sinovial por varios motivos, en primer lugar el ensayo se realiza sobre muestras que contienen el mismo tipo de proteínas a una concentración similar, el método es sensible a bajas concentraciones lo que permite trabajar con volúmenes pequeños y además en el líquido sinovial no existen sustancias que produzcan interferencia. La concentración de proteínas en el líquido sinovial fue estimada comparando la absorbencia de las muestras con la de una curva patrón de absorbencia en función de la concentración obtenida con muestras de concentración conocida de albúmina bovina obtenida comercialmente (Albúmina bovina Sigma Chemical Co, St Louis USA) .

Para la determinación se preparó el reactivo ACR mezclando 2 g de OH Na, 10 g de CO₃ Na, 1 g de tartrato de Na y K y 50 mg de SO₄ Cu con H₂O destilada hasta completar 100 ml. El reactivo de Folin fue obtenido comercialmente (Folin Ciocalteu ®, Instituto Lamarck) y preparado inmediatamente antes de realizar el ensayo diluyendo 1 ml de reactivo en 17 ml de H₂O destilada. Las muestras de albúmina se prepararon en agua destilada hasta obtener soluciones que contenían 4, 3.5, 3, 2.5, 2 y 1 g/dl.

Técnica: se depositaron 50 µl de las muestras (líquido sinovial y patrones) por duplicado en tubos de vidrio. Luego se agregaron 250 µl de ACR (incluso en el blanco) para dejarlos reposar durante 10 minutos. A continuación se adicionaron 200 µl de agua destilada en las muestras y en los tubos patrón, y 250 µl en el tubo blanco, seguido por 1 ml de reactivo de Folin (en todos los tubos) los que fueron incubados en baño térmico a 55°C durante 5 minutos. Seguidamente las muestras se enfriaron en una batea con agua fría durante 1 minuto. La lectura se realizó en un espectrofotómetro con luz visible a 650 nm.

El promedio de la absorbencia de las dos muestras de cada concentración conocida de albúmina fue utilizado para obtener los valores de la pendiente y la ordenada en el origen mediante un cálculo de regresión (ecuación de la recta).

$$Y = a + b x$$

Donde:

y = es la absorbencia de la muestra problema

a = ordenada en el origen

b = pendiente

x = concentración de la muestra problema

Luego reemplazando:
$$x = \frac{(y - a)}{b}$$

2.3.5 Determinación de las concentraciones sinoviales de IL-1 β

Fundamentos del ensayo

Las concentraciones sinoviales de IL-1 β fueron determinadas mediante un ensayo inmunológico (ELISA) con la técnica denominada “doble sandwich de anticuerpos” (Human Interleukin-1B Enzyme Immunoassay Kit. Cayman Chemical). El ensayo se basa en que la molécula de IL-1 β (presente en las muestras) queda atrapada en el pocillo debido a que éste último está impregnado con un anticuerpo monoclonal específico. Para cuantificarlo se agrega un conjugado (Acetilcolinesterasa:Fab) que contiene otro anticuerpo capaz de unirse a un lugar diferente de la molécula de IL-1 β , más una enzima de revelado (acetilcolinesterasa). Esto les permite a los dos anticuerpos formar un “sandwich” con la molécula de IL-1 β cuya concentración puede ser estimada midiendo la actividad de la enzima de revelado presente en el conjugado mediante el agregado de su substrato (reactivo de Ellman’s). El producto de la reacción enzimática es la aparición de un color amarillo que puede ser medido espectrofotocolorimétricamente, donde la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de IL-1 β presente en el pocillo.

Técnica

La curva de patrones fue construida utilizando el concentrado provisto en el kit, diluido con el sobrenadante de un líquido sinovial centrifugado y mezclado obtenido de las dos articulaciones carpianas de un animal sin signos clínicos ni radiológicos de enfermedad articular. Se prepararon muestras patrón conteniendo 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 y 0 pg/ml de IL-1 β . Previamente a ser utilizada la placa se lavó con un buffer de lavado y se dejó escurrir. Luego, 100 μ l de las muestras patrón y la misma cantidad de cada muestra problema fueron depositadas en los pocillos, adicionando posteriormente 100 μ l de conjugado (acetilcolinesterasa + anticuerpo) en todos los pocillos, con excepción de los blancos. La placa fue cubierta con un film e incubada toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el período de incubación la placa

fue vaciada y lavada varias veces con buffer. Luego se agregaron 200 μ l de sustrato para la acetilcolinesterasa (reactivo de Ellman`s) en todos los pocillos, la placa fue cubierta con un film plástico y dejada en reposo al abrigo de la luz durante doce horas. La lectura se realizó a 419 nm.

2.3.6 Determinación de las concentraciones sinoviales de PGE₂

Prostaglandina E₂ (PGE₂) se produce en una variedad de tejidos que no contienen las enzimas necesarias para metabolizarla. El metabolismo se realiza en el pulmón y los metabolitos resultantes, que representan el 90 % del total de PGE₂, no son estables. Bicyclo PGE₂ es un metabolito estable que se obtiene derivatizando los metabolitos presentes en los tejidos.

Fundamentos del ensayo

El ensayo se basa en la competición entre bicyclo PGE₂ (BPGE₂) y BPGE₂ marcada (con una molécula de acetilcolinesterasa) quienes compiten con sitios de unión limitados de un antisuero específico de conejo para BPGE₂ (Bicyclo Prostaglandin E₂ Enzyme Immunoassay kit. Cayman Chemical). La concentración de BPGE₂ marcada es constante mientras que la de los patrones o las muestras varía. Por lo tanto la cantidad de PGE₂ marcada que es capaz de unirse al antisuero específico es inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ libre en el pocillo. Luego el complejo antisuero-PGE₂ libre o PGE₂ marcada se une al anticuerpo monoclonal anti-conejo de ratón fijado en el pocillo. La placa se lava para eliminar los reactivos no unidos y se agrega el reactivo de ELLMAN'S que contiene el sustrato para la acetilcolinesterasa, el producto de esta reacción enzimática tiene máxima absorbencia a 412 nm. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de PGE₂ marcada unida al pocillo, la que es inversamente proporcional a la concentración de PGE₂ presente en el mismo que proviene de la muestra o patrón.

Ensayo

Previo a la realización del ensayo las muestras y los patrones fueron derivatizados para obtener el metabolito estable (BPGE₂). Este procedimiento se realizó agregando buffer carbonato e incubando la sinovia a 37°C durante toda la noche. Las muestras sinoviales a analizar fueron diluidas de forma diferente en función de las concentraciones de PGE₂ esperadas, a saber:

La sinovia de los animales tratados con RAC, R(-) Y S(+)-KTP obtenidas a las 1, 4, 8, 12, 24 y 48 h post-tratamiento y la sinovia de los animales tratados con solución fisiológica (controles) obtenidas a las 1, 24 y 48 h post-tratamiento se diluyeron

1/100. La sinovia de los animales tratados con solución fisiológica (controles) obtenidas a las 4, 8 y 12 h post-tratamiento se diluyeron 1/1000. La curva patrón se construyó preparando muestras que contenían 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 y 0.39 pg/ml de PGE₂.

Los reactivos fueron combinados en los pocillos con las muestras de la siguiente manera:

	NSB	Bo	Patrones	Actividad total	Muestra	Blanco
Buffer	100 µl	50µl	-----	-----	-----	-----
BPGE ₂ m	50 µl	50 µl	50 µl	5 µl	50 µl	-----
BPGE ₂ a	-----	50 µl	50 µl	-----	50 µl	-----
Ellman	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Patrón	-----	-----	50 µl	-----		-----
Muestra	-----	-----	-----	-----	50 µl	-----

Blanco: define la absorbencia del reactivo de Ellman's. Su valor fue sustraído de la absorbencia de todos los pocillos.

Actividad total: mide la actividad total de BPGE₂ marcada (que se agrega inmediatamente antes de la lectura, es decir no se incubó) + acetilcolinesterasa.

Unión no específica (NSB): mide la unión no inmunológica de BPGE₂ marcada al pocillo. Bo (máxima unión): mide la máxima cantidad de BPGE₂ marcada que el antisuero puede unir en ausencia de BPGE₂ libre.

La placa se cubrió con una lámina de plástico e incubó toda la noche a temperatura ambiente. Luego se vaciaron los pocillos para agregarles 200 µl de reactivo de Ellman's y 5 µl de BPGE₂ marcada al pocillo de Actividad Total. La placa fue cubierta nuevamente y puesta en la oscuridad hasta que Bo midió 0.2 A.U.

El porcentaje de unión para las muestras y los patrones fue calculado utilizando la siguiente relación:

$$\% B / Bo = \frac{(\text{absorbencia de patrón o muestra} - \text{absorbencia de NSB})}{(\text{absorbencia de Bo} - \text{absorbencia de NSB})} \times 100$$

La curva patrón fue construída graficando el % B/Bo como función del logaritmo de la concentración de PGE₂.

2.3.7 Determinación de las concentraciones sinoviales de glucosaminoglicanos

Fundamentos del ensayo

La concentración de glucosaminoglicanos (GAGs) presente en el líquido sinovial fue estimada utilizando un método espectrofotocolorimétrico según la técnica descrita por Carroll (38), cuyo colorante es el 1,9-dimetilmetilen blue (DMMB). El DMMB se conjuga con los GAGs presentes tanto en las moléculas de los proteoglicanos como en aquellas libres en el líquido sinovial. De ésta manera se compara la absorbencia de las muestras con la de una curva patrón. Este método de dosaje ha permitido cuantificar los GAGs totales (condroitín sulfato y keratán sulfato) sin que otros polianiones (fundamentalmente el ácido hialurónico) presentes en el líquido sinovial interfirieran con la medición, como ocurría con los métodos utilizados con anterioridad (104). Para lograr éste propósito se modificó la técnica de acuerdo a Farndale (56; 57) ajustando el PH y la concentración de cloruro de sodio de la solución antes de agregar el colorante.

Para ello 100 µl de las muestras fueron diluidos 1/10 PBS 50 mM pH 7 y mezclados en un vortex durante 1 minuto, para transferir 100 µl por duplicado a tubos de poliestireno. Luego se agregaron 100 µl del mismo buffer conteniendo N-acetilcisteína (concentración final 2 mmol/l) y papaína (0.13 U); los tubos fueron tapados, mezclados e incubados a 65°C durante 2 horas. La digestión de la papaína fue desactivada agregando ácido iodoacético (concentración final 4 mmol/l) y la concentración de ClNa fue ajustada a 0.5 mol/l en un volumen final de 250 µl. El DMMB fue preparado mezclando 16 mg del colorante con 3.04 g de glicina, 2.37 g de ClNa, 1 litro de agua desionizada y el pH ajustado a 3.0 agregando 95 ml de HCl 0.1 M. Las muestras procesadas fueron depositadas en cubetas de 3 ml y la lectura se realizó exactamente 15 segundos luego del agregado 2.5 ml del colorante en un espectrofotocolorímetro digital, con una longitud de onda de luz visible de 525 nm. El tiempo transcurrido desde que se agrega el colorante hasta que se registra la lectura es importante ya que la absorbencia disminuye rápidamente en función del tiempo, sobre todo cuando se trata de soluciones con concentraciones elevadas de GAGs. La concentración de glucosaminoglicanos fue estimada con referencia a una curva patrón realizada con condroitín sulfato A obtenido comercialmente (Sigma Chemical Co, St Louis USA). Debido a que este método no estaba validado previamente, se procedió a hacerlo antes de procesar las muestras.

Validación del método para la determinación de GAGs en líquido sinovial de equinos

El ensayo se dividió en tres etapas:

- a. Confección de una curva patrón para condroitín sulfato A (CS)
- b. Digestión enzimática selectiva de condroitín sulfato A
- c. Evaluación de la técnica para el dosaje de condroitin sulfato A en líquido sinovial equino

a. Confección de una curva patrón para condroitín sulfato A

Objetivos: el presente trabajo fue diseñado para obtener una curva patrón de absorbencia en función de la concentración de CS.

Materiales: el colorante fue preparado según la técnica de Farnsdale citada en el apartado anterior. Condroitín sulfato A (Sigma Co St Louis USA) fue diluido en PBS 50 mM (pH 7) para obtener soluciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml. La lectura se realizó utilizando un espectrofotómetro marca Hitachi M-1100.

Metodología: una cubeta conteniendo 100 µl de PBS y 2.5 ml de colorante fue utilizada para ajustar la absorbencia al 0 % con una longitud de onda de 525 nm. Cien µl de cada muestra por duplicado, fueron depositados en las cubetas de lectura, luego se agregaron 2.5 ml de colorante de a un tubo por vez para poder realizar la lectura 15 segundos más tarde. El ensayo fue repetido tres veces el mismo día. La curva de absorbencia en función de la concentración se construyó a partir de las medias obtenidas en los tres ensayos. Los valores medios (media aritmética) y los desvíos estándar de la media permitieron calcular los coeficientes de variación.

b. Digestión enzimática de condroitín sulfato A

Objetivos: el presente estudio fue diseñado para corroborar el grado de pureza del condroitín sulfato A adquirido comercialmente.

Materiales: el colorante y el espectrofotómetro utilizados fueron descritos en el ensayo anterior. La muestra fue preparada diluyendo CS en PBS 50 mM (pH 7) para obtener 4.5 ml de una solución que contenía 50 µg/ml. Condroitinasa ABC (*Proteus vulgaris*) se preparó disolviendo 5 UI en 10 ml de PBS para obtener una concentración final de 0.5 UI/ml.

Metodología: 1.5 ml de la muestra fueron depositados por triplicado en tubos de poliestireno. Cincuenta µl de condroitinasa ABC fueron agregados a dos tubos (concentración final 0.05 UI/ml) y el mismo volumen de PBS al tercero (muestra

testigo). Las muestras fueron incubadas en estufa a 37° C. Un tubo conteniendo 250 µl de PBS y 2 ml de colorante fue utilizado para ajustar la absorbencia al 0 % con una longitud de onda de 525 nm. Una curva patrón de CS (como la descrita en el ensayo anterior) fue construida para estimar las concentraciones de CS de las muestras incubadas. Cien µl de cada tubo fueron extraídos de la estufa a tiempo 0 y a los 5, 10, 20, 30 y 40 minutos de iniciada la incubación; la absorbencia fue leída agregando 150 µl de PBS y 2 ml del colorante luego de 15 segundos. La pérdida en la concentración de CS (media de los dos tubos tratados con condroitinasa ABC) en función del tiempo de incubación fue estimada con referencia a la curva patrón, mientras que la absorbencia en el tubo testigo debió mantenerse constante. Los datos obtenidos fueron utilizados para construir un gráfico que muestra el porcentaje de pérdida en la concentración de CS de las muestras a medida que aumenta el tiempo de incubación producto de la actividad de condroitinasa ABC.

c. Evaluación de la técnica para el dosaje de condroitin sulfato A en líquido sinovial equino

Objetivos: el presente trabajo fue diseñado para evaluar la técnica aplicándola al dosaje de condroitín sulfato A en líquido sinovial equino. Esto incluye el tratamiento de las muestras sinoviales con papaína para digerir las proteínas que puedan interferir con la cuantificación de los GAGs. Además se enriquecieron muestras sinoviales con cantidades conocidas de CS para calcular el % de recuperación de CS.

Materiales: el colorante utilizado fue preparado como se describió en los ensayos anteriores. Una solución de PBS 50 mM (pH 7) con papaína y N-acetilcisteína fue preparada disolviendo 0.1305 g de N-acetilcisteína y 150 µl de papaína (175 UI / ml) en 20 ml PBS. Además se utilizaron una solución de ácido iodoacético 0.1 M, soluciones de CS en PBS conteniendo 100, 50, 40, 20, 10 y 5 µg / ml y una solución de ajuste de sodio (1.11 g Cl Na en 8 ml de agua destilada). Adicionalmente se preparó una solución de CS 100 µg / ml en PBS.

Metodología: Dos ml de líquido sinovial equino fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. A 50 µl del sobrenadante se le agregaron 450µl de PBS para obtener una solución 1/10 de sinovia sin enriquecer. Por otro lado a 50 µl de líquido sinovial sin diluir se le agregaron 50 µl de la solución de CS (100 µg/ml) y 350 µl de PBS para obtener una solución de sinovia 1/10 enriquecida con 10 µg/ml de CS. Las soluciones

fueron mezcladas por separado durante varios minutos utilizando un vortex. Cien μl de cada muestra, por duplicado, fueron depositados en tubos de poliestireno. La digestión de las proteínas presentes en las muestras fue realizada agregando 100 μl de la solución con papaína. Los tubos fueron tapados, mezclados e incubados en estufa a 65° C durante dos horas. Tras la digestión, la papaína fue inactivada agregando 10 μl de la solución de ácido iodoacético y la concentración de sodio fue ajustada agregando 40 μl de la solución de ajuste de sodio. Una cubeta conteniendo 250 μl de PBS y 2 ml de colorante fue utilizada para ajustar la absorbencia al 0 %. Las muestras fueron depositadas en cubetas para agregarles 2 ml del colorante y realizar la lectura 15 segundos más tarde con una longitud de onda de 525 nm. Los valores de absorbencia obtenidos en las muestras fueron extrapolados utilizando una curva de patrones realizada en el momento del ensayo como las citadas anteriormente. La siguiente ecuación permitió conocer el porcentaje de CS recuperado de las muestras enriquecidas:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{(\text{CS muestras enriquecidas} - \text{CS muestras sin enriquecer})}{\text{CS muestras sin enriquecer}} \times 100$$

2.3.8 Determinación de las concentraciones séricas de Tromboxano B₂

Fundamentos del ensayo. Tromboxano A₂ es un metabolito activo sintetizado a partir del ácido araquidónico en las plaquetas. Es un potente promotor de la formación de coágulos ya que provoca agregación celular, vasoconstricción y estasis sanguínea. Su concentración ha sido estimada mediante la cuantificación de su metabolito estable, el TXB₂.

Las concentraciones séricas de Tromboxano B₂ fueron dosadas por radioinmunoensayo (RIA). Este ensayo se basa en el principio de la competición entre el antígeno (en este caso TxB₂) presente en la muestra con un antígeno homólogo radiactivo por un anticuerpo específico.

La incubación de la muestra de concentración desconocida con una cantidad fija de anticuerpo y de antígeno radioactivo, conducirá a la competición de ambos antígenos por el anticuerpo. La emisión β de la mezcla tras la incubación será entonces inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. Los resultados cuantitativos son obtenidos por extrapolación desde una curva patrón.

Ensayo.

El buffer utilizado estaba compuesto por: gelatina 1 g; Trisma HCl 6.61 g y Trisma base 0.97 g, disueltos en 1 litro de agua destilada. El pH fue corregido a 7.4

Carbón/dextrano: se mezclaron 2 g de carbón neutralizado con 0.4 g de dextrano (T-70 ICN, Argentina) y se disolvieron en 80 ml de buffer. Este volumen fue mezclado por 1 hora y el volumen completado a 100ml con buffer.

Antisuero: AntiTxB₂ de conejo, (ICN Inmunochemicals, USA) fue resuspendido con 15 ml de buffer. Este volumen es suficiente para 150 determinaciones.

Patrones: La curva patrón fue construida con las siguientes concentraciones: 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2 ng/ml; 1 ng/ml; 0.5 ng/ml; 0.2 ng/ml; 0.1 ng/ml y 0.05 ng/ml. Todos los patrones fueron preparados en buffer.

Tracer: Se utilizó una solución de [3H] TxB₂ 7.84 TBq/mmol en etanol (Amersham, Argentina). Una concentración de 0.6 µl/ml produjo un número correcto de CPM.

Los tubos se prepararon por duplicado con la adición de los reactivos según se presenta en la siguiente Tabla:

REACTIVO	NSB	Bo	Std	TC	MUESTRA
Buffer	200 µl	100 µl	-----	500 µl	100 µl
Tracer	100 µl				
Antisuero	-----	100 µl	100 µl	-----	100 µl
Std	-----	-----	100 µl	-----	-----
Muestra	-----	-----		-----	100 µl
Carbon	200 µl	200 µl	200 µl	-----	200 µl

NSB: Non-specific binding

TC: Conteo Total (Total count)

Bo : Blanco

Std: Patrón

Una vez adicionados los reactivos, los tubos fueron incubados 18 horas a 4°C. Al finalizar el período de incubación, se adicionó el carbón a todos los tubos, con excepción del TC. La mezcla fue tratada en un vortex, incubada por 10 min a 4°C y centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue decantado a tubos de centelleo agregándose 5 ml de líquido de centelleo (ICN, Argentina) Las emisiones β fueron medidas en un β-counter Packard Tricarb 300.

El porcentaje de unión para las muestras y los patrones fue calculado utilizando la siguiente relación:

$$\% B / B_0 = \frac{(\text{CPM de patrón o muestra} - \text{CPM de NSB})}{(\text{CPM de } B_0 - \text{CPM de NSB})} \cdot 100$$

La curva patrón fue construida graficando el % B / B₀ como función del logaritmo de la concentración de TXB₂.

2.3.9 Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente tanto los parámetros clínicos como los bioquímicos se aplicó el test de ANOVA mediante un programa de computación denominado GraphPad Prism™ (GraphPad Software, Inc. version 2.00 San Diego. USA. © 1995). Los valores a comparar se obtuvieron utilizando un método de análisis estadístico para datos seriales referido como "método de medidas _abreviadas" (154). Brevemente, este método compara los individuos de diferentes grupos partiendo de un único valor asignado a la respuesta de cada uno de ellos. Dicho valor concentra en un solo número la respuesta global del individuo a un tratamiento determinado. El número asignado a cada individuo es el área o superficie bajo la curva de respuesta (temperatura, diámetro etc.) en función del tiempo. Para calcular el área bajo la curva (AUC) de respuesta en función del tiempo se aplicó el método de trapezoides.

$$AUC = 0.5 \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (y_i + y_{i+1})$$

Donde, t es tiempo de toma de muestra e "y" es el valor medido.

Los parámetros clínicos fueron normalizados, previamente al análisis inferativo, de acuerdo a los valores basales individuales de cada animal experimental. La normalización consistió en la corrección de las modificaciones desde basal como porcentaje de cambio:

$$\text{Valor normalizado} = \frac{\text{valor registrado a tiempo } t}{\text{valor basal}} \cdot 100$$

Los análisis estadísticos aplicados para comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de cada tratamiento fueron llevados a cabo aplicando los test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

Un test de ANOVA fue utilizado para el análisis entre los diferentes períodos del cross-over. El límite de significancia fue establecido en 0.05.

3. RESULTADOS

3.1 VALIDACION DE METODOS

3.1.1 Validación del método cromatográfico para la cuantificación de R(-) y S(+) ketoprofeno

Las curvas estándar utilizadas cumplieron los requisitos de validación.

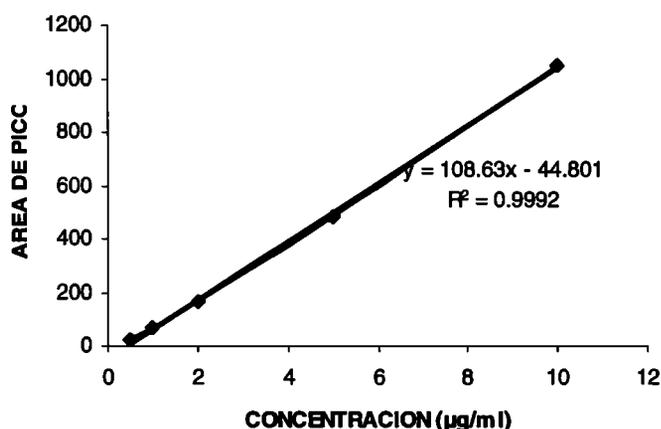
Los coeficientes de variación intra-día para R(-) y S(+)KTP fueron siempre menores de 4.53% (correspondiente a la concentración 0.5 µg/mL). Los coeficientes inter-día para R(-) y S(+)KTP fueron siempre menores a 7.22% (correspondiente a la concentración 0.5 µg/mL).

El análisis de exactitud mostró que los valores observados fueron en todos los casos iguales a los valores de concentración reales $\pm 5\%$.

Las curvas estándar de los dos compuestos tuvieron una regresión >0.99 . Tanto para R(-) como para S(+)KTP, las curvas fueron lineales en todo el rango de concentraciones, entre 10 y 0.5 µg/mL ($r^2 = >0.999$).

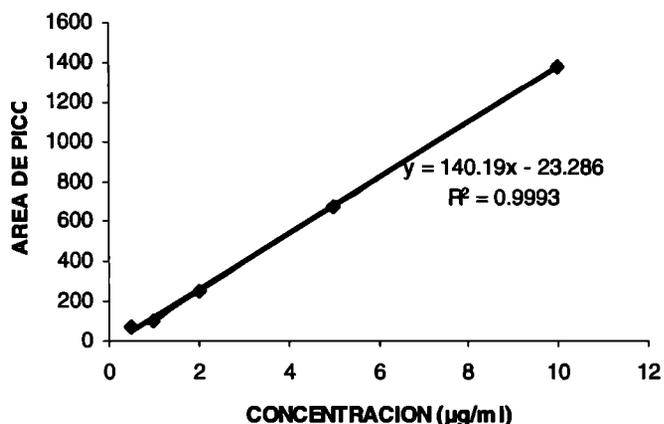
Para S(+)KTP, la curva fue lineal en todo el rango de concentraciones, entre 10 y 0.5 µg/ml ($r^2 = 0.9996$). La ecuación de la recta resultado de la regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados fue:

$$\text{Area de pico cromatográfico} = 106.63x - 44.801$$



Para R(-)KTP, la curva fue lineal en todo el rango de concentraciones, entre 10 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0.9993$). La ecuación de la recta resultado de la regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados fue:

$$\text{Area de pico cromatográfico} = 140.19x - 23.286$$



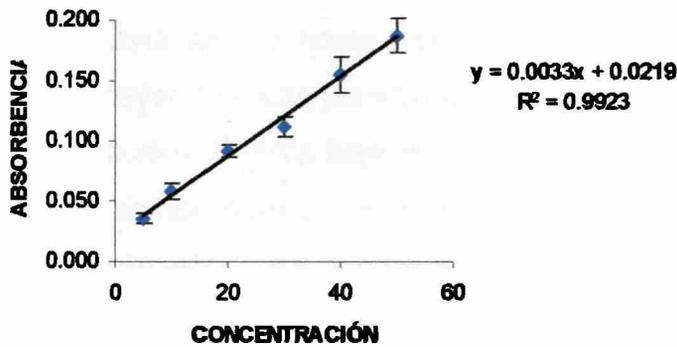
El porcentaje de extracción se calculó mediante la relación existente entre las áreas producidas por las soluciones en etanol y las áreas correspondientes a las mismas drogas con el plasma como diluyente. Los porcentajes de extracción fueron de 90.42, 84.93, 72.38, y 91.03 % para 10, 2, 1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de S(+)-KTP luego de inyectar la mezcla racémica. Para el enantiómero R(-)KTP luego de inyectar la mezcla racémica los porcentajes de extracción fueron de 90.96, 84.24, 71.95 y 97.93 % para las mismas concentraciones que el enantiómero S(+).

3.1.2 Validación del método colorimétrico para la cuantificación de GAGs en líquido sinovial

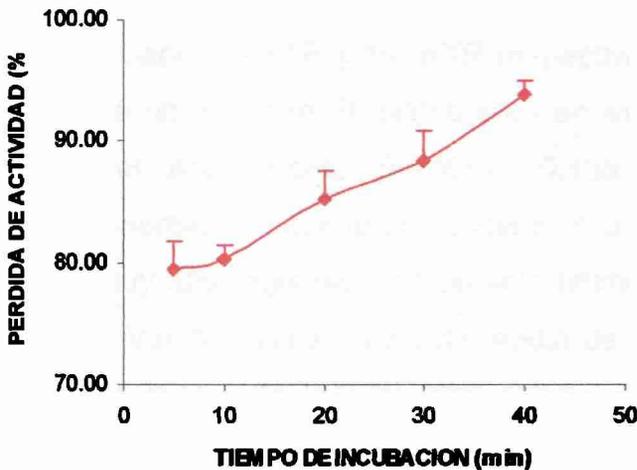
Los valores de absorbencia en función de las concentraciones de Condroitín Sulfato A (obtenido comercialmente) diluido en PBS son mostrados en la figura 2.

Los coeficientes de variación intra-día fueron siempre menores de 5.50% (correspondiente a la concentración 20 $\mu\text{g/mL}$). Los coeficientes inter-día fueron siempre menores a 7.10% (correspondiente a la concentración 30 $\mu\text{g/mL}$).

El cálculo de la pendiente y la ordenada en el origen permitieron establecer un valor de r^2 de 0.9923. La figura muestra el trazado de la curva de absorbencia en función de la concentración de CS y los desvíos calculados.



La digestión enzimática de CS se muestra en la siguiente figura.



La absorbencia leída hacia el final de la digestión fue casi total (98.7%) lo cual garantizó que no hubo otras sustancias que produjeran interferencia con la lectura.

3.2 VARIABLES FARMACOCINÉTICAS

3.2.1 Administración de la mezcla racémica (Rac-KTP)

La disposición de S(+) y R(-)KTP en el plasma después de la administración intravenosa de la mezcla racémica fue descrita convenientemente mediante un modelo bicompartimental en todos los animales (Ver Fig.4). Las concentraciones plasmáticas del enantiómero S(+)KTP fueron más elevadas que las de R(-)KTP en todas las muestras analizadas hasta las dos horas post-administración; S(+)KTP fue el enantiómero predominante en plasma. De ésta manera la relación S:R en plasma se incrementó desde un valor de 55:45 a los cinco minutos post-inyección (primera muestra) hasta alcanzar la máxima diferencia luego de una hora de inyectada la mezcla racémica, con un valor S:R de 74:26. Así, el predominio plasmático del

enantiómero S(+)*KTP* fue aumentando paulatinamente desde la inyección del racemato hasta las dos horas post-administración. Luego la diferencia en la relación S:R fue decayendo hasta las últimas concentraciones plasmáticas mensuradas (hora 6 post-inyección). El área bajo la curva (AUC) concentración plasmática de droga en función del tiempo para S(+)*KTP* fue significativamente más alta ($p < 0.05$) que la de su isómero R(-)*KTP* ($5.5 \pm 0.98 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ y $3.1 \pm 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ para S(+) y R(-)*KTP* respectivamente).

La disposición plasmática de ambos enantiómeros mostró una rápida fase de distribución, con valores de vida media para este proceso ($T_{1/2\alpha}$) de 0.2 ± 0.03 h y 0.13 ± 0.01 h para S(+) y R(-)*KTP* respectivamente (Tabla I). El volumen del compartimento central (V_c) fue bajo para ambos enantiómeros (0.1 ± 0.01 y 0.12 ± 0.01 L/kg, para S(+)*KTP* y R(-)*KTP* respectivamente). Sin embargo, el enantiómero R(-) mostró un volumen de distribución en estado estacionario (V_{dss}) más elevado que el del enantiómero S(+)*KTP* (0.438 ± 0.1 l/kg y 0.198 ± 0.03 l/kg, respectivamente), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, debido a un valor muy alto registrado en un solo animal ($V_{ss} = 0.98$ l/kg para R(-)*KTP* en el animal E - Ver Apéndice). La vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) fue numéricamente mayor para el enantiómero R(-)*KTP* comparado con S(+)*KTP* (1.87 ± 0.6 h y 1.14 ± 0.18 h, respectivamente) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El clearance corporal total (CLB) para R(-)*KTP* fue casi dos veces el de S(+)*KTP* (0.4 ± 0.07 L/kg/h y 0.23 ± 0.04 L/kg/h), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la variación interanimal.

Ambos enantiómeros alcanzaron concentraciones elevadas en la articulación inflamada, con valores de 0.6 ± 0.09 y $0.5 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{ml}$ para S(+)*KTP* y R(-)*KTP* respectivamente, luego de una hora de inyectada la mezcla racémica (Fig.4). El enantiómero S(+) fue, moderadamente, el predominante en todos los registros, siendo la relación S:R de 52:48 tanto a la primera hora como a las cuatro horas post-inyección. El área bajo la curva (AUC) concentración sinovial en función del tiempo fue mayor para el enantiómero S(+)*KTP* comparado con el R(-)*KTP* ($1.25 \pm 0.45 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ y $0.82 \pm 0.23 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ respectivamente). La concentración de R(-)*KTP* en el líquido sinovial luego de una, dos y cuatro horas de la administración intravenosa del racemato fue siempre más alta que su concentración plasmática. Ambos enantiómeros fueron detectados en el líquido sinovial de todos los animales hasta las 2 h, y solo en dos animales en las muestras de las 4 y 6 horas post-inyección.

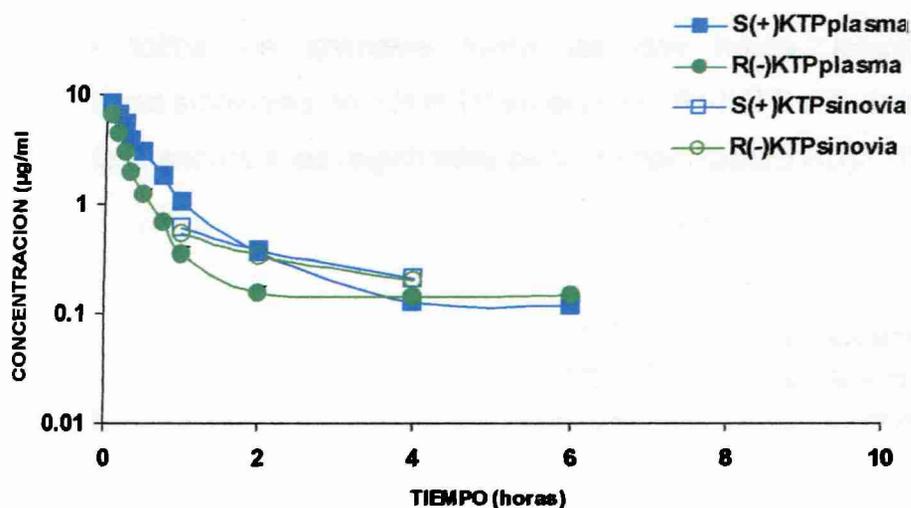


Figura 4. Concentraciones de S(+) y R(-)KTP en plasma y líquido sinovial luego de la administración intravenosa de Rac-KTP a la dosis de 2.2 mg/kg. (Los valores son media \pm sem, n= 6).

3.2.2 Administración de R(-)KTP

La disposición plasmática de R(-)KTP fue mejor descrita por un modelo bicompartimental para todos los animales (Ver Fig. 5). El enantiómero S(+)-KTP fue detectado en plasma desde la primera muestra analizada (5 minutos luego de la inyección intravenosa de R(-)KTP) evidenciando la inversión quiral, siendo el porcentaje de inversión 19.19 ± 6.09 % (Tabla I). La distribución de R(-)KTP fue rápida con una vida media ($T_{1/2\alpha}$) de 0.13 ± 0.028 h y un volumen del compartimento central de 0.13 ± 0.034 L/kg. El volumen de distribución aparente (V_{dss}) fue estimado en 0.788 ± 0.291 L/kg lo cual fue considerado alto tratándose de una droga con alta unión a proteínas plasmáticas. El clearance corporal total con un valor de 0.388 ± 0.011 L/kg/h fue similar al determinado para este enantiómero luego de inyectar los animales con la mezcla racémica. No obstante la vida media de eliminación ($T_{1/2\beta} = 2.63 \pm 0.81$ h) fue mayor que la observada luego de administrar la mezcla racémica. La comparación estadística entre los parámetros farmacocinéticos luego de la inyección intravenosa de la mezcla racémica y del enantiómero R(-)KTP no demostró diferencias estadísticamente significativas.

R(-)KTP en líquido sinovial fue detectado desde la primera hora post-inyección (primera muestra), momento en el cual se detectó la máxima concentración ($0.32 \pm$

0.058 $\mu\text{g/ml}$). El enantiómero R(-)KTP fue medido hasta las 4 h en todos los animales y su concentración a este tiempo fue de $0.177 \pm 0.009 \mu\text{g/ml}$. De la misma manera que lo observado en el plasma, el enantiómero S(+)KTP fue detectado en el líquido sinovial de todos los animales hasta las dos horas. Interesantemente, las concentraciones sinoviales de S(+)KTP en el grupo R(-)KTP a la 1, 2 y 4 horas fueron escasamente menores a las registradas para el enantiómero R(-)KTP.

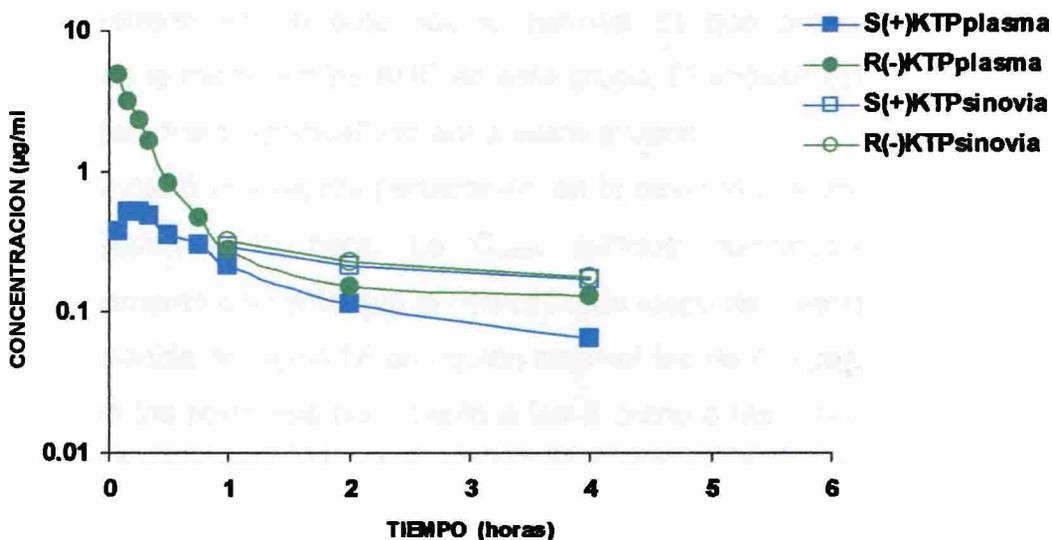


Figura 5. Concentraciones de S(+) y R(-)KTP en plasma y líquido sinovial luego de la administración intravenosa de R(-)KTP a la dosis de 1.1 mg/kg. (Los valores son media \pm sem, n= 6).

3.2.3 Administración de S(+)KTP

Luego de la inyección intravenosa de S(+)KTP su antípoda óptica no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas lo cual refleja una falta de inversión quiral desde el enantiómero S(+) al R(-). La disposición plasmática de S(+)KTP fue mejor descrita mediante un modelo bicompartimental en todos los animales (Ver Fig. 6). La disposición plasmática de S(+)KTP mostró una distribución rápida ($T_{1/2\alpha}$ 0.15 ± 0.04 h) (Tabla I) con un volumen del compartimiento central relativamente pequeño (0.11 ± 0.028 L/kg). El V_{ss} fue menor que el registrado para R(-)KTP, con un valor de 0.33 ± 0.13 L/kg La relación K_{21}/K_{12} fue alrededor de 1 sugiriendo la ausencia de fijación del enantiómero S(+)KTP a las proteínas tisulares. La comparación entre los parámetros farmacocinéticos observados luego de la administración de S(+)KTP y de

la mezcla racémica no reveló diferencias estadísticamente significativas. El $T_{1/2\beta}$ de 1.34 ± 0.52 h fue similar al determinado para este enantiómero después de la administración del racemato. El clearance de 0.29 ± 0.01 L/kg/h es bajo y no presenta diferencias con relación al estimado luego de la administración de la mezcla racémica.

El AUC de S(+)-KTP luego de su administración intravenosa (3.72 ± 0.155 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) fue más baja que el área calculada para el mismo enantiómero después de inyectar la mezcla racémica (5.54 ± 0.98 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$). Esta amplia diferencia es debida al elevado valor registrado en un solo equino (animal E) que provocó un elevado desvío estándar de la media en las AUC en este grupo. El análisis estadístico de las AUC no mostró diferencias significativas entre estos grupos.

S(+)-KTP mostró una rápida penetración en la cavidad articular, con una C_{max} de 0.49 ± 0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a la hora. La C_{max} , aunque numéricamente menor, no fue estadísticamente diferente que la determinada luego de inyectar la mezcla racémica.

La permanencia de S(+)-KTP en líquido sinovial fue de 4 horas en cuatro equinos y de 6 horas en los restantes dos. Tanto a las 2 como a las 4 horas las concentraciones sinoviales fueron más elevadas que las plasmáticas. Al igual que en las muestras de plasma, R(-)-KTP no fue detectado en líquido sinovial.

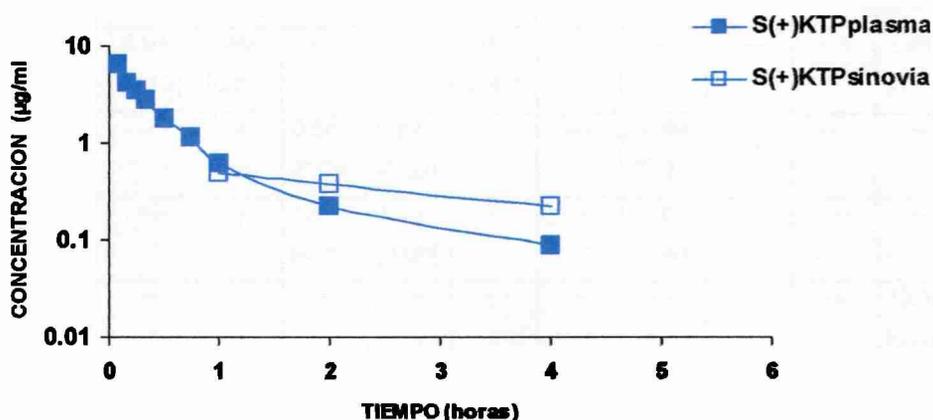


Figura 6. Concentraciones de S(+)-KTP en plasma y líquido sinovial luego de la administración intravenosa de S(+)-KTP a la dosis de 1.1 mg/kg. (Los valores son media \pm sem, n= 6).

Tabla I. Parámetros farmacocinéticos de R(-) y S(+)-KTP luego de la administración intravenosa de la mezcla racémica (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg) en equinos artríticos (los valores son media \pm sem], n=6).

PARAMETRO	Rac-KTP Plasma		Rac- KTP Sinovia		S(+)-KTP Plasma		S(+)-KTP Sinovia		R(-)-KTP Plasma		R(-)-KTP Sinovia	
	S(+)	R(-)	S(+)	R(-)	S(+)	R(-)	S(+)	R(-)	S(+)	R(-)	S(+)	R(-)
α (1/h)	3.78 [0.52]	5.28 [0.36]	----	----	11.4 [6.53]	----	----	----	----	9.90 [4.92]	----	----
β (1/h)	0.68 [0.12]	0.70 [0.23]	----	----	0.82 [0.20]	----	----	----	----	0.63 [0.32]	----	----
$T_{1/2} \alpha$ (h)	0.20 [0.03]	0.13 [0.01]	----	----	0.15 [0.04]	----	----	----	----	0.13 [0.03]	----	----
$T_{1/2} \beta$ (h)	1.14 [0.18]	1.87 [0.63]	----	----	1.34 [0.52]	----	----	----	----	2.63 [0.81]	----	----
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	5.54 [0.98]	3.13 [0.50]	1.25 [0.45]	0.82 [0.23]	3.72 [0.15]	----	1.36 [0.80]	----	----	2.82 [0.08]	0.36 [0.20]	0.86 [0.30]
K10 (1/h)	2.08 [0.19]	3.34 [0.40]	----	----	2.16 [0.31]	----	----	----	----	2.34 [0.37]	----	----
K12 (1/h)	0.97 [0.20]	1.61 [0.21]	----	----	1.59 [0.37]	----	----	----	----	1.70 [0.21]	----	----
K21 (1/h)	1.42 [0.50]	1.02 [0.27]	----	----	1.82 [0.67]	----	----	----	----	1.21 [0.66]	----	----
Vc (l/kg)	0.10 [0.01]	0.12 [0.01]	----	----	0.11 [0.03]	----	----	----	----	0.13 [0.03]	----	----
Vdss (l/kg)	0.20 [0.03]	0.44 [0.13]	----	----	0.33 [0.13]	----	----	----	----	0.79 [0.29]	----	----
CIB (l/kg/h)	0.23 [0.04]	0.40 [0.07]	----	----	0.29 [0.01]	----	----	----	----	0.39 [0.01]	----	----
MRT (h)	0.93 [0.13]	1.40 [0.51]	----	----	1.09 [0.40]	----	----	----	----	1.99 [0.71]	----	----
Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	----	----	0.60 [0.09]	0.54 [0.09]	----	----	0.49 [0.07]	----	----	----	0.29 [0.05]	0.32 [0.06]
Tmax (h)	----	----	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	----	----	1.00 [0.00]	----	----	----	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]
PIQ (%)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	19.19 [6.09]	----	----

3.3 VARIABLES FARMACODINÁMICAS

3.3.1 Temperatura corporal

La temperatura corporal se incrementó desde la inducción de la artritis (tiempo 0) hasta las 8 o 12 h donde se ubicaron los valores máximos para todos los animales independientemente del tratamiento (Ver Fig. 5). Las temperaturas máximas en el

grupo placebo fueron de $5.1 \pm 1.3\%$ sobre el valor basal a las 12 h post-inducción. En los animales de los grupos S(+)-KTP y R(-)-KTP las temperaturas máximas registradas tuvieron valores similares de $5.0 \pm 0.6\%$ y $5.1 \pm 2\%$ sobre el valor basal respectivamente, mientras que los animales del grupo RAC-KTP tuvieron su valor máximo en este parámetro con temperaturas corporales menores, de $4.4 \pm 1.6\%$ a las 12 h post-inducción. Posteriormente la temperatura disminuyó en todos los grupos experimentales observándose una leve elevación a las 36 h post-inducción en los cuatro grupos. A las 48 h, todos los animales (excepción del animal F tras la administración de S(+)-KTP) mantenían la temperatura corporal por encima del valor basal (hora 0). Ninguna de las diferencias observadas entre los grupos alcanzó significación estadística, siendo los valores del AUC (% de variación desde basal en función del tiempo) de 49.27 ± 0.17 , 49.12 ± 0.38 , 49.12 ± 0.35 y 49.06 ± 0.63 para S(+)-KTP, Placebo, R(-)-KTP y RAC-KTP respectivamente (gráfico 1b).

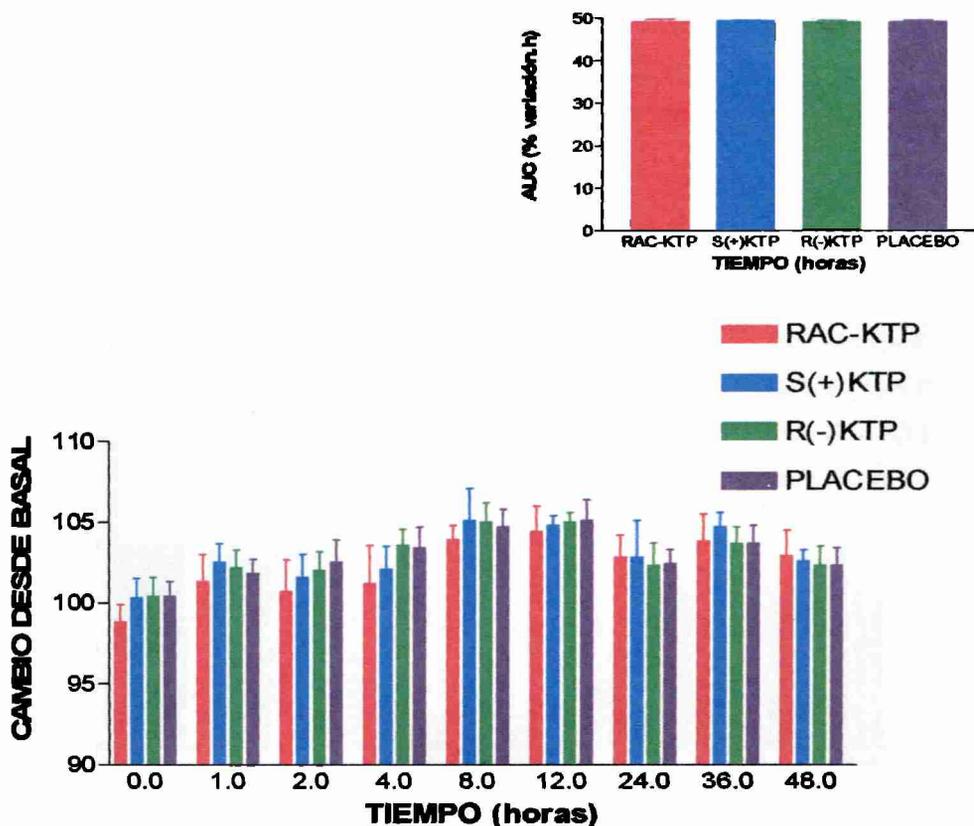


Figura 5. Grafica de los cambios desde basal ($X \pm SD$) en función del tiempo de la temperatura corporal en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs tiempo para de la temperatura corporal en los cuatro grupos experimentales.

3.3.2 Circunferencia carpiana

La circunferencia carpiana aumentó progresivamente desde el registro de la hora 1 hasta las 36 ó 48 h donde se observaron los valores más elevados en todos los animales independientemente del tratamiento (Fig. 7). Las circunferencias carpianas más agrandadas fueron observadas a las 36 h de inducida la sinovitis en el grupo RAC-KTP ($10.9 \pm 4.8\%$), a las 48 h en el grupo S(+)-KTP ($9.8 \pm 6.2\%$) y a las 36 h en el grupo R(-)-KTP ($9.8 \pm 5\%$). Las modificaciones menos marcadas en éste parámetro fueron registradas en los animales del grupo Placebo a las 24 y 36 h ($8.4 \pm 4.2\%$). El análisis estadístico de los cambios temporales de este parámetro no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales, siendo los valores de AUC (cambio desde basal vs tiempo) de 51.44 ± 1.3 ; 51.20 ± 1.49 ; 50.99 ± 1.51 y 50.44 ± 1.72 para R(-)-KTP, RAC-KTP, Placebo y S(+)-KTP.

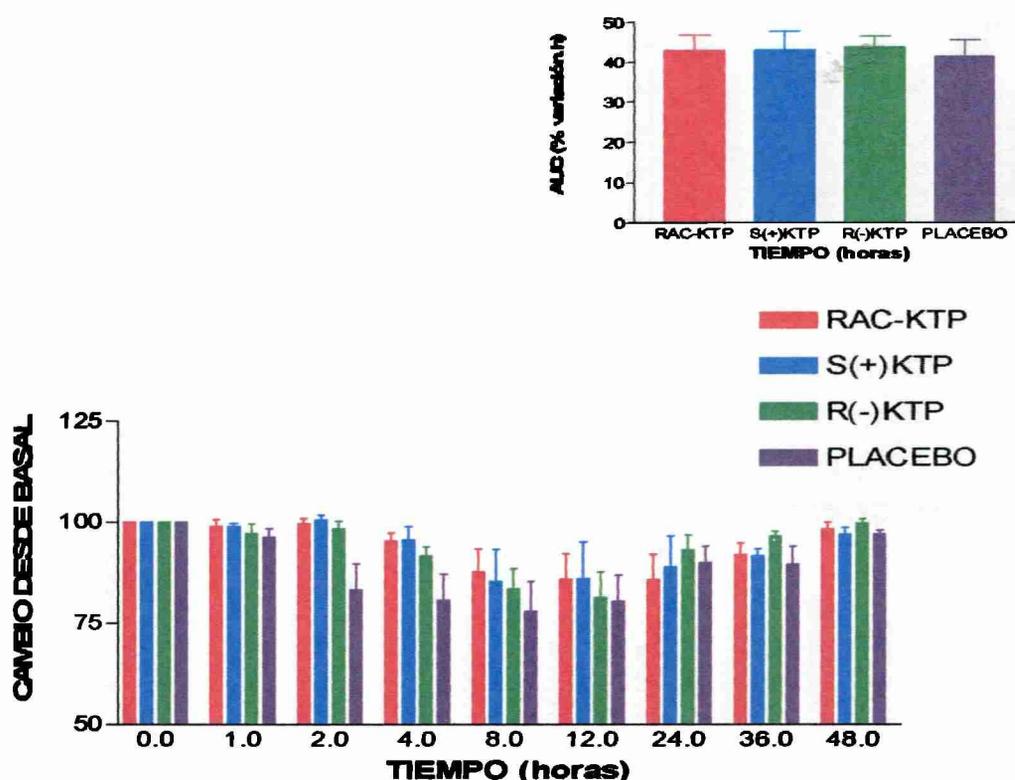


Figura 6. Grafica de los cambios desde basal ($X \pm SD$) en función del tiempo de la circunferencia de la articulación afectada en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs tiempo para la circunferencia de la articulación afectada en los cuatro grupos experimentales

3.3.3 Angulo carpiano en reposo

El ángulo carpiano en reposo disminuyó entre las 4 y las 48 h post-tratamiento en todos los grupos experimentales (Fig. 7). Los animales que mostraron una disminución mayor en sus ángulos carpianos en reposo fueron los del grupo tratado con S(+)-KTP quienes disminuyeron sus ángulos carpianos en reposo un $15.6 \pm 0.13\%$ respecto de sus valores basales a las 12 h post-inducción. Los animales del grupo R(-)-KTP tuvieron una disminución en sus ángulos carpianos en reposo del $11.6 \pm 0.09\%$ a las 12 h. Los del grupo Placebo disminuyeron sus ángulos carpianos en reposo un $10.2 \pm 0.09\%$ también a las 12 h. Una disminución menos marcada en este parámetro se registró a las 36 h en los animales sometidos al tratamiento con RAC-KTP y fue un $6.4 \pm 0.12\%$ menor respecto del valor basal. El análisis estadístico de los cambios temporales de este parámetro no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales, siendo los valores de AUC (cambio desde basal vs tiempo) de 43.88 ± 3.44 ; 45.30 ± 3.98 ; 45.38 ± 1.79 y 45.60 ± 1.62 para S(+)-KTP, RAC-KTP, R(-)-KTP y Placebo.

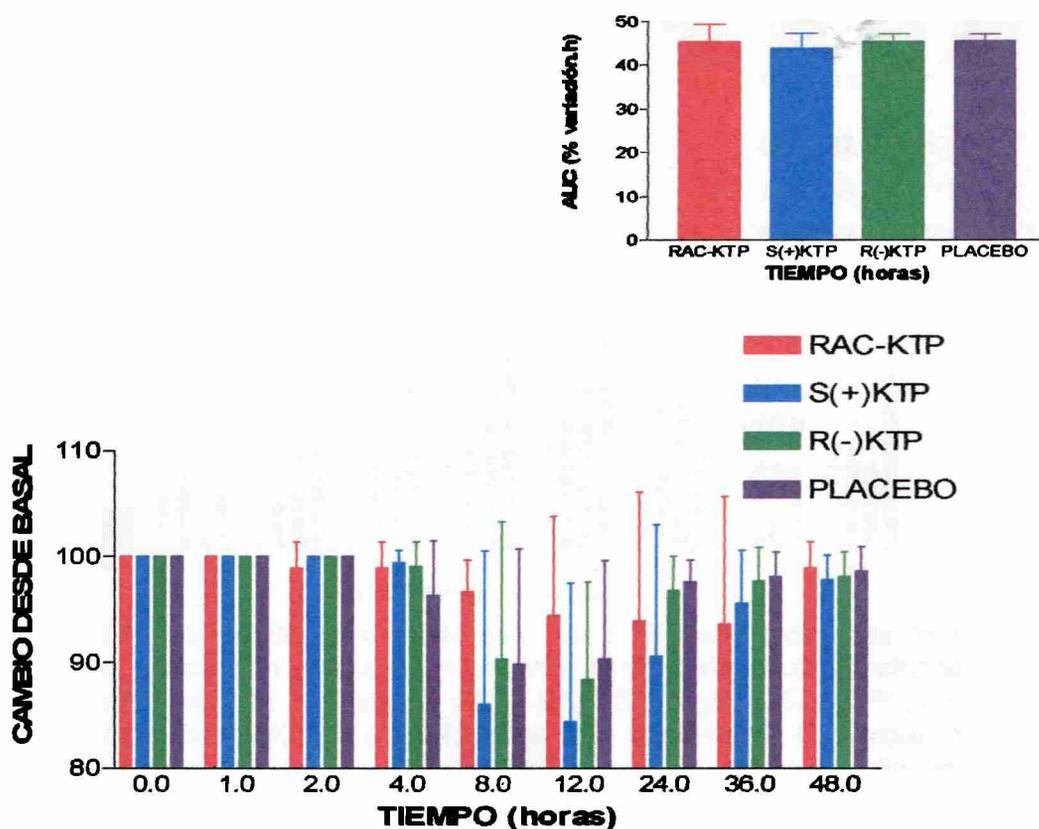


Figura 7. Grafica de los cambios desde basal ($X \pm SD$) en función del tiempo del ángulo carpiano de la articulación afectada en reposo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs tiempo para el ángulo carpiano de la articulación afectada en reposo en los cuatro grupos experimentales.

3.3.4 Angulo carpiano de máxima flexión

El ángulo carpiano de máxima flexión aumentó en todos los grupos experimentales desde las primeras mediciones (1 o 2 horas) hasta las 48 h post-tratamiento (Fig. 8). Los valores más elevados se observaron entre las 4 y 24 h post-tratamiento. En los animales del grupo Placebo el máximo valor se presentó a la 12 h ($5.1 \pm 1.1\%$), a las 24 h en el grupo RAC-KTP ($4.1 \pm 1.0\%$), a las 12 h en el grupo R(-)KTP ($4.0 \pm 1.1\%$) y a las 24 h de inducida la sinovitis en el grupo tratado con S(+)-KTP ($3.9 \pm 0.7\%$). Ninguna de las diferencias observadas entre los grupos alcanzó significación estadística, siendo los valores del AUC (% de variación desde basal en función del tiempo) de 200.92 ± 108.86 ; 162.8 ± 94.83 ; 156.97 ± 74.51 y 153.31 ± 63.28 para los grupos Placebo, R(-)KTP, RAC-KTP y S(+)-KTP respectivamente.

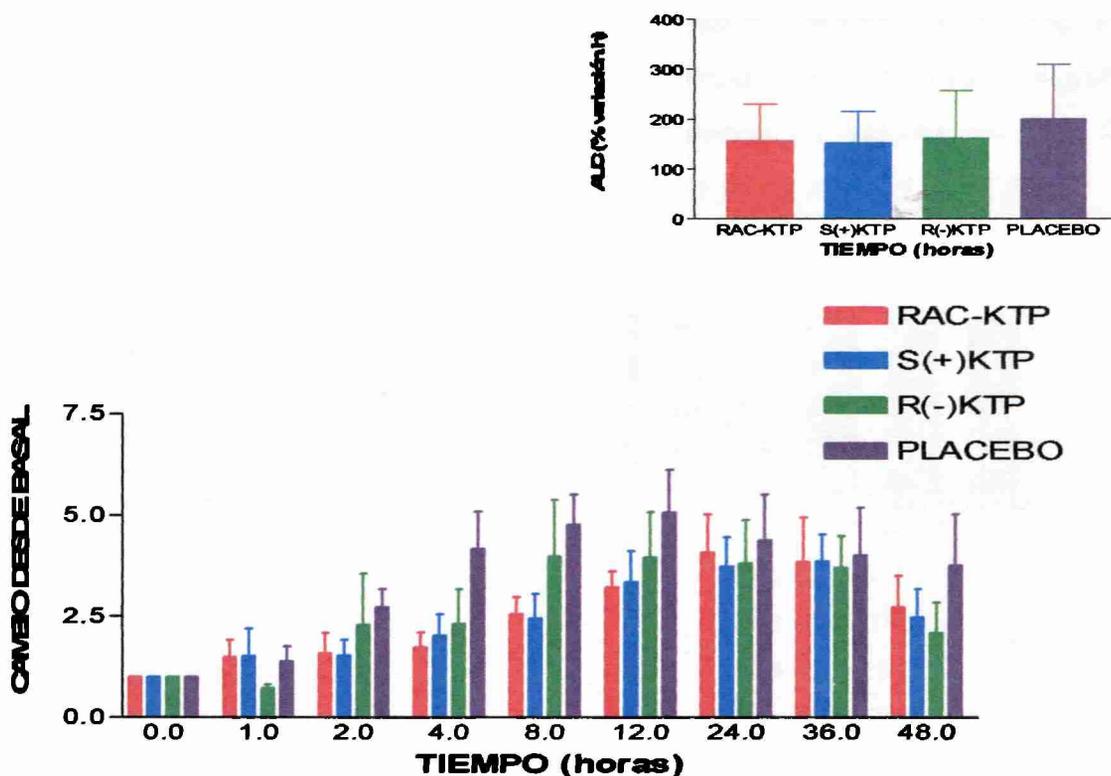


Figura 8. Grafica de los cambios desde basal ($X \pm SD$) en función del tiempo del ángulo carpiano de la articulación afectada en máxima flexión en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs tiempo para el ángulo carpiano de la articulación afectada en máxima flexión en los cuatro grupos experimentales.

3.3.5 Largo del paso

La reacción inflamatoria local como consecuencia de la inyección intraarticular de LPS fue evidenciada por la disminución de este parámetro a partir de la primera muestra registrada (hora 1 post-inducción) en los cuatro grupos experimentales (Fig. 9). En el grupo Placebo, a la hora post-administración el largo del paso era un 4 %

menor al valor a tiempo 0. El pico máximo de disminución desde el basal en este grupo se presentó a las 8 h, siendo el % de reducción del 22 %. El largo de paso fue retornando a valores pre-administración de LPS al transcurrir las horas, siendo el % de reducción desde basal a las 48 h, última muestra tomada, del 2.9 %. En todos los grupos tratados con KTP se observó una disminución en este parámetro, aunque en ninguno de los casos fue tan marcada como en el grupo Placebo. Es interesante resaltar que, a diferencia del grupo Placebo, los grupos tratados con KTP mostraron disminuciones mínimas a la hora post-administración (1.1, 1 y 2.8 % para Rac, S(+) y R(-)KTP respectivamente). El máximo de disminución de este parámetro se observó a las 12 h en los tres grupos tratados. El % de disminución máximo fue en todos los grupos inferior al observado en el grupo Placebo (14.9, 18.7 y 21.2 % para RAC-KTP, S(+)-KTP y R(-)-KTP respectivamente). El análisis estadístico de los cambios temporales de este parámetro no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales, siendo los valores de AUC (cambio desde basal vs tiempo) de 42.92 ± 3.88 ; 43.1 ± 1.9 ; 43.8 ± 2.71 y 41.55 ± 4.12 para RAC-KTP, S(+)-KTP, R(-)-KTP y Placebo respectivamente.

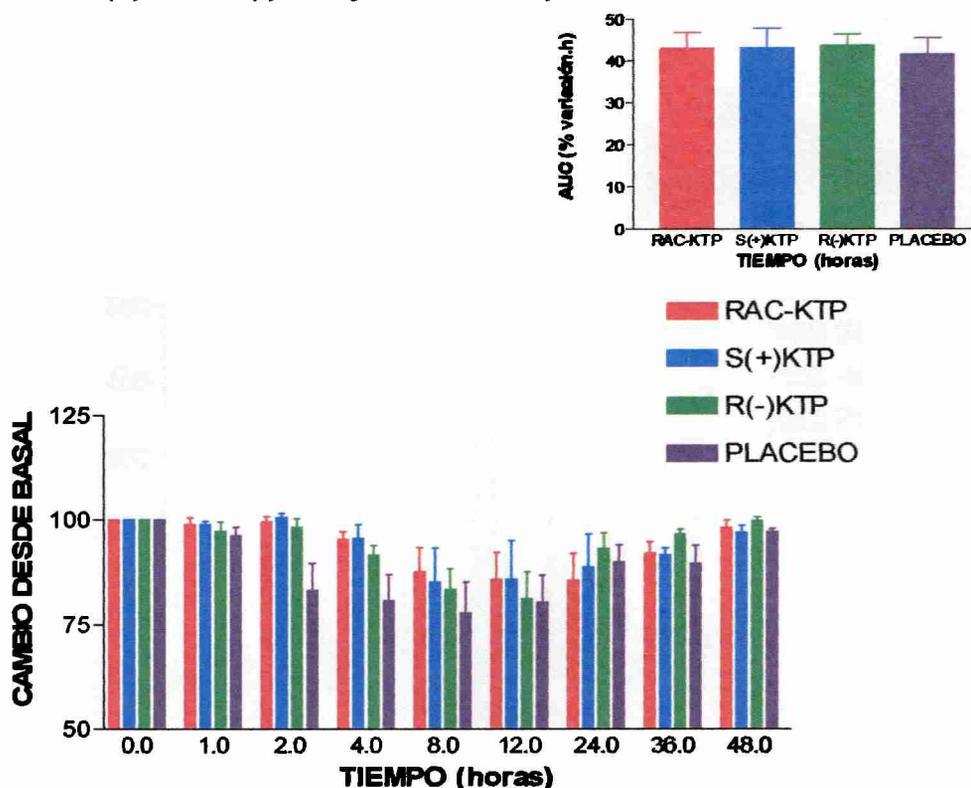


Figura 9. Grafica de los cambios desde basal ($X \pm SD$) en función del tiempo del largo de paso en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs tiempo para del largo de paso en los cuatro grupos experimentales.

3.3.6 Concentraciones sinoviales de leucocitos

La inyección intracarpal de LPS provocó un aumento notorio en la cantidad de leucocitos del líquido sinovial desde la primera hasta la hora 12 post-inyección en los cuatro grupos experimentales. Los conteos más elevados se registraron a las 12 h post-LPS para los grupos R(-)KTP, S(+)-KTP y Placebo, con registros de $286 \pm 153 * 10^6$ leucocitos/ml, $254 \pm 77.4 * 10^6$ leucocitos/ml y $152 \pm 77.1 * 10^6$ leucocitos/ml respectivamente (Fig. 10). En el grupo RAC-KTP el valor pico fue de $157 \pm 66 * 10^6$ leucocitos/ml y se registró a las 36 h. Si bien el número de leucocitos disminuyó luego de alcanzados los valores máximos en los cuatro grupos experimentales, los conteos se mantuvieron más elevados hacia el final de la experiencia que durante las primeras horas. El análisis estadístico que comparó las áreas bajo la curva (conteo leucocitario en líquido sinovial en función del tiempo) no detectó diferencias estadísticamente significativas entre grupos, siendo los valores de área bajo la curva de 7393, 5622, 4762 Y 4041 para S(+)-KTP, R(-)-KTP, RAC-KTP y Placebo respectivamente.

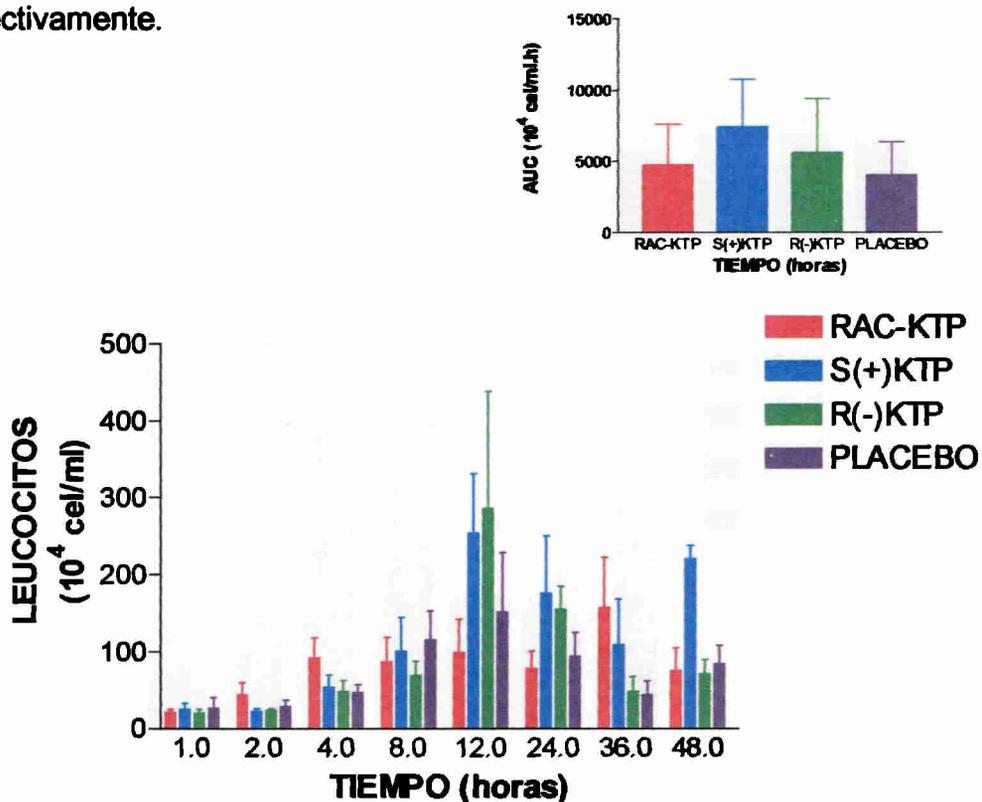


Figura 10. Conteo de leucocitos (10^4 cel/ml) en líquido sinovial ($X \pm SD$) en función del tiempo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) número de leucocitos vs tiempo en los cuatro grupos experimentales

3.3.7 Concentraciones sinoviales de proteínas

La distribución temporal de las concentraciones proteicas en líquido sinovial mostró un marcado aumento desde las primeras horas de inducida la artritis en los cuatro grupos experimentales (Fig. 11). En el grupo Placebo el aumento inicial se prolongó hasta las 12 h donde se registró la concentración más elevada (4.85 ± 1.04 g/dl), luego las concentraciones proteicas en este grupo disminuyeron hacia el final de la experiencia sin llegar al valor basal. Ninguno de los tratamientos con ketoprofeno fue capaz de modificar los aumentos iniciales en la concentración de proteínas en sinovia, de ésta manera los valores más elevados fueron registrados a las 8 h en el grupo S(+)-KTP (4.93 ± 1.91 g/dl), a las 12 h en el grupo RAC-KTP (3.93 ± 1.63 g/dl) y a las 36 h en el grupo R(-)-KTP (4.30 ± 0.65 g/l). El análisis estadístico que comparó las áreas bajo la curva (concentración de proteínas en líquido sinovial en función del tiempo) no reveló diferencias estadísticamente significativas entre grupos, siendo los valores de AUC de 186.89, 183.23, 174.72 y 163.93 para S(+)-KTP, R(-)-KTP, Placebo y RAC-KTP respectivamente.

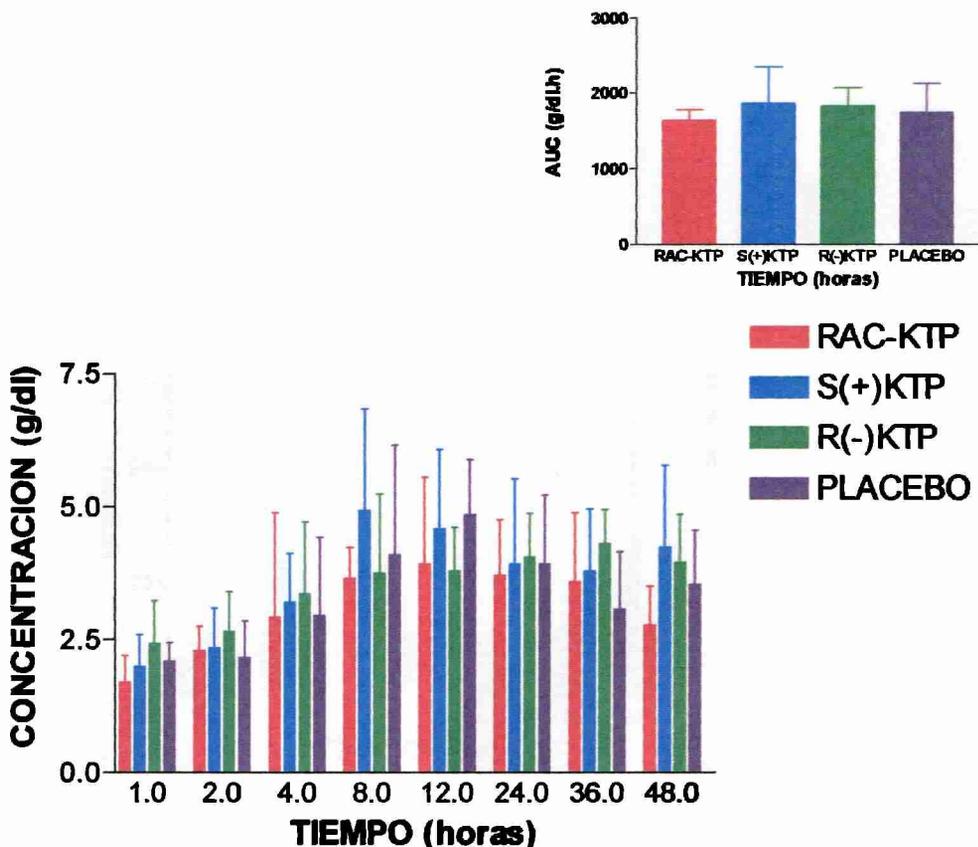


Figura 11. Concentración de proteínas totales (g/dl) en líquido sinovial ($X \pm SD$) en función del tiempo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) concentración de proteínas totales vs tiempo en los cuatro grupos experimentales

3.3.8 Concentraciones sinoviales de IL-1 β

La distribución temporal de las concentraciones sinoviales de esta citokina mostró una elevación durante las primeras cuatro horas para los cuatro grupos experimentales con registros de 30.30 ± 30.66 pg/ml, 21.87 ± 8.85 pg/ml, 17.05 ± 7.99 pg/ml y 16.45 ± 8.22 pg/ml a las cuatro horas post-inducción en los grupos S(+)-KTP, R(-)-KTP, RAC-KTP y Placebo respectivamente (Fig. 12). Luego, el comportamiento fue similar para los animales de los grupos RAC-KTP y R(-)-KTP en los cuales las concentraciones del mediador se mantuvieron más bajas que el valor de las 4 h mientras que en los animales de los grupos S(+)-KTP y Placebo se observó un incremento paulatino hasta las 48 h con valores que superaron el valor registrado para esos grupos a las 4 h (35.97 ± 26.20 pg/ml y 21.73 ± 15.49 pg/ml respectivamente). El análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo los valores del AUC (concentración sinovial de IL-1 β en función del tiempo) de 1109.39, 829, 660.68 y 423.55 para S(+)-KTP, Placebo, R(-)-KTP y RAC-KTP respectivamente.

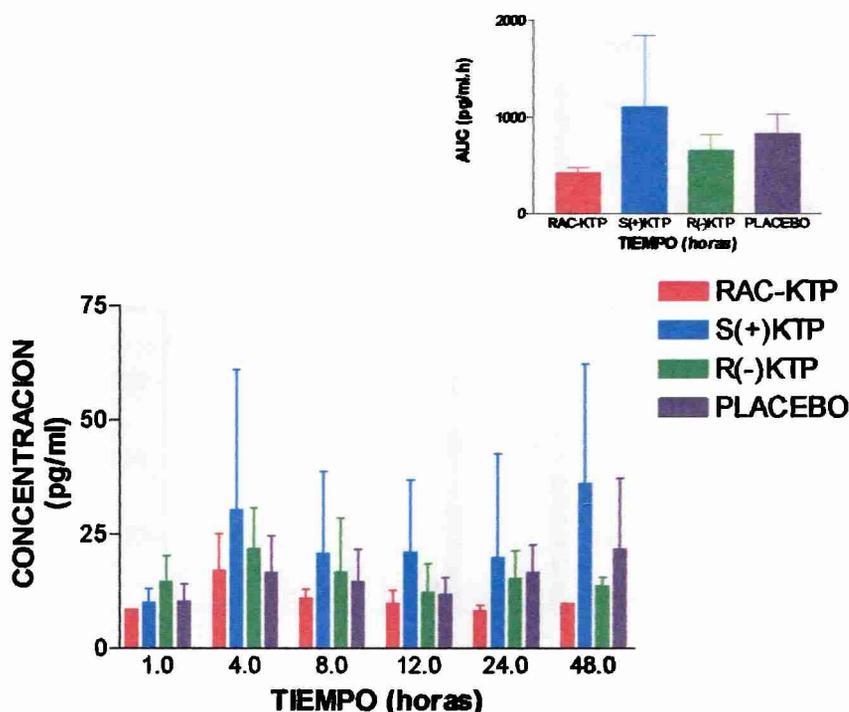


Figura 12. Concentración de IL-1 (μ g/ml) en líquido sinovial ($X \pm SD$) en función del tiempo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) concentración de IL-1 vs tiempo en los cuatro grupos experimentales.

3.3.9 Concentraciones sinoviales de PGE₂

El tratamiento con cualquiera de las tres formas de KTP provocó una marcada disminución en la concentración sinovial de PGE₂ comparado con los animales del grupo Placebo, en quienes los niveles del mediador estuvieron aumentados desde la primera medición hasta las 12 h de inducida la artritis (Fig. 13). Las concentraciones de PGE₂ más elevadas fueron observadas a las 8 h en los animales del grupo Placebo con 234.18 ± 71.70 pg/ml; a la hora post-inducción en el grupo RAC-KTP con un registro de 50.62 ± 25.24 pg/m; a las 24 h en el grupo R(-)KTP con valores de 46.99 ± 13.76 pg/ml y a las 12 h en los animales del grupo S(+)KTP con concentraciones de 21.17 ± 12.19 pg/ml. El análisis estadístico que comparó las AUC (concentración de PGE₂ en líquido sinovial en función del tiempo) reveló diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Placebo frente a los tres grupos tratados con KTP (Placebo vs RAC-KTP, $P < 0.01$; Placebo vs S(+)KTP, $P < 0.01$ y Placebo vs R(-)KTP, $P < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los diferentes compuestos de KTP. Los valores de AUC fueron 3919.2, 1478.8, 1217.1 y 731 para los grupos Placebo, R(-)KTP, RAC-KTP y S(+)KTP respectivamente.

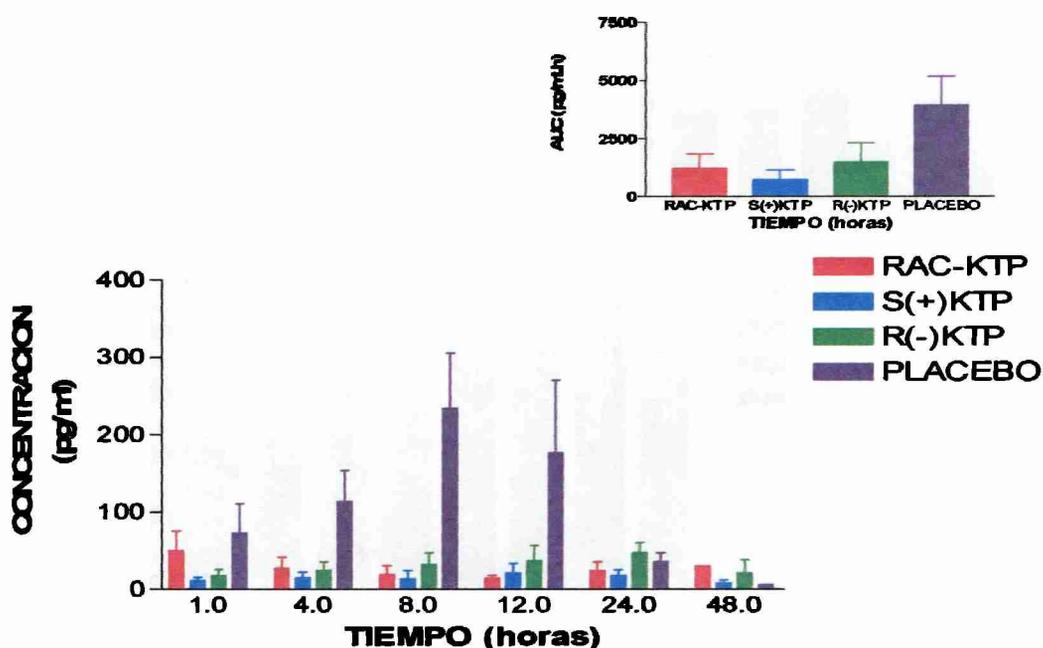


Figura 13. Concentración de PGE₂ (pg/ml) en líquido sinovial ($X \pm SD$) en función del tiempo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)KTP (1.1 mg/kg) y R(-)KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) concentración de PGE₂ vs tiempo en los cuatro grupos experimentales.

3.3.10 Concentraciones sinoviales de glucosaminoglicanos

La distribución temporal de GAGs en el líquido sinovial mostró un comportamiento similar durante las primeras horas en los cuatro grupos experimentales, caracterizado por un aumento notorio en la concentración de este compuesto desde las cuatro hasta las doce horas post-inducción (Fig. 14). En el grupo Placebo, aunque la concentración de GAGs estuvo elevada a las 12 h, el valor pico se registró a las 36 h y fue la concentración más elevada detectada en los cuatro grupos experimentales ($377.6 \pm 67.4 \mu\text{g/ml}$). En los grupos RAC-KTP y S(+)-KTP las concentraciones de GAGs en sinovia alcanzaron sus valores pico a las 12 h, siendo los mismos de $373.1 \pm 110.9 \mu\text{g/ml}$ y $348.5 \pm 82.3 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que en el grupo R(-)-KTP el valor más elevado se registró a las 24 h y fue de $343.4 \pm 66.4 \mu\text{g/ml}$, luego las concentraciones de GAGs disminuyeron hasta las 48 h en los grupos tratados con KTP. El análisis estadístico que comparó las AUC (concentración de GAGs en líquido sinovial en función del tiempo) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos, siendo los valores del área bajo la curva de 15204, 14253, 12551 y 12502 para los grupos Placebo, RAC-KTP, S(+)-KTP y R(-)-KTP respectivamente.

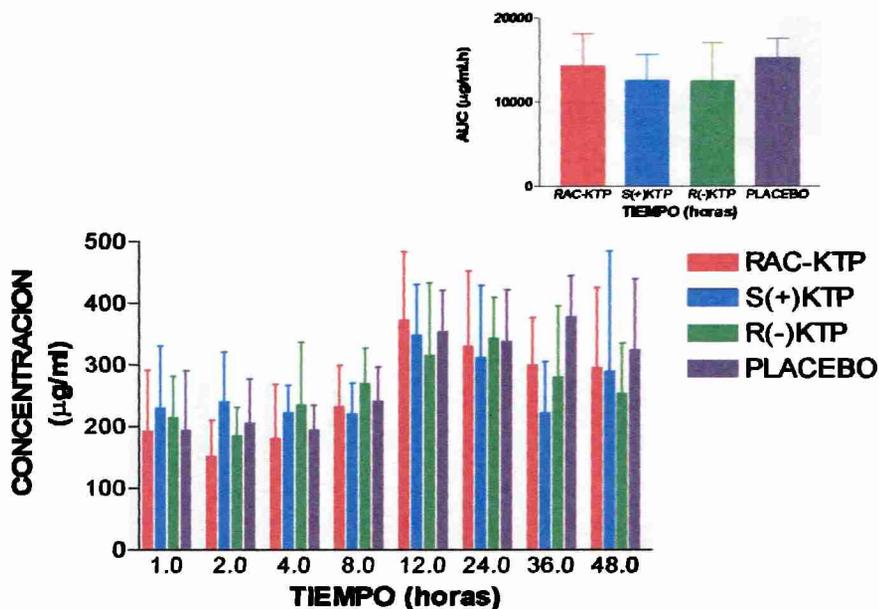


Figura 14. Concentración de glucosaminoglicanos totales ($\mu\text{g/ml}$) en líquido sinovial ($X \pm \text{SD}$) en función del tiempo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) concentración de glucosaminoglicanos totales vs tiempo en los cuatro grupos experimentales.

3.3.11 Concentraciones séricas de TxB₂

Las concentraciones séricas de TxB₂ se mantuvieron más elevadas en el grupo Placebo durante las 36 h post-inducción comparado con los tres grupos tratados con KTP (Fig. 15). Así, mientras las concentraciones en el grupo Placebo a las 0.25 h fueron de 52.19 ± 36.13 pg/ml, en los grupos tratados con ketoprofeno se registraron los valores más bajos, que fueron de 0.28 ± 0.09 pg/ml; 0.30 ± 0.11 pg/ml y 0.38 ± 0.15 pg/ml para RAC-KTP, S(+)-KTP y R(-)-KTP respectivamente. Esta marcada inhibición en la generación *ex vivo* de TxB₂ en los grupos tratados con ketoprofeno se mantuvo hasta las 12 h, momento en el que se observó un aumento paulatino hasta las 36 h, con valores máximos de 8.45 ± 6.59 pg/ml a las 24 h en el grupo R(-)-KTP, 7.95 ± 5.04 pg/ml a las 36 h en el grupo S(+)-KTP y 6.94 ± 5.21 pg/ml a la misma hora en el grupo RAC-KTP. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Placebo vs los tres grupos tratados con ketoprofeno ($P < 0.001$), siendo los valores de AUC de 932.3, 173.8, 170.1 y 106.8 para los grupos Placebo, R(-)-KTP, S(+)-KTP y RAC-KTP respectivamente.

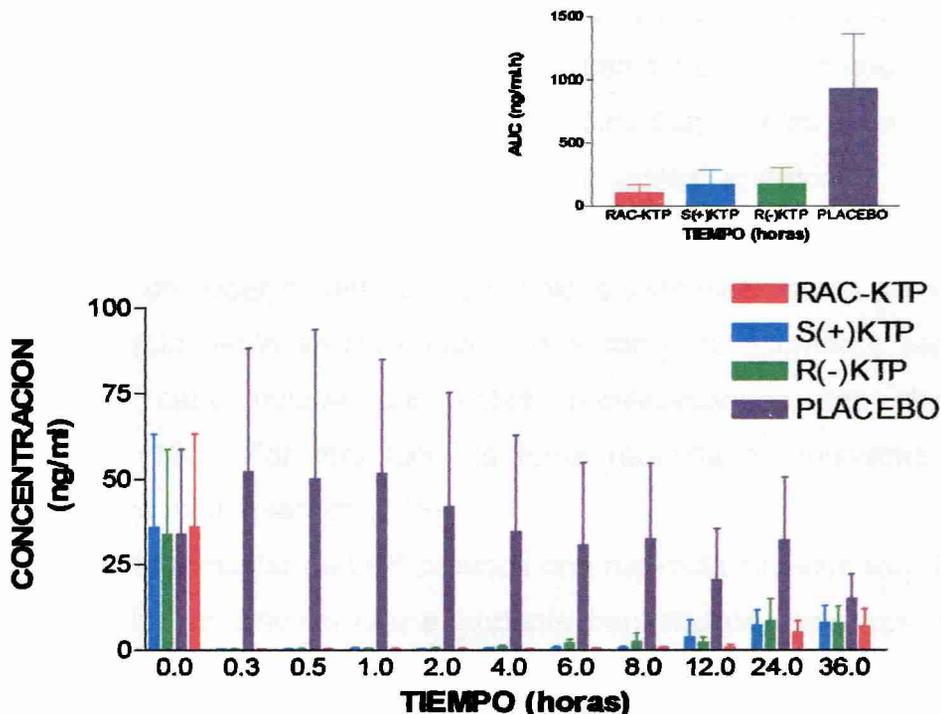


Figura 15. Concentración de TxB₂ (ng/ml) en suero ($X \pm SD$) en función del tiempo en equinos artríticos luego de la administración intravenosa de placebo y Rac-KTP (2.2 mg/kg), S(+)-KTP (1.1 mg/kg) y R(-)-KTP (1.1 mg/kg). CUADRO INTERIOR: Áreas bajo la curva (AUC) concentración de TxB₂ vs tiempo en los cuatro grupos experimentales

4. DISCUSIÓN

4.1 MODELOS EXPERIMENTALES

La aplicación de modelos experimentales de artritis en equinos es muy extendida. Estos modelos se han utilizado con diferentes objetivos, como lo es el estudio del proceso inflamatorio articular (121; 208; 163; 59; 105; 149) o bien la evaluación de la eficacia de fármacos antiartríticos (60; 69; 199; 89). La aplicación de estos modelos experimentales permite el análisis controlado, secuencial y precoz de los cambios inflamatorios articulares. Además por estar diseñados en la especie blanco (en la que se produce la enfermedad en forma espontánea) permiten discutir los resultados desde un punto de vista más real. Existen marcadas diferencias entre los distintos modelos experimentales aplicados a los procesos inflamatorios articulares. Los modelos quirúrgicos emulan la artritis traumática producida en forma natural y son útiles para evaluar el efecto de los tratamientos a mediano y largo plazo. Sin embargo, pueden producir lesiones permanentes que afecten el bienestar del animal por el resto de su vida. Por otro lado, los modelos que usan irritantes como carragenina y coadyuvante de Freund provocan lesiones, aunque no permanentes, de larga duración y lenta evolución, haciéndolos inaplicables para el estudio de los procesos articulares agudos. El modelo de artritis endotóxica es el que mejor garantiza el bienestar animal, siendo de corta duración y evolución benigna, aun cuando puede provocar modificaciones clínicas sistémicas como pirexia, depresión y anorexia (especialmente en los equinos, que son particularmente sensibles a LPS); sin embargo, cabe aclarar que estas manifestaciones son claramente dosis dependientes (195). Por otro lado, la toma repetida de muestras sinoviales por artrocentesis es bien tolerada (245).

La inyección intraarticular de LPS provoca una marcada sinovitis serosa (aumento del volumen del líquido sinovial con abundante cantidad de proteínas) con importante infiltración leucocitaria. En la práctica esta respuesta se observa especialmente en la artritis séptica (135; 252; 123), sin embargo la sinovitis aguda sin un aumento marcado de leucocitos es poco común y se observa en la hemartrosis, ya sea como consecuencia de una distensión exagerada de la cápsula articular o debido a un trauma severo con fragmentación osteocondral.

Cualquiera de estas patologías puede perpetuarse y la sinovitis aguda culminar en una artritis crónica con degeneración del cartílago articular; por tal motivo, el estudio

de los cambios tempranos y magnificados de este modelo experimental puede ser clave para comprender los estadios iniciales de la artritis. Aunque los modelos experimentales idealmente deberían ser un reflejo de la enfermedad que se desea estudiar, también es útil analizar la respuesta individual aunque amplificada de los tejidos para establecer la importancia (el rol) que tienen cada una de las estructuras involucradas en el proceso global. Por último, una de las ventajas más provechosas de este modelo experimental es que la inflamación articular es reversible entre los dos o tres días posteriores a la inyección intraarticular de LPS. Esto permite utilizar al mismo animal en el corto plazo aplicando diseños de cross-over con intervalos cortos entre cada período, y sin efectos de “arrastre”. En consecuencia, es posible estudiar las respuestas de los mismos animales frente a diferentes tratamientos. Esta posibilidad experimental cobra gran importancia cuando se analizan respuestas con gran variabilidad inter-sujetos, como sucede con parámetros clínicos, especialmente aquellos relacionados con el dolor.

Los lipopolisacáridos (LPS o endotoxina) son componentes de la cara externa de la membrana de todas las bacterias Gram negativas. Clásicamente están conformados por tres regiones: el lípido A, un centro de estructura oligosacárido y el polisacárido O.

Los macrófagos/monocitos (o células de Kupffer en el hígado) son probablemente las principales células que interactúan con LPS. La vía primaria de la respuesta inflamatoria se inicia cuando LPS se fija a la proteína fijadora de lipopolisacáridos (LBP), un miembro de las llamadas proteínas de la fase aguda de la inflamación. El lípido A es la región del LPS que provoca la reacción inmunoinflamatoria. Una vez formado, el complejo LPS-LBP interactúa con el receptor CD14 en el macrófago, iniciando la cascada de citocinas pro-inflamatorias: tumor necrosis factor e interleukinas (IL-1, IL-6 e IL-8), además de metabolitos del ácido araquidónico entre otras sustancias (251). Las células primarias en la respuesta a LPS son, como se dijo anteriormente, los macrófagos/monocitos así como los fibroblastos sinoviales. Sin embargo, se ha demostrado en estudios *in vitro* que LPS provoca una estimulación dosis dependiente de los condrocitos, que conduce a un marcado aumento en la producción de prostaglandina E2 así como de IL-1. Esto último ha sido demostrado en una variedad de especies, entre ellas, equinos, bovinos (179) y ratas, así como en sinoviocitos equinos (131). La acción de LPS sobre los condrocitos se traduce en

alteraciones en el metabolismo de los proteoglicanos, tanto por disminución del anabolismo, como por un aumento en su catabolismo (203).

En el presente estudio la administración intraarticular de LPS a la dosis de 0.01 µg/kg provocó modificaciones locales importantes, con una mínima respuesta sistémica. Esto es consecuencia de la dosis administrada ya que dosis diez veces mayores producen importantes respuestas sistémicas con elevación del 10% en la temperatura corporal así como modificaciones cardiovasculares (taquicardia e hipotensión) (59; 194). Los signos sistémicos podrían ser consecuencia de la absorción de LPS, lo que induce la síntesis hepática de las llamadas proteínas de fase aguda (entre ellas, LBP), además de TNF e IL 6 (158).

4.2 FARMACOCINETICA

Ketoprofeno (KTP) [ácido ± 2-(3-benzoilphenyl)propiónico] es una droga antiinflamatoria no esteroidea del grupo 2-arilpropiónico y como tal posee un carbono asimétrico en su molécula que le otorga la característica de compuesto quiral (130). Las diferencias en la organización de los átomos en los compuestos quirales pueden provocar comportamientos distintos tanto en su farmacocinética (139) como en su farmacodinamia (54). De esta manera, los isómeros de un compuesto quiral, pueden diferenciarse por su unión a proteínas (distribución), biotransformación (clearance total) e inclusive por las características cuali y cuantitativas del efecto farmacológico. El comportamiento farmacocinético de la mezcla racémica de KTP en equinos ha sido reportado y los resultados han demostrado que la disposición plasmática es estereoselectiva, siendo el enantiómero S(+) el predominante en plasma (110; 129; 133; 11). El predominio plasmático de S(+)KTP fue atribuido a una inversión quiral unidireccional producida a nivel hepático, que transforma al isómero R(-)KTP en su antípoda óptica S(+)KTP. La inversión quiral unidireccional ha sido reportada también en otras especies, incluyendo humanos, conejos, ratas, bovinos, ovinos y perros (1; 64; 65; 108; 45; 133).

El primer paso durante la inversión quiral de los derivados arilpropiónicos es la formación de tioésteres de CoA (186). La síntesis de estas moléculas está catalizada por la acil CoA sintetasa de cadena larga, la cual es estereoespecífica para los enantiómeros de configuración R(-). En los hepatocitos esta enzima está presente en el retículo endoplásmico (microsomas), mitocondrias y peroxisomas (124; 174). El acilCoA tioéster sintetizado puede seguir tres vías diferentes (106). El mecanismo de

inversión quiral ha sido propuesto por Nakamura et al. (185), y fue descrito en la sección Introducción.

El porcentaje de inversión quiral (PIQ) reportado en el presente estudio para equinos artríticos (19.9%) es mucho menor al reportado por Landoni & Lees (133). Esta diferencia podría ser explicada considerando el grado de severidad de la reacción inflamatoria inducida. En su trabajo de 1996 Landoni y Lees reportan un PIQ de 48.8%, en este estudio los equinos presentaban una reacción inflamatoria localizada y leve (inducida por la inyección intracavitaria de carragenina en cajas titulares implantadas quirúrgicamente en el subcutáneo) comparada con la magnitud del proceso inflamatorio inducido en el presente estudio.

Es importante considerar la influencia probable que la reacción inflamatoria aguda ejerce sobre los sistemas fisiológicos, en particular el sistema nervioso autónomo y el sistema cardiovascular. Es dable pensar que una activación simpaticoadrenal produzca una reducción en el flujo sanguíneo renal (probablemente poco significativo en la cinética de KTP debido a que por ser un fármaco de alta unión a proteínas plasmáticas su filtración glomerular es limitada) y posiblemente una reducción en el flujo sanguíneo hepático, la cual es importante ya que produciría una reducción en el clearance hepático del fármaco.

La influencia de la presencia de inflamación y/o infección sobre la disposición de los fármacos ha sido reportada previamente (210; 180; 178). Además la capacidad de LPS de deprimir la actividad de citocromo P450 ha sido descrita *in vitro* (175; 176; 177). Este efecto de LPS es mediado a través de la inducción de la síntesis de citocinas, especialmente TNF, IL-1 e IL-6, todas estas moléculas con demostrada capacidad de inducir "down regulation" en todas las actividades enzimáticas dependientes de citocromo P450 (2; 175; 176; 177). La inyección de LPS en nuestro estudio pudo haber inducido la síntesis de citocinas, que probablemente provocó una reducción en el metabolismo hepático, lo cual es reflejado en una reducción en el grado de inversión quiral. De hecho, un aumento en los niveles séricos de IL-6 ha sido reportado en pacientes con artritis (102; 237; 103). Es por lo tanto probable que un incremento en los niveles séricos de IL-6 se produjera tras la inyección intrarticular de LPS. Desafortunadamente, en el presente estudio los niveles séricos de citocinas no fueron dosados. Interesantemente, el grado de inversión quiral de ibuprofeno disminuyó en pacientes humanos durante cirugía dental (109).

La inhibición de la inversión quiral tiene importantes consecuencias clínicas ya que, S(+) KTP es considerado el eutómero para la inhibición de ciclooxigenasa (235). Este punto es muy importante y debería ser tenido en cuenta para el apropiado uso terapéutico de este fármaco.

En el presente estudio, el volumen de distribución de R(-)KTP fue casi el doble que el estimado para S(+)KTP. Es importante notar la gran variación interanimal observada en este parámetro tras la administración de la mezcla racémica. Estos resultados contrastan con estudios previos en animales sanos, en los cuales los valores de Vd para ambos enantiómeros tras la administración del racemato son similares (128 ;30). Esto también es cierto para estudios que utilizan equinos con inflamación leve tanto luego de la administración del racemato (0.47 y 0.49 l/kg, para R(-) y S(+)KTP, respectivamente) (128) como de los enantiómeros puros (0.53 y 0.63 l/kg, para R(-) y S(+)KTP, respectivamente) (133). Las diferencias observadas pueden ser explicadas por el menor grado de inversión quiral observado en el presente estudio. Como se mencionó previamente, S(+)KTP es el eutómero para la inhibición de ciclooxigenasa, por lo tanto tiene la capacidad de modular su propia distribución, inhibiendo la inflamación y por lo tanto reduciendo la permeabilidad y el acceso al compartimento inflamado. Probablemente, el menor Vd estimado para R(-)KTP en equinos con inflamación leve (caja tisular) es reflejo de la actividad farmacológica de su antípoda óptica producida por inversión quiral. De hecho, la CE50 de S(+)KTP para la inhibición de la síntesis de PGE₂ en equinos es muy baja, 0.033 µg/ml (133). Dado que en nuestros equinos artríticos el PIQ está reducido, la cantidad de S(+)KTP metabólicamente producida (especialmente tras la administración de R(-)KTP) podría no ser la suficiente para reducir la permeabilidad incrementada en el compartimento inflamado, y esto se refleja en un mayor volumen aparente de distribución para el enantiómero R(-).

Los valores de CIB para R(-) y S(+)KTP luego de la administración de la mezcla racémica son similares a los estimados tras la administración de los enantiómeros puros. Sin embargo, estos valores son menores a los reportados en animales sanos tras la administración del racemato (128), esto es razonable considerando la disminución del metabolismo hepático inducido por la presencia del proceso inflamatorio.

Las concentraciones de S(+) y R(-) en líquido sinovial tras la administración del racemato fueron mensurables hasta las 4 h. Esta corta permanencia coincide con la

reportada en equinos sanos (30; 11). Owens y colaboradores (191) compararon las concentraciones de KTP en sinovia en animales sanos y con sinovitis aguda (inducida por la inyección intrarticular de carragenina) y encontraron una mayor persistencia en el último grupo (hasta 9 horas). Sin embargo, no es posible discutir estos resultados ya que no se utilizaron métodos analíticos enantioselectivos.

Las concentraciones sinoviales de S(+)-KTP (AUC) luego de su administración IV son similares a las observadas tras la administración de la mezcla racémica, lo que refleja la ausencia de interacciones entre los enantiómeros en los procesos de transporte a través de membranas biológicas.

4.3 PARÁMETROS CLÍNICOS

La inyección intraarticular de 0.01 µg/kg de LPS provocó signos clínicos de artritis aguda en todos los animales independientemente del tratamiento administrado, además de moderados y pasajeros signos sistémicos como los reportados por Hawkins y colaboradores en 1993 (94).

4.3.1 Temperatura

La temperatura corporal en esta experiencia fue registrada, como ya se explicó, con un termómetro de máxima colocado dentro de la cavidad bucal desde la comisura. Esto explica los registros más bajos obtenidos durante las primeras horas comparado con los que habitualmente se detectan en la clínica equina cuando se estima la temperatura sistémica utilizando el abordaje anal. No obstante, esta metodología de trabajo permitió registrar las variaciones térmicas inducidas tras la inyección de LPS en los diferentes grupos experimentales que era el objetivo principal del procedimiento. La temperatura corporal estuvo elevada durante las 48 h que duró el estudio en todos los animales, con dos picos, uno entre las 8 y 12 HPI y otro de menor magnitud a las 36 HPI. El aumento observado en todos los grupos experimentales a las doce horas coincide con las modificaciones clínicas ocurridas en el miembro artrítico y pudo ser consecuencia de la absorción sistémica de LPS (204). Sin embargo el aumento en los registros a las 36 HPI pudo ser reflejo de las temperaturas ambientales vespertinas más elevadas, de las fluctuaciones diurnas fisiológicas (producto de la actividad, alimentación etc.) o de ambas (88). Experiencias anteriores utilizando 0.1 µg/kg provocaron picos más elevados y tempranos, entre 5 y 7 HPI en la temperatura rectal, mientras que con dosis de

0.0077 $\mu\text{g}/\text{kg}$ los picos de temperatura rectal se observaron a las 18 HPI. El efecto antipirético potencial de cualquiera de las formas de KTP no alteró significativamente las curvas de temperatura sistémica en función del tiempo, no obstante el enantiómero R(-) tuvo un comportamiento similar al tratamiento placebo, mientras que los animales tratados con racémico y S(+) ketoprofeno tuvieron picos de temperatura más bajos sugiriendo que el enantiómero S(+) presente en concentraciones plasmáticas más elevadas luego de inyectadas las dos preparaciones mencionadas pudo haber sido responsable del escaso efecto antipirético. Aún así, el análisis global de la respuesta (AUC) mostró que los animales del grupo S(+)KTP tuvieron sus temperaturas corporales más elevadas, incluso frente a aquellos del grupo Placebo. Esta respuesta es difícil de explicar, sin embargo aún cuando ketoprofeno posee efecto antitérmico, se han identificado varios mediadores de la inflamación no eicosanoides que tienen importancia en la respuesta sistémica a LPS, como TNF, IL-1 e IL6 (158, 48).

4.3.2 Circunferencia carpiana

La circunferencia carpiana aumentó desde la primer hora hasta las 36 o 48 h post inyección y ninguno de los tratamientos administrados pudo evitar el edema inflamatorio de los tejidos articulares. Esto puede ser debido al escaso poder antiedematoso de cualquiera de las formas de KTP, de hecho esto ha sido observado por otros autores con otros AINEs, como fenilbutazona (241). Sin embargo la medición de este parámetro clínico resultó fácil de realizar y fue bien tolerada por los animales. Por tal motivo el registro de la circunferencia carpiana tras la inyección intracarpal de 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS puede ser útil para evaluar tanto la potencia como la duración del efecto antiedematoso de las drogas.

4.3.2 Ángulo carpiano en reposo

El ángulo carpiano en reposo o ángulo carpiano del miembro "en estación", fue seleccionado para evaluar indirectamente el dolor del miembro artrítico. Cuando el ángulo carpiano se mantiene en 180° (equivalente a 100 para valores normalizados) el miembro está recto hacia el piso apoyando su peso como lo hace normalmente, mientras que a medida que el ángulo carpiano disminuye (flexión voluntaria del carpo), se interpreta que el animal evita soportar peso. Debido a que el equino en reposo mantiene continuamente sus miembros anteriores apoyados, ya que descarga

aproximadamente un 10 % más de peso en los miembros anteriores que en los posteriores (182), se pensó a priori que la medición del ángulo carpiano en reposo sería un reflejo objetivo y verás de la magnitud del dolor en el miembro artrítico. Sin embargo, por nuestra experiencia, es posible especular que la medición espaciada (no continua) del ángulo carpiano en reposo tiene baja repetitividad y es poco representativa para cuantificar el efecto de los tratamientos. Esto puede ser debido a que la medición se realiza durante un instante pequeño y tanto el apoyo como la elevación (descanso) del miembro con dolor son intermitentes. Además el ángulo carpiano en reposo puede variar por factores secundarios, como el simple acercamiento del operador. En definitiva, obtener registros interválicos para identificar una modificación lábil como el ángulo carpiano en reposo, puede provocar mediciones e interpretaciones erróneas. De hecho, nuestro grupo se halla en la etapa de diseño de una modalidad video/dinámica de aplicación para la evaluación de este parámetro. El ángulo carpiano en reposo se modificó más tarde que cualquiera de los otros parámetros clínicos que se evaluaron en los cuatro grupos experimentales. De esta manera, los cambios observados fueron mínimos a las 4 h y notorios entre las 8 y 12 h post-inducción donde solo el tratamiento con RAC-KTP alteró (aunque no de manera estadísticamente significativa) la reducción del ángulo articular. Los registros de las 8 y 12 h revelaron que los animales tratados con S(+)-KTP mantuvieron sus ángulos carpianos en reposo más cerrados (miembro en descanso) revelando incomodidad para mantener el miembro soportando el peso.

4.3.4 Angulo carpiano en flexión

Todos los animales utilizados en este estudio mostraron intolerancia a la flexión de sus carpos desde la hora 2 hasta las 48 h post-inducción, con picos entre las 8 y 12 h. Debido a que el registro de este parámetro involucra una respuesta voluntaria frente al dolor, es un método útil para evaluar el efecto analgésico de los tratamientos. Los registros más elevados de toda la experiencia fueron obtenidos en los animales del grupo Placebo entre las 4 y 12 h. Adicionalmente, los animales de cualquiera de los grupos tratados con KTP toleraron mejor la maniobra comparado con aquellos del grupo Placebo entre las 2 y las 48 h de inducida la artritis, particularmente aquellos tratados con RAC-KTP o S(+)-KTP. Siendo la flexión forzada del carpo una maniobra que provoca dolor, el enantiómero S(+) (presente en concentraciones intrasinoviales más elevadas tanto cuando se administró S(+)-KTP

como RAC-KTP) pareció ser el responsable del mayor efecto analgésico. El mecanismo que provoca esta modificación en la respuesta puede ser dual; por un lado mediante la inhibición en la producción local (intraarticular) de PGE₂, y por otro debido a una acción central (supramedular) que ha sido descrita para todos los AINEs (151; 17).

4.3.5 Largo de paso

El acortamiento del paso fue observado en todos los grupos experimentales, desde las primeras mediciones hasta el final de la experiencia momento en el cual los animales normalizaban su tranco. La longitud del paso fue seleccionada como una medida para evaluar el dolor en el miembro artrítico debido a que durante este andar la distancia entre pisadas es igual en ambos miembros contralaterales -en nuestro caso los miembros anteriores- (75). Esto es importante debido a que en este estudio se utilizó un diseño de cross-over, donde cada miembro anterior fue sometido a dos tratamientos diferentes y sus respuestas fueron analizadas junto a las respuestas de los miembros opuestos. Este parámetro clínico, al igual que la flexión forzada del carpo, está relacionado con el dolor. De esta manera, cuando la articulación carpal de un miembro duele se produce un acortamiento en la longitud del paso, debido a una reducción temporal tanto en la fase de apoyo como en la fase de elevación (189). Sin embargo, a diferencia de la evaluación del ángulo carpiano en flexión, el largo del paso es un registro más fidedigno, con menor variación individual. La menor variabilidad de esta medida se debe a que en la obtención del registro se promedian una cantidad no menor a diez pasos, con lo cual se diluyen los factores secundarios que puedan influenciar la respuesta. Además las modificaciones en este parámetro se producen desde muy temprano, momento en el cual el efecto clínico de las drogas a evaluar puede ser más evidente y el efecto "respuesta-automática" a la maniobra es menor. Estas observaciones han sido detectadas por otros investigadores quienes calificaron la evaluación de este parámetro clínico como reproducible y sensible (241). El tratamiento con cualquiera de las formas de KTP mejoró el largo de paso comparado con el grupo Placebo desde la hora 1 hasta las 12 hs post-inyección. El efecto inhibitorio de los tratamientos fue más pronunciado a las 2, 4 y 8 horas, siendo el orden decreciente de potencia S(+)-KTP, RAC-KTP y R(-)-KTP. Nuevamente, el efecto analgésico pudo haber sido consecuencia de las concentraciones locales del enantiómero S(+) ya que el efecto analgésico observado fue más notorio (aunque

estadísticamente no significativo) en los animales de los grupos RAC-KTP y S(+)-KTP y en menor cuantía en los del grupo R(-)-KTP, estando el nivel de respuesta estadísticamente relacionado a las curvas de disposición sinovial del enantiómero S(+)-KTP.

4.4 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

4.4.1 Leucocitos

La extravasación de leucocitos del lumen de los vasos sanguíneos hacia los tejidos ha sido implicada como un factor clave en numerosas enfermedades inflamatorias incluyendo artritis (187; 200; 111). El número total de leucocitos en líquido sinovial de equinos ha sido estudiado tanto en articulaciones normales (164), como en aquellas con enfermedad articular degenerativa (80) o artritis infecciosa (245). En articulaciones normales los valores no oscilan demasiado según lo publicado por diferentes autores: 167 ± 21 y 87 cel/mm^3 (201; 253, respectivamente). Sin embargo, existe un amplio rango de variaciones cuantitativas en las diferentes enfermedades con relación a los leucocitos sinoviales. Así, en el curso de las sinovitis ideopáticas y osteocondritis disecantes los conteos leucocitarios no sobrepasan los 1000 cel/mm^3 ya que se trata de condiciones con un escaso o nulo componente inflamatorio. En casos de artritis traumática y osteoartritis (artritis crónica o enfermedad articular degenerativa) los conteos leucocitarios varían considerablemente dependiendo del grado de inflamación de la membrana sinovial, pudiendo elevarse hasta 10000 cel/mm^3 . Por último, en la artritis infecciosa los conteos leucocitarios sobrepasan valores de 50000 cel/mm^3 , tanto que los conteos por encima de 100000 son patognomónicos (221; 244).

La inyección intraarticular de LPS provoca un aumento en el número de leucocitos en sinovia el cual es dosis dependiente (194). Este aumento en la cantidad de glóbulos blancos es lineal hasta dosis intraarticulares de LPS de $0.001 \mu\text{g/kg}$ aproximadamente, mientras que, a partir de allí un aumento en la dosis intraarticular de LPS no provoca un aumento en la respuesta. En nuestra experiencia, dosis diez veces más elevadas ($0.01 \mu\text{g/kg}$) que las dosis citadas como las de respuesta máxima confirman esos hallazgos ya que el conteo total de leucocitos en el grupo Placebo alcanzó un valor pico de $152 \pm 77.1 \times 10^6$ leucocitos/ml a las 12 h post-inyección, valores similares a los reportados por Firth con dosis de LPS de $0.1 \mu\text{g/kg}$

(59). Los leucocitos infiltrados en respuesta a la inyección intraarticular de LPS son los responsables de la liberación de mediadores previamente almacenados y de la síntesis de nuevos mediadores, además de radicales libres de oxígeno. Por otro lado, la liberación de enzimas desde los gránulos provoca la degradación tanto del ácido hialurónico del líquido sinovial como del cartílago articular. Ketoprofeno, así como otros AINEs fue presentado en la literatura veterinaria como un inhibidor dual en el proceso inflamatorio, tanto de la vía ciclooxigenasa (COX) como de la vía lipoxigenasa (LO), siendo esta última responsable de la síntesis de mediadores (como Leukotrieno B₄) involucrados en la migración leucocitaria (20; 44; 100; 113, 114). Sin embargo, existen reportes que demuestran la incapacidad de ketoprofeno para inhibir 5-LO de origen animal (130). En este estudio, ninguna de las formas en las que se administró KTP fue capaz de inhibir significativamente la llegada al foco inflamatorio de los leucocitos. Por el contrario, si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas, el AUC (concentración de leucocitos en líquido sinovial en función del tiempo) fue marcadamente menor en el grupo Placebo comparado con cualquiera de los grupos tratados con KTP. Resultados similares han sido reportados en un modelo de sinovitis equina en el cual se evaluó KTP y fenilbutazona, además estos autores detectaron un aumento significativo en las concentraciones sinoviales de LTB₄ en los grupos tratados (190; 192). Estos hallazgos coinciden con otros estudios realizados en humanos, equinos, bovinos, y ovinos en los cuales los AINEs redujeron la concentración sinovial/exudado de prostaglandinas pero provocaron un aumento en el número de leucocitos y en las concentraciones de LTB₄ (213; 243; 192; 133; 134). Una posible explicación para estos hallazgos podría basarse en el aumento de oferta de ácido araquidónico para la vía 5-lipoxigenasa debido a la inhibición de la vía ciclooxigenasa, con la consecuente síntesis de mayor cantidad de LTB₄, un potente quimioatrayente (140). Aunque esta explicación parece sencilla y facilista, no han sido publicados trabajos experimentales para refutarla. Además daría cabida a un enunciado básico para comprender la naturaleza de la respuesta inflamatoria: *no existe ningún paso durante la cascada inflamatoria que pueda inhibirse provocando la supresión total de la reacción, esto garantiza la respuesta* (8). Sin embargo, a la luz de los nuevos acontecimientos científicos con relación al mecanismo de acción de las drogas antiinflamatorias no esteroideas, es criterioso pensar que otras formas inducibles de COX pueden estar involucradas en el proceso inflamatorio.

4.4.2 Proteínas

La cuantificación de las proteínas totales en líquido sinovial se realiza rutinariamente en la mayoría de los laboratorios mediante la técnica de Biuret (84) o mediante un refractómetro. Esta última es la más utilizada por ser una metodología sencilla y eficaz para fines diagnósticos. En ese sentido, en el presente estudio se utilizó un método espectrofotocolorimétrico que es más sensible que la refractometría. La necesidad de un método sensible radica en que los enantiómeros de KTP podrían modificar la concentración de proteínas totales en sinovia con diferencias muy sutiles, las cuales pasarían inadvertidas para los métodos de uso rutinario en clínica equina. En equinos adultos normales, la concentración de proteínas totales del líquido sinovial oscila entre un 25 a 35 % de la concentración de proteínas plasmáticas. De esta manera, los valores normales han sido establecidos en 1.81 ± 0.26 g/dl (253). En general, la concentración de proteínas sinoviales aumenta durante el período agudo de la respuesta inflamatoria, como consecuencia del incremento de la permeabilidad capilar, aumentando así la concentración relativa de alfa 2 globulinas respecto de las albúminas, además de la presencia del fibrinógeno. Adicionalmente, las proteínas en el líquido sinovial pueden aumentar debido a su síntesis a partir de los sinoviocitos (170). Valores de proteínas totales superiores a 2.5 g/dl son indicativos de la presencia de una reacción inflamatoria leve, mientras que valores superiores a 4 g/dl indican la presencia de una inflamación severa. Valores superiores a 7 g/dl se consideran como patognomónicos de artritis infecciosa (170). En el presente estudio las proteínas sinoviales tras la inyección intracarpal de $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS aumentaron desde la primera medición (1 hora) en los cuatro grupos experimentales, con valores pico de 4.9 ± 1.9 , 4.8 ± 1 , 4.3 ± 6.5 y 3.9 ± 1.6 g/dl entre las 8 y 36 horas post-inyección para los grupos S(+)-KTP, Placebo, R(-) KTP y Rac-KTP respectivamente. La concentración proteica de la sinovia se mantuvo elevada hasta el final de la experiencia en los cuatro grupos experimentales. Los presentes resultados no difieren de los aumentos marcados, tempranos y sostenidos reportados en otros estudios que aplicaron el modelo de artritis endotóxica, tanto en animales de laboratorio (101; 202; 216) como en equinos (59; 94; 194). Esto último se debe a la magnitud de la respuesta inflamatoria inducida por LPS, la que contiene un importante componente inmunológico, similar al observado *in vivo* durante la artritis séptica (245). El efecto modulador de la respuesta inflamatoria ejercido por los enantiómeros de KTP no se vio reflejado en una reducción de la penetrabilidad de

proteínas al líquido sinovial. La incapacidad de los AINEs en general para inhibir la transudación de proteínas desde el plasma a los compartimentos inflamados ha sido reportada, no solo en equinos aplicando modelos de inflamación tisular (127; 130), sino en otras especies como bovinos y ovinos (132;134). Esta incapacidad refleja la complejidad del proceso inflamatorio y que, como se mencionó previamente durante esta sección, la inhibición de un solo mediador (en este caso PGE2) no es suficiente para abolir la respuesta inflamatoria.

4.4.3 IL-1B

IL-1 provoca efectos tanto sistémicos u hormonales como locales. En nuestra experiencia los cambios fundamentalmente locales, además de los escasos efectos sistémicos, pudieron ser consecuencia de la producción local de IL-1 tras la inyección intraarticular de LPS. Los efectos sistémicos o de tipo hormonal de IL-1 han sido descritos, y básicamente son similares a los observados tras la inyección intravenosa de endotoxinas. De esta manera, la manifestación clínica más notoria incluye cambios en el comportamiento fundamentalmente depresión y anorexia debidos entre otras causas a hipertermia, hipotensión, síntesis de proteínas de fase aguda por parte del hígado, disminución en la concentración de albúmina, de Fe, de Zn además de una neutropenia inicial (consecuencia de la aumentada adhesión al endotelio), seguida por neutrofilia (consecuencia de la liberación desde la médula ósea), (50). Si bien los estudios *in vitro* sobre IL-1 son mucho más numerosos que los *in vivo*, los primeros explican en parte los acontecimientos observados *in vivo*. Por ejemplo, los efectos de IL-1 sobre el metabolismo del ácido araquidónico en las células endoteliales pueden explicar el estado de shock hemodinámico observado *in vivo*; esto es debido a que IL-1 tiene probados efectos sobre células endoteliales, provocando la síntesis de prostaglandinas, entre ellas PGI₂ y PGE₂, ambos vasodilatadores, además IL-1 favorece la adhesión y migración de leucocitos al foco inflamatorio. Varios investigadores han demostrado que bajas concentraciones de endotoxinas bacterianas (ng/ml) en cultivo de células endoteliales inducen la liberación de IL-1 (141). En los organismos superiores los lipopolisacáridos, potentes inductores de la inflamación (98; 251; 39), se unen a proteínas de fijación, este complejo LPS-LBP interactúa con receptores de la superficie de macrófagos y monocitos induciendo la liberación de citokinas proinflamatorias, entre ellas IL-1 (266). Por tanto, y como se puntualizó al discutir las causales de hipertermia en el

apartado sobre parámetros clínicos, los efectos sistémicos ocurridos en nuestros equinos pudieron ser consecuencia tanto de la absorción sistémica de LPS (induciendo la producción remota de IL-1, por ejemplo en el hígado) como por la acción de IL-1 tras su absorción sistémica desde la articulación (efecto endócrino u hormonal). Como ejemplo de lo dicho podemos citar la respuesta clínica frente a una infección bacteriana, que si bien es un síndrome complejo donde la mayoría de los procesos pueden ser estimulados o inhibidos por diferentes vías (250; 13; 120), las citokinas proinflamatorias parecen tener un rol clave en la cascada de mediadores (21; 51; 97). De hecho, los efectos sistémicos de TNF- α e IL-1 β son similares a los observados en vacas con mastitis por *E. coli* o en cabras tras la administración intravenosa de LPS (250).

La respuesta de los tejidos frente a la injuria depende en parte del balance entre la concentración local de citokinas proinflamatorias (efecto parácrino y/o yuxtácrino) y otras sustancias endógenas con efecto antiinflamatorio (i.e IL-10) (251). Las citokinas proinflamatorias, IL-1 β o TNF- α , tienen un rol clave por su liberación temprana durante la fase aguda de la respuesta inflamatoria (51; 21). Además, en los procesos crónicos su acción catabólica sobre los tejidos puede perpetuarse, conduciendo a lesiones locales irreversibles. El estudio de los efectos locales de IL-1 en las articulaciones ha despertado sumo interés, tanto en humanos como en equinos, debido a que su presencia es una característica común en las distintas patologías articulares en ambas especies (181). Es decir, IL-1 β puede iniciar y mantener un proceso inflamatorio articular.

Debido a la importancia que tiene IL-1 β tanto en los procesos agudos como en el mantenimiento del daño tisular, los niveles de este mediador fueron evaluados luego de la administración de tres isoformas de ketoprofeno en caballos artríticos. Los enantiómeros de KTP, por definición inhibidores de la producción de PGE₂, en principio, podrían no tener efecto alguno sobre la síntesis de citokinas. Numerosos trabajos *in vitro* han demostrado la capacidad de distintas células articulares de responder a la estimulación por IL-1 induciendo la liberación de PGE₂ y enzimas proteolíticas, ambos compuestos relacionados con el deterioro de la matriz tisular (155;156). En nuestro estudio se observó una elevación temprana y de magnitud similar en los niveles intraarticulares de IL-1 β en respuesta a la inyección de LPS, tanto en los grupos tratados con KTP como en el grupo Placebo. Estos aumentos tempranos también se reportan en otros estudios donde luego de inyectar endotoxina

endovenosa los niveles plasmáticos de citokinas alcanzan los valores pico a las pocas horas (2 a 4), al tiempo en que se desarrollan los signos clínicos de endotoxemia (61; 158). En nuestro estudio, las concentraciones de IL-1 β en líquido sinovial aumentaron rápidamente, con valores elevados a las cuatro horas en todos los grupos experimentales, siendo éstos la Cmax para los grupos R(-) y Rac-KTP y ligeramente menores a los máximos para los grupos S(+) y Placebo, que presentaron su Cmax a las 48 h. Sin embargo las diferencias observadas fueron mínimas no alcanzando significación estadística. El aumento temprano en las concentraciones sinoviales de IL-1 observado en nuestro estudio pudo ser responsable, al menos en parte, del aumento intraarticular de los leucocitos, proteínas, PGE2 (en el grupo Placebo) y glucosaminoglicanos.

Por tanto, la potente acción inhibitoria sobre COX de los enantiómeros de KTP, inyectados separadamente o en la mezcla racémica no modificó significativamente la producción local de IL-1 β . Esta observación contradice lo observado *in vitro* por Landoni et al. (131); estos autores reportan una interrelación entre IL-1 y PGE2 en cultivos de sinoviocitos estimulados con LPS. En este trabajo Landoni et al, reportan un feed back negativo entre PGE2 e IL-1, demostrando que el isómero S(+), por provocar una abolición total de la síntesis de PGE2, induce la desinhibición de la síntesis de IL-1, lo que se refleja en un incremento significativo en la concentración de esta citokina en el medio de cultivo. La diferencia entre estos estudios podría ser consecuencia, por un lado, de que en el presente estudio se analiza la respuesta *in vivo* de todos los componentes de la articulación, y por el otro, de que la abolición total de la síntesis de PGE2 *in vivo* es poco probable y en caso de producirse sería transitoria.

4.4.4 Prostaglandina (PG) E2

La prostaglandina E₂ ha sido identificada tanto en el líquido sinovial de equinos con articulaciones normales como en equinos con enfermedad articular adquirida en forma natural. En articulaciones normales las concentraciones son más bajas que en articulaciones que padecen procesos patológicos, como la enfermedad crónica articular u osteoartritis (238; 157; 80; 119). Su participación en el fenómeno inflamatorio articular es indiscutible, siendo éste el mediador primario aplicado a la evaluación de todos los modelos experimentales de artritis (157; 94; 192; 71).

En este estudio, la inyección intraarticular de 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en equinos para provocar artritis aguda experimental permitió cuantificar las concentraciones sinoviales de PGE2 durante las 48 HPI. El aumento entre las 1 y 24 HPI en las concentraciones sinoviales de PGE2 en el grupo Placebo refleja las bondades del modelo experimental, induciendo cambios notorios y pasajeros característicos de una artritis aguda espontánea (no experimental). No obstante, la magnitud de la respuesta tisular es un punto a considerar. En ese sentido, se ha establecido que en general la inyección intraarticular de irritantes provoca la liberación al líquido sinovial de concentraciones más elevadas de mediadores químicos que las reportadas en la artritis producida en forma espontánea. Sin embargo, la curva que grafica la concentración sinovial de PGE2 vs tiempo en nuestra experiencia registra valores comparables con los reportados en articulaciones naturalmente dañadas (157; 238; 80). La elevación temprana y sostenida en la concentración sinovial de PGE2 en el presente estudio coincide con lo reportado en otro estudio donde también se aplicó el modelo endotóxico (94). Sin embargo, el aumento más elevado en las concentraciones intraarticulares de PGE2 en los animales del grupo Placebo de esta experiencia comparado con el estudio antes citado es producto de la inyección de dosis más elevadas de LPS. La inhibición estadísticamente significativa de la síntesis de PGE2 en líquido sinovial en los animales tratados con KTP (grupos Rac-KTP, S(+)-KTP y R(-)-KTP) comparados con el grupo Placebo revela que las tres formas de administración de KTP por vía endovenosa alcanzan concentraciones a nivel sinovial superiores a la mínima necesaria para la inhibición de ciclooxigenasa. Este efecto inhibitorio de la síntesis de PGE2 observado en los tres grupos tratados con KTP puede reflejar dos situaciones diferentes (a) la actividad de S(+)-KTP únicamente, o (b) la resultante de la actividad tanto de S(+)-KTP como de R(-)-KTP. Es decir, debido a que en nuestro trabajo hemos detectado una inversión quiral del enantiómero R(-)-KTP a su antípoda óptica S(+)-KTP es probable que el efecto inhibitorio en la síntesis de PGE2 pueda haber sido únicamente por la actividad de S(+)-KTP; en este caso habría una marcada inhibición luego de administrar tanto S(+)-KTP como la mezcla racémica, y una inhibición menos notoria luego de administrar el enantiómero R(-)-KTP, producto de su inversión al enantiómero activo. Otra posibilidad es que ambos enantiómeros sean activos con diferente potencia, siendo el enantiómero S(+) el eutómero. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ketoprofeno, el análisis de la respuesta global (AUC) de los

individuos a las distintas isoformas de ketoprofeno, indican que Rac-KTP y S(+)-KTP inducen una inhibición en la producción de PGE2 más marcada y sostenida en el tiempo, mientras que el tratamiento con R(-)-KTP produce una inhibición más pobre. Esto confirmaría los reportes previos donde se considera al enantiómero S(+)-KTP como el eutómero, en relación a su acción inhibitoria sobre COX (54).

Tradicionalmente se ha considerado a PGE2 como el mediador responsable del dolor en articulaciones inflamadas. En este estudio, en el que se midieron parámetros clínicos que cuantificaron el dolor (como el ángulo carpiano de máxima flexión y el largo del paso) y aún cuando se observaron diferencias significativas en la concentración de PGE2 entre el grupo Placebo y los grupos tratados con KTP desde las 4 HPI hasta las 12 HPI, estas diferencias no se reflejaron estadísticamente en los registros de los mencionados parámetros clínicos. En otras palabras, en todos los animales tratados con ketoprofeno en los cuales se observó signología clínica de artritis aguda, los niveles de PGE2 estuvieron dentro del rango de concentraciones reportadas como normales (80). Esto corrobora que, PGE2 no es el único mediador químico involucrado en la sintomatología clínica y/o existen otros que pueden reemplazarlo cuando es inhibido (ver capítulo 1) lo que garantizaría la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, ciertos neurotransmisores (neuroquinas, entre ellos sustancia P) han sido identificados en líquido sinovial de equinos (37). Estas sustancias poseen un rol importante en el proceso inflamatorio local, quizás no solamente como transmisores de los impulsos nociceptivos hacia el SNC, sino además como mediadores químicos que pueden incrementar la severidad de la respuesta inflamatoria (119; 147). Esto último refuerza lo dicho anteriormente, es decir que la abolición parcial de la síntesis de PGE2 a nivel articular no conduce a la supresión total de la sintomatología clínica local, dejando claro que la artritis es un fenómeno complejo, para cuyo manejo farmacológico no existe a la fecha un tratamiento totalmente eficaz (162; 167; 168).

4.4.5 Glucosaminoglicanos

El cartílago articular es un tejido especializado para soportar la concusión. Esta propiedad depende de la integridad de su matriz, la cual está compuesta principalmente por colágeno tipo II y proteoglicanos (glucosaminoglicanos fundamentalmente condroitín y keratán sulfato, organizados alrededor de un corazón proteico) (32). La pérdida en el contenido de glucosaminoglicanos (GAGs) de la

matriz cartilaginosa es un rasgo importante en los procesos artríticos, fundamentalmente en los períodos iniciales de la enfermedad articular degenerativa (160; 95; 165). Durante el período agudo de la injuria aumenta la concentración sinovial de GAGs, tanto por la pérdida desde la matriz como por un aumento en su síntesis (144; 145).

Los AINEs son fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de los procesos inflamatorios articulares, sin embargo es poca la evidencia científica acerca de las consecuencias de su uso sobre el cartílago articular. En este sentido, varios AINEs han demostrado inhibir la síntesis de proteoglicanos además de modular la respuesta inflamatoria (26). Pero contrariamente, algunos AINEs (incluidos algunos del grupo de los profenos, como carprofeno) han mostrado un incremento en la síntesis de proteoglicanos *in vitro* (67). En nuestro estudio se mensuraron las concentraciones de GAGs presentes en el líquido sinovial durante la fase aguda de la artritis. Sin embargo, se debe remarcar que además de la cantidad de GAGs liberados al líquido sinovial, es importante conocer la calidad de los mismos (206). En ese sentido en el presente estudio las concentraciones sinoviales de GAGs se estimaron mediante un método fotolorimétrico (DMMB) que no discrimina la calidad de los azúcares, es decir si son fragmentos degradados o no. De tal manera que en principio, en este estudio, sería difícil interpretar si algún aumento o disminución en el contenido sinovial de GAGs pudo estar relacionado con un aumento en la destrucción (efecto catabólico) o bien un aumento en la síntesis (efecto anabólico) de los componentes del cartílago articular. Lamentablemente, solo desde hace unos años, algunos marcadores de fragmentos tanto de proteoglicanos como de colágeno tipo II han sido desarrollados para identificar la pérdida de componentes desde la matriz cartilaginosa hacia la cavidad articular en equinos (70). Aún así, las concentraciones sinoviales de GAGs en equinos utilizando el método fotolorimétrico del DMMB han sido relacionadas con osteoartritis (9). En ese estudio los niveles sinoviales de GAGs en caballos con osteoartritis fueron de $256 \pm 153 \mu\text{g/ml}$ comparado con $66 \pm 32 \mu\text{g/ml}$ de GAGs en articulaciones normales. Además los autores concluyeron que los niveles elevados de GAGs (tanto en líquido sinovial como en suero) reflejaron una pérdida de proteoglicanos desde la matriz cartilaginosa y no un aumento en la síntesis (9). En el presente estudio las concentraciones sinoviales de GAGs se registraron a partir de la hora 1 luego de la inyección de LPS. Desde ese momento y hasta las 8 horas post-inyección las concentraciones sinoviales de GAGs oscilaron

entre 150 y 250 $\mu\text{g/ml}$ en los cuatro grupos experimentales. Entre las 12 y 24 horas de inducida la artritis se observó un aumento más notorio en las concentraciones de GAGs en los cuatro grupos experimentales, con valores superiores a 300 $\mu\text{g/ml}$.

IL-1 ha demostrado ser una de las sustancias más importantes que participan en el recambio de la matriz extracelular del cartílago articular y del hueso (166). En el cartílago articular IL-1 provoca importantes cambios estructurales ya que altera la síntesis de proteoglicanos y aumenta su degradación a través de la liberación de enzimas (90; 91; 92). Algunos estudios *in vitro* en cartílago articular de equinos adultos han demostrado que el efecto más importante de IL-1 sobre los proteoglicanos no está relacionado con la inhibición en la producción sino, por el contrario, con un aumento en la síntesis de moléculas con alteraciones en el patrón de sulfatación (203). IL-1, sola o en combinación con TNF o LPS, puede estimular la liberación de PGE₂, metaloproteinasas y óxido nítrico desde varios tipos celulares incluidos condrocitos, sinoviocitos y osteoblastos (236). Por lo tanto, IL-1 es un modulador clave del equilibrio homeostático de la matriz del cartílago y del hueso. Esta acción no la realiza directamente sino a través de la estimulación de condrocitos, sinoviocitos y osteoblastos para que liberen diversos mediadores inflamatorios, entre ellos PGE₂ y ON. En cultivo de cartílago y hueso, IL-1 estimuló la síntesis de IL-6 provocando la liberación de proteoglicanos al medio; esta acción fue inhibida por anticuerpos anti-IL-6, por tanto su acción parece estar mediada por esta última (143; 188). Aún más indirecto parece su mecanismo de acción a través de IL-11, ya que ésta última sería un mediador importante en la cascada de sustancias que participan en el recambio de la matriz (83). En el cartílago articular, su efecto sobre la síntesis y liberación de metaloproteinasas parece ser independiente de PGE₂ (203). Sin embargo, PGE₂ tendría un efecto de retroalimentación negativa sobre IL-1 (161). Este efecto fue reportado por Landoni et al. (131) en sinoviocitos equinos aplicando estudios *in vitro* (Ver apartado anterior).

Distintas proteinasas han sido implicadas en la degradación del cartílago articular y del hueso (209; 262; 247). En forma general estas enzimas se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo al sitio donde actúan, a saber: aspárticas, cisteínas, serinas y metaloproteinasas. Las proteinasas aspárticas (catepsina D) y cisteínas (catepsina B) son usualmente localizadas en lisosomas celulares y funcionan mejor en un medio ambiente ácido, entre pH 3 y pH 5.5. Las proteinasas serinas (catepsina G o elastasa) se encuentran en los leucocitos polimorfonucleares y se liberan cuando las

células son estimuladas (219). Por el contrario, las proteasas neutras o metaloproteinasas de la matriz son liberadas dentro de la matriz o espacio extracelular desde células locales, actuando mejor a pH neutro como en el cartílago articular. No obstante las que actúan a pH ácido (3 a 5.5) como catepsina D y catepsina B deben tenerse en cuenta en articulaciones inflamadas, tal el caso de nuestro estudio experimental. Dentro de las proteasas neutras, colagenasa y gelatinasa degradan el colágeno, son secretadas por una gran variedad de células y han sido identificadas en el equino (225; 226). Sin embargo dentro de este grupo estromelina (también llamada proteoglicanasa) es la que degrada los proteoglicanos del cartílago articular (68; 74; 240). No obstante, recientemente se ha demostrado que el rol principal de estromelina sería el recambio en articulaciones normales, mientras que agreganasa sería la enzima responsable en la degradación de los proteoglicanos (170). De esa manera, un aumento en la concentración sinovial de IL-1 y de GAGs puede ser interpretado como un aumento en la degradación de la matriz cartilaginosa mediado por estromelina u otras proteinasas. En el presente estudio, se observó un aumento notorio en la concentración sinovial de GAGs desde las 8 hasta las 24 horas post-inyección de LPS en los cuatro grupos experimentales. Este efecto pudo ser consecuencia de los niveles intraarticulares de IL-1 ya que el tiempo de latencia entre la presencia de metaloproteasas y la liberación de proteoglicanos al medio de cultivo ha sido establecido entre 10 a 12 horas (207). Si bien PGE2 posee un rol al menos discutido con relación a la estimulación de las células articulares para provocar la liberación de enzimas proteolíticas, en el presente estudio no se han observado diferencias entre los grupos tratados con KTP (en los que se observó una potente inhibición en la liberación de PGE2) y el grupo Placebo. Esta observación ha sido reportada en estudios *in vitro* en los cuales la degradación de proteoglicanos de la matriz cartilaginosa no pudo ser modificada con dosis de AINEs que inhibieron totalmente la expresión de PGE2 (12).

Como surge claramente, la acción *in vivo* de los AINEs sobre la matriz cartilaginosa es un tema de controversia. No existen claras evidencias que permitan concluir sobre una acción deletérea, aunque tampoco una acción condroprotectora. Esto último es remarcable ya que la acción condroprotectora ha sido utilizada como una herramienta de marketing por la Industria Farmacéutica.

5. CONCLUSIONES

La inyección intracarpal de 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS provocó cambios clínicos locales (cárpianos) y sistémicos, estos últimos debidos probablemente a una ligera endotoxemia provocada por la absorción del irritante. No obstante, el modelo experimental de artritis endotóxica utilizado en este estudio garantizó el bienestar animal aun cuando provocó modificaciones clínicas sistémicas leves y de corta duración.

La administración intravenosa de la mezcla racémica de ketoprofeno produjo concentraciones plasmáticas y sinoviales mensurables de los dos enantiómeros. Sin embargo, S(+)-KTP demostró ser el predominante en ambos fluidos biológicos. El origen de esta predominancia fue aclarado tras administrar los enantiómeros puros, lo que permitió identificar como causa de la misma la inversión del enantiómero R(-) a su antípoda óptica. Las curvas de disposición tanto plasmática como sinovial de los enantiómeros no fueron afectadas por el tipo de formulación administrada (mezcla racémica o enantiómeros puros)

El grado de inversión quiral fue afectado por la severidad de la reacción inflamatoria inducida. Esto puede ser explicado por el hecho de que la inyección de LPS en nuestro estudio pudo haber inducido la síntesis de citocinas, que probablemente provocaron una reducción en el metabolismo hepático, lo cual se reflejó en una disminución en el grado de inversión quiral. Este punto es de máxima importancia ya que subraya la necesidad de corregir la dosis de la mezcla racémica comercialmente disponible de acuerdo al grado de inflamación a ser tratada así como, del estado enzimático de hígado.

La administración de R(-), S(+) o ketoprofeno racémico no evitó los cambios clínicos observados en el grupo control debido, probablemente, a la presencia de otros mediadores de la inflamación no eicosanoides, entre ellos IL1, IL6, TNF, posiblemente kinasas y óxido nítrico, entre otros. Esto deja claro lo complejo de la evaluación de respuestas multifactoriales como son los síntomas clínicos.

Todas las formas de ketoprofeno inhibieron la síntesis de PGE2 y TxB2, no afectando la síntesis y/o liberación de leucocitos, proteínas, IL-1 y GAGs. Esto, como se mencionó anteriormente, explica la falla en aminorar de forma significativa la sintomatología clínica.

En resumen, S(+) ketoprofeno, en menor grado R(-)KTP así como, la mezcla racémica demostraron su actividad inhibitoria de ciclooxigenasa. Sin embargo, este mecanismo de acción no se traduce en la modificación significativa de los signos clínicos de la artritis aguda. Es importante remarcar que los eicosanoides son solo un componente de una sofisticada y orquestada respuesta: *La inflamación*, para la cual a la fecha no existe un tratamiento eficaz y seguro.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Abas A, Meffin PJ. Enantioselective disposition of 2-aryl propionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. IV. Ketoprofen disposition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1987; **240**:637.
2. Abdel-Razzak A. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Molecular Pharmacology* 1993; **44**:707.
3. Abramson S, Weissmann G. The mechanism of action of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Arth.Rheumat*. 1989; **32**:1.
4. Adams ME, Billingham MEJ. Animal models of degenerative joint disease. *Current topics in Pathology* 1982; **71**:265.
5. Adams H. Physiologic, pathophysiologic and therapeutic implications for endogenous Nitric Oxide. *J Am Vet Med Assoc* 1996; **209**:1279.
6. Akaike H. An information criterion A.I.C. *Mathematics Science* 1976; **14**:5.
7. Altman RD, Dean DD, Muniz O. Prophylactic treatment of canine osteoarthritis with glycosaminoglycan polysulfuric acid ester. *Arthritis and Rheumatism* 1989; **32**:759.
8. Altman RD, Kapila P, Dean DD. Future therapeutic trends in osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1989; **S77**:37.
9. Alwan WH, Bennet D, Edwards GB. Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. *Equine Vet.J.* 1991; **23**:44.
10. Arifah AK, Landoni MF, Frean S, Lees P. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in sheep. *Am.J.Vet.Res.* 2001; **62**:77.
11. Armstrong S, Tricklebank P, Lake A, Frean S, Lees P. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid-a comparison with ketoprofen. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1999; **22**:196.
12. Arner EC, Pratta MA. Independent effects of interleukin-1 on proteoglycan breakdown, proteoglycan synthesis and prostaglandin E2 release from cartilage and organ culture. *Arthritis Rheum.* 1989; **32**:288.
13. Atwell DM, Grichnik KP, Newman MF, Reves JG, McBride WT. Balance of proinflammatory and antiinflammatory cytokines at thoracic cancer operation. *Ann.Thoracic Surg.* 1998; **66**:1145.

14. Auer DE, Ng JC, Seawright AA. Superoxide production by stimulated equine polymorphonuclear leukocytes inhibition by antiinflammatory drugs. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* 1990; **13**:59.
15. Baggot JD. Some aspects of clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1978; **1**:111.
16. Baggot JD.(2001) *The physiological basis of veterinary clinical pharmacology.* London: Blackwell Science Ltd,
17. Beaurepaire R, Suandeau C, Chait A, Cimetiere C. Anatomical mapping of brain sites involved in the antinociceptive effects of ketoprofen. *Brain Res.* 1990; **536**:201.
18. Beck W, Geisslinger G, Engler H, Brune K. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in dogs. *Chirality* 1991; **3**:165.
19. Bertone A, Palmer J, Jones J. Synovial fluid inflammatory mediators as markers of equine synovitis. *Vet Surg* 1993; **22**:372.
20. Betley M, Sutherland SF, Gregoricka MJ, Pollet RA. the analgesic effect of ketoprofen for use in treating equine colics compared to flunixin-meglumine. *Equine Pract.* 1991; **13**:11.
21. Beutler B, Milsark I, Cerami A. Passive immunisation against cachectin-tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1995; **229**:869.
22. Billinghamurst R, Fretz P, Gordon J. Induction of intra-articular tumor necrosis factor during acute inflammatory responses in equine arthritis. *Equine Veterinary Journal* 1995; **27**:208.
23. Blanco F, Lotz M. Il-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Expl Cell Res* 1995; **218**:319.
24. Blanco F, Ochs R, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Path* 1995; **146**:75.
25. Bochner B, Lichtenstein L. Anaphylaxis. *N Engl J Med* 1991; **324**:1785.
26. Brandt KD. Non steroidal antiinflammatory drugs and articular cartilage. *J.Rheumatol.* 1987; **14**:132.
27. Brenman FM, Maini RN, Feldmann L. TNF-alfa a pivotal role in rheumatoid arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 1992; **31**:293.
28. Brideau C, Van Staden C, Chung Chan C. In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs and cats. *Am.J.Vet.Res.* 2001; **62**:1755.
29. Bridges C, Harris E. Experimentally induced cartilaginous fractures-osteocondritis dissecans- in foals fed low copper diets. *J Am Vet Med Assoc* 1988; **193**:215.

30. Brink P, de Graves F, Ravis W, Johansen D, Campbell J, Duran S. Stereospecific pharmacokinetics of free and protein bound ketoprofen in serum and synovial fluid of horses after intravenous and intramuscular administration. *Am.J.Vet.Res* 1998; **59**:250.
31. Bryant C, Elliott J. Nitric Oxide. Friend or foe. *Equine Vet Educ* 1994; **6**:59.
32. Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and osteoarthritis. *Am.J.Sport Med.* **25**:873.
33. Buick E. Use of a non esteroidal antiinflammatory drug in the horse. *Equine Vet J* 1987; **19**:60.
34. Cahn RS, Ingold CK, Prelog V. The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. *Experientia* 1956; :81.
35. Caldwell J, Hutt A, Fournel-Gigleux S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochemical Pharmacology* 1988; **37**:105.
36. Caldwell J. Chiral Pharmacology and the regulation of new drugs. *Chemistry and Industry* 1995; :176.
37. Caron JP, Bower RM, Abhold RH. Substance P in the synovial membrane and fluid of equine middle carpal joint. *Equine Vet. J.* 1992; **24**:364.
38. Carroll GJ. Spectrophotometric measurement of proteoglycans in osteoarthritic synovial fluid. *Ann.Rheum.Dis.* 1987; **46**:375.
39. Chaby R. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. *Drug Discovery today* 1999; **4**:209.
40. Chandrasekharan N, Dai H, Roos T, Elton T, Simmons D. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipiretic drugs: Cloning, structure and expression. *PMAS* 2002; **99**.
41. Cohnheim J.(1989) *Lectures in General Pathology.* (ed 2 ed.) London: The New Sydenham Society,
42. Crofford L, Lipsky P, Brooks P, Abramson S, Simon L, Van de Putte L. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arth.Rheumat.* 2000; **43**:4.
43. Curf J, Meis A, Hoogkamp G, Korstange J. A primer on cytokines, sources, receptors, effects and inducers. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; **10**:742.
44. Dawson W, Boot J, Harvey J. The pharmacology of benoxaprofen with particular reference to effects on lipoxigenase product formation. *Euro J Rheumatol Inflamm* 1982; **5**:61.

45. Delatour P, Benoit E, Bourdin M, Gobron M, Moysan F. Enantioselectivite comparee de la disposition de deux anti-inflammatoires non sterodiens, le ketoprofene et le carprofene, chez l'homme and l'animal. Bulletin du l'Academie Nationale du Medecine 1993; **177**:515.
46. Desjardins M, Hurtig M. Cartilage healing. A review with emphasis on the equine model. Can Vet J 1990; **31**:565.
47. Dinarello C, Renfer L, Wolf S. Human leucocytic pyrogen. Purification and development of a radioimmunoassay. Proc Nat Acad Sci USA 1977; **74**:4624.
48. Dinarello C, Wolf S. Molecular basis of fever in humans. Am J Med 1982; **72**:799.
49. Dinarello C. Interleukin-1. Rev Infect Dis 1984; **6**:51.
50. Dinarello C. Biology of interleukin-1. FASEB J 1988; **2**:108.
51. Dinarello C, Wolff S. The role of interleukin-1 in disease. New England Journal of Medicine 1993; **328**:106.
52. Dower W. Phage power. Curr Biol 1992; **2**:251.
53. Edwards J, Sedwick A, Willoughby D. The formation of a structure with features of synovial lining by the subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. J Pathol. 1981; **134**:147.
54. Evans AM. Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. European Journal of Clinical Pharmacology 1992; :237.
55. Evans C, Watkins S, Stefanovic-Racic M. Nitric Oxide and cartilage Metabolism. Methods in enzymology 1996; **269**:75.
56. Farndale R, Sayers C, Barrett A. A direct spectrophotometric microassay for sulphated glycosaminoglycans in cartilage cultures. Connect Tissue Res 1982; **9**:247.
57. Farndale R, Buttle D, Barrett A. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochem Biophys Acta 1986; **883**:173.
58. Farrel A, Blake D, Palmer R, Moncada S. Increased levels of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. Ann Rheum 1992; **51**:1219.
59. Firth D, Wensing T, Seuren F. An induced synovitis disease model in ponies. Cornell Vet 1987; **77**.

60. Foland J, McIlwraith C, Trotter G, Powers B, Lamar C. Effect of betamethasone and exercise on equine carpal joints with osteocondral fragments. *Vet Surg* 1994; **23**:369.
61. Fong Y, Moldawer L, Marano M. Endotoxemia elicits increased circulating b2 interferon/IL-6 in man. *J.Immunol.* 1989; **142**:2321.
62. Ford Hutchinson A, Walker J, Smith M. Assessment of antiinflammatory activity by sponge implantation techniques. *J Pharmacol Methods* 1978; **1**:3.
63. Foster RT, Jamali F. High performance liquid chromatographic assay of ketoprofen enantiomers in human plasma and urine. *Journal of Chromatography* 1987; **338**.
64. Foster RT, Jamali F, Russell AS, Alballa SR. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following single and multiple doses. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1988; **77**:70.
65. Foster RT, Jamali F. Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat: influence of route of administration. *Drug Metabolism and Disposition* 1988; **16**:623.
66. Frean S, Bryant C, Froeling I, Elliott J, Lees P. Nitric oxide production by equine Articular cells in vitro. *Equine Vet Journal* 1997; **29**:98.
67. Frean S, Abraham L, Lees P. In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Research in Veterinary Science* 1999; **67**:183.
68. Frich S, Ruley H. Transcription from the Stromelysin Promotor is induced by Interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987; **262**:16300.
69. Frisbie C, Kawcak C, Trotter G, Powers B, Walton R, Mcilwraith C. Effects of triamcinolone acetonide on an vivo equine osteocondral fragment exercise model. *Equine Vet J* 1997; **29**:349.
70. Frisbie DD, Ray CS, Ionescu M. Measurement of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxi propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. *Am.J.Vet.Res.* 1999; **60**:306.
71. Frisbie D, Ghivizzani S. Treated of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine Il-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002; **9**:12.
72. Frisbie D, Alsobayil F, Billinghamurst C, Mc Ilwraith C. Synovial fluid biomarkers distinguish exercise from osteoarthritic pathology. 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practioners. New Orleans. Louisiana: , 2003: .
73. Gabrielsson J, Weiner D.(1994) *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts and applications.*Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press,

74. Galloway WA. Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components. *Biochem.J.* 1983; **209**:741.
75. Garcia S.(1995) *Fisiologia veterinaria. Biomecanica de la locomocion.*:1054. (Espana Id, ed. ; vol cap 77).
76. Gaucher A, Netter P, Faure G, Shoeller JP. Diffusion of oxyphenbutazone into synovial fluid, synovial tissue, joint cartilage and cerebrospinal fluid. *Eur.J.Pharmacol.* 1983; **25**:107.
77. Gery I, Waksman B. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. The cellular source of potentiating mediators. *J Exp Med* 1972; **136**:143.
78. Gherkel L, Jobling S, Paikl S. A point mutation uncouples human interleukin-1 beta biological activity and receptor binding. *J Biol Chem* 1990; **265**:5922.
79. Gibaldi M, Perrier D.(1982) *Pharmacokinetics.* (2nd ed.) New York: (J. Swarbrick MD, ed.
80. Gibson KT, Hodge H, Whittem T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. *Austr. Vet. J.* 1996; **73**:123.
81. Gilman S, Carbon R, Chanc J, Lewis A. The antiinflammatory activity of the immunomodulator Wy-18,251 3-p-chlorophenyl thiazolo 3,2-7 benzimidazole 2-acetic acid. *Agents Actions* 1985; **17**:53.
82. Gilman S, Berner P, Chang J. Phospholipase A2 activation by Il-1. Release in metabolism of araquidonic acid by Il-1-stimulated rabbit chondrocytes. *Agents Actions* 1987; **21**:345.
83. Girasole G, Passieri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-1: A new cytokine critical for osteoclast development. *J.Clin.Invest.* 1994; **93**:1516.
84. Gornali AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J.Biol.Chem.* 1949; **117**:751.
85. Gregoricka MJ, Sutherland S, Dedrickson B, Busch K. Assessment of the intramuscular administration of ketoprofen. *Equine Practice* 1990; **12**:15.
86. Gregoricka M, Busck K, Pollet R. Clinical evaluation of ketoprofen. A new nonesteroidal antiinflammatory drug for use in horses. *AAEP Convention Proceedings.* , 1991: .
87. Gustafson S, Trotter C, Norrdin W, Wrigley R, Lamar C. Evaluation of intra-articular administered sodium monoiodoacetate-induced chemical injury to articular cartilage of horses. *Am J Vet Res* 1992; **53**:1193.
88. Hafez E.(1973) *Adaptacion de los animales domesticos.*Barcelona: :138. (S.A EL, ed. ; vol capitulo 7).

89. Hamm D, Goldman L, Jones E. Polysulphated glycosaminoglycan. A new intraarticular treatment for equine lameness. *Vet Med* 1984; **79**:811.
90. Hardingham T, Bayliss M, Rayan V, Noble D. Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage. *British Journal of Rheumatology* 1992; **31**:1.
91. Hardingham T, Bayliss M. Proteoglycans of articular cartilage changes in aging and joint disease. *Semin Arthr Rheum* 1990; **Suppl 1**:12.
92. Hardingham T, Fosang A. Proteoglycans. Many forms and many functions. *The FASEB journal* 1992; **6**.
93. Hartley H. The modified Gauss Newton Method for the fitting of non linear regression functions by least squares. *Technometrics* 1961; **3**:269.
94. Hawkins D, McKay R, Gum G, Colahan T, Meyer J. Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6 and prostaglandin E2 values in horses. *American Journal of Veterinary Research* 1993; **54**:379.
95. Heinegard D, Inrot S, Olsson SE, Sayne T. Cartilage proteoglycans in degenerative joint disease. *J.Rheumatol.* 1987; **14**:110.
96. Henderson B, Pettipher E. The synovial lining cell. *Biology and pathobiology. Sem Arthritis Rheum* 1985; **15**:1.
97. Herbert BL, Donald DS. Enhanced prostaglandin E2 secretion by cytokine-stimulated human synoviocytes in the presence of subtherapeutic concentrations of non steroidal antiinflammatory drugs. *Arth.Rheumat.* 1990; **33**:1162.
98. Hewett JA, Roth RA. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolisaccharides. *Pharmacol.Rev.* 1993; **45**:381.
99. Higgins AJ, Lees P. Arachidonic acid metabolites in carrageenin-induced equine inflammatory exudate. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* 1984; **7**:65.
100. Higgs GA, Moncada S, Vane J. The mode of action of antiinflammatory drugs prevents the peroxidation of arachidonic acid. *Antirheum. Drugs* 1983; **25**:11.
101. Hollingsworth J, Atkins E. Synovial inflammatory response to bacterial endotoxine. *Yale J Biol Med* Dec 1965; **38**:241.
102. Houssiau F, Devogelaer JP, VanDamme J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis and Rheumatism* 1988; **31**:784.
103. Hovdenes J, Kuien TK, Hovdenes A. IL-6 in synovial fluid, plasma and supernatants from cultured cells of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1990; **19**:177.

104. Humbel R, Etinger S. A colorimetric method for the determination of sulfated glycosaminoglycans. *Rev Roum Biochim* 1974; **11**:2.
105. Hurtig M. Use of autogenous cartilage particles to create a model of naturally occurring degenerative joint disease in the horse. *Equine Vet Journal* 1988; **Suppl 6**:19.
106. Hutt A, Caldwell J. The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids - a novel route with pharmacological consequences. *J.Pharm.Pharmacol.* 1983; **35**:693.
107. Ialenti A, Moncada S, Rosa M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; **110**:701.
108. Jamali F, Russell AS, Foster RT, Lemko C. Ketoprofen pharmacokinetics in humans. Evidence of enantiomeric inversion and lack of interaction. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990; **79**:460.
109. Jamali F, Kunz-Dover C. Pain-mediated altered absorption and metabolism of ibuprofen: An explanation for decreased serum enantiomer concentration after dental surgery. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999; **47**:391.
110. Jaussaud PJ, Bellon S, Besse D, Courtout D, Delatour P.- Enantioselective pharmacokinetics of ketoprofen in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 1993; **16**:373.
111. Johnston B, Kubes P. The α 4-integrin- an alternative Pathway for neutrophil recruitment. *Immunology Today* 1999; **20**:545.
112. Julou L, Guyonnet J, Ducrot R. Ketoprophen -19.583 R. P. 2-3 benzoylphenylpropionic acid. Main pharmacological properties-outline of toxicological and pharmacokinetic data. *Scand J Rheumatol* 1976; **5**:33.
113. Kankaanranta H, Moilanen E, Vapaatalo H. Tolfenamic acid inhibits leukotriene B₄-induced chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Inflammation* 1991; **15**:137.
114. Kankaaranta H, Moilanen E, Vapaatalo H. Comparison of in vitro effects of flunixin and tolfenamic acid on human leukocyte and platelet functions. *Inflammation* 1993; **17**:417.
115. Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2 Its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm.Res.* 2000; **49**:367.
116. Kauer H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation - nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS* 1994; **350**:9.
117. Kawack C, Mcilwraith C, Norrdin R, Park R, James S. The role of subcondral bone in joint disease. A review. *equine Veterinary Journal* 2001; **33**:120.

118. King JN. Corelation between the pharmacokinetics of oxindanac and inhibition of thromboxane B2 in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1994; **(in press)**.
119. Kirker-Mead CA, Chandna UK, Agarawal R. Concentrations of substance P and prostaglandin e2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *Am.J.Vet.Res.* 2000; **61**:121.
120. Klostermalfen B, Bhardwaj RS. Septic shock. *General Pharmacol.* 1998; **31**:25.
121. Kold SE, Hickman J. An experimental study of the healing process of equine chondral and osteochondral defects. *Equine veterinary Journal* 1986; **18**:18.
122. Krane M, Dayer J, Simon L, Byrne S. Mononuclear cell-conditioned medium containing mononuclear C factor MCF homologous with interleukin-1, stimulates collagen fibronectin synthesis by adherent rheumatoid synovial cell. The effects of prostaglandin E2 and Indomethacin. *Collagen Related Re* 1985; **5**:99.
123. Krey P, Bailen D. Synovial fluid leucocytosis, a study of extremes. *Am J med* 1977; **67**:436.
124. Krisans S, Mortensen M, Lazarow PB. Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. *J.Biol.Biochem.* 1980; **25**:9599.
125. Kujubu DA, Fletcher BS, Vamum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, aphorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *Journal of Biological Chemistry* 1991; **266**:12866.
126. Kujubu DA, Herschman HR. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry* 1992; **267**:7991.
127. Landoni MF, Lees P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in calves. *Chirality* 1995; **7**:586.
128. Landoni MF, Lees P. Comparison of the anti-inflammatory actions of flunixin and ketoprofen in horses applying PK/PD modelling. *Equine Veterinary Journal* 1995; **27**:247.
129. Landoni MF, Lees P. Influence of formulation on the pharmacokinetics and bioavailability of racemic ketoprofen in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1995; **18**:438.
130. Landoni MF. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of non steroidal antiinflammatory drugs in horses and calves. [PhD]. University of London, 1995.
131. Landoni MF, Frean S, Foot R, Lees P. Effects of flunixin, tolfenamic acid, R(-) and S(+) ketoprofen on the response of equine synoviocytes to lipopolysaccharide stimulation. *Equine Veterinary Journal* 1996; **28** :468-475

132. Landoni MF, Cunningham FM, Lees P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolfenamic acid in calves applying PK/PD modelling. *Research in Veterinary Science* 1996; **61**:26.
133. Landoni MF, Lees P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1996; **19**:466.
134. Landoni MF, Comas W, Mucci N, Anglarilli G, Bidal D, Lees P. Enantiospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1999; **22**:349.
135. Lapointe J, Laverty S, Plavoie J. Septic arthritis in 15 standardbred racehorses after intraarticular injection. *Equine Vet J* 1992; **24**:430.
136. Lees P, Higgins A. Clinical pharmacology and therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horse. *Equine Vet.J.* 1985; **17**:83.
137. Lees P. Pharmacology and therapeutics of joint diseases. *CPD Veterinary Medicine* 1999; **2**.
138. Lefevre V, Peeters-joris C, Vaes G. Modulation by IL-1 Tumor Necrosis Factor alpha, on production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *J Leuk Biol* 1984; **36**:341.
139. Levy RH, Boddy AV. Stereoselectivity in pharmacokinetics. A general theory. *Pharm.Res.* 1991; **8**:551.
140. Lewis RA, Austen KF. 1988 (Leukotriens). In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, ed. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press,; 121.
141. Libby P, Ordovas J, Auger K, Robbins A, Dinarello C. Endotoxin and TNF induce Interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* 1986; **124**:179.
142. Lim H, Paria B, Das S, Dinchuk J, Langenback R. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* 1997; **91**:197.
143. Linkhart TA, Susan GL, McCharles DC, Long DL. Interleukin-6 messenger RNA expression and IL-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone: regulation by interleukin-1. *J.Bone Min.Res.* 1991; **6**:1285.
144. Lohmander LS, Dahlberg J, Ryd L, Heinegard D. Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury. *Arthritis rheum.* 1989; **32**:1334.
145. Lohmander LS, Hoerner LA, Dahlberg L, Roos M, Bomsson S, Lark M. Stromelysin, tissue inhibitor and proteoglycan fragments in human knee joint after injury. *J.Rheumatol.* 1993; **20**:1368.

146. Lorenzo J. The role of cytokines in the regulation of local bone resorption. *Crit Rev Immunol* 1991; **11**:195.
147. Lotz N, Vaughn JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; **241**:1218.
148. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; **193**:265.
149. Magilavy DB. Animal models of chronic inflammatory arthritis. *Clin.Orth.Rel.Res.* 1990; **259**:38.
150. Majno G, ed. *The Healing Hand, Man and Wound in the ancient World.* Harvard University Press, 1975;(Virchow., ed.
151. Malmberg AB;Y T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 1992; **257**:1276.
152. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992; **May 6**:259.
153. Marletta M, Yoon P, Iyengar R, Leaf C, Wishnok J. Macrophage oxidation of L-Arginine to nitrite and nitrate. Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; **27**:8706.
154. Matthews JN, Altman D, Campbell M, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br.Med.J.* 1990; **300**:230.
155. May SA, Hooke R, Lees P. Bone fragments stimulate equine synovial lining cells to produce the inflammatory mediator PGE2. *Equine Vet.J.* 1988; **6**:131.
156. May SA, Hooke RE, Lees P. Equine chondrocyte activation by a variety of stimuli. *British Veterinary Journal* 1992; **148**:389.
157. May SA, Hooke RE, Peremans KY, Verschooten F, Lees P. Prostaglandin E2 in equine joint disease. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 1994; **63**:187.
158. Mc Kay R, Lester G. Induction of the acute phase cytokine, hepatocyte stimulating factor, interleukin 6 in the circulation of horses treated with endotoxin. *Am j Vet Res* 1992; **58**.
159. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J.Exp.Med.* 1993; **178**:749.
160. McDevitt CA, Gilberston E, Muir H. An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes. *J. Bone Surg.* 1977; **59**:24.
161. McDonald H, Stover SM, Willis NH, Benton HP. Effect of bacterial lipopolisaccharides on sulfated glycosaminoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine cartilage explants cultures. *Am.J.Vet.Res.* 1994; **55**:1127.

162. McIlwraith C, Yovich J, Martin G. Arthroscopic surgery for the treatment of osteochondral chip fractures in the equine carpus. *J Am Vet Med Assoc* 1987; **191**:531.
163. McIlwraith C, Fessler F, Blevins W, et al. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: clinical determinations. *Am J Vet Res* 1979; **40**:11.
164. McIlwraith C. Synovial fluid analysis in the diagnosis of equine joint disease. *Equine Practice* 1980; **2**:44.
165. McIlwraith CW, VanSicke DC. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: Histologic and histochemical changes in the articular cartilage. *Am.J.Vet.Res.* 1981; **42**:209.
166. McIlwraith C. Current concepts in equine joint disease. *J Am Vet Med Assoc* 1982; **180**:239.
167. McIlwraith C. The usefulness and side effects of intraarticular corticosteroids/ What do we know. *Proc.Am.Assoc.Equine Pract.* 1992; **38**:21.
168. McIlwraith CW.1996 (General pathobiology of the joint and response to injury.). In: McIlwraith CW, Trotter E, ed. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia: W.B. Saunders, : 40.
169. Mcilwraith C, Trotter G.(1996) *Joint Disease in the horse*.W. B. Saubders Company,
170. McIlwraith CW, Billingham RC, Frisbie DD. Current and future diagnostic means to better characterize osteoarthritis in the horse-routine synovial fluid analysis and synovial and serum markers. *AAEP Proc.* 2001; **47**:171.
171. McKay RJ, Lester GD. Induction of the acute phase cytokine, hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6, in the circulation of horses treated with endotoxin. *Am.J.Vet.Res.* 1992; **53**:235.
172. Mckee A.(1982) *Lectures in general Pathology*.London: New Sydenham Society,; vol 1).
173. Metchnikoff E. Heifetsl. Centennial of Metchnikoffs discovery. *J Reticuloendothel Soc* 1982; **31**:381.
174. Miyazawa S, Hashimoto T, Yokata S. Identity of long chain acyl coenzyme A. A synthetase of microsomes, mitochondria and peroxisomes in rat liver. *J.Biochem.* 1985; **204**:723.
175. Monshouwer M, McLellan PA, Delaporte E, Witkamp R, Van Miert A, Renton K. Differential effect of pentoxifylline on lipopolysaccharide induced downregulation of cytochrome P450. *Biochemical Pharmacology* 1996a; **52**:1195.

176. Monshouwer M, Witkamp R, Nijmeijer S, Amsterdam J, Van Miert A. Suppression of cytochrome P450 and UDP glucuronosyl transferasa dependent enzyme activities by pro-inflammatory cytokines and possible role of nitric oxide in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicology Applied Pharmacology* 1996b; **137**:237.
177. Monshouwer M, Witkamp R, Nijmeijer S, et al. A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450 mediated drug metabolism. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1996c; **19**:382.
178. Monshouwer M, R. W. Cytochrome and cytokines: Changes in drug disposition in animals during an acute phase response:A mini review. *The Veterinary Quarterly* 2000; **22**:17.
179. Morales T, Wahl L, Hascall V. The effect of bacterial LPS on the biosynthesis and release of proteoglycans from calf articular cartilage cultures. *Journal Biol Chem* 1984; **259**.
180. Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metabolism Review* 1997; **29**:1129.
181. Morris EA, McDonald BS, Webb A, Rosenwasser L. Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. *AmJ.Vet.Res.* 1990; **51**:213.
182. Muller D.(1954) *Estatica ecuestre. Tecnica de la explotacion equina.*:85. (Agro E, ed.
183. Murphy G, Hembry R. Proteinases in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1992; **32**:61.
184. Muttini A. Arthroscopy in the horse. *Vet Res Commun* 2003; **27**:79.
185. Nakamura Y, Yamaguchi T, Takahashi S, Hashimoto S, Iwatani K, Nakagawa Y. Optical isomerization mechanism of R- hidrotropic acid derivates. *Journal of Pharmacobiodynamics* 1981; **4**:S-1.
186. Nakamura Y, Yamaguchi T. Stereoselective matabolism of 2-phenylpropionic acid in rats.1 In vitro studies on the stereoselective isomerizationand glucuronidation of 2-phenylpropionic acid. *Drug Metab.Disp.* 1987; **15**:529.
187. Neuman B, Machleidt T, LifKa A, Pfeffer K, Vestweber D, Mak T. Crucial role of 55-kilodalton TNF-receptorTNF-induced adhesion molecule expression and leucocyte organ infiltration. *Journal of immunology* 1996; **156**:1587.
188. Nietfeld JJ, Willbrink B, Helle M, Roy LA, Otter N, Swaak AJ. Interleukin-1 induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interlekin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 1990; **33**:1695.

189. Olhagaray Curidi N. 1984 (Estudio de las claudicaciones en las distintas marchas, su diagnostico diferencial). In: S.R.L AHS, ed. *Semiologia clinica de las cogeras*. 1° Edicion ed. Montevideo. Uruguay: 334.
190. Owens JG, Kamerling SG, Stanton S. Effects of ketoprofen and phenylbutazone on chronic hoof pain and lameness in the horse. *Equine Veterinary Journal* 1995; **27**:296.
191. Owens J, Kamerling SG, Barker S. Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1995; **18**:187.
192. Owens J, Kamerling S, Stanton S, Keowen M, Prescott-Mathews J. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. *American Journal of Veterinary Research* 1996; **57**:866.
193. Oyanagui Y. Nitric oxide and superoxide radical are involved in both initiation and development of adjuvant arthritis in rats. *Life Sci.* 1994; **54**:285.
194. Palmer JL, Bertone AL. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. *Equine Veterinary Journal* 1994; **26**:492.
195. Palmer JL, Bertone AL. Joint structure, biochemistry, and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet.J.* 1994; **26**:263.
196. Pang KS, Kwan KC. A commentary: methods and assumptions in the kinetic estimation of metabolite formation. *Drug Metabolism and Disposition* 1983; **11**:79.
197. Patrono C, Ciabattini G, Greco F, Grossi-Belloni D. Comparative evaluation of the inhibitory effects of aspirine-like drugs on prostaglandin production by human platelets and synovial tissue. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1976; **1**:125.
198. Pelletier J, mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible Nitric Oxide inhibits II-1ra synthesis by human articular chondrocytes. Possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cart* 1996; **4**:77.
199. Peloso J, Stick J, Caron J. Effects of hylan on anphoteracin-induced carpal lameness in equids. *Am J Vet Res* 1993; **54**:1527.
200. Perretti M. Endogenous mediators that inhibit the leucocyte-endotelium interaction. *Trends in Pharmacological Science* 1997; **18**:418.
201. Persson L. On the synovia in horses. *Acta Vet.Scand.* 1971; **35**:1.
202. Pettiper ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin-1 induces leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial fluid. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 1986; **83**:8749.

203. Platt D, Bayliss M. An investigation of the proteoglycan metabolism of mature equine articular cartilage and its regulation by interleukin-1. *Equine Vet Journal* 1994; **26**:297.
204. Poxton IR. Endotoxin in human disease. In: Therapeutics. AoVPa, ed. *Endotoxin and NSAIDs in horses*. Harrogate. UK: , 1999: 3.
205. Ramadori G, Sipe J, Dinarello C, Mizel S, Colten H. Pretranslational modulation of acute Phase Hepatic Protein. Synthesis by murine recombinant and interleukin-1 and purified human IL-1. *J Exp Med* 1985; **162**:930.
206. Ratcliffe A, Tyler JA, Hardingham TE. Articular cartilage cultured with interleukin-1: Increased release of link protein, hyaluronate-binding region and other proteoglycan fragments. *Biochem.J.* 1986; **238**:571.
207. Rath NC, Oronsky AL, Kerwar SS. Synthesis of interleukin 1-like activity by normal rat chondrocytes in culture. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1988; **47**:39.
208. Ray C, Baxter G, McIlwraith C. Development of subchondral cystic lesions following subchondral bone trauma in horses. *Vet Surg* 1994; **23**:414.
209. Rechenberg B, McIlwraith W, Akens M, Auer J. Spontaneous production of nitric oxide, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage. *Vet.Sur.* 1998; **27**:520.
210. Renton K, Armstrong S.1994 (Immune-mediated down regulation of cytochrome P450 and related drug metabolism). In: Dean JH, Luster M, Munson A, Kimber I, ed. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. 2nd ed. New York: Raven Press,:
211. Ricard D, Gowen M, McDonald B. Proliferative responses to estradiol, IL-1 alpha y TNF beta by cell expressing alkaline phosphatase in human osteoblast-like cell cultures. *Calcif Tissue Int* 1993; **52**:227.
212. Robinson B, Robson J. Production of an anti-inflammatory substance at a site of inflammation. *Br J Pharmacol* 1964; **23**:420.
213. Robinson DR, Levien L.(1974) *Prostaglandin synthetase inhibitors*.New York: Raven Press,;223. (Robinson HJ, Vane JR, ed.
214. Rosedale P, Hopes R, Winfield R, Digby N. Epidemiological study of wastage among race horse. *Vet Rec.* 1985; **116**:66.
215. Saari H, Konttinen U, Tulamo R. Concentration and degree of polymerization of hyaluronate in equine synovial fluid. *Am J Vet Res* 1989; **50**:2060.
216. Saez-Llorens X, Jafari HS, Olsen KD. Induction of suppurative arthritis in rabbits by Haemophilus endotoxin, tumor necrosis factor-alfa and interleukin-1 beta. *J.Infect.Dis.* 1991; **163**:1267.

217. Schacterle G, Pollack R. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic materials. *Anal.Biochem.* 1973; **51**:654.
218. Schmitt M, Guentert TM. Biopharmaceutical evaluation of ketoprofen following intravenous, oral and rectal administration in dogs. *J.Pharm.Sci.* 1990; **79**:614.
219. Sellers A, Murphy G. Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. *Int.Rev.Connec.Tiss.* 1981; **9**:151.
220. Setnikar I, Pacinic MA, Revel L. Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied on animal models. *Drug Res.* 1991; **41**:542.
221. Sevelius F, Tufuesson PG. Treatment for fractures of the sesamoid bone in horses. *J.Am.Med.Assoc.* 1963; **142**:981.
222. Simmons DL, Xie W, Chipman JG, Evett GE. 1991 (Multiple cyclooxygenases: cloning of a mitogen-inducible form.). In: Baliley JM, ed. *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxines and PAF.* New York: Plenum Press, : 67.
223. Sisson S, Grossman J.(1959) *Anatomia de los animales domesticos.* (4ta ed.) (A. SS, ed.
224. Smith W, Shimokawa T, Otto J. Structure function relationship of PGH synthase: Heme binding and carbohydrate attachment sites. XIth Washington International Spring Symposium: Prostaglandins, Leukotriens, Lipoxins and PAF. Washington: , 1991: .
225. Spiers S, May SA, Harrison L, Bennett H, Edwards G. Proteolytic enzymes in equine joints with infectious arthritis. *Equine Vet.J.* 1994; **26**:48.
226. Spiers S, May S, Bennett D, Edwards G. Cellular sources of proteolytic enzymes in equine joints. *Equine Vet Journal* 1994; **26**:43.
227. Spring C, Mevissen M, Reist M. Modification of sp. *Journal of Veter* 2003; **26**:377.
228. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billar T, et al. Articular chondrocytes synthesize Nitric Oxide in response to cytokines and Lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; **147**:3915.
229. Stefanovich-Racic M, Watkins S, Kang R, Turner D, Evans C. Identification of an inducible nitric oxide synthase in human osteoarthritic cartilage. *Trans.Orthop.Res.Soc.* 1996; **21**:534.
230. Stephanovic-Racic M, Meyers K, Mescher C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum.* 1994; **37**:1062.
231. Stephanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu HI, Evans C. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. *J.Rheumatol.* 1994; **21**:1892.

232. Stephanovic-Racic M, Morales TI, Taskiran D, McIntyre LA, Evans C. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ culture. *J.Immun.* 1996; **156**:1213.
233. Stichtenoth DO, Gutzki F, Tsikas D, Selve N. Increased urinary nitrate excretion in rats with adjuvants arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 1994; **53**:547.
234. Sturge RA, Yates DB, Gordon D, et al. Prostaglandin production in arthritis. *Annals Rheum.Dis.* 1978; **37**:315.
235. Suesa N, Fernandez MF, Gutierrez M, et al. Stereoselective cyclooxygenase inhibition in cellular models by the enantiomers of ketoprofen. *Chirality* 1993; **5**:589.
236. Sung K, Mendelow D, Cu Hi G, Evans C. Characterization of chondrocyte activation in response to cytokines Synthesised by a synovial cell line. *Bioch Biophysic Acta* 1988; **971**:148.
237. Swaak AJ, VanRooyen A, Nieuwenhuis E. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1988; **17**:469.
238. Tamanini C, Seren E, Pezzoli G. Concentrations of prostaglandin E1 and E2 in the synovial fluid of horses affected with arthropathy. *Clin.Vet.* 1980; **25**:544.
239. Testa B. The chromatographic analysis of enantiomers in drug metabolism studies. *Xenobiotica* 1986; **16**:265.
240. Todhunter RJ, Yeh JA, Sheldon A, Grisanzio L, Walker N, Lust G. Effects of stromelysin activity on proteoglycan degradation of canine articular cartilage explantes. *Am.J.Vet.Res.* 1995; **56**:1241.
241. Toutain PL, Autefage A, Legrand C, Alvinerie M. Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in horses: Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1994; **(in press)**.
242. Towle CA, Trice ME, Ollivierre F, Awbrey BJ, Treadwell BV. Regulation of cartilage remodelling by IL-1 evidence for autocrine synthesis of IL-1 by chondrocytes. *Journal of Rheumatology* 1987; **14**:1.
243. Trang L, Granstrom E, Lovgren O. Levels of prostaglandins F2 alpha and E2 and Thromboxane B2 in joint fluid in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1977; **6**:151.
244. Tulamo RM, Bramlage LR, Gabel AA. The influence of corticosteroids on sequential clinical and synovial fluid parameters in joints with acute infectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal* 1989; **21**:332.
245. Tulamo R, Bramlage LR, Gabel A. Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. *Equine Vet. J.* 1989; **21**:325.

246. Twomey B;D M. Cyclooxygenase-independent effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on the neutrophil respiratory burst. *Biochemical Pharmacology* 1992; **43**:413.
247. Tyler JA. Chondrocyte-mediated depletion of articular cartilage proteoglycans in vitro. *Biochem.J.* 1985; **225**:493.
248. Updike S, Diesem C. Vascular supply of the equine stifle joint. *Am J Vet Res* 1980; **41**:1621.
249. Vachon A, Keeley F, Mcilraith C, Chapman D. Biochemical analysis of normal articular cartilage of horses. *Am J Vet Res* 1990; **51**:1905.
250. Van Miert A. Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model:Pathophysiological, pharmacological and therapeutic aspects. *Vet.Quarterly* 1995; **17**:41.
251. Van Miert A. Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. *Veterinary Reserch Communications* 2002; **26**:111.
252. Van Pelt R. Monoarticular ideopathic septic arthritis in horses. *J Am Vet Med Ass* 1971; **158**:1658.
253. Van Pelt R. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. *J Am Vet Assoc* 1974; **165**:91.
254. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature (New Biol.)* 1971; **231**:232.
255. Vane J, Botting R. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm.Res.* 1995; **44**:1.
256. Verde C, Simpson M, Frigoli A, Landoni M. Modificaciones clinicas en un modelo experimental de sinovitis aguda en equinos. *Rev Elect Vet REDVET* 2004; v:Articulo 101004.
257. Verde C, Simpson M, Frigoli A, Landoni M. Enantioselective pharmacokinetics of ketoprofen in plasma and synovial fluid of horses with acute synovitis. *J. Vet.Pharmacol. Therap.* 24: 179-186
258. Villanueva M;H R.; Strobach H.; Palmer, M.; Schror, K. Equipotent inhibition by R(-), S(+) and racemic ibuprofen of human polymorphonuclear cell function in vitro. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1993; **35**:235.
259. Watrous D, Andrews B. The metabolism and inmunology of bone. *Seminars in arthritis and rheumatism* 1989; **19**:45.
260. Werbeeck RK, Blackburn JL, Loewen GR. Clinical pharmacokinetics of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Clinical Pharmacokinetics* 1983; **8**:297.

261. Williams K, Day R, Knihinicki R, Duffield A. The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue. *Biochem.Pharmacol.* 1986; **35**:3403.
262. Woessner JF, Azzow H. Proteoglycan-degrading metalloproteases of human articular cartilage. *J.Rheumatol.* 1987; **14**:36.
263. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by RNAm splicing. *Proceeding of the National Academy of Science USA.* 1991; **88**:2692.
264. Xinping-Zhang E, Schwarz E, Young D, Puzas E, Rosier R, OKeefe R. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J.Clin.Invest.* 2002; **109**:1405.
265. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1978; **6**:165.
266. Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski P. Signalling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor-2. *J.Immunol.* 1999; **163**:639.