

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**TESIS DOCTORAL**

**Interacción analgésica entre antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y opiáceos durante la anestesia inhalatoria en la rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Javier Benito de la Víbora**

Director

**Ignacio Álvarez Gómez de Segura**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

# **INTERACCIÓN ANALGÉSICA ENTRE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES) Y OPIÁCEOS DURANTE LA ANES- TESIA INHALATORIA EN LA RATA**

**JAVIER BENITO DE LA VÍBORA**

**Director: Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura**

**Madrid, 2015**



D. Ignacio Álvarez Gómez de Segura, con D.N.I. 50804138-J, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**Interacción analgésica entre antiinflamatorios no esteroideos (AINes) y opiáceos durante la anestesia inhalatoria en la rata**”, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D. Javier Benito de la Víbora.

Revisado el presente trabajo, considera que reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

En Madrid, a 25 de octubre de 2015,

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura



The word "AGRADECIMIENTOS" is centered between two thick, horizontal, olive-green bars. The top bar is positioned above the text, and the bottom bar is positioned below it, creating a frame for the title.

# AGRADECIMIENTOS



Muchas personas me ayudaron de muy diversas formas durante todos estos últimos años, y sin ellas acabar esta Tesis hubiera sido una tarea imposible y mucha más dura, y con todas ellas tengo una enorme deuda. Sin embargo, hay algunas sin las cuales hubiera sido imposible llevarla a cabo, y a las que debo un agradecimiento especial.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura su ayuda más allá del deber académico como director, y sobre todo por haberme dado una gran base científica de cara a realizar trabajos de investigación y demostrado una amistad que sobrevivirá años de acaloradas discusiones (la mayoría de ellas científicas).

En segundo lugar quiero agradecer a las Dras. Delia Aguado y Mariana Abreu por su infinita ayuda en los experimentos de este estudio, y sobre todo por haberme dado una gran experiencia vital, profesional y científica trabajando a su lado.

También debo agradecer a todo el personal (jefes de servicio, veterinarios, médicos facultativos y médicos residentes, otros investigadores y doctorandos, cuerpo de enfermería, auxiliares, celadores y personal de limpieza) del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz, por tolerarme todo este tiempo, por aportarme una gran cantidad de conocimiento y por poner a mi disposición las instalaciones y todos los equipos del servicio.

Por último gracias a mi esposa, la Dra. Mila Freire, y a mi familia, mis padres Paco y María de la Paz y a mi hermana Marta, por estar siempre a mi lado incondicionalmente con una infinita paciencia.



---

## **ABREVIATURAS**

---



## Abreviaturas empleadas en el texto.

<b>Acrónimo</b>	<b>Descripción</b>
<b>AD<sub>50</sub></b>	Dosis anestésica 50 ((anaesthetic dose 50)
<b>AINE(s)</b>	Antiinflamatorio(s) No Esteroideo(s)
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CRI</b>	Constant Rate Infusion
<b>CAM</b>	Concentración Alveolar Mínima
<b>CAM<sub>iso</sub></b>	Concentración Alveolar Mínima de Isoflurano
<b>CAM<sub>sev</sub></b>	Concentración Alveolar Mínima de Sevoflurano
<b>COX</b>	Enzima ciclooxigenasa
<b>COX-1</b>	Enzima ciclooxigenasa-1
<b>COX-2</b>	Enzima ciclooxigenasa-2
<b>COX-3</b>	Enzima ciclooxigenasa-3
<b>DE (SD)</b>	Desviación estándar (SD en inglés)
<b>DE50</b>	Dosis Efectiva 50
<b>etAA</b>	Concentración anestésica tele-expiratoria preseleccionado
<b>etCO<sub>2</sub></b>	Concentración de CO <sub>2</sub> en gas expirado
<b>FC</b>	Frecuencia cardiaca
<b>FR</b>	Frecuencia respiratoria
<b>g</b>	Gramo
<b>GABA</b>	Neurotransmisor ácido γ-aminobutírico
<b>h</b>	Hora
<b>ip</b>	(vía) intraperitoneal
<b>iv</b>	(vía) intravenosa
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LD50</b>	Dosis letal 50 (Lethal Dose 50)
<b>LD<sub>50</sub>/AD<sub>50</sub></b>	Cociente LD <sub>50</sub> /AD <sub>50</sub>
<b>L/min</b>	Litros/ minuto
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mg kg<sup>-1</sup></b>	Miligramos por kilogramo
<b>mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>	Miligramos por kilogramo por hora
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µg kg<sup>-1</sup></b>	Microgramos por kilogramo
<b>mg kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup></b>	Microgramos por kilogramo por hora
<b>min</b>	Minuto

<b>ml</b>	Mililitro
<b>NMDA</b>	N-metil-D-Aspartato
<b>mmHg</b>	Milímetros de presión
<b>N<sub>2</sub>O.</b>	Óxido nitroso
<b>OP2</b>	Opioides agonistas puros
<b>P<sub>A</sub></b>	Presión parcial alveolar
<b>P<sub>a</sub></b>	Presión parcial arterial
<b>P<sub>BR</sub></b>	Presión parcial cerebral
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Presión parcial arterial de dióxido de carbono
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Presión parcial arterial de oxígeno
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAM</b>	Presión arterial media
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PgE1</b>	Prostaglandina E-1
<b>PgE2</b>	Prostaglandina E-2
<b>PIVA</b>	Anestesia Parcial Intravenosa - Partial Intravenous Anesthesia
<b>% Red CAM<sub>iso</sub></b>	Porcentaje de reducción de la Concentración Alveolar Mínima de Isoflurano
<b>% Red CAM<sub>sev</sub></b>	Porcentaje de reducción de la Concentración Alveolar Mínima de Sevoflurano
<b>% Red FC</b>	Porcentaje de reducción de la frecuencia cardíaca
<b>% Red FR</b>	Porcentaje de reducción de la frecuencia respiratoria
<b>% Red PAM</b>	Porcentaje de reducción de la presión arterial media
<b>%vol.</b>	Porcentaje o valor de gas anestésico inhalatorio suministrado o hallado para CAM
<b>s</b>	Segundo
<b>SC</b>	(vía) subcutánea
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TAO</b>	Tolerancia aguda a opioides
<b>TIVA</b>	Anestesia total intravenosa (Total Intravenous Anesthesia)



**INDICE**



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>63</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>135</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>147</b>
<b>PUBLICACIONES Y TRABAJOS EN FASE DE REVISIÓN.....</b>	<b>163</b>



---

# INTRODUCCIÓN

---



El control del dolor constituye un problema de una dimensión social cada vez mayor que ha favorecido un incremento igualmente considerable de los estudios que tratan de determinar sus mecanismos y tratamientos. La suma de ambos ha favorecido el desarrollo de la denominada analgesia polimodal que sugiere que el abordaje analgésico resulta más eficaz si se emplean diferentes tratamientos analgésicos que emplean diferentes mecanismos de acción. De este modo resulta común emplear conjuntamente opioides e inhibidores de la COX, como por ejemplo los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), asociados a técnicas de anestesia o analgesia locorregional (anestésicos locales, opioides, etc.). Otros fármacos menos empleados pero igualmente eficaces son los antagonistas N-metil-D-Aspartato (NMDA) como la ketamina o la tiletamina; o el empleo de sedantes como los agonistas de los receptores alfa-2 (Clonidina, xilacina, medetomidina o dexmedetomidina). Probablemente una de las asociaciones más conocidas es la de opioides y los inhibidores de la COX (por ejemplo los AINEs), sugerida como tercer escalón analgésico por la OMS para el tratamiento de diferentes dolencias que cursan con dolor intenso, pero su empleo intraoperatorio ha tenido una base más empírica que científica.

La reducción de las necesidades de anestésicos inhalatorios mediante la coadministración de analgésicos intraoperatorios conlleva un incremento del margen de seguridad del paciente pero también una disminución de la polución ambiental y una reducción de costes. La combinación de diferentes tipos de analgésicos puede incrementar dicho efecto ahorrador de anestésico e incluso se ha observado un efecto potenciador derivado de la administración conjunta con de inhibidores de la ciclooxigenasa (COX; por ejemplo, antiinflamatorios no esteroideos – AINEs). Existen sin embargo trabajos recientes, y aparentemente contradictorios, que sugieren un diferente grado de poten-

ciación analgésica (medido en términos de reducción de la Concentración Alveolar Mínima de un agente halogenado - CAM) de los opioides según el inhibidor de la COX coadministrado durante la anestesia inhalatoria.

Los opioides son fármacos analgésicos recomendados para el tratamiento del dolor moderado o severo. Por ello son utilizados habitualmente en procedimientos quirúrgicos donde proporcionan el principal componente analgésico que, además de la pérdida de consciencia, requiere la anestesia quirúrgica. En la práctica, los opioides constituyen un grupo de fármacos insustituibles en el manejo del dolor intraoperatorio y son combinados con anestésicos -inhalatorios o inyectables, con efecto preferentemente hipnótico- para proporcionar una excelente analgesia, ya que estos últimos fármacos no lo producen de forma intrínseca. Aportan, por tanto, el componente analgésico de la denominada anestesia equilibrada o *balanceada* (Lang y col. 1996).

El manejo del dolor intraoperatorio y la percepción del estímulo doloroso durante la cirugía constituyen un factor básico a considerar y prevenir durante la cirugía por el impacto negativo que tiene sobre el paciente. Los opioides constituyen un grupo de fármacos esenciales en el manejo del dolor intraoperatorio y son combinados con los anestésicos inhalatorios para proporcionar una excelente analgesia, ya que estos últimos fármacos no producen analgesia. Aportan, por tanto, el componente analgésico de la denominada anestesia balanceada (o equilibrada; balance = equilibrio). La finalidad de dicha técnica consiste no solo en aportar los componentes necesarios para proporcionar una anestesia óptima (hipnosis, analgesia, relajación muscular bloqueo de los reflejos autonómicos, amnesia) sino en buscar

potenciaciones sinérgicas que favorezcan una reducción de las dosis de cada uno de los fármacos empleados.

En el caso de los anestésicos inhalatorios halogenados (sevoflurano, desflurano, isoflurano) dicha reducción tiene una evidente ventaja al reducirse los efectos secundarios deletéreos dosis-dependiente como son la depresión cardiovascular, caracterizada por una marcada hipotensión, o la depresión respiratoria. Otra segunda ventaja viene derivada de una menor contaminación ambiental, incluso cuando se emplean sistemas de evacuación de gases anestésicos. Una tercera ventaja es una reducción de los costes al emplearse una dosis menor. En resumen, cualquier técnica que permita limitar el empleo de los anestésicos halogenados, maximizando sus ventajas, constituye una mejora y no solo desde un punto de vista clínico.

Los fármacos más eficaces a la hora de reducir las necesidades de anestésicos inhalatorios son los opioides, pudiendo observarse reducciones cercanas al 90% en personas y empleando opioides agonistas puros (OP2) como la morfina, el fentanilo o el remifentanilo (Lang y col. 1996). Dichas estimaciones se han realizado de forma indirecta a través de la reducción de la concentración alveolar mínima (CAM) de los anestésicos halogenados y que también puede considerarse la dosis efectiva 50 (FE50), es decir, aquella que previene la respuesta a un estímulo nociceptivo en un 50% de los sujetos (Eger y col. 1965). Existen diferentes formas de determinar la CAM (estímulo doloroso, intubación, etc.) y constituye una referencia de la potencia anestésica del fármaco. Dada la naturaleza dolorosa de algunos de los estímulos empleados y la capacidad de muchos analgésicos (en especial los opioides) para disminuir el valor de la CAM, se considera que dicha reducción es una estimación indirecta de la potencia analgésica. De todas formas, no puede establecerse una

relación directa entre ambos (Docquier y col. 2003) y, de hecho, otros fármacos con acción analgésica pueden no modificar la CAM *per se* (inhibidores de la COX - AINEs) (Gómez de Segura y col. 1998) y otros, sin efectos analgésicos, sí la reducen (benzodiazepinas). Una gran ventaja de este método es que simula la situación clínica ya que las reducciones obtenidas en la CAM pueden obtenerse también durante la cirugía.

Las combinaciones analgésicas sinérgicas intraoperatorias como opioides e inhibidores de la COX (AINEs) es una las de técnicas de analgesia polimodal o multimodal intraoperatorias. La introducción de técnicas de analgesia multimodal intraoperatorias busca efectos analgésicos aditivos o, preferentemente, sinérgicos y entre fármacos con diferente mecanismo de acción que garanticen una mejor analgesia intraoperatoria, pero al mismo tiempo favorezcan una reducción de las dosis empleadas así como de las necesidades de otros fármacos empleados durante la anestesia, especialmente anestésicos inhalatorios. Ello redundaría en un incremento de los márgenes de seguridad (Kehlet y col. 1993).

Se ha observado un efecto analgésico sinérgico derivado de la combinación de opioides y inhibidores de la COX (por ejemplo con AINEs) (Beaver WT, 1984; Gaitan y col. 2002) con unos efectos secundarios mínimos (Beaver WT 1984, Christie y col. 2000; Gómez de Segura y col. 1998; Hernández-Delgadillo y col. 2003; Ingram 2000; Malmberg y col., 1993; Maves y col. 1994). Clínicamente se ha observado que dichas combinaciones mejoran la analgesia proporcionada, reduciendo las necesidades de estos en el postoperatorio (Gillies y col. 1987). El mecanismo de acción ha sido identificado como una interacción sináptica entre ambos tipos de fármacos donde la activación del receptor  $\mu$  produce una inhibición presináptica de la liberación de GABA me-

diado por metabolitos del ácido araquidónico (Vaughan y col. 1997; Vaughan CW, 1998; Williams JT 1997). Teniendo en cuenta que la CAM es un fenómeno preferentemente espinal (Rampil y col. 1996), nuestro grupo pudo demostrar un año más tarde que la combinación de ambos tipos de fármacos reducía de forma sinérgica la CAM de isoflurano (Gómez de Segura et al. 1998). Dicho efecto sinérgico se observa fácilmente dado que la administración de inhibidores de la COX, el AINE aspirina en este caso, no produjo una reducción de la CAM, mientras que si se asociaba a morfina, se requería una dosis tres veces menor de este opioide para producir el mismo grado de reducción de la CAM. Las consecuencias clínicas de dicho hallazgo son que podemos reducir las dosis de opioides empleadas, las de anestésico inhalatorio, o las de ambos fármacos, obteniendo el beneficio clínico derivado de dicha reducción.

Recientemente, un grupo de farmacólogos ha podido establecer también un efecto antinociceptivo sinérgico entre morfina e inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa comunes como naproxeno, piroxicam, metamizol, diclofenaco y ketoprofeno en el ratón (Miranda y col. 2005). Este estudio confirmó, empleando un modelo de dolor diferente y planteando, por tanto, una situación clínica distinta, el efecto sinérgico observado durante la anestesia inhalatoria, y resaltando la importancia que tiene la médula espinal en dicho proceso. Igualmente, estos autores determinan un grado variable de potenciación según el AINE empleado. En otro estudio empleando un modelo de dolor artrítico, se observó un efecto similar (Deciga y col. 2003).

Sorprendentemente, el efecto observado en el estudio de nuestro grupo con la aspirina (Gómez de Segura et al. 1998), que es un AINE con un efecto inhibitorio COX1 predominante, aunque raramente empleado en la clínica por su moderada potencia analgésica y relativa mayor toxicidad. Posteriormente, un estudio similar

realizado con meloxicam, efecto inhibitorio COX2 predominante, no pudo demostrar ningún efecto potenciador, aun cuando metodológicamente el estudio es prácticamente idéntico al anterior (Santos y col. 2004). Finalmente, en un estudio publicado en el perro se determinó una reducción del 10-15% producida por el ketoprofeno a una dosis de 1-2 mg kg<sup>-1</sup>, cuyo efecto inhibitorio es COX1 predominante (ver Tabla 1).

Las evidencias que apoyarían la existencia de un grado diferenciado de potenciación producida por los AINEs son las bien conocidas variaciones en la potencia analgésica y antiinflamatoria de los diferentes AINEs, pero otro argumento más reciente sugiere que la combinación de diferentes AINEs puede proporcionar ventajas terapéuticas. Se ha observado que la combinación del paracetamol con otros AINEs como ketoprofeno o diclofenaco puede potenciar la acción analgésica (Hyllested y col. 2002). Ello sugiere que las combinaciones de AINEs también podrían ser útiles a la hora de ser combinadas con opioides y modificar igualmente la CAM durante la anestesia inhalatoria.

**Tabla 1.** Estudio en el perro donde se determinó una reducción del 10-15% producida por el ketoprofeno (1-2 mg/kg) en combinación con el fentanilo.

<i>Analgésico</i>	<i>CAM<sub>ISO</sub></i>	<i>% Red CAM<sub>ISO</sub></i>
<i>Salino</i>	27 ± 0.02	1 ± 0
<i>Fentanilo</i>	0.73 ± 0.08	42 ± 6
<i>Fentanilo + Ketoprofeno 1 mg/kg</i>	0.67 ± 0.13	47 ± 10
<i>Fentanilo + Ketoprofeno 2 mg/kg</i>	0.63 ± 0.08	50 ± 6

En resumen, los pocos estudios realizados hasta la actualidad del efecto reductor de la CAM de asociaciones de opioides y AINEs y la posible modulación de estos últimos según el fármaco considerado sugieren la necesidad de determinar la capacidad potenciadora analgésica relativa de los AINEs más comunes, especialmente aquellos que ya se emplean clínicamente durante el periodo perioperatorio. A lo largo del desarrollo de este manuscrito nos referiremos a los AINEs generalmente como inhibidores de la COX, dado que cuando esta tesis fue comenzada todos los fármacos objeto de estudio aparecían en los textos médicos veterinarios como AINEs, pero dado que el paracetamol tiene una capacidad antiinflamatoria escasa y parece contar con otros mecanismos de acción diferenciados a los AINEs más comúnmente utilizados, la terminología inhibidores de la enzima COX o inhibidores de la COX, serán las más empleadas en este manuscrito.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



---

## 1.1 Técnicas de anestesia en animales de laboratorio.

---

La anestesia de animales de laboratorio, y en concreto de roedores como la rata, presenta unos requerimientos especiales que la diferencian de la anestesia clínica en general, pero sus hallazgos y observaciones son de aplicación directa y traslacional a la clínica. El bienestar de los animales utilizados debe ser considerado una prioridad, e incluso en procedimientos relativamente atraumáticos y poco dolorosos, pero potencialmente estresantes para los animales, deben ser llevados a cabo, siempre que sea posible, bajo anestesia general. La preocupación por el bienestar de los animales debe equilibrarse con las necesidades del investigador y del procedimiento experimental llevado a cabo y por lo tanto, las características ideales de un protocolo anestésico experimental deben incluir:

1. Analgesia e hipnosis adecuadas,
2. Recuperación rápida y suave, sin efectos secundarios desagradables, e
3. Fácil administración,
4. Influencia mínima en la investigación que se está llevando a cabo.

Los principales problemas que presenta la anestesia general en animales de laboratorio, y en los pequeños roedores en general, están relacionados, precisamente, con su reducido tamaño. Estos mamíferos tienen una elevada superficie corporal en relación con su peso, lo que los hace especialmente sensibles al desarrollo de hipotermia durante la anestesia. El pequeño tamaño de sus venas superficiales hace que la administración de fármacos por vía intravenosa sea complicada, y sea más conveniente

utilizar otras vías alternativas. Las principales son la vía intraperitoneal y la subcutánea, ninguna de las cuales es adecuada para la administración gradual de anestésicos, con el consiguiente riesgo de sobredosis. Estas características especiales de cara a la anestesia hacen además un reto transferir la información recogida en estas especies a otras superiores e incluso a medicina humana.

---

## 1.2 Técnicas de Analgesia.

---

Proporcionar una analgesia intraoperatoria adecuada es un requisito de la anestesia general de cualquier intervención quirúrgica experimental o clínica. En este sentido, se puede categorizar en cinco grupos principales de analgésicos, que se utilizan habitualmente en los animales y en personas:

1. Opiáceos (por ejemplo remifentanilo),
2. Inhibidores de la COX (por ejemplo antiinflamatorios no esteroideos - AINEs,
3. Anestésicos locales,
4. Agonistas de los receptores adrenérgicos alfa-2,
5. Otros fármacos: donde se incluyen diferentes fármacos con propiedades analgésicas, como ketamina, óxido nitroso, gabapentina, etc.

Por otra parte, se sabe que la administración preventiva de analgésicos, es decir, con anterioridad a que se produzca el estímulo doloroso, reduce la intensidad del dolor postoperatorio y la dosis de analgésicos requerida. Los agentes utilizados pueden va-

riar e incluyen opiáceos (Lascelles et al. 1997), anestésicos locales, AINEs (Lascelles et al. 1998) o antagonistas de los receptores NMDA como la ketamina (Slingsby 1999). El mecanismo en todos los casos está relacionado con el control de los procesos de sensibilización central, mediante la reducción del estímulo doloroso recogido por los nociceptores periféricos y las vías nociceptivas aferentes primarias (Eide y col. 1995; Dobromylsky y col. 2000).

A continuación se revisan los dos grupos de analgésicos utilizados en este estudio: inhibidores de la COX (AINEs y paracetamol) y opiáceos (remifentanilo).

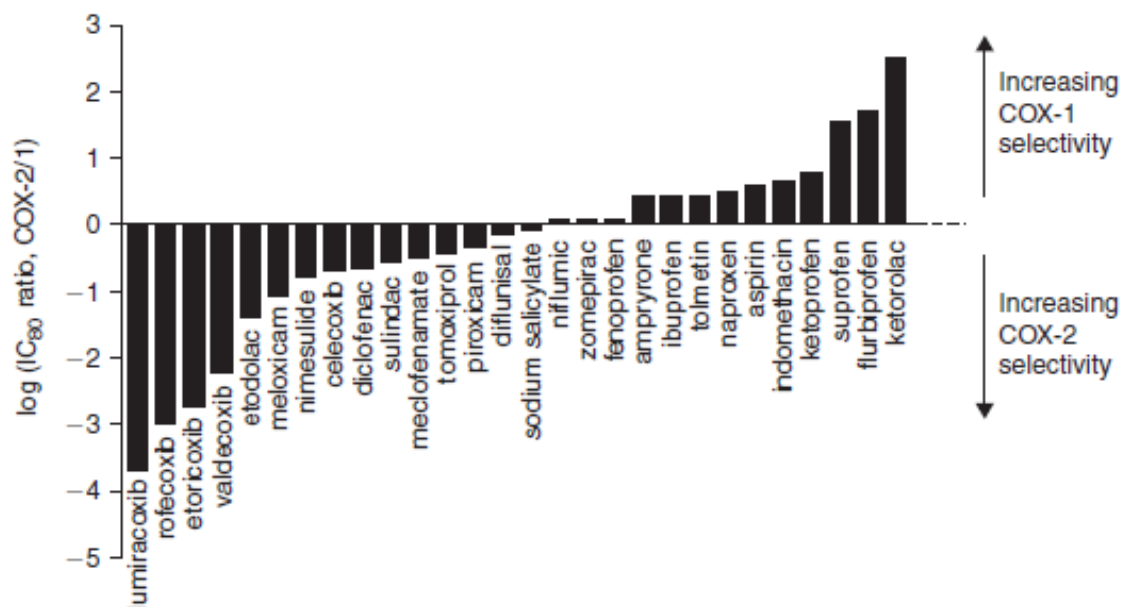
---

### **1.3 Inhibidores de la enzima cicloxigenasa - COX.**

---

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son comúnmente utilizados para controlar el dolor perioperatorio. El metamizol (dipirona) por ejemplo es un inhibidor selectivo de la COX con actividad y propiedades antiinflamatorias (AINEs) (Zannuzo y col. 2015). Vías adicionales sugieren que los inhibidores de la COX en general producen también analgesia a través de la acción directa del fármaco en el sistema nervioso central (Zannuzo y col. 2015). Los antiinflamatorios no esteroideos son un grupo de ácidos orgánicos débiles, con propiedades analgésicas, antiinflamatorias, y, la mayoría de ellos, también antipiréticas. El mecanismo de acción es complejo, y su acción analgésica varía en función del tipo de dolor y el fármaco estudiado. Actúan a nivel del sistema nervioso central sobre el hipotálamo y también inhibiendo periféricamente la síntesis de prostaglandinas (Gomez de Segura y col. 1998; Criado y col.

2003). Los inhibidores de la COX tienen diferentes selectividades por las diferentes isoenzimas descritas para la COX,



**Figura 1.** Selectividad relativa de los agentes inhibidores de la COX-1 y COX-2 humana representada como la relación del IC<sub>80</sub> de la concentración. Curvas del inhibidor para diferentes principios activos frente a la COX-1 y COX-2 se representaron en un ensayo de sangre entera modificada humana y utilizada para calcular la concentración IC<sub>80</sub>. Las relaciones de IC<sub>80</sub> se expresan logarítmicamente para que 0 represente la línea de la unidad, es decir, los compuestos de esta línea tienen actividad frente a la COX-1 y la COX-2. Los compuestos que aparecen encima de la línea son COX-1 selectivos y aquellos por debajo de la línea son más COX-2 selectivos. (Figura adaptada de Warner y Mitchell 2004 - Figura. 2, página 193).

Hay una escasez de estudios en los que se compare AINEs eficaces y seguros, y estos inhibidores de la COX con otros fármacos. Esta deficiencia ha hecho difícil determinar la utilidad clínica en ocasiones de los inhibidores de la COX durante el periodo intraoperatorio. Algunos AINEs se han estudiado en medicina veterinaria en combinación con opioides como por ejemplo en el caso del metamizol combinación con meloxicam para el alivio del dolor crónico en oncología canina.

La administración conjunta de dos AINEs o dos inhibidores de la COX diferentes pero en estrecha asociación temporal se ha contraindicado debido a los potenciales efectos adversos (Monteiro-Steagall et al., 2013). En el estudio de Zanneti y col. 2015, se observaron vómitos durante el período postoperatorio, efectos clínicos que podrían estar relacionados con la administración concomitante de metamizol-meloxicam, pero dado que en dicho estudio la frecuencia de vómitos fue casi la misma entre los diferentes tratamientos; las conclusiones no parecen claras y no se puede establecer una relación directa con el potencial adverso de la administración conjunta de metamizol con o sin meloxicam.

Las evidencias que apoyarían la existencia de un grado diferenciado de potenciación producida por los AINEs son las bien conocidas variaciones en la potencia analgésica y antiinflamatoria de los diferentes AINEs, pero otro argumento más reciente sugiere que la combinación de diferentes AINEs puede proporcionar ventajas terapéuticas. Se ha observado que la combinación del paracetamol con otros AINEs como ketoprofeno o diclofenaco puede potenciar la acción analgésica (Hyllested et al 2002). Ello sugiere que las combinaciones de AINEs también podrían ser útiles a la hora de ser combinadas con opioides y modificar igualmente la CAM durante la anestesia inhalatoria

Pocos estudios realizados hasta la actualidad del efecto reductor de la CAM de asociaciones de opioides y AINEs y la posible modulación de estos últimos según el fármaco considerado sugieren la necesidad de determinar la capacidad potenciadora analgésica relativa de los AINEs más comunes, especialmente aquellos que ya se emplean clínicamente durante el periodo perioperatorio.

#### 1.4.1 **Ketorolaco.**

El ketorolaco es farmacológicamente similar a la aspirina, excepto que interfiere de forma irreversible con la función plaquetaria. Se ha descrito que en pacientes que sufren dolor crónico, la incidencia de efectos secundarios gastrointestinales adversos es ligeramente superior con ketorolaco que con la aspirina. El ketorolaco se absorbe fácilmente tras la administración oral o intramuscular y se une fuertemente a las proteínas plasmáticas (99%). En los seres humanos, la mayor parte del ketorolaco administrado se excreta por orina y puede estar acompañado de toxicidad renal si se administra en dosis repetidas. Se ha demostrado que el ketorolaco reduce la prostaglandina E2 y proporciona alivio del dolor perioperatorio y postoperatorio durante al menos 6 horas en ratas (Kroin y col. 2006). Sin embargo, el ketorolaco es el único AINE inyectable en países como USA, a pesar de que está prohibido en muchos países europeos debido a las preocupaciones acerca de sangrado y úlceras estomacales quirúrgicas después de la cirugía.

#### 1.4.2 **Ketoprofeno.**

El ketoprofeno inhibe tanto la COX-1 y COX-2, teniendo una mayor selectividad para la COX-1 que el ibuprofeno en perros (Streppa y col. 2002). Los metabolitos de ketoprofeno también han mostrado tener actividad frente a la COX-1 y COX-2, y la selectividad de los metabolitos es mayor para la COX-2 que el fármaco original (Levain y col. 2004). Se ha descrito que puede haber actividad que no está mediada por la inhibición de la COX. Por ejemplo, se ha indicado que el R-enantiómero de ketoprofeno no tiene ninguna actividad inhibidora de la COX, pero se ha demostrado que tienen actividad antinociceptiva en medicina humana (Cooper y col. 1998). Algunos de los efectos analgésicos del ketoprofeno pueden ser mediados por mecanismos serotoninérgicos y noradrenérgicos a nivel supraespinal y espinal (Díaz-Reval y col, 2004; Pinardi y col. 2001).

#### 1.4.3 **Metamizol.**

Metamizol (dipirona) es uno de los fármacos analgésicos más comúnmente empleados en Europa y América Latina. Este medicamento tiene débiles acciones antihiperémicas y antiinflamatorias, con baja toxicidad gastrointestinal, lo que sugiere un modo alternativo de acción en comparación con el resto de inhibidores de la COX y AINEs (Pierre y col. 2007) más comúnmente utilizado. Este fármaco es un inhibidor débil de las isoformas de la ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, pero parece ser más potente sobre la COX-3 (Rezende y col. 2008; Tortorici y col. 2009). El metamizol también puede actuar a través de sistemas cannabinoides (Escobar y col. 2012) y sistemas opiérgicos (Tortorici y col. 2009; Hernández Delgadillo y col. 2006). Este último efecto podría conducir a producir tolerancia aguda a los opioides (TAO) (Tortorici y col. 2006). Por

otra parte se ha descrito en medicina humana, que la administración de un AINE como el metamizol de forma repetida, puede conducir progresivamente a producir tolerancia, tolerancia cruzada a la morfina, y un mayor riesgo de síndrome de abstinencia en personas (Tsagareli y col. 2011).

Metamizol se da comúnmente para dolor postoperatorio (Edwards y col. 2008) y se puede administrar para reducir el dolor preoperatorio y el consumo de opiáceos postoperatorios (Ohnesorge y col. 2009; Caliskan y col. 2013; Steffen y col. 2002).

Se ha utilizado en combinación con otros AINEs tales como el ketoprofeno (Shug y col. 2012) o con otros fármacos opioides (López-Muñoz y col. 2008; Baumgartner y col. 2009). Sin embargo, la eficacia disminuida de la administración repetida del metamizol (Tsagareli y col. 2011), también puede modificar los requisitos de anestésicos inhalatorios.

#### **1.4.4 Parecoxib.**

El parecoxib es un profármaco del valdecoxib, otro inhibidor selectivo COX2, que es soluble en agua y que se suministra en formulaciones inyectables. El parecoxib es un inhibidor selectivo de la COX2 en la misma categoría que celecoxib y el rofecoxib, que se comercializa en la Unión Europea. Como se ha formulado de manera inyectable, se puede utilizar durante el período perioperatorio cuando los pacientes no pueden tomar otros inhibidores de la COX de manera oral. Se utiliza para el control del dolor perioperatorio de la misma manera que el ketorolaco. Sin embargo, a diferencia de ketorolaco, el parecoxib no tiene ningún efecto sobre la función plaquetaria y por lo tanto no promueve sangrado durante o después procedimientos quirúrgicos. Además,

el ketorolaco tiene un perfil de toxicidad gastrointestinal mucho mayor en comparación con la mayoría de los otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

#### 1.4.5 Paracetamol.

El paracetamol (acetaminofen) es uno de los analgésicos no opioides más utilizados, y su uso incluye el periodo perioperatorio más a menudo y en comparación con los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El paracetamol posee una actividad antiinflamatoria muy baja pero un efecto analgésico potente con un riesgo mínimo asociado de hemorragias en pacientes con trombocitopenia. Además tiene una reducida capacidad de producir efectos secundarios gastrointestinales. El mecanismo de acción del paracetamol aún no está claro, pero se han identificado mecanismos periféricos y centrales. El paracetamol se identificó inicialmente como un inhibidor de la isoenzima COX-3 aunque tiene propiedades inhibitoras de la COX-2 que han sido propuestas también. Otros mecanismos de acción para explicar sus acciones incluyen las interacciones con sistemas de opiérgicos, sistemas de eicosanoides, y rutas relacionadas con el óxido nítrico. Además se ha propuesto que la señalización endocanabinoide puede desempeñar un papel en la activación del paracetamol en las rutas inhibitorias serotoninérgicas descendentes.

Debido a las características únicas del paracetamol, un enfoque clínico ha sido combinar este fármaco con los inhibidores de la COX tradicionales (AINEs) para aumentar la eficacia del fármaco en escenarios que cursan con dolor agudo perioperatorio. Sin embargo, los estudios que se centren en el período intraoperatorio son escasos. En modelos animales usando la prueba de constricción abdominal ácido acético de los ratones (ensayo de retorcimiento), el paracetamol produjo una acción

analgésica sinérgica cuando se combinaba con AINEs. Otro ensayo clínico controlado con la combinación de parecoxib y paracetamol en pacientes sometidos a cirugía de tiroides no pudo demostrar ninguna ventaja de la combinación sobre los efectos de ambos medicamentos individuales en términos de consumo de opioides durante el periodo postoperatorio. Aunque el efecto reductor del consumo de opioides postoperatorio sigue siendo controvertido para el paracetamol, este fármaco es frecuentemente combinado con opioides potentes como el remifentanilo en el período intraoperatorio.

---

#### 1.4 Analgésicos opiáceos.

---

Los analgésicos opioides son actualmente los fármacos analgésicos más empleados para el tratamiento del dolor severo a moderado en medicina humana y veterinaria. Los analgésicos agonistas opioides como la morfina, o el fentanilo, o el remifentanilo proporcionan analgesia (o hipoalgesia) mediante su unión a los receptores opioides pero a su vez activan otras vías que conllevan paradójicamente a un aumento en la sensibilidad del dolor en el paciente y una disminución del efecto de esta terapia analgésica a lo largo del tiempo.

Interesantemente y como se ha descrito en nuestro grupo en modelos de la CAM en ratas, presentan el inconveniente de desarrollar efectos de tolerancia (TAO) e hiperalgesia inducida por opioides. El desarrollo de estos fenómenos de hiperalgesia y tolerancia están implicados muchos de los mecanismos y vías de la sensibilización periférica y central.

#### 1.4.1 Remifentanilo.

El remifentanilo, opioide utilizado en este estudio es un opioide considerado agonista opioide puro. El remifentanilo tiene una alta potencia y una corta duración, y se caracteriza por una recuperación de su efecto muy rápida, que es independiente de la dosis o del tiempo que hayamos mantenido la infusión continua. Se ha sugerido en muchas ocasiones que se inicie el tratamiento analgésico intraoperatorio con otro fármaco opioide antes de comenzar la infusión de remifentanilo así como la administración al final de la infusión de otro fármaco opiáceo para evitar la aparición brusca de dolor postoperatorio (Angst y col. 2006) otros opioides potentes, por ejemplo fentanilo, el remifentanilo reduce de forma importante los requerimientos de anestésicos inhalatorios (Yoo y col. 2011) Esta reducción dosis dependiente de la CAM de anestésico inhalatorios ha sido descrita en ratas ampliamente (Criado y col. 2003; Gómez de Segura y col. 2009), perros (Monteiro y col. 2010) y gatos (Brosnan y col. 2009).

Interesantemente, tras la introducción del remifentanilo para uso intraoperatorio, se han descrito efectos de tolerancia aguda, así como de hiperalgesia postoperatoria, caracterizada por un incremento del dolor y de las necesidades postoperatorias de morfina (Guignard y col 2000). Otro aspecto importante cuando se utilizan dosis altas de opioides es que la tolerancia aguda (TAO) aparece temporalmente antes cuando se emplean opioides de corta duración de acción (Kissing y col. 1996). Efectos de hiperalgesia relacionados con el uso del remifentanilo han sido descritos ya en ratones (Cabañero y col. 2009; Campillo y col. 2011) y en medicina humana personas (Troster y col. 2006), pudiendo ser prolongada; un único tratamiento con remifentanilo produjo un efecto hiperalgésico de hasta 10 días en ratones (Cabañero y col. 2009).

---

### 1.5 Anestesia Inhalatoria: fármacos.

---

Durante más de 165 años, los anestésicos inhalatorios han jugado un papel central en la práctica anestésica. Ahora en medicina veterinaria son relativamente baratos, cómodos de usar, y tienen efectos secundarios terapéuticos y predecibles. Los primeros artículos o citas sobre la utilización de anestésicos inhalatorios como el éter (1846), cloroformo (1847), y el óxido nitroso (1844) comenzaron a surgir en la década de 1840. Los problemas de seguridad con agentes en aquellas épocas, especialmente cloroformo, fueron identificados rápidamente y comenzó la búsqueda de mejores agentes de inhalación mediante éteres e hidrocarburos fluorados que se convirtieron a partir de entonces en el foco principal de la investigación y el desarrollo en el campo de la anestesia inhalatoria. Desde entonces el halotano y el enflurano fueron de uso común en medicina humana y después en veterinaria, pero se fueron sustituyendo en los últimos 20-30 años. Los agentes inhalatorios utilizados en la práctica moderna incluyen éteres fluorados como el isoflurano, el sevoflurano y desflurano, y el gas óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) principalmente en medicina humana. El gas noble xenón tiene impresionantes propiedades anestésicas, pero los costos de producción actuales impiden su uso generalizado como ya ocurrió en el pasado con otros agentes inhalatorios. Estos agentes anestésico inhalatorios modernos han mejorado en gran medida la seguridad, la fiabilidad y aplicabilidad de la anestesia general (Campagna y col. 2003; Khan y col. 2003)

El mantenimiento de la anestesia general se realiza actualmente principalmente mediante anestésicos inhalatorios, aunque TIVA (*Total Intravenous Anesthesia*- Anestesia Total Intravenosa) y PIVA (*Partial Intravenous Anesthesia* – Anestesia Parcial Intravenosa) puedan ser utilizados para ciertos tipos de

procedimientos. Los anestésicos inhalatorios proporcionan cambios más rápidos de la profundidad anestésica que los anestésicos inyectables, y la reversión de la depresión nerviosa central se logra más fácilmente, lo que explica su uso en anestesias prolongadas (menos riesgo de sobredosis, menor acumulación y recuperaciones más rápidas) (véase el Tabla 1) (Ishizawa y col. 2011; Campagna y col. 2003; Khan y col. 2003).

**Tabla 1.** Comparación clásica entre anestésicos inhalatorios e inyectables (Adaptada de Steffey y col. 2015).

<b>Fármacos Inhalatorios</b>	<b>Fármacos Inyectables</b>
Equipo costoso	Barato (agujas y jeringas)
Necesidad de vía aérea y alta de O <sub>2</sub>	No necesariamente vía aérea
Mejor control de la profundidad de la anestesia	Una vez dado, sufrir las consecuencias
Facilidad de eliminación (ventilación)	Sólo a través del metabolismo y excreción
Contaminación	Sin contaminación

Los anestésicos inhalatorios utilizados más comúnmente en veterinaria incluyen líquidos volátiles como el isoflurano y el sevoflurano, en menor medida el halotano (el halotano se ha dejado de utilizar en Europa y Norteamérica) y el desflurano; y gases inorgánicos como el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). Excepto el N<sub>2</sub>O, los anestésicos volátiles inhalatorios son químicamente “hidrocarburos halogenados” y todos están estrechamente relacionados en su estructura. Las características físicas de los anestésicos inhalatorios van a redundar en sus efectos clínicos finales y en la practicidad o no asociada con su uso en cada caso. Algunas de estas características pueden verse recopiladas en la Tabla 2. Los anestésicos inhalatorios se administran

en forma de vapor o gas después de su evaporización en dispositivos conocidos como “vaporizadores” (Campagna y col. 2003; Khan y col. 2003).

**Tabla 2.** Características físicas de algunos fármacos anestésicos inhalatorios. \*El valor de % de la CAM corresponde a medicina humana (Tabla adaptada de Aranake y col. 2013).

Fármaco	Coficiente (CP) Sangre/gas	Coficiente (CP) Grasa/gas	Temperatura de vapor (°C)	* %CAM
Óxido nitroso	0,47	1,4	-89	105
Ciclopropano	0,55	11,5	-34	9,2
<b>Halotano</b>	<b>2,4</b>	<b>220</b>	<b>50,2</b>	<b>0,75</b>
Metoxifluorano	11,0	950	104,7	0,2
Enfluorano	1,9	98	56,5	1,68
<b>Isofluorano</b>	<b>1,4</b>	<b>97</b>	<b>48,5</b>	<b>1,15</b>
<b>Sevofluorano</b>	<b>0,6</b>	<b>53</b>	<b>58,5</b>	<b>2,5</b>
<b>Desfluorano</b>	<b>0,42</b>	<b>18,7</b>	<b>25</b>	<b>5,72</b>
Dietil eter	12	65	34,6	1,92
Cloroformo	8	400	61,2	0,77
Tricloroetileno	9	714	86,7	0,23

### 1.5.1 Selección del fármaco.

Las propiedades ideales de un anestésico inhalatorio son en general, que sean lo menor inflamables o explosivos posibles, no ser tóxicos, ser seguros con un absorbente de CO<sub>2</sub>, potentes, agradables cuando se inhalan, con un metabolismo mínimo, con una solubilidad del gas baja en la sangre, la mejor analgesia posible,

buena vida útil, mínima depresión en los diferentes órganos donde puedan interactuar, y baratos (Campagna y col. 2003; Khan y col. 2003).

### 1.5.2 Aspectos prácticos de la utilización de anestésicos inhalatorios.

**La concentración alveolar mínima (CAM): Potencia anestésica** (Ver en sección 1.6).

**El coeficiente de partición:** se define como la relación de la cantidad de sustancia (por ejemplo, agentes anestésicos inhalatorios) presente en un determinado tipo de fase o compartimento (grasa, sangre, etc.) en comparación con otra fase o compartimento (del mismo gas anestésico), siendo las dos fases o compartimentos de igual volumen y estando en equilibrio. Por ejemplo, un coeficiente de partición de sangre: gas de 0,5 significaría la concentración de agente inhalatorio en la sangre es la mitad que la existente en el gas alveolar cuando la presión parcial del anestésico es idéntica en ambos sitios. Este coeficiente de partición en un anestésico por inhalación es la forma más comúnmente utilizada para referirse a su solubilidad en un disolvente dado (por ejemplo, grasa, sangre, etc.).

Un anestésico muy potente (por ejemplo, metoxifluorano) tiene un valor bajo de CAM y un coeficiente de partición alto grasa / gas, mientras que un agente anestésico de baja potencia (por ejemplo, N<sub>2</sub>O) tiene una CAM alta y un bajo coeficiente de partición grasa/gas. En otras palabras, un anestésico con una alta solubilidad en grasa (es decir, alto coeficiente de partición grasa/gas) es eficaz a una concentración alveolar baja y tiene por tanto una alta potencia.

A medida que los niveles de gas anestésico en sangre son más difíciles de medir, se acepta generalmente que los niveles finales corrientes (“end-tidal”) espirados

de los anestésicos inhalatorios (etAA) se corresponden con los valores a nivel alveolar y, por tanto, a las tensiones de gas anestésico en sangre. La potencia de un agente anestésico inhalado está inversamente relacionada con CAM es decir, menor valor de CAM mayor potencia. El valor de la CAM también está inversamente relacionado con el coeficiente de partición grasa / gas.

Las dosis de anestésico comúnmente se definen en términos de múltiplos de CAM (es decir, por ejemplo 1,5 x CAM). La profundidad quirúrgica se logra por lo general en el 1,2 a 1,5 veces de los valores de CAM. En una sola especie la variación de los valores de CAM son generalmente pequeños e incluso entre las especies la variación no suele ser muy grande.

### 1.5.3 Mecanismos de acción farmacológica de los agentes inhalatorios.

El mecanismo por el cual los anestésicos inhalatorios producen una depresión del SNC no se conoce completa y claramente. Sin embargo, la mayoría de la evidencia publicada hasta el momento es cada vez más consistente, y parece ser que la teoría más aceptada es la de la inhibición de la transmisión sináptica a través de vías polisinápticas multineuronales, específicamente en el sistema de activación reticular. Los mecanismos de acción de los anestésicos inhalatorios pueden subclasificarse a tres niveles: macroscópico (cerebro y médula espinal), microscópico (sinapsis y axones) y molecular (membranas pre y postsinápticas).

**Absorción y eliminación de agentes anestésicos inhalatorios:** La comprensión de estos conceptos farmacológicos, como son la absorción y la eliminación de un anestésico inhalatorio, son necesarios para el correcto uso de este tipo de anestésicos

y posteriormente mejora en la seguridad de nuestros pacientes domésticos.

**Curvas de presión parcial alveolar y su relación con la absorción:** La presión parcial alveolar ( $P_A$ ) de un anestésico inhalatorio está en equilibrio con la presión en sangre arterial ( $P_a$ ) y la presión parcial en cerebro ( $P_{BR}$ ) del anestésico. Como resultado, la  $P_A$  es una medida indirecta de la presión parcial de anestésico en el cerebro;  $P_A \approx P_a \approx P_{BR}$ . Kety describió las curvas de presión parcial alveolar para todos los gases inertes tenían las mismas características (se considera que los anestésicos inhalatorios se comportan en el cuerpo en forma de gases inertes).

Las curvas de presión parcial alveolar tienen tres etapas distintas: un aumento inicial, una etapa de acodamiento o inflexión (“the knee”) y una etapa de estabilización (“the tail”). El aumento inicial representa una pendiente empinada, donde la ventilación mueve el agente rápidamente hacia los pulmones. Después de esto, la etapa de la inflexión se produce cuando el agente comienza a reducir su velocidad de absorción. Las pendientes de la zona de inflexión están determinadas por la tasa de absorción en los tejidos ricos en vasos sanguíneos (corazón, cerebro, hígado, etc.) y que reciben más del 70% del gasto cardiaco. Las pendientes de estabilización son determinados por la velocidad de absorción de gas en los músculos y la grasa (con relativamente pobre suministro de sangre), y que continúa durante un largo tiempo, especialmente si el anestésico tiene un alto coeficiente de partición grasa:gas.

**Eliminación:** La eliminación de anestésicos inhalatorios o recuperación de la anestesia general se produce por la eliminación del fármaco desde el cerebro. Este proceso es simplemente la reversión (lavado o “wash out” en inglés) de la absorción de anestésico por lo que los factores que afectan a la recuperación son los mismos

que aquellos para la inducción anestésica. En el equilibrio la concentración alveolar de anestésicos inhalatorios va a reflejar la cantidad de anestésico inhalatorio en el cerebro.

**Tabla 3.** Factores que regulan la concentración alveolar del gas inhalatorio.

Factores (con el aumento)	Concentración alveolar
Concentración inspirado	↑
Ventilación alveolar	↑
Solubilidad de inhalante en sangre y tejidos	↓
Gasto cardíaco	↓
Capacidad tisular y flujo sanguíneo a los tejidos	↓

#### 1.5.4 Fármacos inhalatorios.

**Algunas consideraciones clínicas:** El uso de anestésicos inhalatorios permite cirugías y procedimientos de diagnóstico prolongados de una manera segura y eficiente. Los anestésicos inhalatorios se utilizan en combinación con premedicación inyectables, agentes de inducción y analgésicos auxiliares. También se utilizan durante el mantenimiento con muchos otros fármacos y en concreto a la técnica en la que utilizamos un hipnótico inhalatorio, un analgésico opiáceo y un bloqueante neuromuscular la conocemos como técnica anestésica equilibrada. La depresión cardiorrespiratoria se puede claramente anticipar con los anestésicos inhalatorios potentes más modernos. El grado de depresión cardiorrespiratoria dependerá de las dosis y el estado de salud del paciente, y la administración prudente de los anestésicos inhalatorios asegurará un anestesia general segura.

**Tipos de anestésicos inhalatorios:**

**a. Agentes de uso habitual actual:** Isoflurano y sevoflurano.

**b. Agentes que ya no están en uso actual de manera regular:** Óxido nítrico, halotano, enflurano, ciclopropano, metoxiflurano, cloroformo, tricloroetileno y éter.

**c. Agentes de futuro pero con experiencia veterinaria limitada hasta la fecha:**  
Desflurano y xenón.

**1.5.5 Sevoflurano**

El sevoflurano es un gas anestésico potente que está disponible para la anestesia en animales y en medicina humana. Al igual que el isoflurano, es un derivado del metoxiflurano y comparte algunas características comunes con el isoflurano; sin embargo, sevoflurano es farmacocinéticamente diferente de isoflurano, halotano o metoxiflurano, debido a su menor solubilidad en la sangre. Esto se traduce en un equilibrio muy rápido, permitiendo cambios precisos y rápidos en profundidad de la anestesia (Steffey y col. 2015). La principal ventaja del sevoflurano es su rápida inducción y recuperación. El equilibrio y la eliminación más rápidos son útiles en la investigación con animales, cuando se requiere una rápida recuperación de la anestesia general. En comparación con el isoflurano, la rapidez de los efectos será más notable en los animales de gran tamaño, como por ejemplo en los cerdos, caballos, y ganado adulto en general. Los efectos cardiovasculares y respiratorios del sevoflurano son similares a los de isoflurano (Steffey y col. 2015). El aumento de la profundidad anestésica produce una reducción progresiva de la presión arterial y el volumen corriente (Steffey y col. 2015).

El sevofluorano se metaboliza únicamente en una pequeña cantidad, aproximadamente el 2%. La degradación de sevofluorano en presencia de cal sodada ha puesto en evidencia ciertas consideraciones relacionadas con la toxicidad potencial de los Metabolitos de degradación del sevofluorano. Dos productos de degradación se han identificado, uno el  $\text{CF}_2\text{-C}(\text{CF}_3)\text{-O-CH}_2\text{F}$  (una olefina denominada compuesto A) y el segundo el  $\text{CH}_3\text{-O-CF}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{-O-CH}_2\text{F}$  (compuesto B). Sólo el compuesto A se produce en cantidades significativas. Uno de los tipos captadores de  $\text{CO}_2$  en las máquinas de anestesia, el "baralyne" (hidróxido de calcio e hidróxido de bario), que se compone de hidróxido de potasio en mayores cantidades que la cal sodada, produce concentraciones significativamente más altas de compuesto A (Delgado-Herrera y col. 2003). La mayor preocupación está asociada con las técnicas de anestesia de bajos flujos en donde un aumento en el tiempo de contacto y la temperatura de los absorbentes de  $\text{CO}_2$  produce una mayor degradación del anestésico. Algunos estudios han demostrado que la nefrotoxicidad o hepatotoxicidad clínicamente detectable no se produce con la administración de anestesia normal (Bito y Ikeda, 1994; Frink et al., 1994), pero en cualquier caso se han recomendado flujos superiores a  $20 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  en la administración de sevofluorano. A diferencia de desfluorano, el sevofluorano se puede utilizar con los métodos convencionales de vaporización. El olor suave y rápido inicial del sevofluorano se asocian con menos dificultades en algunos animales durante inducción con mascarilla o con cámara de inducciones. Vaporizadores- específicos de sevofluorano deben ser utilizados para suministrar el sevofluorano debido a su presión de vaporización único.

Mejores anestésicos y analgésicos, sin duda, deben ser identificados para conocer cómo funcionan a nivel molecular cuando se administran en combinación con anestésicos inhalatorios. El desarrollo de anestésicos sin efectos secundarios no deseados

deberían siempre conocer e identificar estos sitios moleculares de acción de los agentes inhalatorios y de los agentes inhalatorios en combinación con otros fármacos.

---

## 1.6 Concentración Alveolar Mínima (CAM).

---

Durante más de 165 años, como ya hemos dicho anteriormente, los anestésicos inhalatorios han jugado un papel central en la práctica anestésica. Hoy en día, la medición de las concentraciones anestésicas finales corrientes o concentraciones al final de la expiración (*end-tidal concentrations* en inglés) ofrecen información en tiempo real, y facilitan el control de la dosis objetivo del agente anestésico inhalatorio. Desde 1840 hasta la década de 1960, la introducción de nuevos agentes inhalatorios puso de relieve la necesidad de métodos para medir y comparar potencias entre anestésicos y para determinar las dosis más adecuadas. Los primeros métodos propuestos para evaluar la profundidad de la anestesia inhalatoria se basaron en observaciones clínicas principalmente. De esta manera, durante los años 40, Robbins definió el concepto de la AD<sub>50</sub> (*anaesthetic dose 50*, dosis anestésica 50), como la concentración de anestésico a la cual el 50% de los pacientes no podrían mantenerse en pie durante. Realizó estos estudios en ratones, y definió la AD<sub>50</sub> como la concentración de anestésico a la cual el 50% de los ratones no podrían mantenerse en pie durante al menos 15 segundos cuando eran colocados en una rueda giratoria con una concentración conocida de anestésico. Robbins, también definió el concepto de LD<sub>50</sub> (*lethal dose 50*, dosis letal 50), como la concentración de anestésico que causaba apnea en el 50% de los ratones en 10 minutos y consideró que el cociente LD<sub>50</sub>/AD<sub>50</sub> podría servir como un índice de seguridad. Otro investigador, Guedel, definió las etapas de la anestesia general inhalatoria sobre la base de las alteraciones en la respiración, el tono

muscular, el diámetro de la pupila, el lagrimeo y el reflejo de los párpados. Los métodos de Guedel eran signos establecidos para la anestesia con éter, intentando una correlación entre la actividad electroencefalográfica con los niveles de anestésico, o la división de anestesia en etapas, como hemos comentado previamente, diferenciando los conceptos de analgesia, bloqueo neuromuscular, hipnosis y bloqueo de los reflejos autonómicos previamente establecida por Woodbridge. En el concepto de Woodbridge conocido como "nothria" (un término destinado a caracterizar la inactividad mental y motora junto con la insensibilidad), la profundidad de la anestesia se evaluó clínicamente de acuerdo a los cambios en la sensibilidad, el movimiento, los reflejos y la pérdida de consciencia. Sin embargo, estas observaciones clínicas y evaluaciones cualitativas pueden variar con los diferentes anestésicos inhalatorios utilizados y con su uso en diferentes pacientes, lo que limita su utilidad clínica.

En el año 1963, Merkel y Eger (Merkel y col. 1963) describieron un índice de comparación entre agentes anestésicos. y en 1965 (Eger y col. 1965), introdujeron el concepto de concentración alveolar mínima (CAM), la concentración relativa o la presión parcial de los anestésicos inhalatorios en un único punto final clínicamente relevante durante la anestesia general: la inmovilidad en respuesta a un estímulo quirúrgico. Definieron la CAM como la concentración de anestésico necesaria para prevenir, en un estudio en perros, un movimiento muscular evidente y voluntario en respuesta a un estímulo doloroso. La dosis de anestésico podía entonces ser expresada como múltiplos de la CAM, por ejemplo 1xCAM. Posteriormente en 1964, el mismo Eger junto con Saidman (Saidman y col. 1964) definieron la CAM para el hombre como la concentración a la cual el 50% de los pacientes responden (se mueven) en respuesta a una incisión quirúrgica. Desde su introducción en 1965, la concentración alveolar mínima

(CAM) ha servido como una medida estándar de la potencia de los anestésicos inhalatorios.

### 1.6.1 Definición de CAM.

La concentración alveolar mínima se define como la concentración alveolar mínima de anestésico inhalado en el que 50% de las personas o animales no se mueven en respuesta a un estímulo nociceptivo. En los últimos 20 años, se ha descubierto que los anestésicos inhalatorios inhiben la movilidad en gran medida a través de su acción en la médula espinal, mientras que los efectos amnésicos e hipnóticos están mediados por su acción en el cerebro. Los estudios más recientes sugieren que la concentración de anestésico inhalatorio necesaria para evitar el desarrollo de la memoria explícita, y para producir inconsciencia, es generalmente sustancialmente menor que la concentración requerida para evitar el movimiento en respuesta a la cirugía. Durante esta sección se tratara de destacar los aportes y limitaciones del concepto CAM y sus derivados, como métricas de potencia anestésica con respecto a determinados resultados conductuales. Las evidencias científicas más recientes en medicina humana, sugieren que durante cualquier anestesia general con fármacos inhalatorios, los anestesiistas deberían ponerse en alerta cuando los valores de CAM caen por debajo del rango 0,5-0,7, produciéndose un potencial descenso de la alerta intraoperatoria del paciente con un recuerdo claro y explícito de lo que sucede, y posiblemente de manera similar a protocolos de alerta basados en electroencefalografía.

Sinónimos del concepto de CAM incluyen: "EC50 para la inmovilidad", "MAC-movimiento", "presión parcial alveolar mínima (50% inmovilidad)" y "concentración alveolar media (por la inmovilidad)".

### 1.6.2 CAM y potencia anestésica.

El término "potencia" se refiere a la cantidad de anestésico inhalatorio que debe ser administrado para obtener el efecto que vamos buscando, como por ejemplo el nivel de mantenimiento durante una anestesia general, y como ya hemos indicado el índice estándar más famoso aún utilizado para los anestésicos inhalatorios es el de la concentración alveolar mínima (CAM).

La CAM se define como la concentración alveolar mínima de anestésico que impide o evita el movimiento motor en la mitad de los animales (50%) en una prueba o test y siempre en respuesta a un estímulo nociceptivo (no necesariamente doloroso) pero si supramáximo. Este valor de CAM se suele expresar en forma de porcentaje (%), pero esto implica que la medición se realiza a una presión atmosférica normal a nivel del mar y si no es así debemos recalcular siempre el valor de la CAM:

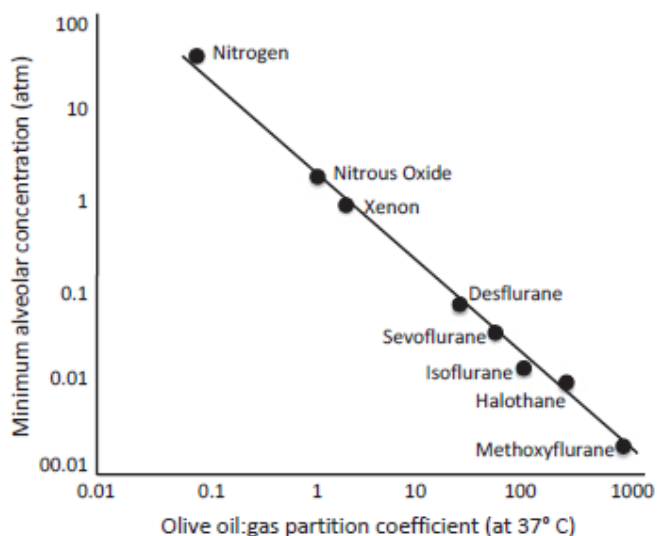
Por ejemplo, si medimos la CAM en una ciudad como Madrid, que se encuentra a unos 700 metros sobre el nivel del mar, deberíamos hacer la siguiente corrección:

$(\%) \text{ CAM}_{\text{a la presión barométrica a nivel del mar (760 mm Hg - altitud ajustada CAM)}} =$ $(\%) \text{ CAM}_{\text{medida}} \times \text{presión barométrica ambiente a la que se midió la CAM (700 mm Hg en Madrid = 650 metros altura)} / \text{presión barométrica a nivel del mar (760 mm Hg)}.$
--

**Tabla 4.** Valores de CAM más aceptados en las principales especies de animales en comparación con los valores aceptados en personas.

<b>Fármaco</b>	<b>Perros</b>	<b>Gatos</b>	<b>Caballos</b>	<b>Personas</b>
<b>Metoxifluorano</b>	0,23 %	0,23 %	0,28 %	0,16 %
<b>Halotano</b>	0,87 %	0,82 %	0,88 %	0,74 %
<b>Isoflurano</b>	1,28 %	1,63 %	1,31 %	1,15 %
<b>Sevofluorano</b>	2,1-2,36%	2,58%	2,36%	1,7%
<b>Desfluorano</b>	7,2%	9,8%	7,6%	5,72 %
<b>Óxido nitroso</b>	188 %	255 %	205%	105 %

Como hemos comentado en la parte de farmacología de anestésicos inhalatorios, a medida que los niveles de gas anestésico en sangre son más difíciles de medir, los niveles “end-tidal” expiratorios de los anestésicos inhalatorios, son aceptados generalmente como los valores a nivel alveolar y, por tanto, a las tensiones de gas anestésico en sangre. La potencia de un agente anestésico inhalado está inversamente relacionada con el valor de CAM es decir, menor valor de CAM mayor potencia. El valor de la CAM también está inversamente relacionado con el coeficiente de partición grasa / gas (CP).



**Figura 2.** Relación entre el CAM (escala logarítmica) y coeficiente de partición de grasa:gas ( $k$ ; escala logarítmica). La figura ilustra que para los agentes anestésicos inhalatorios comúnmente o no utilizados, el producto de CAM y  $k$  es una constante. En general, la disminución de la solubilidad se asocia con una disminución de la potencia, el aumento del valor CAM y un más rápido inicio de acción. (Figura de Aranake y col. 2013).

### 1.6.3 Conceptos derivados de la CAM.

En un esfuerzo por desarrollar una expresión estándar para la concentración de anestésico en el que la consciencia se podría recuperar durante el procedimiento anestésico, se han desarrollado otras medidas de CAM, derivadas del concepto inicial de la CAM. Y así tenemos:

**1. CAM-awake:** Stoelting y colaboradores, introdujeron el concepto de “CAM-awake” (despierto). Una respuesta voluntaria apropiada (por ejemplo apertura de ojos o nistagmo en animales) en respuesta a una orden verbal se consideró una respuesta

positiva que indicaba la presencia de consciencia. A continuación, MAC-awake se definió como la concentración del anestésico necesaria para suprimir una respuesta voluntaria a una orden verbal en el 50% de los pacientes. Se determinó el promedio de las concentraciones de anestésicos en participantes en la investigación que permitían o no una respuesta positiva durante la recuperación de la anestesia general. Mientras que la proporción de CAM-awake y valor CAM habitual varía considerablemente entre los diferentes agentes inhalatorios, y que es comparable a la CAM utilizada en anestésicos inhalatorios como isofluorano, sevofluorano y desfluorano. En la Tabla 2 se reflejan estas variaciones para personas:

**Tabla 5.** Los valores mínimos de concentración alveolar (CAM) y CAM-awake para agentes anestésicos inhalados comúnmente utilizados para una persona (hombre) de 40 años de edad.

Anestésico	*CAM	*CAM <sub>awake</sub>	*CAM <sub>awake</sub> /CAM
Halotano	0,76	0,41	0,55
Isoflurano	1,15	0,49	0,38
Sevofluorano	2	0,62	0,34
Desfluorano	6	2,5	0,34
Óxido nitroso	105	68	0,64

*\*Valores expresados como porcentaje a 1 atmosfera.*

**2. CAM-amnesia (recuerdo):** En anestesia humana, la concentración anestésica necesaria para suprimir el recuerdo ante un estímulo nociceptivo en el 50% de los pacientes es lo que se ha denominado CAM-amnesia, y es un valor teóricamente importante tanto para los pacientes como para los profesionales anestesistas. Los estudios han demostrado que la concentración alveolar de los anestésicos inhalatorios

en los cuales se logra amnesia o falta de recuerdo es inferior al valor CAM; sin embargo, es probable que haya más variabilidad entre pacientes para la CAM-amnesia que para la CAM habitual medida por estímulos supramáximos. Además, los estudios experimentales en humanos y animales, sugieren que la concentración requerida para prevenir recuerdo explícito varía sustancialmente entre los agentes anestésicos volátiles.

**3. CAM-BAR.** Otro valor CAM derivado del concepto de la CAM original de estímulo supramáximo es la concentración alveolar mínima de anestésico inhalatorio que bloquea las respuestas autónomas a la incisión quirúrgica en el 50% de los pacientes (MAC-BAR). Las respuestas autonómicas comúnmente utilizadas para definir y calcular el valor de MAC-BAR son los cambios en la dilatación de la pupila, la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial (PAS, PAM, PAD). Pero el bloqueo autonómico se puede lograr en diverso grados; por lo tanto, MAC-BAR parece una estimación más que un valor exacto.

**4. Otros valores CAM derivados:** Otras medidas derivadas del valor CAM, tales como CAM para la estimulación de la tráquea, o reflejo de dilatación pupilar, también se han investigado. Sin embargo tienen las mismas limitaciones que CAM-BAR en relación a la precisión de la medida de resultado.

#### 1.6.4 Cálculo de la CAM.

Experimentalmente la determinación del valor de la CAM se realiza mediante la toma de una muestra de gas intratraqueal para poder medir las concentraciones de gases anestésicos a ése nivel anatómico. El extremo proximal del catéter que se ha introdu-

cido por el tubo endotraqueal hasta el nivel distal del tubo o punta del tubo endotraqueal, y se conecta al monitor para la medición de  $\text{CO}_2$  y las concentraciones de anestésico inhalatorio expirado. La concentración anestésica expirada se ajusta inicialmente al valor teórico esperado del agente inhalatorio (por ejemplo, sevoflurano 2,4 %vol.) en volumen antes de la primera determinación del valor de CAM. Entre valor y valor se dejan al menos 10-15 min para permitir el equilibrio después de cada cambio de paso en la concentración de anestésico emitido por el vaporizador y antes de la recogida de una nueva muestras de gas y la aplicación del estímulo nociceptivo. Se realiza por triplicado y se realiza una media para obtener el valor final de CAM.

En estudios en humanos y en animales realizados para determinar el valor CAM de manera clínica, la anestesia es inducida en el paciente con el agente inhalatorio de interés y se mantiene a una concentración anestésica tele-expiratoria preseleccionado (etAA) durante 15 minutos para permitir el equilibrado de las presiones parciales alveolares y arteriales.

Una vez calculado un valor CAM, este valor es un único punto en una curva, correspondiente a la concentración de anestésico en el que 50% de los pacientes no se mueven en respuesta al estímulo. La desviación estándar (DE) del valor de la CAM es generalmente aproximado a ~ 10%, lo que indica que 1,2 x CAM (es decir, CAM + 2 DE) debe producir la inmovilidad a la estimulación en el ~ 95% de los pacientes.

#### **1.6.5 Selección de los niveles de anestesia inhalatoria en función de la CAM.**

Las dosis de anestésico comúnmente administradas durante una anestesia general, se definen en términos de múltiplos de CAM (es decir, por ejemplo 1,5 x CAM). La

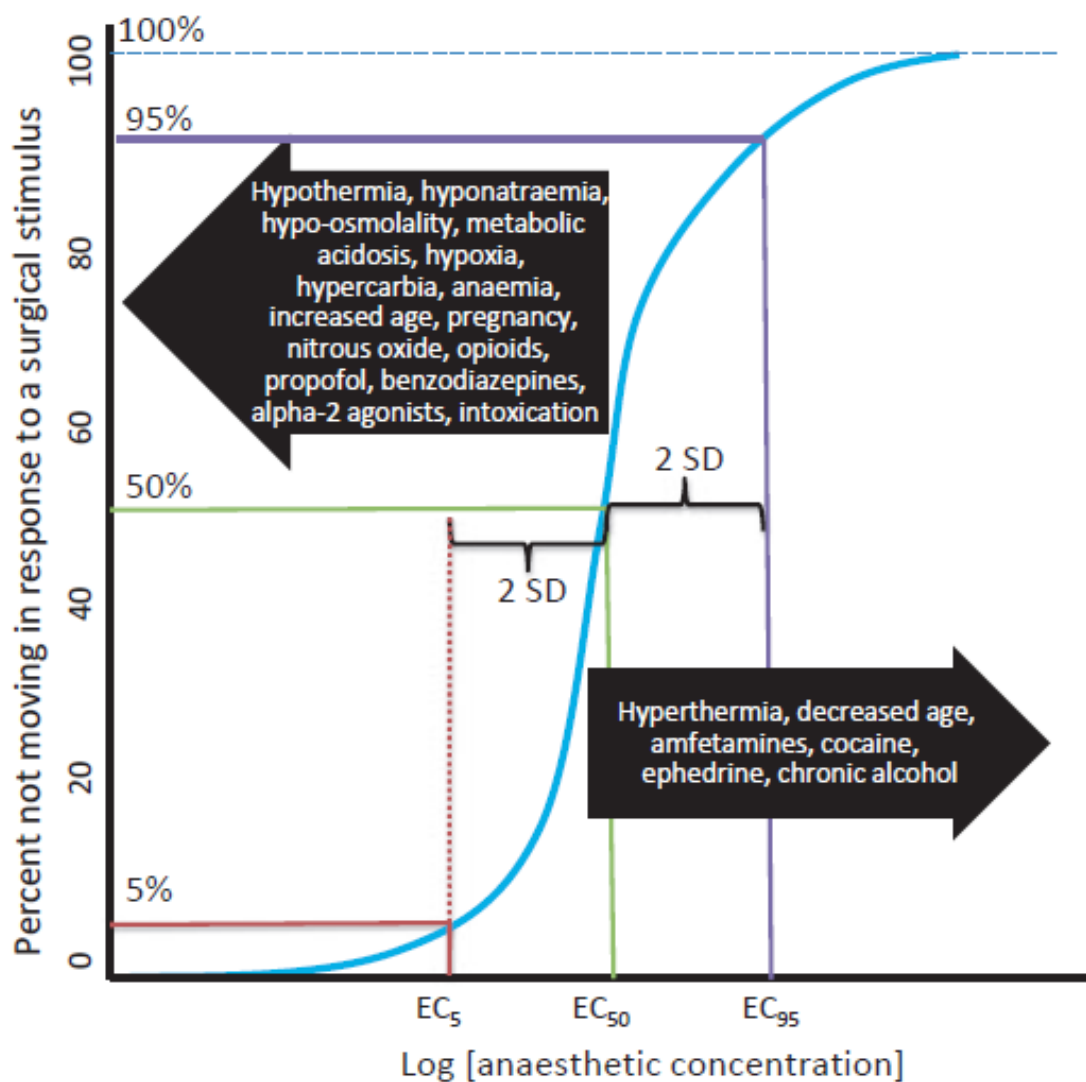
profundidad quirúrgica se logra por lo general en el 1,2 a 1,5 veces los valores de la CAM para un anestésico determinado y una especie determinada. En una sola especie la variación de los valores de CAM son generalmente pequeños e incluso entre las especies la variación no suele ser muy grande (*ver de nuevo Tabla 1*).

#### 1.6.6 Factores que afectan a la CAM.

Muchos factores alteran el valor de la CAM, aumentando o disminuyendo la concentración del anestésico requerido para evitar el movimiento del paciente. Cuando un factor está presente que aumenta el valor CAM en un paciente que es anestesiado, los anestésicos inhalatorios han disminuido la potencia para esa paciente. Así, en presencia de estos factores que alteran aumentando la CAM, los pacientes requerirán una mayor concentración del agente volátil. Por el contrario, para los factores que disminuyen la CAM, los agentes anestésicos inhalatorios han aumentado la potencia. En presencia de estos factores, los pacientes requieren una concentración más baja del agente inhalatorio. Es importante indicar que los factores que alteran el valor de la CAM podrían no afectar de manera similar otras medidas CAM, tales como  $CAM_{awake}$  (despierto),  $MAC_{unawake}$ ,  $MAC_{amnesia}$  y  $MAC_{BAR}$ .

Los factores que alteran el valor de la CAM se pueden subclasificar en fisiológicos, farmacológicos y patológicos. (Figura de Aranake y col. 2013) Algunos de estos factores que aumentan, disminuyen o no alteran los valores de la CAM son los que se pueden ver en la Tablas 6 y 7.

**Figura 3.** Relación entre la concentración de anestésico y el porcentaje de personas que no se mueve en respuesta a un estímulo quirúrgico. Esta figura ilustra la relativamente estrecha variabilidad interindividual en la concentración de anestésico requerida para suprimir el movimiento. Factores que desplazan la curva a la izquierda (es decir, disminuyen el valor CAM) y hacia la derecha (es decir, aumentan el valor CAM) se muestran mediante las flechas. Las concentraciones efectivas de la población se muestran para 5% (EC5), 50% (EC50) y 95% (EC95) de la población. La EC50 es sinónimo del valor CAM. SD es el valor de la desviación estándar. (Figura de Aranake y col. 2013).



**Tabla 6.** Factores no farmacológicos que afectan la CAM. (Adaptado de Steffey y col. 2015).

Disminuyen la CAM	Aumentan la CAM	No alteran la CAM
Hipotensión <50 mmHg	Hipernatremia	Tipo de estimulación supramáxima
Anemia (PCV<13%)	Hipertermia	Duración de la anestesia.
Hipotermia	Hipertiroidismo	Sexo
Hipoxia <40 mmHg		PaCO <sub>2</sub> (15-95 mmHg)
Gestación		Hipertensión
Edad (aumento en edad)		Hipercalemia
Hipotiroidismo		Hipocalemia
Hiponatremia		Cambios acido-base metabólicos
PaCO <sub>2</sub> >95 mmHg		PaO <sub>2</sub> >40 mmHg
		Presión arterial >40 mmHg

**Tabla 7.** Fármacos que alteran la CAM. (Adaptado de Steffey y col. 2015).

Disminuyen la CAM	Aumentan la CAM	No alteran la CAM
Premedicación: acepromacina, diazepam, detomidina, fentanilo, medetomidina, meperidina, midazolam, morfina, xilazina	Estimulantes centrales: doxapram, anfetamina, efedrina, morfina –caballo, lausonia, fisostigmina	Atropina, glicopirrolato, escopolamina
Analgésicos administrados		
Depresores centrales.		
Otros anestésicos inhalatorios (N <sub>2</sub> O).		
Anestésicos inyectables: ketamina, lidocaína, tiopental.		
Otros: adenosina, anticolinérgicos centrales, antagonistas 5-HT.		

### **1.6.7 Ventajas y limitaciones de la CAM y los conceptos derivados de la CAM: controversias.**

En el contexto de las técnicas de anestesia multimodal modernas, la utilización de el valor de CAM como una guía para la determinación de la concentración del agente inhalatorio requerido durante la anestesia ha sido considerado como obsoleto e innecesario. La anestesia general inhalatoria está relacionada con los efectos sobre el cerebro, y no sobre la médula espinal. En medicina humana y en medicina veterinaria, la concentración de agente inhalatorio necesaria para causar pérdida del conocimiento y evitar el recuerdo es fundamental para el suministro de una anestesia adecuada, pero esta concentración de agente inhalatorio no tiene relación con el movimiento de CAM. El cirujano requerirá la inmovilidad, pero esto se puede lograr mediante la administración de fármacos con propiedades relajantes musculares en combinación con un agente inhalatorio. Debido a los efectos de otros fármacos sobre la CAM, como inhibidores de la COX (por ejemplo, AINEs, opiáceos, etc.) el uso de este valor como una guía para evitar el movimiento durante la cirugía también parece irrelevante. Lo que se requiere actualmente en anestesia moderna es un dispositivo que sea capaz de medir directamente la profundidad de la anestesia con el fin de prevenir la sobredosis, la consciencia o recuperación del conocimiento, y la recuperación anestésica. Es probable que este dispositivo o monitor se basará en alguna medida de la actividad cerebral cortical, y en este contexto el concepto de CAM si será redundante.

### **1.6.8 Conclusiones finales sobre el concepto y utilidad de la CAM.**

A pesar de sus limitaciones, la CAM sigue siendo la medida más utilizada de

potencia anestésica para anestésicos inhalatorios. Ha resistido el tiempo en los últimos 50 años y a las controversias sobre sus diferentes usos, imponiéndose como la medida métrica habitual de la profundidad anestésica. La anestesia general basada en inhalatorios es la técnica más común en anestesia veterinaria en hospitales de referencia y grandes centros veterinarios. La medición de la concentración de anestésico inhalatorio en tiempo real es fiable, barata y disponible en todo el mundo mediante monitores multiparamétricos que nos facilitan la concentración expirada de fármaco (etAA). Dada la relativa y estrecha variabilidad entre pacientes humanos y animales, el valor de la MAC es un claro punto final significativo para reflejar la ausencia de movimiento del paciente en respuesta a la estimulación quirúrgica. Futuras mediciones del plano anestésico quirúrgico y la profundidad anestésica tendrán que demostrar su superioridad frente al calor y concepto de la CAM.

## JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS



## 2.1 Utilidad Práctica.

Anualmente se realizan millones de anestесias empleando agentes inhalatorios halogenados. Desgraciadamente, existe un incremento del riesgo directamente relacionado con las dosis empleadas de dichos fármacos dado que los efectos secundarios adversos (depresión cardiovascular y respiratoria entre otros) son dosis dependientes. Dicho de otro modo, es posible reducir de forma significativa los riesgos derivados de la anestesia inhalatoria reduciendo al máximo las dosis empleadas de estos. Para ello, los fármacos más útiles han sido los analgésicos, especialmente los opioides, favoreciendo reducciones elevadas. En este sentido, la posibilidad de incrementar este efecto, por ejemplo mediante la potenciación del efecto analgésico de opioides con AINEs, permitiría incrementar aún más el margen de seguridad. Otros efectos beneficiosos derivados serían limitar la contaminación ambiental y sus efectos sobre el personal al emplear dosis menores de anestésicos volátiles y, en tercer lugar, reducir el coste del procedimiento anestésico al ser los anestésicos inhalatorios fármacos relativamente caros.

Por otro lado, las razones para mejorar la analgesia intraoperatoria al dar analgésicos opioides también incluyen la prevención de la tolerancia aguda a opioides (TAO), lo que disminuye la capacidad analgésica de estos fármacos durante el postoperatorio, y probablemente también durante el periodo intraoperatorio. Además se ha postulado que la tolerancia a los opioides puede ser una consecuencia de la activación directa por el fármaco opioide de vías pronociceptiva y que implica la liberación de citoquinas y la enzima ciclooxigenasa (COX) entre otros mediadores, y que podría prevenirse mediante la administración de inhibidores de la COX.

Existen trabajos recientes y aparentemente contradictorios que sugieren un diferente grado de potenciación analgésica (medido en términos de reducción de la CAM; de los opioides según el inhibidor de la COX coadministrado durante la anestesia inhalatoria.

Atendiendo a la problemática existente y las evidencias descritas en el apartado anterior, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

1. La potenciación del efecto analgésico producido por la asociación de opioides e inhibidores de la COX puede diferir según el fármaco inhibidor considerado, debido a una afinidad diferenciada (selectividad) por los tipos de receptor de la COX.
2. Conceptualmente nuestra hipótesis planteaba que si determináramos que inhibidores de la COX son susceptibles de producir un mayor grado de potenciación en la reducción de la CAM de los opioides intraoperatorios, podríamos conocer que fármacos permiten una disminución de las necesidades de anestésicos inhalatorios mayor, y que finalmente se traduciría en un incremento de la seguridad para el paciente y el personal, y en un ahorro de los costes derivados.

The word "OBJETIVOS" is centered between two thick, horizontal, olive-green bars. The top bar is positioned above the text, and the bottom bar is positioned below it, creating a frame for the title.

## OBJETIVOS



Para demostrar las hipótesis anteriormente descritas el objetivo principal del estudio fue determinar la potenciación del efecto de los opioides, medidos en términos de reducción de la CAM, mediante la coadministración de un inhibidor de la COX o combinaciones de estos, caracterizando el grado de potenciación de aquellos grupos de mayor difusión clínica en medicina humana. Metodológicamente se plantearon los siguientes objetivos del estudio fueron:

- 1) Caracterizar la potenciación producida por diferentes tipos de inhibidores de la COX administrados por vía IV (ketoprofeno, ketorolaco, parecoxib, paracetamol, y metamizol) del efecto analgésico del remifentanilo en la rata y determinado en términos de reducción de la CAM del anestésico inhalatorio halogenado (sevofluorano).
- 2) Determinar si la potenciación es similar independientemente de la dosis de inhibidor de la COX empleado o si bien, es dosis dependiente, empleando un rango 'clínico' de dosis en la especie objeto de estudio.
- 3) A partir de los resultados derivados de los objetivos anteriores, determinar si puede obtenerse un mayor grado de potenciación combinando el fármaco opioide (remifentanilo) con dos de los inhibidores de la COX estudiados (paracetamol y parecoxib). Una primera aproximación plantea combinar fármacos con selectividad COX diferenciada.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



El desarrollo del presente estudio fue llevado a cabo bajo la concesión de dos proyectos del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Sanidad y Consumo, con números de proyecto FIS: PI05/0441 y PI08/0422.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Hospital Universitario La Paz (HULP, Madrid, España) en cuyas instalaciones del Servicio de Cirugía Experimental fue realizada la parte experimental. El estudio se realizó de acuerdo con la legislación vigente en Experimentación Animal en aquellos momentos (RD 223/1988 y RD 1201/2005) y cumple la legislación vigente actual española y europea (Real Decreto 53/2013, y Directiva 2010/63/UE) en cuanto a manejo de animales, procedimientos y condiciones de estabulación.

---

### 3.1 Animales

---

Todos los animales empleados (n=204) fueron ratas de la cepa Wistar, adultas y macho, procedentes de Charles River Laboratories (Barcelona, España). Para el primer objetivo se utilizaron 60 ratas, para el segundo objetivo se utilizaron 72 ratas y finalmente para el tercer objetivo se utilizaron otras 72 ratas. Todas las ratas se encontraban en un rango de pesos de 250 - 350 gramos y contaban con unos 3 meses de edad.

Los animales se alojaron en las salas destinadas a roedores, específicamente para ratas, dentro del animalario del Servicio de Cirugía Experimental (actualmente Unidad de Investigación) del Hospital Universitario La Paz. Todos los animales fueron distri-

buidos en grupos de 4-6 animales por cubeta (macrolon tipo IV). El ciclo de luz (12 horas luz: 12 horas oscuridad), la temperatura ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y la humedad ambiental (40-70%), siguiendo la legislación vigente, estuvieron controladas en todo momento. El agua y la comida (A03 dieta de mantenimiento para roedores, SAFE, Panlab, Barcelona, España) era suministrado *ad libitum*. Tras un periodo de cuarentena y aclimatación nunca inferior a una semana desde su llegada al animalario, las ratas fueron empleadas en los distintos experimentos empezando siempre a primera hora de la mañana (después de las 8:00 horas).

Como criterios de exclusión en este estudio, todos aquellos animales que presentaban o mantenían unos valores fuera de los rangos fisiológicos de temperatura, presión arterial, frecuencias cardíaca y respiratoria y gasometría arterial (determinada al final del estudio) o con la sospecha de otro tipo de alteraciones por la sintomatología presentada durante la inspección física a su llegada al animalario, o al finalizar el periodo de cuarentena de 72h, o durante su estancia pre-experimental, eran excluidos del estudio. Normalmente este tipo de factores conduce a valores de la CAM alterados. Basados en nuestra experiencia previa, se suelen producir un 10-20% de exclusiones y así ocurrió durante el transcurso experimental en este estudio.

---

## 3.2 Anestesia, instrumentación y monitorización

---

### 3.2.1 Inducción a la anestesia.

Las ratas se colocaron en una cámara de inducción de metacrilato donde se suministró un flujo de oxígeno al 100% de concentración y a una velocidad de  $3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  con

un 8 %vol. de sevoflurano (Sevorane, Abbott Laboratories. Madrid, España). Una vez que los animales perdían el reflejo de estación se disminuía el flujo de oxígeno a 0,75 - 1 L·min<sup>-1</sup> y las ratas se extraían de la cámara de inducción colocándose en posición de decúbito esternal para finalizar la fase de inducción mediante mascarilla. Durante esta transferencia desde la cámara de inducción a la zona de trabajo y finalización de inducción con mascarilla, era el momento en que se aprovechaba para realizar el pesaje del animal.

### 3.2.2 Intubación endotraqueal.

La intubación endotraqueal permitió la administración de la anestesia inhalatoria, en este estudio con el agente fluorado, sevoflurano, para facilitar un mejor control de la vía aérea y de la ventilación, así como una disminución de la contaminación del laboratorio. Para el procedimiento de intubación, se utilizó un otoscopio con un cono largo y fino, además de una guía metálica flexible y de punta roma (obtenida de “kits” de cateterización invasiva percutánea central; por ejemplo de catéteres yugulares) y un venocatéter de polietileno 14G (Terumo Surflo, Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica), que hacía la función de un tubo endotraqueal.

Una vez la rata estaba anestesiada y posicionada en decúbito esternal, se realizaba la apertura de la boca del animal y se procedía a extraer la lengua de manera delicada con nuestros dedos. Con la otra mano se sujetaba el otoscopio, introduciendo el cono hacia el interior de la cavidad bucal. A través de él se visualizaban los cartílagos de la epiglotis y el aritenoides, abriendo y cerrándose rítmicamente a medida que se producía las fases de inspiración y de la espiración del animal. En ese momento se introducía la guía por el otoscopio, coincidiendo con la fase de inspiración y apertura máxima del aritenoides, y se deslizaba con delicadeza unos centímetros hacia el interior de la

tráquea. Al mismo tiempo y sujetando el extremo distal de la guía se procedía a extraer suavemente el cono del otoscopio.

A continuación, por el extremo libre, exterior y proximal de la guía se introducía el venocatéter (que hacía las veces de tubo endotraqueal) deslizándolo suavemente sobre la guía hacia el interior de la boca, intentando coincidir con el momento de inspiración para su introducción final. Se introducía el tubo endotraqueal hasta dejar el cono del catéter a la altura de los incisivos y se extraía la guía metálica del interior. Después se comprobaba la posición correcta del tubo, verificando la entrada y salida de aire con la respiración mediante un hilo de la gasa colocado delante del cono del venocatéter o mediante una hoja de bisturí y el empañado de la misma coincidente con la fase de espiración. A continuación se fijaba correctamente el cono del catéter con esparadrapo. Si se apreciaban durante la fase experimental secreciones en el interior del tubo endotraqueal, mediante la audición de ruidos en vía aérea, se procedía a aspirar con una jeringa de 5 mL y un catéter de diámetro inferior al del tubo endotraqueal (se utilizaba un catéter de los utilizados para infusiones en espacio epidural acoplado a una aguja de 25G). En esos casos, se introducía el catéter con un movimiento rápido y suave en la cavidad oral hasta acercarnos a la zona de la carina y aspirando continuamente tanto al introducirlo como al extraerlo, se realizaba tantas veces como era necesario hasta que se dejaran de apreciar ruidos respiratorios de algún tipo y además la curva de capnografía volvía a su forma habitual normal.

### **3.2.3 Cateterización de arteria carótida.**

La cateterización de la arteria carótida se realizaba para la medición y monitorización invasiva de la presión arterial y la extracción de gasometrías arteriales al final de cada

experimento individual. Una vez la rata estaba intubada y conectada a un pequeña pieza en forma de "T" que hacía las veces de circuito de T-Ayre (tipo de circuito anestésico de no reinhalación utilizado en pequeños animales), y diseñada para minimizar el espacio muerto entre el circuito y la boca del animal, se realizaba el mantenimiento de la anestesia con un porcentaje del 4%vol de sevofluorano mediante un flujo de oxígeno del 100% y a una velocidad de 0,75-1 l litros  $\text{min}^{-1}$ . A continuación ya estabilizada la rata, se procedía a pelar la zona ventral de la zona del cuello y se desinfectaba con una solución antiséptica de povidona yodada diluida al 10%. Inmediatamente finalizada la preparación prequirúrgica se realizaba una incisión en la zona del cuello ventrolateralmente con una tijera recta de microcirugía de Iris y se disecaba la zona subcutánea hasta localizar los músculos esternohioideo y omohioideo entre los cuales se puede localizar fácilmente y a simple vista ventralmente la arteria carótida, en posición ventromedial a la vena yugular. Después se procedía a exponer la arteria carótida y se realizaba una separación de la misma del nervio vago con delicadeza. Se colocaba una ligadura proximal a la cabeza y distalmente una lazada más larga para crear tensión en la arteria durante la arteriotomía e inserción del catéter. Se colocaba en la zona intermedia del área expuesta, una tercera lazada para fijar el catéter y que no se deslizara por la propia presión arterial existente. Después se realizaba una pequeña incisión en la arteria carótida con una tijera de microcirugía de Wescott-hoja larga, lo suficientemente grande para permitir el paso del catéter, y se introducía éste siempre con el bisel hacia abajo. Una vez introducido el catéter, se debía sobrepasar la lazada más distal y para ello se aseguraba el catéter anudando la lazada intermedia. Una vez sobrepasada la más distal, se anudaba la misma sobre el catéter fijándolo definitivamente. En ocasiones, anudábamos también la ligadura proximal sobre el catéter para asegurarlo con mayor eficacia. Una vez introducido y fijado el catéter, se comprobaba

que la sangre reflúa por el catéter introducido, mediante una jeringa de insulina con suero heparinizado unida al mismo.

Validado este modelo y comprobado que la presión arterial así como las gasometrías arteriales se mantienen normales durante todos los experimentos realizados para la consecución del objetivo uno, no se realizó dicho procedimiento durante la fase experimental de consecución del objetivo dos y el tres, ya que la incisión quirúrgica necesaria puede desencadenar fenómenos de hiperalgesia que condicionen nuestras observaciones y resultados como se ha descrito ya previamente (Celerier y col. 2006; Cabanero y col. 2009).

#### **3.2.4 Monitorización.**

Los animales una vez instrumentalizados se mantenían mediante ventilación espontánea con una concentración de oxígeno del 100% y un flujo de 0,75-1 L·min<sup>-1</sup>, durante todo el experimento. Una vez instrumentalizadas y estabilizadas las ratas se comenzaba el proceso de monitorización.

Por medio de la cateterización invasiva de la arteria carótida (apartado 3.2.3) se registraba de forma continua la frecuencia cardíaca y la presión arterial invasiva. A través de la pulsoximetría, mediante la colocación de una pinza de pulsoximetría colocada en las patas posteriores se medía la saturación de oxígeno por la hemoglobina. La temperatura corporal se monitorizaba a través de una sonda rectal y los valores de temperatura se mantenían dentro de los rangos considerados normales (37,5-38,5°C) por medio de la utilización de una manta de agua circulante (Heat Therapy Pump, modelo TP-220, Gaymar, Orchard Park, NY) y un flexo o lámpara de iluminación con

una bombilla tradicional de 60W. Todos estos parámetros se monitorizan mediante el monitor RGB (Medical Devices, Madrid, España).

La capnografía y la capnometría (medición de dióxido de carbono inspirado y expirado) así como la medición de las concentraciones inspiradas y espiradas del anestésico inhalatorio se realizaron mediante el Capnomac Ultima (Datex-Ohmeda, Hertfordshire, Inglaterra) conectando el tubo prolongador y de medición del aparato a una aguja de 14G que se insertaba dentro del cono del tubo endotraqueal a través de un orificio en la pieza en T del circuito anestésico, llegando el extremo distal a la altura de la boca del animal. Para evaluar la concentración de gas anestésico espirada de manera más exacta y sin diluciones y poder determinar la CAM se tomaron muestras de gas intra-traqueales, como ha sido descrito previamente (Pajewski et al. 1996). Para ello, se introducía un catéter muy fino (0,9 mm de diámetro externo) a través de la pieza en T hasta alojar su extremo distal en la carina. El extremo proximal se conectaba a una jeringa de cristal de 10 ml (Hamilton 26211-U100, Series Gastight; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). La muestra de gas se obtenía por aspirado de 10 ml durante los 5 min previos a la estimulación de la CAM mediante una bomba de infusión-aspiración (Modelo 55-2226, Harvard Apparatus, Milis, MA) y se analizaban mediante la inyección en el capnógrafo (Datex-Ohmeda, Hertfordshire, Inglaterra). La muestra obtenida así resulta de la mezcla de gas inspirado y espirado pero al tratarse el sevofluorano de un gas poco soluble en sangre ambas medidas suelen ser iguales a los 5 minutos de realizar cualquier cambio de concentración en el vaporizador. Si en condiciones normales no hay secreciones en el tubo, normalmente esta medida coincide con el gas anestésico obtenido con capnógrafo mientras que el  $\text{etCO}_2$  obtenido por aspiración es ligeramente mayor al  $\text{etCO}_2$  espirado del capnógrafo. El catéter se extraía entre las distintas mediciones obtenidas para no aumentar el esfuerzo respiratorio del animal. Al final

de cada experimento individual se realizaba una gasometría mediante la extracción de una muestra arterial en jeringa heparinizada de 1 ml que era analizada el laboratorio de Urgencias del hospital materno-infantil en el Hospital Universitario La Paz (Rapilab 860 de Bayer AG, Leverkusen, Alemania). El objetivo era asegurar que los valores se encontraban dentro de los límites aceptables del pH entre 7,34 y 7,44; la presión arterial de oxígeno por encima de 90 mmHg y la presión parcial de dióxido de carbono por debajo de 55 mmHg.

### **3.2.5 Administración de remifentanilo.**

En todos los animales que recibieron remifentanilo se administró como una infusión continua intravenosa a  $120 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  sin bolo de carga previo. Para ello se cateterizaba la vena lateral de la cola con un venocatóter 22G (Terumo Surflo, Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica), se fijaba convenientemente con esparadrapo, se heparinizaba y se conectaba a través de un prolongador previamente purgado a la jeringa de infusión (bomba de infusión Sep11S de Ascor SA Medical Equipment; Warsaw, Polonia).

El vial del remifentanilo empleado (Ultiva 5mg, Glaxo-Wellcome Laboratories, Madrid, España) se reconstituía con 10 ml de suero fisiológico y con él se prepara una dilución de  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  en una jeringa de 20 ml, es decir, se tomaban 1 ml del remifentanilo reconstituido respectivamente, y era diluido hasta 20 ml con salino. La infusión de remifentanilo (o el salino en el caso de controles) se administra siempre a una velocidad de  $4,8 \text{ ml kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

### 3.2.6 Administración de otros fármacos.

Durante la fase experimental para la consecución del objetivo 1), se estudiaron cuatro inhibidores de la COX: paracetamol (Paracetamol, Perfalgan, Bristol-Myers Squibb, München, Alemania), metamizol (Metamizol; Nolotil, Boehringer Ingelheim, San Cugat del Valle`s, España), ketoprofeno (Ketofen, Merial, Lyon, Francia), ketorolaco (Droal, Protector & Gamble Pharmacueticals Iberia, Barcelona, España) y parecoxib (parecoxib, Dynastat, Pfizer, Alcobendas, España). Durante la fase experimental del objetivo 1), se realizó un estudio mediante la selección de tres dosis (baja, media y alta; 1 x, 2 x y 4 x, respectivamente) de la gama de dosis clínica para las ratas de los inhibidores de la COX estudiados. El rango de dosis clínica que se ha descrito y publicado con anterioridad era de 50-300 mg kg<sup>-1</sup> para el paracetamol (PRC); rango de 1-5 mg kg<sup>-1</sup> de ketoprofeno (KTP); rango de 10-30 mg kg<sup>-1</sup> para parecoxib (PRX). Para el metamizol (MTZ), se han descrito dosis efectivas que pueden variar mucho dependiendo de si se está refiriendo a su actividad antiinflamatoria o antinociceptiva y rangos de dosis de 25-600 mg kg<sup>-1</sup> se han estudiado y han sido descritos y publicados. En la fase experimental de este estudio las dosis que se estudiaron se encontraban dentro del rango de 15-60 mg kg<sup>-1</sup>. Estos inhibidores de la COX y tres dosis dentro de los rangos clínicos descritos, se utilizaron con el objetivo de seleccionar la dosis que proporcionara el nivel más alto de potenciación de la disminución de la CAM de sevoflurano producida por la administración conjunta con una infusión continua de remifentanilo. Cuando dos dosis dieron resultados similares, se seleccionó la dosis más baja. Las dosis estudiadas durante la fase experimental del objetivo 1) fueron paracetamol (75, 150, y 300 mg kg<sup>-1</sup>), ketoprofeno (1, 2 y 4 mg kg<sup>-1</sup>), ketorolaco (1, 2 y 4 mg kg<sup>-1</sup>) y parecoxib (7, 15, y 30 mg kg<sup>-1</sup>). Sin embargo para el metamizol, ya que se encontró un alto rango de dosis descritas en la bibliografía para la rata, se administraron en el estudio las dosis más bajas descritas (15, 30, y 60 mg kg<sup>-1</sup>).

Durante la fase experimental para la consecución del objetivo 2), se seleccionó la dosis que parecía potenciar más los efectos sobre la CAM. Durante esta fase experimental se decidió eliminar el ketorolaco como fármaco experimental y objeto de estudio. La dosis seleccionada para el resto de los otros cuatro inhibidores de la COX fue de 300 mg kg<sup>-1</sup> para paracetamol, 15 mg kg<sup>-1</sup> para metamizol, 2 mg kg<sup>-1</sup> para ketoprofeno, y 30 mg kg<sup>-1</sup> para el parecoxib. A un grupo adicional de ratas se les administró una infusión continua de remifentanilo más administración intraperitoneal cuando correspondiera de solución salina y de esta manera este grupo sirvió como grupo de control. En esta fase experimental, todos los grupos recibieron la infusión de remifentanilo y las ratas se asignaron al azar y aleatoriamente a uno de dos posibles grupos de administración en función que el fármaco inhibidor de la COX se administrara intraperitoneal (IP) al mismo tiempo que se iniciaba la infusión de remifentanilo, es decir inmediatamente después de determinar la CAM de sevoflurano basal o inicial (administración simultánea), o por el contrario inmediatamente después de determinar el primer valor de CAM de sevoflurano tras previamente comenzar una infusión continua de remifentanilo (administración retrasada; determinación de CAM denominada RMF-1). Para cada grupo de administración del inhibidor COX o de la solución salina (administración simultánea o retrasada) el número de animales fue de 8 ratas por grupo.

Dado que la reducción media de la CAM de sevoflurano al administra remifentanilo ha sido descrita y se aproxima a un 24% (Incluir referencia número 20), y dado que el método de determinación de la CAM implica una variación normal dentro del rango del 5-10%, aquellas ratas dentro de esta fase experimental del objetivo 2) y en las que se administrara una infusión continua de remifentanilo pero con una reducción de la CAM

de sevoflurano de únicamente el 10%, fueron excluidos del estudio y consideradas como ratas no respondedoras.

Durante la fase experimental para la consecución del objetivo 3), los animales recibieron aleatoriamente una inyección intraperitoneal (IP) de PRC (Perfalgan; Bristol Mayers Squibb, München, Alemania), o PRX (Dynastat; Pfizer, Alcobendas, España), o la combinación de paracetamol: parecoxib (PRC-PRX), o solución salina. Se seleccionaron para esta fase experimental en función de las fases 1) y 2) las siguientes dosis: PRC (150 y 300 mg kg<sup>-1</sup>), PRX (15 y 30 mg kg<sup>-1</sup>), y su combinación PRC: PRX (150: 15 mg kg<sup>-1</sup>). Un grupo adicional (control) recibió una inyección de solución salina IP. Las dosis administradas fueron seleccionadas en función del rango de dosis clínica anteriormente descritas para ratas, de paracetamol (50 a 300 mg kg<sup>-1</sup>) y parecoxib (10-30 mg kg<sup>-1</sup>). Durante la fase experimental segunda para la consecución del objetivo tres, una infusión constante de remifentanilo (Ultiva; Glaxo-Wellcome Laboratories, Madrid, España) fue administrada a 120 µg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

---

### 3.3 Determinación de la CAM

---

Los valores de la CAM fueron determinados a partir de las muestras de gas alveolar que se recogían al mismo tiempo que se realizaba el pinzamiento de la cola (ver el apartado previo 3.2.4). En todas las fases experimentales de este estudio se determinó siempre la CAM de sevoflurano antes (CAM basal) de la administración de cualquier otro fármaco. Durante las fases experimentales del objetivo 1), 2) y 3) en su segunda parte, la CAM se determinó de manera basal y después del inicio del remifentanilo y/o el tratamiento correspondiente, al menos dos veces más en un intervalo separado por 1.5h. En la fase 3) en su primera parte, se determinó de manera basal y des-

pués del inicio del tratamiento correspondiente (PRC, PRX o PRC: PRX), y al menos dos veces más en un intervalo separado por 1.5h.

La determinación de la CAM en la rata se hizo siguiendo el método de Eger modificado por Roizen (Eger et al. 1965; Waizer et al. 1973). Para la determinación de la CAM en este estudio, seguimos los procedimientos empleados por este equipo y previamente descritos de CAM de movimiento (Gómez de Segura et al, 1998) con ligeras modificaciones y que brevemente se describe a continuación: Una vez monitorizado el animal se disminuye la concentración inspirada de anestésico hasta el valor de la CAM poblacional (2,4% para el sevoflurano) estableciendo un tiempo de equilibrado de 10 min (para el anestésico inhalatorio del isoflurano se recomiendan 15 min aproximadamente). Pasado este tiempo se aplica un estímulo supramáximo (Eger, 1965) consistente en el pinzamiento de la cola con un forceps durante 60 s. Hay varios métodos nociceptivos validados que reproducen un estímulo supramáximo; en este caso empleamos un estímulo de tipo mecánico (presión) realizado por el pinzamiento en la cola (tail-clamp) con una pinza hemostática (8-inch hemostatic Forceps, Martin, Tuttlingen, Alemania). Se comienza a determinar la CAM en la concentración de anestésico inhalatorio más cercana al valor esperado y después de un tiempo adecuado de equilibrado: 30 min después de la instrumentación inicial y 10 min entre cambios de concentración del vaporizador. El primer pinzamiento lo realizamos a 6 cm de la base de la cola y apretando la pinza hasta la primera pestaña de la cremallera durante un minuto o hasta observar una respuesta positiva. Dicho estímulo es el que produce una respuesta o valor CAM más coherente. Se considera una respuesta positiva cuando se produce una respuesta de movimiento obvia en respuesta al estímulo. Si la rata realiza un movimiento brusco de la cabeza, las extremidades o el cuerpo y que es una respuesta negativa si no realiza ningún movimiento, deglute, mastica o mueve la cola. Si la respuesta fue positiva, se aumenta

la concentración un 10%, es decir la concentración de sevoflurano se aumenta un 0,2 %vol. y el siguiente estímulo lo haremos un cm. hacia proximal determinando una nueva respuesta después de otros 10 min de equilibrado. Pequeñas contracciones musculares puntuales o la ausencia de movimiento se considerará una respuesta negativa. Si la respuesta al pinzamiento es negativa, se disminuye la concentración inspirada de anestésico un 10% y la concentración de sevoflurano se disminuirá un 0,2 %vol. y la pinzaríamos la siguiente vez hacia una posición más distal en la cola. Y así sucesivamente con cada estímulo hasta que la respuesta positiva se convierta en negativa y viceversa. Se consideró el valor de CAM como la media de las dos concentraciones más altas que permitan el movimiento en respuesta al estímulo y las dos más bajas que lo prevengan. Todos los valores de CAM se determinaron por triplicado. El monitor de gases anestésicos fue calibrado antes y durante cada experiencia empleando un gas de referencia que provee el fabricante del monitor. Antes de cada aplicación del estímulo nociceptivo, se extrajo una muestra de gas como ya se ha descrito anteriormente.

Finalmente los valores de la CAM determinados en este estudio se determinaron de en un laboratorio a 650 metros sobre el nivel del mar lo que como ya se ha comentado durante la revisión bibliográfica, disminuye la presión barométrica y los resultados obtenidos para los valores de la MAC son más altos que los obtenidos a nivel del mar. Por lo tanto, los valores CAM se corrigieron a la presión barométrica a nivel del mar usando la siguiente fórmula: CAM (%vol.) a la presión barométrica a nivel del mar (760 mmHg) (altitud ajustada de la CAM) = valor de CAM medido (%vol.) × Presión barométrica en el ambiente medido (700 mmHg en Madrid) / Presión barométrica a nivel del mar (760 mmHg).

Una vez determinada la CAM basal o inicial, se inició una infusión continua de remifentanilo IV a una dosis de  $120 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  (exceptuando la primera parte de la fase experimental para la consecución del objetivo 3, en la que únicamente se administraban inhibidores de la COX) y que producía una disminución estimada de la CAM de un 20-30% según datos de nuestro propio laboratorio (Criado et al, 2003). A los 20 min. de iniciada la infusión de remifentanilo, se volvía a determinar la CAM individual del animal (RMF-1 para la fase experimental del objetivo 1 y 2; y CAM-2 para las fases experimentales del objetivo 3). Además, si el grupo era el de la administración simultánea al remifentanilo, se administraban también los correspondientes inhibidores de la COX de forma aleatoria (fármaco y dosis). Una vez obtenido este nuevo valor de CAM (RMF-1; o CAM-2 en las fases experimentales del objetivo 3), se administraba el inhibidor de la COX o salino correspondientes y de forma aleatoria (fármaco y dosis) para los grupos de administración retrasada y pasados 30 min se volvía a empezar determinar la CAM (RMF-2 para la fase experimental del objetivo 1 y 2; o CAM-3 para las fases experimentales del objetivo 3). Finalmente se paraba la administración de remifentanilo y 30 min después se empezaba a determinar de nuevo la CAM (post RMF para la fase experimental del objetivo 1 y 2; o CAM-4 para las fases experimentales del objetivo 3). El estudio concluía una vez que se habían obtenido los cuatro valores de CAM (CAM basal, RMF-1, RMF-2 y post RMF para la fase experimental del objetivo 1 y 2; o CAM-1, CAM-2, CAM-3 y CAM-4 para la fase experimental del objetivo 3) para cada animal con una duración estimada del estudio de 6-8 horas. Los valores de CAM obtenidos se introducían en una hoja de cálculo para su procesamiento estadístico posterior.

---

### 3.4 Diseño experimental

---

El diseño general de este estudio fue experimental, de asignación aleatoria y al azar para todos los animales a las diferentes variables y grupos objeto de estudio. En general, como ya se ha comentado (ver aptdo. 3.2), una vez que todos los animales fueron anestesiados, intubados y monitorizados, se comenzaron a estudiar para la determinación de la CAM. En todos los animales se determinó la CAM de sevoflurano, y posteriormente se administró una infusión continua de un fármaco opioide, remifentanilo (exceptuando en la parte primera de la fase experimental para la consecución del objetivo 3) y se administraron un inhibidor de la COX o placebo (salino) IP en función de la fase experimental en la que nos encontrábamos (ver posteriormente). Sucesivas determinaciones de la CAM de sevoflurano se determinaron para poder calcular después las reducciones relativas de cada fármaco inhibidor de la COX o de la combinación de fármacos respecto a ésta; actuando así cada animal como su propio control. En los grupos con remifentanilo y durante las infusiones de remifentanilo (ver aptdo. 3.2.5) se determinaron hasta dos determinaciones de CAM adicionales con 90 min aprox. de separación, y si estas fueron significativamente distintas se sugirió entonces que hubo desarrollo de tolerancia aguda al remifentanilo o que los inhibidores de la COX tuvieron algún tipo de influencia sobre este efecto de tolerancia aguda al remifentanilo. Una vez que determinado un nuevo valor de CAM, siempre se esperaron 30 minutos de equilibrado desde la instrumentación del animal y la siguiente determinación de la CAM. Generalmente se tardó entre 40 y 60 minutos para determinar un nuevo valor de CAM de sevoflurano; así un experimento con 4 determinaciones de CAM normalmente constituyó entre 6 y 7 horas.

Los parámetros fisiológicos (temperatura, presión arterial invasiva, frecuencias cardíaca y respiratoria, y valores de gasometría arterial (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) se monitorizaron y se mantuvieron dentro del rango fisiológico.

Por lo tanto, las variables principales consideradas dentro de este estudio fueron la administración de los diferentes inhibidores de la COX administrados de forma separada e independiente (fases experimentales del objetivo 1), 2), y segunda parte del objetivo 3)) y la administración de paracetamol: parecoxib (PRC: PRX) administrados de forma independiente pero conjunta (en fases experimentales primera y segunda del objetivo 3)). También se consideraron variables las dosis empleadas de estos inhibidores de la COX, y la combinación paracetamol: parecoxib (PRC: PRX).

En cada fase experimental de cada objetivo concreto de este estudio que se detallará a continuación en esta sección, el diseño experimental puede verse ligeramente alterado para adaptarse al uso de cada fármaco o estrategia concreta que se quiera evaluar. Se detalla a continuación:

#### **3.4.1 Objetivo 1.**

Para la consecución del primer objetivo, las ratas se agruparon al azar para recibir aleatoriamente o paracetamol, o metamizol, o ketoprofeno, o ketorolaco, o parecoxib, justo antes del inicio de una infusión de remifentanilo y por tanto justo antes de empezar a determinar el valor de la primera CAM posterior a la determinación de la CAM basal (justo antes de empezar a determinar RMF-1). Una vez considerados estos 5 grupos de estudio (5 inhibidores de la COX), se seleccionaron tres dosis,

seleccionadas para estudiar cual producía un mayor grado de potenciación. Inicialmente se consideraron aquellos fármacos que presentan algún tipo de selectividad diferenciada por alguno de los receptores COX existentes. Aunque discutido, se asumió que el paracetamol presenta un efecto inhibidor COX-3. Para cada una de las dosis se emplearon cuatro animales por grupo y dosis (total de n = 60 ratas).

### 3.4.2 Objetivo 2.

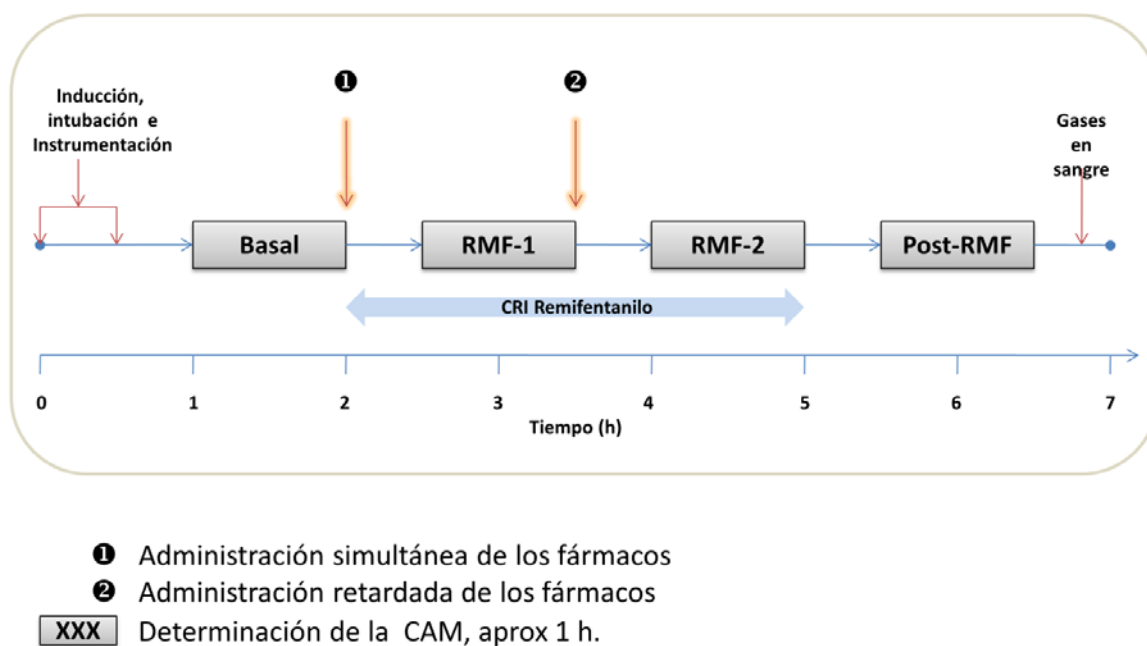
Los inhibidores de la COX a asociar con remifentanilo dependieron de los resultados obtenidos en la fase experimental del estudio de consecución del objetivo 1). Se seleccionó la mejor dosis correspondiente a cada inhibidor de la COX a partir de la fase experimental del objetivo uno. Se consideraron por tanto 4 grupos de estudio (4 inhibidores de la COX) con una dosis seleccionada a partir de la fase experimental del objetivo 1), seleccionada para producir un mayor grado de potenciación. El fármaco ketorolaco fue excluido durante esta fase experimental de la consecución del objetivo dos. Para la consecución del segundo objetivo, las ratas se agruparon al azar para recibir aleatoriamente o paracetamol, o metamizol, o ketoprofeno o parecoxib justo antes de una de las dos determinaciones de CAM posteriores a la determinación de la CAM basal (justo antes de empezar a determinar RMF-1 o RMF-2).

En esta fase experimental se creó un grupo control con remifentanilo. A modo de grupo control, se realizó el mismo procedimiento experimental que con los grupos de administración de algún inhibidor de la COX, pero en lugar de administrar algún inhibidor, se administra suero fisiológico (salino) para evidenciar en el tiempo el com-

portamiento de la infusión continua con remifentanilo. Se establecieron por tanto un grupo control de remifentanilo de 8 animales cada uno.

El número total de grupos de fármaco (inhibidor) o salino fue de nueve grupos (8 grupos de administración simultánea o retrasada al remifentanilo y 1 grupo control con remifentanilo y salino). Para cada una de los grupos de tratamiento (inhibidor o salino) y dosis se emplearon ocho animales (total de  $n = 72$  ratas).

**Figura 4.** Diseño experimental para las fases experimentales del objetivo 2).



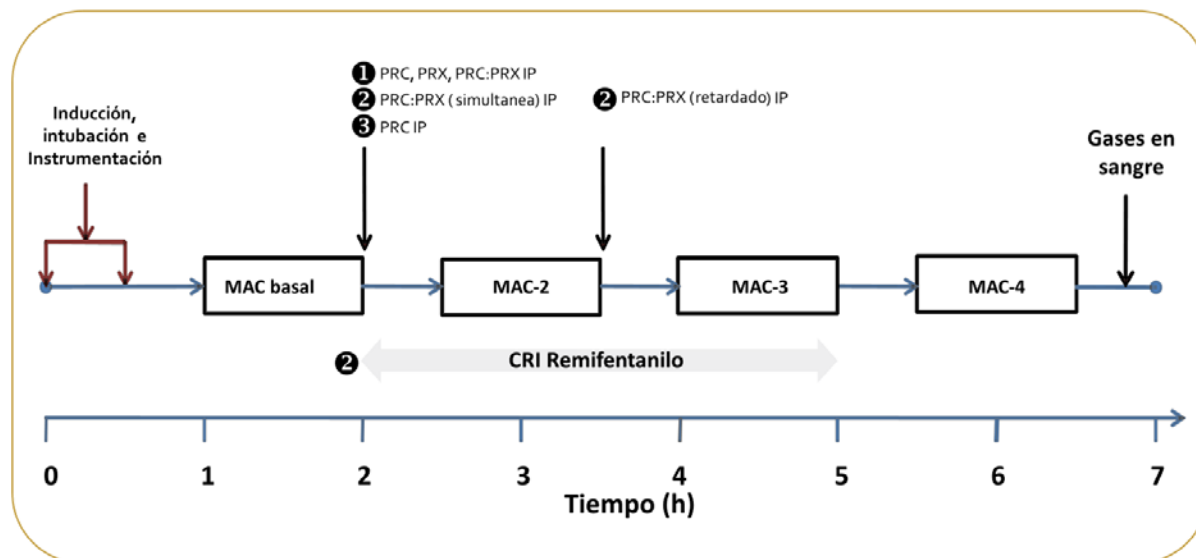
### 3.4.3 Objetivo 3.

Para la consecución del objetivo 3), la CAM de sevoflurano se determinó antes y después de la administración intraperitoneal (IP) de paracetamol (PRC; dosis alta y

baja; 150 and 300 mg kg<sup>-1</sup>), o parecoxib (PRX; dosis alta y baja; 15 and 30 mg kg<sup>-1</sup>), o su combinación paracetamol: parecoxib (PRC: PRX; 150:15 mg kg<sup>-1</sup>), o solución salina. En esta primera parte experimental no se administró remifentanilo. Finalmente, en la segunda parte de la fase experimental para consecución del objetivo 3, se determinaron los efectos sobre la CAM de sevoflurano, al administrar la combinación paracetamol: parecoxib (PRC: PRX; 150:15 mg kg<sup>-1</sup>), en combinación con remifentanilo, administrada simultáneamente al remifentanilo o de forma retrasada.

En la primera parte de esta fase experimental para la consecución del objetivo 3), el número total de grupos de fármaco (inhibidor) o salino fue de seis grupos (5 grupos de administración con inhibidor COX o la combinación PRC: PRX y 1 grupo control con salino). En la segunda parte de esta fase experimental para la consecución del objetivo 3), el número total de grupos de fármaco (inhibidor) o salino fue de tres grupos (2 grupos de administración con la combinación PRC: PRX y administrada simultáneamente al remifentanilo o de forma retrasada y 1 grupo control con remifentanilo y salino). Para cada una de los grupos de tratamiento (inhibidor o salino) y dosis se emplearon ocho animales (total de n = 72 ratas).

**Figura 5.** Diseño experimental para las fases experimentales del objetivo 3).



Al final de cada experimento individual con cada animal se obtuvo una muestra de sangre arterial para gasometría y se eutanasia al animal mediante inyección IV de potasio bajo un plano anestésico profundo.

### 3.5 Diseño estadístico

#### 3.5.1 Evaluación del tamaño muestral.

El valor n estimado, basados en estudios previos y la variación inherente al método empleado es de, al menos, 6 animales por grupo, exceptuando para la primera fase de consecución del objetivo uno, donde 4 animales fueron considerados suficientes. Ello nos permitió detectar variaciones mínimas de un 15% de variación en la CAM y que se consideran adecuadas en función del método empleado y su significación (utilidad) clínica. En cualquier caso, el valor n definitivo se determinó a medida que se obtenían los resultados y se analizaban con un programa estadístico de análisis del tamaño

muestral (nQuery Advisor). Se calculó un porcentaje de fallos experimentales del 20%, lo que implicó que el valor final n sería de 8 animales por grupo.

### **3.5.2 Aleatorización de los animales.**

Las ratas dentro de cada fase experimental fueron asignadas de forma aleatoria y al azar a cada grupo asociadas a un número generado de forma aleatoria (Excel 2007, Microsoft Office).

### **3.5.3 Comparación de medias (valores de CAM y reducciones de CAM).**

Todos los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y se estableció un valor  $p < 0.05$  para afirmar la existencia de diferencias significativas. Los datos de CAM y sus reducciones relativas a la CAM basal fueron analizados para ver si se ajustaban a una distribución normal con el test Kolmogorov-Smirnov para poder realizar test paramétricos.

Para el estudio estadístico, se realizó un análisis descriptivo de los diferentes parámetros estudiados, determinando la media de la CAM individual de cada grupo de fármaco y dosis y de los parámetros controlados para establecer que se encontraban dentro de los límites de normalidad. Dentro de cada fase experimental del estudio y experimentos correspondientes, se realizó un análisis univariante (Modelo lineal general, SPSS) de una o dos vías en función de uno (por ejemplo, fármaco) o dos factores (por ejemplo, fármaco y dosis) considerados. En el caso de medidas repetidas se empleó el ajuste de medidas repetidas (Test de Bonferroni). Para la comparación entre grupos en tiempos de determinación de la CAM concretos o entre dos tiempos de de-

terminación para un mismo grupo, se empleó el ANOVA de una vía. Por ejemplo, en muchos de los análisis de este estudio se han comparado las distintas reducciones de la CAM dos a dos a lo largo del tiempo, por ejemplo para determinar si había reducción de la CAM por el fármaco administrado o bien dos CAM determinadas variaban durante la infusión de remifentanilo (para determinar si había desarrollo de TAO). En todos los casos y para la comparación entre los diferentes grupos o frente al valor basal de la CAM de sevofluorano, se empleó el test post-hoc de Bonferroni. Todos los análisis fueron realizados mediante diferentes paquetes estadístico SPSS (SPSS versiones 10-15 para Windows, Wacker Drive, Chicago, IL, USA) y como ya se ha indicado, el valor n definitivo fue estimado mediante el empleo de un programa de estimación del tamaño muestral (n Query Advisor).

The word "RESULTADOS" is centered between two thick, horizontal, olive-green bars. The top bar is positioned above the text, and the bottom bar is positioned below it, creating a frame for the title.

## RESULTADOS



---

## Resultados del Objetivo 1.

**Caracterizar la potenciación producida por diferentes tipos de inhibidores de la COX administrados por vía IV (ketoprofeno, ketorolaco, parecoxib, paracetamol, y metamizol) del efecto analgésico del remifentanilo en la rata y determinado en términos de reducción de la CAM del anestésico inhalatorio halogenado (sevofluorano).**

---

Como resumen introductorio, esta fase experimental se completó a lo largo de los años 2005 y 2006, permitiendo el establecimiento de las dosis más adecuadas de cada inhibidor de la COX, para poder posteriormente comenzar con las fases experimentales del objetivo dos y el objetivo tres; y establecer cuáles eran los dos mejores fármacos inhibidores de la COX que permitieran finalmente administrar un combinación conjunta de inhibidores con diferentes propiedades farmacológicas (en primera y segunda parte de la fase experimental del objetivo tres) y comprobar sus efectos sobre la CAM de sevofluorano. Durante esta fase experimental se observó que de acuerdo con la hipótesis planteada existen diferencias entre el grado de potenciación para los diferentes inhibidores de la COX estudiados.

En esta fase experimental se utilizaron 60 ratas Wistar con un promedio de peso de  $380 \pm 30$  gramos (media  $\pm$  desviación estándar). La CAM basal de sevofluorano en las ratas fue similar en todos los grupos con un valor promedio de  $2,4 \pm 0,6\%$ vol. (dentro de un rango de 1,6 a 2,9 %vol.; n=60).

Los resultados de esta primera fase experimental se pueden revisar en las Tablas 7-a y 7-b (Valores de la CAM obtenidos) y en las Tablas 8-a y 8-b (% de reducción de la CAM):

**Tabla 7.a.** CAM basal de sevofluorano (MAC-1 basal), y CAM de sevofluorano después de una infusión continua de remifentanilo en dos momentos de determinación (RMF-1 y RMF-2), y CAM después de detener la infusión de remifentanilo (post-RMF). Los animales recibieron ketorolaco, o ketoprofeno, o metamizol IP después de la determinación de la CAM de sevofluorano una vez comenzada la infusión de remifentanilo (administración retardada). Los datos se expresan como media (DE). n = 4 animales / grupo.

Fármaco (mg kg <sup>-1</sup> )	Ketorolaco			Ketoprofeno			Metamizol		
	4	2	1	4	2	1	60	30	15
Basal	2,5±0,1	2,3±0,4	2,5±0,1	2,7±0,2	2,3±0,1	2,3±0,2	2,4±0,1	2,4±0,1	2,3±0,1
RMF-1	1,7±0,3	1,9±0,5	1,8±0,4	1,8±0,2	1,7±0,2	2,1±0,6	2,0±0,6	1,6±0,4	1,9±0,2
RMF-2	1,9±0,2	2,0±0,2	1,8±0,2	1,8±0,2	1,7±0,1	1,9±0,3	2,1±0,2	1,6±0,3	2,0±0,4
post-RMF	2,4±0,2	2,0±0,2	2,4±0,3	2,4±0,3	2,0±0,1	1,7±0,3	2,1±0,1	2,1±0,3	2,2±0,2

**Tabla 7.b.** CAM basal de sevofluorano (MAC-1 basal), y CAM de sevofluorano después de una infusión continua de remifentanilo en dos momentos de determinación (RMF-1 y RMF-2), y CAM después de detener la infusión de remifentanilo (post-RMF). Los animales recibieron paracetamol, o parecoxib IP después de la determinación de la CAM de sevofluorano una vez comenzada la infusión de remifentanilo (administración retardada). Los datos se expresan como media (DE). n = 4 animales / grupo.

Fármaco (mg kg <sup>-1</sup> )	Paracetamol			Parecoxib		
	300	150	75	30	15	7
Basal	2,5±0,1	2,4±0,02	2,4±0,3	2,6±0,2	2,5±1,2	2,3±0,6
RMF-1	1,6±0,3	1,9±0,1	1,7±0,2	1,9±0,3	1,9±0,8	1,9±0,5
RMF-2	1,5±0,4	1,6±0,2	1,9±0,2	1,8±0,3	1,8±0,8	2,0±0,7
post-RMF	2,0±0,1	2,0±0,1	2,2±0,2	2,3±0,4	2,3±1,0	2,2±0,6

**Tabla 8.a.** Porcentaje de reducción de la CAM de sevofluorano después de una infusión continua de remifentanilo comenzara a administrarse (Basal-RMF-1) y después de administrar IP ketorolaco, o ketoprofeno, o metamizol (RMF-2-RMF-1), y después de detener la infusión de remifentanilo (RMF-2- RMF-3). Los datos se expresan como % medio de reducción (DE). n = 4 animales / grupo.

Fármaco (mg kg <sup>-1</sup> ) Tiempo	Ketorolaco			Ketoprofeno			Metamizol		
	4	2	1	4	2	1	60	30	15
Basal – RMF1	34±11%	19±10%	27±16%	25±8%	30±9%	11±29%	17±7%	29±2%	18±10%
RMF2 – RMF1	25±5%	15±16%	27±14%	30±9%	28±6%	17±17%	11±9%	30±19%	13±20%
RMF3 – RMF2	6±6%	14±6%	9±6%	8±9%	18±3%	27±11%	13±7%	8±8%	1±8%

**Tabla 8.b.** Porcentaje de reducción de la CAM de sevoflurano después de una infusión continua de remifentanilo comenzara a administrarse (Basal-RMF-1) y después de administrar IP paracetamol, o parecoxib (RMF-2-RMF-1), y después de detener la infusión de remifentanilo (RMF-2- RMF-3). Los datos se expresan como % medio de reducción (DE). N = 4 animales / grupo.

Fármaco	Paracetamol			Parecoxib			
	(mg kg <sup>-1</sup> )	300	150	75	30	15	7
Basal – RMF1		35±12%	20±4%	28±6%	25±13%	25±10%	17±4%
RMF2 – RMF1		38±12%	31±7%	23±8%	30±9%	28±13%	12±12%
RMF3 – RMF2		23±5%	17±6%	9±3%	13±8%	7±11%	3±11%

---

## Resultados del Objetivo 2.

**Determinar si la potenciación es similar independientemente de la dosis de inhibidor de la COX empleado o si bien, es dosis dependiente, empleando un rango 'clínico' de dosis en la especie objeto de estudio.**

---

Como resumen introductorio, durante esta fase experimental del objetivo dos, se realizaron dos partes experimentales:

La primera parte se realizó en el primer semestre de 2007, y se observó un efecto de tolerancia a la administración de los opioides, inesperado por parte del equipo investigador, y que es de una gran repercusión clínica en medicina humana y que podría sugerir modificar la pautas temporales de administración de inhibidores de la COX y analgésicos opioides conjuntamente, como se discutirá más adelante en la siguiente sección. Parte de los resultados de esta fase experimental fueron presentados en forma de póster en el *Congreso Europeo de Anestesiología* humana, organizado por la *European Society of Anesthesia* (ESA), y celebrado en Copenhague (Dinamarca) en la primavera de 2008 y, además concluyó en la escritura de un artículo.

La segunda parte de esta fase experimental se concluyó durante los meses finales de 2007 y comienzos de 2008. Se corroboraron los resultados obtenidos con algunos de los inhibidores de la COX durante la fase experimental del objetivo uno, determinando una ventaja de la administración conjunta junto al remifentanilo frente a la sucesiva, una vez que el remifentanilo ya había sido administrado. Se presentaron parte de los resultados de esta fase experimental en forma de comunicación oral en la

*Reunión de Otoño de la Asociación de Veterinarios Anestesiastas (AVA) celebrada en Barcelona (España) en el otoño de 2008.*

En esta fase experimental se utilizaron 72 ratas Wistar con un promedio de peso de  $370 \pm 59$  gramos (media  $\pm$  desviación estándar). La CAM basal de sevofluorano en las ratas fue similar en todos los grupos con un valor promedio de  $2,4 \pm 0,3$  %vol. (dentro de un rango de 1,6 a 2,9 %vol.;  $n=72$ ). Cuando se administró una infusión continua de remifentanilo a  $120 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}/\text{h}^{-1}$  (los inhibidores de la COX se administraron después; grupos retardados y grupo control, tiempo RMF-1), el valor de la CAM de sevofluorano se redujo a  $1,8 \pm 0,3$  %vol. (dentro de un rango de 1,2 a 2,5 %vol.;  $n = 40$ ;  $P < 0,05$ ) o un porcentaje de reducción de reducción del  $24 \pm 7$  % (dentro de un rango de 9 al 42 %;  $n = 40$ ;  $P < 0,05$ ).

En resumen el paracetamol potenció la reducción de la CAM producido por remifentanilo en ratas ( $P = 0,002$ ), mientras que el metamizol, el ketoprofeno y el parecoxib no pudieron producir tal efecto. Por otra parte, el paracetamol y el remifentanilo produjeron un grado máximo de reducción de la CAM del  $35 \pm 10\%$ , incluso cuando un efecto de tolerancia a remifentanilo se había observado en animales a los que se había administrado remifentanilo únicamente ( $P < 0,001$ ). Un efecto de tolerancia al remifentanilo no se observó cuando se administró metamizol, ketoprofeno, o parecoxib una vez que la infusión del fármaco opiáceo se había iniciado ( $P > 0,05$ ).

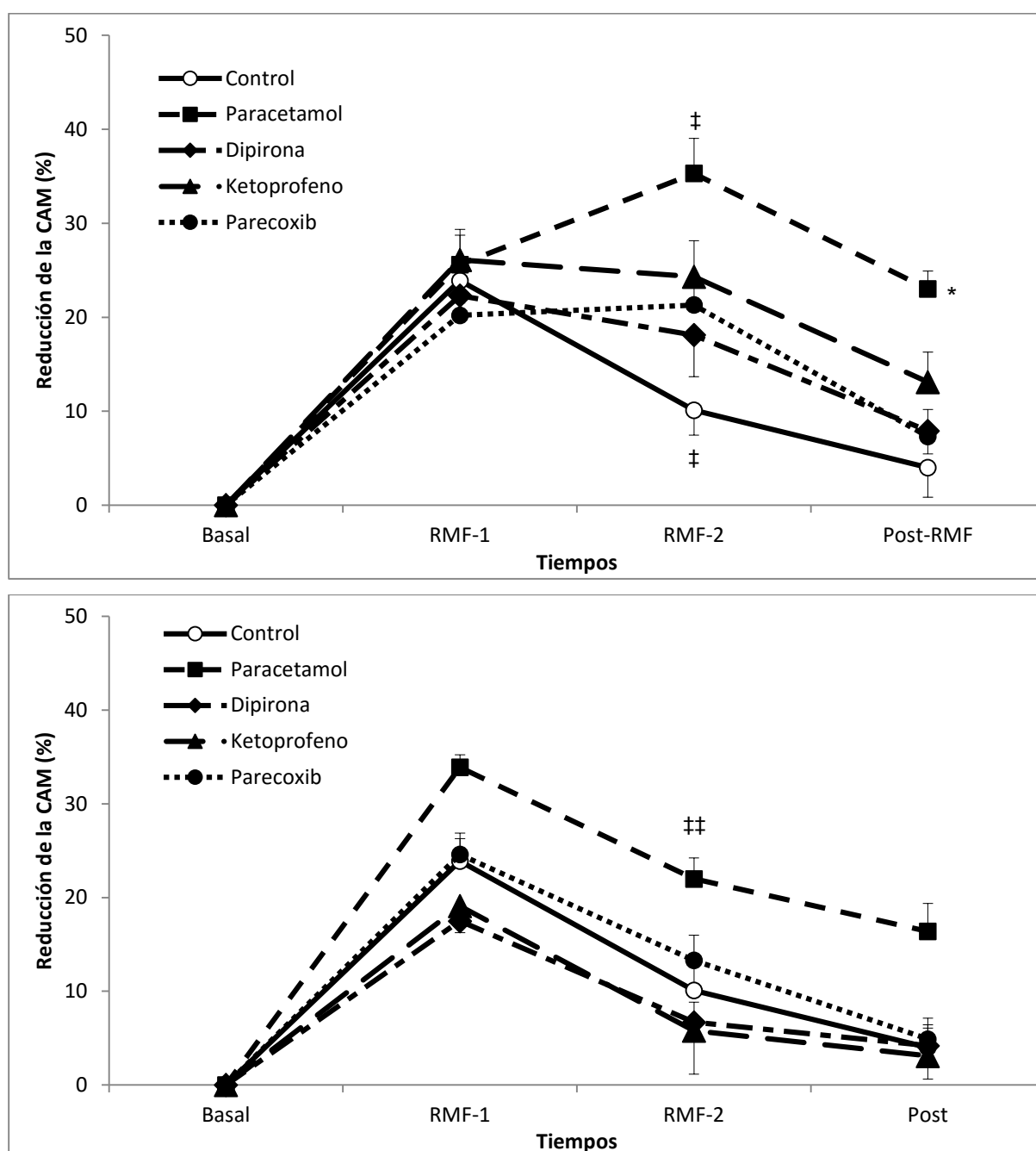
***Objetivo dos, fase experimental primera. Los inhibidores de la COX potencian de forma diferenciada la reducción de la CAM de sevoflurano producida por la administración de remifentanilo.***

De los cuatro fármacos inhibidores de la COX estudiados en esta fase experimental, sólo el paracetamol (PRC) fue capaz de producir una potenciación significativa de la reducción de la CAM de sevoflurano producida por la administración de remifentanilo (test ANOVA para medidas repetidas; prueba de Bonferroni) en los grupos de administración retrasada, ( $P < 0.001$ ) y en los grupos de administración simultánea ( $P=0,002$ ). La máxima reducción de la CAM de sevoflurano (en el momento RMF-2) producida, cuando el paracetamol se administró después de la determinación de la CAM producida por la administración de remifentanilo (reducción de  $35 \pm 10\%$ ; test ANOVA de una sola vía, prueba de Bonferroni;  $P = 0,000$  versus grupo control) y en tiempo de RMF-1, cuando el paracetamol se administró de forma simultánea al comienzo de la infusión de remifentanilo (reducción de  $34 \pm 4\%$ ; test ANOVA de una vía; prueba de Bonferroni;  $P = 0,021$  versus el grupo control). El metamizol, el ketoprofeno, y el parecoxib no produjeron un efecto similar con el observado con el paracetamol al comparar los resultados, lo que sugeriría que el nivel de potenciación de la reducción CAM de sevoflurano producida por el remifentanilo es altamente dependiente del tipo de fármaco inhibidor de la COX considerado (Tabla 9 y Figura 4).

**Tabla 9.** CAM basal de sevofluorano, y CAM de sevofluorano después de una infusión continua de remifentanilo en dos momentos de determinación (RMF-1 y RMF-2), y CAM después de detener la infusión de remifentanilo (post-RMF). Los animales recibieron paracetamol, o metamizol, o ketoprofeno o parecoxib IP cuando se inició la infusión de remifentanilo (administración simultánea) o después de la determinación de la CAM de sevofluorano una vez comenzada la infusión de remifentanilo (administración retardada). A un grupo de control sólo se le administró la infusión de remifentanilo. Los datos se expresan como media (DE). \* Significativamente diferente de la CAM basal, mismo fármaco. Significativamente diferente cuando el valor P es < 0,05. N = 8 animales / grupo.

Fármaco Tiempo	Control	Administración retardada				Administración simultánea			
		Paracetamol	Metamizol	Ketoprofeno	Parecoxib	Paracetamol	Metamizol	Ketoprofeno	Parecoxib
Basal	2.4±0.2	2.5±0.3	2.4±0.2	2.3±0.2	2.5±0.3	2.4±0.3	2.4±0.2	2.2±0.3	2.3±0.2
RMF-1	1.8±0.2*	2.0±0.4*	1.8±0.2*	1.7±0.2*	2.0±0.1*	1.5±0.2*	2.0±0.3*	1.7±0.3*	1.7±0.2*
RMF-2	2.1±0.3	1.7±0.3*	1.9±0.3*	1.8±0.1*	1.8±0.2*	1.8±0.2*	2.2±0.2	2.0±0.4	2.1±0.4
post-RMF	2.3±0.1	1.9±0.2*	2.2±0.2	2.0±0.1*	2.1±0.2*	2.0±0.2*	2.3±0.2	2.1±0.3	2.2±0.3

**Figura 6.** La reducción de la CAM de sevoflurano en diferentes momentos de determinación de la CAM y producidos por remifentanilo sólo (control) o en combinación con paracetamol, metamizol, ketoprofeno, y parecoxib administrado en dos puntos de tiempo diferentes (parte superior, la administración retardada; inferiores, la administración simultánea; Ver diseño experimental para Objetivo 2). Los datos se expresan como media (DE), n=8. \* Significativamente diferente del grupo de control (medidas repetidas). ‡ RMF-2 significativamente diferente versus RMF-1, misma droga. ‡‡ RMF-2 significativamente diferente versus RMF-1, mismo fármaco, en todos los grupos de fármacos. Significativo con una P de valor < 0,05.



***Objetivo dos, fase experimental segunda. El efecto de Tolerancia Aguda Inducida por la administración de remifentanilo puede ser parcialmente evitada por la administración de inhibidores de la COX.***

La administración de remifentanilo indujo un efecto de tolerancia aguda al fármaco opioide (TAO), como se evidenció por una disminución en el porcentaje de reducción del valor de la CAM (el valor de la CAM aumentó) en el corto periodo de tiempo entre la segunda y tercera determinación de la CAM dentro de los animales del control (grupo de animales que sólo reciben remifentanilo; % de reducción de CAM en RMF-1 versus % de reducción de CAM en RMF-2;  $P < 0,001$ ). Cuando cualquiera de los cuatro fármacos inhibidores de la COX estudiados fueron administrados en el periodo después de la determinación de la reducción CAM de sevofluorano producida por la administración de remifentanilo (RMF-1) (ver Figura 4), el efecto de la tolerancia no se observó (momento RMF-2) (metamizol, ketoprofeno y parecoxib; T-test para muestras pareadas,  $P > 0.05$  versus grupo control) o fue incluso superior a la reducción observada previamente con remifentanilo únicamente, determinando una potenciación de la reducción de la CAM al mismo tiempo que la prevención de tolerancia al opioide (PRC, T-test para muestras pareadas,  $P = 0,000$ ). Sin embargo, se observó un efecto de tolerancia aguda al fármaco opioide cuando se inició la infusión continua de remifentanilo al mismo tiempo que se administraban los distintos fármacos inhibidores de la COX (grupo de control y grupos experimentales inhibidores; T-test para datos emparejados o relacionados; tiempo RMF-1 versus tiempo RMF-2,  $P < 0,05$ ).

---

### Resultados del Objetivo 3.

**A partir de los resultados derivados de los objetivos anteriores, determinar si puede obtenerse un mayor grado de potenciación combinando el fármaco opioide (remifentanilo) con dos de los inhibidores de la COX estudiados (paracetamol y parecoxib).  
Una primera aproximación plantea combinar fármacos con selectividad COX diferenciada.**

---

Como resumen introductorio, durante esta fase experimental del objetivo tres, se realizaron dos partes experimentales:

La primera y la segunda parte se realizaron conjuntamente en el segundo semestre de 2008. La primera parte experimental consistió en la observación de los efectos de paracetamol, parecoxib y la combinación de ambos sobre la CAM de sevoflurano. La segunda parte experimental consistió en las interacciones del paracetamol, el parecoxib y la combinación de ambos con el remifentanilo y como estas interacciones influyen la CAM de sevoflurano y los efectos de tolerancia aguda producidos por el remifentanilo. Durante la primera parte experimental se observaron efectos diferentes sobre la CAM de sevoflurano entre el paracetamol y el parecoxib, que podrían ser explicados por un diferente mecanismo de acción del paracetamol frente al parecoxib. Durante la segunda fase experimental se observó que el paracetamol a altas dosis potenció la reducción de la CAM de sevoflurano y que tanto paracetamol como parecoxib parecían bloquear los efectos de tolerancia aguda generados con la administración del fármaco opioide remifentanilo. Estos resultados podrían implicar en la práctica clínica una selección adecuada de los fármacos a la hora de influir sobre los efectos de los anestésicos

inhalatorios y de los fármacos que se administran conjuntamente durante una anestesia general.

Parte de los resultados de esta fase experimental fueron presentados en forma de comunicación oral (primera parte experimental) y de comunicación póster (segunda parte experimental) en el *10<sup>th</sup> World Congress of Veterinary Anaesthesia*, celebrado en Glasgow (Escocia, Reino Unido) en el otoño de 2009 y además, un artículo se encuentra en revisión para su publicación actualmente.

En esta fase experimental se utilizaron 72 ratas Wistar con un promedio de peso de  $344 \pm 42$  gramos (media  $\pm$  desviación estándar). La CAM basal de sevofluorano en las ratas fue similar en todos los grupos con un valor promedio de  $2,1 \pm 0,3$  %vol. (dentro de un rango de 1,6 a 2,8 %vol.; n=72).

En resumen, el paracetamol redujo significativamente la CAM en un 32% (dosis alta,  $p < 0,05$ ) y un 13% (dosis baja,  $p > 0,05$ ). El parecoxib no causó ninguna reducción de la CAM. La combinación de paracetamol:parecoxib redujo la CAM en un 16% ( $p < 0,001$ ) cuando se administran solos; sin embargo ninguna ventaja fue observada al proporcionar la combinación de los inhibidores de la COX sobre la administración de paracetamol solo o con remifentanilo.

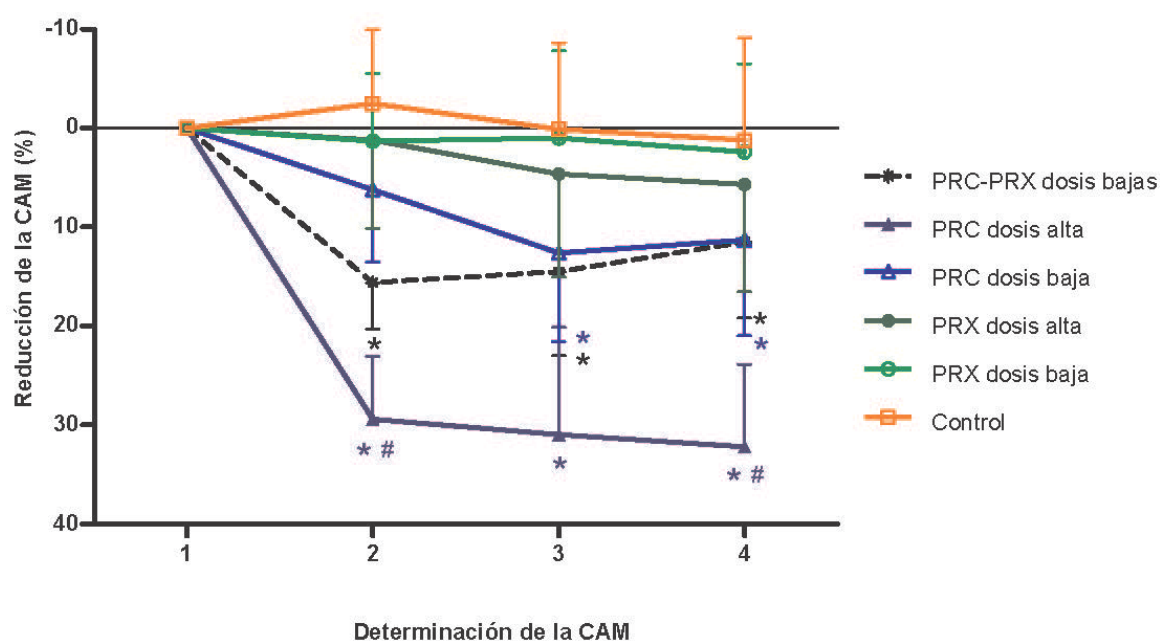
***Objetivo tres, fase experimental primera. Paracetamol (PRC), pero no parecoxib (PRX), redujo la CAM de sevofluorano de manera dosis dependiente. La coadministración de PRC con PRX no modificó los efectos conseguidos por el PRC sobre la CAM de sevofluorano cuando se administró de manera única.***

Cuando se administró paracetamol (PRC; dosis de 300 mg kg<sup>-1</sup>) la reducción del valor de la CAM de sevofluorano fue de un 32 ± 8% (CAM-2, CAM-3 y CAM-4 versus CAM basal o control; P < 0,05), y cuando se administró PRC (dosis de 150 mg kg<sup>-1</sup>) la reducción del valor de la CAM de sevofluorano no fue significativa 13 ± 9% (CAM-4; P > 0,05). La reducción máxima de la CAM de sevofluorano se determinó después de 4,5 h desde la administración de PRC (dosis 300 mg kg<sup>-1</sup>, CAM-4, P < 0,001). Por el contrario, el parecoxib (PRX) no produjo ninguna reducción significativa de la CAM, ni a la dosis de 15 mg kg<sup>-1</sup> ni a la dosis de 30 mg kg<sup>-1</sup> (en la determinación CAM-4; reducciones de 2 ± 9% y 5% ± 9, respectivamente). Por último, la administración conjunta de paracetamol: parecoxib (PRC: PRX; 150: 15 mg kg<sup>-1</sup>) produjo una reducción de la CAM de sevofluorano del 16 ± 5% (en la determinación CAM-2). La reducción de la CAM con la administración conjunta de PRC: PRX fue significativamente diferente de los animales controles en los tiempos de determinación CAM-2 y CAM-3 (P < 0,01 y P < 0,05, respectivamente). No hubo interacciones entre los grupos (dosis) y el tiempo (Tabla 10, Figura 6).

**Tabla 10.** CAM basal de sevofluorano (CAM-1 basal) y después de la administración de cualquiera de los fármacos inhibidores COX, o paracetamol (PRC, 150 o 300 mg kg<sup>-1</sup>), o parecoxib (PRX, 15 o 30 mg kg<sup>-1</sup>), o una combinación de paracetamol-parecoxib (PRC: PRX, 150: 15 mg kg<sup>-1</sup>) en ratas. La CAM de sevofluorano se determinó tres veces a partir de entonces en intervalos de 1.5 h (CAM-2, CAM-3 y CAM-4) (Parte primera de la fase experimental del objetivo 3). Los datos se expresan como medias  $\pm$  DE. \* Diferencias significativas frente a CAM-1 (CAM basal), mismo fármaco y dosis. ‡ Diferencias significativas de la CAM de sevofluorano con PRC (300 mg kg<sup>-1</sup>), mismo momento de determinación. Se consideraron diferencias significativas con un valor de P <0,05. (Test de Bonferroni). n = 8 animales / grupo.

Fármaco (mg kg <sup>-1</sup> )	Control (Salino)	PRC		PRX		PRC:PRX 150:15
		150	300	15	30	
CAM-1(basal)	2.2 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3
CAM-2	2.2 $\pm$ 0.2 <sup>‡</sup>	2.1 $\pm$ 0.3 <sup>‡</sup>	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>
CAM-3	2.2 $\pm$ 0.3 <sup>‡</sup>	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	2.1 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>
CAM-4	2.1 $\pm$ 0.3 <sup>‡</sup>	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>*‡</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	2.1 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	2.1 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>

**Figura 7.** Reducción de la concentración alveolar mínima de sevoflurano (CAM) producida por paracetamol (PRC; 150 o 300 mg kg<sup>-1</sup>), o parecoxib (PRX, 15 o 30 mg kg<sup>-1</sup>), o la combinación de ambos fármacos, paracetamol-parecoxib (PRC: PRX, PRC 150: PRX 15 mg kg<sup>-1</sup>) administrados vía intraperitoneal (IP) (fase experimental primera del objetivo 3)). Los datos se expresan como medias (DE). El tamaño de la muestra "n" es siempre 8 animales por grupo. \* Significativa reducción de la CAM de sevoflurano diferente de la CAM en el grupo de control (mismo tiempo). ‡ Significativa reducción de la CAM diferente de la reducción de la CAM producida por la combinación PRC: PRX, en el mismo tiempo de determinación. Valores significativo con un valor de P <0,05.



***Objetivo tres, fase experimental segunda. La reducción de la CAM de sevoflurano producida por la administración de una infusión continua de remifentanilo, es potenciada por la administración conjunta de paracetamol y parecoxib (PRC:PRX).***

Cuando se administró una infusión continua del fármaco opioide remifentanilo, la CAM de sevoflurano se redujo en un  $22 \pm 6\%$  (efecto pico en punto de determinación CAM-2) en comparación con la CAM de sevoflurano basal o control. Además se observó una reducción de la CAM de sevoflurano más pequeña 1,5 horas más tarde (es decir, 3 h después de que la infusión continua de remifentanilo comenzara), siendo entonces la reducción de la CAM de únicamente un  $9 \pm 6\%$  (en el punto de determinación CAM-3), lo que representa una disminución del  $14 \pm 5\%$  de la reducción frente a lo observado en el punto de determinación CAM-2 (CAM-3 versus CAM-2;  $P < 0.01$ ). La combinación PRC: PRX (150: 15 mg kg<sup>-1</sup>) produjo un aumento de la reducción de la CAM de sevoflurano inicialmente producida por el remifentanilo de  $30 \pm 5\%$ , (en punto de determinación de CAM-2;  $P < 0,05$ ), y de nuevo se produjo una reducción de la CAM más pequeña, reducción de la CAM de  $15 \pm 5\%$ , en el punto de determinación de CAM-3 (CAM-3 versus CAM-2;  $P < 0,001$ ).

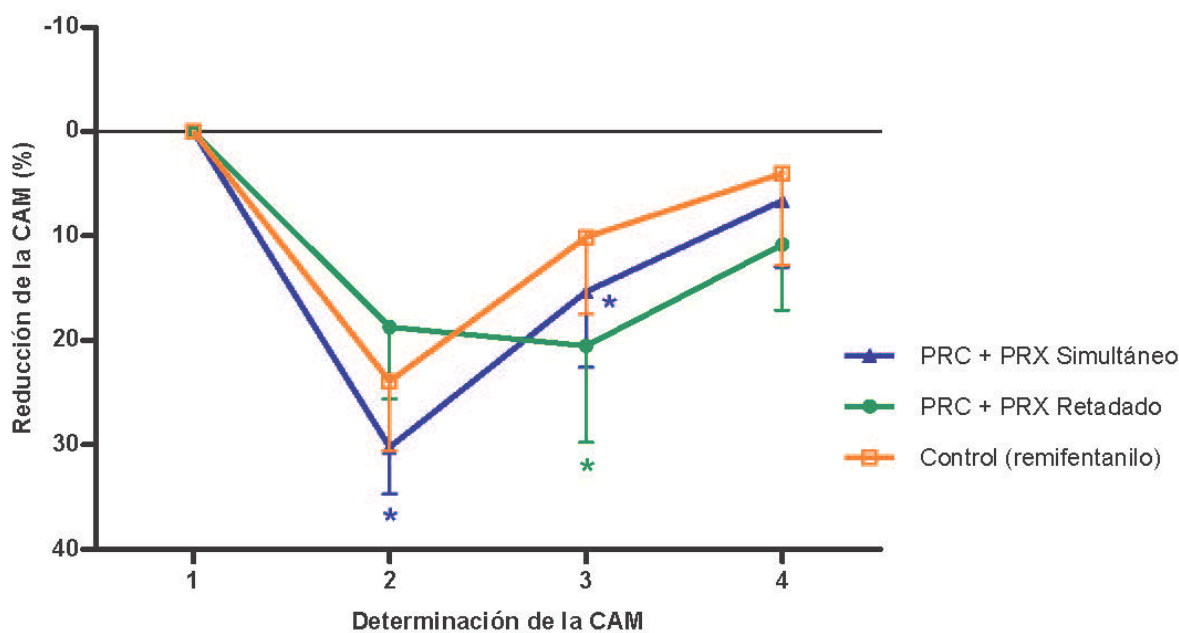
Cuando se administró conjuntamente el paracetamol; parecoxib (PRC: PRX) pero 1,5 horas después de que se iniciara una infusión continua de remifentanilo (administración retrasada), no se observó la disminución de la reducción de la CAM de sevoflurano (aumento de los valores de la CAM) observadas en el punto de determinación CAM-3 en los grupos anteriores en los que se había administrado remifentanilo (tolerancia aguda al opioide - TAO). Por último, cuando se interrumpió la infusión continua de remifentanilo, los valores de la CAM de sevoflurano observados (en punto de determinación CAM-4) que

fueron similares entre los distintos grupos y similares a los valores de la CAM basal determinados (punto de determinación CAM-1) (ver Tabla 6 y Figura 6).

**Tabla 11.** Concentración alveolar mínima basal de sevoflurano (CAM-1 basal), determinaciones de la CAM después de comenzar la administración de una infusión intravenosa de remifentanilo a velocidad constante (RMF) de (CAM-2 y CAM-3, respectivamente), y determinación de la CAM de sevoflurano después de parar la infusión de remifentanilo (CAM-4). La CAM de sevoflurano se determinó tres veces, posteriormente a la determinación de la CAM basal, a intervalos de 1,5 h, y el tiempo indicado es desde el inicio de remifentanilo (parte segunda de la fase experimental del Objetivo 3). Los datos se expresan como medias  $\pm$  DE. Los animales recibieron una combinación de paracetamol-parecoxib (PRC: PRX, 150: 15 mg kg<sup>-1</sup>) por vía intraperitoneal (IP), cuando se inició la infusión de remifentanilo (administración simultánea) o después de la determinación de CAM-2 con la infusión de remifentanilo (administración retrasada). A un grupo de control sólo se le administró la infusión de remifentanilo (120 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). \* Diferencias significativas versus CAM-1 (CAM basal), misma droga. ‡ Diferencias significativas versus CAM-4, en el mismo grupo.  $\infty$  diferencias significativas versus CAM en el grupo control, en el mismo tiempo. Las diferencias significativas se consideraron para un valor de P <0,05. (Test de Bonferroni). n = 8 animales / grupo.

Fármaco (mg kg <sup>-1</sup> )	RMF (Control)	RMF + PRC:PRX (Administración simultánea)	RMF + PRC:PRX (Administración retardada)
CAM-1(basal)	2.2 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2 <sup>‡</sup>	2.0 $\pm$ 0.3
CAM-2	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>*‡</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>*‡</sup>	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>
CAM-3	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>*‡</sup>	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>*‡</sup>	1.6 $\pm$ 0.4 <sup>*‡</sup>
CAM-4	2.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>*<math>\infty</math></sup>	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>

**Figura 8.** Reducción de la concentración alveolar mínima de sevoflurano (CAM) producida por una infusión de remifentanilo ( $120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) por vía intravenosa o la infusión de remifentanilo en combinación con la administración IP de paracetamol-parecoxib (PRC: PRX; PRC 150: PRX  $15 \text{ mg kg}^{-1}$ ; administrado de manera simultánea al comienzo de remifentanilo o administración retardada después del comienzo del remifentanilo) (parte dos de la fase experimental del objetivo 3). Los datos se expresan como medias  $\pm$  DE. El tamaño de la muestra "n" es siempre el valor 8 animales por grupo. \* Reducción significativamente diferente versus la CAM del grupo de control, al mismo tiempo de determinación. Se consideró un valor significativo cuando el valor de  $P < 0,05$ .





---

## DISCUSIÓN

---



---

## Objetivos 1 y 2.

**Caracterizar la potenciación producida por diferentes tipos de inhibidores de la enzima COX administrados por vía IV (ketoprofeno, ketorolaco, parecoxib, paracetamol, y metamizol) del efecto analgésico del remifentanilo en la rata y determinado en términos de reducción de la CAM del anestésico inhalatorio halogenado (sevofluorano). Determinar si la potenciación es similar independientemente de la dosis de inhibidor de la enzima COX empleado o si bien, es dosis dependiente, empleando un rango 'clínico' de dosis en la especie objeto de estudio.**

---

La reducción de la CAM de sevofluorano producida por remifentanilo puede ser potenciada por la administración de fármacos con acción inhibidora de la enzima COX. Sin embargo, estos medicamentos pueden variar en gran medida en su capacidad para potenciar dicha reducción, lo que sugiere que las combinaciones más adecuadas deben ser consideradas en términos de reducción de CAM y, probablemente, como efecto analgésico neto. Entre los inhibidores de la COX estudiados, únicamente el paracetamol consigue potenciar la reducción, ya conseguida, de la CAM de sevofluorano con remifentanilo, mientras que el metamizol, ketoprofeno y parecoxib no produjeron tal aumento en dicha reducción.

Los efectos de los opioides sobre la CAM se han utilizado para determinar su potencia analgésica relativa. En ratas, el remifentanilo reduce la CAM de isofluorano entre un 10% y un 60% con dosis que van desde 60 a 240  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Por lo tanto, una reducción de la CAM del 24% obtenida con el remifentanilo en este estudio a 120  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  es similar a la observada previamente (25%) (Criado y col. 2003), aunque con gran variabilidad interindividual. La diferente interacción entre el remifentanilo y los inhibidores de la COX estudiados está de acuerdo con las publicaciones previas en las que se ha observado una interacción supra-

aditiva entre la morfina y la aspirina (Gómez de Segura y col. 1988), mientras que una falta de interacción ha sido observada cuando se utilizó el AINE meloxicam, en ratas (Santos y col. 2004). Estudios similares realizados en otras especies animales no mostraron potenciación del efecto reductor de la CAM con la morfina al administrar flunixin meglumine en cabras (Doherty y col. 2004), un AINE preferencial de la enzima COX-1 utilizado comúnmente en la práctica veterinaria. Igualmente no se ha visto potenciación al utilizar butorfanol con meloxicam en conejos (Turner y col. 2006) o carprofeno en perros (Ko y col 2000). La magnitud de la potenciación producida por los inhibidores de la COX cuando se añaden a remifentanilo varía en un rango del 30% al 50% de aumento relativo en perros y conejos (Ko y col 2000; Ko y col 2009), y hasta un 70-80% de aumento relativo en ratas que recibieron morfina y aspirina (Gómez de Segura y col. 1998). La interacción observada podría ser producida a nivel espinal, donde tanto los fármacos opioides como los inhibidores de la COX actúan y esto puede parcialmente explicar sus efectos sobre la CAM, ya que un componente significativo de la CAM se produce en la médula espinal (Malmberg y col. 1993; Rampil y col. 1996).

Sin embargo, una limitación de los resultados en este estudio es que la extrapolación de los mismos a los seres humanos debe ser considerada con cautela. Se han observado diferencias relevantes entre las distintas especies con respecto a la acción tranquilizante y analgésica de los opioides. Por ejemplo, los seres humanos y los primates no humanos son muy sensibles a los efectos de los opioides, mientras que sus efectos en caballos y cerdos son menos pronunciados (Steffey y col. 1994). Estas diferencias también se han observado en su capacidad para reducir la CAM de los anestésicos halogenados; morfina a una dosis de  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  redujo la CAM del isoflurano entre un 50 y un 55% en perros y en monos rhesus, pero sólo un 13% en cerdos (Steffey y col. 1994). Como no se midieron las concentraciones plasmáticas de remifentanilo, no hay ninguna garantía de que los efectos observados no se vieran afectados por las fluctuaciones plasmáticas del remifentanilo durante el estu-

dio. De igual manera, la farmacocinética difiere entre las ratas y los seres humanos con un nivel de eliminación del fármaco mucho más alto en las ratas (Egan y col. 1996; Haidar y col. 1997).

La potenciación por los inhibidores de la COX de la reducción de la CAM de sevo-fluorano producida por remifentanilo podría basarse en la acción inhibidora de las diferentes isoenzimas COX (Simmons y col. 2004) aunque otros mecanismos no pueden ser descartados (Ammon y col. 2000; Anderson BJ, 2008). Entre otros mecanismos potenciales (Ammon y col. 2000; Watanabe y col. 2003) se ha observado una interacción sináptica entre los opioides y los AINEs, en la cual la activación del receptor mu provoca la inhibición presináptica de la liberación del transmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico mediada por los metabolitos del ácido araquidónico (Vaughan y col. 1997). En ratones se ha determinado un sinergismo variable en la antinocicepción entre los inhibidores de la COX y la morfina a nivel espinal en un modelo de dolor visceral, donde aparentemente los inhibidores preferenciales de la enzima COX-1 (Miranda y col. 2005) y los inhibidores selectivos de la COX-2 (Pinardi y col. 2005) mostraron un rango similar de interacción sinérgica con el opioide. Sin embargo, cuando se empleó un estímulo nociceptivo mecánico, como por ejemplo el estímulo supramáximo utilizado para determinar la CAM, no se observó ningún efecto como consecuencia de la interacción potencial entre la inhibición de la enzima COX y la acción opioide.

El ketoprofeno es un inhibidor de la COX no específico (Cryer y col. 1998) a diferencia del parecoxib, inhibidor selectivo de la COX-2, un profármaco del valdecoxib (Cheer y col. 2001). El paracetamol y el metamizol son agentes analgésicos y antihipertérmicos que carecen de actividad antiinflamatoria (Simmons y col. 2004). Recientemente se ha demostrado un potente efecto inhibidor sobre la enzima COX-2 y un efecto inhibidor moderado de la COX-1 por el paracetamol en los seres humanos (Hinz y col. 2008), con un perfil farmaco-

lógico similar a la de los inhibidores selectivos de la enzima COX-2. Por el contrario, no se ha descrito una acción similar del metamizol. Por lo tanto, una inhibición selectiva sobre las enzimas COX-1 y COX-2 no explica completamente los efectos observados en los resultados ya que el meloxicam, un inhibidor de la enzima COX-2, no logró producir el mismo efecto en ratas (Santos y col. 2004) pero si lo logró en perros (Yamashita y col. 2008). Por tanto, deben considerarse otros mecanismos potenciales, a pesar de la variación en la acción de los inhibidores de la enzima COX en las distintas especies.

Los efectos analgésico y antipirético, pero no los antiinflamatorios, del paracetamol se han atribuido a la activación de la isoenzima COX-3, también conocida como isoenzima COX-1b (Kis y col. 2006). Sin embargo, se han encontrado grandes diferencias entre la isoenzima COX-3 en perros y la misma isoenzima identificada en ratones y seres humanos (Chandrasekharan y col. 2002; Kis y col. 2005) por lo que la inhibición de la enzima COX producida por paracetamol sigue siendo poco clara. Entre otros posibles mecanismos, la activación de los receptores serotoninérgicos (5-HT) (Srikiatkhachorn y col. 1999; Courade y col. 2001; Jeong y col. 2004) y la activación de los receptores cannabinoides (Ottani y col. 2006), como así también los niveles de ácido nítrico, podrían estar involucrados en la potenciación del remifentanilo por medio del paracetamol (Anderson BJ, 2008).

La sensibilidad al dolor refleja un equilibrio entre los sistemas potenciadores o facilitadores del dolor y los sistemas inhibitorios del dolor y un aumento desequilibrante de este componente inhibitorio puede inducir un efecto de tolerancia (Shavit y col. 2005), mientras que un efecto hiperalgésico se obtendría cuando tal aumento se produce en el sistema facilitador del dolor. Con la introducción de un opioide de acción ultracorta como el remifentanilo, se ha puesto en evidencia la aparición de un efecto de tolerancia rápida en humanos (Vinik y col. 1998) no solo aumentando la percepción del dolor en el postoperatorio, sino también mitigando una reducción en la CAM de sevoflurano en un modelo experimental en ratas (Gó-

mez de Segura y col 2009). Sin embargo, también se ha descrito una ausencia de desarrollo de tolerancia aguda a opioides (TAO) después de procedimientos anestésicos que incluyen la administración de remifentanilo (Cortinez y col. 2001; Lee y col. 2005). La activación de las células glía, (Cortinez y col. 2001) y el aumento en citoquinas y quimoquinas proinflamatorias inducida por los fármacos opioides (Hutchinson y col. 2008; Shavit y col. 2005; Watkins y col. 2005) pueden contribuir al desarrollo de la tolerancia aguda a los opioides. Esto nos viene a demostrar que los inhibidores de la enzima COX estudiados mitigaron la aparición de tolerancia aguda a los opioides y además el paracetamol potenció a corto plazo, la reducción de la CAM por el remifentanilo.

En resumen, el uso de inhibidores de la enzima COX, ketoprofeno, metamizol y parecoxib, no proporcionó una potenciación consistente de los efectos reductores del remifentanilo sobre la CAM de sevoflurano. Sin embargo, esta potenciación si fue observada claramente para el paracetamol. El efecto de tolerancia aguda del remifentanilo fue mitigada por los fármacos inhibidores de la COX utilizados, aunque no fue prevenida o evitada, promoviendo su utilización combinada durante el periodo perioperatorio. Los resultados hallados vienen a sugerir que los inhibidores de las enzimas COX son realmente un grupo amplio que incluye fármacos con acciones diferentes y que por tanto interactuarían con el remifentanilo en grados diferentes. En conjunto, los resultados indican una gran utilidad potencial del paracetamol en combinación con el remifentanilo en el periodo perioperatorio, aunque la demostración de este uso conjunto en humanos y especies animales debe ser explorada con mayor profundidad.

---

**Objetivo 3.**

**Determinar si puede obtenerse un mayor grado de potenciación combinando el fármaco opioide (remifentanilo) con dos de los inhibidores de la enzima COX estudiados (paracetamol y parecoxib).**

---

El paracetamol, a diferencia del parecoxib, indujo una reducción relevante de la CAM de sevoflurano en ratas, y no se apreciaron más ventajas cuando ambos fármacos se administraron combinados. Sin embargo, la combinación de paracetamol-parecoxib potenció la reducción de la CAM ya producida por el remifentanilo. Debido a que ambos fármacos tienen acciones inhibitoras de la enzima COX, esto sugiere un mecanismo de acción adicional del paracetamol para explicar las diferencias observadas entre el paracetamol y el parecoxib. Una actividad canabinoide podría estar probablemente involucrada en la acción de este fármaco sobre la CAM de los anestésicos inhalatorios. La administración del paracetamol indujo una reducción de la CAM prolongada que duró varias horas (hasta 4 horas y media). Sin embargo, se observó un efecto máximo retardado cuando el paracetamol se administró a la vez que se iniciaba la infusión de remifentanilo, lo que sugiere que el paracetamol debe administrarse de forma preventiva.

En este estudio, se ha observado una reducción relativamente potente de la CAM con la administración paracetamol en la rata, y se han determinado efectos similares con la administración de opioides potentes en ratas. La eficacia de una formulación intravenosa del paracetamol se ha explorado para tratar el dolor postoperatorio (Uysal y col. 2011; Brodner y col. 2011), y se propone actualmente en la clínica para el tratamiento del dolor agudo (Power, 2011). Cuando el paracetamol se comparó con los inhibidores selectivos de la enzima COX-2, las diferencias en el consumo añadido de morfina eran demasiado

pequeñas para ser clínicamente significativas (Maund y col. 2011). Como ya hemos indicado, el parecoxib es un inhibidor COX-2 selectivo que se proporciona para aliviar el dolor inflamatorio (Padi y col. 2004) y fue el primer fármaco parenteral administrado como inhibidor selectivo de la COX-2 con el que se demostró una eficacia en el tratamiento del dolor postoperatorio en procedimientos quirúrgicos orales, procedimientos de cirugía ortopédica y procedimientos abdominales de ovariectomía (Lloid y col. 2009). A pesar de las similitudes entre paracetamol y parecoxib como inhibidores de la enzima COX, el paracetamol proporciona un grado claramente diferente en la reducción de la CAM como se ha determinado en este estudio.

Debido a que el paracetamol y los inhibidores selectivos de la enzima COX-2 pueden tener mecanismos de acción y efectos distintos, se ha sugerido su combinación con el fin de mejorar la acción analgésica de cualquiera de los fármacos administrados solos. El paracetamol se considera un fármaco de elección en los protocolos de analgesia multimodal, porque sus efectos antinociceptivos pueden ser medidos a través de diferentes sistemas nociceptivos. Sin embargo en las ratas, la combinación del paracetamol y parecoxib no proporcionó ninguna ventaja con respecto a la administración exclusiva de paracetamol, en términos de reducción de la CAM de sevoflurano. Este resultado concuerda con la falta de mejora en la eficacia analgésica de esta combinación en términos de consumo de opioides postoperatoriamente (Gehling y col. 2010).

Aunque cabría esperar una potenciación de la analgesia proporcionada por la combinación del paracetamol y el parecoxib (Miranda y col. 2006; Miranda y col. 2009), en este estudio no se observó ninguna ventaja con respecto a la administración de paracetamol solo, en términos de reducción de la CAM de sevoflurano. Es bien conocido que las terapias analgésicas que combinan agentes individuales con diferentes mecanismos de

acción tienen ventajas potenciales para el tratamiento del dolor leve a moderado en las áreas ambulatorias (Kehlet y col. 2003; Macario y col. 2010). Las combinaciones de fármacos con acción sinérgica aumentan la eficacia del tratamiento mediante el aumento de su efecto terapéutico, reduciendo los efectos colaterales por medio de la disminución de la dosificación o por ambos mecanismos (Raffa y col. 2003). El paracetamol puede potenciar sinérgicamente la analgesia producida por otros inhibidores de la enzima COX (por ejemplo los AINEs) (Miranda y col. 2006) y su combinación clínica específicamente con fármacos AINEs se ha sugerido para pacientes en el periodo perioperatorios (Hyllested y col. 2002) incluyendo aquellos con condiciones musculoesqueléticas (Hinz y col. 2007), dolor de origen dental, o dolor postoperatorio, permitiendo una reducción de la dosis de opioides y una mejora en la seguridad. Sin embargo, los resultados concuerdan con la falta de efectos analgésicos aditivos durante la anestesia inhalatoria, como previamente se ha publicado en pacientes humanos durante el periodo postoperatorio con las combinaciones de paracetamol y parecoxib (Gehling y col. 2010), paracetamol y rofecoxib (Pickering y col. 2006; Naesh y col. 2005) o de inhibidores selectivos de la COX-2 con otros analgésicos no opioides tales como la aspirina (Rimon y col. 2010). Por lo tanto, la ventaja terapéutica de estas combinaciones sigue siendo controvertida (Ong y col. 2010).

Los efectos del paracetamol y parecoxib sobre la CAM en este estudio, se han determinado mediante un modelo en ratas, y por lo tanto los resultados deberían ser extrapolados a la práctica clínica con cautela. Aunque se ha demostrado que el valor de la CAM es similar entre la mayoría de las especies utilizadas en medicina de animales de laboratorio (mamíferos), la reducción real de las necesidades de anestésicos por un determinado fármaco, como por ejemplo el paracetamol y el parecoxib, pueden variar mucho entre ellas. Por consiguiente los resultados, como ya hemos mencionado previamente, no deben extrapolarse directamente entre diferentes especies. Por otra parte,

los niveles plasmáticos de paracetamol, parecoxib, la combinación paracetamol -parecoxib y remifentanilo, no se midieron en este estudio y, de nuevo, no pueden ser descartadas variaciones en dichos niveles plasmáticos, aunque se tuvo especial cuidado para determinar los valores de la CAM en momentos temporales similares durante el estudio. También, y como ya se ha comentado anteriormente, deben considerarse las diferencias farmacocinéticas y alométricas entre ratas, otros mamíferos y los seres humanos, a la hora de extrapolar los resultados. En un estudio reciente, se ha determinado una reducción de la CAM del 18% en pacientes a los que se administró parecoxib, (Liu y col. 2012) mientras que en este estudio sólo se observó una reducción del 5% de la CAM en ratas. Además, las observaciones realizadas con este método de determinación de la CAM no son simplemente el resultado de los efectos antinociceptivos de los fármacos utilizados en esta fase experimental sino más bien son el resultado de las interacciones del anestésico inhalatorio con el paracetamol, el parecoxib o con la combinación paracetamol -parecoxib (Docquier y col. 2003). En cualquier caso, la interacción analgésico-hipnótica que produce una reducción de la CAM finalmente determina una reducción clínica de los requerimientos anestésicos inhalatorios, resultando en una anestesia más segura.

---

### **Limitaciones del estudio.**

---

Una de las limitaciones de estos estudios es el método utilizado para determinar las interacciones de los inhibidores de la COX y el remifentanilo bajo anestesia inhalatoria y que se basa en la determinación de la reducción de la CAM de sevoflurano (Quasha y col. 1980). Las determinaciones de la CAM durante las distintas fases experimentales de este estudio para completar los diferentes objetivos, fueron realizadas por una persona que no era ciega a los fármacos administrados. Sin embargo, la respuesta positiva de movimiento

ante un estímulo nociceptivo supramáximo es altamente objetivo y reproducible. Por otro lado todas las determinaciones de la CAM fueron siempre realizadas por la misma persona, reduciendo la posible influencia de la variabilidad entre distintos observadores en los resultados.

Otra limitación del método de la CAM a la hora de valorar diferentes interacciones entre diferentes analgésicos es que no se puede establecer un vínculo directo entre la potencia analgésica y la reducción de la CAM de manera intraoperatoria durante la anestesia inhalatoria y otros efectos además de cambios en el grado de analgesia podrían estar influenciando los cambios que se producen en la CAM de sevoflurano (Docquier y col. 2003). Fármacos analgésicos potentes como los opioides (Criado y col. 2003), los tranquilizantes (Hall y col. 1988; Heard y col. 1986), y como en este estudio, algunos inhibidores de la COX, disminuyen la CAM de una manera clínicamente significativa. Por consiguiente, la inmovilidad debida a la acción de los anestésicos inhalatorios y los efectos analgésicos no están necesariamente relacionados (Brosnan y col. 2009) ya que se ha observado un efecto variable sobre la CAM cuando se han considerado diferentes tipos de fármacos. Por otro lado, el modelo de la CAM utilizado en este estudio imita adecuadamente el periodo intraoperatorio y es por tanto de interés clínico (Aguado y col. 2013).

---

#### **Direcciones futuras de esta línea de investigación.**

---

A partir de las observaciones de los efectos diferenciados de diferentes inhibidores de la COX sobre la CAM se puede deducir que estos, y específicamente el paracetamol, poseen otros mecanismos de acción que están implicados en su interacción con los anestésicos inhalatorios, en su interacción con los analgésicos opiáceos, o con ambos. La aplicación

clínica en medicina humana y veterinaria de la combinación de todos estos fármacos durante el periodo perioperatorio requiere ampliar los estudios realizados hasta este momento. Por otro lado, las observaciones halladas con relación a los posibles efectos de tolerancia aguda a los opioides (TAO) y de hiperalgesia a los opioides, deben ser exploradas en mayor profundidad para conocer como los diferentes mecanismos de acción de los inhibidores de la enzima COX previenen, mitigan o bloquean estos efectos no deseados de los fármacos opioides en el ámbito clínico.

A partir de las observaciones de la interacción entre dos inhibidores de la COX, se puede deducir que deben estar implicados otros mecanismos de acción diferentes al inhibitorio sobre la enzima COX cuando se administra, por ejemplo, paracetamol (Anderson BJ, 2008). Se han sugerido, en otros experimentos con animales, otros mecanismos de acción para el paracetamol (Pickering y col. 2006), como por ejemplo interacciones con sistemas opiérgicos, sistemas relacionados con sustancias eicosanoides, y con rutas del óxido nítrico (Roca-Vinardell y col. 2003). Además se ha sugerido que los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> (Smith HS, 2009; Raffa y col. 2004; Jeong y col. 2004; Courade y col. 2001; Srikiatkhachorn y col. 1999;) y receptores endocannabinoides (Ottani y col. 2006) estarían implicados en los efectos antinociceptivos del paracetamol. Estudios previos han demostrado interacciones sinérgicas entre analgésicos opiáceos y cannabinoides (Cichewicz DL, 2004). De igual manera, se han propuesto mecanismos de acción que incluirían la interferencia con receptores de la sustancia P a nivel espinal o la inhibición de neuronas excitadas por la sustancia P, la activación de rutas inhibitorias descendentes suprasegmentales, un aumento en la secreción de  $\beta$ -endorfina pituitaria, y efectos directos sobre los potenciales de membrana neuronales (Miranda y col. 2006). En conclusión, consideramos de interés un estudio específico encaminado a determinar si receptores cannabinoides o receptores serotoninérgicos están implicados en la acción a nivel espinal o

supraespinal del paracetamol a la hora de potenciar la reducción de la CAM producida por los fármacos opiáceos. De hecho, un estudio adicional aún no publicado del grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo sugiere dicha implicación para explicar los efectos del paracetamol.

---

## CONCLUSIONES

---



A partir de los resultados obtenidos en este estudio y su análisis se consideran las siguientes conclusiones:

1. Los inhibidores de la COX potencian de manera diferenciada el efecto producido por la administración de remifentanilo sobre la concentración alveolar mínima de sevoflurano, siendo el paracetamol el fármaco más eficaz.
2. Dado que todos los inhibidores de la COX impidieron o limitaron el efecto de tolerancia al remifentanilo, una vez que este efecto se había establecido, la administración intraoperatoria, frente a la preoperatoria, de estos fármacos parece producir un efecto reductor de la concentración alveolar mínima de sevoflurano más adecuado.
3. El paracetamol, pero no el parecoxib, redujo la concentración alveolar mínima de sevoflurano.
4. La combinación del paracetamol y parecoxib redujo la concentración alveolar mínima; sin embargo, este último fármaco no incrementó el efecto producido por el paracetamol administrado de manera única.
5. La combinación paracetamol-parecoxib potenció aún más la reducción de la concentración alveolar mínima de sevoflurano producida por el remifentanilo.



---

---

## RESUMEN

---



La reducción de las necesidades de anestésicos inhalatorios mediante la coadministración de analgésicos intraoperatorios conlleva un incremento del margen de seguridad del paciente pero también una disminución de la polución ambiental y una reducción de costes. La combinación de diferentes tipos de analgésicos puede incrementar dicho efecto ahorrador de anestésico e incluso se ha observado un efecto potenciador derivado de la administración conjunta con de inhibidores de la ciclooxigenasa (COX; por ejemplo, antiinflamatorios no esteroideos – AINEs). Existen sin embargo trabajos recientes, y aparentemente contradictorios, que sugieren un diferente grado de potenciación analgésica (medido en términos de reducción de la Concentración Alveolar Mínima de un agente halogenado - CAM) de los opioides según el inhibidor de la COX coadministrado durante la anestesia inhalatoria.

Nuestra hipótesis planteaba que dicha potenciación del efecto analgésico producido por la asociación de opioides e inhibidores de la COX puede diferir según el fármaco inhibidor considerado, debido a una afinidad diferenciada (selectividad) por los tipos de receptor de la COX. Conceptualmente nuestra hipótesis planteaba que si determináramos que inhibidores de la COX son susceptibles de producir un mayor grado de potenciación en la reducción de la CAM de los opioides intraoperatorios, podríamos conocer que fármacos permiten una disminución de las necesidades de anestésicos inhalatorios mayor, y que finalmente se traduciría en un incremento de la seguridad para el paciente y el personal, y en un ahorro de los costes derivados.

Por tanto, el objetivo principal del estudio fue determinar la potenciación del efecto de los opioides, medidos en términos de reducción de la CAM, mediante la coadministración de un inhibidor de la COX o combinaciones de estos, caracterizando el grado de potenciación de aquellos grupos de mayor difusión clínica en medicina humana. Metodológicamente los objetivos del estudio fueron: 1) Caracterizar la potenciación producida por diferentes tipos de inhibidores de la COX administrados por vía IV (ketoprofeno, ketorolaco, parecoxib, parace-

tamol, y metamizol) del efecto analgésico del remifentanilo en la rata y determinado en términos de reducción de la CAM del anestésico inhalatorio halogenado (sevofluorano); 2) Determinar si la potenciación es similar independientemente de la dosis de inhibidor de la COX empleado o si bien, es dosis dependiente, empleando un rango 'clínico' de dosis en la especie objeto de estudio; y finalmente, 3) A partir de los resultados derivados de los objetivos anteriores, determinar si puede obtenerse un mayor grado de potenciación combinando el fármaco opioide (remifentanilo) con dos de los inhibidores de la COX estudiados (paracetamol y parecoxib). Una primera aproximación plantea combinar fármacos con selectividad COX diferenciada.

Para ello se emplearon 204 ratas de la cepa Wistar, adultas y macho, que fueron anestesiadas con sevofluorano vaporizado en oxígeno, intubadas traquealmente y monitorizadas. En todos los casos, las ratas recibieron remifentanilo y anestesia con sevofluorano y se determinó la CAM antes (CAM basal) y después del inicio del remifentanilo y/o el tratamiento correspondiente, al menos dos veces más en un intervalo separado por 1.5h. Para la consecución de los dos primeros objetivos, las ratas se agruparon al azar para recibir aleatoriamente o paracetamol o metamizol, o ketoprofeno o parecoxib o ketorolaco justo antes de una de las dos determinaciones de CAM posteriores a la CAM basal. Para el objetivo dos, el ketorolaco fue descartado. Para el objetivo tres, la CAM de sevofluorano se determinó antes y después de la administración intraperitoneal (IP) de paracetamol (dosis alta y baja), parecoxib (dosis alta y baja), su combinación (paracetamol: parecoxib), o solución salina. Finalmente, se determinaron los efectos de la CAM al administrar la combinación de paracetamol:parecoxib con remifentanilo. La CAM fue determinada de muestras de gas alveolar que se recogían al mismo tiempo que se realizaba el pinzamiento de la cola. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza para medidas repetidas y para evaluar comparativamente el efecto de los inhibidores de la COX se comparó la reduc-

ción de la CAM producida por remifentanilo en presencia o no de los inhibidores de la COX objeto de estudio.

El paracetamol potenció la reducción CAM producido por remifentanilo en ratas ( $P = 0,002$ ), mientras que el metamizol, el ketoprofeno y el parecoxib no pudieron producir tal efecto. Por otra parte, el paracetamol y el remifentanilo produjeron un grado máximo de reducción de la CAM del  $35 \pm 10\%$ , incluso cuando un efecto de tolerancia a remifentanilo se había observado en animales a los que se había administrado remifentanilo únicamente ( $P < 0,001$ ). Un efecto de tolerancia al remifentanilo no se observó cuando se administró metamizol, ketoprofeno, o parecoxib una vez que la infusión del fármaco opiáceo se había iniciado ( $P > 0,05$ ). El paracetamol redujo significativamente la CAM en un  $32 \pm 8\%$  (dosis alta,  $p < 0,05$ ) y un  $13 \pm 9\%$  (dosis baja,  $p > 0,05$ ). El parecoxib no causó ninguna reducción de la CAM. La combinación de paracetamol:parecoxib redujo la CAM en un  $16 \pm 5\%$  ( $p < 0,001$ ) cuando se administran solos; sin embargo ninguna ventaja fue observada al proporcionar la combinación de los inhibidores de la COX sobre la administración de paracetamol solo o con remifentanilo.

En conclusión, los inhibidores de la COX potencian de manera diferente el efecto analgésico producido por la administración de remifentanilo sobre la CAM de sevoflurano, siendo el paracetamol el fármaco más eficaz, especialmente si se administra simultáneamente con el inicio de la infusión de remifentanilo. Sin embargo, ya que todos los inhibidores de la COX impidieron un efecto de tolerancia a los opioides (TAO), una vez que este efecto se había establecido, la administración intraoperatoria en lugar de la preoperatoria de estos fármacos inhibidores de la COX es sugerida tras los resultados observados. Además el paracetamol, pero no el parecoxib, redujo la CAM de sevoflurano. La combinación de la paracetamol y parecoxib redujo también la CAM; sin embargo, no se proporcionó un efecto superior sobre la misma dosis utilizada de paracetamol administrado de manera única. Por otro lado, la

combinación paracetamol:parecoxib reduce aún más la reducción de la CAM ya conseguida por el remifentanilo.

---

---

## SUMMARY

---



The reduction of the requirements of inhalant anesthetics by coadministration of associated intraoperative analgesic drugs produces an increased margin of safety of the patient and furthermore a decrease in environment pollution and a reduction of costs. The combination of different pharmacological pain killers may increase the anesthetic sparing effect and it has even seen an enhancing effect derived from the combination therapy with inhibitors of cyclooxygenase enzyme (COX, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs - NSAIDs). However, there are recent studies seemingly contradictory which suggest a different level of analgesic potentiation of opioids drugs (measured in terms of reducing the Minimum Alveolar Concentration of halogenated agents - CAM) according to the coadministered COX inhibitor during inhalant anesthesia.

Our hypothesis was that the potentiation of the analgesic effect produced by the association of opioids and COX inhibitors may differ depending on the inhibitor drug considered due to a distinct affinity (selectivity) for the different types of COX receptors. Conceptually our hypothesis was that if we determined which COX inhibitors are more susceptible to produce a greater enhancement in reducing the intraoperative CAM produced by opioids drug, we would know which family of COX inhibitor drugs could allow a higher decrease of inhalants anesthetic requirements and finally as a result in, an increase in safety for the patient and the staff, and a saving of the costs involved.

Therefore, the main objective was to determine the potentiation of the sparing effect of an opioids drug, measured in terms of reduction in the CAM, by coadministration of a COX inhibitor or a combination of them, and further characterizing the degree of enhancement of those groups of greater clinical diffusion in human medicine. Methodologically the aims of the study were: 1) To characterize the enhancement produced by different types of COX inhibitors administered intravenously (ketoprofen, ketorolac, parecoxib, paracetamol and

metamizol) on the analgesic effect of remifentanil in rats and determined in terms of reducing the CAM of the halogenated inhalant anesthetic (sevoflurane); 2) To determine whether the enhancement is similar regardless of the dose of COX inhibitor used or whether, if it is dose dependent, using a 'clinical' range of dose in the testing species; and finally 3) From the results derived from the previous aims, to determine whether it could be obtained a greater degree of enhancement by the combination of the opioid drug (remifentanil) with two of the COX inhibitors studied (paracetamol and parecoxib). A first approach raises combine drugs with distinct COX inhibition selectivity.

For this purpose, 204 male adult Wistar rats were anesthetized with sevoflurane in oxygen, endotracheally intubated and monitored. In all cases, rats received remifentanil and inhalant anesthesia by sevoflurane and the CAM was determined before (CAM baseline) and at least twice in a range separated by 1.5h after a constant rate infusion of remifentanil had been started and / or the corresponding treatment administered. For the accomplishment of the first two aims, rats were randomly grouped to receive or paracetamol, or metamizole, or ketoprofen, or parecoxib, or ketorolac, just before one of the two post-baseline CAM determinations.

For the second aim, ketorolac was discarded. For the third aim, the CAM of sevoflurane was determined before and after intraperitoneal (IP) administration of paracetamol (paracetamol; high and low dose), or parecoxib (parecoxib, high and low dose), or a combination (paracetamol: parecoxib), or saline. Finally, the effects on the CAM were determined by administering the combination of paracetamol: parecoxib and remifentanil. The CAM was determined by alveolar gas samples that were collected while the tail clamping was performed. The results were statistically analyzed by analysis of variance for repeated measures and to evaluate comparatively the effect of different families of COX inhibitors, the increasing of

sparing-effect on the CAM produced by remifentanil in the presence or not of COX inhibitors was compared.

Paracetamol potentiated the CAM reduction produced by remifentanil in rats ( $P = 0.002$ ), whereas metamizole, ketoprofen, and parecoxib failed to produce such an effect. Furthermore, paracetamol and remifentanil produced a maximum degree of CAM reduction  $35 \pm 10\%$  even when a tolerance effect to remifentanil was observed in animals given remifentanil alone ( $P < 0.001$ ). A tolerance to remifentanil was not observed when metamizole, ketoprofen, or parecoxib was given once the opioid infusion has been started ( $P > 0.05$ ). Paracetamol significantly reduced the CAM by  $32 \pm 8\%$  (high dose,  $P < 0.05$ ) and  $13 \pm 9\%$  (low dose,  $P > 0.05$ ). Parecoxib did not cause any reduction of the CAM. The combination paracetamol:parecoxib reduced the CAM by  $16 \pm 5\%$  ( $P < 0.001$ ) when administered alone; however no advantage was provided over paracetamol alone or with remifentanil.

In conclusion, COX inhibitors differentially potentiate the analgesic effect produced by remifentanil on the sevoflurane CAM, and paracetamol was the most effective drug, especially if administered when the remifentanil infusion was started. However, since all COX inhibitors prevented a tolerance effect to opioids once it was established, intraoperative rather than preoperative administration of these drugs is suggested. Paracetamol, but not parecoxib, reduced the sevoflurane CAM, and this effect may involve cannabinoid receptors. The combination of paracetamol and parecoxib reduced the CAM; however, no advantage was provided over the same dose of paracetamol alone. Nevertheless, this combination further reduced the CAM reduction afforded by remifentanil.



---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abbott FV, Hellemans KGC. Phenacetin, acetaminophen and dipyron: analgesic and rewarding effects. *Behav Brain Res* 2000; 112: 177–186.
- Abbott FV, Bonder M. Options for management of acute pain in the rat. *Vet Rec* 1997; 140: 553–557.
- Ammon S, von Richter O, Hofmann U, Thon KP, Eichelbaum M, Mikus G. In vitro interaction of codeine and diclofenac. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1149–1152.
- Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatr Anaesth* 2008; 18: 915–921.
- Angst MS and Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 2006; 104: 570-587.
- Antognini JF. Intrathecal acetylsalicylic acid and indomethacin are not analgesic for a supramaximal stimulus. *Anesth Analg* 1993; 76: 1079-1082.
- Aranake A, Mashour GA, Avidan MS. Minimum alveolar concentration: ongoing relevance and clinical utility. *Anaesthesia* 2013; 68: 512-522.
- Beaver WT. Combination analgesics. *Am J Med* 1984; 77: 38-53.
- Bjorkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1995; 103: 1-44.
- Brandstater B. Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 1965; 26: 756–763.
- Brodner G, Gogarten W, Van Aken H, et al. Efficacy of intravenous paracetamol compared to dipyron and parecoxib for postoperative pain management after minor-to-intermediate surgery: a randomised, double-blind trial. *Eur J Anaesthesiol* 2011; 28: 125-132.
- Brosnan RJ, Pypendop BH, Siao KT and Stanley SD. Effects of remifentanil on measures of anesthetic immobility and analgesia in cats. *Am J Vet Res* 2009; 70: 1065-1071.

- Cabañero D, Campillo A, Celerier E, Romero A and Puig MM. Pronociceptive effects of remifentanil in a mouse model of postsurgical pain: effect of a second surgery. *Anesthesiology* 2009; 111: 1334-1345.
- Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2110-2124.
- Campillo A, Cabañero D, Romero A, Garcia-Nogales P and Puig MM. Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. *Eur J Pharmacol* 2011; 657: 89-96.
- Carlsson KH, Helmreich J, Jurna I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). *Pain* 1986; 27: 373–390.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13926–13931.
- Cheer SM, Goa KL. Parecoxib (parecoxib sodium). *Drugs* 2001; 61: 1133–1141.
- Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 520-523.
- Cichewicz DL. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci* 2004; 74: 1317-1324.
- Cooper DM, Hoffman W, Tomlinson K, Lee HY. Refinement of the dosage and dosing schedule of ketoprofen for postoperative analgesia in Sprague–Dawley rats. *Lab Anim (NY)* 2008; 37: 271–275 .
- Cortinez LI, Brandes V, Munoz HR, Guerrero ME, Mur M. No clinical evidence of acute opioid tolerance after remifentanil-based anaesthesia. *Br J Anaesth* 2001; 87: 866–869.

- Courade JP, Chassaing C, Bardin L, Alloui A, Eschali r A. 5-HT receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of acetaminophen in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 432: 1–7.
- Criado AB, Gomez de Segura IA. Reduction of isoflurane MAC by fentanyl or remifentanyl in rats. *Vet Anaesth Analg* 2003; 30: 250–256.
- Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 413–421.
- Deciga C, Lopez UG, Reval MI, Lopez M. Enhancement of antinociception by co-administration of an opioid drug (morphine) and a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 99-107.
- Delgado-Herrera L, Ostroff RD, Rogers SA. Sevoflurane: approaching the ideal inhalational anesthetic: a pharmacologic, pharmacoeconomic, and clinical review. *CNS Drug Rev.* 2001; 7: 48-120.
- Docquier MA, Lavand'homme P, Ledermann C, Collet V, De Kock M. Can determining the minimum alveolar anesthetic concentration of volatile anesthetic be used as an objective tool to assess antinociception in animals? *Anesth Analg* 2003; 97: 1033–1039.
- Doherty TJ, Will WA, Rohrbach BW, Geiser DR. Effect of morphine and flunixin meglumine on isoflurane minimum alveolar concentration in goats. *Vet Anaesth Analg* 2004; 31: 97–101.
- Egan TD, Minto CF, Hermann DJ, Barr J, Muir KT, Shafer SL. Remifentanyl versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology* 1996; 84: 821–833.
- Elia N, Lysakowski C, Tramer MR. Does multimodal analgesia with acetaminophen, nonsteroidal antiinflammatory drugs, or selective cyclooxygenase-2 inhibitors and patient-controlled analgesia morphine offer advantages over morphine alone? Meta-analyses of randomized trials. *Anesthesiology* 2005; 103: 1296-1304.

- Fu D, Guo Q, Ai Y, Cai H, Yan J, Dai R. Glial activation and segmental upregulation of interleukin-1b (IL-1b) in the rat spinal cord after surgical incision. *Neurochem Res* 2006; 31: 333–340.
- Gaitan G, Herrero JF. Subeffective doses of dexketoprofen trometamol enhance the potency and duration of fentanyl antinociception. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 393-398.
- Gehling M, Arndt C, Eberhart LH, Koch T, Kruger T, Wulf H. Postoperative analgesia with parecoxib, acetaminophen, and the combination of both: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients undergoing thyroid surgery. *Br J Anaesth* 2010; 104: 761-767.
- Gillies GW, Kenny GN, Bullingham RE, McArdle CS. The morphine sparing effect of ketorolac tromethamine. A study of a new, parenteral non-steroidal anti-inflammatory agent after abdominal surgery. *Anaesthesia* 1978; 42: 727-731.
- Gomez de Segura IA, Benito de la Vibora J, Aguado D. Opioid tolerance blunts the reduction in the sevoflurane minimum alveolar concentration produced by remifentanil in the rat. *Anesthesiology* 2009; 110: 1133–1138.
- Gomez de Segura IA, Criado AB, Santos M, Tendillo FJ. Aspirin synergistically potentiates isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesthesiology* 1998; 89: 1489–1494.
- Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D and Chauvin M. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* 2000; 93: 409-417.
- Haidar SH, Moreton JE, Liang Z, Hoke JF, Muir KT, Eddington ND. Evaluating a possible pharmacokinetic interaction between remifentanil and esmolol in the rat. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1278–1282.
- Hall RI, Schwieger IM, Hug CC Jr: The anesthetic efficacy of midazolam in the enflurane-anesthetized dog. *Anesthesiology* 1988; 68:862–866.

- Heard DJ, Webb AI, Daniels RT: Effect of acepromazine on the anesthetic requirement of halothane in the dog. *Am J Vet Res* 1986; 47:2113–2115.
- Hernandez-Delgadillo GP, Cruz SL. Dipyrrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrrone-treated and morphine-tolerant rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 502: 67–73.
- Hernandez-Delgadillo GP, Lopez-Munoz FJ, Salazar LA, Cruz SL. Morphine and dipyrrone co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. *European Journal of Pharmacology* 2003; 469: 71-79.
- Hinz B, Cheremina O, Brune K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J* 2008; 22: 383–390.
- Hinz B, Brune K. Antipyretic analgesics: nonsteroidal antiinflammatory drugs, selective COX-2 inhibitors, paracetamol and pyrazolinones. *Handb Exp Pharmacol* 2007: 65-93.
- Hinz B, Brune K. Pain therapy with antipyretic analgesics. *Orthopade* 2007; 36: 23-31.
- Hutchinson MR, Coats BD, Lewis SS, et al. Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 1178–1189.
- Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Sci World J* 2007; 7: 98–111.
- Hyllested M, Jones S, Pedersen JL, Kehlet H. Comparative effect of paracetamol, NSAIDs or their combination in postoperative pain management: a qualitative review. *Br J Anaesth* 2002; 88: 199-214.
- Ilkiw JE, Pascoe PJ, Tripp LD. Effects of morphine, butorphanol, buprenorphine, and U50488H on the minimum alveolar concentration of isoflurane in cats. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1198-1202.
- Ingram SL. Cellular and molecular mechanisms of opioid action. *Prog Brain Res* 2000; 129: 483-492.

- Ishizawa Y. Special article: general anesthetic gases and the global environment. *Anesth Analg*. 2011;112: 213-217.
- Jahr JS, Lee VK. Intravenous acetaminophen. *Anesthesiol Clin* 2010; 28: 619-45.
- Jeong CY, Choi JI, Yoon MH. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 502: 205–211.
- Khan KS, Hayes I, Buggy DJ. Pharmacology of anaesthetics II: inhalation anaesthetic agents Continuing Education in Anaesthesia, *Critical Care & Pain Journal* 2013: 25.
- Kehlet H, Werner MU. Role of paracetamol in the acute pain management. *Drugs* 2003; 63 Spec No 2: 15-22.
- Kehlet H, Dahl JB. The value of "multimodal" or "balanced analgesia" in postoperative pain treatment. *Anesth Analg* 1993; 77: 1048-1056.
- Kis B, Snipes JA, Gaspar T, Lenzser G, Tulbert CD, Busija DW. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. *Inflamm Res* 2006; 55: 274–278.
- Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1–7.
- Kissin I, Lee SS, Arthur GR and Bradley EL, Jr. Time course characteristics of acute tolerance development to continuously infused alfentanil in rats. *Anesth Analg* 1996; 83: 600-605.
- Ko JC, Weil AB, Inoue T. Effects of carprofen and morphine on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009; 45: 19–23.
- Ko JC, Lange DN, Mandsager RE, et al. Effects of butorphanol and carprofen on the minimal alveolar concentration of isoflurane in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 1025–1028.
- Koppert W, Wehrfritz A, Korber N, et al. The cyclooxygenase isozyme inhibitors parecoxib and paracetamol reduce central hyperalgesia in humans. *Pain* 2004; 108: 148-53.

- Kroin JS, Buvanendran A, Watts DE, Saha C, Tuman KJ. Upregulation of cerebrospinal fluid and peripheral prostaglandin E2 in a rat postoperative pain model. *Anesth. Pharmacol* 2006; 103; 334–343.
- Kroin JS, Ling ZD, Buvanendran A, Tuman KJ. Upregulation of spinal cyclooxygenase-2 in rats after surgical incision. *Anesthesiology* 2004; 100: 364–369.
- Lang E, Kapila A, Shlugman D, Hoke JF, Sebel PS, Glass PS. Reduction of isoflurane minimal alveolar concentration by remifentanyl. *Anesthesiology* 1996; 85: 721-728.
- Lee LH, Irwin MG, Lui SK. Intraoperative remifentanyl infusion does not increase postoperative opioid consumption compared with 70% nitrous oxide. *Anesthesiology* 2005; 102: 398–402.
- Liu Z, Lu H, He G, Ma H, Wang J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs reduce the stress response during sevoflurane anesthesia. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2012; 56:890-895.
- Lloyd R, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Intravenous or intramuscular parecoxib for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2009: CD004771.
- Macario A, Royal MA. A Literature Review of Randomized Clinical Trials of Intravenous Acetaminophen (Paracetamol) for Acute Postoperative Pain. *Pain Pract* 2010; 1:290-296.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology* 1993; 79: 270-281.
- Marret E, Kurdi O, Zufferey P, Bonnet F. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on patient-controlled analgesia morphine side effects: meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesthesiology* 2005; 102: 1249-1260.

- Maves TJ, Pechman PS, Meller ST, Gebhart GF. (1994) Ketorolac potentiates morphine antinociception during visceral nociception in the rat. *Anesthesiology* 1994; 80: 1094-1101.
- Maud E, McDaid C, Rice S, Wright K, Jenkins B, Woolacott N. Paracetamol and selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs for the reduction in morphine-related side-effects after major surgery: a systematic review. *Br J Anaesth* 2011; 106: 292-297.
- Mazario J, Herrero JF. Antinociceptive effects of metamizol (dipyrone) in rat single motor units. *Neurosci Lett* 1999; 274: 179–182.
- Merkel G, Eger EI. A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency. *Anesthesiology*. 1963; 24: 346-357.
- Miranda HF, Sierralta F, Prieto JC. Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2009; 92: 314-318.
- Miranda HF, Puig MM, Prieto JC, Pinardi G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* 2006; 121: 22-28.
- Miranda HF, Prieto JC, Pinardi G. Spinal synergy between nonselective cyclooxygenase inhibitors and morphine antinociception in mice. *Brain Res* 2005; 1049: 165–170.
- Monteiro ER, Teixeira-Neto FJ, Campagnol D, Alvaides RK, Garofalo NA and Matsubara LM. Effects of remifentanil on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs. *Am J Vet Res* 2010; 71: 150-156.
- Monteiro-Steagall BP, Steagall PVM, Lascelles, BDX. Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27: 1011–1019.
- Naesh O, Niles LA, Gilbert JG, et al. A randomized, placebo-controlled study of rofecoxib with paracetamol in early post-tonsillectomy pain in adults. *Eur J Anaesthesiol* 2005; 22: 768-773.

- Olofson E, Sleight JW, Dahan A. The influence of remifentanyl on the dynamic relationship between sevoflurane and surrogate anesthetic effect measures derived from the EEG. *Anesthesiology* 2002; 96: 555–564.
- Ong CK, Seymour RA, Lirk P, Merry AF. Combining paracetamol (acetaminophen) with nonsteroidal antiinflammatory drugs: a qualitative systematic review of analgesic efficacy for acute postoperative pain. *Anesth Analg* 2010; 110: 1170-1179.
- Oscier CD, Milner QJ. Peri-operative use of paracetamol. *Anaesthesia* 2009; 64: 65-72.
- Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 2006; 531: 280–281.
- Padi SSV, Jain NK, Singh S, Kulkarni SK. Pharmacological profile of parecoxib: a novel, potent injectable selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Eur J Pharmacol* 2004; 491: 69–76.
- Pickering G, Lorient MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: 371-378.
- Pinardi G, Prieto JC, Miranda HF. Analgesic synergism between intrathecal morphine and cyclooxygenase-2 inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82: 120–124.
- Power I. An update on analgesics. *Br J Anaesth* 2011; 107: 19-24.
- Quasha AL, Eger EI, Tinker JH. Determination and applications of MAC. *Anesthesiology* 1980; 53: 315-334.
- Raffa RB, Walker EA, Sterious SN. Opioid receptors and acetaminophen (paracetamol). *Eur J Pharmacol* 2004; 503: 209-210.
- Raffa RB, Clark-Vetri R, Tallarida RJ, Wertheimer AI. Combination strategies for pain management. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 1697-1708.

- Raffa RB, Stone DJ, Jr., Tallarida RJ. Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 291-294.
- Rampil IJ, King BS. Volatile anesthetics depress spinal motor neurons. *Anesthesiology* 1996; 85: 129-134.
- Remy C, Marret E, Bonnet F. Effects of acetaminophen on morphine side-effects and consumption after major surgery: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Anaesth* 2005; 94: 505-513.
- Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, et al. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 28-33.
- Roca-Vinardell A, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Mico JA. The role of 5-HT1A/B autoreceptors in the antinociceptive effect of systemic administration of acetaminophen. *Anesthesiology* 2003; 98: 741-747.
- Saidman LJ, Eger EI. Effect of Nitrous Oxide and of narcotic premedication on the alveolar concentration of halothane required for anesthesia. *Anesthesiology* 1964; 25: 302-306.
- Santos M, Kunkar V, Garcia-Iturralde P, Tendillo FJ. Meloxicam, a specific COX-2 inhibitor, does not enhance the isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesth Analg* 2004; 98: 359-363.
- Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet* 2003; 361: 981-982.
- Shavit Y, Wolf G, Goshen I, Livshits D, Yirmiya R. Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. *Pain* 2005; 115: 50-59.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 387-437.
- Smith HS. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician* 2009; 12: 269-280.

- Srikiatkachorn A, Tarasub N, Govitrapong P. Acetaminophen-induced antinociception via central 5-HT(2A) receptors. *Neurochem Int* 1999; 34: 491–498.
- Steffey EP, Khursheed RM, Brosnan RJ. Chapter 16: Inhalation Anesthetics. The Fifth Edition of Lumb and Jones. © 2015 John Wiley & Sons, Inc. Published 2015 by John Wiley & Sons, Inc. Pages 297-323.
- Steffey EP, Baggot JD, Eisele JH, et al. Morphine-isoflurane interaction in dogs, swine and rhesus monkeys. *J Vet Pharmacol Ther* 1994; 17: 202–210.
- Troster A, Sittl R, Singler B, Schmelz M, Schuttler J and Koppert W. Modulation of remifentanil-induced analgesia and postinfusion hyperalgesia by parecoxib in humans. *Anesthesiology* 2006; 105: 1016-1023.
- Turner PV, Kerr CL, Healy AJ, Taylor WM. Effect of meloxicam and butorphanol on minimum alveolar concentration of isoflurane in rabbits. *Am J Vet Res* 2006; 67: 770–774.
- Uysal HY, Takmaz SA, Yaman F, Baltaci B, Basar H. The efficacy of intravenous paracetamol versus tramadol for postoperative analgesia after adenotonsillectomy in children. *J Clin Anesth* 2011; 23: 53-57.
- Vaughan CW. Enhancement of opioid inhibition of GABAergic synaptic transmission by cyclo-oxygenase inhibitors in rat periaqueductal grey neurones. *Br J Pharmacol* 1998;123: 1479-1481.
- Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 1997; 390: 611-614.
- Vinik HR, Kissin I. Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans. *Anesth Analg* 1998; 86: 1307–1311.
- Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: New forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 2004; 18, 790–804.

- Watanabe C, Okuda K, Sakurada C, Ando R, Sakurada T, Sakurada S. Evidence that nitric oxide-glutamate cascade modulates spinal antinociceptive effect of morphine: a behavioural and microdialysis study in rats. *Brain Res* 2003; 990: 77–86.
- Watkins LR, Hutchinson MR, Johnston IN, Maier SF. Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci* 2005; 28: 661–669.
- Williams JT. The painless synergism of aspirin and opium. *Nature* 1997; 390: 557-559.
- Yamashita K, Okano Y, Yamashita M, Umar MA, Kushiuro T, Muir WW. Effects of carprofen and meloxicam with or without butorphanol on the minimum alveolar concentration of sevoflurane in dogs. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 29–35.
- Yoo KY, Jeong CW, Kim SJ, Jeong ST, Kim WM, Lee HK, Oh KJ, Lee JU, Shin MH and Chung SS. Remifentanyl decreases sevoflurane requirements to block autonomic hyperreflexia during transurethral litholapaxy in patients with high complete spinal cord injury. *Anesth Analg* 2011; 112: 191-197.
- Zanuzzo FS, Teixeira-Neto FJ, Teixeira LR, Diniz MS, Souza VL, Thomazini CM, Steagall PV. Analgesic and antihyperalgesic effects of dipyron, meloxicam or a dipyron-meloxicam combination in bitches undergoing ovariohysterectomy. *Vet J* 2015; 205: 33-37.
- Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyron. *Br J Pharmacol* 2007;151:494-503.
- Rezende RM, Franca DS, Menezes GB, dos Reis WG, Bakhle YS, Francischi JN. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2008;153:760-8.
- Tortorici V, Aponte Y, Acevedo H, Nogueira L, Vanegas H. Tolerance to non-opioid analgesics in PAG involves unresponsiveness of medullary pain-modulating neurons in male rats. *Eur J Neurosci* 2009;29:1188-96.

- Escobar W, Ramirez K, Avila C, Limongi R, Vanegas H, Vazquez E. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *Eur J Pain* 2012;16:676-89.
- Hernandez-Delgadillo GP, Cruz SL. Endogenous opioids are involved in morphine and dipyrrone analgesic potentiation in the tail flick test in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;546:54-9.
- Tortorici V, Vanegas H. Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *Eur J Neurosci* 2000;12:4074-80.
- Tsagareli MG, Nozadze I, Tsiklauri N, Gurtskaia G. Tolerance to Non-Opioid Analgesics is Opioid Sensitive in the Nucleus Raphe Magnus. *Front Neurosci* 2011;5:92.
- Edwards J, Meseguer F, Faura C, Moore RA, McQuay HJ, Derry S. Single dose dipyrrone for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD003227.
- Ohnesorge H, Bein B, Hanss R, Francksen H, Mayer L, Scholz J, Tonner PH. Paracetamol versus metamizol in the treatment of postoperative pain after breast surgery: a randomized, controlled trial. *Eur J Anaesthesiol* 2009;26:648-53.
- Caliskan E, Sener M, Kocum A, Ozyilkan NB, Ezer SS, Aribogan A. The efficacy of intravenous paracetamol versus dipyrrone for postoperative analgesia after day-case lower abdominal surgery in children with spinal anesthesia: a prospective randomized double-blind placebo-controlled study. *BMC anesthesiology* 2013;13:34.
- Steffen P, Krinn E, Möller A, Seeling W, Rockemann MG. Metamizol and diclofenac profoundly reduce opioid consumption after minor trauma surgery. *Acute Pain* 2002;4:71-5.
- Schug SA, Manopas A. Update on the role of non-opioids for postoperative pain treatment. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007;21:15-30.
- Lopez-Munoz FJ, Godinez-Chaparro B, Huerta-Cruz JC, Guevara-Lopez U, Dominguez-Ramirez AM, Cortes-Arroyo AR. The antinociceptive efficacy of morphine, metamizol, or

their combination in an experimental rat model with different levels of inflammatory pain.

Pharmacol Biochem Behav 2008;91:196-201.

Baumgartner CM, Koenighaus H, Ebner JK, Henke J, Schuster T, Erhardt WD.

Cardiovascular effects of dipyrone and propofol on hemodynamic function in rabbits. Am

J Vet Res 2009;70:1407-15.

---

## **PUBLICACIONES Y TRABAJOS EN FASE DE REVISIÓN**

---



# Remifentanil and cyclooxygenase inhibitors interactions in the minimum alveolar concentration of sevoflurane in the rat

J. Benito<sup>1,4</sup>, D. Aguado<sup>1</sup>, M. B. Abreu<sup>2</sup>, J. García-Fernández<sup>3</sup> and I. A. Gómez de Segura<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Experimental Surgery and <sup>3</sup> Department of Pediatric Anaesthesiology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Present address: Comparative Pain Research Laboratory, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University (NCSU), Raleigh, NC, USA

\* Corresponding author. E-mail: iagsegura@vet.ucm.es

## Key points

- Opioids and cyclooxygenase (COX) inhibitors reduce anaesthetic requirements.
- But do COX inhibitors given with opioids spare anaesthetics further?
- In this study, only paracetamol but not metamizole, ketoprofen, or parecoxib, reduced the minimum alveolar concentration of sevoflurane in rats when given with remifentanil, compared with remifentanil alone.
- Not all COX inhibitors are the same!

**Background.** Intraoperative opioids reduce anaesthetic requirements and thus limit the side-effects derived from high doses of the latter. Cyclooxygenase (COX) inhibitors can also be given but it remains unclear whether they further reduce the anaesthetic requirements. Our aim was to determine whether COX inhibitors potentiate the effect of remifentanil on the minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane anaesthetized rats.

**Methods.** Male Wistar rats received remifentanil under sevoflurane anaesthesia, and the MAC was determined before and at two time intervals after, separated by 1.5 h. Rats were randomly allocated to receive paracetamol, metamizole, ketoprofen, or parecoxib just before one of the two studied time intervals. The MAC was determined from alveolar gas samples at the time of tail clamp. Data were analysed with an analysis of variance for repeated measures.

**Results.** Paracetamol potentiated the MAC reduction produced by remifentanil in rats ( $P=0.002$ ), whereas metamizole, ketoprofen, and parecoxib failed to produce such an effect. Furthermore, paracetamol and remifentanil produced a maximum degree of MAC reduction [35 (10)%] even when a tolerance effect to remifentanil was observed in animals given remifentanil alone ( $P<0.001$ ). A tolerance to remifentanil was not observed when metamizole, ketoprofen, or parecoxib was given once the opioid infusion has been started ( $P>0.05$ ).

**Conclusions.** COX inhibitors differentially potentiate the analgesic effect produced by remifentanil on the sevoflurane MAC, and paracetamol was the most effective drug. However, since all COX inhibitors prevented a tolerance effect to opioids once it was established, intraoperative rather than preoperative administration of these drugs is suggested.

**Keywords:** anaesthetics volatile, sevoflurane; analgesics opioid, remifentanil; complications, drug tolerance; model, rat; pain, acute

Accepted for publication: 29 June 2010

Opioids are given under general anaesthesia to provide adequate intraoperative analgesia but also to reduce the requirements of anaesthetics and thus reduce their side-effects. Other analgesics are also given to potentiate the analgesic effect such as cyclooxygenase (COX) inhibitors, most of them also known as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). However, the potential interference with opioids to reduce halogenated anaesthetic requirements remains unclear and contradictory experimental results in animals have been reported.<sup>1 2</sup>

The relative potency of analgesic drugs during inhalation anaesthesia has been determined through their reduction of the minimum alveolar concentration (MAC) of

halogenated anaesthetics<sup>3 4</sup> where a typical dose–response effect has been observed.<sup>5</sup> A previous study in rats<sup>2</sup> determined a potentiation of the effect of morphine on the MAC of isoflurane by aspirin, a covalent modifier of COX-1, where only one-third of the morphine dose was necessary, when combined with the NSAID, to reduce the MAC of isoflurane to a similar degree. Since aspirin alone did not provide any sparing effect on isoflurane requirements, a synergistic effect was determined. However, a similar study, where the preferential COX-2 meloxicam was used, failed to demonstrate a synergistic or additive effect on the MAC of isoflurane.<sup>1</sup> The observed difference might be a consequence of the differential action on COX receptors. There are no



**PARACETAMOL AND PARECOXIB EFFECTS ON THE MINIMUM  
ALVEOLAR CONCENTRATION (MAC) OF SEVOFLURANE IN  
THE RAT**

Journal:	<i>British Journal of Anaesthesia</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Laboratory Investigation
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Benito, Javier; North Carolina State University, Clinical Sciences Aguado, Delia; University Complutense, Animal Medicine and Surgery Abreu, Mariana; University Complutense, Animal Medecine and Surgery; La Paz University Hospital, Experimental Surgery Garcia-Fernandez, Javier; Puerta de Hierro University Hospital, Anaesthesia and Critical Care Gomez de Segura, Ignacio; University Complutense, Animal Medicine and Surgery
Key Words:	Anaesthetics volatile - sevoflurane, Analgesics non-opioid, Pain - experimental, Rat, Analgesics non-opioid - acetaminophen

1  
2  
3 **PARACETAMOL AND PARECOXIB EFFECTS ON THE MINIMUM ALVEOLAR**  
4 **CONCENTRATION (MAC) OF SEVOFLURANE IN THE RAT**  
5  
6  
7  
8  
9

10 *Javier Benito D.V.M. \*<sup>†</sup>, Delia Aguado D.V.M. \*<sup>#</sup>, Mariana B. Abreu D.V.M. \*<sup>#</sup>, Javier*  
11 *García-Fernández Ph.D., M.D. ‡, Ignacio A. Gómez de Segura Ph.D., D.V.M.\*.*  
12  
13  
14

15  
16  
17  
18 \* Dept. of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty. Complutense  
19 University (UCM), Madrid, Spain.  
20

21  
22 # Dept. of Experimental Surgery, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.  
23

24 ‡ Dept. of Anaesthesia and Critical Care, Puerta de Hierro University Hospital,  
25 Majadahonda, Madrid, Spain.  
26  
27

28  
29  
30 † Current address: Comparative Pain Research Laboratory, Dept. of Clinical  
31 Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University  
32 (NCSU), Raleigh, NC, USA.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 Corresponding author:

41 Dr. Ignacio A. Gómez de Segura,

42 Dept. of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty,

43 Complutense University (UCM)

44 Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid, Spain

45 Tel.: +34 913 943 858

46 Fax: +34 913 943 808

47 E-mail: [jgsegura@vet.ucm.es](mailto:jgsegura@vet.ucm.es)  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 *Running head: Paracetamol and parecoxib effects on Sevoflurane MAC.*  
4

5  
6 *Summary Statement:* Paracetamol reduced the minimum alveolar concentration  
7 (MAC) of sevoflurane, and this effect may involve cannabinoid receptors. The  
8 combination of paracetamol and parecoxib reduced the MAC; however, no  
9 advantage was provided over the same dose of paracetamol alone. This  
10 combination of drugs potentiated the MAC reduction produced by remifentanyl in the  
11 rat.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

**ABSTRACT**

Background: The aim was to determine the effects of paracetamol (PRC), parecoxib (PRX) and the combination of paracetamol and parecoxib (PRC:PRX) on the minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in rats. The interaction of the combination PRC:PRX with remifentanyl on the MAC and the mechanism of action involved in anaesthetic immobilisation when PRC is combined with inhalant anaesthetics was also explored.

Methods: Eighty-four adult male Wistar rats were anaesthetised with sevoflurane. First, the sevoflurane MAC was determined before and after intraperitoneal (IP) administration of PRC (low and high doses), PRX (low and high doses), their combination (PRC:PRX) or saline. In a second experiment, the effects of PRC:PRX combined with remifentanyl on the MAC were determined. Finally, the effects of serotonin and cannabinoid blockade on the effects of PRC on the MAC were determined.

Results: PRC significantly reduced the MAC by  $32\pm 8\%$  (high dose,  $p<0.05$ ) and  $13\pm 9\%$  (low dose,  $p>0.05$ ). PRX did not cause any reduction of the MAC. The combination PRC:PRX reduced the MAC by  $16\pm 5\%$  ( $p<0.001$ ) when administered alone; however no advantage was provided over PRC alone or with remifentanyl. Antagonism of CB1 receptors, but not of serotonin receptors, partially blocked the MAC reduction produced by PRC (high dose;  $17\pm 7\%$ ,  $p<0.05$ ).

Conclusions: PRC, but not PRX, reduced the sevoflurane MAC, and this effect may involve cannabinoid receptors. The combination of PRC and PRX reduced the MAC; however, no advantage was provided over the same dose of PRC alone. Nevertheless, this combination further reduced the MAC reduction afforded by remifentanyl.

**Key words:** paracetamol; parecoxib; sevoflurane; inhalant anaesthetics; minimum alveolar concentration.

## INTRODUCTION

Paracetamol (acetaminophen, PRC) is one of the most widely used non-opioid analgesics, and its use includes the perioperative period.<sup>1,2</sup> In comparison to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), PRC possesses a very low anti-inflammatory activity<sup>3</sup> but a potent analgesic effect with minimal associated risk of bleeding in thrombocytopenic patients and reduced gastrointestinal side effects.<sup>4</sup> The mechanism of action of PRC remains unclear,<sup>5,6</sup> and central as well as peripheral mechanisms have been identified.<sup>7-9</sup> PRC was initially identified as a COX-3 isoenzyme inhibitor<sup>10,11</sup> although it has COX-2 inhibitory properties as well.<sup>6</sup> Other mechanisms of action have been proposed to explain its actions,<sup>12</sup> including interactions with opioidergic systems, eicosanoid systems, and/or nitric oxide pathways.<sup>13</sup> Furthermore, endocannabinoid signalling may play a role in PRC activation of the serotonergic descending inhibitory pathways.<sup>7,14</sup>

Because of the unique characteristics of PRC, a clinical approach has been to combine this drug with traditional COX inhibitors (NSAIDs) to increase drug efficacy in scenarios such as acute postoperative pain.<sup>15</sup> However, studies focused on the intraoperative period are sparse. In animal models using the acetic acid abdominal constriction test of mice (writhing test), PRC produced a synergistic analgesic action when combined with NSAIDs.<sup>16</sup> A controlled clinical trial of the combination of parecoxib (PRX) and PRC in patients undergoing thyroid surgery failed to demonstrate any advantage of the combination over individual drug effects in terms of postoperative opioid consumption.<sup>2</sup> Although the claimed opioid-sparing effect of PRC remains controversial.<sup>17-19</sup> NSAIDs are frequently commonly combined with potent opioids such as remifentanyl in the intraoperative period.

An indirect although clinically valuable method of determining the relative analgesic potency of drugs in the intraoperative period is the determination of the reduction of the minimum alveolar concentration (MAC) of an inhalant anaesthetic.<sup>20</sup> Relevant differences have been observed in the ability of NSAIDs to

1  
2  
3 reduce the MAC in the rat,<sup>21,22</sup> and recently, a potent MAC-sparing action of PRC  
4 has been observed in this species when combined with the opioid remifentanil.<sup>23</sup>  
5  
6

7 We hypothesised that PRC effects on the MAC might be different compared to  
8 NSAIDs because a different mechanism of action is involved and these effects might  
9 be potentiated by the NSAID. Therefore, the aim of this study was to determine the  
10 effects of PRC, PRX and the combination of PRC and PRX on the sevoflurane MAC in  
11 rats. Additionally, we aimed to evaluate the interaction of the combination of these  
12 drugs with remifentanil on the MAC. Finally, the involvement of serotonergic and  
13 cannabinoid receptors on the observed effects was explored.  
14  
15  
16  
17  
18  
19

## 20 21 22 **MATERIALS AND METHODS** 23

24 The study was performed after obtaining Institutional Animal Care Committee  
25 approval (La Paz University Hospital, Madrid, Spain). Eighty-four adult male Wistar  
26 rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) that weighed  $344 \pm 42$  g (mean  
27  $\pm$  SD) were housed in groups of 4-6 in cages (Macrolon Type IV) with a 12 hour  
28 light-12 hour dark cycle, a relative humidity of 40-70%, and a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  ambient  
29 temperature. Food (B&K Universal) and water were provided *ad libitum*. Animals  
30 were allowed to acclimatise for at least 1 week before the experiments started. All  
31 of the studies were performed during the morning (starting at 9:00 am).  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 Rats were placed in an induction chamber into which 8% sevoflurane (Sevorane;  
41 Abbott Laboratories, Madrid, Spain) in a continuous oxygen flow of  $3 \text{ L min}^{-1}$  was  
42 directed (Sevoflurane Vaporizer, Sevorane Dragër Vapor 2000). Endotracheal  
43 intubation was performed using a 14-gauge polyethylene catheter (Terumo Surflo  
44 IV Catheter) with the animal positioned in sternal recumbency. A flexible, blunt-tip  
45 wire guide was inserted into the trachea with an otoscope and was used to direct  
46 the endotracheal catheter. After the position of the catheter was ascertained, it was  
47 connected to a small T-piece breathing system with minimal dead space. Fresh gas  
48 flow to the T-piece was adjusted to  $1 \text{ L min}^{-1}$  of oxygen (100%), and the  
49 sevoflurane concentration was adjusted to 1.5xMAC (3.5%-4%). The absence of  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 the pedal reflex to toe pinch was also verified during this period. The rats were kept  
4  
5 under spontaneous ventilation during the entire experiment. In the rats in  
6  
7 Experiment 2, remifentanyl (Ultiva; Glaxo-Wellcome Laboratories, Madrid, Spain)  
8  
9 was administered with an infusion pump (Syringe pump, model Sep11S, Ascor S.A.,  
10  
11 Medical Equipment, Warsaw, Poland) by means of a 22-gauge polyethylene  
12  
13 catheter inserted in a lateral tail vein.

#### 14 15 16 17 Monitoring

18  
19 Arterial oxygen hemoglobin saturation (via pulseoximetry) and heart and  
20  
21 respiratory rates were monitored continuously (RGB Medical Devices, Madrid,  
22  
23 Spain). Rectal temperature was also monitored and was maintained between 37.0  
24  
25 °C and 38.5 °C by means of a water-circulating warming blanket (Heat Therapy  
26  
27 Pump, Model TP-220; Gaymar, Orchard Park, NY) and a heating lamp.

#### 28 29 30 Determination of the sevoflurane MAC

31  
32 Intratracheal gas sampling was used to measure anaesthetic gas concentration  
33  
34 and to determine the MAC. A fine catheter with a 0.9-mm external diameter was  
35  
36 inserted through the endotracheal catheter, with the fine catheter tip located at the  
37  
38 level of the carina. The samples were assayed using a side-stream infrared analyser  
39  
40 (Capnomac Ultima; Datex-Ohmeda, Hertfordshire, UK).

41  
42 The MAC was established according to the method previously described.<sup>21</sup> A  
43  
44 painful noxious stimulus was applied with a long haemostat (8-inch Rochester Dean  
45  
46 Haemostatic Forceps) clamped to the first ratchet lock onto the tail for 60 s  
47  
48 immediately after the gas sample was obtained from the trachea. The tail was  
49  
50 always stimulated proximal to a previous test site when the previous response was  
51  
52 negative or distal if it was positive, starting 6 cm distal to the tail base. A positive  
53  
54 response was considered to be a gross purposeful movement of the head,  
55  
56 extremities or body. A negative response was considered to be the lack of  
57  
58 movement or grimacing, swallowing, chewing or tail flicking. When a negative  
59  
60

1  
2  
3 response was observed, the sevoflurane concentration was then reduced in  
4 decrements of 0.2 % until the negative response became positive. Similarly, where  
5 a positive response was observed, the sevoflurane concentration was then  
6 increased in increments of 0.2 % until the positive response became negative. The  
7 MAC was considered to be the concentration mid-way between the highest  
8 concentration that permitted movement in response to the stimulus and the lowest  
9 concentration that prevented such movement. Determination of the MAC was  
10 performed in a laboratory 650 m above sea level, which lowers the barometric  
11 pressure and results in MAC values that are higher than those obtained at sea level.  
12 Therefore, the MAC values were corrected to the barometric pressure at sea level  
13 using the following formula: MAC (%) at sea level barometric pressure (760 mmHg)  
14 (altitude adjusted MAC) = measured MAC (%) x measured ambient barometric  
15 pressure (700 mmHg in Madrid)/sea level.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

#### 30 Experimental design and drug groups

##### 31 Experiment 1: Effects of PRC, PRX and their combination on MAC

32  
33  
34 A total of six groups of rats were used (n=8 rats per group). The MAC was  
35 determined four times in each animal. After the animals were anaesthetised and  
36 instrumented, MAC-1 (baseline) was determined (each animal acted as its own  
37 control). Then, the MAC was re-determined three times, at 1.5 hour intervals (MAC-  
38 2, MAC-3, and MAC-4; Figure 1). Animals were randomly given an intraperitoneal  
39 (IP) injection of PRC (Perfalgan; Bristol Mayers Squibb, München, Germany), PRX  
40 (Dynastat; Pfizer, Alcobendas, Spain), the combination PRC-PRX or saline. The  
41 following doses were selected: PRC (150 and 300 mg kg<sup>-1</sup>), PRX (15 and 30 mg kg<sup>-1</sup>),  
42 and their combination PRC:PRX (150:15 mg kg<sup>-1</sup>). One further group (control)  
43 received an IP injection of saline. Doses administered were selected from the  
44 clinical dose range reported previously in rats for paracetamol (50-300 mg kg<sup>-1</sup>)  
45 and parecoxib (10-30 mg kg<sup>-1</sup>).  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Experiment 2: Effects of the combination of PRC and PRX with remifentanil on  
4  
5 MAC

6  
7 A total of 3 groups of rats were used (n=8 rats per group). The MAC-1 (baseline)  
8 was determined after instrumentation (each animal acted as its own control as in  
9 Experiment 1). Two out of three groups were administered an IP injection of a  
10 combination of PRC:PRX (150:15 mg kg<sup>-1</sup>) with a constant-rate infusion of  
11 remifentanil (Ultiva; Glaxo-Wellcome Laboratories, Madrid, Spain) given at 120 µg  
12 kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The opioid was given intravenously in a lateral vein of the tail, with no  
13 loading dose, and the MAC was re-determined 1.5 h and 3 h later (MAC-2 and MAC-  
14 3). Finally, the remifentanil infusion was stopped, and the MAC was re-determined  
15 (MAC-4). To avoid a potential bias regarding the time of PRC or PRX administration  
16 in relation to remifentanil infusion, the PRC and PRX were administered at two  
17 different times. Animals were randomly given COX inhibitors intraperitoneally at  
18 two time points, either at the same time that the remifentanil infusion was started,  
19 immediately after determining the baseline MAC (simultaneous administration), or  
20 immediately after the first determination of the MAC of remifentanil (after MAC-2;  
21 delayed administration to the opioids, respectively) (Figure 1). A third group, the  
22 control group for this experiment, was given an IV constant infusion of remifentanil  
23 at the same rate (see previously) and an IP injection of saline.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 Experiment 3: Effect of serotonergic and cannabinoid receptor blockade on the  
43 MAC reductions produced by PRC

44  
45 Two groups of rats were used (n=6 rats per group) and compared to the group  
46 of rats given PRC 300 mg kg<sup>-1</sup> (Experiment 1). Experiments 1 and 3 were  
47 performed simultaneously and in random order. Animals were administered an  
48 intraperitoneal injection of PRC (300 mg kg<sup>-1</sup>) and a selective 5-HT<sub>2</sub> serotonin  
49 receptor inhibitor, ketanserine (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1 mg kg<sup>-1</sup>) or  
50 a selective endocannabinoid inhibitor, SR141716A (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO,  
51 USA) (1.5 mg kg<sup>-1</sup>), after the determination of the baseline MAC. The MAC was re-  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 determined 1.5 h, 3 h and 4.5 h after the baseline MAC determination (MAC-2,  
4 MAC-3 and MAC-4) (Figure 1).  
5  
6  
7

8  
9 Thirty minutes was allowed between the MAC determinations and 1 hour was  
10 usually necessary to determine the MAC values. Overall, each experiment lasted  
11 between six and seven hours. Animals were euthanised with potassium chloride  
12 given intravenously while still deeply anaesthetised at the end of the experiment. A  
13 schematic view of the experimental design is shown in Figure 1.  
14  
15  
16  
17

#### 20 Statistical Analysis

21  
22 Sample size calculations indicated a minimum  $n$  value of 6 was necessary to  
23 determine differences with a power of 80% and a  $P$  value of 0.05. The Mean and SD  
24 were obtained from previous studies<sup>21</sup>, and the statistical package was N Query  
25 Advisor (version 2.0; Statistical Solutions, Saugus, MA, USA).  
26  
27  
28  
29

30 The results are presented as means  $\pm$  standard deviations (SD). Rats in each  
31 experiment were randomly allocated using a randomly generated list (Excel 2007,  
32 Microsoft Office). Data was tested for normality with the Kolmogorov-Smirnov test.  
33 The Bonferroni test was used to compare groups. A  $P$  value of  $< 0.05$  was  
34 considered critical to indicate statistical significance. Data analysis were performed  
35 using the SPSS statistical package (vs. 15 for Windows. 2006; SPSS Inc., Wacker  
36 Drive, Chicago, IL, USA).  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

## 46 RESULTS

47  
48 The baseline MAC in rats was similar in all groups with an average value of  
49  $2.1 \pm 0.3\%$  vol (range 1.6%-2.8%vol;  $n=84$ ).  
50  
51  
52

53  
54 ***Experiment 1: PRC, but not PRX, dose-dependently reduced the MAC.***  
55  
56 ***The co-administration of PRX with PRC does not modify the effects of PRC***  
57 ***alone on the MAC.***  
58  
59  
60

1  
2  
3 PRC 300 mg kg<sup>-1</sup> reduced the MAC by 32±8% (MAC-2 to MAC-4 vs. control;  
4  $P<0.05$ ), and PRC 150 mg kg<sup>-1</sup> non-significantly reduced the MAC by 13±9% (MAC-  
5 4;  $P>0.05$ ). The maximum MAC reduction was determined after 4.5 h from the PRC  
6 administration (300 mg kg<sup>-1</sup>, MAC-4;  $P<0.001$ ). Conversely, PRX did not induce  
7 MAC reduction at either 15 or 30 mg kg<sup>-1</sup> (MAC-4 reduction, 2±9% and 5±9%,  
8 respectively). Finally, the combination PRC:PRX (150:15 mg kg<sup>-1</sup>) reduced the MAC  
9 by 16±5% (MAC-2). The MAC reduction with PRC:PRX was significantly different  
10 from the controls at MAC-2 and MAC-3 ( $P<0.01$  and  $P<0.05$ , respectively). There  
11 were no interactions between the groups (doses) and time (Table 1, Figure2).  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 ***Experiment 2: Remifentanil MAC reduction is potentiated by the co-***  
24 ***administration of PRC:PRX.***  
25

26 When a remifentanil constant-rate infusion was given, the MAC was reduced by  
27 22±6% (MAC-2, peak effect), and a smaller MAC reduction was observed 1.5 hours  
28 later (3 h after the remifentanil infusion started), with a MAC reduction of 9±6%  
29 (MAC-3), representing a 14±5% decrease from the MAC-2 reduction ( $P<0.01$ , MAC-  
30 3 versus MAC-2). The combination PRC:PRX (150:15 mg kg<sup>-1</sup>) increased the MAC  
31 reduction induced by remifentanil to 30±5%, ( $P<0.05$ , MAC-2), and again a smaller  
32 MAC reduction was determined at MAC-3 (MAC reduction 15±5%; MAC-3 versus  
33 MAC-2  $P<0.001$ ).  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 When PRC:PRX was administered 1.5 hours after the remifentanil infusion was  
43 started (delayed administration), the decreased MAC reduction determined in the  
44 previous groups with remifentanil at MAC-3 (acute tolerance to the opioid) was not  
45 observed. Finally, when the remifentanil infusion was stopped, the re-determined  
46 MAC values (MAC-4) were found to be similar among the groups and similar to the  
47 MAC-1 (baseline) values (Table 2, Figure 3).  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 ***Experiment 3: Endocannabinoid receptor antagonism blocks PRC effects***  
56 ***on the MAC.***  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 When PRC was administered with the selective serotonin receptor antagonist,  
4 ketanserine, the MAC reduction was similar to that produced by PRC alone  
5 ( $P>0.05$ ). However, when the selective endocannabinoid receptor inhibitor  
6 SR141716A was administered the MAC reduction was significantly decreased  
7 compared to PRC alone ( $P<0.05$ ), suggesting, at least in part, an involvement of  
8 the CB1 receptors in the observed effects of PRC on the MAC (Table 3, Figure 4).  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 **DISCUSSION**

17  
18 The drug PRC, unlike PRX, induced a relevant reduction of the sevoflurane MAC  
19 in rats, and no further benefits were determined when both drugs were combined.  
20 Nevertheless, the combination of PRC:PRX potentiated the efficacy of remifentanil  
21 on the MAC. Because both drugs have COX inhibitory actions, and an additional  
22 mechanism of action is suggested to explain the observed differences. Because  
23 endocannabinoid receptor blockade partially blocked the PRC effects on the MAC, a  
24 cannabinoid-like activity is probably involved in the MAC-sparing action of PRC. The  
25 administration of PRC induced a prolonged MAC reduction lasting several hours (up  
26 to 4.5 h). However, a delayed maximum effect was observed when PRC was given  
27 at the same time that remifentanil infusion was started, suggesting that PRC should  
28 be administered pre-emptively.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 A relatively potent MAC reduction has been determined with PRC in the rat, and  
41 similar effects have been determined with the administration of potent opioids in  
42 rats. The efficacy of an intravenous formulation of PRC has been explored for  
43 postoperative pain<sup>24, 25</sup> and is currently proposed in the acute pain clinical setting.<sup>26</sup>  
44 When PRC was compared with the selective COX-2 inhibitors, the differences in  
45 morphine consumption were too small to be of clinical significance.<sup>27</sup> PRX is a  
46 selective COX-2 inhibitor that is reported to provide relief from inflammatory pain.<sup>28</sup>  
47 It was the first parenterally administered selective COX-2 inhibitor shown to be  
48 effective in treating postoperative pain resulting from oral surgery, orthopaedic  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 surgery and abdominal hysterectomy.<sup>29</sup> Despite the similarities between PRC and  
4 PRX, a clearly differing degree of reduction of MAC was determined in this study.  
5

6  
7 Because PRC and selective COX-2 inhibitors may have distinct effects, their  
8 combination has been suggested in order to improve the analgesic action of either  
9 drug alone. PRC is considered the drug of choice in multimodal analgesia protocols,  
10 because its antinociceptive effects can be mediated through different nociceptive  
11 systems. However, in the rats, the combination of PRC and PRX did not provide any  
12 advantage over PRC administered alone in terms of MAC reduction. This result is  
13 consistent with a lack of improvement in the analgesic efficacy of this combination  
14 in terms of postoperative opioid consumption.<sup>2</sup>  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

22  
23 Experimental data in animals support the involvement of spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors  
24 and endocannabinoid receptors in the antinociceptive effect of PRC. Other proposed  
25 mechanisms of action of PRC include interference with spinal substance P receptors  
26 or the inhibition of neurons excited by substance P, the activation of supra-  
27 segmental descending inhibitory pathways, an increase in pituitary  $\beta$ -endorphin  
28 secretion, and direct effects on neuronal membrane potentials.<sup>16</sup> The inhibitory  
29 effect of the cannabinoid antagonist on PRC-induced MAC reduction observed in this  
30 study suggests a role of this system.<sup>30</sup> An action of PRC on spinal or supraspinal  
31 cannabinoid receptors may also explain the potentiation of the remifentanyl MAC-  
32 sparing action.<sup>31</sup> These results are consistent with previous reports of synergistic  
33 interactions between cannabinoid and opioid analgesics.<sup>32</sup>  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

44  
45 Although a potentiation of analgesia might be expected by combining PRC with  
46 PRX,<sup>16,33</sup> no advantage over PRC alone to further reduce MAC was observed in this  
47 study. It is well known that analgesic therapy that combines individual agents with  
48 different mechanisms of action has potential advantages for the management of  
49 mild-to-moderate pain in the outpatient setting.<sup>4,34</sup> Synergistic drug combinations  
50 increase treatment efficacy by increasing the therapeutic effect, reducing the side  
51 effects by lowering drug dosage, or both.<sup>35</sup> PRC may synergistically potentiate  
52 NSAIDs analgesia,<sup>16</sup> and its clinical combination with NSAIDs has been suggested in  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 perioperative patients,<sup>36</sup> including those with musculoskeletal conditions,<sup>37</sup> dental  
4 pain, or postoperative pain, allowing opioids dose-sparing and improved safety.  
5  
6 However, the results in this study in rats are consistent with the lack of additive  
7 analgesic effect during inhalational anaesthesia previously reported in patients in  
8 the postoperative period with the combination of PRC and PRX,<sup>2</sup> PRC and  
9 robecoxib,<sup>12,38</sup> or selective COX-2 inhibitors with other non-opioid analgesics such  
10 as aspirin.<sup>39</sup> Therefore, the therapeutic advantage of these combinations remains  
11 controversial.<sup>15</sup>  
12  
13  
14  
15  
16  
17

18 The effects of PRC and PRX on the MAC have been determined using a rat model,  
19 and the results should be extrapolated to the clinical setting carefully. Although  
20 MAC value has been proved to be consistent among most common laboratory  
21 animal species (mammals), the actual reduction in anaesthetic requirements by a  
22 given drug, such as PRC and PRX, may vary greatly among them; therefore, results  
23 should not be directly extrapolated between species. Moreover, the plasma levels of  
24 PRC, PRX, the combination PRC-PRX and remifentanil were not measured in this  
25 study; therefore variations cannot be excluded, although care was taken to  
26 determine MAC at similar times. Furthermore, the pharmacokinetic and allometric  
27 differences between rats, other mammals and humans should be considered when  
28 extrapolating the results. A MAC reduction of 18% has been determined in patients  
29 administered PRX,<sup>40</sup> whereas only a 5% MAC reduction was observed in rats. In  
30 addition, the observations made with the MAC method are not simply the result of  
31 the antinociceptive effects of the tested drugs but rather are the result of the  
32 interactions of the combinations of the PRC, PRX, PRC-PRX, and the inhalant  
33 anaesthetic.<sup>20</sup> In any event, the analgesic-hypnotic interaction that produces a MAC  
34 reduction actually determines a clinical reduction in anaesthetic requirements,  
35 resulting in a safer anaesthesia.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 In conclusion, the parenteral administration of PRC alone provided a potent and  
54 consistent reduction of the sevoflurane MAC in the rat. This effect was not observed  
55 with the administration of PRX, a selective COX inhibitor. Furthermore, PRX did not  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 potentiate the PRC effects on the MAC. The observed effect on the MAC may involve  
4 the cannabinoid system, because cannabinoid receptor blockade prevented the  
5 MAC-reducing effect of PRC administration.  
6  
7  
8  
9

### 10 **Acknowledgements**

11  
12 The authors thank Drs. E. de Miguel and C. Largo, Department of Experimental  
13 Surgery, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.  
14  
15  
16

### 17 **Conflict of interest**

18  
19 None declared.  
20  
21  
22

### 23 **Funding**

24 This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones  
25 Sanitarias, Spanish Health Ministry, Madrid, Spain. Grant number: FIS PI05-0441  
26  
27  
28  
29  
30 and PI08-0422.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REFERENCES

1. Oscier CD, Milner QJ. Peri-operative use of paracetamol. *Anaesthesia* 2009; **64**: 65-72.
2. Gehling M, Arndt C, Eberhart LH, Koch T, Kruger T, Wulf H. Postoperative analgesia with parecoxib, acetaminophen, and the combination of both: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients undergoing thyroid surgery. *Br J Anaesth* 2010; **104**: 761-7.
3. Hinz B, Brune K. Antipyretic analgesics: nonsteroidal antiinflammatory drugs, selective COX-2 inhibitors, paracetamol and pyrazolinones. *Handb Exp Pharmacol* 2007; **177**: 65-93.
4. Kehlet H, Werner MU. Role of paracetamol in the acute pain management. *Drugs* 2003; **63** Spec No 2: 15-22
5. Jahr JS, Lee VK. Intravenous acetaminophen. *Anesthesiol Clin* 2010; **28**: 619-45.
6. Hinz B, Cheremina O, Brune K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J* 2008; **22**: 383-90.
7. Smith HS. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician* 2009; **12**: 269-80.
8. Bjorkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1995; **103**: 1-44.
9. Koppert W, Wehrfritz A, Korber N, et al. The cyclooxygenase isozyme inhibitors parecoxib and paracetamol reduce central hyperalgesia in humans. *Pain* 2004; **108**: 148-53.
10. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 13926-31.
11. Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet* 2003; **361**: 981-2.

12. Pickering G, Lorient MA, Libert F, Eschaliere A, Beaune P, Dubray C. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **79**: 371-8.
13. Roca-Vinardell A, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Mico JA. The role of 5-HT<sub>1A/B</sub> autoreceptors in the antinociceptive effect of systemic administration of acetaminophen. *Anesthesiology* 2003; **98**: 741-7.
14. Raffa RB, Walker EA, Sterious SN. Opioid receptors and acetaminophen (paracetamol). *Eur J Pharmacol* 2004; **503**: 209-10.
15. Ong CK, Seymour RA, Lirk P, Merry AF. Combining paracetamol (acetaminophen) with nonsteroidal antiinflammatory drugs: a qualitative systematic review of analgesic efficacy for acute postoperative pain. *Anesth Analg* 2010; **110**: 1170-9.
16. Miranda HF, Puig MM, Prieto JC, Pinardi G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* 2006; **121**: 22-8.
17. Remy C, Marret E, Bonnet F. Effects of acetaminophen on morphine side-effects and consumption after major surgery: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Anaesth* 2005; **94**: 505-13.
18. Marret E, Kurdi O, Zufferey P, Bonnet F. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on patient-controlled analgesia morphine side effects: meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesthesiology* 2005; **102**: 1249-60.
19. Elia N, Lysakowski C, Tramer MR. Does multimodal analgesia with acetaminophen, nonsteroidal antiinflammatory drugs, or selective cyclooxygenase-2 inhibitors and patient-controlled analgesia morphine offer advantages over morphine alone? Meta-analyses of randomized trials. *Anesthesiology* 2005; **103**: 1296-304.
20. Docquier MA, Lavand'homme P, Ledermann C, Collet V, De Kock M. Can determining the minimum alveolar anesthetic concentration of volatile

- 1  
2  
3 anesthetic be used as an objective tool to assess antinociception in animals?  
4  
5 *Anesth Analg* 2003; **97**: 1033-9.  
6  
7 21. Gomez de Segura IA, Criado AB, Santos M, Tendillo FJ. Aspirin synergistically  
8 potentiates isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by  
9 morphine in the rat. *Anesthesiology* 1998; **89**: 1489-94.  
10  
11 22. Santos M, Kunkar V, Garcia-Iturralde P, Tendillo FJ. Meloxicam, a specific COX-  
12 2 inhibitor, does not enhance the isoflurane minimum alveolar concentration  
13 reduction produced by morphine in the rat. *Anesth Analg* 2004; **98**: 359-63.  
14  
15 23. Benito J, Aguado D, Abreu MB, Garcia-Fernandez J, Gomez de Segura IA.  
16 Remifentanil and cyclooxygenase inhibitors interactions in the minimum  
17 alveolar concentration of sevoflurane in the rat. *Br J Anaesth* 2010; **105**: 810-  
18 7.  
19  
20 24. Uysal HY, Takmaz SA, Yaman F, Baltaci B, Basar H. The efficacy of intravenous  
21 paracetamol versus tramadol for postoperative analgesia after  
22 adenotonsillectomy in children. *J Clin Anesth* 2011; **23**: 53-7.  
23  
24 25. Brodner G, Gogarten W, Van Aken H, et al. Efficacy of intravenous paracetamol  
25 compared to dipyrrone and parecoxib for postoperative pain management after  
26 minor-to-intermediate surgery: a randomised, double-blind trial. *Eur J*  
27 *Anaesthesiol* 2011; **28**: 125-32.  
28  
29 26. Power I. An update on analgesics. *Br J Anaesth* 2011; **107**: 19-24.  
30  
31 27. Maund E, McDaid C, Rice S, Wright K, Jenkins B, Woolacott N. Paracetamol and  
32 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs for the  
33 reduction in morphine-related side-effects after major surgery: a systematic  
34 review. *Br J Anaesth* 2011; **106**: 292-7.  
35  
36 28. Padi SS, Jain NK, Singh S, Kulkarni SK. Pharmacological profile of parecoxib: a  
37 novel, potent injectable selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Eur J Pharmacol*  
38 2004; **491**: 69-76.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 29. Lloyd R, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Intravenous or intramuscular  
4  
5 parecoxib for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*  
6  
7 2009: CD004771.
- 8  
9 30. Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A. The analgesic activity of  
10  
11 paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J*  
12  
13 *Pharmacol* 2006; **531**: 280-1.
- 14  
15 31. Raffa RB, Stone DJ, Jr., Tallarida RJ. Discovery of "self-synergistic"  
16  
17 spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). *J*  
18  
19 *Pharmacol Exp Ther* 2000; **295**: 291-4.
- 20  
21 32. Cichewicz DL. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid  
22  
23 analgesics. *Life Sci* 2004; **74**: 1317-24.
- 24  
25 33. Miranda HF, Sierralta F, Prieto JC. Synergism between NSAIDs in the orofacial  
26  
27 formalin test in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2009; **92**:  
28  
29 314-8.
- 30  
31 34. Macario A, Royal MA. A Literature Review of Randomized Clinical Trials of  
32  
33 Intravenous Acetaminophen (Paracetamol) for Acute Postoperative Pain. *Pain*  
34  
35 *Pract Advance* access published on November 28, 2010. doi: 10.1111/j.1533-  
36  
37 2500.2010.00426.x
- 38  
39 35. Raffa RB, Clark-Vetri R, Tallarida RJ, Wertheimer AI. Combination strategies for  
40  
41 pain management. *Expert Opin Pharmacother* 2003; **4**: 1697-708.
- 42  
43 36. Hyllested M, Jones S, Pedersen JL, Kehlet H. Comparative effect of  
44  
45 paracetamol, NSAIDs or their combination in postoperative pain management:  
46  
47 a qualitative review. *Br J Anaesth* 2002; **88**: 199-214.
- 48  
49 37. Hinz B, Brune K. [Pain therapy with antipyretic analgesics]. *Orthopade* 2007;  
50  
51 **36**: 23-31.
- 52  
53 38. Naesh O, Niles LA, Gilbert JG, et al. A randomized, placebo-controlled study of  
54  
55 rofecoxib with paracetamol in early post-tonsillectomy pain in adults. *Eur J*  
56  
57 *Anaesthesiol* 2005; **22**: 768-73.  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 39. Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, et al. Coxibs interfere with the action of aspirin  
4 by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci U S*  
5 *A* 2010; **107**: 28-33.  
6  
7  
8  
9 40. Liu Z, Lu H, He G, Ma H, Wang J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs reduce  
10 the stress response during sevoflurane anesthesia. *Acta anaesthesiologica*  
11 *Scandinavica* Advance access published on June 22, 2012, doi:  
12 10.1111/j.1399-6576.2012.02730.x  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1. Schematic view of the three experiments. ❶: Effects of interactions of paracetamol (PRC, 150 or 300 mg kg<sup>-1</sup>), parecoxib (PRX, 15 or 30 mg kg<sup>-1</sup>), or the combination paracetamol-parecoxib (PRC:PRX, PRC 150:PRX15 mg kg<sup>-1</sup>) administered intraperitoneally (IP) on the minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC<sub>sev</sub>). ❷: Effects of the combination PRC:PRX (150: 15 mg kg<sup>-1</sup>, simultaneous or delayed administration IP) administered with remifentanil (120 µg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) intravenously on the MAC<sub>sev</sub>. ❸: Effects of a selective 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptor inhibitor, ketanserine (1 mg kg<sup>-1</sup>) or a selective endocannabinoid inhibitor, SR141716A (1 mg kg<sup>-1</sup>) IP, 1.5 h after administration of paracetamol (PRC), 300 mg kg<sup>-1</sup> IP, on the MAC<sub>sev</sub>.

Figure 2. Reduction of the minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC) produced by paracetamol (PRC, 150 or 300 mg kg<sup>-1</sup>), parecoxib (PRX, 15 or 30 mg kg<sup>-1</sup>), or the combination paracetamol-parecoxib (PRC:PRX, PRC 150:PRX 15 mg kg<sup>-1</sup>), of both drugs given administered intraperitoneally (IP) (at different times; Experiment 1). Data are expressed as means (SD). The sample size "n" is always 8. \* MAC reduction different from the control group (same time). † MAC reduction different from the PRC:PRX group, same time. Significant at a *P* value < 0.05.

Figure 3. Reduction of the minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC) produced by remifentanil (120 µg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) intravenously or remifentanil with the combination paracetamol-parecoxib (PRC:PRX, PRC 150:PRX 15 mg kg<sup>-1</sup>; simultaneous or delayed IP administration) of both drugs given at different times (Experiment 2). Data are expressed as means (SD). The sample size "n" value is always 8. \* MAC reduction different from control group, same time. Significant at a *P* value < 0.05.

1  
2  
3 Figure 4. Reduction of the minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC)  
4 produced by paracetamol (PRC, 300 mg kg<sup>-1</sup>; Experiment 1) or the combination  
5 PRC with ketanserine (1 mg kg<sup>-1</sup>) or PRC with SR141716A (1.5 mg kg<sup>-1</sup>)  
6 administered IP at different times (Experiment 3). Data are expressed as means  
7 (SD). The sample size "n" value is always 8. \* MAC reduction different from control  
8 group (Repeated measures), same time. Significant at a *P* value < 0.05.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## TABLES

*Table 1.* Baseline minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC-1 baseline) and following the administration of either paracetamol (PRC, 150 or 300 mg kg<sup>-1</sup>), parecoxib (PRX, 15 or 30 mg kg<sup>-1</sup>), or a combination of paracetamol-parecoxib (PRC:PRX, 150:15 mg kg<sup>-1</sup>) in rats. The MAC was determined three times thereafter at 1.5 h intervals (MAC-2, MAC-3 and MAC-4) (Experiment 1). Data are expressed as means ± SD. \* Significant differences from the MAC-1 (baseline), same drug and dose. † Significant differences from MAC with PRC (300 mg kg<sup>-1</sup>), same time. Significant differences at a *P* value < 0.05. (Bonferroni test). n = 8/group.

Drug (mg kg <sup>-1</sup> )	Control (Saline)	PRC		PRX		PRC:PRX 150:15
		150	300	15	30	
MAC-1(baseline)	2.2±0.2	2.3±0.3	2.2±0.2	2.2±0.4	2.2±0.3	2.2±0.3
MAC-2	2.2±0.2 <sup>†</sup>	2.1±0.3 <sup>†</sup>	1.6±0.2*	2.2±0.4 <sup>†</sup>	2.2±0.4 <sup>†</sup>	1.8±0.3*
MAC-3	2.2±0.3 <sup>†</sup>	2.0±0.2*	1.5±0.2*	2.2±0.4 <sup>†</sup>	2.1±0.4 <sup>†</sup>	1.9±0.3*
MAC-4	2.1±0.3 <sup>†</sup>	2.0±0.2* <sup>†</sup>	1.5±0.2*	2.1±0.4 <sup>†</sup>	2.1±0.4 <sup>†</sup>	1.9±0.3*

*Data are expressed as means ± SD.*

Table 2. Baseline minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC-1 baseline) and following a remifentanil (RMF) intravenous constant-rate infusion (MAC-2 and MAC-3, respectively), and after stopping of the remifentanil infusion (MAC-4). The MAC was determined three times thereafter at 1.5 h intervals, and the time indicated is from start of remifentanil (Experiment 2). Data are expressed as means  $\pm$  SD. Animals were given a combination of paracetamol-parecoxib (PRC:PRX, 150:15 mg kg<sup>-1</sup>) intraperitoneally when the remifentanil infusion was started (Simultaneous) or after MAC-2 was determined with the remifentanil infusion (Delayed). A control group was given only the remifentanil infusion (120  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). \* Significant differences from MAC-1 (baseline), same drug. † Significant differences from MAC-4, same group.  $\infty$  Significant differences from the MAC in the control group, same time. Significant differences at a *P* value < 0.05. (Bonferroni test). n = 8/group.

Drug (mg kg <sup>-1</sup> )	RMF (Control)	RMF + PRC:PRX (Simultaneous administration)	RMF + PRC:PRX (Delayed administration)
MAC-1(baseline)	2.2 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2 <sup>†</sup>	2.0 $\pm$ 0.3
MAC-2	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>**†</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>**†</sup>	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>
MAC-3	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>**†</sup>	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>**†</sup>	1.6 $\pm$ 0.4 <sup>**†</sup>
MAC-4	2.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>*<math>\infty</math></sup>	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>

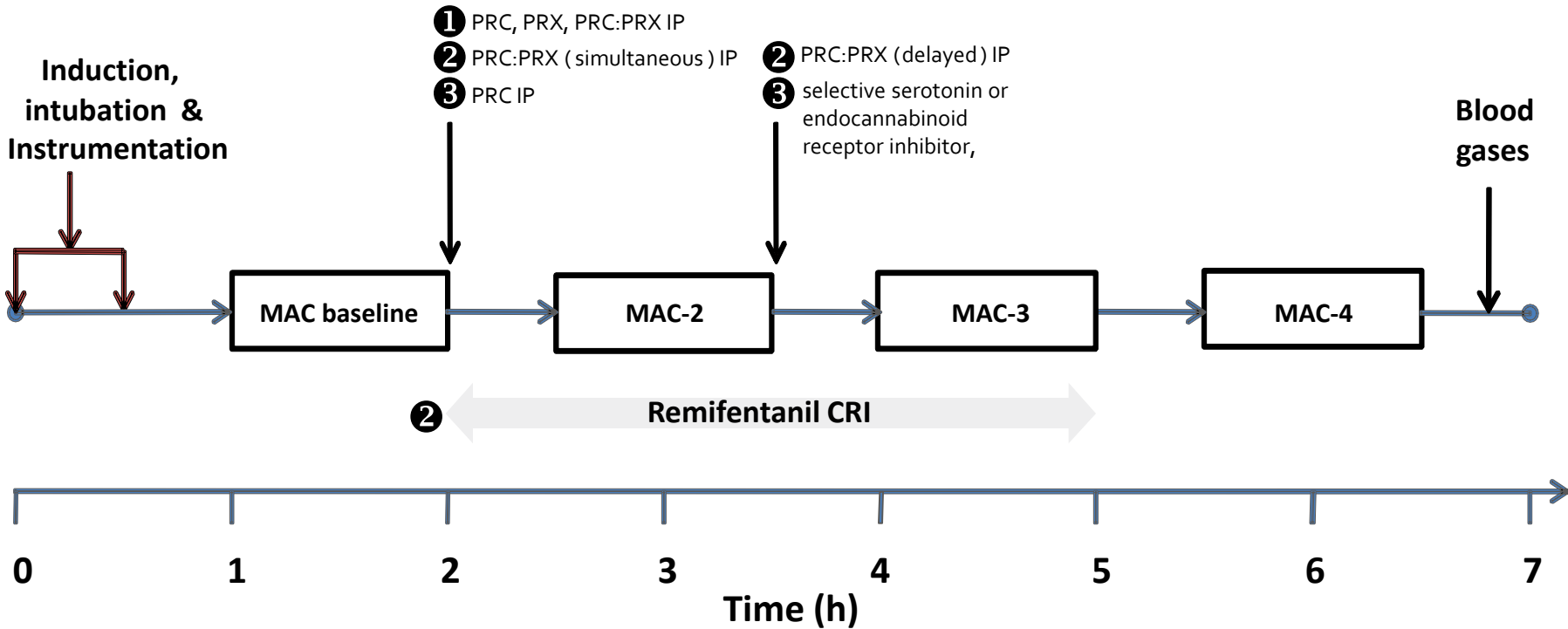
Data are expressed as means  $\pm$  SD.

*Table 3.* Baseline minimum alveolar concentration of sevoflurane (MAC-1, baseline) and following the administration of paracetamol (PRC 300 mg kg<sup>-1</sup>) intraperitoneally (IP) or PRC with ketanserine or SR141716A. The MAC was determined after 1.5 h (MAC-2), 3.0 h (MAC-3) and 4.5 h (MAC-4) (Experiment 3). Data are expressed as means  $\pm$  SD. Animals were given ketanserine (1 mg kg<sup>-1</sup>) or SR141716A (1.5 mg kg<sup>-1</sup>) with the PRC IP after the MAC was determined (after MAC-1 baseline). \* Significant differences from MAC-1 (baseline), same drug. † Significant differences from MAC with ketanserine, same time. Significant differences at a *P* value < 0.05. (Bonferroni test). n = 8 (Control group) and n = 6.

Drug	PRC (n=8)	PRC + Ketanserine (n=6)	PRC + SR141716A (n=6)
MAC-1(baseline)	2.2 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1
MAC-2	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>*†</sup>
MAC-3	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>*</sup>	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>*†</sup>
MAC-4	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>*</sup>	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>*†</sup>

*Data are expressed as means  $\pm$  SD.*

# Experimental Design



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

