



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **EVALUACIÓN EXPERIMENTAL EN ROEDORES, DE LA TOXICIDAD DE LA PROCAÍNA EN ALGUNOS ESQUEMAS DE UTILIZACIÓN COMO NEURAL TERAPÉUTICO**

**Dora Lucía Avellaneda López**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Medicina Alternativa

Bogotá, Colombia

2011



# **EVALUACIÓN EXPERIMENTAL EN ROEDORES, DE LA TOXICIDAD DE LA PROCAÍNA EN ALGUNOS ESQUEMAS DE UTILIZACIÓN COMO NEURAL TERAPÉUTICO**

**Dora Lucía Avellaneda López**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Medicina Alternativa**

Director

Ph.D Luis Fernando Ospina Giraldo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Medicina Alternativa

Bogotá, Colombia

2011



## Resumen

La procaína es el fármaco para la realización de la terapia neural. Su perfil de seguridad ha sido descrito para su uso como anestésico local, sin embargo, la literatura revisada no aporta información suficiente para su uso como neural terapéutico. El objetivo del presente trabajo es contribuir con el conocimiento sobre las bases teóricas de la Terapia Neural, mediante la evaluación de la toxicidad de la Procaína en roedores, según el esquema de uso como neural terapéutico. Se realizó un estudio de experimentación animal para evaluar la neurotoxicidad de la Procaína en administración repetida por vía intradérmica. El comportamiento animal se observó una hora después de cada aplicación y durante el mes siguiente, mediante una batería de pruebas observacionales para evaluar signos clínicos de neurotoxicidad. En ninguna de las pruebas aplicadas se observaron cambios sugestivos de neurotoxicidad, con lo que se puede concluir que la Procaína es segura al ser administrada en dosis bajas por vía intradérmica, teniendo en cuenta que hacen falta estudios para establecer el perfil completo de la Procaína como neural terapéutico.

**Palabras Clave (MeSH):** Procaína, perfil de seguridad, terapia neural, test de Irwin.

## Abstract

Procaine is the drug used for the realization of neural therapy. It's safety profile has been described for use as a local anaesthetic, however, the reviewed literature does not provide sufficient information for use as neural therapy. The aim of this paper is to contribute to knowledge on the theoretical bases of Neural Therapy, by evaluating the toxicity of procaine in rodents, according to the scheme of usage as Neural Therapy. An animal experimentation study as made to assess the neurotoxicidad of procaine on repeated administration intradermal. Animal's behavior was done one hour after each application and during the following month, using an observational test battery to assess clinical signs of neurotoxicity. None of the tests applied were observed changes suggesting neurotoxicity, which can be concluded that procaine is safe when administered in low doses by the intradermal route, taking into account that studies are needed to establish the complete profile of Procaine as neural therapy.

**Keywords:** Procaine, Security profile, Neural Therapy, Irwin Test

## Contenido

<b>Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>11</b>
1.1 Anestésicos Locales .....	11
1.1.1 Historia .....	11
1.1.2 DEFINICIÓN.....	15
1.1.3 ESTRUCTURA QUÍMICA.....	15
1.1.4 CLASIFICACIÓN.....	17
1.1.5 FARMACOCINÉTICA .....	17
1.1.6 FARMACODINAMIA.....	21
1.1.7 APLICACIONES CLÍNICAS.....	26
1.1.8 TOXICIDAD.....	27
1.2. TERAPIA NEURAL Y PROCAÍNA COMO NEURAL TERAPÉUTICO .....	39
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>41</b>
2.1 TOXICIDAD Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	41
2.1.1 Estudios de toxicidad a dosis repetidas .....	43
2.1.2 Test de Irwin.....	44
2.1.3 Pruebas utilizadas en este trabajo.....	48
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	51
2.2.1 Animales y sustancia activa.....	51
2.2.2 Estudios preliminares .....	52
2.3 Diseño experimental .....	54
2.4 Observación:.....	54
<b>3. Resultados.....</b>	<b>55</b>
<b>4. Discusión .....</b>	<b>63</b>
4.1 Ensayos preliminares.....	63
4.2 Interpretación del test de Irwin .....	64
4.2.1 Sistema Nervioso Central .....	65
4.2.2 Sistema Nervioso Periférico .....	65
4.2.3 Sistema Nervioso Autónomo.....	66
4.2.4 Otros niveles .....	66
4.3 Interpretación de las pruebas de “performance motor” (test de campo abierto, chimenea, alambre) .....	67
4.4 Extrapolación de los resultados a humanos .....	67
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>69</b>
5.1 Conclusiones.....	69
5.2 Recomendaciones.....	69
<b>Bibliografía .....</b>	<b>71</b>

## Lista de figuras

Estructura Química de los anestésicos locales	<b>Página</b> 18
---	---------------------

## Lista de tablas

Tabla 1. Diseño experimental para el Test de Irwin	<b>Página</b> 55
Tabla 2. Test de Irwin en ratones- Procaína 20 mg/Kg	57
Tabla 3. Test de Irwin en ratones- Procaína 40 mg/Kg	59
Tabla 4. Test de Irwin en ratas- Procaína 25 mg/Kg	62



# Introducción

En los últimos años pacientes y profesionales han recurrido al uso de terapéuticas alternativas buscando mejores resultados sobre las condiciones de salud.

En 1993, un estudio presentado por Eisenberg y sus colegas informó que aproximadamente un 34% de los adultos en Estados Unidos había utilizado al menos un tratamiento no convencional (1). Eisenberg, en un estudio nacional realizado en Estados Unidos muestra un incremento notable en el uso de medicina alternativa en 1997 comparado con las estadísticas de 1990, encontró que entre el 32 y el 54% (según el estrato socioeconómico) de la población había utilizado alguna vez alguno de los tratamientos de medicina no convencional (2).

En Colombia, la evaluación de la encuesta de calidad de vida del DANE en 1997 permitió conocer que un alto porcentaje de personas asistieron a consulta de terapia alternativa por “problemas en la calidad técnica, la eficiencia o la oportunidad de los servicios convencionales de salud” (3). Un estudio realizado en Bogotá en 2005 mostró que el 98% de la población encuestada conoce las terapéuticas alternativas y que de ellos un 80% las ha utilizado alguna vez (4).

Dado el creciente uso de las terapias alternativas se hace necesario aportar a la construcción de sus conceptos en coordinación con campos del conocimiento como la biología, la fisiología, la farmacología, la biología molecular, la física cuántica, la cibernética, entre otras, para enriquecer su comprensión, aplicabilidad y práctica segura.

Particularmente refiriéndose a la **Terapia neural**, se encuentra que su proceso conceptual ha profundizado ampliamente en la creación de sus bases filosóficas, sin embargo su correlación con algunas de las ciencias mencionadas aún se encuentra en proceso de construcción. Por tanto, se hace necesario retomar las ciencias básicas para

dar un soporte al ejercicio de la terapia neural, con el cual se garantice una doctrina segura, efectiva, actualizada e interdisciplinaria.

Haciendo referencia a la Procaína, que es la sustancia con la que se realiza la terapia neural, su mecanismo de acción, efectos secundarios y contraindicaciones se han explicado tradicionalmente desde su uso como anestésico local pero no como neural terapéutico, conceptos con marcadas diferencias conceptuales.

A la luz de esta inquietud, el presente trabajo tiene como objetivo contribuir con el conocimiento sobre las bases teóricas de la Terapia Neural, mediante la evaluación de la toxicidad de la Procaína en roedores, según el esquema de uso como neural terapéutico. Inicialmente se propone observar los cambios sugestivos de toxicidad que presenten los roedores luego de la administración repetida de la procaína, en microdosis; según la metodología específica que se plantea para la experimentación. Posteriormente se relacionan los resultados del experimento con la información encontrada en la literatura. Para finalmente interpretar la relación entre los resultados del trabajo y la literatura con respecto a la posibilidad de predecir el perfil de toxicidad de la administración repetida de microdosis en seres humanos.

El presente trabajo representa una contribución importante con respecto al uso seguro que se haga de la Procaína, único medicamento con el que se realiza la Terapia Neural.

Al investigar el perfil de seguridad de la Procaína bajo los esquemas utilizados en la terapia neural (y no en su uso como anestésico local), se aportan al neuralterapeuta elementos que facilitan el conocimiento de los efectos neurotóxicos de dicha sustancia y que soportan su práctica segura.

De la misma manera, los resultados de esta investigación pueden aportar información valiosa a los entes regulatorios de las prácticas de la Terapia Neural. Conociendo el perfil de seguridad neurotóxica de la Procaína bajo los esquemas usados en la Terapia Neural, se podrá implementar la reglamentación precisa con respecto a los recursos técnicos y humanos necesarios para hacer una práctica segura.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Anestésicos Locales

### 1.1.1 Historia

Investigaciones arqueológicas en Perú, Chile, Colombia y Bolivia han permitido establecer que la cultura de la coca ha sido parte de la tradición indígena desde hace aproximadamente 4.500 años (5). La utilización de la coca por los pueblos indígenas ha sido ampliamente registrada en diversas crónicas históricas, describiendo usos chamánicos, sociales, populares y rituales. Su connotación sagrada ha sido evidente en los relatos de ceremonias, rituales realizados en las malocas y asociados al mameo de la hoja (6).

Se ha descrito cómo los indios del Perú notaron el efecto anestésico de la coca denominándolo “kunka sukunka”, que traducido del quechua significa “faringe adormecida” (7). Llama la atención las referencias reportadas sobre la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y de caries en poblaciones que acostumbran el mameo (5).

Algunos investigadores aseguran que la palabra “Coca” deriva del quechua, aunque otros afirman que proviene del aymará y que significa arbusto. La cultura aymará se desarrolló cerca al lago Titicaca y fue conquistada por los incas alrededor de 1430. Posterior a esta fecha se empezaron a conocer escritos europeos en los que se mencionaba la coca y su frecuente utilización en América. En un escrito de 1499, Américo Vesputio anota que todos los indígenas acostumbraban mantener cierta hierba en la boca por largos

períodos de tiempo. Hacia 1565 Monrades, un médico español, hace la primera descripción acerca de la coca en la literatura europea y aproximadamente 10 años más tarde publica la primera clasificación de la misma. Desde esta época la Iglesia se manifestaba en contra del uso de la hoja de coca, al considerarla como una práctica pagana. En 1708 Boerhaave, médico holandés, incluyó la coca en una publicación importante sobre hierbas medicinales. Gracias a los especímenes enviados por Jessieu, en 1750 Lamarch realizó la clasificación taxonómica de la coca, identificando 200 especies originarias de América y aproximadamente 50 especies encontradas en Asia, India y otras regiones (5, 6).

Los primeros reportes del aislamiento de la cocaína datan de 1855 por Gaedecke, un químico alemán, y en 1857 por Persey, un médico norteamericano, quien además la propuso como anestésico (8). Alrededor de 1959, Wohler describe el posible efecto anestésico de la cocaína en la mucosa oral (5), de la misma forma el farmacólogo Karl Ritter von Schroff describió los cambios de la sensibilidad de la piel al aplicarle cocaína de forma tópica (8). En 1857 el neurólogo Mantegazza sugirió acerca de los efectos sistémicos de la coca y la propuso como un fármaco potencial (9).

Carl von Scherzer, naturalista australiano, viajó alrededor del mundo y durante su estancia en Perú recolectó y envió suficiente cantidad de la planta para su estudio por parte de los químicos alemanes Abert Niemann y Wilhelm Lossen. En 1860, en Gottingen (Alemania), Niemann aisló el principio activo de la hoja de coca el cual llamó cocaína. Este investigador falleció al poco tiempo, pero Lossen continuó los estudios logrando determinar la fórmula molecular correcta en 1865. Estos investigadores además reportaron el efecto de adormecimiento de la lengua por causa del alcaloide (6).

El primer experimento realizado con la cocaína fue realizado por Moreno y Maiz como parte de su tesis doctoral, quienes encontraron que la inyección de cocaína causaba alteraciones de la sensibilidad en ratas, cerdos y ranas (6).

Hacia 1880, el médico ruso Von Anrep publicó los resultados de sus experimentos en animales e incluso en él mismo, reportando el efecto anestésico al aplicar la cocaína por

vía subcutánea, por lo cual la recomendó como anestésico para uso en cirugía. En 1880 la cocaína aparece como fármaco oficialmente reconocido en la farmacopea norteamericana (5, 6).

Por este tiempo Sigmund Freud mostraba un amplio interés por las propiedades farmacológicas de la cocaína, poniéndolo de manifiesto en textos como “Uber Coca” y “Contribución al Conocimiento de los Efectos de la Cocaína” y sugiriéndola como tratamiento útil para la neurastenia, la ansiedad, la depresión y la adicción a la morfina (6, 8, 9).

Hacia la década de 1880 Carl Koller, oftalmólogo vienés, trabajaba en el Hospital General de Viena lugar donde conoció a Sigmund Freud quien y fue así como Koller se involucró en el estudio de la Cocaína (6).

En septiembre de 1884 Koller presentó la primera operación utilizando anestésico local en un paciente con glaucoma. Este suceso fue reportado en la literatura alemana y americana y dos meses después se habían reportado aproximadamente 150 casos de su uso en anestesia para procedimientos quirúrgicos a nivel corneal y conjuntival. En los años siguientes la cocaína fue ampliamente utilizada como anestésico local en la práctica clínica (6, 9).

A partir de este suceso surgen múltiples estudios buscando ampliar el efecto anestésico de la cocaína. Investigadores como Brettauer, Koller, Konigstein y Hall, entre otros, describen las propiedades de la cocaína para bloquear la conducción sensorial al ser inyectada en un nervio (6). Según reportes, el primero en utilizarla clínicamente para bloqueo nervioso fue Halsted, cirujano de la Universidad John Hopkins (7).

A partir de 1884 múltiples reportes describían los problemas de la fármacodependencia y la toxicidad de la cocaína, principalmente a nivel respiratorio, cardiovascular y nervioso. En los años siguientes el Index Medicus reportaba cada vez más casos de toxicidad, incluso efectos severos como convulsiones y la muerte fueron descritos en esta década. Esto impulsó a la comunidad científica a continuar estudios que pudieran llevar al descubrimiento de fármacos más seguros y con potentes efectos anestésicos como sustitutos de la cocaína (8).

En 1891, Giesel aisló la tropocaína a partir de las hojas de la variedad javanesa de la coca, alcaloide con niveles similares de toxicidad a la cocaína. Posteriormente se sintetizaron sustancias como la holocaína y eucaína. En 1898, Eihorn sintetizó la Nirvaquina, el primer anestésico amino amida, sin embargo por su alta irritación local se suspendió prontamente su uso. En 1900 Eihorn sintetizó la Benzocaína y en 1905 la Procaína (8, 10).

La Procaína fue utilizada durante casi medio siglo como el prototipo de anestésico local que lograba adecuados niveles anestésicos y menores efectos secundarios con respecto a la cocaína. Sin embargo, la necesidad de mejorar su potencia y duración promovió el desarrollo nuevos estudios (7).

Con una modificación en el anillo aromático de la procaína se obtuvo la clorprocaína, logrando mejorar su velocidad de acción y corta duración, sin embargo la presencia de bloqueo motor no deseado luego de aplicarla por vía epidural motivó la suspensión de su uso (8, 10).

En 1930 se desarrolló la tetracaína, utilizado principalmente como anestésico tópico en vía aérea y en anestesia espinal. En 1931 se sintetizó la cinchocaína, usada muy poco tiempo por su alta toxicidad. La lidocaína fue sintetizada en 1944 y utilizada por primera vez en la clínica por Lofgren en 1948. Debido a sus propiedades y seguridad ha sido ampliamente utilizada desde esa época para bloqueos de nervio periférico, bloqueo epidural y anestesia espinal. La efocaína fue descubierta en 1952, pero debido a sus efectos tóxicos a nivel de sistema nervioso no fue aceptada por mucho tiempo (8, 10).

En 1960 se desarrolló la Prilocaína, con características similares a la Lidocaína aunque con menor capacidad de vasodilatación, aunque se asoció a la presencia de metahemoglobinemia como consecuencia de su aplicación.

La mepivacaína se sintetizó en 1957 y en 1963 se sintetizó su molécula butil homóloga, la bupivacaína. Su aplicación marcó un avance muy importante en la historia de los

anestésicos locales, debido a su larga duración y la posibilidad de causar bloqueo motor o sensitivo según su concentración. En 1972 se introdujeron la etidocaina, con importante acción en bloqueo motor y la articaína usada en procedimientos odontológicos (8, 10).

Debido a los efectos tóxicos de la bupivacaína y al efecto motor de la etidocaina, a partir de 1980 se iniciaron nuevos estudios en búsqueda de un anestésico de larga acción, con bloqueo diferencial entre la función motora y sensitiva pero con pocos efectos secundarios. En 1990 se sintetizó la Ropivacaína y se introdujo en la práctica clínica en 1996, fármaco que cuenta con la característica de causar bloqueo diferencial a menores dosis (8, 10).

### 1.1.2 DEFINICIÓN

Los **anestésicos locales** son fármacos capaces de actuar sobre cualquier parte del sistema nervioso, generando un bloqueo de la función sensitiva, táctil, propioceptiva y en algunos casos motora del lugar sobre el cual se apliquen. En las dosis utilizadas en la práctica clínica, el bloqueo es reversible, lo que significa que la recuperación de las funciones nerviosas es completa y no se generan daños en las fibras ni en las células que contactan (7, 11, 12).

### 1.1.3 ESTRUCTURA QUÍMICA

La mayoría de los anestésicos locales comparten una estructura similar constituida por un anillo aromático, generalmente bencénico, y una amina terciaria o secundaria, unidos por una cadena intermedia con un enlace de tipo éster o de tipo amida (13).

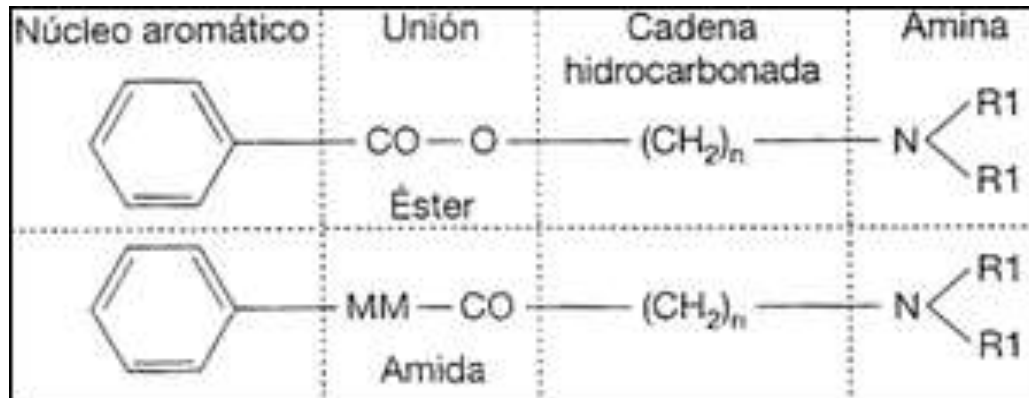


Figura 1. Estructura Química de los anestésicos locales (13)

El anillo aromático determina la liposolubilidad de la molécula. El tipo de enlace (éster o amida) determina la velocidad del metabolismo del fármaco, lo cual se relaciona con la duración de su acción y su toxicidad (12, 13). La cadena hidrocarbonada en la gran mayoría de los anestésicos está conformada por un grupo alcohol y dos átomos de carbono, al aumentar el tamaño de la cadena se aumenta la liposolubilidad del medicamento (13).

El grupo amino terminal puede estar conformado por una amina terciaria o cuaternaria. En la forma de amina terciaria (no ionizada) la molécula es liposoluble, en la forma de amina cuaternaria (ionizada) la molécula es hidrosoluble, este cambio está determinado por el pH del ambiente y el pK de cada anestésico (14).

Según la presencia de un carbono asimétrico se define la existencia de dos esteroisómeros de la molécula "R" o "S", lo que sucede en todos los anestésicos locales exceptuando la lidocaína, sin embargo la mayoría de las presentaciones comerciales utilizan la forma racémica del compuesto (13).



### 1.1.4 CLASIFICACIÓN

Según el tipo de enlace entre el anillo aromático y el grupo amino terminal, los anestésicos locales se clasifican en tipo éster o tipo amida.

Los principales anestésicos tipo éster son la Cocaína, Procaína, Tetracaína y Benzocaína; los principales de tipo amida son la Lidocaína, Bupivacaína, Mepivacaína, Etidocaína, Prilocaína, Ropivacaína (12).

### 1.1.5 FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética es la descripción matemática de los cambios de la concentración de los medicamentos en el cuerpo con respecto a sus procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. La duración y la intensidad de los efectos de los fármacos dependen de los factores que influyan sobre el movimiento de las moléculas dentro del cuerpo (15). Para el objeto del presente trabajo es necesario conocer estos procesos en los anestésicos locales debido a la estrecha relación con su toxicidad.

#### **Absorción**

La absorción de estos medicamentos depende principalmente del grado de vascularización del sitio de aplicación, del efecto vasoactivo y las propiedades fisicoquímicas de cada anestésico y de la adición de vasoconstrictores (16, 17, 18).

Regiones altamente vascularizadas como las mucosas, la pleura y el cuero cabelludo presentan una tasa de absorción rápida, a diferencia de órganos como la vejiga e incluso la piel intacta que se ha definido como impermeable a los anestésicos locales tipo amida (16).

El efecto vasoactivo de los anestésicos locales depende de la dosis y del órgano sobre el cual se aplique. Se ha descrito que dosis altas de anestésico local causan vasodilatación mientras que dosis bajas causan vasoconstricción. Estudios han descrito que la

bupivacaína y la lidocaína en dosis altas causan vasodilatación en piel, mientras que a dosis menores causan vasoconstricción a nivel del músculo (16).

El uso de vasoconstrictores, específicamente de epinefrina, prolonga la acción del anestésico local y mejora la intensidad del bloqueo debido a que hace más lenta la tasa de absorción (16, 17).

Según las propiedades de cada fármaco se describe que la lidocaína se absorbe más rápido que la prilocaína y la bupivacaina más rápido que la etidocaina (17).

### **Distribución**

La distribución tisular se relaciona con la perfusión de cada tejido, la capacidad de atravesar las membranas, la unión a proteínas y las características fisicoquímicas particulares de cada anestésico (16).

Según la perfusión tisular se observa una mayor distribución a nivel pulmonar y renal y menor en músculo esquelético y grasa (17).

Luego de que el anestésico se deposita en el tejido, se difunde por gradiente de concentración hasta la bicapa lipídica de la membrana neuronal. La difusión pasiva del medicamento depende del área y grosor de la membrana, del coeficiente de difusión y de la concentración y propiedades fisicoquímicas del anestésico (14).

En el momento de la inyección, los anestésicos locales se encuentran en forma ionizada, es decir hidrosoluble, estado no apto para atravesar la membrana neuronal. El tiempo de inicio del efecto anestésico depende del cambio de forma ionizada a no ionizada que le permite al anestésico local atravesar el recubrimiento lipofílico de los nervios facilitando el contacto con la membrana axonal. Este proceso depende del pH al que se exponga el anestésico y se determina mediante la constante de ionización o pKa del fármaco. El pKa de los anestésicos locales representa el pH al cual el 50% de las moléculas se encuentran en forma ionizado (más hidrofílica) y el otro 50% en forma no ionizada (molecular, más lipofílica). El pKa de los anestésicos locales está entre 7.5 a 9, por lo que

a un pH fisiológico (aprox 7.4) la mayor parte de las moléculas se encuentra en forma no ionizada (16, 19, 20).

Sin embargo, algunos estudios han encontrado resultados diferentes en la procaína. Como explicación para este comportamiento proponen que la fracción ionizada de la procaína también tiene efectos anestésicos y sugieren darle importancia tanto al anillo aromático lipofílico como a las fracciones ionizadas y no ionizadas en la efectividad de su acción (21).

### **Unión a proteínas**

Los anestésicos locales se unen a la alfa 1 glicoproteína ácida plasmática. Esta unión a proteínas plasmáticas determina la disponibilidad en el sitio de acción, por lo que se asocia con su afinidad por los canales de sodio y la duración del bloqueo anestésico. De los fármacos más utilizados se ha descrito que la bupivacaína tiene mayor porcentaje de unión a proteínas por lo tanto mayor duración de su acción (16, 18).

Según las características de cada medicamento, se describe que la prilocaína se distribuye más rápido que la lidocaína o mepivacaína y la etidocaína más rápido que la bupivacaína (17).

### **Metabolismo**

El metabolismo de los anestésicos locales depende del tipo de enlace. Los anestésicos tipo éster son metabolizados por las pseudocolinesterasas plasmáticas, produciendo metabolitos inactivos, entre ellos el ácido paraminobenzóico a quien se atribuyen las reacciones alérgicas y anafilácticas. Los anestésicos tipo amida se metabolizan a nivel microsomal en el hígado, produciendo metabolitos en algunos casos tóxicos (12, 13, 18).

En cuanto al metabolismo hepático, la prilocaína muestra una tasa más rápida, la lidocaína, mepivacaína y etidocaína tienen una tasa de degradación intermedia, mientras que el metabolismo de la bupivacaína es mucho más lento (17).

### **Excreción**

Uno de los parámetros más importantes en relación con la excreción de los anestésicos locales es su vida media. La bupivacaína se presenta como el anestésico local de los que se usan comúnmente con la vida media más larga (aproximadamente 3 horas) (16).

El "clearance" (aclaramiento, depuración) determina la eficiencia con la que se eliminan del organismo los anestésicos locales y depende principalmente de su unión a proteínas y del pH de la orina. Estudios realizados en humanos, sobre el clearance renal de la lidocaína y prilocaína han mostrado que el clearance de estas sustancias es inversamente proporcional al pH de la orina, lo que ha sugerido que la excreción ocurre por difusión no iónica (18).

Como se anotó anteriormente la biotransformación de estos medicamentos se hace principalmente en el hígado, por lo que la excreción por vía renal es básicamente de los metabolitos inactivos (12, 16). En el caso de la procaína un 2% es excretada sin cambios, encontrándose en orina aproximadamente un 90% de PABA (ácido para-aminobenzoico) (17).

Las principales características farmacológicas de la procaína son:

Anestésico de potencia baja y duración corta.

- Liposolubilidad de 1, potencia relativa de 1, comienzo de acción (latencia) de 6 a 10 minutos, pKa de 8,9, porcentaje de unión a proteínas de 6 y duración del efecto de 60 a 90 minutos.
- El pH de la solución simple es de 5,0 a 6,5 y con vasoconstrictor de 3,5 a 5,5. Se considera el anestésico con mayor potencial de vasodilatación.
- Su volumen de distribución es de 0.93 L/Kg, su clearance es de 5.62 L/Kg/h y la vida media es de 0.1 horas (6 minutos).
- Mediante la acción de las colinesterasas plasmáticas se producen dos metabolitos importantes: el PABA y el dietilaminoetanol.
- La excreción de la procaína por vía renal se da en un 90% como PABA, en un 2% como dietilaminoetanol y un 2% de procaína sin metabolizar (11, 12, 16, 17).

### 1.1.6 FARMACODINAMIA

La farmacodinamia de los anestésicos locales permite comprender su mecanismo de acción y los efectos físicos, químicos y fisiológicos sobre el organismo (12), procesos relacionados con la toxicidad farmacológica.

#### **Mecanismo de acción**

Los anestésicos locales “previenen la generación y la conducción del impulso nervioso”, actuando directamente sobre la membrana celular (12).

Es necesario comprender los mecanismos de la conducción nerviosa para entender el funcionamiento de los anestésicos locales:

En todas las células excitables los movimientos iónicos a través de las membranas semipermeables proveen el potencial energético necesario para la conducción del impulso. En las células nerviosas estos movimientos se inician y se mantienen gracias a la bomba Na-K ATP, la cual es electrogénica (es decir que bombea más cargas positivas hacia el interior que hacia el exterior) y dependiente de energía (13, 22).

Gracias al funcionamiento de esta bomba se permite el movimiento de iones potasio al interior de la célula y de iones sodio al exterior, lo que permite que la célula en reposo establezca una diferencia de voltaje entre las caras interna y externa de su membrana. Para la célula nerviosa esta diferencia de voltaje, es decir su potencial de reposo, es de -60 a -90 mV. En esta fase la puerta de activación del canal de sodio se encuentra cerrada impidiendo la entrada de sodio a la célula y la membrana se encuentra en estado de polarización. El campo eléctrico generado por el impulso nervioso genera un cambio en el potencial de membrana haciéndose menos negativo, cuando el potencial alcanza los -70 a -50 mV se abre la puerta de activación del canal de sodio llevándolo a su estado

activado. De esta forma se genera una entrada masiva de sodio a la célula llevando el potencial a un valor positivo. Unas diezmilésimas de segundo el aumento de voltaje cierra la puerta de inactivación, impidiendo la entrada de sodio a la célula y los canales de potasio se abren para permitir la entrada de este ión. A partir de ese momento inicia la fase de repolarización que busca regresar al potencial de reposo (11, 13, 22, 23, 24).

Los anestésicos locales actúan directamente sobre los canales de sodio voltaje dependientes, disminuyendo su permeabilidad al sodio y por tanto alterando la excitabilidad de la membrana. Tienen una alta afinidad por el estado abierto o inactivo del canal. Al bloquear la primera fase del potencial de acción se disminuye la velocidad de despolarización, retrasando la conducción del impulso y la propagación del potencial. Estos procesos conllevan a un bloqueo de la despolarización de la célula con la consecuente falla de la conducción nerviosa (12, 13, 22, 24).

El efecto de estos fármacos depende del potencial de membrana, la conformación del canal, el pH y el acceso al poro del ión conductor.

Estudios experimentales han permitido suponer que el sitio de acción de los anestésicos locales es la porción interna del canal de sodio, específicamente en el segmento S6 del dominio IV de la subunidad alfa (12).

La posición del sitio de unión de la lidocaína y otros anestésicos locales se ha definido mediante estudios de mutagénesis. Estos estudios identificaron una llave fenilalanina necesaria para el bloqueo voltaje-dependiente del canal por parte de los anestésicos locales (en el humano F1759). Está fenilalanina se encuentra a nivel transmembrana en el segmento S6 del dominio IV de la subunidad alfa que contacta la porción intracelular del poro del canal (25, 26, 27).

Como se describió anteriormente la amina terciaria de los anestésicos locales se ioniza a pH fisiológico, y los estudios han propuesto que esta forma es la responsable de la unión a F1759. Además se ha sugerido que la parte hidrofóbica al otro extremo del anestésico local se une con un residuo de tirosina (Y1766 en el humano) localizado dos vueltas

helicoidales más intracelular en IVS6. Estas uniones determinan el alineamiento de la molécula a través de la pared del canal, con su grupo amino terciario cargado (26, 27, 28).

Inicialmente se pensó que el anestésico local ocluía físicamente el sitio al que se unía en el canal, sin embargo estudios moleculares permitieron demostrar que las moléculas eran demasiado pequeñas para ocluir completamente el poro. Esto permitió la hipótesis de que los anestésicos locales impedían el flujo de corriente a través del canal, al introducir una carga positiva que electrostáticamente impida el flujo de iones de sodio (25, 26, 27).

Sin embargo, experimentos consistentes en introducción de cargas en la posición F1759 del poro han permitido evidenciar que la carga positiva por si misma no es capaz de bloquear completamente el flujo de sodio a través del canal (26, 27).

Combinando modelos moleculares y cálculos del perfil del potencial eléctrico dentro del poro, algunos experimentos han comparado los efectos de las cargas positivas en este nivel con y sin la presencia de moléculas de anestésicos locales bloqueando el poro. Algunos modelos mostraron que aminoácidos con carga negativa en el filtro de selectividad del poro y en un anillo de aminoácidos con carga negativa en el área extracelular del filtro producen un fuerte potencial eléctrico negativo que se extiende a través del filtro de selectividad del poro y en su porción intracelular. Este campo negativo favorece la conducción de iones de sodio. Sustituyendo aminoácidos positivos en F1759 se hizo más positivo el potencial a nivel de la porción intracelular del filtro de selectividad del poro, produciendo una barrera al paso de iones de carga positiva. Sin embargo una molécula de anestésico local unida al poro modificado (con su carga positiva cerca de F1759) aumentó el doble la energía de esta barrera comparada con los aminoácidos de carga positiva. Este aumento importante de la barrera energética producido por los anestésicos locales ha explicado la forma como estos bloquean el canal (26).

Además del efecto sobre los canales de sodio, los anestésicos locales se unen a otros receptores de la membrana nerviosa.

Aunque se ha visto que pueden bloquear los canales de potasio, se dice que las concentraciones para que se dé el bloqueo son mayores a las utilizadas en la práctica

clínica (12, 22). Sin embargo, algunos estudios han sugerido que el efecto del bloqueo de los canales de potasio no sólo contribuye a la prolongación del potencial de acción sino que también puede asociarse con efectos secundarios de los anestésicos locales como excitabilidad del sistema nervioso o arritmias (29).

Otros estudios han sugerido que los anestésicos locales inhiben los receptores 5HT<sub>3</sub> (serotonina) de forma dosis-dependiente, la inhibición por parte de la procaína y tetracaína es competitiva, mientras que la bupivacaína y lidocaína tienen mecanismos tanto competitivos como no competitivos (30).

Otras investigaciones han demostrado que los anestésicos locales inhiben los receptores NMDA de forma concentración-dependiente, en el caso específico de la procaína y la bupivacaína se ha sugerido que el sitio de acción estaría relacionado con el sitio de bloqueo por el ión Mg y la Ketamina (31).

### **Efectos sobre el organismo**

Los anestésicos locales tienen la capacidad de actuar sobre cualquier tipo de membrana excitable, por lo que tienen efecto en cualquier punto de las neuronas, en cualquier grupo ganglionar e incluso en las células musculares y miocárdicas. Aunque tienen la particularidad de hacer efecto sobre el nervio blanco al ser absorbidos a la circulación sistémica pueden tener efectos sobre otros órganos, principalmente en Sistema nervioso central y cardiovascular (11).

Según la concentración y el tiempo de exposición, el anestésico local muestra selectividad por las fibras nerviosas de menor diámetro (fibras C) y las de mayor densidad de canales de sodio (las  $\square$ A), sin embargo cuando su concentración se equilibra en el tejido, se pierde esta selectividad. Así, se pierde primero la sensibilidad al dolor, luego a la temperatura, luego al tacto y finalmente la propiocepción. Generalmente las fibras motoras no se bloquean, excepto cuando se incide en nervios periféricos



importantes, debido a la ubicación externa de las fibras motoras sobre las sensitivas (11, 12, 13).

Al tener su acción directa sobre la membrana celular, los investigadores han mostrado interés en estudiar el efecto que los anestésicos locales puedan tener sobre las membranas de células diferentes a las nerviosas o musculares. Un estudio realizado por Suwalsky y col., mediante observación de diversos tipos celulares expuestos a procaína con rayos X y microscopía electrónica, mostró la interacción de este anestésico con los fosfolípidos de membrana, principalmente con las fosfatidilserinas, pudiendo afectar la estructura y fisiología de la membrana (32).

El metabolismo mitocondrial también se influye por acción de los anestésicos locales. Estudios han mostrado su capacidad para inhibir la ATPasa mitocondrial y las enzimas de la cadena respiratoria, lo que se ha asociado con la presentación de reacciones tóxicas con el uso de los anestésicos locales. Algunos reportes afirman que la procaína puede tener efectos protectores en la ultraestructura mitocondrial y en sus propiedades dependientes de energía, al parecer por la inhibición de la fosfolipasa A2. También se ha descrito su efecto sobre procesos mitocondriales como apoptosis y oxidación (33).

Estudios in vitro describieron que la deformabilidad de los eritrocitos disminuyó bajo los efectos de la procaína y la tetracaína a diferentes concentraciones, lo cual podría tener algún efecto benéfico sobre la microcirculación (34). Un estudio realizado por Gotta col., demostró que los anestésicos locales tienen la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, aparentemente por una disminución de la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, estos cambios se lograron con dosis superiores a las consideradas seguras en la práctica clínica (35).

Sobre el efecto de los anestésicos locales en el sistema inmune, estudios en células humanas han evidenciado que tienen la capacidad de inhibir la fagocitosis de los leucocitos, la adhesión, difusión y locomoción de los macrófagos, la liberación de enzimas lisosomales de los granulocitos, inhiben la actividad citolítica de los linfocitos NK y pueden inhibir la producción de IL2, TNF e IFN por parte de los linfocitos T (36, 37). Se han descrito importantes efectos antiinflamatorios en tejido pulmonar lesionado, en

patologías gastrointestinales y efectos benéficos de su uso sobre la microcirculación y la reperfusión miocárdica luego de un infarto (38).

A nivel de los microtúbulos cerebrales se ha descrito que la procaína y tetracaína aumentan la tasa de polimerización de la tubulina y de la despolimerización de los microtúbulos, mecanismo dependiente de las concentraciones utilizadas (39).

Incluso se ha descrito algún efecto antibacterial de los anestésicos locales, al parecer por inhibición el crecimiento y alteración de la actividad enzimática de las membranas bacterianas, causando alteraciones estructurales, cambios en la permeabilidad y lisis del microorganismo. Los reportes indican que la lidocaína parece presentar mayor actividad antibacterial con respecto a otros anestésicos usados comúnmente en la práctica (40, 41).

Con todo lo anterior se puede concluir que el efecto de los anestésicos locales no se limita al bloqueo de la conducción nerviosa, sino que tiene una acción muy amplia sobre todos los sistemas del organismo, con una repercusión muy importante en sus mecanismos de toxicidad.

### **1.1.7 APLICACIONES CLÍNICAS**

Comúnmente se utilizan buscando su efecto anestésico, aunque por ejemplo en el caso de la Terapia Neural, la procaína se utiliza como neuralterapéutico, en dosis y concentraciones diferentes a las que se utilizan en anestesia y buscando efectos diferentes al del bloqueo nervioso, lo cual se comentará más adelante.

Los anestésicos locales solamente se utilizan para anestesia regional en diversas formas.

Para anestesia tópica de piel y mucosas se emplean soluciones acuosas de tetracaína, lidocaína y cocaína o polvo de benzocaína. Aunque su nivel de acción son las terminaciones nerviosas del área en la que se aplican, pueden ser absorbidos y tener acción sistémica.

La anestesia por infiltración puede hacerse extravascular o intravenosa, buscando la difusión del medicamento y su efecto sobre las terminaciones nerviosas locales.

Con el bloqueo nervioso y de troncos nerviosos se busca inhibir la conducción del trayecto del nervio o plexo en el que se practiquen.

En la anestesia epidural se inyecta el anestésico directamente en el espacio epidural y en la anestesia espinal se hace la aplicación en el espacio subaracnoideo (11).

Las dosis se especifican según el tipo de anestesia que se utilice. Según la literatura revisada, para el caso de la Procaína la dosis máxima recomendada en adultos para anestesia por infiltración es de 1.000 mg (de procaína al 1 o 2%), para bloqueo nervioso es de 500 mg y para anestesia epidural 500-600 mg (16).

## **1.1.8 TOXICIDAD**

### **1.1.8.1 HISTORIA DE LA TOXICIDAD**

A partir del descubrimiento de Koller, sobre la eficacia anestésica de la cocaína usada tópicamente para la cirugía ocular, se iniciaron estudios para comprobar su acción y toxicidad al ser usada como anestésico local (10).

En 1868 Moreno y Maiz presentaron el primer reporte de convulsiones inducidas por cocaína en animales. En 1880, von Arep publicó una completa revisión sobre la Cocaína, incluyendo datos importantes de su toxicidad. En 1981 se publicó "Envenenamiento por Cocaína" en el cual se citaban más de 125 casos secundarios a toxicidad por cocaína (9).

Hoy se conoce que la cocaína comparte con los demás anestésicos locales su acción sobre los canales de sodio, sin embargo su efecto sobre la liberación de catecolaminas aumenta su perfil toxicológico. A nivel del sistema nervioso central es un potente estimulante, causando euforia, locuacidad, inquietud y en dosis mayores temblores, incoordinación motora y convulsiones. Luego de la estimulación puede suceder depresión del sistema nervioso con falla respiratoria y muerte. En dosis bajas puede

causar bradicardia, al aumentar las dosis por su efecto vagal central puede favorecer la hipotensión y por efecto directo sobre el miocardio puede darse la insuficiencia cardíaca. Incluso su uso tópico ha mostrado esfacelación del epitelio de la córnea y severa toxicidad por vía respiratoria (41).

En el proceso de la búsqueda de anestésicos locales más seguros las investigaciones apuntaron a hacer modificaciones en la estructura de la cocaína para disminuir sus efectos adversos. Surgen así moléculas como la eucaína, la ortocaína y la nirvaquina con importantes reacciones a nivel local por lo que su uso fue restringido.

Posteriormente se sintetiza la procaína, que mostró menor irritación local pero acción corta a bajas dosis, lo que permitió suponer que sus efectos tóxicos serían similares a los de la cocaína si se aumentaran las dosis para lograr acción anestésica. En 1930 se sintetizó la Tetracaína, con toxicidad sistémica alta por su rápida tasa de absorción por lo que su uso se limitó a anestesia tópica de vía aérea. En 1960 se sintetizó la Prilocaína, anestésico tipo amida cuyos metabolitos 4-hidroxi-2-metilalanina y ortotoluidina se han asociado con el desarrollo de metahemoglobinemia. La bupivacaína, sintetizada en 1963, se ha asociado principalmente con efectos cardiotóxicos principalmente arritmias súbitas (10).

La toxicidad sistémica asociada al uso de anestésicos locales cambió notablemente a partir de 1981, antes de esta fecha múltiples publicaciones sustentaron los efectos tóxicos de estos medicamentos al ser usados por vía epidural (Blundell, 1955; Bonica, 1957; Morre, 1978; Kenepp, 1981). Bonica y colaboradores reportaron una incidencia mayor al 3% en pacientes obstétricas.

En 1983 la FDC (Food and Drug Commission) de Estados Unidos se reunió para analizar los casos reportados en los años previos sobre toxicidad de anestésicos locales. Allí, Albright presentó 49 casos de paro cardíaco asociados al uso de bupivacaína, de los cuales 21 fueron muertes, 16 en pacientes obstétricas. Luego se reportó una serie de casos de 52 muertes asociadas al uso de bupivacaína, de las cuales 31 fueron casos obstétricos. Posteriormente la FDA declaró contraindicado el uso de la bupivacaína

intravenosa en anestesia regional y sugirió evitar su uso al 0.75% en la práctica obstétrica (9). Además, se hicieron recomendaciones con base en la técnica, incluyendo aspiración, inyección progresiva, control de las dosis y el uso de dosis de prueba, particularmente con los vasoconstrictores asociados al anestésico (43).

A partir de esta fecha se evidenció una importante disminución de la toxicidad sistémica asociada a anestésicos locales principalmente a los usados por vía epidural. Por ejemplo una revisión del Centro de Enfermedades Comunicables en Estados Unidos, sobre morbilidad materna realizada por Hawkins y col. reportó una importante disminución de la mortalidad materna relacionada con los procedimientos anestésicos después de 1984. Resultados similares se concluyen en el estudio Claim Closed de la Sociedad Americana de Anestesiología. Tanaka en 1993 reportó una frecuencia de toxicidad sistémica de 11 por cada 10.000 anestésias epidurales realizadas, y Brown en 1995 revisó la experiencia de la Clínica Mayo y reportó una incidencia de 1,2 por cada 10.000 anestésias epidurales realizadas (43).

Una revisión reciente sobre reacciones adversas a los anestésicos locales realizada por la Universidad de Tolouse en Francia presenta una caracterización importante del perfil toxicológico de estos medicamentos (44).

El objetivo del estudio fue caracterizar el perfil de seguridad de la lidocaína, bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína y levobupivacaina. Tomaron los casos de reacciones adversas a anestésicos locales reportados en el sistema francés de farmacovigilancia entre 1995 y 2006. Identificaron 727 casos (el 0.3% del total de la población de la base de datos) que reportaron 1157 diferentes reacciones a anestésicos locales. La lidocaína (36%) y la bupivacaína (35.4%) fueron los anestésicos más involucrados (44).

En orden de frecuencia las reacciones reportadas fueron: falla en el bloqueo anestésico, complicaciones neurológicas, alergias, complicaciones cardiovasculares y por último síntomas respiratorios.

La falla en el bloqueo anestésico se reportó en un 27%, con un 90% debido a anestesia espinal con bupivacaína. En este caso se descartaron fallas en la técnica de administración y presencia de otros medicamentos (44).

En el 22% se reportaron reacciones neurológicas, de las cuales las convulsiones fueron las más frecuentes (21.2%), con 4 casos de muerte asociados a este hecho. Los anestésicos más involucrados en este tipo de reacción fueron lidocaína (43%), ropivacaína (30%) y bupivacaína (12%). Un 9.9% correspondió a daño del nervio (todos asociados a bupivacaína), 6% a desórdenes psiquiátricos, 4.6% disartria, 3.9% parálisis y somnolencia en un 3.5% (44).

El 19% de los reportes correspondió a casos de alergia, lo más frecuente fue el edema (29%), seguido de erupciones en piel (28%), reacciones anafilácticas (14%) y urticaria (13%). Sin embargo, de los casos de alergia, solamente en 14 casos se pudo confirmar el anestésico como el causante de la alergia, gracias a pruebas de sensibilidad en piel o al hecho evidente de que la reacción se presentó luego de la administración del medicamento. Esto significa que solo un 2% del total de los casos de reacciones adversas (de los 727) se pudo establecer como alergia inducida por anestésicos locales (44).

En el 15% de los casos correspondió a reacciones a nivel cardiovascular. El anestésico más involucrado fue la mepivacaína, seguida de la ropivacaína, lidocaína y bupivacaína. El síntoma más frecuente fue incomodidad en el pecho (25.4%), seguido de hipotensión (11.2%), paro cardíaco (10.7%), bradicardia (9.3%), taquicardia y shock circulatorio (7.8%). Se reportaron 3 casos de pacientes fallecidos por paro cardíaco (44).

Las complicaciones respiratorias representaron el 2.8% de todos los casos, la disnea fue el síntoma más frecuente, seguido de broncoconstricción y paro respiratorio (44).

Un estudio realizado en el Reino Unido mostró características similares. Para esta investigación se utilizó la base de datos ADROIT (Adverse Drug Reporting On Line Tracking System) analizando los casos de reacciones adversas a anestésicos locales

reportados entre 1967 y 2005. Incluyeron 985 casos, de los cuales 797 involucraron a lidocaína, 160 a bupivacaína, 16 a ropivacaína y 12 a levobupivacaína (45).

Según la ruta de administración se encontró que lo más frecuente fue el uso dental de la lidocaína (18%), seguida de la vía parenteral al parecer por punción accidental (16%), otras vías incluyen lidocaína subcutánea (13.1%), lidocaína tópica (12.5%), bupivacaína y levobupivacaína epidural (45).

Según el medicamento los hallazgos mas frecuentes fueron la asociación de lidocaína y alergia en un 29%, bupivacaína y convulsiones, bupivacaína y cardiotoxicidad, levobupivacaína y síntomas cardiovasculares (45).

#### **1.1.8.2 FACTORES QUE DETERMINAN LA TOXICIDAD**

La toxicidad de los anestésicos locales depende de factores propiamente asociados al fármaco, de la dosis, de la técnica de administración, de la interacción con otros medicamentos y de las condiciones del paciente (46, 47).

Como ya se describió previamente las propiedades farmacológicas del medicamento le confieren características asociadas a su grado de toxicidad. La liposolubilidad determina la facilidad para que el anestésico contacte la fibra nerviosa, la tasa de absorción y el metabolismo determinan la disponibilidad del anestésico en el tejido blanco. Los anestésicos locales más hidrófobos se relacionan con mayor toxicidad debido a su distribución es más amplia, su tasa de metabolismo es menor y son más afines a los canales de sodio. El tamaño de la molécula también se relaciona con su grado de toxicidad, las moléculas más pequeñas pueden liberarse con mayor facilidad del sitio receptor disminuyendo su potencial tóxico (9, 12, 46, 47).

En cuanto a la técnica de administración, la inyección intravascular accidental es el factor con el que más se relacionan los efectos tóxicos de los anestésicos locales, al generarse un pico más alto y rápido del medicamento en sangre. El mismo efecto se puede lograr con la inyección en lugares altamente vascularizados, en los cuales la absorción sistémica es alta aunque la duración del efecto anestésico es menor. Algunos estudios han demostrado que al aplicar anestésico local en el tejido intercostal se reporta la mayor

concentración del medicamento en sangre (9). Tejidos lesionados con respuesta vasoconstrictora postraumática tienden a disminuir la absorción sistémica del anestésico (11).

Existen reportes de casos de síntomas neurológicos asociados al uso de lidocaína tópica en lesiones orales o durante procedimientos de vía aérea o gastrointestinal. Incluso se han reportado casos de convulsiones y depresión respiratoria luego de la administración de lidocaína tópica en la piel (48).

La velocidad de inyección también incide en la presencia de toxicidad. Un estudio de Scott hecho en humanos mostró que al administrar etidocaína intravenosa a 20 mg/minuto se presentaron síntomas neurológicos con una dosis total de 161 mg; mientras que al administrarlos a una velocidad de 10 mg/minuto se requirió una dosis de 236 mg. Otro estudio realizado en perros mostró que se presentaban convulsiones luego de administrar un bolo de 3.4 mg/Kg de bupivacaína y 3 mg/Kg de ropivacaína. La administración de las mismas dosis en un tiempo mayor a 15 minutos no registró convulsiones (9).

Las condiciones particulares de cada paciente pueden incidir de forma significativa en la toxicidad de los anestésicos locales.

Pacientes con hepatopatías tienen una disminución en la tasa de metabolismo de las amidas, por lo que se pueden aumentar los niveles del anestésico en sangre y potencializar su efecto tóxico. Así mismo, la falla cardíaca puede disminuir el flujo sanguíneo a nivel hepático e interferir con el metabolismo de los anestésicos locales. De la misma forma situaciones que disminuyen la cantidad de colinesterasas en sangre pueden alterar la hidrólisis de estos medicamentos (9, 13, 47).

Un estudio clínico reportó que la hiperkalemia y la acidosis en un paciente con falla renal crónica como un factor importante para el desarrollo de toxicidad por bupivacaína (9).



Altas dosis de anestésicos pueden empeorar condiciones preexistentes del corazón como bloqueos o daño miocárdico (9).

Con respecto a la relación de la edad con la toxicidad de los anestésicos locales se encuentran diferentes opiniones. Algunos experimentos han permitido suponer una mayor resistencia a la toxicidad en pacientes jóvenes. Esta particularidad se ha asociado a posibles diferencias en los procesos metabólicos, en la unión a proteínas, en la distribución del fármaco e incluso a inmadurez de los sistemas nervioso y cardiovascular (9). Sin embargo, estudios en animales han descrito una relación inversa entre la toxicidad de anestésicos más liposolubles (como etidocaína y bupivacaína) y la edad. Proponen que el porcentaje de peso de los ratones más adultos tenga mayor cantidad de tejido adiposo, por lo que se concentrarían menos en un solo tejido disminuyendo su potencial tóxico (49).

Otra condición discutida es la interferencia del estado ácido-base del paciente sobre la toxicidad de los anestésicos locales. Algunos autores afirman que los cambios en el pH sanguíneo y la PaCO<sub>2</sub> pueden alterar la dosis del anestésico local y causar convulsiones. Estudios en animales han mostrado una relación directa entre la dosis del anestésico que puede causar convulsiones y el pH e inversa con la PaCO<sub>2</sub>. Se ha demostrado en estudios animales mayor cardiotoxicidad de la bupivacaina en estados de hipoxia y acidosis (9). Sin embargo, otros estudios sugieren que la acidificación de los anestésicos locales tipo amida no altera su toxicidad a nivel de sistema nervioso central (50).

Las reacciones de toxicidad sistémica más descritas son neurotoxicidad, cardiotoxicidad y alergias. La miotoxicidad es un efecto menos común.

Anteriormente se utilizaba solamente la **dosis letal 50** (DL50) para analizar la seguridad de los anestésicos locales en los estudios animales, sin embargo debido a las diferencias encontradas entre animales, especies, dosis, vías y velocidad de administración, se estableció el **índice CC/CNS** (dosis para generar colapso cardiovascular/dosis para generar convulsiones) útil para comparar la toxicidad cardiovascular de los diferentes anestésicos estudiados. Se considera un medicamento más seguro si tiene un índice más alto, debido al tiempo que permitiría para tratar los síntomas iniciales de intoxicación

antes de generar convulsiones. La mayoría de los estudios reportan así los índices de menor a mayor: bupivacaína, levobupivacaína, ropivacaína, lidocaína (51).

La mayoría de los estudios de animales concientes evalúan la presencia de convulsiones según la dosis administrada. La dosis límite para causar convulsiones es una medida de toxicidad sobre el sistema nervioso central (51).

### **1.1.8.3 NEUROTOXICIDAD**

El sistema nervioso central es más sensible a la toxicidad por anestésicos locales y sus síntomas se suelen manifestar antes que los cardiovasculares (17).

La entrada del anestésico local a la circulación cerebral se da principalmente por las siguientes causas (52):

Sobredosis del medicamento inyectado cerca a troncos nerviosos periféricos que posteriormente será absorbida a la circulación sistémica.

Aplicación de dosis no tóxicas en sitios altamente vascularizados.

Inyección accidental en extensiones durales, a nivel de troncos nerviosos cervicales o craneales.

Inyección accidental arterial o venosa. Para que ocurran convulsiones luego de la inyección en sistema venoso o médula ósea se requiere la aplicación de dosis excesiva y en bolo.

El flujo reverso a través de sangre arterial puede suceder en aplicaciones en cabeza y cuello con una alta presión.

Se ha sugerido que la primera fase de la neurotoxicidad es la excitación y se debe al bloqueo del sistema inhibitorio, estimulando la corteza y los centros cerebrales. Las manifestaciones clínicas corresponden a las de excitación del sistema nervioso: entumecimiento perioral y lingual, aturdimiento, acúfenos, agitación, verborrea y lenguaje incoherente, dificultad para pronunciar las palabras, espasmos musculares, nistagmus, intranquilidad, euforia, náusea, vómito, desorientación, inquietud, fasciculaciones, temblor y convulsiones (12, 17, 47, 51, 53).

Al aumentar la dosis del anestésico se bloquean tanto el sistema inhibitorio como el excitatorio produciéndose una depresión del sistema nervioso y la muerte a causa de paro respiratorio (11, 12, 17).

Algunos estudios han mostrado que la administración intravascular rápida de anestésicos locales puede causar efectos depresores y la muerte sin el estadio previo de la excitación nerviosa. La lidocaína y la procaína pueden causar pérdida del estado de conciencia con somnolencia como único síntoma predecesor (12).

Existe una relación entre la potencia del anestésico y la dosis necesaria para causar convulsiones, teniendo en cuenta también la vía de administración y la velocidad de inyección. Los anestésicos de larga duración son aproximadamente 4 veces más tóxicos que la lidocaína (51).

La procaína es el anestésico menos potente y menos tóxico después de su inyección intravenosa, mientras que la bupivacaína, tetracaína y etidocaína presentan mayor potencia y mayor efecto convulsivo (17, 54).

Niveles de Procaína en sangre mayores a 20 ug/ml se asocian a síntomas en sistema nervioso central, para Lidocaína, mepivacaína y prilocaína de 5-10 ug/ml y para tetracaína, bupivacaína y etidocaína de 1,5-4 ug/ml (17).

Un estudio realizado en neuronas de caracol en cultivo permitió establecer que la procaína y la mepivacaína tienen los menores efectos adversos en el crecimiento de conos y dendritas, seguidas por ropivacaína y bupivacacaína, luego lidocaína, tetracaína y por último como la más tóxica la dibucaína (55).

Múltiples estudios han permitido afirmar que los anestésicos locales son tóxicos a nivel de nervio periférico. A este nivel se considera que el potencial tóxico no se relaciona con el pH, la osmolaridad de las soluciones, los aditivos asociados o la liposolubilidad, sino con la concentración local del anestésico y su potencia para causar bloqueo nervioso. Los estudios experimentales in vivo e in Vitro han permitido proponer que se produce un daño directo de las células de Schwann y una degeneración axonal del nervio afectado.

También se ha propuesto que la aplicación tópica o local de los anestésicos locales puede causar citotoxicidad directa o alterar el microambiente nervioso exponiendo al nervio a isquemia y a daño secundario (56, 57).

Entre los síndromes descritos asociados a la toxicidad nerviosa periférica de los anestésicos locales están el de cauda equina y el neurológico transitorio.

El Síndrome de Cauda Equina es una complicación poco frecuente después de la anestesia espinal, principalmente con el uso de lidocaína. Según la intensidad del anestésico utilizado se puede presentar muerte neuronal por apoptosis o necrosis.

El Síndrome Neurológico Transitorio (TNS) se define como severo dolor pero pasajero, en los dermatomas lumbosacros dentro de las 24 horas luego de la aplicación de anestesia espinal. Aunque sus mecanismos no están claramente identificados, parecen diferentes a los que se asocian al Síndrome de Cauda Equina (56, 58, 59).

Takenami y col., en un estudio realizado en ratas, utilizaron varios anestésicos locales en diferentes concentraciones (mepivacaína, prilocaína, procaína al 2, 10, 16 y 20% y bupivacaína al 0.5, 2.5, 4 y 5 %) para administración intratecal y posterior observación de cambios clínicos e histológicos.

El tiempo de recuperación para la deambulación fue menor en el grupo de la procaína. Se presentaron daños histológicos con prilocaína y mepivacaína al 16 y 20% y con bupivacaína al 4 y 5%. La procaína no generó daños evidentes al estudio histológico ni siquiera la concentración más alta (20%). (60)

Sin embargo dentro de la literatura revisada para el presente estudio se encontró un caso de síndrome de cauda equina irreversible asociado a la anestesia espinal con Procaína al 10%. En este mismo reporte de caso citan múltiples casos de estudios en animales que sugieren que la procaína tiene un efecto neurotóxico similar al de otros anestésicos locales, contrario a lo que han expuesto estudios recientes de experimentación in vivo e in vitro (59).

#### 1.1.8.4 CARDIOTOXICIDAD

Aunque no está claro el mecanismo por el cual los anestésicos locales causan depresión miocárdica, se ha sugerido que el bloqueo de los canales de sodio disminuye la contractilidad de la célula miocárdica. Además, algunos estudios han sugerido que los anestésicos locales aumentan la liberación del calcio en el miocardio y por tanto disminuye su contractilidad (9,11).

Se ha sugerido que el efecto directo del anestésico sobre el miocardio cause una primera fase de excitación con taquicardia e hipertensión como síntomas predominantes. A medida que la concentración en sangre aumenta se genera depresión de la contractilidad produciendo arritmias, bradicardia, hipotensión y paro cardíaco (51).

Las alteraciones de la contractilidad cardíaca se han visto relacionadas a la dosis del anestésico y son proporcionales a la potencia del bloqueo nervioso, lo que implica que los anestésicos locales más potentes tienden a reducir más la contractilidad a dosis más bajas que los anestésicos locales menos potentes. Por la depresión de la contractilidad se produce hipotensión, elevación de la presión de fin de diástole, reducción del efecto inotrópico, del gasto cardíaco, y de la fracción de eyección (9, 13, 51).

Los estudios electrofisiológicos en animales han mostrado una prolongación de la conducción cardíaca dependiente de la dosis del anestésico, induciendo un aumento en el intervalo PR y de la duración del QRS. La depresión de SA y del nodo AV se manifiesta con bradicardia e hipotensión (51).

Los anestésicos más liposolubles, con mayor unión a proteínas y más potentes son los más cardiotóxicos (tetracaína, bupivacaína, etidocaína) en comparación con los menos liposolubles, con menor unión a proteínas y menos potentes (lidocaína, prilocaína, mepivacaína) (61). Estudios en tejido cardíaco aislado en los que se administran directamente al tejido dosis no tóxicas (si fueran inyectadas en circulación), han mostrado la capacidad de la lidocaína y bupivacaína de generar arritmias (9).

El anestésico más relacionado con cardiotoxicidad es la bupivacaína, los datos sugieren que su potencial arritmogénico es mayor que el de la Lidocaína y se encuentra en medio de la ropivacaína y la levobupivacaína (51).

Estudios en animales en los que se administran dosis progresivas de bupivacaína, procaína, etidocaína, tetracaína, lidocaína, mepivacaína y prilocaína han demostrado su capacidad de producir importante disminución de la presión arterial, frecuencia cardíaca y del gasto cardíaco, llevando a la muerte a los animales por hipotensión severa. La dosis letal más baja correspondió a la bupivacaína, seguida de tetracaína y etidocaina. Se encontró que la procaína necesitó la mayor dosis para causar la muerte (9).

A nivel cardiovascular la lidocaína en dosis y niveles sanguíneos no tóxicos puede generar síntomas debido a un leve aumento en el gasto cardíaco y en la presión sistémica. Niveles sanguíneos de 5-10 ug/ml causan depresión de la contractilidad miocárdica y relajación de la pared vascular generando caída del gasto cardíaco y de la resistencia vascular periférica (17).

#### **1.1.8.5 REACCIONES ALÉRGICAS**

En general, los estudios reportan baja incidencia de alergias secundarias al uso de anestésicos locales, los principales tipos de reacciones alérgicas conocidas son tipo I mediada por IgE y tipo IV mediada por linfocitos T (47).

Los anestésicos tipo éster como los tipo amida han mostrado capacidad de causar reacciones alérgicas por vía tópica e inyectada, sin embargo se reporta mayor incidencia en los ésteres a causa del fuerte potencial alergénico del PABA. También se atribuye potencial alergénico a moléculas que con frecuencia se asocian a los anestésicos locales como: preservantes tipo metilparabeno y propilparabeno, con estructuras similares al PABA; metabisulfito sódico y bisulfito sódico (antioxidantes adicionados a los vasoconstrictores) (12, 47, 62).

Aunque el mecanismo se desconoce, se han descrito casos de reacción cruzada entre los dos grupos de anestésicos y entre los anestésicos tipo éster con otras sustancias del grupo para-amino como sulfamidas, antidiabéticos orales, derivados del para-aminofenol, fotoprotectores con parabenos, con tinturas de cabello con parafenilendiamina, entre otros (47, 62).

#### **1.1.8.6 MIOTOXICIDAD**

Esta complicación es infrecuente, sin embargo la evidencia experimental sustenta el daño muscular luego del uso de anestésicos locales dependiendo básicamente de la dosis y empeora con la administración repetida. Se han reportado casos luego de bloqueos periféricos repetidos, infiltración de bordes de heridas, inyección en puntos gatillo y bloqueos peri y retrobulbares (63).

Histológicamente, después de la inyección se evidencia contractura de las miofibrillas, luego se observa degeneración lítica del retículo sarcoplásmico del músculo estriado y finalmente edema y necrosis de los miocitos en los siguientes 1 a 2 días después de la aplicación del medicamento. Se ha visto que los mioblastos, la lámina basal y el tejido conectivo no se afectan por lo cual es posible la regeneración muscular a las 3 o 4 semanas siguientes (63).

Reportan que la procaína tiene el menor efecto miotóxico y la bupivacaína el mayor (63).

## **1.2. TERAPIA NEURAL Y PROCAÍNA COMO NEURAL TERAPÉUTICO**

En la terapia neural la procaína se utiliza en bajas diluciones y en microdosis. Se aplica en áreas consideradas como campos interferentes, como pápulas intradérmicas o en la cercanía de ganglios nerviosos.

Según Huneke, la terapia neural es un tratamiento integral, que actúa sobre el ser humano en su totalidad. “El impulso curativo colocado correctamente con cualquier

neural terapéutico es respondido por todo el vegetativo por cuyas vías corren los caminos que llevan hacia la enfermedad y hacia la curación. La terapia neural segmentaria significa la aplicación de microdosis de Procaína en puntos preciso que se hallan en el terreno de la enfermedad. La mejoría lograda con ella logra aumentarse con la repetición hasta llegar a la curación” (64).

Según el doctor Peter Dosch, los estudios de Fleckenstein y Hardt demostraron que la Procaína en bajas concentraciones logra repolarizar la membrana celular, evitando la despolarización y limitando el flujo iónico. Al estabilizarse el potencial la membrana se protege de estímulos lesivos despolarizantes. Este nuevo estado de la membrana celular facilita una repolarización más efectiva (64).

La teoría de Ferdinand Huneke postula que la penetración de la aguja en la piel “perfora millares de fibrillas vegetativas cargadas eléctricamente y abre su capa aislante, de esta manera coloca ella en la estructura eléctrica del neurovegetativo un corto circuito. La inyección de Procaína intensifica y aumenta este corto circuito, pues ella también está en condiciones de inhibir o eliminar la pared aislante del nervio. La energía electrostática puede así fluir libremente al tejido circundante equilibrando entonces diferencias patógenas de potencial”. Huneke considera que éste impulso se da sobre todo el neurovegetativo y tendrá la posibilidad de ser respondido por todo el sistema nervioso (64).



## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 TOXICIDAD Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

A la experimentación animal se le atribuyen grandes aportes al desarrollo de las ciencias biomédicas. A través de la historia, el estudio de disciplinas relativas al organismo humano como la anatomía, fisiología, farmacología, toxicología, bacteriología, inmunología, patología, entre otras, se ha ligado a la experimentación en animales. Desde la época de Hipócrates y Aristóteles se describen experimentos en animales para tratar de identificar el funcionamiento de los procesos orgánicos de los seres vivos y esta asociación se ha mantenido en todo el curso de crecimiento de la ciencia.

En el desarrollo de medicamentos, las fases preclínicas involucran experimentos en animales que incluyen la etapa de conocimiento de la actividad biológica, la evaluación de su seguridad y el seguimiento del organismo que recibió la sustancia. La experimentación animal ha resultado particularmente útil en los estudios toxicológicos (65).

Específicamente con respecto a la neurotoxicidad y su evaluación en animales, su valor ha sido reconocido desde hace muchos años. Desde la década de los 60 tanto las industrias farmacéuticas como las industrias químicas, se valen de los experimentos en animales para investigar los efectos neurotóxicos de nuevas sustancias; sin embargo en sus inicios estas pruebas eran inespecíficas (66).

Dada la preocupación por contar con las pruebas adecuadas, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) en 1985, publicó "Guidelines for Neurotoxicity

Risk Assessment”, con el fin de orientar la evaluación de los agentes sospechosos de causar neurotoxicidad. Estas han sido revisadas y mejoradas en los años siguientes a la primera publicación (66, 67).

Según estas guías se define **neurotoxicidad** como cualquier cambio adverso de la estructura o de la función del sistema nervioso central o periférico después de que el individuo ha entrado en contacto con un elemento químico, físico o biológico. Como efectos funcionales se entienden todos los que inciden sobre las áreas somáticas, autonómicas, sensoriales y/o cognitivas, es decir cambios neurofisiológicos y comportamentales. Los cambios estructurales se consideran todos los que causan alteraciones anatómicas (68).

Dentro de las alternativas de estudio de la neurotoxicidad, la EPA identifica la posibilidad de realizar estudios en humanos (dentro de los que incluye las evaluaciones clínicas, los informes de casos, los estudios epidemiológicos), en animales, en laboratorio de experimentación e *in vitro*.

La EPA hace particular énfasis en la utilidad de los estudios en animales y propone 5 categorías de evaluación de la neurotoxicidad en animales, teniendo en cuenta los efectos a nivel: estructural o neuropatológicos, neurofisiológico, neuroquímico, comportamental y en el desarrollo (68).

Con respecto a las pruebas comportamentales, la guía indica que los cambios en el comportamiento del animal pueden reflejar signos de neurotoxicidad causados por la exposición a cierto elemento. Dentro de las pruebas designadas para cuantificar estos cambios se encuentran las “Baterías de Observación Funcional” (FOB, por “Functional Observational Battery”), la actividad motora, el comportamiento operante controlado por horario (SCOB, por “Schedule-Controlled Operant Behavior”), convulsiones, test especializados para neurotoxicidad (funciones motora, sensorial, cognitiva) (68).

Particularmente en referencia a las FOB, la guía advierte su gran utilidad para evaluar aspectos neuromusculares (debilidad, movimientos anormales, incoordinación), sensoriales (visión, audición) y autonómicos. Así mismo, las pruebas de actividad motora

muestran un espectro de comportamientos que incorporan procesos motores, sensitivos e integrativos (66, 68).

### **2.1.1 Estudios de toxicidad a dosis repetidas**

El presente trabajo plantea un estudio de toxicidad a dosis repetidas, con el objeto de analizar si la administración repetida de microdosis de Procaína genera signos clínicos de neurotoxicidad.

Según la OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), el propósito de los estudios de exposición a dosis repetidas es detectar una evidencia biológica válida del potencial tóxico u oncogénico de la sustancia que se investiga (69).

Las respuestas producidas por químicos en humanos y en animales de experimentación pueden diferir según la cantidad de sustancia, la duración y la frecuencia de la exposición. No todas las respuestas que se observan representan toxicidad, por lo que es necesario establecer pautas claras para evaluar el significado de las respuestas observadas (69).

La fiabilidad del estudio depende de los métodos observacionales y experimentales utilizados, la frecuencia y duración de la exposición, la especie, raza, género y edad de los animales usados, el número de animales utilizados por grupo, la dosis, ruta y frecuencia de la administración y las condiciones bajo las cuales se probó la sustancia (69).

Estos estudios incluyen las siguientes observaciones: Mortalidad/supervivencia, observaciones clínicas, cambios en el peso y en el consumo de agua y comida, medidas de química sanguínea, hematología o pruebas en orina, observaciones postmortem (estudios de patología) (69).

### 2.1.2 Test de Irwin

El test de Irwin es un procedimiento observacional sistemático que se utiliza para determinar los usos de una sustancia, para desarrollar su espectro de actividad, para detectar efectos adversos de una nueva sustancia sobre el comportamiento general y para evaluar neurotoxicidad (74, 75, 76). Fue descrito por Irwin en 1968, para aplicar en ratones, pero rápidamente fue modificado para aplicación en ratas (74, 77).

Actualmente hace parte de los procedimientos recomendados por la ICH (International Committee for Harmonization) para la evaluación de la seguridad farmacológica, para detectar efectos adversos de las sustancias sobre el sistema nervioso central (69, 74, 75).

Los datos obtenidos pueden ayudar a determinar el rango de la dosis para ser probada en otros estudios de seguridad. Puede proporcionar una orientación inicial sobre la indicación terapéutica, mecanismo de acción o función específica (76).

Se usa frecuentemente en la fase exploratoria del desarrollo de un medicamento. Cuando se aplica en las fases iniciales de los estudios permite: encontrar efectos secundarios de la sustancia sobre el SNC, entender los mecanismos por los cuales se dan estos efectos, entender parte de la relación entre la estructura y la actividad de la sustancia y posiblemente revela algunos efectos terapéuticos nuevos (75,77). En fases más avanzadas, cuando la sustancia está más caracterizada, el test provee información importante sobre su margen de seguridad (77).

A continuación se describe la forma original como fue concebido el test de Irwin, aunque con las modificaciones recientes se han omitido algunos parámetros y se aceptan registros cualitativos según la intensidad de la respuesta observada (78). Es importante registrar la aparición de la respuesta y si su intensidad cambia en sentido de aumentar o disminuir en el tiempo de observación.

**ACTIVIDADES PRE-TEST**

En primer lugar se mide el diámetro de la pupila antes y después de aplicar la sustancia, lo que permite establecer rápidamente la actividad de la misma. Si se desconoce la dosis a usar, la dosis inicial puede ser de 30 mg/kg y a partir de esa se aplican dosis logarítmicamente más altas o bajas. A este momento ya se puede establecer si el compuesto es activo y si lo es lo suficiente como para continuar la investigación; cuál es su actividad principal y si hay actividades secundarias presentes.

Se plantea así:

Se pesan los ratones para agruparlos según cercanía del peso.

Grupo 1: 4 ratones de la misma raza, con una diferencia de peso de 1 gramo o menos, 2 machos, 2 hembras. Se marcan con tinta.

Grupo control.

Se requiere una sala de laboratorio tranquila, aislada, a una temperatura de 72° F más o menos 1.

Los resultados se registran en una forma para tabular.

**OBSERVACIONES GENERALES.**

Especie, sexo, peso.

Sustancia, tiempo de inyección, dosis, solvente y ruta.

A los efectos de la sustancia se les da una puntuación de 0 a 8. La puntuación se da en el momento del pico máximo del efecto. La puntuación de base o las respuestas normales se valoran en 4. Puntuación por debajo de 4 son para respuestas subnormales y por encima de 4 supranormales.

La puntuación de base para los signos anormales es 0 y la puntuación máxima es 8. Para cada ítem se establece su puntuación de base.

El perfil está dividido en 3 partes: comportamental, neurológico y autonómico, con subdivisiones cada uno.

**A. PERFIL COMPORTAMENTAL**

1. Estado de alerta o estupor

Acomodación o emplazamiento visual (4): mide la repuesta del animal al ser puesto en diferentes posiciones y su habilidad para orientarse sin error.

Estereotipia (0): repetición mecánica de algún movimiento. Puede indicar estimulación o depresión central.

Pasividad (0): mide la respuesta del animal al ser acomodado en posturas inusuales. Indica depresión central, miorelajación, parálisis o anestesia.

Respuestas a diferentes manipulaciones:

Acicalamiento (4). Excesivo puede indicar excitación central o estimulación simpática.

Vocalización (0): En condiciones normales no emiten sonidos.

Desasosiego (0): su presencia puede indicar estimulación central, cambios viscerales o el aviso de convulsiones.

Irritabilidad (0): su manifestación extrema puede ser la agresividad.

Nerviosismo (0)

## 2. Actividad motora

Actividad espontánea (4): usualmente el ratón muestra una actitud curiosa.

Reactividad (4): observar la reacción cuando el animal es sacado de la jaula y puesto en la mesa.

Estas miden la estimulación o sedación del sistema nervioso, de los ganglios nerviosos y de las placas neuromusculares:

Respuesta táctil (4): puede indicar presencia de actividad anestésica.

Respuesta al dolor (4): mide analgesia, sedación y depresión central.

## B. PERFIL NEUROLOGICO

### 1. Excitación central

Sobresalto (0)

Erección de la cola (0)

Temblor (0)

Convulsiones (0)

### 2. Incoordinación motora

Posición corporal (4) y posición de las extremidades (4): indicadores de bloqueo neuromuscular o perturbación central.

Marcha tambaleante (0): puede indicar ataxia.

Marcha anormal (0): puede indicar ataxia o relajación muscular.

Reflejo de enderezamiento (0). Altos puntajes pueden indicar la presencia de un depresor del sistema nervioso central, miorrelejante, anestésico, o agente que causa bloqueo sináptico en alguna parte del sistema.

### 3. Tono muscular

Tono de la extremidad (4): se mide sujetando la pata delantera y evaluando la resistencia a la extensión.

Fortaleza del paso (4).

Tono corporal (4) y tono abdominal (4): notando la tensión muscular en comparación con el grupo control.

Los test en este grupo pueden indicar actividad miorrelejante, bloqueo neuromuscular y depresión central.

### 4. Reflejos

Oído (4), corneal (4), reflejo flexor ipsilateral (4). Puntuaciones alteradas pueden reflejar un bloqueo en alguna parte del sistema sensorial, las sinapsis espinales o las vías aferentes.

## C. PERFIL AUTONÓMICO

### 1. Signos ópticos

Tamaño de la pupila (4). Dilatación indica actividad parasimpaticolítica o simpaticomimética. Miosis sugiere actividad muscarínica.

Apertura palpebral (4): amplia indica actividad simpaticomimética y estrecha indica actividad sedativa.

Exoftalmos (0): indica estimulación simpática.

### 2. Secreciones

Orina (0): puede indicar actividad muscarínica o la irritación del tracto urinario.

Salivación (0): indicativo de actividad muscarínica.

### 3. Signos generales

Retorcerse (0): indica irritación tisular o estimulación de receptores sensoriales.

Piloerección (0): puede ser por compensación a bajas temperaturas o actividad simpaticomimética.

Hipotermia (0): puede indicar actividad sedante o akinetótica.

Color de la piel (4): principalmente la de las orejas puede cambiar de rosada a roja o blanca. Roja puede indicar vasodilatación por posible actividad simpaticolítica. Blanco indica vasoconstricción y posible actividad simpaticomimética.

Frecuencia cardíaca (4): entre muchas posibilidades, taquicardia puede indicar actividad parasimpaticolítica y bradicardia actividad cardiotónica.

Frecuencia respiratoria (4): puede acelerarse por sustancias tóxicas o analépticos del sistema respiratorio, y desacelerarse por depresores respiratorios o centrales.

#### TOXICIDAD

Según el número de sobrevivientes de cada grupo se puede establecer aproximadamente una Dosis Letal 50.

### 2.1.3 Pruebas utilizadas en este trabajo

#### Test de Irwin modificado (79)

Sustancia:
Dosis. Vía de administración. Vehículo
Hora de administración
Fecha
Responsable

Parámetros	t de respuesta (min)	0	15	30	60
↓ SNC					
Actividad motora					
Ataxia					
Pérdida reflejo enderezamiento					
Analgesia					
Anestesia					
Pérdida reflejo corneal					
Pérdida reflejo pinneal					
Parálisis patas anteriores					
patas traseras					
Reacción de alarma					



↑ <b>SNC</b>				
Actividad motora				
Temblores finos en el cuerpo				
Temblores fuertes en el cuerpo				
Fasciculaciones				
Convulsiones tónicas				
Convulsiones tónicas				
Convulsiones mixtas				
Reacción de alarma				
<b>OJOS</b>				
Enoftalmia				
Exoftalmia				
Ptosis palpebral				
Tamaño de la pupila				
Nistagmus				
Lacrimación				
<b>OREJAS</b>				
Palidez				
Hiperemia				
Cianosis				
<b>EFFECTOS GENERALES</b>				
Salivación				
Erección de la cola				
Piloerección				
Micción				
Diarrea				
Priapismo				
Signo de Robichaud				
Movimiento circular				
Temperatura rectal				

Respiración (t en segundos para 50 respiraciones)				
<b>EFFECTOS SUBJETIVOS</b>				
Agresivo				
Pasivo				
Temeroso				
<b>OTRAS OBSERVACIONES MUERTE/NECROPSIA</b>				

Pruebas para analizar el “*performance*” de los animales, es decir su actitud y su aptitud. Estas pruebas han sido seleccionadas de las recomendadas en la literatura para tales fines (66, 67, 68, 69, 70).

- Ensayo del **campo abierto**: Se ubica el animal en una caja abierta en la cual se miden su actividad espontánea, los movimientos discretos, las distancias recorridas, el tiempo en que permanece parado, su actividad exploratoria, entre otros. Con este experimento se busca determinar la presencia de cambios motores y comportamientos estereotipados que sugieran neurotoxicidad por los fármacos suministrados, o la capacidad depresora o estimulante del compuesto administrado
- Prueba de la **chimenea**: Se coloca el ratón en un tubo cilíndrico de vidrio (una probeta de 250 ml de capacidad), de 30 cm de longitud, ubicado horizontalmente. Tan pronto el animal toca el extremo final del tubo, este se coloca verticalmente y se mide el tiempo que tarda el ratón en subir en retroceso hasta el extremo superior del tubo. En esta prueba se evalúan la fuerza y tono muscular, el equilibrio y la coordinación de los movimientos.
- Prueba de la **mall** (capacidad prensil): Consiste en ubicar al animal por un minuto, sobre una malla de alambre entrecruzado y se registra su tiempo de permanencia sobre la misma. Este examen requiere la capacidad prensil del

animal y tiene como propósito evaluar la presencia de incoordinación motora secundaria a la administración de fármacos que alteren el funcionamiento neurológico.

- Ensayo del **alambre (Test de restablecimiento)**: Consiste en sujetar al animal de la cola y colocar las patas delanteras en un alambre ubicado a 20 cm de altura, tan pronto el animal se agarra del alambre se tracciona horizontalmente y se suelta para registrar el tiempo en que el animal se agarra con las patas traseras. Este experimento evalúa la relajación muscular que puede aparecer como signo de neurotoxicidad luego de la administración de ciertos fármacos.

## 2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El estudio fue realizado en el Bioterio de Experimentación del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, bajo la coordinación del Profesor Luis Fernando Ospina.

### 2.2.1 Animales y sustancia activa.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la legislación sobre protección de animales de laboratorio vigente en Colombia y en la Universidad Nacional (71, 72, 73). Se utilizaron ratones albinos suizos ICR, de 9 a 12 semanas de edad, machos, con pesos entre 35 y 40 g y ratas Wistar, machos, de 10 a 12 semanas de edad, con pesos entre 220 y 260 g. Todos los animales se mantuvieron bajo esquemas controlados de luz, (fotoperiodo 12h luz/12 horas oscuridad), temperatura ( $21\pm 2$  °C), humedad, aseo (cambio de camas dos veces por semana) y suministro de agua y comida *ad libitum*.

Se utilizó Procaína.HCl al 1% del laboratorio Denva (Versenikcaina), con registro Invima 2008 M-0008573.

### 2.2.2 Estudios preliminares

La fase de ensayos preliminares inició con el período de adaptación de los animales, la observación de sus condiciones habituales, de su perfil neurológico sin administración de medicamentos y el conocimiento de las herramientas de trabajo por parte del experimentador.

Posteriormente se realizaron múltiples experimentos para seleccionar una dosis que no generara signos evidentes de toxicidad aguda y que permitiera varias aplicaciones con el objeto de estudiar toxicidad por administración repetida:

a. En ratones (35 a 40 g de peso)

- Aplicando 1 ml de Procaína al 1%, se administró una dosis de 280 mg/kg por vía subcutánea, repartida en 5 pápulas en la piel del abdomen. Inmediatamente después de la administración se presentaron convulsiones tónico-clónicas generalizadas y pocos segundos después la muerte del animal.
- Se decidió administrar la mitad de la dosis anterior. Se aplicó una dosis de 140 mg/Kg por vía subcutánea, repartida en 5 pápulas en la piel del abdomen. De la misma forma, se presentaron inmediatamente convulsiones tónico-clónicas generalizadas y segundos después la muerte del animal.
- Se experimentó la mitad de la dosis anterior. Se aplicó una dosis de 70 mg/Kg por vía subcutánea repartida en 5 pápulas en la piel del abdomen. Pocos minutos después de la aplicación se observaron alteraciones neurológicas dadas por ataxia, incoordinación motora y marcha vacilante. Sin embargo, estos cambios cedieron espontáneamente sin generar convulsiones ni muerte del animal. Por presencia de síntomas de toxicidad neurológica aguda no se consideró útil esta dosis.
- Con una dilución de la Procaína al 1%, de 1:500, aplicando un volumen de 1 ml, se logró una dosis de 40 mg/Kg, la cual tampoco generó signos de toxicidad aguda durante la primera hora después de su administración.

- Se hizo una dilución de la Procaína al 1%, de 1:1000. Aplicando un volumen de 1 ml se administró una dosis de 20 mg/Kg, la cual no generó ninguna alteración neurológica durante la primera hora posterior a su administración.

b. En ratas:

- Una dosis de 50 mg/Kg (1ml de procaína al 1%) intraperitoneal causó la muerte instantánea del animal, sin presencia de síntomas neurológicos previos.
- Una dosis de 25 mg/Kg (0.5 ml de procaína al 1%) intraperitoneal, causó síntomas neurológicos leves dados por marcha vacilante, ataxia y pasividad, sin causar convulsiones o muerte.

#### **Selección de la dosis**

- Con base en los resultados de los experimentos preliminares se seleccionaron las dosis de 20 mg/Kg y de 40 mg/Kg para experimentación en ratones.
- Se escogió una dosis de 40 mg/kg como la utilizada en ratones, para hacer la administración subcutánea en la cercanía de un ganglio nervioso a nivel dorsal.

Sin embargo, se decidió cambiar la forma de dilución para lograr igual concentración en menor volumen. Para aplicar solamente 0.5 ml en 3 pápulas subcutáneas, para evitar tantas punciones en el animal.

Debido al metabolismo rápido de los animales y buscando forzar la aparición de signos de toxicidad por administración repetida se decidió aplicar la procaína dos veces al día durante dos semanas.

## 2.3 Diseño experimental

Tabla 1. Diseño experimental para el Test de Irwin

	<b>GRUPO A</b>	<b>GRUPO B</b>	<b>GRUPO C</b>
<b>Animales</b>	5 ratones	5 ratones	5 ratas
<b>Peso</b>	30 – 40 g	30 – 40 g	220 – 260 g
<b>Animales experimentales</b>	Número 1 al 4	Número 1 al 4	Número 1 al 4
<b>Animal control</b>	Número 5	Número 5	Número 5
<b>Sustancia control</b>	SSN 0.9%	SSN 0.9%	SSN 0.9%
<b>Dosis Procaína</b>	20 mg/Kg	40 mg/Kg	25 mg/kg
<b>Volumen</b>	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
<b>Vía de administración</b>	Subcutánea (3 pápulas)	Subcutánea (3 pápulas)	Intradérmica
<b>Sitio de administración</b>	Abdomen previamente rasurado	Abdomen previamente rasurado	Paravertebral lumbar en la cercanía a un ganglio nervioso
<b>Frecuencia de las administraciones</b>	Dos aplicaciones diarias, con 8 horas de diferencia.	Dos aplicaciones diarias, con 8 horas de diferencia	Dos aplicaciones diarias, con 8 horas de diferencia

## 2.4 Observación:

Antes de la administración se observó el comportamiento espontáneo de los animales en un corral de observación (área de 50x50 cm, altura 10 cm, piso cubierto en papel blanco).

Previo a la administración, así como a una hora, una semana y un mes después de la última administración, se realizaron: test de Irwin, test de campo abierto, prueba del alambre y prueba de la chimenea.











<b>GENERALES</b>																
Salivación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erección de la cola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloerección	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micción	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diarrea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimiento circular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EFFECTOS</b>																
<b>SUBJETIVOS</b>																
Agresivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temeroso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): Respuesta ausente; (+): Respuesta presente; (++): Respuesta exaltada; E: animales experimentales; C: animal control

Test de campo abierto: Durante las primeras administraciones no hubo ningún cambio en esta prueba. Después de las administraciones No. 5 y 6, se evidenció un aumento en la actividad espontánea, mayor reactividad e inquietud de los animales experimentales. Sin embargo, la condición basal de los animales se reestableció en poco tiempo, por lo que en las pruebas realizadas posteriormente no se encontraron cambios. Estos hallazgos no fueron evidentes en el animal control.

Test del alambre y de la chimenea: Dada la hiperexcitabilidad de los animales experimentales, se observó una leve disminución en la fuerza y coordinación, que alteraron el resultado de estas pruebas luego de la 5ª y 6ª administración. Sin embargo, estos cambios no fueron persistentes en el tiempo y en las pruebas posteriores se reestableció su desempeño habitual.



mixtas																
Reacción de alarma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>OJOS</b>																
Enoftalmia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exoftalmia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis palpebral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nistagmus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>OREJAS</b>																
Palidez	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiperemia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cianosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EFFECTOS GENERALES</b>																
Salivación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erección de la cola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloerección	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micción	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diarrea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimiento circular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EFFECTOS SUBJETIVOS</b>																
Agresivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temeroso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): Respuesta ausente;(+): Respuesta presente;(++): Respuesta exaltada; E: animales experimentales;C: animal control

Las pruebas de la chimenea y del alambre no se realizan en ratas, debido al peso del animal y a las características propias de su actividad motora.



## **4. Discusión**

La experimentación animal ha permitido establecer los efectos y la toxicidad de los anestésicos locales, según la vía de su administración: intravenosa, intraarterial, subaracnoidea, intramuscular, intraperitoneal, intramiocárdica, directamente sobre nervio periférico (50, 51, 53, 56,63, 80, 81).

Sin embargo, en la revisión de la literatura hecha para el presente trabajo, no se encontraron estudios en animales que analizaran el perfil de seguridad de anestésicos locales en administración intradérmica. Aunque la Procaína en la terapia neural no es usada como anestésico, se debe recordar que es un fármaco y por lo tanto es necesario establecer claramente su perfil de seguridad en las vías y dosis en las que se usa como neural terapéutico. Este trabajo permite establecer una primera etapa en el avance de la estructuración de tal concepto.

### **4.1 Ensayos preliminares**

En la farmacología de los anestésicos locales se describe que en humanos, son neurotóxicos en la medida que puedan entrar altas concentraciones a la circulación sistémica, bien sea por inyección intravascular, por administración en cercanías a troncos nerviosos o por aplicación en áreas altamente vascularizadas (52).

En los experimentos preliminares del presente trabajo, se encontró que desde áreas distales (piel del abdomen), rápidamente existe una absorción y distribución hacia sistema nervioso central, generando manifestaciones clínicas casi inmediatamente después de la aplicación de la Procaína.

La intoxicación del Sistema Nervioso Central (SNC) en humanos se describe en dos fases: la primera dada por estremecimiento, contracciones musculares y temblores que preceden las convulsiones tónico-clónicas. Posteriormente con el aumento de los niveles del anestésico en plasma se bloquean las vías inhibitorias y excitatorias, con la consecuente depresión del SNC con hipoventilación y paro respiratorio (51).

En los experimentos preliminares del presente estudio se evidenciaron las fases descritas para la neurotoxicidad de los anestésicos locales. Con la aplicación de una dosis alta de procaína por vía intradérmica en la pared del abdomen, aparecieron rápidamente convulsiones tónico-clónicas y posteriormente depresión respiratoria con la consecuente muerte del animal.

Esto permite establecer que dependiendo de la dosis, la Procaína puede ser neurotóxica al ser aplicada por vía intradérmica. Considerando las diferencias de tamaño, área de superficie corporal y vascularización de la piel de ratones y ratas frente al humano, se hace necesario profundizar en estudios que permitan establecer la dosis segura para administrar por vía intradérmica en humanos.

## **4.2 Interpretación del test de Irwin**

Los estudios de toxicidad proponen varias fases para establecer el perfil de seguridad de un medicamento (69). En el presente trabajo se propuso un estudio de toxicidad preclínica, en una primera fase de observación. La herramienta principal con la cual se evaluó el efecto neurotóxico de la procaína fue el test de Irwin. A pesar de ser un instrumento con cierto grado de subjetividad, al hacer las observaciones de forma sistemática se pudo recoger una importante información sobre el comportamiento de la Procaína en su aplicación en dosis repetidas.

Es importante resaltar que mediante el test de Irwin se pueden establecer los efectos de la procaína tanto sobre el Sistema Nervioso Central, Periférico y Autonómico, así como otros efectos , ejemplo; laxante, diurético, etc.)



### **4.2.1 Sistema Nervioso Central**

La administración repetida de bajas dosis de procaína por vía intradérmica en la pared abdominal del ratón y en un plano más profundo en la cercanía de un ganglio nervioso dorsal, permitió observar que:

- a. No se generaron cambios en la actividad motora, en el acicalamiento, ni agresividad en los animales de experimentación, lo que permite interpretar que en esas condiciones la sustancia no tuvo efecto adrenérgico.
- b. No sucedieron temblores, por lo que se interpreta que no tuvo efecto colinérgico relevante.
- c. No se presentaron convulsiones tónicas, clónicas o tónico-clónicas, por lo que descarta efecto excitatorio extremo en SNC.
- d. No se presentaron signos de sedación como disminución de la actividad motora, ptosis palpebral, disminución de los reflejos. No se observaron signos de anestesia como disminución de la sensibilidad, de los reflejos o de la actividad motora. No se evidenciaron signos de miorelajación central como disminución del tono muscular, incoordinación motora, disminución del reflejo de emplazamiento o parálisis. No se evidenció efecto hipnótico con signos como disminución de la actividad motora, sueño o disminución de los reflejos. Tampoco fueron evidentes signos de actividad tranquilizante como catalepsia, disminución de la reacción de alerta o de la curiosidad. Por lo que se puede concluir que la Procaína no generó ningún efecto depresor del Sistema nervioso central.

### **4.2.2 Sistema Nervioso Periférico**

Con respecto a los efectos sobre el Sistema Nervioso Periférico, se observó que con la administración de Procaína a dosis bajas y repetidas:

- a. No se generaron cambios en el reflejo de emplazamiento visual, en los reflejos ni se presentó vocalización. Esto permite deducir que no hubo un efecto claro de sensibilidad.

b. No se presentó el signo de Straub (erección de la cola), disminución del reflejo de pinzamiento, ni disminución de la reacción de alerta; con lo que se presume no hubo efecto analgésico.

c. No se presentó alteración del tono muscular, del reflejo postural, de la actividad motora ni parálisis de las extremidades, por lo que se entiende que no hubo efecto de miorrelajación periférica.

### **4.2.3 Sistema Nervioso Autonómico**

a. No hubo cambios en el acicalamiento, no se presentó piloerección, exoftalmos ni priapismo como signos de efecto simpático-mimético.

b. No se presentó lacrimación, sialorrea, diarrea como signos de efecto parasimpático.

### **4.2.4 Otros niveles**

a. No se evidenciaron cambios en la coloración de las orejas, por lo que se interpreta que no tuvo un efecto vasodilatador o vasoconstrictor relevante.

b. La micción se presentó de forma habitual, por lo que no se presume un efecto diurético. Es de anotar que la micción es frecuente como acto reflejo cuando el animal es manipulado para ser levantado del piso, y que varios eventos de micción se presentan en forma normal cuando el animal permanece expuesto muchos minutos en un campo abierto, ajeno a su sitio de alojamiento.

c. No se presentó diarrea, por lo que no se asume un efecto laxante.

### **4.3 Interpretación de las pruebas de “performance motor” (test de campo abierto, chimenea, alambre)**

Con respecto a los animales control no se evidenció ninguna diferencia llamativa en el desempeño de estas pruebas, con lo que se puede establecer que la Procaína administrada en bajas dosis repetidas por vía intradérmica, no causa alteración en el desempeño motor de los animales estudiados; descartando clínicamente su neurotoxicidad.

### **4.4 Extrapolación de los resultados a humanos**

La extrapolación de estos resultados no puede hacerse de manera directa, debido a importantes diferencias entre la especie estudiada y los humanos.

Según la especie seleccionada se pueden establecer puntos a favor para la interpretación de los resultados. Siendo los estudios en roedores modelos realizados desde hace muchos años, la anatomía y fisiología de estos animales son ampliamente conocidas, lo que permite hacer observaciones específicas e interpretaciones claras de los resultados obtenidos (65). El tamaño, su gran capacidad reproductiva, la facilidad para su manipulación, etc., han permitido establecerlo como un modelo in vivo económico y altamente reproducible. Otra ventaja potencial es la amplia disponibilidad de variantes genéticas (51, 65)..

Sin embargo, existen otras diferencias que deben ser tenidas en cuenta para una estricta interpretación de los resultados obtenidos. Según Giráldez, “el tamaño de la especie tiene gran importancia en las diferencias interespecíficas, pues influye poderosamente en la velocidad del metabolismo, ya que éste en los animales homeotermos está en función de las calorías que pierde el organismo, las cuales, obviamente, difunden al exterior por la superficie corporal. En concreto, lo que determina la velocidad del metabolismo es la relación entre la masa corporal y la superficie del organismo. Por regla general, los seres

de menor tamaño tienen una mayor superficie respecto a su volumen, de lo que se infiere que metabolizan y eliminan más rápidamente los tratamientos que reciben; hay que tener en cuenta, por tanto, que los animales pequeños requieren dosis mayores de fármacos que los de gran tamaño, para conseguir efectos comparables” (65).

Por otro lado el tiempo biológico (es decir, el relacionado con la longevidad de la especie animal y sus reacciones metabólicas) es muy diferente entre especies, según su expectativa de vida media (65).

Aunque no se encontraron protocolos establecidos para la frecuencia de aplicación de la terapia neural en humanos, la literatura revisada y la práctica sugieren una frecuencia semanal en promedio (64, 83, 84, 85, 86).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, el presente estudio planteó la administración de suficiente volumen de Procaína dos veces al día durante varios días, aportando una cantidad de sustancia acorde al metabolismo y al tiempo biológico de los roedores de experimentación. En estas condiciones se busca forzar la aparición de reacciones neurotóxicas y relacionar de forma más adecuada los resultados obtenidos con los esperados en los humanos.

Aunque se requieren estudios en los que se profundice sobre el perfil de seguridad de la Procaína administrada en microdosis por vía intradérmica, el presente estudio permite inferir que si no se presentó neurotoxicidad en los roedores bajo las circunstancias descritas, tampoco suceda en los humanos, considerando las diferencias interespecies anteriormente mencionadas.

# 5. Conclusiones y recomendaciones

## 5.1 Conclusiones

La toxicidad de la Procaína administrada por vía subcutánea en ratones y ratas de laboratorio mostró un comportamiento dosis-dependiente, encontrando que hay seguridad en la administración de dosis inferiores a 40 mg/Kg.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos realizados, es posible concluir que la aplicación repetida de microdosis de Procaína por vía intradérmica no genera signos de neurotoxicidad evidentes en pruebas de observación clínica en animales de laboratorio.

## 5.2 Recomendaciones

Es necesario profundizar en los estudios para determinar el perfil de seguridad de la Procaína en su uso como neural terapéutico.

Sería importante ampliar las baterías de ensayos que permitan determinar el perfil de neurotoxicidad de la Procaína, implementando ensayos que utilicen equipos como el actímetro, el rota-rod (eje rotatorio), etc.

Teniendo en cuenta las recomendaciones de la OCDE (69) para la realización de estudios de toxicidad por dosis repetidas, se sugiere plantear análisis de química sanguínea y estudios histopatológicos que permitan complementar el perfil toxicológico de la Procaína utilizada en microdosis por vía intradérmica.



## Bibliografía

1. Eisemberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, *et al.*. Unconventional Medicine in the United States. Prevalence, Costs and Patterns of Use. *N Engl J Med.* 1993; 328:246-252.
2. Eisemberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, *et al.*. Trends in Alternative Medicine Use in the United States, 1990-1997. *JAMA.* 1998; 280: 1569-1575.
3. Velandia F, Arandón N, Cárdenas JM, Jara MI, Pérez N. Oportunidad, Satisfacción y Razones de no Uso de los Servicios de Salud en Colombia, Según la Encuesta de Calidad de Vida del DANE. *Colombia Médica* 2001; 32:4-9.
4. Benitez LF. Uso de Terapias Alternativas en el Periodo Comprendido Entre Enero de 2004 a Enero de 2005 en Bogotá. *Asociación Homeopática de Colombia*, 2005.
5. García JC. De la Coca a la Cocaína. Una Historia por Contar. Bogotá. Editorial Universidad del Rosario. 2006: 188-220.
6. Calatayud J, González A. History of the Development and Evolution of Anesthesia Since the Coca Leaf. *Anest* 2003; 98: 1503-1508.
7. Smerilli A L, Sacot NJ. Anestésicos Locales: Historia, Acción Farmacológica, Mecanismo de Acción, Estructura Química y Reacciones Adversas. *Rev. Fac. Odontología UBA* 2004; 19: 19-24.
8. Ruetsch YA, Bonibc T, Borgeatac A. From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2001; 1:175-182.
9. Rice SA, Fish KJ. *Anesthetic Toxicity.* New York: Raven Press; 1994:107-127.
10. Baños JE, Lázaro C. Antecedentes Históricos: la Búsqueda del Anestésico local sin toxicidad. *Anestesia Regional y Dolor Postoperatorio, Programa de Educación Continuada.* Ed. Federación Mexicana de Colegios de Anestesiología. México. 2009: 46-52.
11. Hurlé M A. Anestésicos Locales. En: Flórez J. *Farmacología Humana.* 5 ed. Barcelona: Masson; 2008. p. 355-365 .
12. Catterall W, Kenneth M. Anestésicos Locales. En: Goodman A. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 9 ed. México McGraw-Hill; 1996. p. 353-371.
13. De Carlos J M, Viamonte M A. *Farmacología de los Anestésicos Locales.* *An Sist Sanit Navar.* 1999; 22 Supl 2: 11-18.
14. Skidmore R A, Patterson J D, Tomsick R S. Local Anesthetics. *Dermatol Surg.* 1996; 22: 511-522.
15. Ellenhorn M J, Barceloux D G. *Medical Toxicology, Diagnosis and Tratment of Human Poisoning.* New York: Elsevier Science Publishers; 1998: 104-113.
16. Rosenberg P H, Veering B T Urmey W F. Maximum Recommended Doses of Local Anesthetics: A Multifactorial Concept. *Reg Anesth Pain Med.* 2004; 29 (6): 564-575.

17. Covino B G, Giddon D. Pharmacology of Local Anesthetic Agents. *J Dent Res* 1981; 60 (8): 1454-1459.
18. Covino B G. Comparative Clinical Pharmacology of Local Anesthetic Agents. *Anesth* 1971; 35 (2): 158-166.
19. Becker D E, Reed K L. Essentials of Local Anesthetic Pharmacology. *Anesth Prog* 2006; 53: 98-109.
20. Ritchie J M, Ritchie B, Greendgard P. The Active Structure of Local Anesthetics. *J Pharm Exp Ther.* 1965; 150 (1):152-159.
21. Ritchie J M, Ritchie B. Local Anesthetics: Effect of pH on Activity. *Science.* 1968; 162: 1394-1395.
22. Butterworth J F, Strichartz G R. Molecular Mechanisms of Local Anesthesia: A review. *Anesth.* 1990; 72 (4): 711-734.
23. Guyton A C, Hall J E. *Tratado de Fisiología Médica.* 9 ed. México Interamericana McGraw-Hill. 1997. p 61-78.
24. Strichartz G R. Current Concepts of the Mechanism of Action of Local Anesthetics. *J Dent Res.* 1981; 60 (8): 1460-1470.
25. Kending J J, Courtney K R, Cohen E N. Anesthetics: Molecular Correlates of Voltage- and Frequency- Dependent Sodium Channel Block in Nerve. *J Pharm Exp Ther.* 1979; 210 (3). 446-452.
26. Scheuer T. Local Anesthetic Block of Sodium Channels: Raising the Barrier. *J Physiol.* 2007; 581 (2): 423.
27. Muroi Y, Chanda B. Local Anesthetics Disrupt Energetic Coupling Between the Voltage-sensing Segments of a Sodium Channel. *J Gen Physiol.* 2008; 133 (1): 1-15.
28. Fraizer D R, Narahashi T, Yamada M. The Site of Action an Active Form of Local Anesthetics. Experiments with Quaternary Compounds. *J Pharm Exp Ther.* 1969; 171 (1): 45-51.
29. Kindler C H, Yost Spencer. Two-pore Domain Potassium Channels: New Site of Local Anesthetic Action and Toxicity. *Reg Anesth Pain Med.* 2005; 30: 260-274.
30. Ueta K, Suzuki T, Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. Local Anesthetics have Different Mechanisms and Sites of Action at Recombinant 5-HT<sub>3</sub> Receptors. *J Anesth Pain Med.* 2007; 32: 462-470.
31. Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. Local Anesthetics Have Different Mechanisms and Sites of Action at Recombinant NMDA Receptors. *Brit J Pharm.* 2003; 138: 876-882.
32. Suwalky M, Schneider C, Villena F, Noris B, Cárdenas H, Cuevas F. A Study of the Perturbation Effects of Local Anesthetic Procaine on Human erythrocyte and model membranes and of modifications of the sodium transport in toad skin. *Bioph Chem.* 2005; 116: 227-235.
33. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol Rev.* 2002; 54 (1): 115-117.
34. Ramakrishnan S, Schmid-Schobein H. Effect of Local Anesthetics on Red Blood Cell Deformability. *Frontiers Med Biol Engng.* 1999; 9 (4): 331-336
35. Gotta A W, Sullivan CA. Effect of Local Anesthetics on Platelet Aggregation. *Reg Anesth.* 1983; 8 (2): 65-68.
36. Takagi S, Kitagawa S, Oshimi K, Takaku F, Miura Y. Effect of Local Anesthetics on Human Natural Killer Cell Activity. *Clin Exp Immunol.* 1983; 53: 477-481.



37. Lahat A, Horin S B, Lang A, Fudim E, Picard O, Chowers Y. Lidocaine Down-Regulates Nuclear Factor kB Signaling and Inhibits Cytokine Production and T Cell Proliferation. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152: 320-327.
38. Hollmann M W, Durieux M E. Local Anesthetics and the Inflammatory Response. A New Therapeutic Indication? *Anesth.* 2000; 93: 858-875.
39. Genna J M, Coffe G, Pudles. Effects of Tertiary Amine Local Anesthetics on the Assembly and Disassembly of Brain Microtubules in vitro. *Eur J Biochem.* 1980; 110: 457-464.
40. Gocmen J S, Buyukkocak U, Caglayan O, Aksoy A. In Vitro antibacterial effects of topical local anesthetics. *J Derm Treat.* 2008; 19: 351-353.
41. Lazdunski C, Baty D, Pages M. Procaine, a Local Anesthetic Interacting with the Cell Membrane, Inhibits the Processing of Precursor Forms of Periplasmic Proteins in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 1979; 96: 49-57
42. Lizasoain I, Moro M A, Lorenzo P. Cocaína: Aspectos Farmacológicos. *Adicc.* 2000; 14 (1): 57-64.
43. Mulroy M F. Systemic Toxicity and Cardiotoxicity from Local Anesthetics: Incidence and Preventive Measures. *Reg Anesth Pain Med.* 2002; 27 (6): 556-561.
44. Régis F, Lapeyre.MEstre M, Samii K, Montastruc J L. A Review of the French Pharmacovigilance Database. *Drug Safety.* 2009; 32 (4): 345-356.
45. Nazir M S, Holdcroft A. Local Anesthetic Drugs: Adverse Effects as reported through the ADROIT System in the UK. *Pharmacoe Drug Saf.* 2009; 18: 1000-1006.
46. Bonica J J. Clinical Investigation of Local Anesthetic. *Anesth.* 1957; 18 (1): 110-125.
47. Resano A, Redín J. Racciones Adversas a los Anestésicos Locales. *An Sist Sanit Navar.* 1999; 22 Supl 2: 93-100.
48. Brosh-Nissimov T, Ingbir M, Fried W M, Porat Reuven. Central Nervous System Toxicity Following Topical Skin Application of Lidocaine. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004; 60: 683-683.
49. Liu P L, Covino B M, Feldman H S. Effect of Age on Local Anesthetic Central Nervous System Toxicity in Mice. *Reg Anesth.* 1983; 8: 57-60.
50. De Jong R H, Bonin J D. pH Does Not Affect Toxicity of Local Anesthetics. *Reg Anesth.* 1980, 56: 10-11.
51. Groban L. Central Nervous System and Cardic Effects From Long-acting Amide Local Anesthetic Toxicity in the Intact Animal Model. *Reg Anesth Pain Med.* 2003; 28 (1): 3-11.
52. Aldrete J A, Usubiaga L E. New Concepts of Toxicity for Local Anesthetic Agents. *Reg Anesth.* 1979; 3: 6-10.
53. Hogan Q. Local Anesthetic Toxicity: An Update. *Reg Anesth.* 1986; 21: 43-50.
54. Schamp J R. Experimental Studies on the Toxicity of Procaine. *J Dent Res.* 1941; 20: 425-433.
55. Kasaba T, Onizuka S, Takasaki M. Procaine and Mepivacaine Have Less Toxicity In vitro than Other Clinically Used Local Anesthetics. *Anesth Analg.* 2003; 97: 85-90.
56. Kalichman M W. Physiologic Mechanisms by Wich Local Aneshtics May Cause Injury to Nerve and Spinal Cord. *Reg Anesth.* 1993; 18: 448-452.
57. Hogan Q H. Pathophysiology of Peripheral Nerve Injury During Regional Anesthesia. *Reg Anesth Pain Med.* 2008 ; 33: 435-441.

58. Hodgson P S, Spencer L S, Batra M S, Gras T W, Pollock J E, Neal J M. Procaine Compared With Lidocaine for Incidence of Transient Neurologic Symptoms. *Reg Anesth Pain Med.* 2000; 25 (3): 218-222.
59. Jhonson M, Swanson J. Procaine Spinal Neurotoxicity. *Anesth* 2008; 109: 349-351.
60. Takenami T, Yagishita S, Nara Y, Tsai Y H. Spinal Procaine is Less Neurotoxic than Mepivacaine, Prilocaine and Bupivacaine in Rats. *Anesth Pain Med.* 2009; 34 (3).
61. Heavner J E. Cardiac Toxicity of Local Anesthetics in the Intact Isolated Heart Model: A review. *Reg Anesth Pain Med.* 2002; 27 (6): 545-555.
62. Thyse J P, Menne T, Elberling J, Plaschke P, Jahoansen J D. Hypersensitivity to Local Anesthetics- Update and Proposal of Evaluation Algorithm. *Cont Derm.* 2008; 59: 69-78.
63. Zink W, Graf B. Local Anesthetic Myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med.* 2004; 29: 333-340.
64. Dosch P. Libro de Enseñanza de la Terapia Neural según Huneke. 4 ed. Heidelberg. Casa Haug – Karl F Haugh. 1973: 70-89.
65. Zúñiga J, Tur Mari J, Milocco S, Piñeiro R. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. 2001: 3-20, 324-333, 490-512.
66. Moser V. Observational Batteries in Neurotoxicity Testing. *Int J Toxicol.* 2000; 19: 407-411.
67. Baird SJ, Catalano P J, Ryan L M, Evans J S. Evaluation of Effect Profiles: Functional Observational Battery Outcomes. *Fund Applied Toxicol.* 1997; 40: 47-51.
68. U.S. Environmental Protection Agency. Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. *Federal Register* 1998; 63 (93): 26926-26954.
69. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Repeat-Dose Toxicity Studies. ENV/JM/MONO. 2000:18.
70. Lapa AJ, Monteiro TC. Evaluación de la Actividad y Comportamiento Motor. En: Métodos de Evaluación de la Actividad Farmacológica de Plantas Medicinales. CYTED/CNPq. Programa Iberoamericano de Ciencia e Tecnología para o Desenvolvimento. 2001: 72-78.
71. Osorio A, Cardozo C. Utilización de Animales de Laboratorio en la Experimentación Biológica. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. 2000.
72. Congreso de Colombia. Ley 84 de 1989. Estatuto Nacional de Protección Animal.
73. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 008430 de 1993. Por la Cual se Establecen las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas Para la Investigación en Salud.
74. Irwin, S. Comprehensive Observational Assessment: A Systematic, Quantitative Procedure for Assessing the Behavioral and Physiological State of the Mouse. *Pscycopharmacologia.* 1968; 13: 222-257.
75. Ron de P, Delaunois A, Hanon E, Lamberty Y, Guyaux M. An Origin inal Method to Interpret Neurobehavioral Data Generated by the Irwin Test in the Mouse. *Proceedings of Measuring Behavior.* Maastricht, The Netherlands. 2008: 326.
76. Roux S, Sablé E, Porsolt R. Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and

- Physiological Function. Curr Prot in Pharmac. DOI 10.1002/0471141755.ph1010s27 January, 2005.
77. Vogel H, Hock F, Mayer D. Safety and Pharmacokinetic Assays. Sprienger-Verlag, Berlin. Heidelberg New York 2006: 327.
  78. Turner R. Screening Methods in Pharmacology, Vol 1. Chapter 3: The Organization of Screening. Academic Press, New York. 1965.
  79. Giráldez A. Curso de Técnicas Farmacológicas. Posgrado de Farmacología. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. 1993.
  80. Feldman, H; Covino B, Sage D. Direct Chronotropic and Inotropic Effects of Local Anesthetic Agents in Isolated Guinea Pig Atria. Reg Anes. 1982; 7 (4):149-156.
  81. David S, Amour C, Duracher C, Ferretti P, Petit P. Comparison of the Effects of Mepivacaine and Lidocaine on Rat Myocardium. Eur Journ Soc Anes. 2007; 24: 190-197.
  82. Chiriboga C, Rodríguez V, Proaño P, Salinas F. Dolor Cervical y Terapia Neural. Resultados en 64 casos. XIV Jornadas Médicas Hospital Alcivar. Ecuador. 2006. En [www.terapianeural.com](http://www.terapianeural.com) (consultada en Febrero 2011)
  83. Martín S. Mis experiencias con el uso de la Terapia Neural. Presentación de casos, 1995-2006. Encuentro Internacional de Terapia Neural. Argentina. 2006. En [www.terapianeural.com](http://www.terapianeural.com) (consultada en Febrero 2011)
  84. Dross, G. La Terapia Neural según Huneke. Congreso Internacional de Terapia Neural. México. 2000. En [www.terapianeural.com](http://www.terapianeural.com) (consultada en Febrero 2011)
  85. Hammer, R. Tratamiento neuralterapéutico del dolor de cadera agudo/crónico. Encuentro Internacional de Terapia Neural. México. 2000. En [www.terapianeural.com](http://www.terapianeural.com) (consultada en Febrero 2011)