

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROFARMACOLOGIA

ANTINOCICEPCION AGUDA VISCERAL EXPERIMENTAL POR DEXKETOPROFENO
Y SU MODIFICACION POR AGENTES RELACIONADOS CON LAS
NITROSINTASAS.

Roberto Rustom Astudillo

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR
AL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Hugo Miranda G.

TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Gianni Pinardi T.

SANTIAGO – CHILE
2007

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROFARMACOLOGÍA

ANTINOCICEPCION AGUDA VISCERAL EXPERIMENTAL POR DEXKETOPROFENO
Y SU MODIFICACION POR AGENTES RELACIONADOS CON LAS
NITROSINTASAS.

Roberto Rustom Astudillo

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR
AL TITULO DE CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Hugo Miranda G.

TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Gianni Pinardi T.

SANTIAGO – CHILE
2007

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre quien me ha acompañado en todo este proceso académico, sin UD yo no sería nadie.

A mi amor Carolina Amaro quien me ha apoyado y dado su amor en infinidad de veces.

A mi familia que siempre ha estado conmigo.

Al todo el laboratorio de Fármaco que ayudó mucho en la realización de este trabajo.

Y a mis amigos en general.....

INDICE

| | |
|-------------------|----|
| Introducción | 1 |
| Marco Teórico | 3 |
| Hipótesis | 25 |
| Objetivos | 25 |
| Material y Método | 26 |
| Resultados | 29 |
| Discusión | 35 |
| Conclusiones | 37 |
| Resumen | 39 |
| Bibliografía | 40 |

INTRODUCCIÓN

Pocas sensaciones son tan molestas para el ser humano como el dolor; el cual siempre ha acompañado al hombre a lo largo de la historia. Los primeros asentamientos humanos no comprendían la causa, y menos la función del dolor y le atribuían un origen divino, mágico, demoníaco y hasta filosófico. A pesar de desconocer la causa y brindarle orígenes errados, el hombre siempre ha buscado la forma de mitigar el dolor, exactamente no se sabe cuando ni donde comenzó el uso de la primera sustancia destinada a la analgesia, el opio o adormidera (futura morfina), pero hay pruebas arqueológicas que en el año 1400 antes de Cristo ya se usaba en Egipto, en Babilonia y en Creta, de donde se expandió a todo el Mediterráneo y parte de Asia. Otras plantas que fueron usadas desde la antigüedad para quitar el dolor (entre otras cosas), eran la raíz de la mandrágora, la cicuta, el alcohol, la cannabis o hachis (marihuana), la corteza del sauce (ácido salicílico) y la coca entre los Incas.

Aunque el manejo del dolor es un proceso de muchos años que aún no termina, es importante mencionar que hacia 1800 los especialistas se tornaron más sensibles al dolor del paciente y se esforzaron por mejorar la analgesia; fueron entonces descubiertas las propiedades analgésicas del óxido nitroso, el cual pudo ser utilizado en procedimientos cortos que no fueran muy dolorosos, como extracciones dentarias.

La primera generación de AINE se comenzó a conocer en 1899, cuando fue aislado el ácido acetilsalicílico ("Aspirina") del ácido salicílico (corteza del sauce), que durante muchos años fue el analgésico más empleado en todo el mundo. La

fenilbutazona y la indometacina continuaron con el desarrollo de los AINE en 1952 y 1964 (1).

Así como la historia del manejo del dolor ha evolucionado, también lo ha hecho el concepto del dolor; y es así como la IASP (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor) lo define como una “experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular actual o potencial”. Ya se dejaron atrás las creencias filosóficas, religiosas y demoníacas que se creía que producían dolor. Actualmente se conocen los mecanismos neurofisiológicos que provocan nocicepción y basada en estos, la industria farmacéutica ha trabajado intensamente en la elaboración de nuevos y modernos analgésicos, además de otros medicamentos coadyuvantes en el manejo del dolor. (1)

Siempre buscando el bienestar de las personas, la industria farmacéutica además ha comenzado a trabajar en la elaboración de medicamentos que se basan en la combinación de fármacos, con el objetivo de aumentar la analgesia y de este modo, disminuir la sensación displacentera e incómoda, ayudando a la comunidad en el derecho de tener un mejor bienestar personal y una mejor calidad de vida.

MARCO TEORICO

El dolor clínico puede ser dividido en 2 entidades: el dolor inflamatorio el cual es consecuencia del trauma a los tejidos periféricos (Ej. incisión quirúrgica, disección, quemaduras, etc.); y el dolor neuropático el cual es resultado de una injuria directa al tejido nervioso. Ambos tipos de injuria resultan cambios a largo plazo en la sensibilidad del sistema nervioso, donde se reduce la intensidad del estímulo doloroso necesario para inducir dolor (2,3).

VIAS FISIOLÓGICAS DEL DOLOR.

Cada receptor está especializado en detectar un tipo particular de estímulo (Ej. presión, temperatura, dolor, etc.). Los receptores están distribuidos en diferentes tipos de tejidos, y en diferentes densidades (2, 3). Los receptores especializados de dolor (nociceptores) dan información al sistema nervioso central, sobre el estado del medioambiente y sobre la periferia del organismo.

Los nociceptores son terminaciones nerviosas libres y están ubicados en la piel o en otros tejidos. Los de temperatura pueden ser terminaciones nerviosas libres, bulbos de Krouse o corpúsculos de Rouffini.

Los receptores pueden ser estimulados por daño mecánico, temperaturas extremas o por irritación de sustancias químicas. La mayoría pueden ser estimulados por 2 o más estímulos, mientras que solo algunos responden a un estímulo. Cuando se encuentran en tejidos periféricos (como la piel) y son estimulados, el impulso

nociceptivo es transmitido al SNC por 2 distintos tipos de neuronas las A-delta y las fibras nerviosas tipo C (3).

Las A-delta son fibras de gran diámetro mielinizadas, por lo que dan una rápida conducción, las cuales transmiten el primer dolor, el dolor agudo, punzantes e injurioso. Las fibras C son de menor diámetro. Son amielinizadas por lo que dan una conducción mas lenta, y son responsables del segundo dolor, sordo quemante, de tipo visceral (3).

Las primeras neuronas sensoriales aferentes vienen desde la periferia, luego entran a la medula espinal y sinaptan con neuronas en el asta dorsal. Las neuronas de segundo orden, emergen desde el asta dorsal, tienen axones largos que se decusan a nivel de la comisura anterior y viajan hacia craneal por vías contralaterales y anterolaterales (también conocido como tracto espinotalámico). Algunos axones no se decusan, pero suben por la vía espinal ipsilateral y anterolateral.

Las fibras de la vía espinal anterolateral terminan en el tálamo, desde donde las neuronas de relevo (interneuronas) envían al señal a otro centro del SNC y a la corteza sensorial. Son estos altos centros los responsables de la percepción del dolor y del componente emocional que lo acompaña (3).

Hay 4 diferentes procesos en la vía sensitiva: transducción, transmisión, modulación y percepción. Cada uno de estos 4 procesos representa un potencial blanco para la terapia analgésica.

Transducción.

Los nociceptores responden selectivamente a la noxa como estímulo, y a su vez lo transforma en energía química, mecánica y térmica en el sitio del estímulo, dentro del impulso nervioso. A esto se le conoce como transducción. Los nociceptores aferentes primarios son las ramas terminales de las fibras A-delta y fibras C, cuyos cuerpos celulares están localizados en el ganglio de la raíz dorsal.

Mendell describió una clasificación de tipo funcional para las fibras nerviosas nociceptivas. Las neuronas de amplio rango dinámico son aquellas que reciben entradas tanto de estímulos nociceptivos como de estímulos no nociceptivos y que además exhiben una gran respuesta. Las neuronas con alto umbral son aquellas que solo son estimuladas por estímulos nociceptivos. Y las neuronas con bajo umbral son aquellas que se activan solo con estímulos no nociceptivos (3).

Transmisión.

Luego de que la señal de transducción ha ocurrido, los impulsos son transmitidos vía fibras A-delta y C hasta el asta dorsal de la medula espinal. Las fibras nerviosas sinaptan en las capas superficiales de la lamina de Rexed: las neuronas A-delta sinaptan en la lamina I, II y V. y las fibras C sinaptan en la lamina I y II (3).

Percepción.

Las fibras nociceptivas aferentes de segundo orden tienen su cuerpo celular en el asta posterior de la medula espinal, desde el cual proyecta sus axones a los centros altos del SNC responsables del procesamiento de la información nociceptiva. La mayoría de las fibras ascendentes se decusan antes de subir por el tracto espino-talámico. Los impulsos transmitidos por estas vías son responsables por la discriminación sensitiva del dolor y la respuesta emocional que esta evoca (3).

Modulación.

La interacción entre las neuronas excitatorias e inhibitorias tiene una gran importancia en el procesamiento de la información que llega hacia el cerebro. Las vías eferentes ayudan a modificar la información nociceptiva aferente. Las vías eferentes neuronales involucradas en la modulación del dolor incluyen: el tracto corticoespinal el cual comienza en la corteza motora y sinapta en la lamina Redes III-IV; las neuronas eferentes hipotalámicas las cuales emergen en el hipotálamo y sinaptan en el cerebro medio, puente, médula y la lamina Redes I; y las fibras eferentes extensivas desde la sustancia madre periacueductal en el cerebro medio y el núcleo rafe magno en la médula espinal, al asta dorsal. La estimulación de estas vías eferentes (descendentes) puede modular la transmisión nociceptiva en la periferia y en la medula espinal, alterando la liberación de neurotransmisores, o supraespinalmente activando las vías inhibitorias (3).

La fisiopatología del dolor involucra interacciones muy complejas de diferentes estructuras periféricas y centrales. El componente fisiológico del dolor se denomina nocicepción, el cual consiste en el proceso de transducción, transmisión y modulación de las señales nerviosas generadas en respuesta a un estímulo nocivo externo. Este es un proceso fisiológico que resulta en una percepción consciente del dolor. En su forma más simple, el sistema puede ser considerado como una cadena de tres neuronas, con una neurona denominada de primer orden que se origina en la periferia y que se proyecta a la médula espinal, otra neurona de segundo orden que asciende desde la médula espinal, y una tercera de tercer orden que se proyecta a la corteza cerebral. En una forma más compleja puede haber comunicación con otras neuronas sensitivas y vías neuronales descendentes inhibitorias que provienen del cerebro medio y que son capaces de modular el estímulo doloroso (3).

ÓXIDO NITRICO

El óxido nítrico (NO) es una molécula con múltiples efectos en varios tejidos. Tiene importantes roles como en la vasodilatación, cambio bacteriano, estimulación de las citóquinas, regular la función de los tejidos mineralizados, neurotransmisión, etc. Sin embargo bajo condiciones patológicas tiene efectos dañinos. Solo en los últimos años ha habido un aumento en el interés del rol del NO en la patogénesis de las enfermedades orales y periodontales. Por esto hay muy pocos artículos publicados sobre la participación del NO en las condiciones tanto fisiológicas como patológicas de la región oral (4, 5).

Síntesis

El NO es sintetizado por una compleja familia de enzimas llamadas nitrosintasas (NOS). El sustrato requerido para este grupo de enzimas es el aminoácido L-arginina, el cual produce el NO junto a la L-citrulina, pero para que este proceso se lleve a cabo se requiere de una serie de co-factores (4) Hay tres tipos de enzimas NOS, cada una de las cuales es producida por diferente grupos de genes y las que fueron nombradas por orden de descubrimiento. NOS-1 que fue la primera en ser purificada y clonada desde los tejidos neuronales, por lo que se le llamo nNOS. NOS-3 fue encontrada en las células endoteliales y se le llamo eNOS. Estos 2 tipos son llamados constitutivos pues están siendo expresadas continuamente tanto en las células neuronales como endoteliales. Estas enzimas son dependientes de la concentración de calcio en los tejidos, por lo tanto producen bajas y transitorias concentraciones de NO. LA NOS-2 (también llamada iNOS) es una isoforma que es inducible e independiente de la concentración de calcio. Esta isoforma se expresa constantemente en ciertos sitios como en los queratinocitos en la piel y en las células ductales salivares (4, 5)

Inhibidores de las NOS

Hay un gran numero de inhibidores para las enzimas NOS, estos son usados como herramientas farmacológicas que nos ayudan a identificar las acciones fisiológicas que tiene el NO e investigar su rol en los procesos fisio-patológicos. Estos

inhibidores no presentan una selectividad al actuar sobre solo 1 de las 3 NOS, sino que actúan sobre los 3 tipos de NOS, pero con mayor potencia sobre un tipo de NOS, en relación a los 2 restantes. Dentro de los inhibidores algunos de los compuestos más comunes son 7-NITROINDAZOL, 3-BROMO-7-NITROINDAZOL y el 6-NITROINDAZOL, L-NMMA, L-NNA y su Pro fármaco el N^G-nitro-l-arginine methyl ester, L-NAME. L-NAME actúa como un inhibidor no selectivo de las NOS, mientras que 7-NITRO actúa más sobre nNOS, aunque en este caso la diferencia entre los valores de inhibición sobre las otras formas de NOS fueron pequeños (5,6).

NO y Enfermedades Orales

Hay pocos estudios que hablan sobre el rol del NO en las patologías orales. De hecho el campo de mayor interés es el rol del NO en la patogénesis y en la biología del cáncer oral. A continuación se muestra cómo se ha implicado el NO en algunas enfermedades orales:

Enfermedad Periodontal.

En presencia de enfermedad periodontal la síntesis de NO aumenta. Esto debido a que probablemente sea la placa bacteriana quien active a la NOS-2. En estudios recientes se ha visto que los fibroblastos encontrados en periodontitis crónica tienen una alta expresión de NOS2 en comparación con los encontrados en tejido gingival sano. Se cree que el NO puede jugar un rol tanto en la patogénesis de la enfermedad periodontal, como en la pérdida ósea. Se cree que esta inducción de

NOS2 ocurre en respuesta al LPS bacteriano, o en respuesta a citóquinas que se producen durante la enfermedad periodontal (7,8).

Quistes odontogénicos e infección periapical

Solo hay un estudio en este campo que investigó la expresión de NOS en quistes radiculares. NOS puede regular la destrucción ósea a nivel apical en la zona inflamatoria. NOS también participaría en la patogénesis de la infección apical, por esto se ha postulado que al introducir drogas inhibitoras de NOS en los canales radiculares, se podrían resolver procesos infecciosos apicales (9,10).

Enfermedades inflamatorias de la mucosa Oral

Se ha encontrado expresión de NOS-2 en el Liqueen plano oral (OLP). El OLP se caracteriza por producir muchas citóquinas, dependiendo del equilibrio existente entre estas citóquinas, las que determinarían la inhibición o expresión de las NOS (11,12). Las condiciones de inflamación crónica que induce la NOS2 podrían producir el suficiente NO y subproductos como para poder iniciar una carcinogénesis. Sin embargo esto resulta ser improbable ya que la actividad de la NOS2 en OLP fue muy baja o nula, por lo que el NO no jugaría un rol en la transformación de OLP a un estado de malignidad.

Por otro lado se encontró niveles de nitritos salivares (involucrados en la producción de NO) mas altos en pacientes con OLP, que en pacientes sanos tomados como controles. Se podría especular de estos resultados que la producción de NO se

incrementa al tener OLP y/o que la alta producción de NO juega un rol dañino sobre la mucosa oral lo que produciría OLP (13).

NO en la fisiopatología de los desordenes temporomandibulares.

Se ha visto un aumento en la producción de NO en ciertos desordenes temporomandibulares. Se ha postulado que el NO juega un rol en la patogénesis de la sinovitis y los cambios degenerativos del tejidos óseo y cartilaginoso de la ATM (14). El NO es producido localmente en el líquido sinovial de las ATMs afectadas por afecciones internas. En muestras de líquido sinovial, se ha detectado niveles de NO tanto en las ATMs sintomáticas, como en las asintomáticas. Se cree que los metabolitos que fueron detectados en las ATM asintomáticas pueden representar una proceso de enfermedad latente (15).

Enfermedades de las glándulas salivales.

Hay pocos estudios que relacionen la expresión de las NOS con los desordenes de las glándulas salivales. Bentz y colaboradores evaluaron en varios tumores tanto benignos como malignos y encontraron una expresión alta de NOS-3 (16). Recientemente se encontró que NOS-2 se expresaba en adenoma pleomorfo y en los conductos salivares normales y se postulo que su origen estaba en las células mioepiteliales. El significado de estos hallazgos es aun desconocido como así el efecto del NO a nivel salival (17).

Rol en la carcinogenesis

Debido a que altas concentraciones de NO causan mutaciones genéticas, se postularía que exposiciones por largos periodos de tiempo a NO podrían tener un rol activo en la carcinogenesis. Las mutaciones que produce el NO en el DNA pueden ocurrir por varios mecanismos. Como la desaminación, la transición o transversión del ácido nucleico, que puede deberse a exposiciones a especies de RNO_x (nitrocompuestos), inactivar la DNA ligasa por la afinidad que tiene el NO con el grupo tiol de los aminoácidos. Además se sugiere que podría inactivar al gen supresor de tumores p53. Esto aún no está claro pues es difícil determinar si el NO induce las mutaciones, o si la mutación de p53 por si misma da como resultado una up-regulation, (o regulación por incremento en la producción) de la NOS-2(18, 19).

Carcinoma oral y displasia

Los estudios se han enfocado principalmente en la NOS-2. Así Rosbe y Gallo estudiaron 10 y 27 casos respectivamente, en los cuales se encontró que las células tumorales eran fuente de expresión de NOS. Aunque el NO facilita la angiogenesis, también puede participar en otras acciones que van en perjuicio del cáncer oral. El NO modula la expresión de la matriz de las metaloproteinasas, y también se piensa que hace un down-regulation (regulación por disminución en la producción) de la síntesis de sus inhibidores. Las altas concentraciones de NO encontradas en canceres humanos resultan insuficientes para inducir ya sea una apoptosis o causar directamente la muerte de las células cancerosas (20,21). Sin embargo recientes

estudios in Vitro han encontrado que el NO proveniente de algunas drogas en altas concentraciones induce apoptosis y eventualmente causa citotoxicidad y la muerte de las células cancerosas (22).

ASPECTOS TERAPEUTICOS DEL DOLOR

Analgesia o antinocicepción

Es la ausencia o bien la reducción del dolor percibido Es la abolición de las respuestas reflejas y conductuales evocadas por la aplicación de estímulos nocivos.

Se puede producir desde el punto de vista farmacológico en 3 niveles distintos:

1. A nivel de la conducción del estímulo doloroso:
 - ✓ Anestésicos locales: fármacos que interrumpen la transmisión del impulso nervioso en forma reversible, con un periodo de acción de 2-16 horas, ejemplo, lidocaína y procaína.
 - ✓ Alcoholes y fenoles: sustancias que interrumpen la transmisión del impulso nervioso en forma prolongada e irreversible, su período de acción es de 4 o más meses.
2. A nivel central: mediante analgésicos que actúan a nivel del neuroeje, como son los opioides. Actualmente estos fármacos son los mas efectivos para la inhibición del dolor, pero su gran defecto son las reacciones adversas.
3. A nivel periférico: representados por los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que corresponden a fármacos que pueden ejercer un efecto ya sea antiinflamatorio, analgésico y/o antipirético.

ANALGESICOS ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES

Los antiinflamatorios no esteroideos corresponden a un grupo muy diverso de sustancias que en su mayoría son ácidos orgánicos débiles derivados en general de los ácidos carboxílico y enólico. Sin embargo el motivo que los convoca bajo la sigla de AINEs es el hecho de tener un mecanismo de acción común capaz de entregarles ciertas características terapéuticas y efectos adversos que les son similares (1). Además presentan un común mecanismo de acción radicado principalmente en la bioinhibición de las ciclooxigenasas (COXs), esto pues la COX resulta ser el paso crítico en la biosíntesis de las prostaglandinas. La COX actúa oxigenando el ácido araquidónico, para así formar prostaglandina G_2 , la que luego mediante una peroxidasa la reduce y forma la prostaglandina H_2 . Existen 3 isoformas fundamentales: COX-1, COX-2 Y COX-3. COX-1 se expresa en forma constitutiva en el organismo en casi todos los tejidos sanos, incluyendo plaquetas y riñones. Esta enzima ejerce muchos mecanismos homeostáticos sobre el organismo, como por ejemplo protege la mucosa gástrica. La COX-2 se expresa primariamente en órganos como cerebro, riñones y aparato reproductor femenino, sin embargo puede ser inducida por las citokinas inflamatorias producidas en otros tejidos tales como las células endoteliales. Por la tanto La COX-2 parece ser el objetivo de los efectos anti-inflamatorios de los AINES, mientras que la COX-1 es la que produce los efectos adversos o RAM (23, 24)

Efectos adversos de los AINEs (RAM)

Las reacciones adversas que presentan los AINES se van a relacionar con la inhibición de las PG. Además puede haber una tendencia a producir algunas reacciones tóxicas las que pueden variar dependiendo del AINES (24).

Las RAM que principalmente presentan los Aines son:

- **Úlceras gastrointestinales** debido a que bloquean COX-1, y por lo tanto al efecto protector de la mucosa gástrica que ésta posee
- **Nefropatías agudas** como síndrome nefrótico, nefritis intersticial, necrosis tubular, hipoperfusión renal, en pacientes con alguna patología renal.
- **Producen edema e insuficiencia renal aguda**, agravar una hipertensión o insuficiencia cardíaca. Además, reducen la eficacia de fármacos diuréticos y antihipertensivos
- **Retención de agua, sodio y potasio**, debido a que inhiben a las PG, las que a su vez regulan el equilibrio hidroelectrolítico
- **inhiben o disminuyen la agregación plaquetaria** Los Aines debilitan la adhesión plaquetaria mediante la disminución del Tromboxano A₂ plaquetario, generándose así una tendencia al sangrado.
- **Inhiben la motilidad uterina:** esto debido a la cualidad de los AINES para inhibir la síntesis de prostaglandinas, particularmente la PGF₂

- **Reacciones de hipersensibilidad:** incluye síntomas como shock anafiláctico, broncoespasmo, urticaria, angioedema y erupciones cutáneas.

DEXKETOPROFENO.

El dexketoprofeno es una sal hidrosoluble del enantiómero dextrorrotatorio proveniente del Ketoprofeno que es un fármaco antiinflamatorio no-esteroidal (AINEs). El ketoprofeno racémico es usado como un fármaco analgésico y antiinflamatorio, y es uno de los inhibidores mas potentes de la prostaglandina in Vitro. Su efecto es debido al (S)-(+ enantiómero (dexketoprofeno), mientras que el (R)-(-) enantiómero carece del efecto. Se ha visto según estudios, el grado de disociación que existe entre el efecto analgésico y antiinflamatorio. Esto se midió en estudio sobre ratas con el whiriting test (test de contorsiones), ahí se vio que el efecto analgésico era mayor que el efecto antiinflamatorio. Sobre la base de los datos anteriores se separo al ketoprofeno en su forma pura, o sea el (S)-(+ ketoprofeno dexketoprofeno, para el tratamiento del dolor de diversas etiologías incluyendo el que se asocia con la inflamación. Si bien hay varios estudios donde se ha medido los parámetros clínicos farmacológicos del ketoprofeno, existen pocos estudios que hablan sobre la forma activa, o sea el enantiomero (S)-(+).

El ketoprofeno racemico exhibe una pequeña estereo-selectividad en su farmacocinética. Una relativa biodisponibilidad del dexketoprofeno oral (12.5 y 25mg, respectivamente) es similar a la del ketoprofeno racémico (25 y 50 mg respectivamente), valores que fueron medidos en todos los casos en el área bajo la

curva de tiempo v/s concentración. El dexketoprofeno no se acumula significativamente cuando se administra en dosis de 25mg 3 veces al día. Su perfil de absorción cambia cuando es ingerido con comida, reduciéndose tanto la tasa de absorción (t_{max}) y la concentración máxima en el plasma. Se une fuertemente a proteínas plasmáticas, especialmente la albúmina. Es eliminado mediante una larga biotransformación para así inactivar sus metabolitos glucoro-conjugados. Luego los conjugados son eliminados por la orina sin mayores cambios.

La eficacia de la analgesia observada por el enantiomero (S)-(+), puro, es similar a la observada después de una doble dosis del compuesto racémico. En dosis mayores a 7 mg se observó que el dexketoprofeno fue significativamente superior a placebo en pacientes con dolor moderado a severo. En la relación entre la dosis y la respuesta se vio que la diferencia entre las dosis de 12.5 mg y de 25 mg, se debía más bien a una mayor duración en el efecto analgésico, que a un aumento en el peak del efecto analgésico, por lo que se propone que en dosis de 25 mg se produce un plateau en la curva de dosis-efecto. El ketoprofeno se administra comúnmente de forma oral, pero también se puede administrar por vía rectal, intramuscular, tópica e intravenosa. Pero el dexketoprofeno solo se ha preparado hasta ahora una preparación para vía oral. Al ser una droga altamente lipofílica, el proceso de absorción va a depender de la tasa de difusión de la droga a través de las membranas y de los compartimentos hidrofílicos. El perfil farmacocinético del dexketoprofeno trometamol, se estableció mediante 2 estudios. Estos determinaron que tiene un t_{max} más corto y menos variable que el dexketoprofeno ácido y que el ketoprofeno. Ellos atribuyen esta rápida

absorción a la adición de la sal trometamina al dexketoprofeno. Esto puede usarse desde una perspectiva farmacocinética, pues el dexketoprofeno trometamol podría ser usado en dolores en condiciones muy precisas (25). Otro punto importante es que se midió la diferencia entre la concentración al tomarlo en dosis única o al tomarlo 3 veces al día. Se encontró que no había diferencia al medir la concentración por lo que se demostró que el fármaco no se acumula significativamente cuando es administrado 3 veces al día (26). También se vio como afecta la ingesta de alimentos y los antiácidos en la biodisponibilidad. Se vio que no había ninguna diferencia en la biodisponibilidad cuando se administra con ingesta de alimentos y antiácidos ⁽²⁷⁾. Sin embargo se observaron cambios en el perfil de absorción, con una reducción relevante tanto del C_{max} como de t_{max} . Este aumento en t_{max} se debe al ocupamiento estomacal debido a la ingesta de comida, por lo que el dexketoprofeno demora su llegada al intestino delgado que es su sitio de absorción. La relevancia clínica de la reducción de c_{max} y el aumento de t_{max} va a depender de si los efectos clínicos del dexketoprofeno se relacionan directamente con su concentración plasmática. Estudios experimentales se han hecho para ver esta relación sin obtener aún un resultado concluyente al respecto (28). Así si la eficacia terapéutica va a ser dependiente de altas concentraciones a nivel plasmático, un c_{max} disminuido podría disminuir la eficacia analgésica, y se sugeriría no ingerir el fármaco junto con las comidas. Sin embargo como el ingerir el fármaco junto con alimentos no afecta la biodisponibilidad se dice que es improbable que la eficacia clínica sea comprometida, solo se debe tomar en consideración los casos de pacientes con dolores agudos y punzantes, a los cuales la ingesta de alimentos si

puede demorar el tiempo en que la analgesia tome efecto (29). El volumen de distribución determinado luego de una administración oral fue de 0.243 L/kg (26,27). Este volumen se acerca al volumen plasmático y nos sugiere que la unión a los tejidos es apreciablemente menor que la unión a las proteínas plasmáticas. El dexketoprofeno se une fuertemente a las proteínas plasmáticas, la fracción libre es menos que el 0.8%. Los 2 enantiómeros tanto el (S)-(+), como el (R)-(-) muestran alta afinidad por los sitios primarios de unión de la fenilbutazona y el diazepam, y muestra una menor afinidad por el sitio secundario de unión del diazepam.

A concentraciones fisiológicas de sero albúmina, la unión de ambos enantiómeros parece no ser estereoselectiva. Pero en muy altas concentraciones (200-600mg/L) se puede observar cierta estereoselectividad en la unión de los enantiómeros a la seroalbúmina, siendo ligeramente mayor la del enantiómero (S)-(+), que la del (R)-(-). (30). La distribución en el líquido sinovial es importante, pues es el sitio primario donde actúan los AINEs en procesos inflamatorios crónicos articulares. La disposición en este líquido no parece ser estereoselectiva según los estudios, eso si estudios en humanos con dexketoprofeno trometamol aún no se han realizado. Existe una reacción entre los ácidos carboxílicos lipofílicos, que se conjugan con la coA y luego reaccionan con un diglicérido. Esta reacción forma uniones covalentes entre los xenobioticos y tejidos del organismo, donde lo más probable es que se acumule en el tejido graso. Las consecuencias toxicológicas a largo plazo aún son desconocidas. Se ha sugerido que los triglicéridos híbridos interrumpen el metabolismo normal de los lípidos y la función de la membrana, por lo tanto la recepción de lípidos anormales puede ser la

responsable de los efectos adversos sobre el sistema nervios central (SNS). El ketoprofeno es metabolizado en el hígado, y puede sufrir 3 diferentes biotransformaciones. Primero conjugación al ácido-glucoronico, segundo hidroxilación del anillo aromático del grupo benzoilo, y tercero inversión del enantiomero (R)-(-) al (S)-(+). El primero de los 3 procesos es el que mas ocurre, sin embargo la importancia de los otros 2 procesos varia dependiendo de la especie. En humanos la mayoría de la droga (73 a un 81%) es recuperada en su forma inalterada después de la hidrólisis del glucorónico, en muestras de orina durante las primeras 12 horas del tratamiento, así por ejemplo en ratas la inversión de los enantiomeros es muy alta (75% de la dosis), sin embargo en humanos este proceso se lleva acabo pero en una proporción muy baja (31,32,33). El dexketoprofeno se elimina después de que completa su metabolismo. Su eliminación es tan rápida que a pesar de repetidas dosis, no se aprecia o hay una pequeña acumulación del fármaco en la concentración plasmática. El clearance aparente, que fue determinado después de la administración de dexketoprofeno trometamol en humanos, fue de 0.087 L/h/kg. La disminución de las concentraciones del fármaco en el plasma humano son paralelas para los 2 enantiomeros del ketoprofeno, donde se ve una relación lineal entre la dosis v/s el tiempo. Al administrar una dosis de dexketoprofeno aproximadamente se recupera el 82% de la orina. Se vio que el enantiomero (S)-(+) es más prevalente en la orina. Esto indicaría una conjugación preferencial a favor del enantiomero (S)-(+). Sin embargo como la mayoría del fármaco es eliminado mediante conjugación, es esperable que se elimine un enantiómero con gran afinidad para la conjugación con un $t_{1/2}$ menor que el

otro. Aunque hay diferencias en el t_{max} entre ambos enantiómeros, estas no han sido estadísticamente significativas. El 18% de una dosis de dexketoprofeno que no se recupera por la orina, se podría encontrar en la bilis. Se sugiere que esto podría ir en acuerdo con la estereo selectividad en la excreción de los enantiómeros, siendo en enantiómero (R)-(-) el que se excretaría mas por esta vía. Pero esta idea ha sido rechazada por la pequeña cantidad de enantiómeros conjugados que han sido hallados en la bilis (26, 27).

El uso de una droga que tenga un enantiómero puro se justifica si esta otorga más beneficios que el fármaco en su forma original. Para hacer esto se evalúan datos como la eficacia, tolerabilidad o parámetros farmacocinéticos. Las ventajas de tener este enantiómero son de minimizar la toxicidad inicial y las interacciones mediadas por el enantiómero menos activo. Además se puede dar la mitad de la dosis en comparación con el ketoprofeno racémico, lo que disminuye la carga hepática y la cantidad total de metabolitos que se forman. Esto último es importante pues algunos metabolitos como el ácido glucoronico (proveniente del ketoprofeno) tienen la capacidad de acetilar covalentemente a las proteínas, con el resultado de que esto puede iniciar una sensibilización inmunológica o una toxicidad tejido-selectiva. Otra ventaja potencial es evitar las reacciones adversas o potenciales efectos tóxicos provenientes del enantiómero (R)-(-), como por ejemplo evitar la conjugación estereo selectiva del (R)-(-) con el CoA, seguida con una reacción de bioinversión con lo que el compuesto se acumula en los tejidos grasos, o la ulceración en la parte intestinal alta.

El dexketoprofeno trometamol por su parte exhibe una disminución en la irritación gástrica debido a su mayor solubilidad en agua, lo que reduce su concentración en el estómago. Además llega más rápido al rango de acción, en relación al dexketoprofeno solo. Actualmente la dosis recomendada de ketoprofeno es de 25 a 100mg, los que corresponden a 12.5 a 50 mg de dexketoprofeno. Sin embargo los resultados de algunos estudios preclínicos nos dicen que para el dexketoprofeno trometamol se requiere una dosis mas baja aun, o sea de 5, 10 y 20 mg. En un estudio donde se comparo al ibuprofeno con el dexketoprofeno trometamol. No se vieron diferencias significativas en la reducción del dolor, pero se vio que el tiempo que se requiere para que el medicamento tome acción fue mucho menor en el dexketoprofeno trometamol (0.9 vs 2.1 h) (26, 27)

Para el desarrollo de analgésicos en general el modelo que se usa para medir la eficacia de estos, es la extracción quirúrgica de los terceros molares impactados. Los pacientes usados son generalmente jóvenes, saludables, que no están tomando otros medicamentos, además el procedimiento quirúrgico es uniforme y el dolor producido es de intensidad moderada a severa, según una escala del dolor cuyos valores van del 1 al 10, donde 1 es leve y 10 es severo. Todas estas características nos dan unos resultados consistentes en la medida del alivio del dolor, con una variabilidad mucho menor que la que se encuentra en otros modelos.

DEXIBUPROFENO

El ibuprofeno es un ácido 2-arilpropinoico. Su actividad como AINEs es antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Es una droga de primera elección debido a su poca incidencia de efectos adversos, ya que posee menor riesgo de complicaciones gastrointestinales (34). El ibuprofeno es una mezcla racémica que se compone de 2 enantiómeros el S-enantiómero y el R-enantiómero, toda la actividad analgésica reside en el S-enantiómero o dexibuprofeno. Al ser un ácido propinoico el ibuprofeno presenta un metabolismo de inversión donde experimenta una inversión unidireccional desde el R-enantiómero hasta su inverso el S-enantiómero en una magnitud del 60%. Es un mecanismo complicado donde se sabe actúan al menos 3 enzimas (35).

La absorción se da en forma pasiva, pero es favorecida por la gradiente de protones. También podría estar involucrado un mecanismo activo, por la presencia de transportadores protón/monocarboxilos (MCT) en los enterocitos del tracto intestinal. La unión a proteínas de ambos enantiómeros fue mayor al 99% en concentraciones terapéuticas, observándose una saturación de la unión en concentraciones altas. A pesar de la alta unión a proteínas de ambos enantiómeros, se observan diferencias en el sitio de unión entre ambos (0.358 vs. 0.979 $\mu\text{g/mL}$ para el R- y S-enantiómeros respectivamente). Existen 2 sitios de unión para ambos, uno de alta y otro de baja afinidad. Comparten el mismo sitio de unión de alta afinidad, donde la afinidad para el R-enantiómero fue 2.6 veces más alta que el S-enantiómero (35)

La interacción entre ambos enantiómeros se debe tener en cuenta a la hora de estudiar los parámetros farmacocinéticos de la mezcla racémica en comparación con el

enantiómero puro. Es razonable anticipar un mayor volumen de distribución cuando se administra la mezcla racémica que en presencia solo del S-enantiómero. La menor tasa de unión del S-enantiómero puede contribuir a una mayor tasa de transferencia, en el fluido sinovial y por lo tanto provocar una respuesta farmacológica mayor (35). Ambos enantiómeros experimentan un metabolismo de tipo oxidativo formando metabolitos hidroxilos y carboxilos. Todos los metabolitos de la fase 1 y los enantiómeros intactos pueden ser conjugados con el ácido glucoronico produciendo metabolitos de fase 2. Existe además una selectividad en el metabolismo que favorece al S-enantiómero (34,35). El riñón es la mayor vía de excreción, se ha recuperado de la orina en 24 hrs la mayoría de la droga intacta junto con los metabolitos (entre el 60-70%). Otra vía de excreción es la biliar. La selectividad en la excreción de los enantiómeros se ha observado en estudios en ratas, mientras que en humanos aun no hay estudios concluyentes.

La administración del S (+)-enantiómero da como resultado una acción analgésica e antiinflamatoria mas potente que la mezcla racémica, además esto no trae consigo un aumento en la toxicidad gástrica, sino mas bien la disminuye (34,35)

HIPOTESIS

La administración de dexketoprofeno y dexibuprofeno induce actividad analgésica en el ensayo algesiometro visceral agudo que es modulada por el sistema nitridergico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antinociceptiva de dexketoprofeno y dexibuprofeno en el ensayo algesiometro experimental de las contorsiones abdominales y estudiar la participación de la vía NO-GMPc en dicha actividad

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la antinocicepción inducida por la administración intraperitoneal (i.p) de dexketoprofeno y dexibuprofeno en el test de las contorsiones.
2. Evaluar en el ensayo citado el efecto analgésico de los inhibidores de las nitrosintasas en el citado test
3. Estudiar el efecto moduladorio de la vía NO-GMPc en la actividad de dexketoprofeno y dexibuprofeno.

MATERIAL Y METODO

Animales

Se usarán ratones machos de la cepa CF/1 (*Mus musculus*) de 25 a 30 gramos de peso, los que serán aclimatados al ambiente del laboratorio (22-24 °C) al menos dos horas antes de la experimentación. La cual se realizó de acuerdo a un protocolo (CBA N° 131) aprobado por la Comisión de Ética local de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Cada animal recibió una dosis de los fármacos, fue utilizado una vez y seleccionado en forma aleatoria. Todas las observaciones durante el experimento fueron efectuadas en forma randomizada, ciega y usando como control suero fisiológico. Un mínimo de 6 animales fueron usados para cada tratamiento. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después del experimento mediante dislocación cervical.

Test de las Contorsiones

La evaluación de la actividad antinociceptiva se efectuó por el método algiesométrico agudo del writhing test o test de las contorsiones, en el que se usa un estímulo químico irritativo: El estímulo nociceptivo, es la inyección i.p. de 10 ml/kg de una solución de ácido acético al 0.6 %. El dolor producido se mide contando el número de contorsiones que presenta el animal después de 5 minutos de la inyección y durante 5 minutos. Se entiende por contorsión la contracción de la musculatura abdominal junto con una elongación de las extremidades posteriores.

Drogas

Todas las drogas usadas fueron suministradas por el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y corresponden a: dexketoprofeno, dexibuprofeno, L-NAME un inhibidor no selectivo de las enzimas nitrosintasas (NOS) y 7-nitroindazol, inhibidor preferencial de n-NOS.

Administración de drogas

Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 10 ml/kg y el ensayo algesiométrico fue realizado cuando se produjo el efecto máximo de cada droga.

Los resultados se expresan como porcentaje de antinocicepción (% AN) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ AN} = 100 - [\text{WE} / \text{WC} \times 100]$$

Donde:

WE = número de contorsiones de los animales inyectados con droga,

WC = es el número de contorsiones en los animales inyectados con salino.

Los animales controles fueron inyectados, por i.p. con solución salina al 0.9% y la evaluación fue idéntica a la de los animales tratados. Estos se inyectaron, por vía i.p. con dexketoprofeno (1- 30 mg/kg) y con dexibuprofeno (1-30 mg/kg) 30 minutos antes de la administración del ácido acético. Para estudiar la participación del sistema opioide y del nitridérgico, se administró por la misma vía, 30 minutos antes de la

inyección de los AINEs, L-NAME (1, 5 y 10 mg/kg) o bien 7-nitroindazol (0,25 y 1,5 mg/kg).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos de las curvas log dosis-respuesta se analizarán mediante regresión lineal por cuadrados mínimos para determinar las ED50. Los parámetros estadísticos se calcularán con un programa computacional del laboratorio, la significación estadística será determinada por análisis de pruebas t de student y será considerada a un nivel de 5% (36).

RESULTADOS.

Efecto antinociceptivo de dexibuprofeno

La administración intraperitoneal (i.p.) de diferentes dosis de dexibuprofeno, en el método algesiométrico de las contorsiones abdominales, dio como resultado una actividad antinociceptiva dosis dependiente. La DE50 fue de 3.9 ± 0.4 mg/kg. Estos resultados se muestran en la figura 1.

Efecto antinociceptivo de dexketoprofeno

La administración intraperitoneal (i.p.) de diferentes dosis de dexketoprofeno, utilizando el mismo método algesiométrico, dio como resultado una actividad antinociceptiva dosis dependiente. La DE50 del dexketoprofeno fue de 13.3 ± 1.1 mg/kg. El análisis estadístico de las curvas resultó que ellas no eran paralelas. Todos estos resultados se muestran en la figura 1.

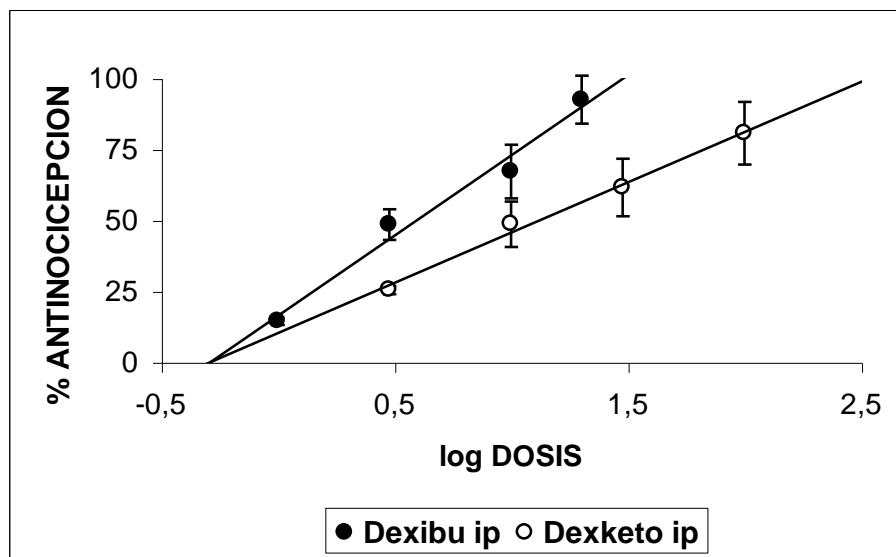


Figura 1. Curvas dosis-respuesta de dexibuprofeno y dexketoprofeno en el test de las contorsiones abdominales.

Interacción de los AINES con L-NAME y 7-NITROINDAZOL

El pretratamiento con 5 o con 10 mg/kg de L-NAME modificó tanto la DE50 de dexibuprofeno como la de dexketoprofeno ($P < 0.05$). El pretratamiento con 1.5 mg/kg de 7-Nitroindazol, modificó tanto el efecto de la ED50 de dexketoprofeno y del dexibuprofeno ($P < 0.05$). Es de notar que usando 1 mg/kg de L-NAME o bien 0.25 mg/kg de 7-Nitroindazol, no se observó cambio en la actividad tanto de dexibuprofeno como en la dexketoprofeno. Por otra parte, si el pretratamiento se hace con 5 o con 10 mg/kg de 7-Nitroindazol, se obtuvo un aumento significativo de la actividad antinociceptiva, registrándose un número muy pequeño de contracciones. Estos resultados se observan en las tabla1 y en las figuras 2, 3, 4 y 5.

Tabla 1. Efecto de L-NAME sobre el número de contorsiones inducidas por la ED50 de dexibuprofeno y de dexketoprofeno, en el test de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético.

| FARMACOS | NÚMERO DE CONTORSIONES | |
|---------------------|------------------------|---------------------|
| | ED50 DEXIBUPROFENO | ED50 DEXKETOPROFENO |
| AINEs | 10.5±1.23 | 9.0±0.45 |
| L-NAME 1 | 9.17±1.01 | 9.4±1.21 |
| 5 | 5.67±1.05* | 3.33±0.71* |
| 10 | 3.5±0.99 * | 1.5±0.22 * |
| 7-NITROINDAZOL 0.25 | 13.6±0.51 | 10.8±1.8 |
| 1.5 | 8.17±1.08* | 4.33±0.71* |
| 5 | 1.87 ± 0.53 | 1.33 ± 0.61 |
| 10 | 0 | 0 |

Valores representan el promedio de las contorsiones ± SEM de al menos 6 animales.
DEXIBU= dexibuprofeno; DEXKETO= dexketoprofeno * P < 0.05

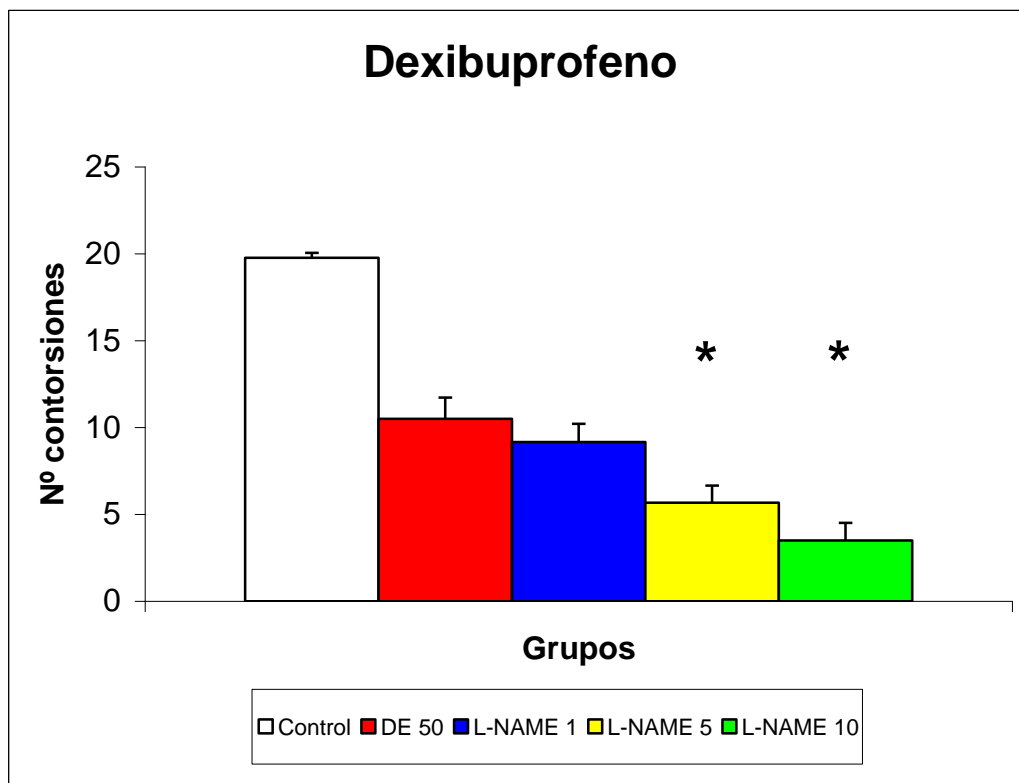


Figura 2. Efecto de L-NAME en la actividad antinociceptiva de la ED50 de dexibuprofeno. * $P < 0.05$.

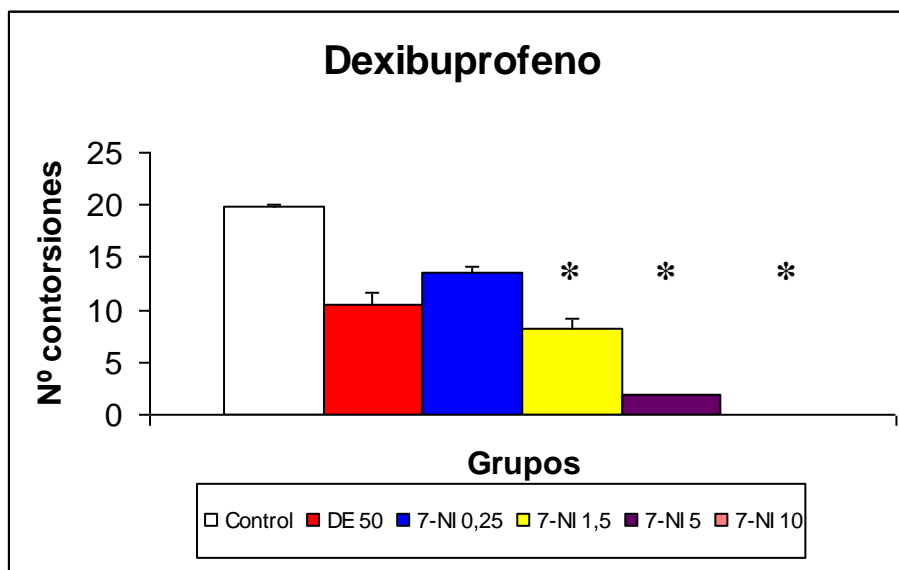


Figura 3. . Efecto de 7-NITRO en la actividad antinociceptiva de la ED50 de dexibuprofeno. * $P < 0.05$.

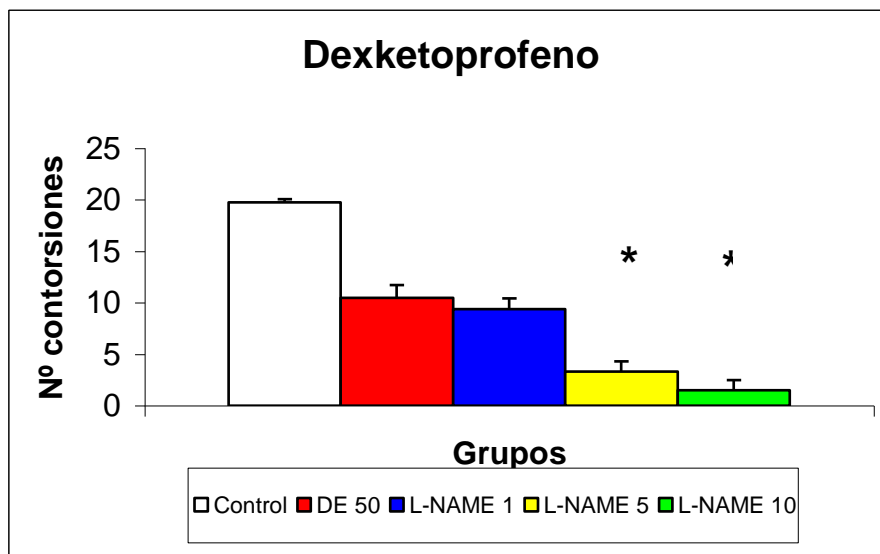


Figura 4. Efecto de L-NAME en la actividad antinociceptiva de la ED50 de dexketoprofeno. * $P < 0.05$.

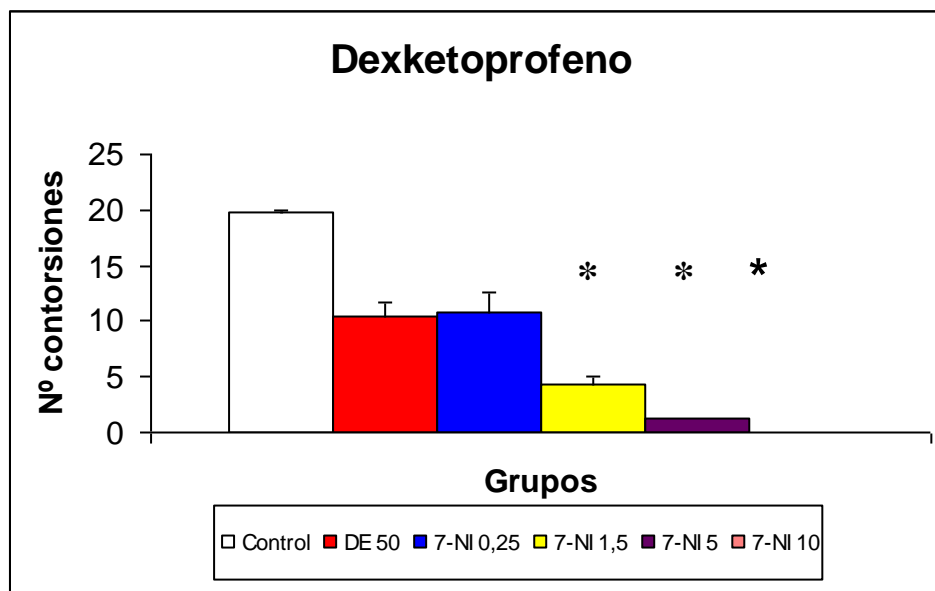


Figura 5. Efecto de 7-NITRO en la actividad antinociceptiva de la ED50 de dexketoprofeno. * $P < 0.05$.

DISCUSIÓN.

El presente trabajo demuestra la actividad antinociceptiva de los AINES, dexibuprofeno y dexketoprofeno en el test de las contorsiones o whriting test, junto con la interacción que tienen estos AINES al combinarlos con inhibidores selectivos de las NOS como lo son L-NAME Y 7-NITRO. Aunque los 2 AINES son del grupo de los propiónicos se ve que el dexibuprofeno es 3.4 veces más efectivo, en este ensayo que mide fundamentalmente analgesia, que el dexketoprofeno. Además, dado que las curvas dosis-respuestas no son paralelas, se infiere que estos AINEs están actuando por diferentes mecanismos de acción, así dexibuprofeno es más inhibidor de COX-2 que COX-1 y lo inverso es cierto para dexketoprofeno (24). Sin embargo no debe descartarse otros mecanismos de acción de estos AINEs, que estarían relacionados con todos los niveles de la función celular (activación de receptores, actividad de canales iónicos, interacciones con lípidos y proteínas de membranas; formación de segundos mensajeros, etc) y éstos son dependientes de la concentración de los fármacos, los eventos por ellos producidos, podrían oscilar desde el nivel molecular a diferentes tipos de interacciones. Por otra parte el tipo de interacción, debe estar en relación además de la concentración local de los fármacos a la naturaleza e intensidad del estímulo nociceptivo y a los mecanismos de transducción (37).

La inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), encargada de la síntesis de NO, puede realizarse mediante sustancias análogas a la L-Arginina como son la N-

nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) y el 7-nitroindazole (7-NITRO) las que inhiben en diferente grado a los 3 tipos de NOS (6, 7).

El incremento de la actividad nociceptiva producida por la acción de L-NAME sobre los 2 tipos de AINES, podría deberse a que este antagonista es capaz de inducir analgesia (6, 7). Este efecto se vería dosis-dependiente, y se expresaría en relación directa a la concentración de L-NAME utilizada. El efecto sinérgico inducido por el 7-NITRO es consecuencia de su descrita actividad antinociceptiva (4). En resumen, el presente trabajo, demuestra que la participación del sistema NO-GMPc, mediada por los inhibidores de la síntesis de NO, en la actividad antinociceptiva, tanto de dexibuprofeno como de dexketoprofeno, está en relación directa a la dosis del antagonista utilizado.

CONCLUSIONES.

- ✓ La administración de dexketoprofeno o de dexibuprofeno vía i.p., utilizando el test de las contorsiones abdominales produce una acción antinociceptiva dosis dependiente.
- ✓ Dexibuprofeno es un analgésico de mayor potencia que dexketoprofeno.
- ✓ El pretratamiento con L-NAME y con 7-NITRO produce un aumento de la actividad antinociceptiva de dexibuprofeno y de dexketoprofeno, que es directamente proporcional a la dosis del inhibidor de NO.
- ✓ El pretratamiento con L-NAME y 7-NITRO y los resultados obtenidos, indican la participación en el sistema NO-GMPc en este ensayo experimental.

SUGERENCIAS

De los hallazgos del estudio se sugiere:

- Evaluar otros tipos de AINEs y de sus combinaciones con inhibidores de la NOS.
- Estudiarla en diferentes ensayos algesiométricos
- Evaluarlas por diferentes vías de administración
- Estudiar el compromiso de otros sistemas biológicos: adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, etc.

RESUMEN

El presente trabajo mostró la actividad antinociceptiva de 2 tipos de AINEs, dexibuprofeno y dexketoprofeno, siendo el dexibuprofeno de mayor efectividad que el dexketoprofeno. Estos resultados se explican por la selectividad por los distintos tipos de COX, dexibuprofeno tiene mayor efecto sobre COX-2 que sobre COX-1, siendo lo inverso para dexketoprofeno.

Además se estudió la interacción entre estos AINEs y 2 tipos de inhibidores de la NOS: L-NAME y 7NITRO. A dosis bajas de estos inhibidores no presentaban efecto sobre la ED50 de los AINEs, sin embargo a mayores concentraciones se incrementa significativamente la eficacia de la ED50 de los AINEs.

Se concluye que existe una interacción sinérgica entre los AINEs y los inhibidores de la NOS.

BIBLIOGRAFIA

-
- 1 Savage MG, Henry MA. Preoperative nonsteroidal anti-inflammatory agents: review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Aug;98(2):146-52. Review.
 - 2 Ueda H. In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. *Jpn J Pharmacol.* 1999 Mar;79(3):263-8. Review.
 - 3 Kelly DJ, Ahmad M, Brull SJ. Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. *Can J Anaesth.* 2001 Nov;48(10):1000-10. Review.
 - 4 Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Apr;366(1-2):90-100. Epub 2006 Jan 4. Review.
 - 5 Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615. Review.
 - 6 Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 2001 Apr 6;897(1-2):9-19.
 - 7 Lohinai Z, Stachlewitz R, Virag L, Szekely AD, Hasko G, Szabo C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J Dent Res* 2001;80:470—475.
 - 8 Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol* 2002;73:392-400.

9 Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogiso B, et al. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-g-producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J* 1999;32:124-130.

10 Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod* 2001;27:749-752.

11 Brennan PA, Umar T, Palacios-Callender M, Spedding AV, Mellor T, Buckley J, et al. A study to assess inducible nitric oxide synthase expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2000b;29:249—254.

12 Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta*. 2006 Apr;366(1-2):90-100. Epub 2006 Jan 4. Review.

13 Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1999;28:355-359.

14 Takahashi T, Kondoh T, Kamei K, et al. Elevated levels of nitric oxide in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:505– 9.

15 Aghabeigi B, Cintra N, Meghji S, Reher P, Evans AW, Hopper C. Measurement of nitric oxide in temporomandibular joint saline aspirates. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:401– 3.

16 Bentz BG, Haines K, Hanson DG, Radosevich JA. Endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) localisation in normal and neoplastic salivary tissue. *Head Neck* 1998;20:304-309.

-
- 17 Brennan PA, Umar T, Zaki GA, Langdon JD, Spedding AV, Buckley J, et al. Are myoepithelial cells responsible for the widespread expression of inducible nitric oxide synthase in pleomorphic adenoma? An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2000;29:279-283.
- 18 Wink DA, Vodovotz Y, Laval D, Laval F, Dewhirst DW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:711-721.
- 19 Murata J, Tada M, Iggo RD, Sawamura Y, Shinohe Y, Abe H. Nitric oxide as a carcinogen: analysis by functional yeast assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide. *Mutation Res* 97;379:211-218.
- 20 Gallo O, Masini E, Morbidelli L. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progresión in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-596.
- 21 Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998 Mar;17(1):107-18. Review.
- 22 Shang ZJ, Li JR, Li JB. Effects of exogenous nitric oxide on oral squamous cell carcinoma : An a Vitro study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:905-910.
- 23 Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic *FASEB J.* 2004 May;18(7):790-804.
- 24 Huber MA, Terezhalmay GT. The use of COX-2 inhibitors for acute dental pain: A second look. *J Am Dent Assoc.* 2006 Apr;137(4):480-7. Review
- 25 Gich I, Barbanoj MJ, Artigas R, et al. New fast-onset oral formulation of desketoprofen. 6th Interscience World Conference on Inflammation, Antirheumatics, Analgesics and Immunomodulators (INWIN = 95); 1995 Mar 28-30; Geneva

-
- 26 Barbanoj MJ, Gich I, Artigas R, et al. Pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol in healthy volunteers after single and repeated oral doses. *J Clin Pharmacol* 1998; 38 (12 Suppl.): 33-40S
- 27 McEwen J, De Luca M, Casini A, et al. The effect of food and an antiacid on the bioavailability of dexketoprofen trometamol. *J Clin Pharmacol* 1998; 38 (12 Suppl.): 41-5S
- 28 Jamali F, Mathers D, Russell AS. Concentration-effect relationship of S-ketoprofen in adjuvant arthritic rats. *Pharm Res* 1989; 6 Suppl.: S211
- 29 Orme MLE. The relationship between the plasma concentration of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their therapeutic effect. *Agents Actions* 1985; 17: 151-5
- 30 Dubois N, Muller N, Lapique F, et al. Stereoselective protein binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: pharmacological consequences. *Therapie* 1993; 48: 335-9
- 31 Carabaza A, Suesa N, Tost D, et al. Stereoselective metabolic pathways of ketoprofen in the rat: incorporation into triacylglycerols and enantiomeric inversion. *Chirality* 1996;8: 163-72
- 32 Jamali F, Lovlin R, Aberg G. Bi-directional chiral inversion of ketoprofen in CD-1 mice. *Chirality* 1997; 9: 29-31
- 33 Rudy AC, Liu Y, Brater C, et al. Stereoselective pharmacokinetics and inversion of (R)-ketoprofen in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 1998; 38 (12 Suppl.): 3-10S
- 34 Bonabello A, Galmozzi MR, Canaparo R, Isaia GC, Serpe L, Muntoni E, Zara GP. Dexibuprofen (S+-isomer ibuprofen) reduces gastric damage and improves analgesic and antiinflammatory effects in rodents. *Anesth Analg*. 2003 Aug;97(2):402-8

35 Hao H, Wang G, Sun J. Enantioselective pharmacokinetics of ibuprofen and involved mechanisms. *Drug Metab Rev.* 2005;37(1):215-34.

36 Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. Miranda HF y cols. *Pain* 121: 22-28, 2006

37 Barrera NP, Morales B, Torres S, Villalón M. Principles: mechanisms and modeling of synergism in cellular responses. *Trends Pharmacol Sci.* 2005, 26, 526-532.