

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Medicina
Escuela de Kinesiología

INTERACCIÓN DEL SISTEMA NITRIDÉRGICO EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO-ESTEROIDALES DESKETOPROFENO Y MELOXICAM

Seminario de Título para optar al Grado de Licenciado en Kinesiología
Integrantes:

ÁNGEL ESTEBAN BENÍTEZ VERA

ENRIQUE NICOLÁS SEPÚLVEDA LÓPEZ

Profesor Guía: FERNANDO SIERRALTA GARCÍA, DD.
Santiago, Chile 2006

AGRADECIMIENTOS .	1
RESUMEN .	3
ABSTRACT .	5
ABREVIATURAS . .	7
INTRODUCCIÓN .	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . .	11
Pregunta de Investigación .	11
Importancia y Justificación del problema en estudio .	11
MARCO TEÓRICO . .	13
Prostanoides, COXs y AINEs . .	13
Sensibilización Periférica . .	15
Sensibilización Central . .	16
Efectos antihiperalgésicos centrales y periféricos de los AINEs .	17
Desketoprofeno . .	18
Meloxicam .	18
El Sistema Nitridérgico . .	19
Regulación . .	20
Mecanismo de Acción .	20
NO y SNC . .	20
Acciones Fisiopatológicas . .	21
Intervención con inhibidores . .	22
L-NAME .	23
Relación entre Sistema Nitridérgico, PGs y COXs .	23
OBJETIVOS . .	27
Objetivo general .	27
Objetivos específicos . .	27
HIPÓTESIS .	29

VARIABLES . .	31
Inhibidores de NOS . .	31
Efecto Antinociceptivo . .	31
MATERIALES Y MÉTODOS .	33
Animales .	33
Medición de la actividad antinociceptiva .	33
Diseño de Investigación . .	34
Análisis de datos y estadísticas .	35
RESULTADOS . .	37
DISCUSIÓN .	41
CONCLUSIÓN .	45
PROYECCIONES . .	47
BIBLIOGRAFÍA .	49
APÉNDICE . .	53
LISTA DE TABLAS .	53
LISTA DE FIGURAS . .	53
TABLAS .	54
FIGURAS .	56

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, queremos agradecer a nuestro director de tesis Dr. Fernando Sierralta por enseñarnos que el rigor científico es absolutamente compatible con el buen humor y, además, por su apoyo irrestricto durante los momentos difíciles que surgieron en la realización de este Seminario de Título. Tampoco nos podemos olvidar de los profesores Sr. Alejandro Correa y Sr. José López, ya que sin su vital aporte en lo práctico, en lo teórico y en lo humano, esta investigación jamás se hubiese realizado. Por último, queremos agradecer a los profesores Dr. Gianni Pinardi y Dr. Hugo Miranda, por haberse tomado el tiempo de explicar, a este par de nóveles investigadores, los aspectos más técnicos de esta investigación.

RESUMEN

El mecanismo de acción principal de los antiinflamatorios no-esteroidales es por la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas, pero en su efecto analgésico intervienen otras sustancias neuromoduladoras. El objetivo de esta investigación es estudiar la participación del sistema nitridérgico, a través de los inhibidores de óxido nítrico sintasa L-NAME y 7-nitroindazol, en la actividad antinociceptiva de meloxicam y desketoprofeno.

La antinocicepción fue evaluada, en ratones, con el test de la formalina, midiéndose el tiempo de lamido que realiza cada ratón en su pata izquierda, sitio de inyección de la formalina. Se registraron las dos fases del test, los primeros 5 minutos (fase algésica) y los últimos 10 minutos (fase inflamatoria) del total de 30 minutos que dura el test. Los ratones fueron inyectados por intraperitonealmente con los antiinflamatorios no-esteroidales desketoprofeno o meloxicam, 30 minutos antes de la administración de la formalina subcutánea. Para estudiar la participación del sistema nitridérgico, los inhibidores L-NAME y 7-nitroindazol fueron inyectados intraperitonealmente 45 minutos antes de la inyección de formalina.

Se confeccionaron curvas dosis-respuesta a partir de los resultados de cada uno de los grupos en estudio: desketoprofeno, meloxicam, L-NAME, 7-nitroindazol y las combinaciones de los antiinflamatorio más los inhibidores.

Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencias significativas en la interacción de L-NAME respecto de la acción antinociceptiva de ambos antiinflamatorios y sólo una tendencia significativa a revertir el efecto de la fase inflamatoria. La administración de 7-nitroindazol suprimió completamente el efecto nociceptivo de la formalina, en ambas fases del test, probablemente por la alta dosis empleada (5 mg/kg). Por esta razón, no podemos concluir que la antinocicepción mostrada por la interacción del 7-nitroindazol con ambos antiinflamatorios no-esteroidales, se debe a un efecto sinérgico de ambas sustancias o solamente a la acción potente del 7-nitroindazol.

En conclusión, estos resultados no nos permiten afirmar categóricamente que el efecto antinociceptivo de desketoprofeno y meloxicam es modulado por el sistema nitridérgico, utilizando el test de la formalina.

ABSTRACT

The main mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs is the inhibition of the cyclooxygenases enzymes, but on its analgesic effect other neuromodulating substances intervene. The aim of this investigation is to study the participation of the nitrenergic system, using the nitric oxide synthase inhibitors L-NAME and 7-nitroindazole, in the antinociceptive activity of dexketoprofen and meloxicam.

The antinociception was assessed, in mice, with the formalin test, measuring the licking time that each mouse made on its left hindpaw, site of the formalin injection. The two phases of the test were recorded, the first 5 minutes (algesic phase) and the latest 10 out of 30 minutes (inflammatory phase) of the test total duration. The mice were injected intraperitoneally with the non-steroidal anti-inflammatories dexketoprofen or meloxicam, 30 minutes before the administration of subcutaneous formalin. To study the participation of the nitrenergic system, the inhibitors L-NAME and 7-nitroindazole were injected intraperitoneally 45 minutes before the formalin injection.

Dose-responses curves were made from the results of each study group: dexketoprofen, meloxicam, L-NAME, 7-nitroindazole and the combinations between the antiinflammatories plus the inhibitors.

The results obtained in this study showed no significative differences in the interaction between L-NAME in relation to the antinociceptive action of both antiinflammatories and there was only one significative tendency to revert the effect of the inflammatory phase. The administration of 7-nitroindazole completely suppressed the nociceptive effect of formalin, in both phases of the test, probably due to the high dose employed (5 mg/kg). For this reason, we cannot conclude that the antinociception showed by the interaction between 7-nitroindazole and the two non-steroidal anti-inflammatory drugs, it is caused by a synergistic effect between both substances or just by the 7-nitroindazole potent action.

In conclusion, these results do not allowed us to affirm that the antinociceptive effect of dexketoprofen and meloxicam it is modulated by the nitrenergic system, using the formalin test.

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño del tejido real o potencial, o descrita en términos de tal daño” (Merskey y Bogduk, 1994). El dolor es el síntoma aislado de más frecuente consulta en los centros de salud, constituyéndose en un tema de vital importancia para todos los profesionales de la salud.

Dentro de las opciones terapéuticas para el manejo del dolor, el tratamiento farmacológico se ha establecido como un pilar fundamental. En particular, los fármacos de mayor uso son los denominados antiinflamatorios no-esteroidales, los cuales han tenido y siguen teniendo, un gran éxito tanto terapéutico como comercial en el tratamiento del dolor agudo.

Hoy en día la investigación sobre los antiinflamatorios no-esteroidales centra su objetivo en la disminución de los efectos adversos que presentan estos fármacos, es por ello que es necesario conocer en forma precisa su mecanismo de acción. El presente estudio se enmarca en esa línea, para acercarnos un poco más a las vías y mecanismos específicos, responsables de la acción antinociceptiva de los antiinflamatorios no-esteroidales, en este caso del desketoprofeno y meloxicam en su relación con el sistema nitridérgico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pregunta de Investigación

¿El mecanismo de acción de desketoprofeno y meloxicam en su efecto antinociceptivo, está mediado por el sistema nitridérgico?

Importancia y Justificación del problema en estudio

El dolor es el síntoma más frecuente en la práctica médica y el tratamiento del mismo es una de las principales razones de derivación a kinesiterapia por parte de los médicos (Crossley y cols., 2002). La prescripción de antiinflamatorios no-esteroidales, como parte del tratamiento de un cuadro doloroso agudo, es una cuestión habitual en la mayoría de los centros asistenciales del país y del mundo. En el ámbito de la kinesiterapia el conocimiento de las características farmacológicas de los antiinflamatorios no-esteroidales es de una gran importancia debido que una gran cantidad de los pacientes que se encuentran bajo tratamiento kinésico además recibe paralelamente un tratamiento médico a base de antiinflamatorios no-esteroidales (Underwood y cols.,

2006).

Hoy en día, el estudio de los antiinflamatorios no-esteroidales está concentrado en el descubrimiento de las vías y reacciones específicas que, en último término, producen sus característicos efectos farmacológicos. Las investigaciones actuales han puesto especial hincapié en prevenir las reacciones adversas del uso de estos fármacos y en ampliar su campo de acción al unirlos con otras sustancias como el óxido nítrico (Ortiz y cols., 2003. Mollace y cols., 2005).

Entre las vías que tienen relación con el mecanismo de acción de los antiinflamatorios no-esteroidales se encuentra la vía del óxido nítrico-GMP cíclico, la cual forma parte esencial del llamado sistema nitridérgico (Aguirre-Bañuelos, 2000, Duarte, 2000). La relación específica entre el sistema nitridérgico con el mecanismo de acción de los antiinflamatorios no-esteroidales dista de estar dilucidada y, de hecho, muchas de las investigaciones al respecto aún encuentran resultados que, aparentemente, pueden interpretarse como contradictorios (Clancy y cols., 2000). La presente investigación se enmarca dentro de la línea investigativa anteriormente descrita e intenta dar nuevas luces al rol que juega la relación entre el mecanismo de acción de los antiinflamatorios no-esteroidales desketoprofeno y meloxicam y el sistema nitridérgico.

MARCO TEÓRICO

Prostanoides, COXs y AINEs

Los prostanoides, que incluyen a prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), son metabolitos oxigenados de ácidos grasos de 20 carbonos poliinsaturados, incluyendo los ácidos araquidónico y eicosapentaenoico que se liberan a partir de fosfolípidos membranarios. No se almacenan, sino que son sintetizados *de novo* a partir del ácido araquidónico liberado de las membranas por las fosfolipasas (FL) cuando las células son activadas por traumatismos, citoquinas, factores de crecimiento y otros estímulos (Cha y cols., 2006).

La síntesis de prostanoides es iniciada por la limitada tasa de liberación del ácido araquidónico, generada por acción de la FLA₂, a partir de la membrana plasmática. La FLA₂, a su vez, es activada por una variedad de mediadores intercelulares e intracelulares. Luego, el ácido araquidónico se convierte en PGG₂ y después en PGH₂, por acción enzimática de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Las enzimas COXs residen en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear con su dominio catalítico específicamente orientado para recibir el ácido araquidónico liberado. La PGH₂ se sigue transformando por acción de prostaciclina sintasa, varias isomerasas y tromboxano sintasa hasta convertirse en un prostanoides (Cha y cols., 2006).

Las PGs son moduladores vitales de numerosas condiciones y procesos fisiológicos y patológicos que incluyen la citoprotección gastrointestinal, control de funciones renales, inflamación, regulación inmune, cáncer, artritis, etc. Además las PGs sensibilizan terminaciones nerviosas periféricas y nociceptores para transmitir señales nociceptivas al cerebro y a la médula espinal (Cha y cols., 2006). Las PGs son potentes agentes de sensibilización que tienen la capacidad de modular varios sitios de la vía nociceptiva, realizando la transducción (efecto de sensibilización periférico) y transmisión (efecto de sensibilización central) de la información nociceptiva. Aunque varios prostanoides muestran efectos similares, se cree que la PGE₂ es uno de los mediadores principales de la hipersensibilidad (Daher y Tonussi, 2003). La PGE₂ tiene un rol crucial como mediador de los típicos signos y síntomas de la inflamación: rubor, calor, tumor, dolor y pérdida de función. La dilatación de pequeños vasos sanguíneos inicia el desarrollo del eritema y el calor; el incremento en la permeabilidad vascular produce el característico aumento de volumen de los tejidos (Dannhardt y Kiefer, 2001).

La identificación de dos isoformas de la COX, ofreció una hipótesis simple y atractiva. Se creía que la COX-1, habiendo sido encontrada en casi todas las células, era la enzima constitutiva responsable de la producción de PGs basales, vitales en la protección estomacal, gracias a la producción de mucus y a la inhibición de la producción de ácido gástrico. En lo que respecta a la COX-2, que tiene una baja o imperceptible expresión en la mayoría de las células, pero que aumenta su concentración dramáticamente en una variedad de condiciones patológicas, se propuso que era una enzima inducible responsable de la producción "patológica" de PGs durante la inflamación y en distintos estados cancerígenos. Sin embargo, gracias a la experiencia ganada por la introducción de los inhibidores selectivos de COX-2 se demostró que los mecanismos inherentes de la hipótesis anterior eran más complicados de lo que se pensó inicialmente, puesto que cada vez se acumulaba más evidencia de que la COX-1 y COX-2 tienen papeles tanto fisiológicos como patológicos (Hinz y Brune, 2002).

La COX-3, una variante de la COX-1, fue descubierta en el 2002 y en ese momento se sugirió que esta enzima era una isoforma sensible al acetaminofeno o paracetamol y fue descrita como la llave que abriría el misterio del mecanismo de acción del acetaminofeno (Chandrasekharan, 2002). Desde aquel momento estas teorías generaron y siguen generando gran controversia, al menos hoy se sabe que, en roedores y en seres humanos, la COX-3 codifica proteínas con secuencias aminoacídicas totalmente distintas a las de la COX-1 o COX-2 y no posee actividad de COX, por lo tanto, se ha considerado improbable que, en estas especies, la COX-3 desempeñe un papel en la fiebre y el dolor mediados por PGs (Kis y cols., 2005).

Aparte de la vía de los prostanoides, el ácido araquidónico también puede servir como sustrato para la formación de los ácidos eicosanoicos, de los leucotrienos y de las lipoxinas por acción de las lipooxigenasas. Una tercera vía conduce a la producción de ácido epoxiaraquidónico, a través de la actividad catalítica de las enzimas monooxigenasas del citocromo P450. Los productos metabólicos de los tres caminos se conocen colectivamente como eicosanoides (Vanegas y Schaible, 2001).

En 1971, Vane demostró que la acción antiinflamatoria de la aspirina y otros antiinflamatorios no-esteroidales (AINEs) descansa en su habilidad para inhibir la

actividad de la enzima COX la cual, producto de esta inhibición, disminuía la síntesis de PGs pro inflamatorias las cuales, a su vez, eran causantes de la inflamación, el dolor y la fiebre (Vane, 1998). Por lo tanto, la administración de AINEs, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como artrosis o artritis reumatoide, invariablemente conlleva a una falta de PGs utilizadas en las funciones fisiológicas mencionadas anteriormente. Es así como los efectos terapéuticos y los efectos secundarios de esta clase de drogas antiinflamatorias se relacionan íntimamente con su mecanismo de acción bioquímico (Dannhardt y Kiefer, 2001).

En un comienzo, se consideraba que el principal mecanismo de acción de los AINEs estaba relacionado con su acción antiinflamatoria y se pensaba que se debía únicamente a la inhibición de la producción de PGs en el sitio de la inflamación. En 1972, Ferreira demostró que, aunque la PGE_2 por sí misma no produce dolor, su presencia es esencial en la inducción del dolor a través de histamina y bradiquinina. Estos hallazgos forman la base de la visión actual de que las PGs no son algogénicas *per se*, sino que actúan como agentes de sensibilización para realzar las propiedades nociceptivas de varios mediadores inflamatorios. Particularmente, fue demostrado que los AINEs, debido a su grupo ácido, se pueden acumular extensivamente dentro de los tejidos inflamados, donde ejercen su acción farmacológica (Smith y cols., 2000).

Sensibilización Periférica

La lesión tisular o inflamación involucra la producción y liberación de un grupo de mediadores químicos entre los que se incluyen bradiquinina, serotonina y PGs, las cuales se pueden producir localmente o desde células que infiltran el sitio de la inflamación. La mezcla de estos y otros agentes, contribuye a la producción de cambios en la permeabilidad vascular, resultando en el eritema y edema característico de la inflamación. Esta mezcla también cumple el rol de sensibilizar los nociceptores periféricos al iniciar una cascada de eventos que cambian las conductancias iónicas del nociceptor periférico terminal (Ito y cols., 2001).

Las PGs son rápidamente producidas en el sitio de la inflamación, en respuesta al estímulo y, en consecuencia, sensibiliza a los nociceptores. Se cree que las PGE_2 y PGI_2 actúan directamente sobre los terminales periféricos de los nociceptores aferentes primarios por el sistema de segundos mensajeros del AMPc, desencadenando así una hiperalgesia (Ito y cols., 2001).

La bradiquinina es uno de los más potentes algógenos, y se considera que posee un rol fundamental en la mediación de la hiperalgesia durante los procesos inflamatorios. Además, se cree que las acciones algésicas e inflamatorias de la bradiquinina dependen parcialmente de la sensibilización que realice la PGE_2 , de hecho, se ha visto que la acción de estas PGs incrementan la respuesta de los receptores polimodales ante la acción de la bradiquinina (Ito y cols., 2001).

La COX-2 es la isoforma que se expresa en mayor proporción en el tejido herido y es

una fuente primordial de prostanoïdes durante la inflamación. En modelos animales, los leucocitos polimorfonucleares, fagocitos mononucleares y fibroblastos muestran un incremento en la expresión de COX-2 y PGE₂, el prostanoïde más abundante encontrado en el tejido herido (Burian y Geisslinger, 2005).

La función de la COX-1 en la respuesta inflamatoria es explicada por los resultados experimentales que demuestran un aumento de COX-1 en monocitos circulantes en exposición a lipopolisacáridos y, una producción temprana de PGs en mastocitos estimulados. También existen resultados de estudios con ratones deficientes en la expresión de COX-1 y COX-2 que indican que la COX-1 juega un papel único en la iniciación de ciertas respuestas inflamatorias. Las dos isoformas de COX están implicadas juntas en la reacción inflamatoria y pueden contribuir a la sensibilización periférica, donde la respuesta más temprana de los prostanoïdes es dependiente de COX-1 y, a medida que la inflamación progresa, la COX-2 se transforma en fuente principal de la producción de prostanoïdes (Burian y Geisslinger, 2005).

Sensibilización Central

En contraste con lo que ocurre en la periferia las isoformas COX-1 y COX-2, se expresan en forma constitutiva en neuronas y en elementos no neuronales de secciones cervicales y lumbares de la médula espinal. La expresión de la COX-1 a nivel espinal es baja y solamente se puede encontrar en el citoplasma de las células gliales. La COX-2 parece ser la isoforma predominante y está presente en neuronas de todas las láminas, particularmente en las capas superficiales, motoneuronas y células no neuronales como los astrocitos (Willingale y cols., 1997).

Varias líneas de investigación indican que el incremento en la producción de PGE₂, en el SNC, mediado por COX-2, contribuye al grado de severidad de las respuestas inflamatorias y dolorosas en los modelos de inducción de edema por carragenina. Se ha visto que la COX-2 es rápidamente inducida en la médula espinal y otras regiones del SNC después de una inyección de carragenina en la pata de ratas (**Guay y cols., 2004**). En la médula espinal, existe una liberación basal de PGE₂, aunque su liberación también aumenta después la estimulación nociceptiva, como en pulsos eléctricos, calor doloroso, formalina subcutánea (sc) e inflamación periférica. Por otro lado, la administración intratecal de PGE₂ causa alodinia e hiperalgesia en animales conscientes (**Vasquez y cols., 2001**). Por otra parte la COX-2 en la médula espinal parece tener un papel importante en la elevación de la PGE₂ durante la inflamación periférica y es principalmente responsable de la hipersensibilidad central observada durante la inflamación. Sin embargo, esto no excluye a la COX-1 en la médula espinal siendo fuente de PGs espinales en la inflamación periférica y, de hecho, esto se ha demostrado en ratones *knockout* deficientes de COX-2 (Ballou y cols., 2000).

La inyección sc de formalina en la pata trasera de animales de laboratorio, también ha demostrado que induce una liberación de PGE₂ en el líquido cefalorraquídeo lumbar. La inyección de formalina da lugar a una fase aguda o algésica que empieza

inmediatamente después de la inyección de formalina y continúa por 10 minutos más, aproximadamente, después de los cuales la nocicepción es considerablemente reducida. La etapa temprana se debe a la excitación de las neuronas de la médula espinal producida por una descarga de impulsos aferentes que, a su vez, es consecuencia de una activación directa de los nociceptores por parte de la formalina. La etapa tardía o inflamatoria se destaca por la reaparición de los comportamientos relacionados con moderados a altos niveles de dolor y empieza 10 a 15 minutos después de la inyección de formalina. Esta última etapa se debe al efecto de impulsos aferentes persistentes sobre las neuronas espinales que para ese momento se encuentran en un estado de hiperexcitabilidad debido a la liberación de mediadores neuroactivos, y de este modo es tomada como un modelo de sensibilización central (Morrow y cols., 1998).

Efectos antihiperalgésicos centrales y periféricos de los AINEs

La inhibición que ejercen los AINEs en la biosíntesis de PGs genera una variedad de efectos sobre las COX incluyendo la inactivación irreversible de las COX y la inhibición competitiva reversible de las COX. Tradicionalmente se creía que era esta inhibición en los tejidos periféricos la responsable de la acción antiinflamatoria y analgésica de los AINEs. Sin embargo, datos de experimentación animal sugieren que la inhibición de las PGs sintetizadas localmente, por sí sola, no explica satisfactoriamente el espectro completo de la eficacia de los AINEs y, por lo tanto, la inhibición de la producción central de PGs también puede desempeñar un papel en el efecto de estos fármacos (Burian y cols., 2003).

Cuando ocurre un daño celular, se genera una liberación de los productos de las vías de la COX y de la lipoxigenasa dando como resultado la síntesis y liberación de PGs y leucotrienos. Las PGs sensibilizan las neuronas aferentes (nociceptores) a estímulos dolorosos como químicos, calor, y presión mecánica. Las PGs y los leucotrienos no activan los nociceptores directamente, sino que trabajan con la activación del AMPc y/o la activación de los productos de los polimorfonucleares (Mehlich y cols., 1999).

La existencia de un componente central en la acción nociceptiva de los AINEs se postuló hacia fines de los 70's. Sin embargo, aún no existen definiciones precisas respecto de este mecanismo de acción. La cuantificación de la disociación entre los efectos antiinflamatorios y antinociceptivos de los AINEs ha servido para probar la existencia de los efectos centrales. Es más, se ha descubierto que los AINEs ketoprofeno, ketorolaco y bromfenaco tienen grandes índices de disociación, lo que sugiere que la contribución de los mecanismos de acción antinociceptivos no periféricos, en la acción de estos fármacos, puede tener una gran relevancia (Burian y Geisslinger, 2005).

Desketoprofeno

El desketoprofeno, enantiómero activo del compuesto racémico ketoprofeno, es un AINE de la familia de los arilpropiónicos. El desketoprofeno actúa a través de una inhibición no selectiva de la COX, disminuyendo así la síntesis de PG. El inicio muy rápido de la acción, comparado con el ketoprofeno, sugiere que el desketoprofeno es más apropiado para el tratamiento del dolor agudo. Se ha demostrado que la acción del S-isómero del ketoprofeno es cerca de 3000 veces más potente que el R-isómero (Ghezzi y cols., 1998). La formulación de la droga como un isómero único tiene muchas ventajas potenciales, incluyendo la posibilidad de aumentar el índice terapéutico y de simplificar el perfil farmacocinético. El uso del enantiómero activo aislado permite una reducción en la dosificación del 50%. Esto puede reducir las reacciones adversas al disminuir la carga metabólica y renal (García Rodríguez y cols., 1994).

El desketoprofeno es un eficaz analgésico en el tratamiento del dolor suave a moderado, con un perfil clínico similar a otros analgésicos orales comúnmente disponibles. Produce una reducción marcada en los requerimientos postoperatorios de opioides cuando es utilizado como parte de un régimen analgésico equilibrado, de ese modo disminuye potenciales efectos secundarios inducidos por los opioides (Iohom y cols., 2002).

En lo que se refiere a los efectos centrales del desketoprofeno, también se ha demostrado que este AINE tiene la capacidad de inhibir la síntesis de PGs a nivel central, aunque se cree que es su interacción con el sistema serotoninérgico la que explica la mayor eficacia de este fármaco con respecto a otros AINEs (Díaz-Reval y cols., 2004). Además, se ha visto que en ratas normales (sin inflamación periférica), estimuladas eléctrica y mecánicamente, disminuye el reflejo nociceptivo de retirada y el fenómeno de *wind-up* (Mazario y cols., 1999).

Meloxicam

El meloxicam es un AINE del grupo de los oxicam, inhibidor potente de la COX, y que ejerce una inhibición más selectiva para COX-2 que para COX-1. Se ha sugerido que la inhibición de la COX-1 depende de la dosis y de la variación interindividual de los niveles de la droga. Se utiliza para tratar la artritis reumatoide, la artrosis y otras enfermedades comunes (Jackson y cols., 2003). Además de su función principal como fármaco antiinflamatorio, también está emergiendo como agente útil en la enfermedad de Alzheimer y el tratamiento del cáncer (principalmente colorectal y adenocarcinoma). Entre las ventajas que ofrece el meloxicam por sobre otros AINEs podemos encontrar: a) menos irritación del tejido gastrointestinal y local (cutáneo, rectal y ocular), aunque el meloxicam se absorbe principalmente en el duodeno (absorción intestinal); y b) pocos

efectos secundarios renales con respecto a otros AINEs (Nassab y cols., 2006).

Evidencia anterior ha demostrado que la actividad antinociceptiva del meloxicam observada después de su administración sistémica se debe principalmente a una acción periférica en o cerca de los terminales del nociceptor, aunque también se ha sugerido una acción espinal (Ortiz y cols., 2005).

Algunos informes sugieren que la liberación de acetilcolina en la médula espinal podría estar implicada en el mecanismo de acción del meloxicam. El meloxicam reduce en la retina el factor de necrosis tumoral y reduce los niveles endoteliales de óxido nítrico sintasa (NOS). También se ha demostrado la implicancia de la vía del óxido nítrico-GMP cíclico (NO-GMPc) en el efecto antinociceptivo periférico producido por el meloxicam en el test de la formalina en ratas. Se ha sugerido que el efecto antinociceptivo periférico del meloxicam se debe, al menos en parte, a la modulación de los canales de K⁺ en la vía del NO-GMPc (Ortiz y cols., 2005).

El Sistema Nitridérgico

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular, entrega el principio de una directa vasodilatación. El agente que desencadena este proceso es conocido como el factor de relajación derivado del endotelio. Luego se identificó que este factor influía sobre el tono vascular y también en el flujo sanguíneo cerebral, y junto con esto, que este factor poseía las mismas características funcionales que el óxido nítrico (NO) (Rodrigo y cols., 2000).

El NO es un gas estable altamente difusible, compuesto de un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno, que se sintetiza en las células del organismo a partir del aminoácido L-arginina y participa como neurotransmisor (NT) en el SNC y sistema nervioso periférico otorgando así una acción neuromoduladora (Esplugues, 2002).

Es sintetizado mediante una familia de enzimas llamadas colectivamente óxido nítrico sintasas, de las cuales se han identificado tres isoformas (Thomas y Ramwell, 2005):

- La isoforma purificada y clonada en las neuronas (nNOS) productora de un NO que es NT, se encuentra también expresada en el músculo esquelético, en los neutrófilos, en los islotes pancreáticos, en los endotelios y epitelios del aparato respiratorio, y en las vísceras del tracto gastrointestinal.
- La isoforma endotelial (eNOS) purificada y clonada en las células endoteliales también puede expresarse en ciertas poblaciones neuronales del cerebro y en las plaquetas. Está implicada en la regulación de la hemostasia vascular.
- La isoforma inducible (iNOS) purificada por primera vez en los macrófagos, su expresión ha podido ser observada en células de diversos tipos, tales como las células musculares lisas y las células endoteliales y en un pequeño número de neuronas situadas en el hilio del hipocampo, en el cerebelo, corteza y otras áreas del

cerebro de ratas adultas normales (Rodrigo y cols., 2000).

Regulación

Las isoformas nNOS y eNOS, que son las que nos interesan para esta investigación, se expresan de forma constitutiva en respuesta a diversos estímulos y producen pequeñas cantidades de NO. Dichas isoformas son calcio/calmodulina dependientes, se encuentran en el citosol y sólo producen cantidades importantes de NO al ser activadas por una elevación del calcio intracelular, a diferencia de la iNOS que es independiente del Ca^{2+} , por lo tanto, la separación del Ca^{2+} con la calmodulina inactiva a la nNOS (Vila, 2000).

Mecanismo de Acción

Como el NO no se almacena, sino que se sintetiza en respuesta a estímulos, se difunde a través de las membranas biológicas donde reacciona con metales de transición, grupos tiol y amina, oxígeno, súper óxido y otros radicales libres, que son sustancias blancos.

La liberación de NO también se produce por la acción de algunas sustancias como angiotensina II, acetilcolina, bradiquinina, histamina y serotonina, nitrovasodilatadores, nitroglicerina y nitratos, además a causa de hipoxia, noradrenalina y ácidos grasos insaturados. En cambio otras sustancias inhiben su síntesis, como: azul de metileno, AINEs, glucocorticoides y la N-monometil-L-arginina, los radicales libres del oxígeno y peróxidos lipoides. (Molina y Salazar, 2000)

El NO ejerce sus efectos citotóxicos debido a la reacción con enzimas que contienen hierro, y una rápida combinación del NO con el oxígeno, produciendo radicales libres. Por este motivo, puede inhibir los mecanismos de respiración oxidativa intracelular y disminuir el consumo de oxígeno al lesionar la cadena respiratoria mitocondrial (Rodríguez y Delfín, 2004).

Asimismo el NO interviene en el efecto de varios NTs como son la acetilcolina, noradrenalina, dopamina, glutamato, GABA, serotonina, ATP, monóxido de carbono, opioides y endotelina, influencia que no está del todo dilucidada (Esplugues, 2002).

NO y SNC

El NO posee una función importante en el SNC, como NT y modulador de ligandos unidos a receptores. Las posibles células blanco del NO en el SNC incluyen las terminaciones nerviosas presinápticas y postsinápticas. El NO modifica la liberación del NT en diferentes áreas del cerebro, la liberación postsináptica de NO después de la activación

del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) puede iniciar la liberación presináptica de glutamato (Thomas y Ramwell, 2005).

Se propuso que el NO produce una rápida difusión al terminal nervioso presináptico donde la guanidil ciclasa se activa produciendo GMPc y así facilita la liberación del NT. El NO fue el primer mensajero intercelular comprobado que elevaba los niveles de GMPc y que continuaba con la activación de los receptores de glutamato.

En cuanto a la percepción del dolor, el NO está implicado tanto en las vías periféricas y centrales. Los reflejos nociceptivos involucran la interacción del NO con los receptores NMDA y establecen que la síntesis de NO eleva la facilitación espinal de los *inputs* aferentes en vista de los comportamientos presentados a modo de respuesta. La inhibición del NO tiene un efecto antinociceptivo cuando se estimulan los terminales nerviosos periféricos químicos, en modelos de hiperalgesia. A diferencia, el bloqueo de la síntesis de NO exacerba el dolor en problemas de hiperalgesia mecánica (Esplugues, 2002).

Acciones Fisiopatológicas

El NO participa en la regulación de ciertas funciones hemostáticas y a grandes concentraciones se comporta como un elemento de daño tisular o un agente de la defensa inmunitaria frente a microorganismos (Esplugues, 2003).

Vasculares: El NO es el responsable de que el tono basal del aparato circulatorio sea la vasodilatación, debido a su efecto dilatador por relajación de la fibra muscular lisa vascular, y también inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria a través de activación de la guanilato ciclasa soluble, formando GMPc (Rodríguez y Delfín, 2004).

Neurotransmisión: La actividad de la isoforma nNOS está incrementada postsinápticamente por la acción estimuladora de ciertos aminoácidos tales como el glutamato. Existen evidencias indirectas de que todo este mecanismo es dependiente de glutamato, el cual tras ser liberado en el espacio intersináptico, actúa sobre específicos subtipos del receptor NMDA (Rodrigo y cols., 2000).

Acción inmunitaria: Interviene como un componente de la respuesta inmunitaria específica, frente a una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos, etc. El NO es mediador de los mecanismos de defensa del huésped, los macrófagos son activados formando citrulina y NO y esto se asocia con un incremento de la citotoxicidad de estas células (Rodríguez y Delfín, 2004).

Otros: Uno de los mecanismos de inhibición del NO son los radicales libres del oxígeno, los cuales según múltiples estudios, están sumidos en muchas patologías neurales: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, ataques cerebrales, pérdida neuronal durante la isquemia cerebral y otros trastornos del sistema nervioso (Sánchez y cols., 2004).

En el síndrome de distress respiratorio agudo la hipoxemia mantenida, causante del

daño endotelial y con esto alteración de la producción, vida media y efecto del NO, provoca vasoconstricción y consecuentemente hipertensión pulmonar (Rodríguez y Delfín, 2004).

Intervención con inhibidores

La síntesis excesiva de NO, hace necesario inhibir su producción con inhibidores de la NOS, o en otros casos se utilizan fármacos donantes que aumentan la concentración de NO en los tejidos biológicos estimulados (Esplugues, 2003). Los más importantes han sido los inhibidores de NOS (Thomas y Ramwell, 2005).

Inhibidores de la NOS

Los primeros inhibidores de la NOS compartían una característica común: la no selectividad respecto de la fuente del NO, es decir, de las distintas isoformas de NOS. Debido a que la L-arginina fue identificada como el sustrato natural necesario para la síntesis de NO, varios análogos derivados de la L-arginina fueron sintetizados y caracterizados como inhibidores competitivos de la NOS, entre ellos se encuentra el N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) (Muscará y Wallace, 1999). Subsecuentemente, aparecieron otros inhibidores de NOS con efectos más específicos, es decir, sobre una isoforma particular de la NOS, en esta categoría se encuentra el 7-nitroindazol, el cual inhibe a la NOS neuronal (nNOS).

L-NAME

La inhibición de la óxido nítrico sintasa puede realizarse mediante sustancias análogas a la L-Arginina como lo es el L-NAME que *in vitro* inhibe preferentemente la síntesis de NO para la isoforma eNOS y la isoforma nNOS (Rodrigo y cols., 2000). Es generalmente aceptado que la administración intraperitoneal (ip) de L-NAME no ejerce una gran influencia en la fase algésica provocada por la formalina, aunque en la segunda fase del test (inflamatoria) demuestra un efecto inhibitorio cuando se administra previo al tratamiento nociceptivo en ratones (Duarte y Ferreira, 2000).

7-nitroindazol

Se ha demostrado que los derivados del indazol, especialmente el 7-nitroindazol (7-NI), son potentes inhibidores de la NOS. El 7-NI es más selectivo para la nNOS que los inhibidores metélicos o con base de nitro-arginina, y la administración de este agente del indazol a animales de experimentación inhibe la nNOS, sin cambios en la presión arterial o en la relajación dependiente del endotelio. Por otra parte, el 7-NI se ha utilizado como bloqueador eficaz de la NOS en diversos escenarios experimentales, incluyendo estudios de función renal, aprendizaje o de erección peniana (Wangenstein y cols., 2006).

Relación entre Sistema Nitridérgico, PGs y COXs

También existe evidencia de que existen mecanismos de acción de los AINEs, relativos a sus efectos antinociceptivos, independientes de la vía de las PGs (Ortiz y cols., 2003). Se ha propuesto que el GMPc está involucrado en la antinocicepción. Esta propuesta se basó en la observación que la administración local de L-arginina produce antinocicepción en ratones en un modelo de hiperalgesia inducida por carragenina y esta nocicepción es bloqueada por inhibidores de NO y azul de metileno (inhibidor de guanidil ciclasa). En modelos de hiperalgesia producida por PGs y carragenina, la administración local de donantes no enzimáticos de NO y opiáceos, también produjo antinocicepción, la cual, fue inhibida, en ambos casos, por azul de metileno, la antinocicepción también fue inhibida por inhibidores de NOS, aunque sólo en el caso de la morfina (Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 2000). En 1994, Tonussi y Ferreira, a partir de sus trabajos con diclofenaco e indometacina, propusieron la participación de la vía NO-GMPc en la desensibilización de nociceptores. Observaciones ulteriores sugieren que esta vía también participa en la acción antinociceptiva periférica de varios otros AINEs, tales como meloxicam, ketorolaco, nimesulide, metamizol, parecoxib y rofecoxib (Ortiz y cols., 2003).

Distintos trabajos han mostrado que el NO aumenta la síntesis de PGs y a partir de aquello se ha sugerido que los metabolitos de la NOS activan directamente a la COX. Por otro lado, se ha visto experimentalmente que las PGs influyen la inducción de NOS. Estas observaciones implican que existe una cercana relación entre la COX y la NOS, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y que el sinergismo que se da en ciertas condiciones, por ejemplo, ante un proceso patológico, puede tener importantes consecuencias (González y cols., 2001).

Sobre la interacción entre la COX y el NO se han realizado numerosos estudios, sin embargo los resultados encontrados han sido contradictorios. Algunos estudios indican que el NO estimula la síntesis de PGs por la COX, mientras que otros observan inhibición de la enzima ante el NO. Algunos autores sugieren que estos resultados se deben a que el NO sólo actúa como un precursor de otras sustancias que sí tienen una relación directa con la COX (Goodwin y cols., 1999). Estudios posteriores han demostrado que la exposición de distintas líneas celulares a NO producen una activación de la COX-1 y una inhibición de la COX-2, por lo tanto, se propuso que los contradictorios resultados anteriormente vistos podrían deberse a que en los diferentes estudios el NO afectaba a distintas isoformas de la COX (Clancy y cols., 2000). Recientemente, otras investigaciones han propuesto que el efecto final de la actividad moduladora del NO en las COXs no es único, puesto que el NO endógeno, así como dadores de NO, inician y detienen la vía de las COXs, dependiendo de los niveles basales de NO liberado, de los tipos celulares en los cuales se produce la biosíntesis de PGs y de la intensidad del estímulo utilizado para liberar las PGs. Además el NO se conjuga con aniones súper óxido, lo que lleva a la formación de peroxinitritos, los cuales modulan a las COX (Mollace y cols., 2005).

Con todos estos antecedentes, quisimos estudiar la posible modulación en el efecto antinociceptivo de dos AINEs característicos: desketoprofeno, por su marcada acción analgésica que tiene en clínica, y el meloxicam, molécula que actúa sobre las dos isoformas de la COX, pero con una mayor acción sobre la COX-2 y con una clara acción más antiinflamatoria en su accionar clínico, y su posible modulación nitridérgica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la actividad antinociceptiva de meloxicam y desketoprofeno es mediada a través del sistema nitridérgico, por acción de los inhibidores de óxido nítrico sintasa, en el ensayo experimental de la formalina.

Objetivos específicos

- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración ip de desketoprofeno y meloxicam en el test de la formalina.
- Estudiar la participación del sistema nitridérgico, utilizando inhibidores de la oxido nítrico sintasa, en el efecto antinociceptivo de desketoprofeno y meloxicam, utilizando el test de la formalina.

HIPÓTESIS

La acción antinociceptiva de los antiinflamatorios no-esteroidales está modulada por los inhibidores de la oxido nítrico sintasa, en ratones.

VARIABLES

Inhibidores de NOS

Definición conceptual: interacción que producen los inhibidores de NOS, L-NAME y 7-nitroindazol, en el efecto antinociceptivo de desketoprofeno y meloxicam.

Definición operacional: se definirá a través del análisis de las curvas dosis-respuesta de las drogas administradas por vía ip.

Efecto Antinociceptivo

Definición conceptual: Esta variable es producto del mecanismo de acción de los AINEs y se define como la disminución de la actividad dolorosa, inducida al animal a través de la administración sc de formalina.

Definición operacional: El efecto antinociceptivo se evaluará como cambios en el tiempo promedio de lamidos de cada grupo, utilizando el test algesiométrico de la formalina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de cepa CF/1 (*Mus musculus*), de género masculino, con un peso entre 28 y 30 gramos y sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h. Los ratones fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio dos horas antes del comienzo de la experimentación, teniendo libre acceso a comida y agua durante ese lapso de tiempo. Cada animal sólo recibió una dosis de las drogas en estudio. Al final de cada medición los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. El ensayo experimental se realizó en base al protocolo aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Medición de la actividad antinociceptiva

La antinocicepción se evaluó con el test de la formalina (Capone y Aloisi, 2004). Los ratones fueron aclimatados al ambiente del laboratorio 120 minutos antes de la hora de inicio de la experimentación. Los ratones se colocaron durante 30 minutos dentro de los

cilindros de observación de Plexiglás que se utilizaron en el experimento, con el fin de permitir el acostumbramiento de los mismos a su nuevo ambiente, concluidos los 30 minutos se sacaron de los cilindros para administrarles la formalina. Los ratones fueron inyectados en la pata trasera izquierda con 20 µl de formalina diluida al 5%, usando una jeringa Hamilton de 50 µl y una aguja estéril de 27 gauges. Después de la inyección con formalina se colocaron nuevamente a los animales dentro del cilindro para iniciar la observación. Detrás de cada cilindro de observación, se dispuso de un espejo en 90°, el cual permite la observación de la pata izquierda del ratón desde todos los ángulos posibles. El comportamiento nociceptivo de los ratones fue observado inmediatamente después de la administración de formalina.

El comportamiento nociceptivo será definido como el tiempo de lamido de los ratones, en la zona sin pelo de su pata trasera izquierda durante la fase algésica e inflamatoria. El comportamiento nociceptivo inducido por la formalina sc es bifásico. La primera fase, aguda o algésica, corresponde a los 5 minutos inmediatamente posteriores a la inyección con formalina; la segunda fase, tardía o inflamatoria, tiene lugar 15 minutos después de terminada la fase algésica, entre los 20 y los 30 minutos posteriores a la inyección. No se contabiliza el tiempo entre la fase algésica y la fase inflamatoria, debido a que el ratón se encuentra en una etapa de quietud. El comportamiento nociceptivo fue registrado con cronómetros digitales.

Diseño de Investigación

La investigación de este trabajo es de tipo experimental “verdadera” con posprueba únicamente y grupo de control (Hernández y cols., 2003). Las observaciones se realizaron en forma aleatoria y ciega simple (sin conocimiento del tratamiento suministrado). La selección de los animales se realizó por muestreo aleatorio simple procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

En cada grupo control se utilizó 6 ratones y en el resto de los grupos se utilizaron 6 ratones por cada dosis de AINE, completando un tamaño muestral de 162 ratones. El total de 9 grupos, con sus respectivas dosis de fármacos, se describen a continuación:

- Grupo control salino: los ratones fueron inyectados por vía ip con solución salina al 0.9% (el grupo control de suero fisiológico es del tipo control positivo, pues se espera que el tiempo de lamido sea mayor que lo obtenido cuando se administran los diversos fármacos de este estudio).
- Grupo control L-NAME: los ratones fueron inyectados con L-NAME por vía ip (5 mg/Kg). La administración del fármaco fue realizada 45 antes de aplicar el test.
- Grupo control 7-NI: los ratones fueron inyectados con 7-NI por vía ip (5 mg/Kg). La administración del fármaco fue realizada 45 antes de aplicar el test.
- Grupo desketoprofeno: los ratones fueron inyectados con desketoprofeno por vía ip con dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg. La administración de este AINE fue realizada 30

minutos antes de aplicar el test.

- Grupo desketoprofeno/L-NAME: los ratones fueron inyectados por vía ip con L-NAME, 5 mg/kg, 15 minutos antes de la administración de desketoprofeno 3, 10, 30 y 100 mg/kg vía ip, esperando 30 minutos antes de aplicar la formalina.
- Grupo desketoprofeno/7-NI: los ratones fueron inyectados por vía ip con 7-nitroindazol, 5 mg/kg, 15 minutos antes de la administración de desketoprofeno 3, 10, 30 y 100 mg/kg vía ip, esperando 30 minutos antes de aplicar la formalina.
- Grupo meloxicam: los ratones fueron inyectados con meloxicam por vía ip con dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg. La administración de este AINE fue realizada 30 minutos antes de aplicar el test.
- Grupo meloxicam/L-NAME: los ratones fueron inyectados por vía ip con L-NAME, 5 mg/kg, 15 minutos antes de la administración de meloxicam 3, 10, 30 y 100 mg/kg vía ip, esperando 30 minutos antes de aplicar la formalina.
- Grupo meloxicam/7-NI: los ratones fueron inyectados por vía ip con 7-NI, 5 mg/kg, 15 minutos antes de la administración de meloxicam 3, 10, 30 y 100 mg/kg vía ip, esperando 30 minutos antes de aplicar la formalina.

Análisis de datos y estadísticas

Los resultados obtenidos se presentan como promedio \pm M.S.E. (*mean square error*). Para cuantificar el efecto de los fármacos, se comparó el efecto de cada AINE antes y después de la administración del L-NAME y 7-NI a través de curvas dosis-respuesta. El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de un análisis de varianza (ANOVA) y test t de Student. El nivel de significancia se fijó en 5 %.

RESULTADOS

Los siguientes resultados se presentarán a través de una tabla con los resultados más detallados (ver TABLA 2).

· **Resultados Grupo Control Salino**

En este grupo control se obtuvo, en la primera fase (0 a 5 minutos), un tiempo promedio de lamidos de $139,71 \pm 5.60$ segundos. En la segunda fase (20 a 30 minutos) se obtuvo un promedio de lamidos de 169 ± 6.01 segundos.

· **Resultados Grupo Control L-NAME**

En este grupo durante la primera fase se registró un tiempo promedio de lamidos de 113.50 ± 15.41 segundos (NS) y durante la segunda fase un tiempo promedio de lamidos de 94.00 ± 12.91 segundos ($p < 0.05$).

· **Resultados Grupo Control 7-NI**

En este grupo durante la primera fase se registró un tiempo promedio de lamidos de 1.67 ± 1.09 segundos ($p < 0.05$) y durante la segunda fase un tiempo promedio de lamidos de 0.0 ± 0.0 segundos ($p < 0.05$).

· **Resultados Grupo Desketoprofeno**

En la dosis de 3 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de

116.2 ± 7.98 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 153.2 ± 27.0 segundos (NS).

En la dosis de 10 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 65.2 ± 11.49 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 134 ± 15.50 segundos (NS).

En la dosis de 30 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 52.3 ± 10.40 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 121.3 ± 12.10 segundos (p<0.05).

En la dosis de 100 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 30.67 ± 7.90 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 60.67 ± 18.30 segundos (p<0.05).

Resultados Grupo Desketoprofeno/L-NAME

En este grupo se inyectó previamente una dosis de 5 mg/kg de L-NAME.

En la dosis de 3 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 72.00 ± 11.67 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 21.67 ± 15.21 segundos (p<0.05).

En la dosis de 10 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 70 ± 11.35 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 23.55 ± 13.71 segundos (p<0.05).

En la dosis de 30 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 63.83 ± 5.87 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 28.33 ± 12.34 segundos (p<0.05).

En la dosis de 100 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 59.60 ± 12.44 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 19.40 ± 8.71 segundos (p<0.05).

Resultados Grupo Desketoprofeno/7-NI

En este grupo se inyectó previamente una dosis de 5 mg/kg de 7-nitroindazol.

En la dosis de 3 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 18.17 ± 7.75 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 3.00 ± 3.00 segundos (p<0.05).

En la dosis de 10 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 13.80 ± 9.92 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 7.40 ± 7.40 segundos (p<0.05).

En la dosis de 30 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 12.08 ± 6.66 segundos (p<0.05) y en la segunda fase fue de 10.00 ± 10.00 segundos (p<0.05).

En la dosis de 100 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 10.00 ± 4.20 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 0.88 ± 0.88 segundos (p<0.05).

Resultados Grupo Meloxicam

En la dosis de 3 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 125.17 ± 13.83 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 135.33 ± 11.60 segundos (NS).

En la dosis de 10 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 97 ± 8.86 segundos ($p < 0.05$) y en la segunda fase fue de 132 ± 25.90 segundos (NS).

En la dosis de 30 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 72.83 ± 16.26 segundos ($p < 0.05$) y en la segunda fase fue de 71.33 ± 11.22 segundos ($p < 0.05$).

En la dosis de 100 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 18 ± 7.81 segundos ($p < 0.05$) y en la segunda fase fue de 5 ± 0.70 segundos ($p < 0.05$).

Resultados Grupo Meloxicam/L-NAME

En este grupo se inyectó previamente una dosis de 5 mg/kg de L-NAME.

En la dosis de 3 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la fue de 74.83 ± 11.18 segundos ($p < 0.05$) y en la segunda fase fue de 40.40 ± 13.62 segundos ($p < 0.05$).

En la dosis de 10 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 68.80 ± 8.70 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 11.83 ± 7.87 segundos ($p < 0.05$).

En la dosis de 30 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 65.00 ± 12.51 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 11.60 ± 7.11 segundos ($p < 0.05$).

En la dosis de 100 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 3.50 ± 2.20 segundos (NS) y en la segunda fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos ($p < 0.05$).

Resultados Grupo Meloxicam/7-NI

En este grupo se inyectó previamente una dosis de 5 mg/kg de 7-nitroindazol.

En la dosis de 3 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos y en la segunda fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos.

En la dosis de 10 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos y en la segunda fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos.

En la dosis de 30 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos y en la segunda fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos.

En la dosis de 100 mg/kg, el tiempo promedio de lamidos durante la primera fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos y en la segunda fase fue de 0.0 ± 0.0 segundos.

Todos los resultados no fueron significativos al compararlos al antagonista 7-NI.

DISCUSIÓN

Las PGs son potentes agentes de sensibilización que tienen la capacidad de modular varios sitios de la vía nociceptiva, realizando la transducción (efecto de sensibilización periférico) y transmisión (efecto de sensibilización central) de la información nociceptiva. Esto forma la base de la visión actual de que las PGs no son algogénicas *per se*, sino que actúan como agentes de sensibilización para realzar las propiedades nociceptivas de varios mediadores inflamatorios. Los AINEs ejercen sus efectos farmacológicos por la inhibición de las PG, a nivel de las diversas isoformas que tiene la COX. Tanto la COX-1 como la COX-2, están implicadas juntas en la reacción inflamatoria y pueden contribuir a la sensibilización periférica, donde la respuesta más temprana es dependiente de COX-1 y, a medida que la inflamación progresa, la COX-2 se transforma en fuente principal de la producción de PG (Burian y Geisslinger, 2005).

El comportamiento de los AINEs estudiados, desketoprofeno y meloxicam, demostraron por la curva dosis-respuesta obtenida, su claro efecto antinociceptivo en el test algesiométrico de la formalina, hecho que confirma un sinnúmero de estudios al respecto. Cabe hacer notar que a dosis equimolares, la acción antinociceptiva del meloxicam es casi el doble de efectiva que la acción del desketoprofeno. Esta diferencia en efectividad antinociceptiva, se explica en parte por su acción más selectiva a nivel de la isoforma COX-2, frente a una noxa de tipo inflamatorio, como sería el caso de la sustancia algógena utilizada en este test algesiométrico. Se ha visto que la COX-2 es rápidamente inducida en la médula espinal y otras regiones del SNC después de una inyección de carragenina en la pata de ratas (**Guay y cols., 2004**). En la médula espinal, existe una liberación basal de PGE₂, aunque su liberación también aumenta después la

estimulación nociceptiva, como en pulsos eléctricos, calor doloroso, formalina sc e inflamación periférica, lo que vendría a corroborar la acción más efectiva del meloxicam en este estudio.

Por otro lado, es sabido que el óxido nítrico que se sintetiza por tres isoformas NOS con funciones y ubicaciones diferentes, está implicado tanto en las vías periféricas y centrales del dolor. Los reflejos nociceptivos involucran la interacción del NO con los receptores NMDA y establecen que la síntesis de NO eleva la facilitación espinal de los input aferentes en vista de los comportamientos presentados a modo de respuesta. La inhibición del NO tiene un efecto antinociceptivo cuando se estimulan los terminales nerviosos periféricos químicos, en modelos de hiperalgesia. A diferencia, el bloqueo de la síntesis de NO exacerba el dolor en problemas de hiperalgesia mecánica (Esplugues, 2002).

Al utilizar L-NAME, un inhibidor no específico de la NOS, en el test de la formalina, no produjo un efecto antinociceptivo, pese a que el test usa un estímulo químico periférico (formalina) y sólo logra un cambio significativo en la fase inflamatoria del test, revirtiendo el efecto algésico.

Con respecto a la interacción de L-NAME con los AINEs, no se obtuvo ningún cambio significativo, ni antagonismo ni sinergismo, en la acción antinociceptiva de ambos AINEs, y una tendencia significativa a revertir el efecto de la fase inflamatoria en el accionar tanto del meloxicam como del desketoprofeno, de lo cual se deduce que la inhibición no selectiva no induce cambios en el mecanismo de acción de los AINEs en estudio.

El 7-NI es un potente inhibidor más selectivo para la nNOS, acción ejercida sobre la NOS cerebral y sin afectar las otras dos isoformas periféricas (Wangensteen y cols., 2006). Por otra parte la interacción entre COX y NO ha sido estudiada en numerosos trabajos, muchos de los cuales con resultados contradictorios. Algunos estudios indican que el NO estimula la síntesis de PGs por la COX, mientras que otros observan inhibición de la enzima ante el NO (Goodwin y cols., 1999). Otros estudios han demostrado que la exposición a NO producen una activación de la COX-1 y una inhibición de la COX-2, explicando los resultados contradictorios de la literatura, a que el NO afectaba a distintas isoformas de la COX (Clancy y cols., 2000).

Los resultados obtenidos con 7-NI suprimieron por completo la respuesta nociceptiva de formalina, tanto en la fase algésica, como en la fase inflamatoria, resultado que está en concordancia con la acción del NO en la respuesta hiperalgésica visceral y en estímulos periféricos químicos y con la dosis empleada (5 mg/kg) que, por otro lado, resultó ser muy potente. Por esta misma razón, la interacción entre este inhibidor de la NOS central con los AINEs en estudio, no se puede concluir que la antinocicepción es debido a la sinergia entre ambas sustancias o solamente a la acción potente del 7-NI, sinergia que fue más marcada con el meloxicam, llevando los valores prácticamente a un tiempo de lamido igual a cero.

Aunque los resultados obtenidos en nuestro estudio no son categóricos para poder afirmar que el sistema nitridérgico modula el efecto antinociceptivo de los AINEs en estudio, desketoprofeno y meloxicam, tampoco lo son en postular que el NO no participa

modulando la acción de las PGs en el mecanismo de acción antinociceptivo de dichos AINEs. Recientemente, investigadores han propuesto que el efecto final de la actividad moduladora del NO en las COXs no es único, puesto que el NO endógeno, así como dadores de NO, inician y detienen la vía de las COXs, dependiendo de los niveles basales de NO liberado, de los tipos celulares en los cuales se produce la biosíntesis de PGs y de la intensidad del estímulo utilizado para liberar las PGs (Mollace y cols., 2005).

Por otra parte es sabido que, según el test algesiométrico empleado, no siempre los resultados van en un mismo sentido, ya que las noxas son diferentes: químicas, en el caso de la formalina o del test de la carragenina, físicas, como el calor en el test de la cola del ratón, o en el test de la plancha caliente; por esta razón, es necesario corroborar los resultados obtenidos en este estudio realizando el mismo protocolo de investigación, pero con otro método algesiométrico.

CONCLUSIÓN

- Desketoprofeno y meloxicam son fármacos que poseen actividad antinociceptiva al ser administrados por vía ip lo que demuestra una acción segmentaria.
- El efecto antinociceptivo de desketoprofeno y meloxicam, es del tipo dosis-dependiente en el test de la formalina.
- En el efecto antinociceptivo de desketoprofeno y meloxicam no es posible demostrar la acción neuromoduladora nitridérgica empleando el test de la formalina.

PROYECCIONES

- Estudiar la posible interacción utilizando un antiinflamatorio no-esteroidal inhibidor específico de COX-3, para ver si existe relación en la modulación del dolor con L-NAME y con 7-nitroindazol, en el test de la formalina.
- Utilizar fármacos inhibidores de COX-1, COX-2 o COX-3, pero con diferentes ensayos algesiométricos y así conocer si tienen alguna relación con el sistema nitridérgico, utilizando inhibidores de óxido nítrico sintasa no selectivos y selectivos. Luego, los resultados entre cada test se pueden comparar para conocer la especificidad de cada uno de ellos.
- Utilizar el mismo protocolo de investigación empleado en este estudio y aplicarlo a otros tests algesiométricos que utilicen noxas diferentes, tanto químicas como físicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Bañuelos, P., y V. Granados-Soto. 2000. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *European Journal of Pharmacology* 395:9-13.
- Ballou, L.R., R.M. Botting, S. Goorha, J. Zhang, y J.R. Vane. 2000. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 97(18):10272-10276.
- Burian, M., I. Tegeder, M. Seegel, y G. Geisslinger. 2003. Peripheral and central antihyperalgesic effects of diclofenac in a model of human inflammatory pain. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 74:113-20.
- Burian, M., y G. Geisslinger. 2005. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology & Therapeutics* 107(2):139-154.
- Capone, F., y A.M. Aloisi. 2004. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Annali dell Istituto Superiore di Sanità* 40(2):223-229.
- Cha, Y.I., L. Solnica-Krezel, y R.N. DuBois. 2006. Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Developmental Biology* 289:263-272.
- Chandrasekharan, N.V., H. Dai, K. Lamar Turepu Roos, N.K. Evanson, J. Tomsik, T.S. Elton, y D.L. Simmons. 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*

99:13926-13931.

Clancy, R., B. Varenika, W. Huang, L. Ballou, M. Attur, A.R. Amin, y S.B. Abramson. 2000. Nitric Oxide Synthase/COX Cross-Talk: Nitric Oxide Activates COX-1 But Inhibits COX-2-Derived Prostaglandin Production. *The Journal of Immunology* 165:1582-1587.

Crossley, K., K. Bennell, S. Green, S. Cowan, y J. McConnell . **2002**. Physical therapy for patellofemoral pain: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *The American Journal of Sports Medicine* 30:857-865.

Daher, J.B. y C.R. Tonussi. 2003. A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. *Brain Research* 962:207-212.

Dannhardt, G. y W. Kiefer. 2001. Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry* 36:109-126.

Díaz-Reval, M.I., R. Ventura-Martínez, M. Deciga-Campos, J.A. Terrón, F. Cabre, y F.J. López-Muñoz. 2004. Evidence for a central mechanism of action of S-(+)-ketoprofen. *European Journal of Pharmacology* 483:241-248.

Duarte, I.D., y S.H. Ferreira. 2000. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators of Inflammation* 9:25-30.

Esplugues, J.V. 2002. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology* 135:1079-1095.

Esplugues, J.V. y M.D. Barrachina. Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas. En: Jesús Flórez, *Farmacología Humana*. Cuarta edición, España, Ed. Masson. 2003. 347-362.

García Rodríguez, L.A. y H. Jick. 1994. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 343(8900):769-772.

Ghezzi, P., G. Melillo, C. Meazza, S. Sacco, L. Pellegrini, C. Asti, S. Porzio, A. Marullo, V. Sabbatini, G. Caselli, y R. Bertini . 1998. Differential contribution of R and S isomers in ketoprofen anti-inflammatory activity: role of cytokine modulation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287(3):969-974.

Goodwin, D.C., L.M. Landino y L.J. Marnett. 1999. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *The FASEB Journal* 13:1121-1136.

González, E., J. Roselló-Catafau y A. Jawerbaum. 2001. Involvement of inducible isoforms of COX and NOS in streptozotocinpancreatic damage in the rat: interactions between nitridergic and prostanoid pathway. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids* 64(6):311-316.

Guay, J., K. Bateman, R. Gordon, y J. Mancini. 2004. **Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant PGE 2 response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE 2 synthase-1.** *Journal of Biological Chemistry* 279(23):24866-24872.

Hernández, R., C. Fernández y P. Baptista. *Metodología de la investigación*. 3ª ed. México, D.F., McGraw-Hill, 2003. 705p.

Hinz, B. y K. Brune. 2002. Cyclooxygenases-2#10 years later. *The Journal of*

- Experimental Therapeutics 300:367-375.
- Iohom, G., M. Walsh, G. Higgins, y G. Shorten. 2002. Effect of perioperative administration of dexketoprofen on opioid requirements **and inflammatory response following elective hip arthroplasty. British Journal of Anaesthesia 88(4):520-526.**
- Ito, S., E. Okuda-Ashitaka, y T. Minami. 2001. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neuroscience Research* 41:299-332.
- Jackson, L. y J.D. Morrow. Analgésicos-Antipiréticos y Antiinflamatorios, y Fármacos Antigotosos. En: Goodman G., A., Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª edición, México, Ed. McGraw-Hill, 2003. 724-725.
- Kis, B., J.A. Snipes, y D.W. Busija. 2005. Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions, and Uncertainties. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 315:1-7.**
- Mazario, J., C. Rosa, y J.F. Herrero. 1999. The NSAID dexketoprofen trometamol is as potent as μ -opioids in the depression of wind-up and spinal cord nociceptive reflexes in normal rats. *Brain Research* 816:512-517.
- Mehlisch, D.R., J. Markenson y T.J. Schnitzer. 1999. The Efficacy of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for Acute Pain. *Cancer Control* 6:5-9.
- Merskey, H. y N. Bogduk, eds. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2ª edición, Seattle, U.S.A., International Association for the Study of Pain Press, 1994. 209-214.
- Moalem, G. y D.J. Tracey. 2006. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51(2):240-264.
- Molina, G. y F. Salazar. 2000. Óxido nítrico y activación plaquetaria en la hipertensión inducida en el embarazo. *Revista Ecuatoriana de Ginecología y Obstetricia* 7:1.
- Mollace, V., C. Muscoli, E. Masini, S. Cuzzocrea, y D. Salvemini. 2005. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. *Pharmacological reviews* 57:217-252.
- Morrow, T.J., P.E. Paulson, P.J. Danneman, y K.L. Casey. 1998. Regional changes in forebrain activation during the early and late phase of formalin nociception: analysis using cerebral blood flow in the rat. *Pain* 75:355–365.
- Muscará, M. N. y J.L. Wallace. 1999. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. American journal of Physiology 276(6):G1313-G1316.**
- Nassab, P.R., R. Rajko, y P. Szabo-Revesz. 2006. Physicochemical characterization of meloxicam-mannitol binary systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(4):1191-7.
- Ortiz, M.I., V. Granados-Soto y G. Castañeda-Hernández. 2003. The NO–cGMP–K⁺ channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 76:187-195.
- Ortiz, M.I., G. Castañeda-Hernández, y V. Granados-Soto. 2005. Pharmacological evidence for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by meloxicam in the formalin test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 81:725-731.

- Rodrigo, J., D. Alonso, A.P. Fernández, J. Serrano, J.C. López, J.M. Encinas, P. Fernández, S. Castro, M.A. Peinado, J.A. Pedrosa, A. Richard, Martínez-Murillo, M. Santacana, M.L. Bentura, y L.O. Uttenthal. 2000. El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 23(2):195-236.
- Rodríguez, A. y C.A. Delfín. 2004. Oxido Nítrico. Su uso en el SDRA. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias* 3(1):117-123.
- Sánchez, D.J., G.C. Villanueva, C.A. Sosa, D.J. Orjuela, J.A. Ortega, C.M. Martínez, y N.E. Herrera. 2004. Oxido nítrico en el sistema nervioso central. *Neuronas nitrérgicas. Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría* 37(2):73-78.
- Serrano C., A. Valero, y C. Picado. 2004. Óxido nítrico nasal. *Archivos de Bronconeumología* 40(5):222-230.
- Smith, W.L., D.L. DeWitt, y R.M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry* 69:145-182.
- Thomas, G. y P.W. Ramwell. Óxido nítrico, donadores e inhibidores. *En: Katzung, B.G. Farmacología básica y clínica. Novena edición, México, Ed. El Manual Moderno. 2005. 313-319.*
- Underwood, M.R., G. Harding, y J. Klaber. 2006. Patient perceptions of physical therapy within a trial for back pain treatments. *Rheumatology* 45(6):751-756.
- Vane, J.R., Y.S. Bakhle, y R.M. Botting. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38:97-120.
- Vanegas, H. y H. Schaible. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Process in Neurobiology* 64(4):327-363.
- Vasquez, E., K. Bär, A. Ebersberger, B. Klein, H. Vanegas, y H. Schaible. 2001. Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *The Journal of Neuroscience* 21(22):9001-9008.
- Vila, M.G. 2000. Rol y mecanismos subcelulares del óxido nítrico en la regulación de la contractilidad miocárdica. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* 29:501-507.
- Wangenstein R., I. Rodriguez-Gomez, J.M. Moreno, M. Alvarez-Guerra, A. Osuna, y F. Vargas. 2006. Effects of Chronic Treatment with 7-nitroindazole in Hyperthyroid Rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291(5):R1376-1382.
- Willingale, H.L., N.J. Gardiner, N. McLymont, S. Giblett, y B.D. Grubb. 1997. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *British Journal of Pharmacology* 122:1593-1604.

APÉNDICE

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.	Protocolo del test de la formalina.....	47
TABLA 2.	Evaluación del dolor en el ensayo algesiométrico utilizando Desketoprofeno y Meloxicam en presencia o ausencia de 7-NI y L-NAME.....	48

LISTA DE FIGURAS

INTERACCIÓN DEL SISTEMA NITRIDÉRGICO EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO-ESTEROIDALES DESKETOPROFENO Y MELOXICAM

FIGURA 1	Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase.....	49
FIGURA 2	Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	49
FIGURA 3	Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase.....	50
FIGURA 4	Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	50
FIGURA 5	Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de 7-NI en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase.....	51
FIGURA 6	Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de 7-NI en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	51
FIGURA 7	Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase.....	52
FIGURA 8	Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	52
FIGURA 9	Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase.....	53
FIGURA 10	Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	53
FIGURA 11	Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip previa administración de 7-NI en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	54
FIGURA 12	Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip previa administración de 7-NI en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.....	54

TABLAS

TABLA 1. Protocolo experimental del test de la formalina.

PROTOCOLO TEST DE LA FORMALINA	
Primer grupo de 4 ratones	
12:45 hrs.	L-NAME o 7-NI primer grupo
13:00 hrs.	AINEs o Suero
13:20 hrs.	L-NAME o 7-NI segundo grupo
13:30 hrs.	Formalina
Segundo grupo de 4 ratones	
13:35 hrs.	AINEs o Suero
13:55 hrs.	L-NAME o 7-NI tercer grupo
14:05 hrs.	Formalina
Tercer grupo de 4 ratones	
14:10 hrs.	AINEs o Suero
14:40 hrs.	Formalina
15:10 hrs.	Término del Test

TABLA 2. Evaluación del dolor en el ensayo algésimétrico utilizando Desketoprofeno y Meloxicam en presencia o ausencia de 7-NI y L-NAME.

INTERACCIÓN DEL SISTEMA NITRIDÉRGICO EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO-ESTEROIDALES DESKETOPROFENO Y MELOXICAM

Grupos	Dosis (mg/kg)	Primera fase		Segunda Fase	
		Promedio de lamidos ± MSE (seg)	valor P	Promedio de lamidos ± MSE (seg)	valor P
Control	-	139.71 ± 5.60	-	169 ± 6.01	-
Control / L-NAME	5	113.5 ± 15.41	NS	94 ± 12.91	p < 0.05
Control / 7-NI	5	1.67 ± 1.09	p < 0.05	0 ± 0.0	p < 0.05
Desketoprofeno	3 10 30 100	116.2 ± 7.98 65.2 ± 11.49 52.3 ± 10.4 30.67 ± 7.9	NS p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05	153.2 ± 27 134 ± 15.50 121.3 ± 12.1 60.67 ± 18.3	NS NS p < 0.05 p < 0.05
Desketoprofeno / L-NAME	3 10 30 100	72 ± 11.67 70 ± 11.35 63.83 ± 5.87 59.6 ± 12.44	p < 0.05 NS NS NS	21.67 ± 5.21 23.55 ± 13.71 28.33 ± 12.34 19.4 ± 8.71	p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05
Desketoprofeno / 7-NI	3 10 30 100	18.17 ± 7.75 13.8 ± 9.92 12.08 ± 6.66 10 ± 4.2	p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05 NS	3 ± 3.00 7.4 ± 7.40 10 ± 10.00 0.88 ± 0.88	p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05
Meloxicam	3 10 30 100	25.17 ± 13.83 97 ± 8.86 72.83 ± 16.26 18 ± 7.81	NS p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05	135.33 ± 11.60 132 ± 25.90 71.33 ± 11.22 5 ± 0.70	NS NS p < 0.05 p < 0.05
Meloxicam / L-NAME	3 10 30 100	4.83 ± 11.18 68.8 ± 8.70 65 ± 12.51 3.5 ± 2.20	p < 0.05 NS NS NS	40.4 ± 33.62 11.83 ± 7.87 11.6 ± 7.11 0 ± 0.0	p < 0.05 p < 0.05 p < 0.05
Meloxicam / 7-NI	3 10 30 100	0.00 ± 0.0 0.0 ± 0.0 0.0 ± 0.0 0.0 ± 0.0	NS NS NS NS	0.0 ± 0.0 0.0 ± 0.0 0.0 ± 0.0 0.0 ± 0.0	NS NS NS NS

FIGURAS

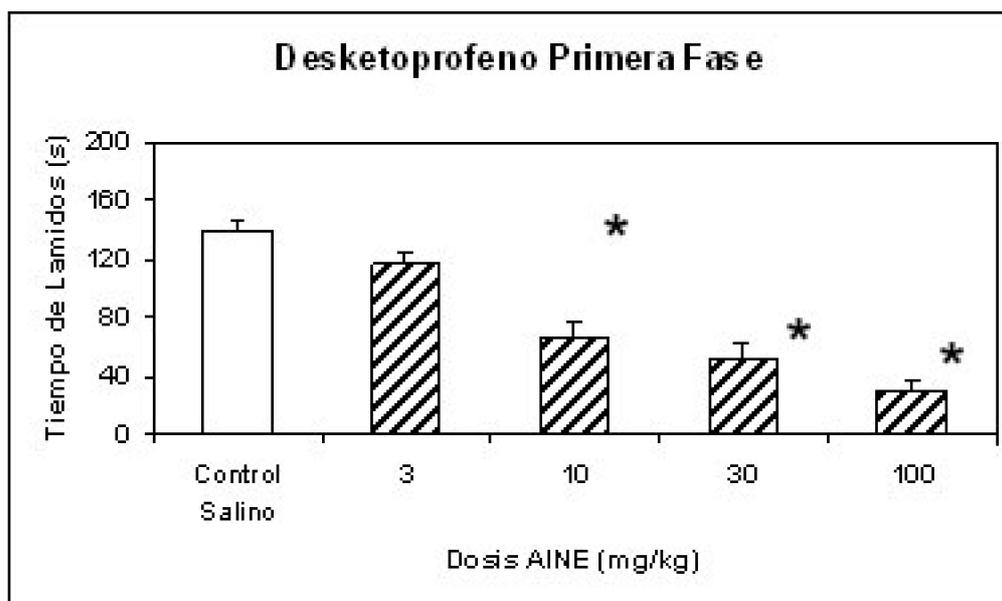


Figura 1. Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase., = $p < 0.05$.

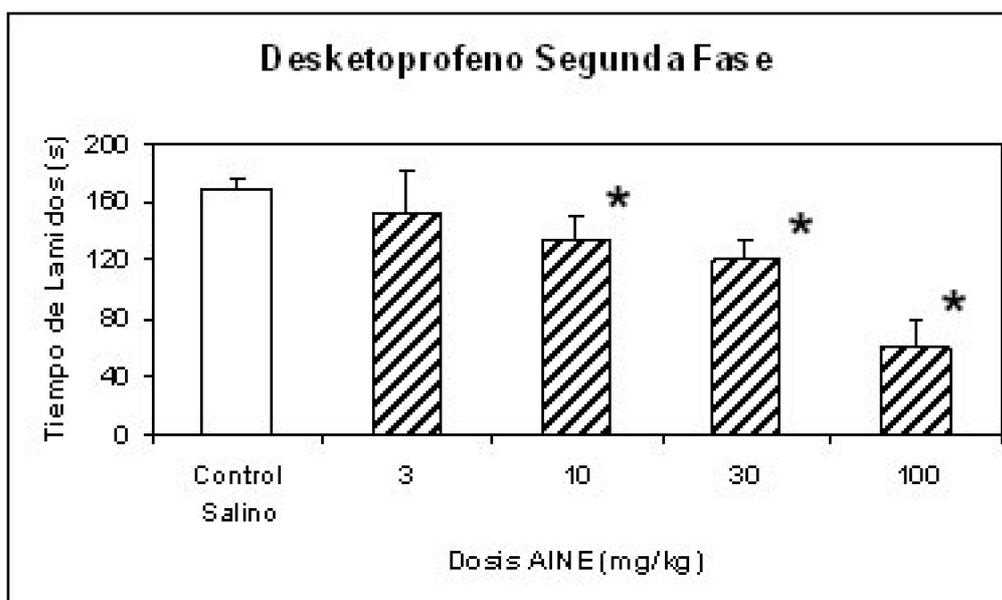


Figura 2. Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase., = $p < 0.05$.

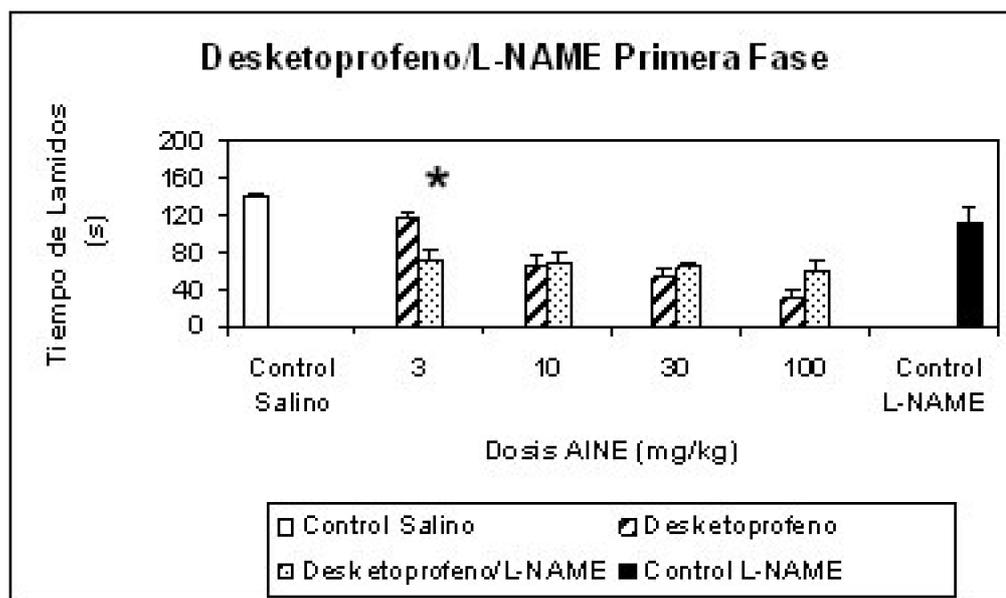


Figura 3. Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de L-NAME en el ensayo algisiométrico de la formalina, primera fase. * = $p < 0.05$.

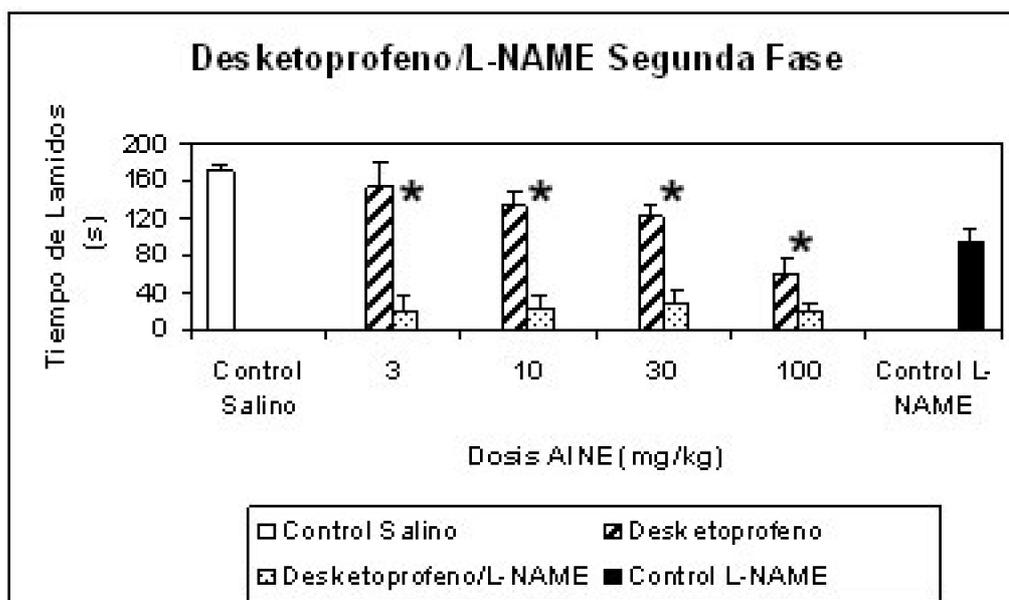
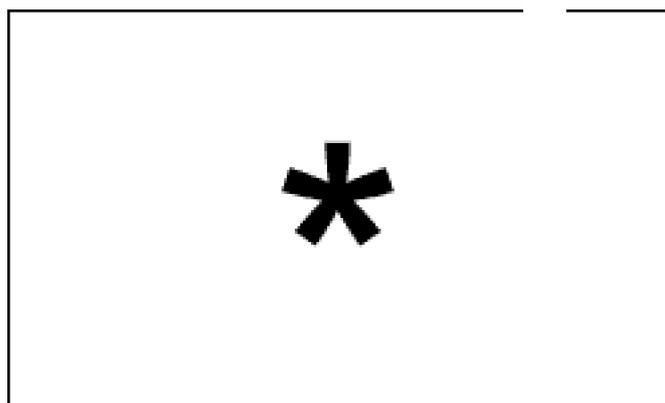


Figura 4. Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase., = $p < 0.05$.

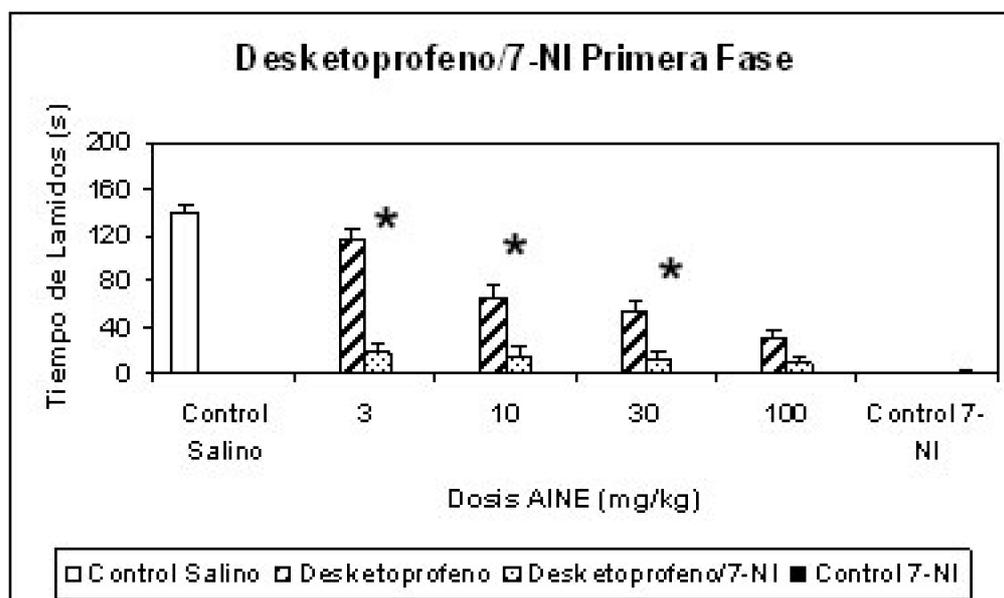


Figura 5. Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de 7-nitroindazol (7-NI) en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase., = $p < 0.05$.

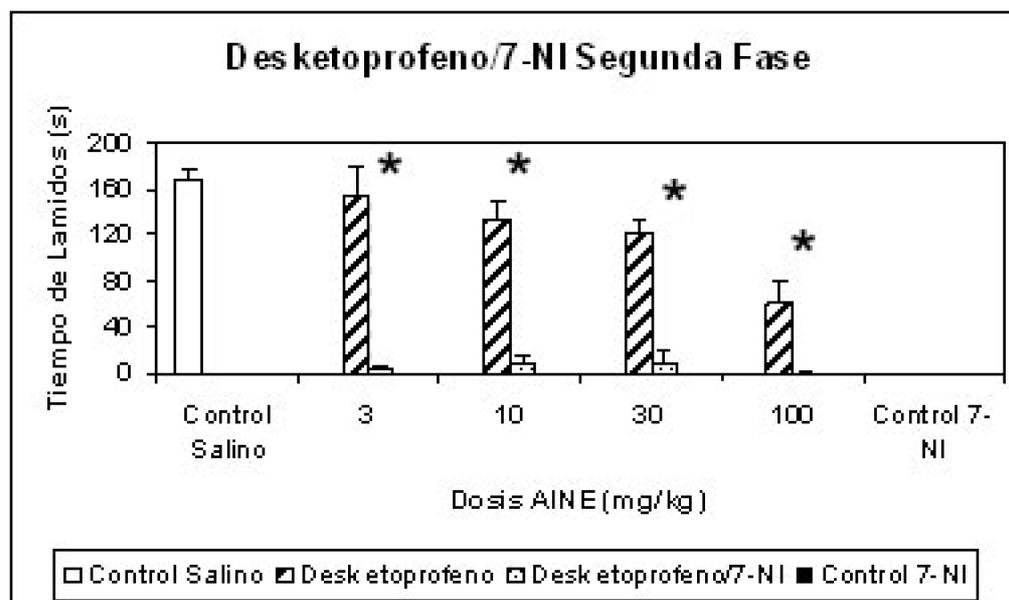


Figura 6. Curva dosis-respuesta del Desketoprofeno ip previa administración de 7-nitroindazol (7-NI) en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase., = $p < 0.05$.

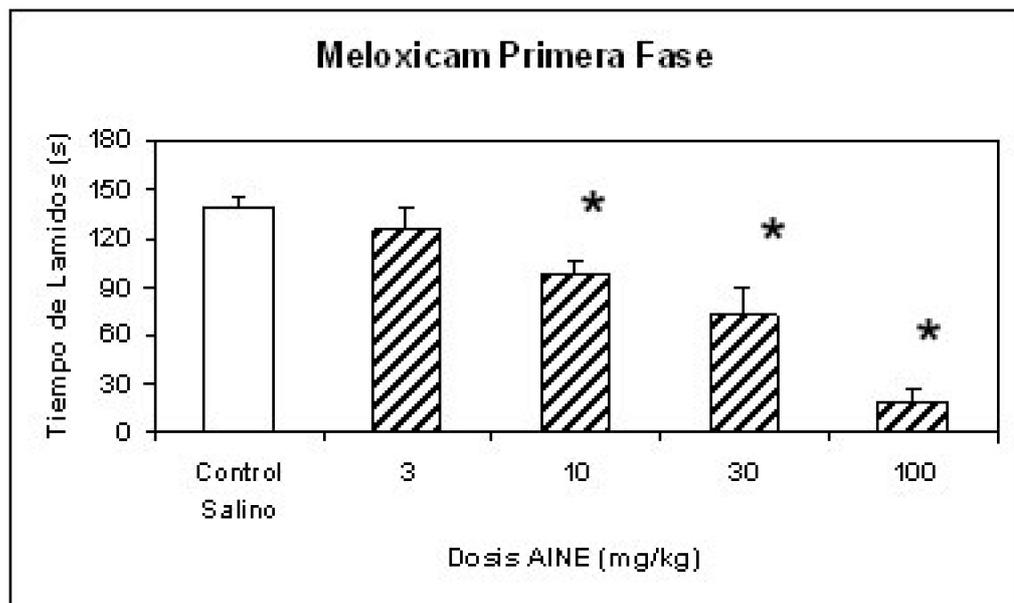
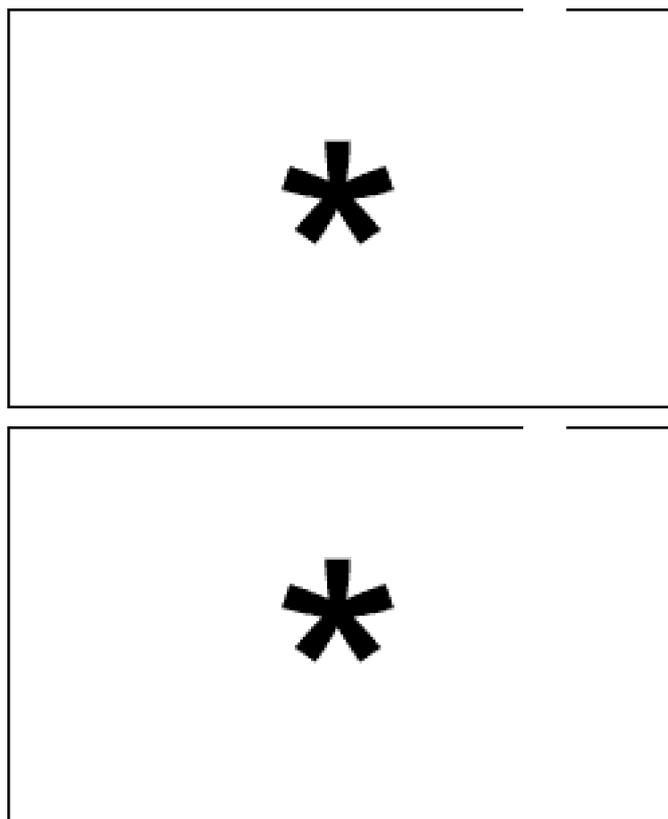


Figura 7. Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip en el ensayo algosimétrico de la formalina, primera fase., = $p < 0.05$.



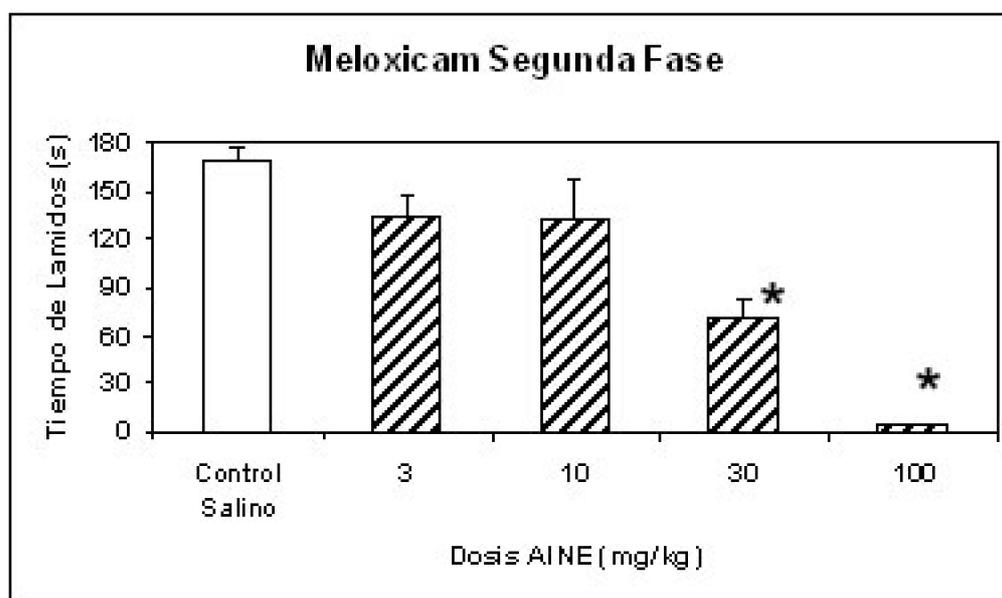
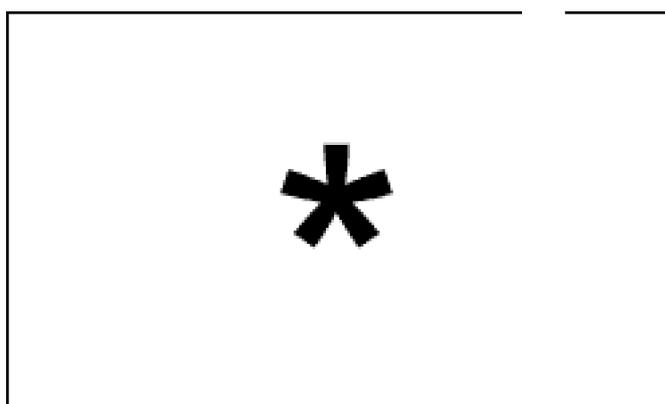


Figura 8. Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase., = $p < 0.05$.

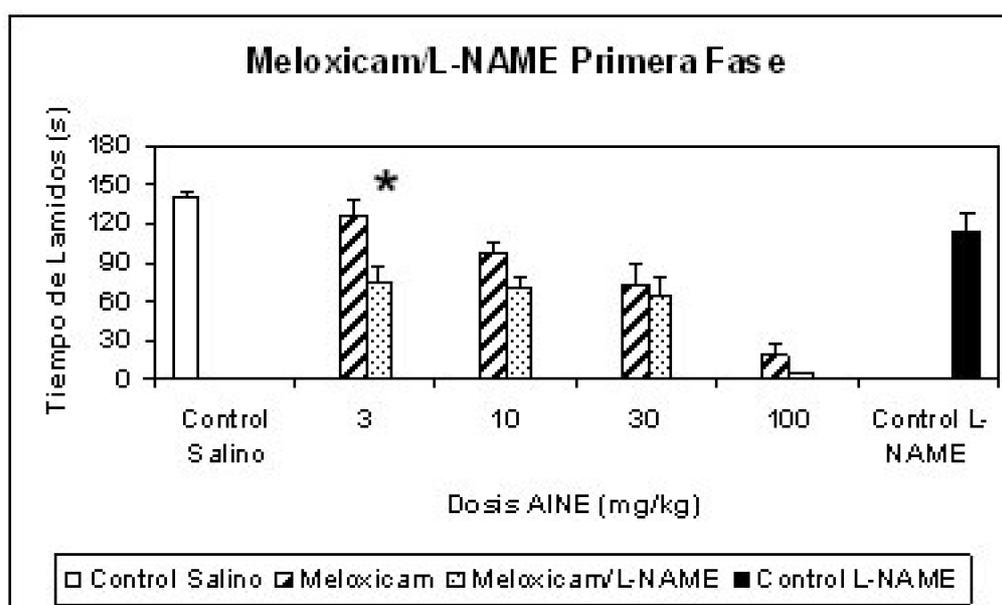


Figura 9. Curva dosis-respuesta del Meloxicam *ip* previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase. $p < 0.05$.

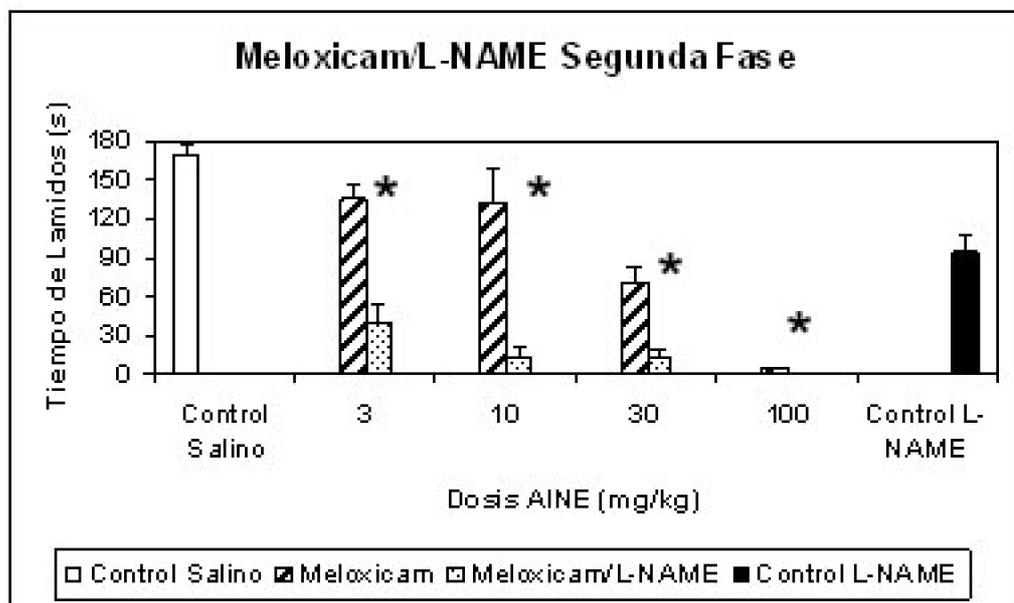
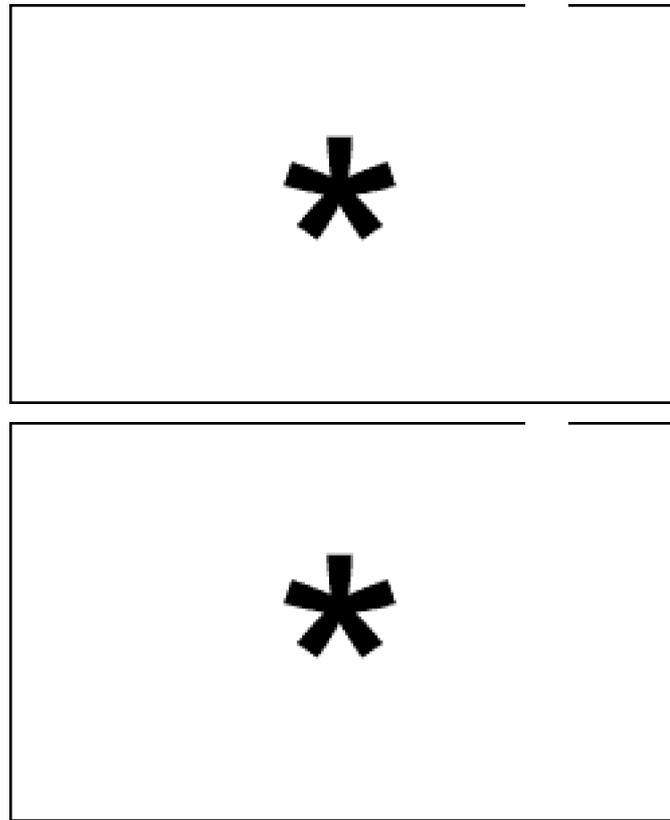


Figura 10. Curva dosis-respuesta del Meloxicam *ip* previa administración de L-NAME en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase. $p < 0.05$.

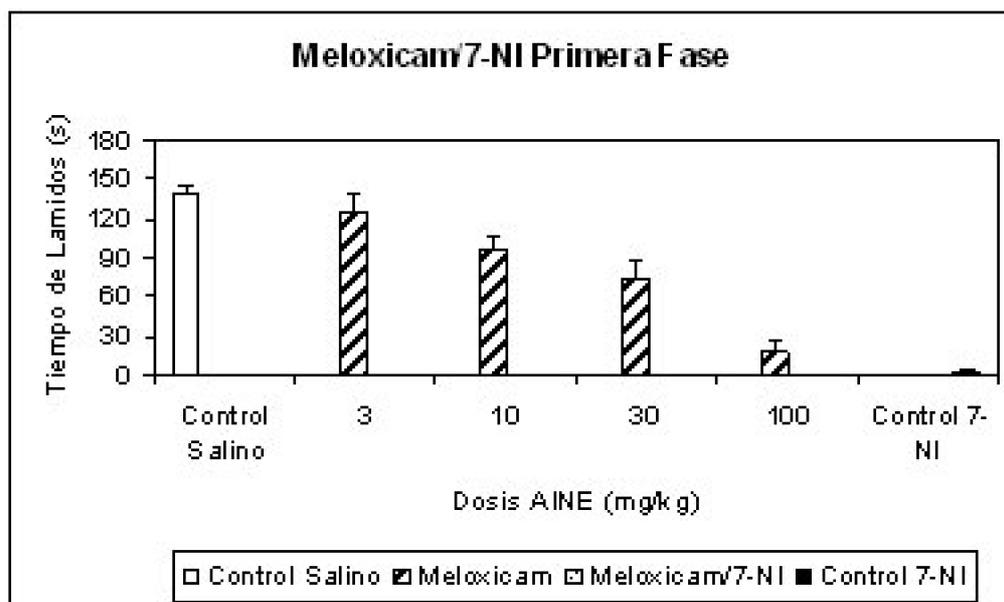


Figura 11. Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip previa administración de 7-nitroindazol (7-NI) en el ensayo algesiométrico de la formalina, primera fase.

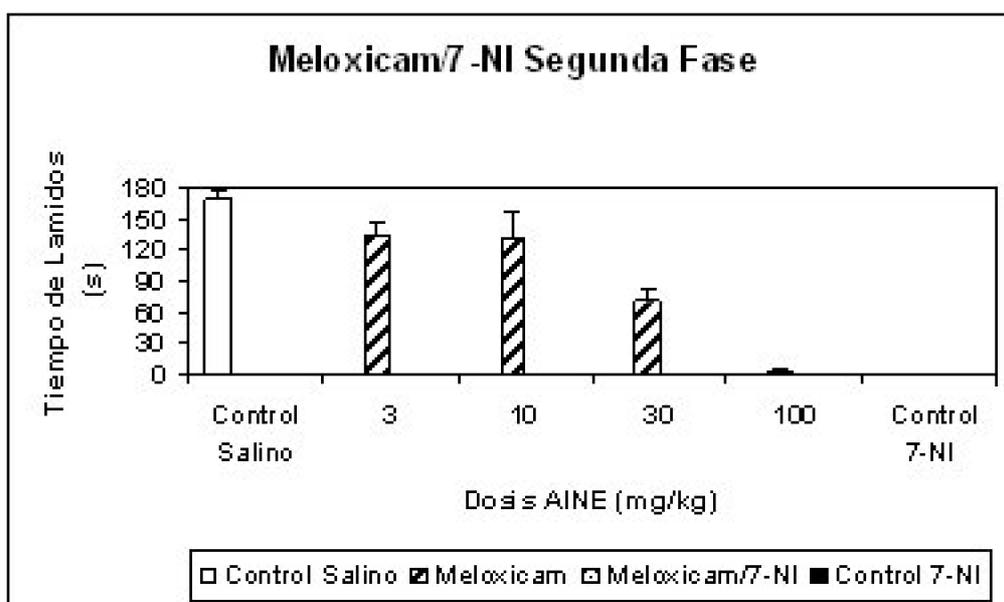


Figura 12. Curva dosis-respuesta del Meloxicam ip previa administración de 7-nitroindazol (7-NI) en el ensayo algesiométrico de la formalina, segunda fase.