



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**ROL DEL SISTEMA NITRIDERGICO EN LA ANALGESIA TRIGEMINAL  
DEL DEXKETOPROFENO**

**Andrea Paz Maturana Ramírez.**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO- DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Hugo F. Miranda G.**

**TUTORES ASOCIADOS  
Prof. Dr. Gianni Pinardi T  
Dr. Fernando Sierralta G**

**Santiago - Chile  
2007**

## **DEDICATORIA**

A mis papás y mi hermana Sofía, por el incondicional apoyo durante toda mi vida, por su confianza, amor y paciencia... los quiero muchísimo.

Les dedico con mucho amor esta tesis.

A Dustan por todo el amor, amistad y alegría que le da a mi vida, por haber sido siempre un apoyo fundamental.

## AGRADECIMIENTOS

- A los Drs. Miranda y Pinardi, por su tiempo, alegría y sobrehumana paciencia.
- A don José y don Alejandro, por su complicidad y desinteresada ayuda.
- A la Ingecita, por su incondicional y alegre amistad, por las pocas peleas e interminables risas.
- A mis abuelas, porque son una constante guía para mi vida.
- A mi tía Cecilia, por ser mi segunda mamá.
- A mis leales amigos (as); Carolina(s), Came, Felipe y Jimy.
- A todos los Dr(as) y funcionarios de la facultad por entregarme no sólo conocimiento, sino también gratos momentos.
- A Dios por darme todo lo que tengo y porque siempre ha estado junto a mí.

## Índice

<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>8</b>
• Definición de Dolor	8
• Clasificación de Dolor	9
• Anatomía nerviosa de dolor orofacial	11
• Oxido Nítrico	22
• Inhibidores de las NOS	31
• AINES	31
• Dexketoprofeno	38
<b>Hipótesis</b>	<b>46</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>46</b>
<b>Objetivos Específicos</b>	<b>46</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>47</b>
<b>Resultados</b>	<b>53</b>
<b>Discusión</b>	<b>61</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>64</b>
<b>Sugerencias</b>	<b>65</b>

<b>Resumen</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**ROL DEL SISTEMA NITRIDERGICO EN LA ANALGESIA TRIGEMINAL  
DEL DEXKETOPROFENO**

**Andrea Paz Maturana Ramírez.**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO- DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Hugo F. Miranda G.**

**TUTORES ASOCIADOS  
Prof. Dr. Gianni Pinardi T  
Dr. Fernando Sierralta G**

**Santiago - Chile**  
**2007**

## Introducción

El dolor constituye un hecho consubstancial a la vida y ésta difícilmente sería concebible en su ausencia. En aquellas enfermedades en las que el dolor no puede ser percibido se presentan múltiples problemas, los que incluso, podrían llevar a la muerte. La nocicepción es evidentemente una función fisiológica esencial de alerta, la que permite mantener la integridad de nuestro organismo.

En odontología, el dolor, es un aspecto constante en la atención. Muchas de las consultas son debidas a este motivo. Es por eso que, un adecuado conocimiento, manejo y tratamiento, de su etiología y fisiopatología, es fundamental, como también un provechoso uso de las distintas opciones que ofrecen las industrias farmacéuticas en materia analgésica.

Actualmente los mecanismos neurofisiológicos que provocan nocicepción son conocidos, y en base a ellos, se ha trabajado en la elaboración de medicamentos con una poderosa y selectiva analgesia, como los opioides, anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroidales (AINES), sin embargo, estos fármacos presentan efectos colaterales, que en algunos casos, pueden obligar a interrumpir el tratamiento.

Los AINES han sido los fármacos de elección en el tratamiento del dolor de origen orofacial. Si bien, su fórmula es de eficacia comprobada, su mecanismo de acción, además de inhibir a las enzimas COX<sub>1-2</sub> y con ello la síntesis de prostaglandinas, no ha sido claramente establecido.

Existen evidencias que el efecto analgésico es modulado por fármacos que interactúan con otros receptores, como por ejemplo agentes adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, nitridérgicos. Se ha demostrado también, que con el uso de antagonistas no selectivos y selectivos de diversos neurotransmisores, se pueden modificar los efectos analgésicos de los AINES, aumentándolos o bien disminuyéndolos.

En el caso de las enzimas oxido nítrico sintetasas (NOS), productoras de oxido nítrico (NO), son bloqueadas por un grupo de inhibidores con moderada selectividad, como son NG-Nitro-L-arginina y 7-nitroindazol, los que permiten identificar el rol del NO tanto en procesos fisiológicos como patológicos. De esta manera, al conocer su modulación, puede permitirnos un mejor y más provechoso uso, aumentando la analgesia, disminuyendo los efectos colaterales, permitiendo así una mejor calidad de vida para los pacientes (4, 5, 6, 7, 8).

Los AINES son fármacos racémicos, es decir, están formados por dos enantiómeros uno S (+) y otro R (-), los que poseen distintas funciones biológicas. Actualmente, la industria farmacéutica ha logrado aislar el isómero S (+) del ketoprofeno, el **dexketoprofeno**, la molécula activa de este racemato. Este enantiómero, clasificado como inhibidor preferencial de la COX<sub>1</sub> y en menor medida de la COX<sub>2</sub>, pertenece al grupo de los propiónicos y presenta comprobadas ventajas, como son el uso de la mitad de la dosis requerida en el ketoprofeno, disminución de la carga metabólica y de los efectos secundarios causados directa o indirectamente por el isómero no útil, el *isómero R (-)* (1,2, 3).

El propósito de este estudio será evaluar la posible modulación nitridérgica en el efecto analgésico del **dexketoprofeno**, usando inhibidores de la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS), como son la NG-Nitro-L-arginina, inhibidor no selectivo de las NOS y el 7-nitroindazol, inhibidor preferencial de la NOS neuronal, mediante el método algesiométrico agudo de la formalina orofacial (9).

## Marco teórico

### Definición de dolor

El dolor, es definido por la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASO) como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en término de ese daño.

Ahora bien, la *nocicepción* y el *dolor* son conceptos diferentes. *Nocicepción* es la excitación de los nociceptores, la que puede o no conducir a la percepción dolorosa. El *dolor* es una percepción producto de la abstracción del cerebro, que involucra al sistema límbico, el que aporta el componente afectivo al *dolor*.

Actualmente se ha comprobado que son muchas las estructuras nerviosas a nivel periférico, medular, subcortical y cortical que intervienen en la percepción del dolor, con lo que esta percepción afecta a nuestros pensamientos, memoria, actitudes, emociones, movimientos y conducta, y a la vez esta percepción se ve afectada por cada uno de esos procesos. Si bien se sabe que la nocicepción comienza en receptores periféricos, no podemos hablar de dolor hasta que llega al encéfalo (10, 11).

### **Clasificación del dolor.**

Existen muchas clasificaciones para el dolor. Las más habituales lo evalúan según intensidad, evolución, características, origen y etiología.

- *Intensidad.* No esta relacionada directamente con la magnitud del daño, pero es fundamental considerarla para el tratamiento. La forma de ser evaluada debe quedar consignada en la ficha clínica del paciente y por lo general se usan escalas descriptivas numéricas.
- *Evolución.* Se clasifica en agudo y crónico.
  - *Dolor agudo:* Es aquel que comprende el lapso estimado para que los tejidos sanen, según IASP, tres meses. Puede ser continuo, intermitente o paroxístico, y estar acompañado de respuestas neurovegetativas, a saber, taquicardia, aumento de la presión arterial, taquipnea, entre otros, según la magnitud del cuadro doloroso. Este tipo de dolor, es un mecanismo de alarma fisiológica para limitar el daño y así iniciar la reparación.
  - *Dolor crónico:* Aquel que tiene una duración mayor a 3 meses, o que por las características de su origen, excede el tiempo que habitualmente tendría un dolor agudo semejante.

Puede ser continuo o recurrente. Tiene poco o nulo componente neurovegetativo, aunque sí un alto compromiso psicológico, con alteraciones conductuales que pueden llevar a estados depresivos. Este dolor carece de propiedades biológicas reparadoras.

- *Característica somatosensorial.* Se clasifica como *epicrítico*, cuando es superficial, localizado, y a su vez punzante, lacerante, lancinante, quemante opresivo fulgurante o en ramalazo. Por naturaleza no es referido. Se clasifica como *protopático* cuando es difuso, mal localizado, sordo. Es un dolor referido, o sea que su origen, es distante al sitio localizado.
- *Sitio de origen.* Puede ser periférico, profundo o visceral y central. El periférico se refiere al que se origina en tegumentos, el profundo, es el que inicia en vísceras, cavidades serosas y articulaciones, y el central tiene su origen en el sistema nervioso central.
- *Etiología.* Puede ser traumática, infecciosa, disfunción neurológica o psicógena (6, 12).

## Anatomía nerviosa del dolor orofacial

### Nociceptores

Son receptores específicos, que responden selectivamente ante estímulos que podrían llegar a producir una lesión tisular. Se consideran de adaptación lenta, es decir, que envían señales eléctricas mientras persiste el estímulo.

Responden directamente a estímulos lesivos o de forma indirecta, al responder a sustancias liberadas por el tejido lesionado (histamina o bradiquinina), o a alteraciones metabólicas, como baja de pH, y aumento de concentración de ciertos iones, es por esto que los nociceptores pueden ser considerados quimioceptores.

A diferencia de otros receptores, otras estructuras puedan modular las propiedades receptoras de los nociceptores.

Los nociceptores pueden responder a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. También existen los receptores polimodales, que responden a una combinación de estos.

- Térmico: fibras  $A\delta$ ,  $< 5^{\circ}$  y  $> 45^{\circ}$
- Mecánico: fibras  $A\delta$ , 5-30 m/s.
- Polimodal: fibras tipo C  $< 1$  m/s. Estímulos mecánicos, térmicos y químicos.

Existen 2 tipos de fibras:

- **Fibras A $\delta$** , mielínicas, de diámetro 1-6 mm y velocidad de conducción entre 4-36 m/s. Son el 10% de las fibras sensitivas de la piel, dan información de tipo mecánica y térmica. Su información es localizada, y no evocan componente afectivo de la experiencia sensorial. Responsable del dolor agudo, de aparición rápida y corta duración, llamado *primer dolor*. Su umbral es menor al de fibras C. Secretan *glutamato*, el que actúa en receptores tipo AMPA.
- **Fibras C**, amielínicas, de diámetro 0,2-1,5 mm, velocidad de conducción entre 0,4 y 2 m/s. En piel son el 70% de las fibras sensitivas. Son polimodales. Transmiten sensaciones mal localizadas. Responsables del dolor urente y persistente, que sigue al dolor agudo, o *segundo dolor*. Evocan el componente afectivo de la experiencia dolorosa. El principal neurotransmisor es el glutamato, libera también *sustancia P* y péptido relacionado con el *gen de la Calcitonina (CGRP)* (10, 11).

Estas fibras A $\delta$  y C no son grupos homogéneos, sino que forman fibras que varían en el tipo de estímulo transmitido, su umbral de activación o la velocidad de transmisión.

Los cuerpos celulares están en el ganglio de la raíz dorsal medular, y en el caso de las regiones cefálicas en el núcleo espinal del trigémino (10).

### **Vías Ascendentes trigeminales.**

La información nociceptiva orofacial, originada desde la piel facial, dientes, lengua, músculos masticatorios, articulación temporomandibular y glándulas salivales, llega al encéfalo mediante vías que se originan en las neuronas de proyección del núcleo espinal del trigémino.

***Tracto trigeminotalámico o haz neotrigeminotalámico.*** Señales nociceptivas orofaciales son transportadas por el V par, y en menor medida, por los pares nerviosos del facial, glossofaríngeo y vago. La primera neurona de esta vía tiene su soma ubicado en el *ganglio de Gasser*, con una terminación periférica que es el nociceptor, y una prolongación central hacia los núcleo trigeminales ipsilaterales, llevando la información hacia la segunda neurona de los respectivos núcleo sensoriales. Estos núcleos también reciben proyecciones de otros centros superiores, así se ejercen influencias modulatorias sobre estas vías.

Tanto las fibras A $\delta$  y C, descienden al llegar a la protuberancia, formando el *tracto espinal del trigémino*, al que se unen las fibras aferentes somáticas del resto de los pares craneales, que aportan información nociceptiva. El tracto espinal va desde la parte media de la protuberancia hasta el 2° o 3° segmento cervical, donde las fibras se unen al *tracto de Lissauer*. Estas fibras terminan en el núcleo espinal del V par, ubicado medial respecto al tracto. Las fibras nociceptivas llegan al subnúcleo caudal, que recibe también fibras de los segmentos cervicales superiores (10, 13, 14).

Cada rama del nervio trigeminal ha sido ordenada en un campo terminal específico, tanto en el núcleo sensitivo trigeminal (NST), como en el núcleo espinal, el que se subdivide en: subnúcleo oral, subnúcleo interpolar y subnúcleo caudal.

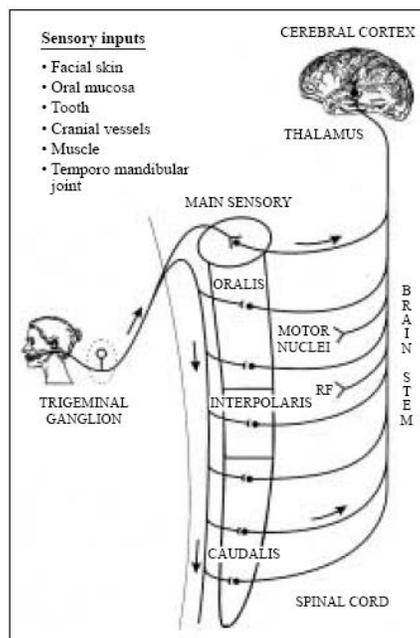


Figura 1. Vía somatosensorial principal de cara y boca según Sessle.

La división mandibular está localizada en la zona dorsal o dorsomedial del NST y de los 3 subnúcleos, la rama oftálmica en la zona ventral o ventrolateral, y la rama maxilar es la zona intermedia de ellos.

Las neuronas orales y faciales difieren en el tamaño del soma, en estructura y en los campos terminales centrales. Las neuronas orales tienen sus centros terminales primarios en la zona rostral del núcleo del óbex, núcleo principal, oral y el interpolar, mientras que las neuronas faciales tienen su terminal primario en el subnúcleo caudal (13, 14).

El subnúcleo caudal, recibe algunas entradas aferentes de ambos lados de la cara y boca (14).

Los axones de la segunda neurona, ubicada en el núcleo espinal, se decusan y ascienden posterior al lemnisco medial, enviando colaterales a la formación reticular, terminando en los núcleos de tálamo ventral posteromedial (VPM), e intralaminares. Desde aquí, la información viaja a la región facial del área sensitiva primaria de la corteza, área 1, 2, 3 de Brodman, y a otras estructuras corticales y subcorticales, como son la *corteza insular*, y la *circunvolución cingular*, parte del *Sistema Límbico*, relacionada con el procesamiento afectivo y emocional del dolor (11, 14).

**Tractos Espinoparabraquiales.** En la protuberancia se encuentra el núcleo parabraquial. Este integra respuestas vegetativas y motivacionales ante el dolor. Además de las fibras que le llegan por *el tracto espinomesencefálico*, están los *tractos espinoparabraquiotalámico* y *espinoparabraquiamigdalino*. El origen de estos tractos está en la medula y en el subnúcleo caudal.

Así, al ser estimulada una *fibra A $\delta$* , se secreta *glutamato*, que actúa sobre receptores tipo AMPA/KAINATO, ubicados en la segunda neurona.

Este receptor es un canal ionotrópico, que al activarse produce una violenta entrada de  $\text{Na}^+$ , generando un potencial de acción que viaja por el tracto trigeminotalámico, hasta el núcleo VPM del tálamo, donde se encuentra la tercera neurona proyectada hasta la *corteza somatosensitiva primaria*. Este es el dolor fugaz, localizado y de corta duración (10, 13, 14).

La *fibra C* es activada con la aparición de mediadores químicos, como bradiquinina, leucotrienos, prostaglandinas (PG),  $\text{K}^+$ , entre otros. La bradiquinina, además de estimular directamente a los nociceptores, produce un aumento de PGs. La fibra C, libera como neurotransmisor *CGRP* y *sustancia P*, este último, viaja tanto a la periferia como a la segunda neurona de la vía. En la periferia la *sustancia P* estimula macrófagos, plaquetas y mastocitos para que liberen más neuropéptidos y mediadores de la inflamación, provocando edema, enrojecimiento y aumento de la temperatura local, fenómeno llamado **inflamación neurogénica**. Esto genera más potenciales de acción, más *sustancia P*, produciendo un feed back positivo, generando **sensibilización periférica** (11, 14, 15). A nivel central, la excitación intensa de las *fibras tipo C* determina la descarga de una alta frecuencia de potenciales de acción por la vía aferente, por lo cual, además de la secreción de *glutamato*, se secreta *sustancia P*, *CGRP*, *Neurokinina A*.

La *sustancia P* activa el *receptor NK tipo 1* de la segunda neurona, y genera excitaciones largas y prolongadas, las que aumentan la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, el que provoca la apertura de un receptor de *glutamato*, taponado por  $\text{Mg}^{+2}$  en condiciones fisiológicas, que es el receptor *N-metilico-D-aspartate (NMDA)*. La apertura del receptor *NMDA* determina una masiva entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y la formación de *óxido nítrico (NO)*. El *NO* difunde hacia la terminación presináptica, provocando aumento del *GMPc*, el que estimula una mayor secreción de *glutamato (feedback positivo)*, lo cual produce una sensibilización prolongada de la *segunda neurona* del núcleo espinal.

Este fenómeno es conocido como **hipersensibilización central**, que es posible por un mecanismo llamado **neuroplasticidad**. En este fenómeno la propia neurona reorganiza conexiones sinápticas, con proteínas que generan nuevos receptores y modifican mecanismos bioquímicos y fisiológicos utilizados en sus comunicaciones intercelulares, en respuesta a distintos estímulos (11, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

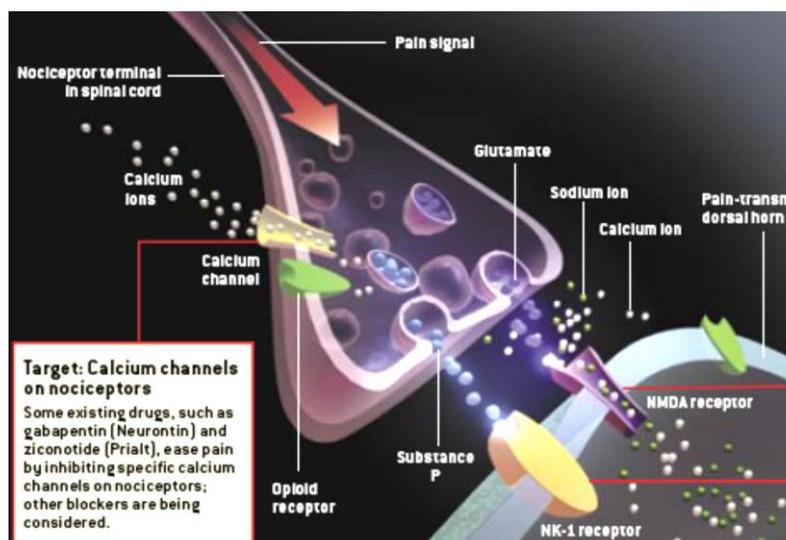


Figura 2. Mecanismos involucrados en la hipersensibilización central según Basbaum.

Según los distintos núcleos diana se pueden caracterizar dos sistemas de procesamiento nociceptivo: **medial y lateral**.

- **Sistema Medial** responsable del componente afectivo del dolor, relevante en el dolor crónico. Participan la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo y los núcleos talámicos mediales e intralaminares, que se proyectan hacia la circunvolución del cíngulo, estructuras límbicas, y corteza prefrontal (10).

- **Sistema Lateral** da la percepción conciente, localización exacta, calidad, intensidad y duración del estímulo doloroso y están involucrados los núcleos talámicos y el córtex parietal (10, 14).

Los procesos periféricos implicados en la sensibilización de terminaciones aferentes nociceptivas en el sitio de la lesión se asocian a una baja del umbral de activación y aumento de la sensibilidad a estímulos, es decir, **hiperalgesia primaria**. Ahora bien, los productos químicos pueden difundir a tejidos vecinos y estimular fibras aferentes nociceptivas, contribuyendo a la extensión del área dolorosa, fenómeno conocido como **hiperalgesia secundaria**.

Activadas y sensibilizadas, las fibras nociceptivas pueden exhibir una disminución de umbrales de activación y actividad espontánea, estos cambios generan respectivamente **alodinia**, donde el dolor es producido por un estímulo no doloroso, de baja intensidad, e **hiperalgesia espontánea**, característica de muchas condiciones de dolor crónico (11, 14, 16, 20).

En el proceso nociceptivo se pueden identificar cuatro procesos involucrados en su transmisión y procesamiento, estos son la *transducción, conducción, modulación y percepción*. Todos ellos pueden ser modificados farmacológicamente.

La **transducción**, proceso en el que los nociceptores transforman la energía del estímulo a un potencial de acción, se puede manejar con el

uso de *anestésicos locales (AL)* y con AINES, que alteran el proceso de transducción al inhibir la síntesis de mediadores inflamatorios.

La **conducción**, propagación de estos potenciales hacia el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), puede ser abolida por *AL*, al modificar la capacidad de descarga.

La **modulación** es a la modificación cuantitativa y cualitativa de la información, en el SNC como en el SNP. Pueden producir hiperalgesia o de hipoalgesia. Farmacológicamente se puede interrumpir interfiriendo en la síntesis de mediadores de la inflamación, como los AINES.

La **percepción** implica la integración de las vías medial y lateral. Produce la experiencia emocional, subjetiva y consciente del dolor y permite determinar localización, magnitud y naturaleza del estímulo, acompañándose tanto de angustia como de necesidad de alivio. Se puede modular con *AL*, AINES, opioides, y antidepresivos entre otros (21).

### **Modulación de la percepción dolorosa.**

Existen varios circuitos neuronales moduladores de la percepción dolorosa, tanto a nivel central como periférico; y estos procesos implican mecanismos de regulación presinápticos o postsinápticos, así como una variedad de sustancias endógenas, neuroquímicos y receptores (11).

Las aferencias sensoriales orofaciales son moduladas de diferentes maneras, por interneuronas dentro del núcleo sensitivo trigeminal (NST): por conexiones recíprocas entre el NST y la médula rostral ventromedial y por la corteza cerebral (13). La modulación inhibitoria descendente es realizada por fibras eferentes de la *sustancia gris periacueductal* que liberan opio péptidos endógenos; del *núcleo magno del raphe* y *núcleo paragigante celularis* que liberan serotonina y del núcleo *Locus coeruleus* que libera noradrenalina (11, 21). La modulación periférica es por estimulación de fibras A $\beta$ , a nivel periférico, estimula a una interneurona a liberar encefalinas a nivel presináptico en segunda neurona (11).

### **Oxido Nítrico**

El *NO* estructuralmente, es una de las moléculas biológicas inorgánicas más simples, sin embargo participa en uno de los circuitos de señalización más intrincados y versátiles actualmente conocidos. El *NO* es un gas, incoloro, formado por un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno, con un electrón desapareado. El carácter del radical libre del *NO* le confiere características específicas, como su alta reactividad, y determinan su interacción, *in vivo*, con numerosos blancos.

Como gas es altamente lipofílico e hidrofílico, posee un alto poder de difusión (40 - 300 $\mu$ m diámetro), que determina una rápida extensión tridimensional y fácil acceso a células vecinas, a menudo, lejos del sitio de su síntesis. Esto sugiere que, cuando actúa como neurotransmisor, tiene un papel neuromodulatorio. Su vida media es de 5-6 segundos. El *NO in vivo* se neutraliza rápidamente por la hemoglobina, y los aniones del superóxido.

A diferencia de los neurotransmisores establecidos, el *NO* es sintetizado según su demanda y no es almacenado en vesículas sinápticas ni liberado por exocitosis, simplemente difunde a medida que se produce desde el terminal del axón. Sus receptores moleculares incluyen una variedad de proteínas intracelulares y extracelulares. La mayor parte de sus acciones son consecuencia de interacciones intracelulares, por lo que es considerado principalmente como segundo mensajero (16, 17, 22). La actividad de los neurotransmisores convencionales finaliza por mecanismos de recaptura o degradación enzimática, pero en el caso del *NO*, su reacción continúa hasta que se agote el sustrato. Por lo tanto, el control de su síntesis es la llave para la regulación de su actividad.

### Síntesis del óxido nítrico

Una familia de enzimas, llamadas óxido nítrico sintetasas (*NOS*), catalizan la oxidación del aminoácido L-arginine para producir *NO* y L-citrulina. Tres isoformas de *NOS* han sido distinguidos; cada una es producida por diferentes grupos de genes y fueron nombradas por orden de descubrimiento:

- 1.- *NOS neuronal* (nNOS o NOS I) en trombocitos, células  $\beta$  del páncreas, en el músculo, pulmón, estómago, neuronas, células epiteliales del útero y células endoteliales de las arteriolas aferentes y eferentes.
- 2.- *NOS endotelial* (eNOS o NOS III) en trombocitos y células endoteliales.
- 3.- *NOS tipo macrófago o inducible* (iNOS o NOSII) se encontró en macrófagos, neutrófilos, células de Kúpffer y microglia.

Tanto nNOS y eNOS están normalmente expresadas en estos tejidos, por eso también son llamadas *constitutivas*. Se encuentran en el citosol y membranas celulares, su actividad depende de la concentración de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, producen *NO* en bajas cantidades, micromolares, y son muy importantes en la regulación de procesos fisiológicos.

La *iNOS* normalmente no se encuentra expresada, es sintetizada luego de la inducción por un estímulo inmunológico/ inflamatorio como endotoxinas bacterianas o citoquinas inflamatorias, como son  $TNF-\alpha$ , IL-6,

IL-1. Es independiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, produce *NO* en mayores cantidades, nanomolares, en períodos controlados y se considera que se expresan en cuadros patológicos. Su actividad aparece después de 6 - 8 horas de la inducción (tiempo en que se realiza la activación del gen y síntesis de la enzima).

Aunque todas las isoformas catalizan las mismas reacciones, cada una de ellas tiene su propia estructura y localización. Estas características determinan diferencias en los caminos de la activación, así como la especificidad de sus inhibidores. Las características del *NO* y las diferencias funcionales entre las isoformas de las *NOS* determinan su diverso rol en la regulación de muchos procesos fisiológicos y patológicos.

### **Acción biológica del óxido nítrico**

El *NO* actúa sobre las células directa e indirectamente. Una vez sintetizado, difunde a los tejidos vecinos, actuando sobre diversos sustratos, siendo el más importantes la enzima *guanilato ciclasa soluble*. Esta enzima activada cataliza la transformación de *guanosin trifosfato* (GTP) en *guanosin monofosfato cíclico* (GMPc) (16, 22, 17, 18, 19, 23).

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (LZW).

### Figura 3. Biosíntesis de óxido nítrico, según Esplugues.

El NO tiene múltiples e importantes efectos en variados tejidos. A nivel vascular, eNOS, es un potente vasodilatador, regula la presión arterial, inhibe la agregación plaquetaria y la adherencia de los neutrófilos activados (16, 17, 19).

La iNOS desempeña un papel importante en la supresión de actividad de bacterias, parásitos, virus y tumores. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, tiene efectos dañinos, viéndose su expresión aberrante en numerosas condiciones inflamatorias, como la enfermedad de Crohn, shock hemorrágico y en la patogénesis de la hipertensión arterial (16, 17, 19). También participaría en la patogénesis de enfermedades orales, como la enfermedad periodontal, en la que iNOS sería activada por la placa bacteriana, en quistes odontogénicos e

infección periapical, liquen plano oral, en desordenes témporo-mandibulares y en tumores de glándulas salivales (24, 25).

Las distintas isoformas de NOS determinan el papel del NO como regulador fisiológico, ejerciendo efectos beneficiosos el organismo o como agente tóxico. Tales efectos negativos se producen porque las altas cantidades persistentes del NO puede reaccionar con aniones del superóxido, el cuál genera compuestos altamente tóxicos (17, 19, 24).

### **Implicancia en funciones centrales y periféricas**

El NO, proveniente de la nNOS, tiene complejas influencias en el desarrollo cerebral, es modulador de variadas funciones fisiológicas, entre ellas la conformación de la memoria, el comportamiento y en la regulación de la neuroplasticidad. También esta implicado en la tolerancia opioide y de su retiro, ritmo circadiano, patrón respiratorio, regulación de la microcirculación, en respuestas neuroendocrinas, entre otras (16, 19).

Por último, juega un controvertido rol en la modulación dolorosa, con un doble efecto, siendo agente promotor de hiperalgesia, y a su vez con una intrincada participación en la vía moduladora analgésica (16).

El NO participa en la transmisor sin ptica, tanto a nivel central como a nivel periférico. El NO actúa como **neurotransmisor retrógrado**, como

fue mencionado en párrafos anteriores. Así, el *NO*, estaría implicado en la *neurotransmisión excitatoria glutamatergica* y en la potenciación del estímulo a largo plazo (16, 17, 18, 19).

Aunque la *nNOS* es considerada constitutiva, los niveles de actividad y expresión de ella parecen estar sujetos a una dinámica de *up* - o *down-regulación*, inducida por una gran variedad de estímulos, incluyendo injurias nerviosas y cerebrales, envejecimiento, tratamientos farmacológicos, lactancia, hipoxia, stress, gonadectomía y ejercicio (16). Es importante recalcar, para una adecuada comprensión de la actividad del *NO* en el dolor, que los distintos papeles que posee en la mayoría de los tejidos dependen de su concentración; así el *NO* producido por enzimas constitutivas es en muy pequeñas cantidades y por corto tiempo, en tanto que, el *NO* producido por la enzima inducible en respuesta a estímulos inflamatorios e infecciosos, se genera en cantidades mil veces mayores y por largo tiempo (17, 26).

### **NO y analgesia**

Trabajos experimentales, sugieren la participación de la vía L-arginina: el *NO* en la vía del dolor, específicamente en la analgesia periférica y central. Estos trabajos establecieron que la acetilcolina, que estimula la liberación del *NO* constitutivo, antagoniza la hiperalgesia

inducida en ratas por  $PGE_2$ , carragenina y ácido acético. Junto con esto, se demostró que donadores exógenos del  $NO$ , como nitroglicerina y nitroprusiato sódico, antagonizan la hiperalgesia provocada por un estímulo inflamatorio como  $PGE_2$ , carragenina, inflamación neurogénica, efectos bloqueados al inhibir  $GMPc$ , lo que sugiere que el efecto antinociceptivo del  $NO$  es mediado por la vía  $GMPc$ . Se observó también, que durante la inflamación experimental inducida por carragenina, la administración local de L-arginina produce antinocicepción, la que es bloqueada por inhibidores de la NOS. Estas afirmaciones provocaron una polémica, pues existen otros autores que sugieren que el  $NO$  tiene más bien un rol pro-nociceptivo en los estados de dolor inducidos por estímulos como carragenina, glutamato o formalina. Estas inconsistencias podrían deberse a múltiples motivos, incluyendo la complejidad de factores involucrados en la regulación del dolor, los que involucran la interacción de una amplia variedad de estímulos, la intensidad de los mismos y de otras condiciones asociadas a la enfermedad de base que ocasiona el dolor.

En este contexto, los resultados clínicos y experimentales sugieren que el  $NO$ , carece de una participación importante como mediador del dolor, bajo condiciones fisiológicas de producción endotelial o neuronal, por acción de NOS constitutivas. Sin embargo, en caso de lesión tisular,

luego de unas horas producida ésta, se induce la expresión de la *iNOS* que lleva a la producción prolongada del *NO* en distintas células, pasando a tener un rol en la hiperalgesia (26).

Es importante destacar que el rol del *NO* cambia según el tipo estímulo doloroso. La inhibición del *NO* produce antinocicepción cuando el dolor se debe a estímulos químicos o térmicos en nociceptores periféricos o en dolor visceral, y que la administración intratecal de L-arginina induce alodinia. En contraste, el bloqueo de la síntesis de *NO* exacerba el dolor en modelos de hiperalgesia mecánica. Sin embargo, el uso de ratones transgénicos (*knock-out* o carentes) solamente para *nNOS* no han aclarado estos resultados contradictorios. Así estos animales manifiestan una sensibilización normal a ciertos tipos de daños, sin modificaciones en el uso de inhibidores de *NOS* (16).

Este doble rol, podría deberse también a una regulación diferenciada del *NO* en fibras nerviosas aferentes o, a que actúa como un mensajero molecular diferenciado en distintas neuronas, dependiendo del carácter excitatorio o inhibitorio en una vía nociceptiva dada. Si actúa sobre neuronas excitatorias, el efecto resultante será hiperalgesia, en tanto que si el *NO* induce la activación de neuronas inhibitorias, el efecto resultante será hipoalgésia (26).

### **Inhibidores de las NOS**

Existe una gran cantidad de inhibidores para *NOS*, útiles en farmacología como herramientas que permiten identificar el rol del *NO* en procesos fisiológicos como patológicos. Estos inhibidores actúan sobre los 3 tipos de *NOS*, con moderada selectividad, con mayor potencia sobre un tipo de *NOS*, en relación a los 2 restantes. Son un grupo de sustratos análogos a L-arginina, capaces de bloquear la síntesis del *NO*. Los inhibidores más comunes son 7-NITROINDAZOL (7-NI), 3-BROMO-7-NITROINDAZOL, 6-NITROINDAZOL, L-NMMA, L-NNA y su Pro fármaco el N<sup>G</sup>-nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME). El L-NAME actúa como un inhibidor no selectivo de las *NOS*, mientras que 7-NI actúa preferentemente sobre *nNOS* (18, 22, 23).

### **Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroidales: AINES**

Los AINES corresponden a un conjunto de fármacos, con diferentes estructuras químicas. La mayoría son ácidos orgánicos débiles, derivados de los ácidos carboxílico y enólico. Su característica común es la inhibición de las ciclooxigenasas (COX), enzimas que inician la cascada de transformación del ácido araquidónico (AA) en PGs y tromboxanos, lo que les da ciertas características terapéuticas y efectos adversos que les son

similares (27). Aunque la mayoría de los componentes comparten las tres acciones que lo definen: *analgésica*, *antitérmica* y *antiinflamatoria*, su eficacia relativa para cada una de ellas puede ser diferente. Asimismo, su toxicidad puede coincidir con la del grupo o ser más o menos específica, es por eso que su uso clínico depende tanto de su eficacia como de su toxicidad relativa (6).

El mecanismo de acción comprende principalmente la bioinhibición de COX, enzima que inicia la cascada de transformación del AA. Este AA, está presente en membranas celulares, unido a fosfolípidos. Frente a un estímulo físico, químico o mecánico es liberado y metabolizado por COX, generando *endoperóxidos cíclicos inestables*, que se transforman en PGs y tromboxanos, sustancias llamadas genéricamente eicosanoides. La COX actúa oxigenando el AA, para así, formar PGG<sub>2</sub>., la que mediante una peroxidasa es reducida y forma PG H<sub>2</sub>.

Existen 3 isoformas fundamentales: COX-1, COX-2 Y COX-3. COX-1 es expresada constitutivamente en el organismo, en casi todos los tejidos y su expresión está relacionada con el control de funciones fisiológicas. COX-2 se expresa primariamente en órganos como cerebro, riñones y aparato reproductor femenino, sin embargo, tiene características de enzima inducible en determinadas células y bajo ciertas circunstancias

patológicas, mediante mediadores de la inflamación y citoquinas inflamatorias, como muestra el siguiente esquema, tomado de Florez:

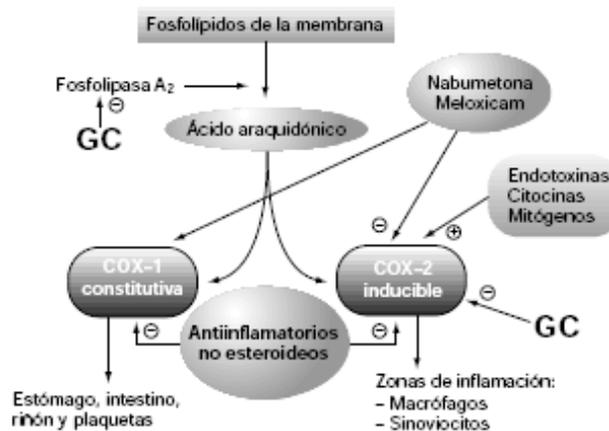


Figura 4. Representación esquemática de la acción de AINE, glucocorticoides (GC) e inductores de la expresión sobre COX-1 y COX-2.

La última isoenzima descubierta fue COX-3. Esta isoenzima sería constitutiva principalmente en el cerebro y moduladora del dolor. COX-3 es sensible a drogas analgésicas / antipiréticas como el paracetamol.

Algunos de estos eicosanoides participan en diversos grados en inflamación, dolor y fiebre, por lo que, la inhibición de su síntesis mediante AINES explica su actividad terapéutica, pero, debido a que también participan en procesos fisiológicos, dicha inhibición sería responsable de diversas reacciones adversas. Considerando que los eicosanoides son sólo una parte de los mediadores celulares involucrados una determinada

función o proceso patológico y que los AINES no inhiben el conjunto de la cascada biosintética que tiene su origen en el AA, se comprende la limitación que poseen estos fármacos (6, 28, 29).

Los AINES pueden ser clasificados según su estructura química y selectividad por las COXs, de acuerdo a Warner y Mitchell (28) en:

Structural class	COX-1- nonselective	COX-2- selective
alkanones	nabumetone	
anthranilic acids	meclofenamic acid, mefenamic acid	meclofenamate esters and amides
arylpropionic acids	ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproxen, SC560	celecoxib, etoricoxib, parecoxib, rofecoxib, valdecoxib
diarylheterocycles		darbufelone
di-tert-butyl phenols		meloxicam
enolic acids	piroxicam, tenoxicam, phenylbutazone	lumiracoxib
heteroaryl acetic acids	diclofenac, ketorolac, tolmetin	etodolac, indomethacin amides (and esters)
indole and indene acetic acids	indomethacin, sulindac	
para-aminophenol derivatives	acetaminophen	
salicylic acid derivatives	aspirin, diflunisal, sulfasalazine	o-(acetoxyphenyl)hept-2-ynyl sulfide (APHS)
sulfanilides		nimesulide, flosulide

La mayoría de los AINES, actualmente disponibles, inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de ambas isoformas, siendo en mayor medida la de COX-1. Aunque los mecanismos de inhibición son algo diferentes, la mayoría inhibe la enzima de forma *estereoespecífica*, *competitiva* y *reversible*. Existen diferencias en la actividad de la COX en los diversos tejidos o en su susceptibilidad a la acción inhibitoria de los distintos AINES. Esto puede indicar que otras acciones de los AINES, independientes de la inhibición de la COX, contribuyen a algunos de sus efectos terapéuticos.

Si a ello se suman las diferencias en la selectividad a la inhibición de COX-1 y COX-2, y sus diferencias farmacocinéticas, que condicionan una diferente difusión tisular, celular o subcelular, podemos empezar a entender la diversa potencia y espectro de acción farmacológica (6). Además se sabe que la COX-2 es también constitutiva en algunos tejidos y COX-1 puede estar sobre-expresada durante la inflamación. Esto implica que la inhibición de ambas isoenzimas sería necesaria para obtener una reducción del dolor, y por otro lado, la inhibición de cualquiera de las dos isoenzimas induciría algún efecto no deseado. La potencia y efectividad de los AINES con diferente selectividad por las isoenzimas de COX no es todavía clara (30).

La actividad antiálgica de los AINES es moderada. Son útiles en dolores articulares, musculares, dentarios y cefaleas de diversa etiología, incluidas las formas moderadas de migraña. Están indicados especialmente en dolores caracterizados por una destacada participación de las PGs. Se ha aceptado que la acción analgésica de los AINES tiene lugar a nivel periférico, inhibiendo la síntesis de las PGs producidas durante la inflamación, sin embargo, no existe una correlación precisa entre la actividad anticiclooxigenasa *in vitro* y el efecto analgésico en todos los modelos de dolor experimental o clínico. Además, existen mediadores

celulares no prostaglandínicos que también estimulan a nociceptores periféricos, sobre los que apenas se conoce el efecto de los AINES.

Autores sugieren que algunos AINES pueden tener un lugar de acción central. Pese a que no existe una hipótesis unitaria, se proponen, entre otros, los siguientes mecanismos de acción central: a) inhibición de la síntesis de PGs a nivel medular y cerebral b) incorporación a la membrana plasmática, modificando su viscosidad e interfiriendo en la generación de las señales de transducción dependientes de proteínas G; c) activación de vías serotoninérgicas descendentes inhibitorias de la información dolorosa; d) *down-regulation* del sitio modulador *redox* del complejo receptor *NMDA-canal iónico*, y e) abolición de la inducción por aminoácidos excitatorios de genes de expresión inmediata (6).

Existen evidencias que el efecto analgésico es modulado por fármacos que interactúan con otros receptores, como por ejemplo agentes adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, nitridérgicos. Así se ha demostrado que con el uso de antagonistas no selectivos y selectivos de diversos neurotransmisores (atropina, tropisetron, L-NAME, etc) se puede modificar los efectos analgésicos de los AINES, aumentándolos o disminuyéndolos, alterando factores que intervienen en el proceso nociceptivo, ya sea a nivel de los receptores involucrados en él; por

modificación de la conductancia de ciertos iones,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ; por interferir con la señal intracelular emergente de los mediadores celulares; por modificar el sistema de control del dolor inhibitorio descendente; por influir en la endógenos analgésicos o en la liberación de sustancias algógenas (4, 5, 6, 7, 8) . Por otra parte, existen estudios en los que se demuestra que el efecto antinociceptivo del AINE ketorolaco esta mediado por *NO*, debido a la activación de *NOS* en el tejido dañado (31).

### **Efectos adversos de los AINES (RAM)**

La mayoría de ellos se presentan en consumos crónicos y altas dosis, y se relacionar con la inhibición de PGs. La tendencia a producir algunas reacciones tóxicas las varían según el AINE utilizado (26).

Las principales RAM que presentan los AINES están relacionadas con problemas gastrointestinales; renales; fenómenos hipersensibilidad; reacciones hematológicas; inhibición de la motilidad uterina en el embarazo y su inducción al *cierre prematuro del conducto arterioso* (6, 27, 28).

## Dexketoprofeno

El *dexketoprofeno (DKP) trometamol* es una sal hidrosoluble y liposoluble, proveniente del enantiómero dextrorrotatorio del ketoprofeno. Pertenece a la familia de los ácidos propiónicos. Usado como fármaco analgésico, antipirético y antiinflamatorio, siendo uno de los inhibidores más potentes de PGs *in vitro*. El ketoprofeno es una mezcla racémica, compuesta por iguales cantidades de dos enantiómeros, R (-) y S (+), siendo su forma *dextrorrotatoria* la molécula activa, mientras el enantiómero R (-) carece de dicha actividad.

Los *enantiómeros* son moléculas que presentan una estructura espacial particular, denominada *quiralidad*. Esta es una característica de algunas moléculas, debida a la presencia de un átomo de carbono asimétrico, presentando la misma composición química pero diferente configuración tridimensional. Así, pueden existir en el espacio en dos formas diferentes que son imágenes *especulares* entre sí y no superponibles. Los enantiómeros se diferencian por *asimetría estereoquímica*. El enantiómero en que la dirección sigue las agujas del reloj se le asigna la letra R (*rectus*, derecha) y a aquel en que el orden es antihorario la letra S (*sinistra*, izquierda). Las propiedades físicas de los enantiómeros también difieren, en los AINES, los enantiómeros S son

dextrógiros (desvían la luz polarizada hacia la derecha) y los R son levógiros (desvían la luz polarizada hacia la izquierda). En nomenclatura química los compuestos dextrógiros se designan con el signo (+) o la letra D y los levógiros con el signo (-) o la letra L.

Ahora bien, la acción de los AINES está dada por el bloqueo de las COXs, mediante una disposición espacial complementaria entre ellos. Esta unión provoca un cambio estructural en la enzima, inactivándola. Así, en los AINES *quirales*, las COX sólo reaccionan con los enantiómeros que les son complementarios, los S (+), pues su forma R (-) es desprovista de tal actividad sobre su receptor específico (6, 32), ver figura 5:

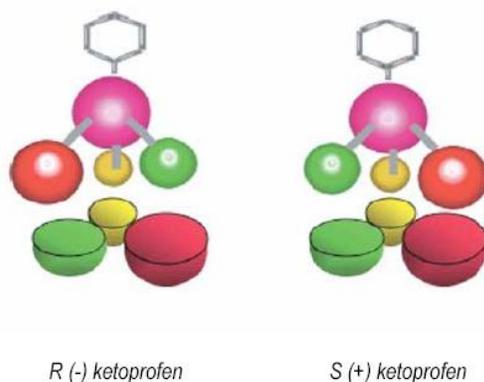


Figura 5. Unión a receptor específico. En este caso, solo el enantiómero S (+) es capaz de bloquear a la COX.

### **Características farmacocinéticas del dexketoprofeno**

El ketoprofeno racémico actúa por inhibición competitiva y reversible de COX 1 y en menor medida de COX 2. Este exhibe una pequeña estereo-selectividad en su farmacocinética. El *DKP* administrado por vía oral se absorbe en el intestino delgado. El *DKP*, ácido S (+)-2 (3-benzoilfenil) propiónico, corresponde al isómero ácido, el cual es convertido en *sal TRIS* (trometamol) aumentando su solubilidad, mejorando su perfil cinético. Estudios farmacocinéticos en voluntarios sanos demostraron que este fármaco posee un rango de velocidad de absorción más alto que su forma ácida libre y que el racemato, lo que le permite en un corto tiempo alcanzar la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) del *DKP trometamol* con un tiempo máximo ( $T_{max}$ ) de 0.25 –0.75 hr, comparados con *DKP ácido* ( $T_{max}$ . 0.5- 3. hr.) y ketoprofeno racémico ( $T_{max}$ : 0.25-3.0 hr.); las tres formas contenían cantidades equivalentes del enantiómero S (+). Estos valores para *DKP trometamol*, generan un inicio en la analgesia más rápido y confiable, comparado con las otras formulaciones, considerado potencialmente útil en casos de dolor agudo (1, 32). La eficacia analgésica del enantiómero S (+) puro, es similar a la observada con una doble dosis del compuesto racémico. En dosis

mayores a 7 mg. el *DKP* fue significativamente superior a placebos en dolor moderado a severo (1, 30).

La  $C_{max}$  del enantiómero S(+) después de la administración del *DKP trometamol* fue más alta y mejor tolerada (3.71 +/- 0.72 mg/L) que las obtenidas luego de la administración de la droga racémica (2.72 +/- 1.25 mg/L) y *DKP ácido* (2.02 +/- 0.7 mg/L); sin embargo, la biodisponibilidad relativa, medida por la valores del área bajo la curva versus concentración plasmática, con un tiempo para el enantiómero S (+), fue similar para las tres formulaciones. En la relación dosis- respuesta se vio que la diferencia entre las dosis de 12.5 mg y de 25 mg, radicaba en una mayor duración de la analgesia, mas que a un aumento en su *peak*, por lo que se propone que en dosis de 25 mg se produce un plateau en la curva. Así, en el ser humano, la biodisponibilidad relativa del *DKP* oral en dosis de 25 mg es similar a la del ketoprofeno racémico oral de 50 mg.

El *DKP* no se acumula en el tejido graso significativamente cuando se administra en dosis de 25 mg 3 veces al día. Al ser ingerido con comida se reduce la tasa de absorción. Presenta una fuerte unión a proteínas plasmáticas, especialmente la albúmina, cercana a un 98%. Es metabolizado en el hígado, por las enzimas citocromo P450. La droga tiene un alto número de metabolitos, principalmente derivados hidroxilos.

Su excreción es renal, aproximadamente 70-80% en 12 horas, sin presencia de la droga original en la orina (1, 30, 32).

Informes sugieren que enantiómeros R (-) de algunos derivados ácidos propiónicos podrían exhibir actividad analgésica a través de mecanismos no relacionados con las PGs. Un estudio demostró que 100 mg de R (-) de ketoprofeno es tan eficaz como 1000 mg del paracetamol en el postoperatorio por dolor dental. Aunque el paracetamol de 1000 mg posee una analgesia más rápida el inicio (45 vs. 60 minutos) que 100 mg del R (-) de ketoprofeno, la duración de la acción analgésica parece ser equivalente. La dosis 25 mg del R (-) de ketoprofeno no fue estadísticamente superior al placebo. La acción analgésica de R (-) puede ser explicada por la bioinversión de R (-) a S (+) del enantiómero, según lo demostrado en voluntarios sanos. El uso de una droga enantioméricamente pura es justificado si proporciona una cierta ventaja clínica sobre el uso del racemato, como es este el caso. Además, enantiómero R (-) del ketoprofeno posee un bajo índice bioinversión a S (+) en los seres humanos (menor al 15%) (1, 30).

### **Indicación y eficacia analgésica**

Indicado para el tratamiento del dolor agudo de leve a moderado en odontalgias, alivio del dolor postoperatorio en cirugía bucal y en afecciones musculoesqueletales dolorosas como osteoartritis, esto es gracias a su rápida acción analgésica, potente acción antiinflamatoria y sus reducidos efectos secundarios (1, 30, 33). El *DKP* atraviesa la *barrera hematoencefálica*, planteando un efecto analgésico a nivel central, distinto a la acción analgésica que puede ejercer en el sitio de la injuria (30).

Comparado con Ibuprofeno de 600 mg, en el manejo del dolor post exodoncia de terceros molares incluidos o semiincluidos, se comprobó que el *DKP* es más efectivo en la primera hora tras la intervención y su duración analgésica es de 5.30 horas, mientras que la duración analgésica del Ibuprofeno es de 6 horas tras su administración (32). Otro estudio comparó la eficacia y tolerancia de *DKP* v/s tramadol. El *DKP* demostró ser tan efectivo como tramadol 50 mg durante los tres primeros días del post-operatorio en cirugía ortopédica (33). El *DKP trometamol* al ser comparado con rofecobix no mostró diferencias estadísticamente significativas, siendo eficientes analgésicos para el tratamiento del dolor en cirugías de extracción de terceros molares mandibulares. Ambos fueron igualmente bien tolerados (2).

### **Efectos adversos**

Las complicaciones gastrointestinales es el efecto nocivo más común del ketoprofeno racémico, sin embargo, la acción ulcerogénica del DKP trometamol es muy baja: 5 veces menor. Su rápida absorción parece ofrecer alguna protección frente a complicaciones gastrointestinales provocadas por irritación directa de la mucosa gástrica independiente de la inhibición de la COX-1 (1, 32). Se ha publicado un estudio con 6 casos de dermatitis fotoalérgica debido al uso del *DKP* tópico y su posterior exposición al sol. Sin embargo, 2 de ellos presentaban historias previas de fotoalergia por aplicación de ketoprofeno, y los casos restantes una sensibilización previa a este fármaco. Esto sugiere que existiría una reacción cruzada entre *DKP* y ketoprofeno (34).

### **Implicancias terapéuticas de las propiedades farmacocinéticas**

El uso del enantiómero activo tiene numerosas ventajas clínicas potenciales, incluyendo un perfil farmacológico mejorado, reducción de complejas interacciones de la droga y una farmacocinética mejorada.

El DKP requiere la mitad de la dosis para tener el mismo efecto, que el ketoprofeno, reduciendo la carga hepática, renal y la cantidad total de metabolitos formados. Sus ventajas radican en sus propiedades

farmacocinéticas y perfil de tolerabilidad. Con mejores valores  $C_{max}$  y  $T_{max}$  en la administración de la sal, comparada a la forma ácida y al racemato, con un comienzo más rápido de su acción analgésica. Además reduce al mínimo su toxicidad, interacciones y efectos tóxicos atribuidos al enantiómero inactivo R (-). Posee un perfil de tolerabilidad mejorado, con un menor potencial de ulceración gástrica (1).

## **HIPÓTESIS**

La administración de dexketoprofeno produce actividad antinociceptiva, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial, que es modulada por el sistema nitridérgico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comprobar la actividad antinociceptiva del dexketoprofeno, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones, determinando la participación de la vía NO-GMPc en dicha actividad.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la antinocicepción inducida por la administración del dexketoprofeno en el test orofacial de la formalina.
2. Evaluar el efecto modulador de N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina en la analgesia inducida por el dexketoprofeno.
3. Evaluar el efecto modulador de 7- nitroindazol en la analgesia inducida por el dexketoprofeno.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Animales.

En el estudio fueron usados 140 ratones de la cepa CF/1 (*Mus musculus*) machos de 28 a 30 gramos de peso. Todos los animales fueron aclimatados al ambiente del laboratorio al menos dos horas antes de la experimentación (35), la que se realizó según el protocolo *CBA N° 238 FMUCH* aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Cada animal seleccionado aleatoriamente, fue usado una vez y recibió solo una dosis de las drogas estudiadas. Los animales fueron tratados con formalina subcutánea al 5% y distribuidos para cada tratamiento de la siguiente forma:

- 1.- Grupo control: 28 ratones inyectados con suero salino.
- 2.- Grupo para determinar dosis de dexketoprofeno a utilizarse: 24 ratones
- 3.- Grupo de ratones tratados con L-NAME 1 mg /Kg.: 6; y con L-NAME 5mg/Kg.: 6.
- 4.- Grupo pretratado con L-NAME 1mg/Kg. y dexketoprofeno: 24 ratones.
- 5.- Grupo de ratones tratados con 7-NI 0.1 mg /Kg.: 6; y con 7-NI de 1 mg /Kg.: 6.
- 6.- Grupo pretratado con 7-NI 1mg/Kg. y dexketoprofeno: 24 ratones.

Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de realizado el experimento, mediante el método de dislocación cervical, realizado por personal experimentado.

## **2. Test de la formalina orofacial**

La evaluación de la analgesia se efectuó mediante el test algesiométrico orofacial de la formalina, que permite medir dolor originado en la estimulación del nervio trigémino. Para ello se inyectó, por vía subcutánea, 20  $\mu$ L de solución de formalina al 5% en el labio superior derecho del animal, justo lateral a la nariz. Esta prueba muestra un curso bifásico: una fase temprana, dada por la activación de nociceptores que sigue a la injuria corrosiva que produce el irritante (fase I) y una tardía, debida a la organización de un foco inflamatorio en el sitio de la injuria y la sensibilización central y periférica que ello conlleva (fase II). Tras la aplicación de formalina aparecen respuestas conductuales, manifestado como el rascado del área perinasal, tanto con la pata delantera y trasera ipsilateral, como con las dos patas delanteras. (9, 35) El estímulo químico generado por la formalina se puede calificar como nocivo, puesto que produce lesión del tejido fino, activa nociceptores A $\delta$  y C, en neuronas nociceptivas espinales como trigeminales y se siente como doloroso en el

hombre (35). Los ratones fueron colocados en un cilindro transparente, inmediatamente después de la administración de la formalina y se registró, por medio de un cronómetro digital, el tiempo total de rascado perinasal, durante los 5 minutos inmediatos a la inyección, correspondientes a la fase I. Luego se registró por 10 minutos, a partir de los 20 minutos de la inyección y hasta los 30 minutos, el tiempo total durante el cual se frotaron el labio comprometido y que corresponde a la fase inflamatoria, mediado por fibras C (fase II). No se contabiliza el tiempo entre la fase algésica y la inflamatoria, debido a que el ratón se encuentra en un período de quietud. Los resultados se expresaron como porcentaje de efecto antinociceptivo máximo (% MPE) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ AN} = 100 - [\text{TE} / \text{TC} \times 100]$$

donde:

**TE** = tiempo de rascado de los animales inyectados con droga.

**TC**= tiempo de rascado de los animales inyectados con solución salina fisiológica.



Fotografía 1. Ratones rascándose el labio superior derecho luego de inyección con formalina. En el último cuadro se observa el labio superior derecho inflamado luego de la inyección con formalina.

### **3. Evaluación de la analgesia**

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se construyeron curvas dosis-respuesta del AINE (3-100 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal (i.p.) con un mínimo de 6 animales por cada uno, de al menos 4 dosis. La droga fue disuelta en solución salina y administrada por vía i.p., en un volumen constante de 10 mL/Kg., 30 minutos antes del ensayo algesiométrico, tiempo en que se alcanza el efecto analgésico máximo determinado previamente. Los animales usados como grupo control fueron tratados con salino i.p. al 0.9 %. A partir de la curva dosis-respuesta se calculó, por regresión lineal, la dosis que produjo un 50 % del MPE, la cual se utilizó para el estudio de la modulación nitridérgica.



Fotografía 2. Administración de droga i.p. y en el labio superior derecho.

#### **4. Estudio de la modulación nitridérgica:**

Para esto los animales fueron pretratados con 1 o 5 mg/Kg. de L-NAME, o con 0.1 o 1 mg/Kg. de 7-NI y se repitieron las curvas dosis-respuesta del DKP. Los fármacos se administraron *i.p.* en un volumen constante, de 10 mL/kg. El ensayo de la formalina se realizó a los 30 minutos después de la administración de los fármacos. Para analizar la modulación nitridérgica, sin interferir significativamente con la actividad antinociceptiva del DKP, y considerando los efectos intrínsecos de los inhibidores de la NOS, en el test orofacial, se eligieron las dosis de 1 mg/kg de L-NAME y de 0.1 mg/kg de 7-NI. El análisis de la modulación se efectuó evaluando el desplazamiento de la curva dosis-respuesta del DKP, por efecto de L-NAME o 7-NI y de los cambios de los valores de la DE50 (dosis que produce un 50 % del efecto máximo). En el caso que la

interacción es de naturaleza sinérgica, la curva dosis-respuesta se desplazó hacia la izquierda, con una consecuente disminución significativa del valor de DE50. En el caso contrario, en una interacción antagónica, el desplazamiento es hacia la derecha y existe un incremento significativo del valor de DE50. Por último, no hay desplazamiento de la curva y si no existe cambio significativo de DE50, si la modulación es aditiva.

Las observaciones fueron hechas en forma randomizada, ciega y controladas con solución salina, y de acuerdo a las normas éticas internacionales que rigen este tipo de experimentación, el número de animales utilizados fue el mínimo estrictamente necesario, para un correcto análisis estadístico. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (SEM). El análisis estadístico de los datos obtenidos y su valor significativo se determinó por análisis de varianza (ANOVA) y pruebas t de Student, considerando la significación a un nivel del 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### 1.- Grupo control

La administración de formalina al 5 % en ratones previamente tratados con suero salino, produjo un tiempo de rascado de  $133.71 \pm 4.70$  segundos en la fase I y de  $163.2 \pm 4.40$  segundos en la fase II.

### 2.- Determinación de la DE50 para dexketoprofeno

Al administrar DKP, indujo una respuesta antinociceptiva dosis-dependiente, como se observa en la figura 7. La DE 50, en mg/Kg., del DKP resultó ser  $16.11 \pm 2.60$  para la fase I y de  $54.70 \pm 8.9$  para la fase II. Las curvas dosis-respuesta fueron estadísticamente paralelas y la potencia relativa del DXP resultó ser 3.4 veces más potente en la fase II comparada con la fase I. Estos resultados se muestran en la figura 6.

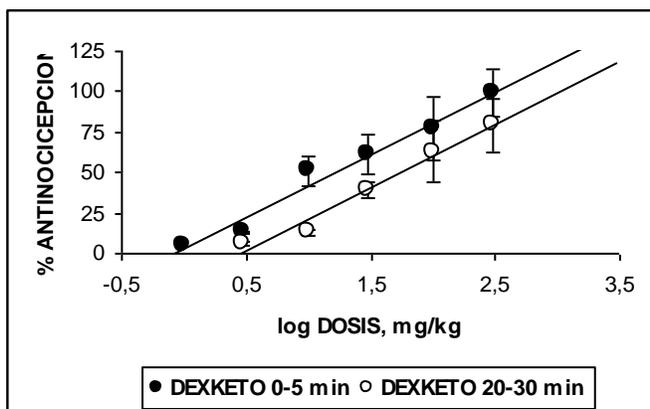


Figura 6. Curva dosis-respuesta del DKP en el ensayo de la formalina orofacial en las fases I y II. Cada punto representa el promedio de al menos 6 animales con sus respectivos SEM. Todos los puntos son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

### 3.- Grupo tratado con L-NAME.

El grupo tratado con L-NAME (1mg/Kg.) produjo  $75.33 \pm 9.11$  seg. de rascado en la fase I y  $64.33 \pm 11.23$  segundos en la fase II. En cambio, la administración de 5 mg/Kg. i.p. de L-NAME indujo  $60.20 \pm 11.14$  seg. de rascado en la primera fase y  $54.00 \pm 13.50$  seg. en la fase II. Estos resultados se muestran en la figura 7.

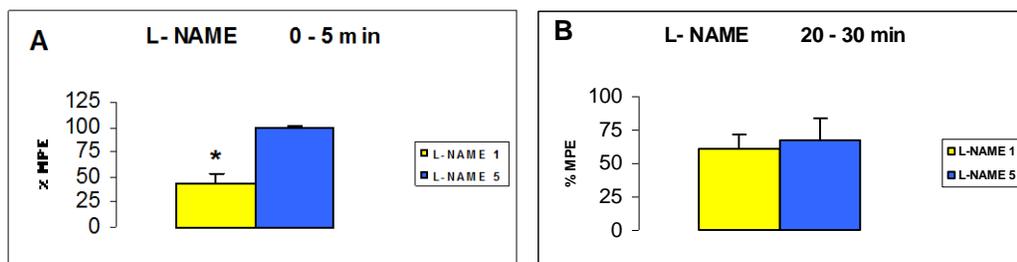


Figura 7. Histograma del efecto de L-NAME en el ensayo de la formalina orofacial. A= fase I y B= fase II. Cada columna es el promedio con su respectivo SEM. \*  $p < 0.05$ .

#### .4.- Grupo tratado con dexketoprofeno y L-NAME

El pretratamiento de L-NAME no produjo cambios en el tiempo de rascado en la fase I, evidenciado por una falta de desplazamiento de la curva dosis-respuesta y DE50 obtenida fue de  $16.96 \pm 2.6$  mg/Kg., valor no es estadísticamente significativo con respecto al valor del DKP solo, ver figura 8 y 9.

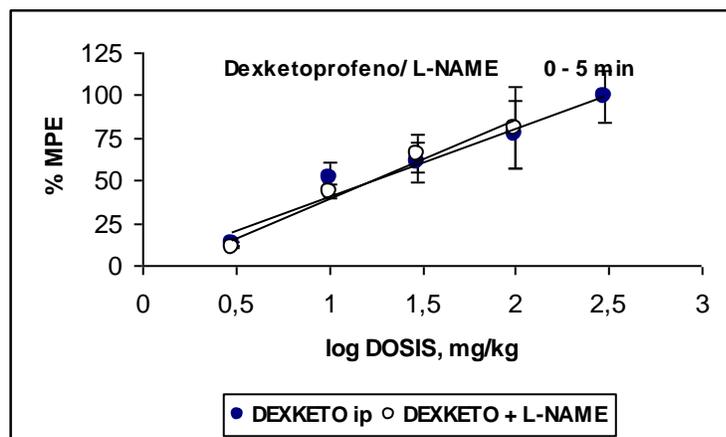


Figura 8. Curva dosis-respuesta a DKP, en la fase I, después del pretratamiento con 1 mg/Kg. de L-NAME. Cada punto representa el promedio de al menos 6 animales con sus respectivos SEM.

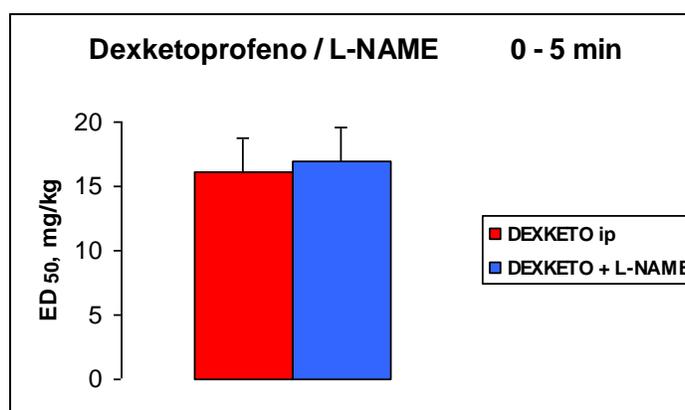


Figura 9. Histograma del efecto de L-NAME en la actividad de DE50 del DKP en el ensayo de la formalina orofacial en la fase I. Cada columna representa el promedio con su respectivo SEM.

En cambio, el pretratamiento con 1 mg/Kg. i.p. de L-NAME produjo un cambio significativo en el tiempo de rascado inducido por la administración

orofacial de formalina en la fase II, ya que la curva dosis-respuesta del DXP se desplazó hacia la izquierda y se obtuvo una DE50 de  $15.96 \pm 2.5$  mg/Kg. ( $P < 0.05$ ). Estos cambios se grafican en la figura 10 y 11.

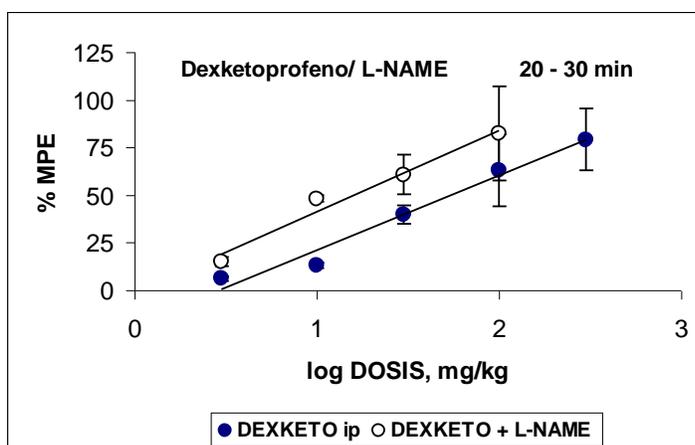


Figura 10. Curva dosis-respuesta a DKP, fase II, luego del pretratamiento con 1 mg/Kg. de L-NAME, en el ensayo de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio de al menos 6 animales con sus respectivos SEM y todos ellos son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

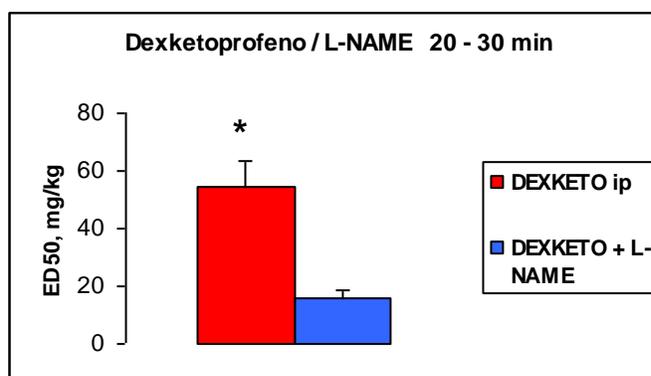


Figura 11. Histograma del efecto de L-NAME en la actividad de DE50 de DKP en el ensayo de la formalina orofacial en la fase II. Cada columna representa el promedio con su respectivo SEM. \*  $p < 0.05$

### 5.- Grupo tratado con 7-NI

El grupo tratado con 7-NI (0.1mg/Kg.) produjo  $81.00 \pm 10.65$  seg. de rascado en la fase I y  $137.75 \pm 6.82$  seg. en la fase II. En cambio, la administración de 1 mg/Kg. i.p. de 7-NI indujo  $44.17 \pm 5.69$  seg. de rascado en la fase I y  $51.00 \pm 10.19$  seg. en la fase II. Ver figura 12.

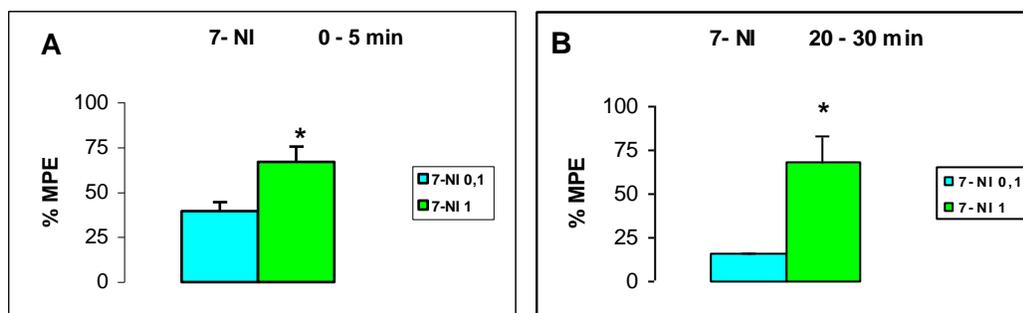


Figura 12. Histograma del efecto de 7- NI en el ensayo de la formalina orofacial. A= fase I y B = fase II. Cada columna con su respectivo SEM. \* $p < 0.05$ .

### 6.- Grupo tratado con dexketoprofeno y 7-NI

La administración de 7-NI, 30 minutos antes de la administración del DKP, produjo un cambio significativo en el tiempo de rascado inducido por la administración orofacial de formalina en ambas fases, ya que las curvas dosis-respuesta del DKP se desplazaron hacia la izquierda y se obtuvo una  $DE_{50} 1.62 \pm 0.50$  mg/Kg. ( $p < 0.05$ ) y de  $9.11 \pm 1.10$  mg/Kg.

( $p < 0.05$ ) para la fase I y fase II, respectivamente. Estos cambios se grafican en la figura 13, 14 y 15.

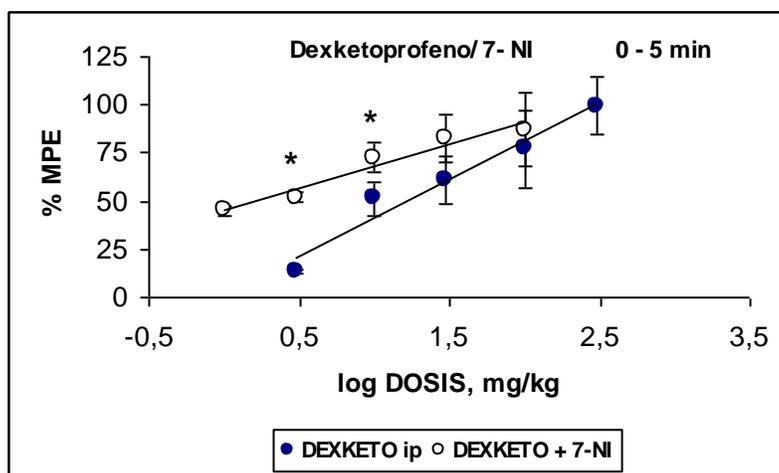


Figura 13. Curva dosis-respuesta a DKP, en la fase I, después del pretratamiento con 0.1 mg/Kg. de 7-NI, en el ensayo de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio de al menos 6 animales con sus respectivos SEM. \*  $p < 0.05$ .

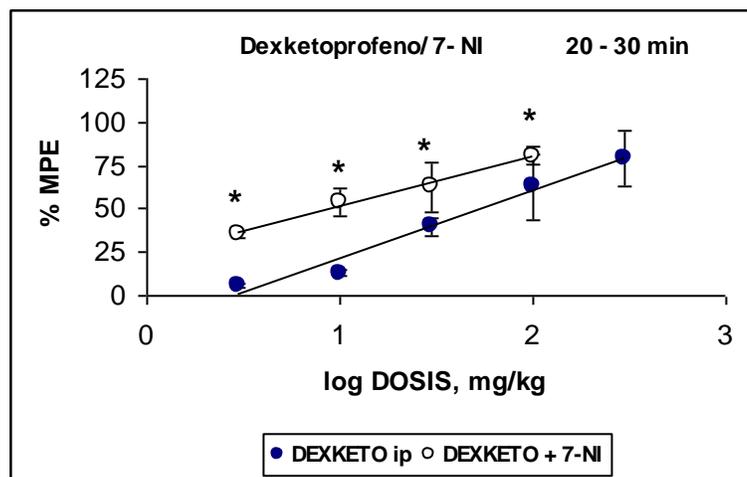


Figura 14. Curva dosis-respuesta a DKP, fase II, luego del pretratamiento con 0.1 mg/Kg. de 7-NI, en el ensayo de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio de al menos 6 animales con sus respectivos SEM. \*  $p < 0.05$ .

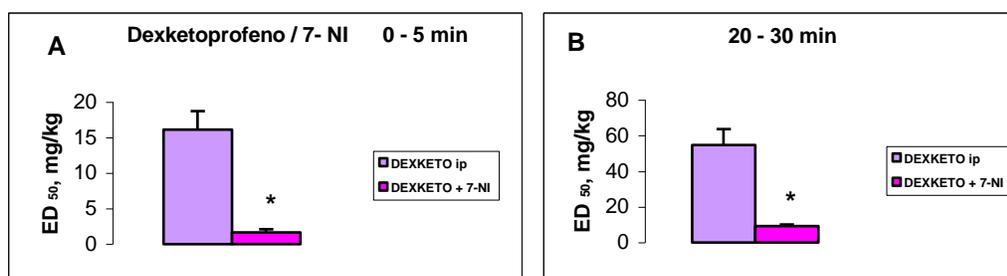


Figura 15. Histograma del efecto de 7-NI en la actividad de la DE50 del DKP en el ensayo de la formalina orofacial. A= fase I y B= fase II. Cada columna representa el promedio con su respectivo SEM. \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSION

La administración subcutánea de formalina en el labio superior del ratón indujo una conducta nociceptiva reproducible, resultado consistente con los de una publicación reciente, en que se describe el curso temporal del efecto nociceptivo de la inyección subcutánea de formalina en la región orofacial de la rata. Por otra parte, concuerda con lo informado, que la inyección de formalina en el hombre induce un intenso dolor. Entre los agentes comprometidos en la generación del dolor se mencionan los mediadores inflamatorios, como sustancia P, histamina, entre otros (35)

La actividad antinociceptiva del DKP, puede deberse a la capacidad de este AINE de inhibir, en forma no selectiva tanto a COX-1 como a COX-2. Además se ha descrito una acción a nivel central, capaz de inhibir la síntesis de eicosanoides, los que han sido señalados como mediadores proinflamatorios, que producen una disminución del umbral de descarga de las neuronas nociceptivas, facilitando la transmisión del impulso nervioso (1, 30, 31, 32).

La falta de efecto del pretratamiento de los animales con 1 mg/Kg. de L-NAME en la primera fase, es concordante con lo informado previamente, que la administración i.p. o intracerebroventricular de este inhibidor de NOS, carece prácticamente de efecto en la fase I de la

formalina. La explicación de este hallazgo, podría radicar en que la vía NO- GMPc no está comprometida en los procesos nociceptivos espinales y trigeminales, evocados por bajas concentraciones de agentes nociceptivos inducidos por formalina (36). Ahora bien, se podría hipotetizar que, la cinética de bioinhibición de las NOS podría ser diferente, alcanzando a la nNOS en último término dado su característica de no selectividad. Sin embargo, entre los 20 a 30 minutos de la fase II, produjo una actividad antinociceptiva dosis dependiente de tipo sinérgico. Esto se podría explicar por la inhibición no selectiva que ejerce L-NAME sobre NOS, que en un largo plazo logra inhibir a la nNOS evitando la formación de NO y con ello inhibiendo su función moduladora, que en este caso sería como agente pronociceptivo, pues su ausencia genera un aumento en la analgesia. Estos hallazgos concuerdan con los descrito previamente, en que NO puede producir analgesia o hiperalgesia, según el tipo de ensayo algesiométrico. En pruebas químicas su rol sería hiperalgésico (16).

La sinergia obtenida con la administración previa de 7-NI, en la actividad analgésica del DKP en ambas fases, podría explicarse por la mayor selectividad que presenta 7- NI para inhibir a nNOS, la que tendría un rol pronociceptivo en la vía NO-GMPc. Por otra parte, dado que 7-NI,

es un inhibidor de NOS competitivo y reversible, su cinética le permite alcanzar concentraciones mayores y en menor tiempo en la biofase, a diferencia de L-NAME, por lo que inhibe con mayor eficacia a la nNOS. Esto se traduce en una más efectiva modulación de la nocicepción trigeminal en el test de la formalina orofacial.

El hecho que la modulación de la analgesia no sea en forma completamente eficaz, podría indicar que la vía NO-GMPc no es la única que estaría modulando la nocicepción trigeminal, lo que concuerda con los antecedentes antes presentados en el marco teórico (13, 14, 15, 21).

En conclusión la administración de DKP produce efectos antinociceptivos, parcialmente dependientes de la modulación del sistema NO-GMPc en el test de la formalina orofacial. Este hallazgo permite sugerir la exploración de asociaciones farmacológicas con donadores de NO, evaluando cuidadosamente sus efectos colaterales y así, contribuyendo en forma significativa al incremento de alternativas en analgesia bimodal, para el tratamiento farmacológico del dolor agudo postoperatorio, como también para el tratamiento del dolor crónico.

### **Conclusiones**

1. La administración de DKP vía i.p. induce una acción antinociceptiva dosis-dependiente en el ensayo de la formalina orofacial.
2. El pretratamiento con L-NAME no altera la actividad analgésica del DKP en la primera fase de test utilizado.
3. El pretratamiento con L-NAME produce un efecto sinérgico en la actividad antinociceptiva del DKP, en la segunda fase del test de la formalina orofacial.
4. El pretratamiento con 7-NI produce un aumento de la actividad antinociceptiva del DKP de tipo sinérgico, en ambas fases del ensayo orofacial.
5. Existe una participación del sistema nitridérgico en la actividad del DKP en la vía trigeminal en el test de la formalina orofacial de tipo hiperalgésico.
6. Los resultados obtenidos, sugieren que la vía NO-GMPc no es la única que modula la nocicepción trigeminal.
7. Los hallazgos del presente trabajo permiten explorar una vía alternativa para el tratamiento farmacológico del dolor.

### **Sugerencias**

En el presente trabajo se demuestra el desarrollo de la actividad antinociceptiva del DKP, modulado por la vía NO-GMPc, en el test de la formalina orofacial. De este estudio surge la necesidad de realizar las mismas curvas dosis- respuesta, evaluando con el mismo test, la participación de otras vías involucradas en la modulación nociceptiva, tales como: adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, entre otros, para determinar cual de ellas es la más relevante en cuanto a participación y cual es la más apropiada para nuevas alternativas de tratamiento.

Sería interesante también evaluar combinaciones de otros tipos de AINES con inhibidores de la NOS, estudiándolos tanto en este test como en otros ensayos algesiométricos y modificando las vías de administración.

## Resumen

En el presente trabajo se investigó si existe modulación de la vía NO-GMPc en la actividad antinociceptiva del dexketoprofeno en el dolor trigeminal, en el modelo de la formalina orofacial. Se estudió en ratones el rol del sistema *NO-GMPc*, pretratándolos por vía i.p. con 1 ó 5 mg/Kg. de L-NAME, o con 0.1 ó 1 mg/Kg. de 7-NI. El análisis de la modulación nitridérgica se efectuó evaluando el desplazamiento de la curva dosis-respuesta del DKP, por efecto de L-NAME o 7-NI y de los cambios del 50% de los valores de la dosis efectiva (DE50). De los 2 inhibidores de la NOS, sólo 7-NI presentó efecto sobre la ED50 del dexketoprofeno, sin embargo, a mayores concentraciones, ambos inhibidores incrementaron significativamente la eficacia de la ED50 del dexketoprofeno. Se concluye que existe una interacción sinérgica entre el dexketoprofeno y los inhibidores de la NOS en el test de la formalina orofacial. Este hallazgo podría ser de utilidad clínica por sus proyecciones en asociar analgésicos con inhibidores de NOS, lo que permitiría obtener sinergismo analgésico, el que permite disminuir los posibles efectos colaterales, y ser útiles en el tratamiento farmacológico del dolor.

## Bibliografía

1. Barbanoj MJ, Antonijoan RM, and Gich I. Clinical Pharmacokinetics of Dexketoprofen Clin Pharmacokinet. 40 (4): 245-262. 2001
2. Jackson ID, Heidemann BH, Wilson J, Power I, Brown RD. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial comparing rofecoxib with dexketoprofen trometamol in surgical dentistry. Br J Anaesthesia 92 (5): 675- 680. 2004.
3. Tucker GT. Chiral Switches. Lancet 355: 1085 – 87. 2000
4. Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception Anesth Anal. 93: 430-435. 2001.
5. Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. Br J Pharmacol. 135: 1591-1597, 2002.
6. Florez J, Armijo J.A, Mediavilla A, "Farmacología Humana". 3ª Edición, Masson S.A. Barcelona, España 1998. 1273 p.p.7-177. Cap 2-11 ; p. 355-388. Cap. 22.
7. Vane J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. Thorax 55: 3-9. 2000
8. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology .Annu Rev Biochem. 69:145–82. 2000.
9. Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R. The Orofacial Formalin Test in the Mouse: A Behavioral Model for Studying Physiology and Modulation of Trigeminal Nociception. J Pain 7 (12): 908-914. December, 2006.

10. Busquets C, Ribera M. "Monografies Mediques. Unidades de dolor. Realidad hoy, reto para el futuro". Gispert S.A. Barcelona, España. 2002. 426. p 217- 250. cap.19
11. Sessle BJ. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. *J Oral Rehabil.* 33; 243–261. 2006.
12. Ahmad M, Gouche C. "Management strategies for treatment of neuropathic pain in the edery". *Drugs Aging* 19 (12): 929-945. 2002
13. Takemura M, Sugiyo S, Moritani M, Kobayashi M, and Yonehara N. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Arch Histol Cytol.* 69 (2): 79-100. 2006
14. Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol.* 71:117-36. 2005
15. Basbaum A, Julius D. Toward Better Pain. *Scientific American.* 60-67. June 2006.
16. Esplugues J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.* 135 (5): 1079 -1095. 2002
17. Arzumanian V, Stankevičius E, Laukevičienė A, Kėvelaitis E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina.* 39(6) : 535- 541. 2003
18. Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Br Res.* 897: 9-19. April 2001
19. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, and Salvemini D. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. *Pharmacol.* 57 (2):217–252. 2005
20. Julius D, Basbaum A. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413 (9):203-210. September 2001

21. Kelly DJ, Ahmad M, Brull SJ. Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. *Can J Anaesth.* 48(10):1000-10. Nov; 2001
22. Dudzinski D, Igarashi J, Greif D, and Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:235–76. 2006
23. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357(3): 593-615. Aug 2001.
24. Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clinica Chimica Acta.* 366 (1-2):90 -100. Apr 2006
25. Brennan PA, Thomas GT, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch. Oral Biol.* 48: 93- 100. 2003
26. López P. Oxido nítrico y dolor. *Medunab.* 4: 1-7. Abril 2001
27. Poveda R, Bagán JV, Jiménez Y, Gallud L. “Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs in dental practice.”. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12: 10-18. 2007.
28. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J.* 18: 790-804 May 2004.
29. Choi H.S, Lee HJ, Jung CY, Ju JS, Park JS, Ahn DK. Central cyclooxygenase-2 participates in interleukin-1b-induced hyperalgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Neurosci Lett.* 352:187–190. August 2003.
30. Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology* 40: 937–946. 2001.

- 31 Gaitan G, Herrero JF. Subanalgesic doses of dexketoprofen and HCT-2037 (nitrodexketoprofen) enhance fentanyl antinociception in monoarthritic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 80: 327–332. 2005
32. Jiménez E, Gasco C, Arrieta JJ, Gómez J, Bartolomé B. Study of the analgesic efficacy of Dexketoprofen Trometamol 25mg. vs. Ibuprofen 600mg. after their administration in patients subjected to oral surgery. *Med Oral* 9: 138-148. 2004
33. Burke Daniel, Bannister J. Dexketoprofen trometamol in post-operative pain management. *Acute Pain* 5: 57-62, 2003.
34. Goday J, Rodriguez J, Martinez M, Fonseca E. Photoallergic contact dermatitis from dexketoprofen: study of 6 cases. *Contact Dermatitis.* 55: 59-61. 2006.
35. Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev.* 28: 219–226. 2004
36. Sakurada C, Sugiyama A, Nakayama M, Yonezawa A, Sakurada S, Tan-No K, Kisara K, Sakurada T. Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. *Neurochem Interna.* 38: 417-423. 2001.