

Short Communication

Análisis *in silico* de la escopoletina aislada de especies vegetales como agente analgésico inhibidor de Ciclooxygenasa-2

[*In silico* analysis of scopolotin isolated from plant species as a Cyclooxygenase-2 inhibitor analgesic agent]

Rafael E. Salazar¹, Alberto G. Flores² y Miguel A. Moreno^{2*}

¹Heidelberg University Biochemistry Center (BZH), 69120 Heidelberg, Alemania

²Escuela de Biología, Universidad de El Salvador, El Salvador.

*Correspondence to: miguel.moreno@ues.edu.sv

Abstract: Pain is generated as a natural defense response of organisms to possible tissue damage or a particular sensory stimulus. Search for new treatments has led to the study of active plant compounds, which have shown promise in *in vivo* preclinical trials. The analgesic potential of species of the genus *Persea* has been demonstrated and this is attributed to scopolotin. Studies reveal an effect similar to AINEs, so pain inhibition would be related to its interaction with cyclooxygenase-2. The purpose of this study is to determine *in silico* the analgesic effect of scopolotin, and also to evaluate its pharmacokinetic, toxicological and drugability characteristics, using bioinformatic tools. The results indicate an interaction energy of -7.2 kcal/mol for scopolotin and the enzyme, establishing hydrogen bonds with residues Ser530 and Tyr385. The pharmacokinetic, drugability, toxicological and molecular docking analysis, indicate that scopolotin has good characteristics to be a drug with analgesic activity, via the inhibition of the enzyme cyclooxygenase-2.

Keywords: Docking; Analgesic; Inhibitor; Cyclooxygenase-2; Scopolotin

Resumen: El dolor es generado como una respuesta natural de defensa de los organismos ante un posible daño tisular o un estímulo sensorial particular. La búsqueda de nuevos tratamientos ha llevado al estudio de compuestos activos de plantas, que han resultado prometedoras en ensayos preclínicos *in vivo*. El potencial analgésico de especies del género *Persea* ha sido demostrado y se alude dicha actividad a escopolotina. Los estudios revelan un efecto similar al de los AINEs por lo que la inhibición del dolor estaría relacionada a su interacción con la ciclooxigenasa-2. El propósito del presente estudio es determinar *in silico* el efecto analgésico de la escopolotina, y además evaluar sus características farmacocinéticas, toxicológicas y de drogabilidad, mediante herramientas bioinformáticas. Los resultados indican una energía de interacción de -7.2 kcal/mol para la escopolotina y la enzima, formando puentes de hidrógeno con los residuos Ser530 y Tyr385. El análisis farmacocinético, de drogabilidad y toxicológico junto con los resultados del acoplamiento molecular, indican que la escopolotina tiene buenas características para ser un fármaco con actividad analgésica, vía la inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2.

Palabras clave: Docking; Analgésico; Inhibidor; Ciclooxigenasa; Escopoletina

This article must be cited as: Salazar RE, Flores AG, Moreno MA. 2022. Análisis *in silico* de la escopoletina aislada de especies vegetales como agente analgésico inhibidor de Ciclooxygenasa-2. *Med Plant Commun* [REDACTED].

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales para el tratamiento del dolor ha mostrado resultados prometedores y, en general, tiene bajo costo y un mínimo de efectos adversos (Kafeshani, 2015; Nasri, 2016; Rafieian-kopaei, 2017). Estudios previos indican que el género *Persea* muestra actividad analgésica en pruebas in vivo en modelos animales, al igual que los tratamientos terapéuticos convencionales como los AINE (Adeyemi, 2002). Se han reportado varios metabolitos secundarios de este género, como alcaloides, terpenoides, flavonoides y cumarinas, que poseen actividades biológicas como antiinflamatoria, antiparasitaria, antifúngica e insecticida, entre otras. En un estudio reciente, se describe la actividad analgésica de las hojas de *Persea schiedeana* y se presume que la escopoletina presente en los extractos es el compuesto responsable de dicha actividad (Mejía et al., 2021).

La escopoletina posee muchas actividades biológicas comprobadas como la antibacteriana y antifúngica, sin embargo, plantas con un alto contenido de escopoletina son usadas tradicionalmente para el tratamiento de convulsiones, inflamaciones y dolor (Gnonlonfin et al., 2012). La existencia de escopoletina se ha confirmado para *Persea americana* (Bhuyan et al., 2019), planta cuya actividad analgésica ha sido demostrada para diferentes órganos de la planta (Adeyemi et al., 2002).

El dolor es generado como una respuesta natural de defensa de los organismos ante un posible daño tisular o un estímulo sensorial particular. Los estímulos causantes del dolor “noxas”, son detectados por receptores sensoriales específicos llamados “nociceptores” que son terminaciones nerviosas libres con cuerpos celulares en los ganglios de las raíces dorsales con terminación en la asta dorsal de la médula espinal y responden selectivamente a estímulos (Zegarra, 2007).

Las prostaglandinas son mediadores locales o cofactores que aumentan la sensibilidad de las terminaciones nerviosas libres y se encuentran estrechamente relacionados al proceso inflamatorio y forman una parte fundamental del proceso metabólico desencadenante del dolor (Zegarra, 2007). La ciclooxigenasa 2 (COX-2) da inicio a este proceso con la doble oxidación del ácido araquidónico para producir la hidroxil endoperoxi prostaglandina G2 (PGG2), que posteriormente es transformado en PGH2, un precursor directo de los tromboxano, prostaglandinas y prostaciclina, todos mediadores del proceso inflamatorio y del dolor (Hamberg et al., 1974).

Los dos grupos de fármacos que actualmente forman los pilares básicos del tratamiento analgésico son los opioides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Bonet, 2004). Por lo general, los AINEs funcionan inhibiendo la producción de prostaglandinas, que a su vez reduce la actividad de COX-2 en el proceso metabólico normal de señalizado del dolor e inflamación (Rivera-Ordóñez, 2006). Sin embargo, muchos AINEs presentan efectos secundarios no deseados y cada uno varía en su eficacia y gravedad de los efectos negativos (Sostres et al., 2010; Wongrakpanich et al., 2018). La búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del dolor ha llevado al estudio de compuestos activos de plantas, que han resultado prometedoras en ensayos preclínicos *in vivo*.

En el presente estudio, se describen las propiedades de la unión de la escopoletina con el sitio activo de COX-2 utilizando análisis de acoplamiento molecular como indicador de la inhibición de la enzima. Además, se describe brevemente las características farmacocinéticas, toxicológicas y de drogabilidad del metabolito secundario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de receptores y ligando.

La estructura 3D de proteína Ciclooxigenasa-2 PDB ID: 1PXX (Rowlinson et al., 2003) se descargó del banco de datos de proteínas RCSB (PDB, <http://www.rcsb.org>) y se guardó en formato PDB. La preparación de la proteína (eliminación de ligandos, moléculas de agua y cofactores que vienen resueltas en la estructura cristalizada) se realizó con el programa UCSF Chimera 1.16 (Pettersen et al., 2004). Además, se añadieron hidrógenos no polares y cargas de Kollman. La estructura 3D de los ligandos (diclofenaco y escopoletina) se descargó de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), y su tratamiento se basó en la minimización de sus energías con el método MMFF94 (Halgren, 1996).

Docking molecular

El acoplamiento molecular se realizó con el programa PyRx (Dallakyan, 2015), bajo el parámetro de rotación libre de

todos los enlaces del ligando con libertad conformacional y receptor rígido. Las coordenadas de la proteína para el acoplamiento se definieron de acuerdo con el sitio activo descrito por Rowlinson *et al.* (2003). Las interacciones ligando - receptor se visualizaron usando el programa PoseView (Stierand *et al.*, 2016). El fármaco diclofenaco fue utilizado como control del experimento.

Análisis ADMET Y Drug Likeness:

Las propiedades ADME son indicadores importantes de la eficacia de las hierbas y juegan un papel clave en el descubrimiento de fármacos y en la reducción de costos y tiempo. Según Ntie-Kang *et al.* (2013), los fármacos deben absorberse fácilmente por vía oral, transportarse fácilmente al sitio de acción deseado, no metabolizarse fácilmente en productos tóxicos antes de alcanzar el sitio de acción y eliminarse fácilmente del cuerpo antes de acumularse en cantidades que pueden producir efectos secundarios adversos. Con el objetivo de analizar las características farmacéuticas, toxicológicas y de drogabilidad, la estructura de la escopolotina fue cargada en los programas ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) y SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del acoplamiento molecular indican que la escopoletina interactúa de manera similar al diclofenaco con el sitio activo de la ciclooxygenasa-2. La afinidad de la unión entre el ligando y el receptor fue de -6.6 kcal/mol para la escopoletina, mientras que para diclofenaco el acoplamiento indica una afinidad de -8.4 kcal/mol (tabla 1). La afinidad indica la menor energía utilizada por el sistema para formar la unión (Ramadevi y Subhashree, 2013). Según la literatura, la energía de unión inferior a -5,0 kcal/mol es el estándar para considerar estable la unión de ligandos y receptores durante experimentos de acoplamiento molecular (Gaillard, 2018).

Uno de los desafíos más importantes que enfrenta un fármaco oral es su movimiento a través de la barrera epitelial intestinal que determina la velocidad y el grado de absorción humana y, en última instancia, afecta su biodisponibilidad (Guan et al, 2018). Como puede advertirse de la Tabla N° 1, los indicadores ADME y de drogabilidad para escopoletina son aceptables. Debe mencionarse que este ligando presenta una alta absorción gastrointestinal, por lo que su administración por la vía oral es adecuada. Por otro lado, la glicoproteína P (P-gp) es una proteína transportadora involucrada en muchos procesos esenciales como la absorción intestinal, el metabolismo, la distribución y la excreción de fármacos. Se ha reportado que la P-gp afecta la biodisponibilidad de fármacos (Lin, 2003). En el intestino, la P-gp bombea los medicamentos de regreso al lumen, lo que disminuye su absorción (Finch y Pillans, 2014). Por lo que, en nuestro caso, la escopoletina no ve afectada su absorción gastrointestinal, como si lo es para el diclofenaco. Por otro lado, los fármacos que actúan en el Sistema Nervioso Central (SNC) deben atravesar la barrera hematoencefálica (por sus siglas en inglés BBB) para alcanzar su objetivo molecular. Por el contrario, para los medicamentos con un objetivo periférico, es posible que se requiera poca o ninguna penetración de BBB para evitar efectos secundarios en el SNC. En este sentido, y dado que la escopoletina si presenta penetración de esta barrera, significa que podría presentar efectos adversos en SNC.

Tabla N° 1

Energía de interacción ligando-receptor, propiedades farmacocinéticas y drogabilidad

Compuesto	E. interacción (Kcal/mol)	Farmacocinética				Drogabilidad					
		GA	S-Pgp	P-BBB	I-CYP	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Bio
Escopolotina	-6.6	alta	no	si	1/5	si	si	si	si	no	0.55
Diclofenaco	-8.4	alta	si	no	1/5	si	si	si	si	si	0.85

AG: Absorción gastrointestinal, P-BBB: penetración de la barrera hematoencefálica, S-Pgp: sustrato de glicoproteína P, I-CYP: Inhibidor de isoformas de la enzima CYP (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4), Bio: Biodisponibilidad

Según Guan *et al.* (2018), cuantas más isoformas de la enzima CYP inhiba una molécula pequeña, más probable será que esté involucrada en interacciones farmacológicas clínicas, aumentando así sus posibles efectos secundarios y reduciendo la probabilidad de alcanzar su diana terapéutica. Vemos ahora, como la escopoletina a pesar de no tener un alto índice de biodisponibilidad y excreción (criterio P-BBB), presentaría pocos efectos secundarios, en tanto que inhibe solo una

de las cinco isoformas de la enzima CYP, lo que concuerda con las propiedades toxicológicas evaluadas y aún más con los resultados de drogabilidad calculados, en especial con los criterios Lipinski (no se reporta ninguna violación) (Lipinski *et al.*, 2001). Al respecto, según Benet *et al.* (2016), las reglas Lipinski son consideradas uno de los criterios esenciales para evaluar la posible efectividad de un fármaco. La drogabilidad de la escopoletina se comprobó, al presentar un peso molecular menor a 500 Da, menos de 5 donadores o aceptores de puentes de hidrógeno, y valores de ALogP menores a 5 (Tabla N° 2). Para este estudio, fueron considerados otros criterios druglikeliness (Ghose, Veber, Egan, y Muegge).

Tabla N° 2
Propiedades fisicoquímicas de los ligandos

Ligando	Peso molecular (gr/mol)	H-donadores	H-aceptores	ALogP	Enlaces con rotación
Escopoletina	192.17	1	4	1.51	1
Diclofenaco	296.15	2	2	4.36	4

H-Donadores: Número de átomos donadores para puentes de hidrógeno; **H-Aceptores:** Número de átomos aceptores para puentes de hidrógeno; **ALogP:** Hidrofobicidad del ligando. La drogabilidad del ligando se basa en el cumplimiento de no menos de 4 reglas Lipinski.

Los resultados del análisis toxicológico para la escopoletina (Tabla N° 3), indican en su mayoría una baja probabilidad de toxicidad, lo que concuerda con los recientes resultados en pruebas in vivo de toxicidad aguda oral de extractos vegetales en los cuales fue corroborada la presencia esta cumarina (Mejía *et al.*, 2021). Por otro lado, se indica un riesgo moderado para afecciones vía dérmica y alto para la vía ocular, lo que no representa un riesgo si consideramos su potencial uso por la vía oral. Menos alentador es el riesgo de causar toxicidad hepática, lo que concuerda con efectos adversos reportados para AINEs cuyo blanco terapéutico es la enzima COX-2 (Lagos, 2018).

Tabla N° 3
Análisis toxicológico de escopolotina

Propiedad	B-hERG	H-HT	DILI	T-AMES	T-AO (rata)	S-Dérmica	I-Cancer	C-Ocular	I-Ocular
Valor*	0.09	0.25	0.81	0.06	0.07	0.56	0.6	0.36	0.98
Decisión	●	●	●	●	●	●	●	●	●

B-hERG: Bloqueador del canal hERG; **H-HT:** Hepatotoxicidad en humanos; **DILI:** Daño hepático inducido por fármacos; **T-AMES:** Test de mutagenicidad; **T-AO:** Toxicidad aguda oral; **S-dérmica:** Sensibilización dérmica; **I-Cancer:** Carcinogenicidad; **C-Ocular:** Corrosión ocular; **I-Ocular:** Irritación ocular.

* La probabilidad de ser toxico, irritante, sensibilizante o corrosivo aumenta a medida el valor se aleja de 0. ● Baja probabilidad; ● Probabilidad moderada; ● Riesgo

Existen múltiples factores que afectan la afinidad del enlace entre ligando y receptor, dentro de los cuales el número de puentes de hidrógeno formados entre las moléculas es determinante (Fu *et al.*, 2018). Según los resultados, tanto diclofenaco como escopoletina forman dos puentes de hidrógeno, con los mismos aminoácidos, Ser530 y Tyr385, y estos enlaces no covalentes están formados a través del grupo aldehído de ambos ligandos (Figura N° 1). Otras interacciones de importancia son la del tipo hidrofóbicas, de las cuales el diclofenaco presenta mayor numero, lo que puede explicar una mejor energía de interacción con la enzima. Estudios de acoplamiento previos con COX-2 han logrado resultados satisfactorios con valores de afinidad de enlace entre -8.2 y -7.5 Kcal/mol (Sohilaït *et al.*, 2017).

Las interacciones formadas por diclofenaco con Ser530 y Tyr385, se corresponden a lo reportado por Rowlinson *et al.* (2003). Estos aminoácidos son sitios de interacciones común para una gran variedad de AINEs, como el ácido acetilsalicílico (Lucido *et al.*, 2016), indometacina (Kurumbail *et al.*, 1996), flurbiprofeno (Kurumbail *et al.*, 1996), entre otros. Estos residuos son importantes para la interacción mediante puentes de hidrógeno con el sustrato natural de esta enzima, el ácido araquidónico (Vecchio *et al.*, 2010); y dado que la escopoletina interactúa de manera similar, queda en evidencia la capacidad de este compuesto para inhibir la enzima COX-2.

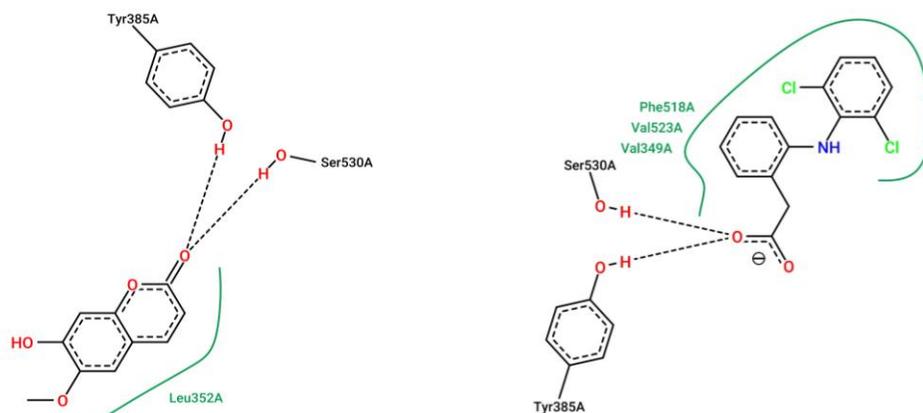


Figura N° 1

Interacción molecular con COX-2 producto del acoplamiento para a) Escopoletina y b) Diclofenaco. Ambos ligandos interactúan con puentes de hidrógeno con Ser530 y Tyr385

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos (energía de acoplamiento de alta afinidad, y buenos resultados ADMET y Drug Likeness) podemos concluir que la escopoletina, resulta un buen candidato a ser el compuesto activo que le brinda la actividad analgésica a especies del género *Persea* vía la inhibición de COX-2. Este estudio proporciona una hipótesis preliminar sobre el efecto analgésico de la escopolotina y debería guiar experimentos futuros en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del dolor.

REFERENCIAS

- Adeyemi OO, Okpo SO, Ogunti OO. 2002. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae). **Fitoterapia** 73: 375-380. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00118-1](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00118-1)
- Bhuyan DJ, Alsherbiny MA, Perera S, Low M, Basu A, Devi OA, Barooah MS, Li CG, Papoutsis K. 2019. The odyssey of bioactive compounds in avocado (*Persea americana*) and their Health Benefits. **Antioxidants** 8: 426. <https://doi.org/10.3390/antiox8100426>
- Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. 2016. BDDCS, the rule of 5 and drugability. **Adv Drug Deliv Rev** 101: 89-98.
- Bonet R. 2004. Dolor y analgesia: tratamiento con analgésicos y antiinflamatorios. **Offarm: farmacia y sociedad** 23: 70-74.
- Dallakyan S, Olson AJ. 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Meth Mol Biol** 1263: 243-250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
- Finch A, Pillans P. 2014. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. **Aust Prescr** 37: 137-139. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2014.050>
- Fu Y, Zhao J, Chen Z. 2018. Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: A case of oligopeptide binding protein. **Comput Math Methods Med Dec** 4: 3502514. <https://doi.org/10.1155/2018/3502514>
- Gaillard T. 2018. Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 Benchmark. **J Chem Inform Mod** 58: 1697-1706.
- Gnonlonfin GJ, Sanni A, Brimer L. 2012. Review scopoletin: A coumarin phytoalexin with medicinal properties. **Crit Rev Plant Sci** 31: 47-56. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616039>
- Guan L, Yang H, Cai Y, Sun L, Di P, Li W, Liu G, Tang Y. 2018. ADMET-score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **MedChemComm** 10: 148-157. <https://doi.org/10.1039/c8md00472b>

- Halgren T. 1996. Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J Comput Chem** 17: 490-519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. 1974. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. **Proc Natl Acad Sci USA** 71: 3824-3828. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3824>
- Kafeshani M. 2015. Ginger, micro-inflammation, and kidney disease. **J Renal Endocrinol** 1: e04.
- Lin JH. 2003. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. **Adv Drug Deliv Rev** 55: 53-81.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev** 46: 3-26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- Lucido MJ, Orlando BJ, Vecchio AJ, Malkowski MG. 2016. Crystal structure of aspirin-acetylated human cyclooxygenase-2: Insight into the formation of products with reversed stereochemistry. **Biochemistry** 55: 1226-1238. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01378>
- Mejía JG, Vásquez S, Salazar R, Muñoz L, Castillo UG, Paz-González AD, Rivera G, Núñez MJ, Moreno MA, Kennedy ML. 2021. Analgesic activity and phytochemical profile of aqueous, ethanol and dichloromethane extracts of *Persea schiedeana* leaves. **Int J Pharm Sci Res** 12: 4167-4173. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(8\).4167-73](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(8).4167-73)
- Nasri H. 2016. Herbal drugs and new concepts on its use. **J Prev Epidemiol** 1: e01.
- Ntie-Kang F, Lifongo LL, Mbah JA, Owono Owono LC, Megnassan E, Mbaze L, Judson PN, Sippl W, Efangé SMN. 2013. *In silico* drug metabolism and pharmacokinetic profiles of natural products from medicinal plants in the Congo basin. **In Silico Pharmacol** 1: 12. <https://doi.org/10.1186/2193-9616-1-12>
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem** 25: 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Rafieian-kopaei M, Shakiba A, Sedighi M, Bahmani M. 2017. The analgesic and anti-inflammatory activity of *Linum usitatissimum* in Balb/c Mice. **J Evid-Based Complement Alt Med** 22: 892-896. <https://doi.org/10.1177/2156587217717416>
- Ramadevi M, Subhashree V. 2013. In silico molecular interaction studies of gamma-hemolysin of Staphylococcus aureus with flavonoid compounds. **Trends Bioinformatics** 6: 91-100.
- Rivera-Ordóñez A. 2006. AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. **Rev Mex Anestesiol** 29: 36-40.
- Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, Stallings WC, Kurumbail RG, Marnett LJ. 2003. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. **J Biol Chem** 278: 45763-45769. <https://doi.org/10.1074/jbc.m305481200>
- Sohilait MR, Pranowo HD, Haryadi W. 2017. Molecular docking analysis of curcumin analogues with COX-2. **Bioinformation** 13: 356-359. <https://doi.org/10.6026/97320630013356>
- Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanás A. 2010. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 24: 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>
- Stierand K, Maass PC, Rarey M. 2006. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. **Bioinformatics** 22: 1710-1716. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl150>
- Vecchio AJ, Simmons DM, Malkowski MG. 2010. Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2. **J Biol Chem** 285: 22152-22163. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.119867>
- Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. 2018. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. **Ageing Dis** 9: 143-150. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0306>
- Zegarra JW. 2007. Bases fisiopatológicas del dolor. **Acta Med Peruana** 24: 105-108.