



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

“ROL DE NALTREXONA EN LA ANTINOCICEPCIÓN EXPERIMENTAL DEL  
ÁCIDO VALPROICO EN DOLOR OROFACIAL EXPERIMENTAL”

MACARENA ALEJANDRA IRIARTE HERNÁNDEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Hugo F. Miranda Guzmán

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Fernando A. Sierralta G.

Adscrito a Proyecto : *PERFIL FARMACOLÓGICO DE ANALGÉSICOS EN  
DOLOR EXPERIMENTAL*

Santiago – Chile

2013

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo está dedicado a todos quienes han sido parte importante de de mi formación profesional y personal.

En especial al equipo que conforma el departamento de neurofarmacología, por acogerme dentro del proyecto para realizar el presente trabajo de forma comprometida donde me sentí como un profesional más del grupo. En particular al doctor Hugo Miranda por su calidad docente y profesional, que comparte diariamente con sus alumnos. A Don José López Durán por su colaboración desinteresada, disposición a enseñar e inigualable calidad humana.

A mi querida Universidad de Chile por permitir mi desarrollo académico con el mejor cuerpo docente y por su constante preocupación por la equidad entre estudiantes.

A mi familia, en especial a mi padre y mi madre por su apoyo en este proyecto profesional con el cariño y soporte que solo brinda la familia.

A mi novio por su cariño especial durante 9 años, por todos aquellos momentos difíciles donde me sentí acogida y las constantes alegrías de las que ha sido parte importante.

Al “pack” de amigas inseparables: Andrea, Consuelo, Virginia, Elizabeth, Paulina, Carola, gracias por su compañía y apoyo excepcional.

Nuevamente a mi familia en general, muchas gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
MARCO TEÓRICO.....	7
I.    Neurofisiología del dolor.....	7
II.   Modulación del dolor.....	8
III.  Neurofisiología del dolor orofacial.....	9
IV.  Prueba de formalina.....	11
V.   Tratamiento del dolor.....	11
VI.  Ácido valproico.....	12
VII.  Naltrexona.....	13
VIII.  Interacción de fármacos.....	14
IX.  Medición experimental del dolor y ética.....	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
I.    Estudio.....	18
II.   Material.....	18
III.  Fármacos.....	19
IV.  Método algosiométrico.....	19
V.   Diseño experimental.....	23
VI.  Evaluación de la analgesia.....	24
VII.  Potencia relativa.....	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## ANEXO

I.	Nº1: Aprobación del comité de Bioética de la Facultad de medicina de la universidad de Chile sobre investigación en animales.....	40
II.	Nº 2: Tabla de datos.....	41
III.	Nº3: Cuadro resumen de DE <sub>50</sub> y Potencias relativas.....	51

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El dolor es una experiencia emocional y sensorial desagradable, muy frecuente y particular en la región orofacial por encontrarse densamente inervada. Su naturaleza, en esta región, no está bien definida, por lo que es frecuentemente causa de investigaciones.

Durante el desarrollo de estas pruebas, se ha visto que la efectividad de los AINE se ha hecho insuficiente para disminuir el dolor severo, por lo que el uso de fármacos antiepiléptico y antidepresivo se ha hecho frecuente. Por esta razón, el ácido valproico, fármaco antiepiléptico, se ha utilizado en terapias para el dolor crónico severo. Su uso e interacción con naltrexona, fármaco utilizado comúnmente para tratar las adicciones, en pruebas de dolor orofacial es objetivo de este estudio por tratarse de un fármaco que en dosis muy bajas bloquea la transmisión del dolor.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se utilizaron 152 ratones a los que se administró intraperitonealmente: a) ácido valproico, b) naltrexona, c) ambos. Luego se realiza el test algosimétrico de la formalina orofacial, inyectando formalina 2% en el labio superior derecho del animal, observando la cantidad de frotaciones que realiza el ratón durante los primeros 5 minutos (fase I o algésica aguda) del experimento y desde los 20 a 30 minutos (fase II algésica- inflamatoria). Los resultados se miden como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio (E.E.M). La significancia estadística se determinó por pruebas t Student ( $p < 0.05$ ).

**RESULTADOS:** La administración de Ácido valproico y naltrexona solos produce un efecto antinociceptivo en ambas fases, siendo el ácido valproico más potente en la fase II y la naltrexona más potente en la fase I. La coadministración de ambas drogas genera un efecto sinérgico que se manifiesta al observar que la mínima máxima potencia efectiva (MPE) es considerablemente mayor que cuando las drogas son aplicadas de forma única.

**CONCLUSIONES:** El ácido valproico actúa a través de receptores opioides lo que permite determinar interacciones con otras drogas que podrían interferir en nuestro tratamiento. Además el efecto sinérgico generado por la naltrexona permite el uso de dosis menores de ácido valproico y así es posible disminuir sus efectos adversos.

## INTRODUCCIÓN

La región orofacial es uno de los territorios más densamente inervados, principalmente por el nervio trigémino, y representa un territorio en donde se desarrollan condiciones dolorosas con características propias. Sin embargo, las bases farmacológicas del dolor crónico orofacial no están bien dilucidadas y el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos AINES no ha sido eficaz para el tipo severo de esta enfermedad.

De esta forma se ha indagado en la efectividad de otros fármacos con el fin de dar una terapia que permita mejorar la calidad de vida de estos pacientes. Dentro de éstos, los fármacos anticonvulsivantes y antidepresivos han sido parte de terapias para tratar el dolor crónico, dentro de ellos encontramos el ácido valproico, la imipramina y amitriptilina.

Si bien el mecanismo de acción del ácido valproico en la antinocicepción del dolor orofacial no está bien definido, es necesario precisar su acción ante diversos medicamentos que podrían generar alguna interacción farmacológica disminuyendo o potenciando su efecto, lo que generaría un ineficaz resultado terapéutico o problemas por sobredosis.

Uno de los medicamentos que se considera importante de estudiar su acción en conjunto con el ácido valproico es la naltrexona pues se ha visto que administrado en dosis muy bajas potencia la acción antinociceptiva de otras drogas como la morfina.

El objetivo del actual estudio es utilizar el modelo de Luccarini para caracterizar cambios de comportamiento en ratones, particularmente la relación entre la cantidad de tiempo que los ratones se frotan los labios, tras la inyección de una solución al 2 % de formalina previo la inyección de ácido valproico y/o naltrexona.

## MARCO TEÓRICO

### I. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR

Las terminaciones de células nerviosas levemente especializadas que inician la sensación dolorosa se denominan nociceptores. Estos se categorizan según las características de sus axones que transmiten, encontrándose el grupo A $\delta$  de axones mielínicos, que conducen a 20 m/s, el grupo de fibras C de axones amielínicos que conducen a velocidades inferiores a 2 m/s. Su característica principal es que son de umbral de estimulación alto a diferencia de las fibras A $\beta$  que son de calibre grueso y de umbral bajo, pues transmiten el tacto suave.

Las fibras A $\delta$  son mielinizadas y de conducción rápida, responden a estímulos mecánicos y térmicos, lo cual se relaciona con el dolor agudo, su diámetro es de 1,0 a 5,0 micrones y poseen campos receptivos que consisten en un conjunto de puntos sensibles. Las fibras C son amielínicas y de conducción lenta, responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos por lo que se dice que son polimodales, se relacionan con el dolor crónico proveniente de estímulos principalmente de naturaleza química. Experimentos de bloqueo selectivo han confirmado que las fibras A $\delta$  son responsables del primer dolor o dolor agudo y que las fibras C son responsables de un dolor más sordo y más duradero (1)

La mayor parte de las fibras A $\delta$  y C entran al sistema nervioso central por el asta dorsal de la médula espinal. Los axones que transmiten información desde los receptores para el dolor y la temperatura por lo general se encuentran en la división más lateral de las raíces dorsales. Cuando estos axones alcanzan la zona posterior de la médula espinal, se ramifican en colaterales ascendentes y descendentes, formando el tracto dorsolateral de Lissauer para luego penetrar en la sustancia gris del asta dorsal. Luego estas neuronas hacen contacto con otras localizadas en varias láminas de Rexed como la lámina I o zona marginal y lámina II o sustancia gelatinosa. La información proveniente de la lámina II es transmitida a neuronas de segundo orden en las láminas IV-VI conocidas también como núcleo propio, cuyos axones ascienden hasta el tronco encefálico y el tálamo hasta el cuadrante anterolateral de la mitad contralateral de la médula espinal. Estas fibras junto a

las neuronas de segundo orden de la lámina I, forman el tracto espinotalámico que es la principal vía ascendente para la información relacionada con el dolor y la temperatura. Por esta razón, se omitirá la descripción de vías menores ya que excede el alcance del presente trabajo.

Los principales núcleos de destino de los axones ascendentes para el dolor y la temperatura se encuentran en el complejo ventral posterior del tálamo. Los núcleos ventroposteromediales (VPM) y ventroposterolaterales (VPL) reciben la mayor parte de estos axones. Las neuronas del núcleo VPM reciben información del rostro; las neuronas del núcleo VPL recibe información nociceptiva del resto del cuerpo.

Otros núcleos talámicos, como el núcleo central lateral y el complejo trilaminar, reciben proyecciones desde la formación reticular y también participan en la respuesta de despertar evocada por un estímulo nocivo (1).

## II. MODULACIÓN DEL DOLOR

El sistema nervioso central posee circuitos neuronales diseñados para modular la transmisión del dolor. Pueden controlar la estimulación de la neurona nocisensible y responder a sustancias opiodes.

Existen dos mecanismos principales de control, descritos a continuación:

- a) Los impulsos corticales pueden poner en marcha las regiones del tronco encefálico y del hipotálamo que modulan el procesamiento de la información dolorosa en el propio tronco y en la médula espinal. La sustancia gris periventricular del hipotálamo se comunica con la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo mediante una vía encefalinérgica. Las fibras descendentes desde esta estructura excitan a las neuronas serotoninérgicas del núcleo magno del rafe en el bulbo raquídeo tanto directamente como a través de las interneuronas de la formación reticular bulbar. Esta proyección utiliza serotonina, neurotensina, somatostatina y glutamato. Las neuronas rafeespinales se dirigen, a su vez, al asta posterior y a la porción caudal del núcleo del trigémino. Estos axones serotoninérgicos



terminan en las interneuronas encefalinérgicas de las láminas II y III, que actúan sobre terminales presinápticas y postsinápticas para suprimir la actividad que llega a las fibras del dolor. Además el hipotálamo se comunica directamente con las astas posteriores medulares y bulbares para actuar sobre la llegada de señales dolorosas.

- b) La analgesia producida por estimulación se basa en la estimulación eléctrica de las estructuras del SNC para inducir la liberación de productos químicos endógenos, como la encefalina, desde los circuitos para el control del dolor. Las sustancias opioides internas inhiben la transmisión del dolor. La estimulación de la sustancia gris periacueductal, la sustancia gris periventricular o el núcleo magno del rafe provoca la liberación de encefalina o monoaminas. La administración exógena de sustancias opiodes farmacológicas como la morfina, excita a las neuronas periventriculares y periacueductales, reforzando su actividad natural. Este aumento de actividad inhibe a las neuronas de las astas posteriores medulares y bulbares que transmiten la información dolorosa, produciendo analgesia (2).

### III. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR OROFACIAL

El principal nervio craneal que codifica el dolor a nivel orofacial es el nervio trigémino (V par), luego en menor medida el nervio facial (VII par), glossofaríngeo (IX par), vago (X par). También se debe considerar la participación de los tres nervios craneales superiores.

En esta región abundan las fibras A $\delta$  y C, pero están principalmente concentradas en la pulpa dental. La fibra C transmite el dolor sordo causado por la inflamación de la pulpa. La fibra A $\delta$  transmite el dolor agudo causado por la hipersensibilidad de los dientes.

El nervio trigémino es un nervio mixto, contiene fibras sensitivas (aférentes) y motoras (eferentes). Posee un gran ganglio (trigeminal) que da lugar a tres ramas principales : V1 oftálmica; V2 maxilar y V3 mandibular en el

que se encuentra el soma de la primera neurona de la vía del dolor trigeminal. La porción sensorial transmite el tacto, dolor, temperatura y propiocepción de zonas como cara, músculos faciales y masticatorios, de la articulación temporomandibular y cavidad bucal.

El nervio trigémino posee 3 núcleos sensitivos: Núcleo Sensitivo Principal, Núcleo Mesencefálico y Núcleo Espinal. El núcleo espinal posee dos unidades, la superior o Subnúcleo Oral al igual que el Núcleo sensitivo principal transmite la sensibilidad táctil discriminativa; la unidad inferior correspondiente al Subnúcleo Interpolar y al subnúcleo Caudal que transmite la sensibilidad táctil no discriminativa y de presión, como la sensibilidad térmica y dolorosa del territorio cefálico.

Las neuronas de segundo orden del núcleo sensitivo principal releva la información del tacto discriminativo de la cabeza hacia el núcleo ventral posteromedial (VPM). Los axones derivados de su porción ventrolateral llegan al VPM contralateral junto con fibras procedentes del núcleo espinal (caudal) conforman el fascículo trigeminotalámico anterior. Las neuronas de la división dorsomedial del núcleo sensitivo principal inervan el VPM ipsilateral por medio del fascículo trigeminotalámico posterior. El núcleo mesencefálico contiene células de origen que participan en la propiocepción.

Las fibras que transmiten el dolor, temperatura y tacto en general descenden formando el fascículo trigeminoespinal. Esta última vía que contiene fibras facilitadoras e inhibitoras junto con su núcleo, se extiende hasta los segmentos más altos (C2 o C3) de la médula espinal. En el tracto espinal del trigémino se unen las fibras aferentes somáticas del resto de los pares craneales, que aportan información nociceptiva. Las fibras nociceptivas llegan al subnúcleo caudal, que recibe también fibras de los segmentos cervicales superiores. En el núcleo espinal, se produce la sinapsis con la segunda neurona, cuyo axón se cruza y asciende enviando colaterales a la FR para terminar en los núcleos VPM, posterior e intralaminar del tálamo. Desde allí la información va al área sensitiva primaria de la corteza sector 1,2,3 de Brodman y a otras estructuras corticales y subcorticales como la corteza insular, que procesa información del estado interno del organismo, integrando los aspectos cognitivo, sensorial y afectivo, modulando el umbral doloroso, y la

circunvolución cingular, que es parte del sistema límbico, relacionado con el pensamiento afectivo y emocional del dolor (3)

#### IV.- PRUEBA DE LA FORMALINA

Corresponde a una prueba de estimulación tónica donde se aplica un estímulo químico, lo cual da lugar a una conducta estereotipada compleja. Tras la aplicación del estímulo nociceptivo se produce una respuesta inflamatoria que induce alodínea e hiperalgesia.

En la rata y el ratón esta prueba muestra dos fases: una temprana debido a la activación de nociceptores que sigue a la injuria corrosiva que produce el irritante (fase 1) y una tardía debida a la organización de un foco inflamatorio en el sitio de injuria y la sensibilización central y periférica que ello conlleva (fase 2). Tras la aplicación de la formalina aparecen respuestas conductuales dirigidas hacia la zona afectada como lárido-mordisqueo, sacudidas, elevación ,resguardo y en el caso de inyectarse en la región orofacial se observa un aumento del acicalamiento. (4,5))

#### V.- TRATAMIENTO DEL DOLOR

Los fármacos más importantes en la inhibición de la neurotransmisión del dolor son:

- Anestésicos locales
- Analgésicos Opioides
- Analgésicos anti-inflamatorios no esteroidales (AINEs)
- Co- analgésicos

Los coanalgésicos son un grupo de fármacos que disminuyen el dolor pero que originariamente se usa para otros fines, como disminuir la ansiedad, insomnio, depresión. Podemos destacar los antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivantes (ác. Valproico, carbamazepina), corticoides e inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina.

## VI. ÁCIDO VALPROICO

Corresponde a un fármaco que tiene propiedades anticonvulsivantes. Su uso fue aprobado en 1978 en Estados Unidos. Químicamente corresponde a un ácido carboxílico de cadena ramificada simple.

En cuanto a su mecanismo de acción el ácido valproico inhibe la activación repetitiva sostenida, inducida por la despolarización de las neuronas corticales o de la médula espinal, en el ratón. Esta acción parece mediada por recuperación prolongada de los canales de Na activados por voltaje, a partir de su recaptación.

Otro mecanismo que puede contribuir a las acciones anticonvulsivas del ácido valproico esta en relación al metabolismo del GABA. Aunque el ác. valproico no tiene efecto en las reacciones al GABA, incrementa la cantidad del GABA que se pueda recuperar del cerebro después de administrar este fármaco en animales. In vitro, el ácido valproico puede estimular la actividad de la enzima sintética del GABA e inhibir las enzimas degradadoras (6).

Los efectos adversos más frecuentes consisten en síntomas gastrointestinales transitorios, como anorexia, náusea y vómito en cerca de 16% de los pacientes. Los efectos adversos en el SNC consisten en sedación, ataxia y temblor; estos síntomas ocurren con poca frecuencia y suelen reaccionar a la disminución de la dosis. Una complicación infrecuente es la hepatitis fulminante, en muchos casos mortal. (5)

## VII. NALTREXONA

La naltrexona es un antagonista opioide que se ocupa para tratar la dependencia de alcohol y, entre otras cosas para revertir la depresión respiratoria causada por adicción a drogas opioides. Se ha visto que en dosis muy bajas, este fármaco produce analgesia pues bloquea la autoinhibición presináptica de liberación de encefalina, desencadenando una liberación masiva de estos neurotransmisores endógenos.

Su uso se contraindica con la presencia concomitante de analgésicos opiodes, hipersensibilidad al fármaco o cualquier componente de la preparación, hepatitis aguda o presencia de alguna falla hepática y dependencia a opioides por la posibilidad de provocar síndrome de privación o abstinencia.

Algunos posibles efectos adversos que pueden resultar de su uso son trombosis venosa, depresión, hipersensibilidad, neumonía y daño hepático. No se ha reportado toxicidad cardiovascular, sólo pequeños incrementos en la presión sanguínea pero no son cambios significativos. Existe presencia de dolor abdominal en un 11%, diarrea en un 13 %, náusea en un 29 % de un total de pacientes tratados con naltrexona (7).

## VIII. INTERACCIÓN DE FÁRMACOS

Se refiere a la acción que ejerce un fármaco sobre otro, de lo que puede resultar cambios cualitativos o cuantitativos, como:

- Supraaditividad (sinergismo): El resultado es significativamente mayor que la simple suma de los fármacos por separado.
  
- Aditividad (sumación) El resultado que se consigue es la simple suma algebraica de los efectos que produce cada uno de los fármacos por separado.
  
- Subatividad (antagonismo): El resultado logrado corresponde a un efecto menos que la suma de la actividad de cada fármaco por separado. (8)

## IX. MEDICIÓN EXPERIMENTAL DEL DOLOR Y ÉTICA.

La American Veterinary Medicine Association (AVMA) ha definido el dolor en animales como: “Una experiencia sensorial y emocional aversiva, que evoca acciones motoras protectoras, las que resultan en evitación aprendida y que puedan modificar rasgos de conducta especie - específicos, incluyendo comportamiento social”. Por lo tanto, es el análisis de este tipo de conductas es el que permite identificar en el animal las dimensiones sensodiscriminativa y emotiva del dolor que en contexto experimental se llama nocicepción.

Dicha prueba debe cumplir con diversos requisitos para ser considerada ética y técnicamente válida (4) como ser revisados tanto por científicos como por profanos, debiendo establecerse que la investigación tiene un claro potencial benéfico. Además debe hacerse un cuidadoso análisis de la conducta animal e identificar cualquier desviación de lo normal. También debe utilizarse el estímulo doloroso mínimo para los propósitos del experimento. No obstante, es importante utilizar agentes o procedimientos para aliviar el dolor, siempre y cuando ello no interfiera con los propósitos de la investigación. Es importante que la duración de los experimentos sean lo más breve posible, manteniendo el número de animales en el mínimo (5)

## HIPÓTESIS

La naltrexona potencia la acción antinociceptiva del ácido valproico en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones.



## OBJETIVOS

### I. Objetivo general:

Estudiar la modalidad de la acción antinociceptiva del ácido valproico y su modificación por naltrexona en el test de la formalina orofacial en ratones.

### II. Objetivos específicos:

Cuantificar la respuesta del animal luego de la administración i.p. de ácido valproico mediante el test de la formalina orofacial.

Medir el efecto de la naltrexona en el test de la formalina orofacial.

Ponderar la intensidad de la interacción farmacológica de naltrexona con ácido valproico en el ensayo de la formalina antes mencionado.

## MATERIALES Y MÉTODO

### I. Estudio

La presente investigación forma parte del proyecto “Perfil farmacológico de analgésicos en dolor crónico experimental”, dirigido por el Dr. Hugo F. Miranda. Se realiza en el Laboratorio de Neurofarmacología del dolor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El actual trabajo cuenta con la aprobación del comité de Bioética sobre investigación con animales de acuerdo al protocolo CBA # 0572 FMUCH (anexo 1).

### II. Material

Se usarán 152 ratones (*Mus musculus*) aprox., machos de la cepa CF/1 de 25 a 30 g de peso (figura 1) y habituados al ambiente de laboratorio al menos dos horas antes del experimento.



Figura 1: Ratones cepa CF/1

Habrà una variaci3n del protocolo CBA N° 0572 FMUCH aprobado por la Comisi3n de Ética de la Facultad de Medicina, ya que entre los coanalgésicos se incluye el ácidu valproico, donde cada animal recibe solamente una dosis de la droga. Las observaciones ser3n efectuadas en forma ciega, aleatoria y controladas con soluci3n salina 0.9%, provenientes de datos hist3ricos del laboratorio. Se deja constancia que, bas3ndose en las normas éticas internacionales que rigen este tipo de experimentaci3n, el n3mero de animales utilizados ser3 el m3nimo estrictamente necesario, para un correcto an3lisis

estadístico. Los animales se sacrificarán después del experimento mediante dislocación cervical, por personal experimentado.

Para la observación se dispone de un cilindro transparente de 20 cm de altura y diámetro, además de un sistema de espejos posteriores que permite la observación en cualquier disposición del animal.

Las observaciones fueron realizadas en forma ciega para los fármacos utilizados y los animales se eligieron en forma aleatoria.

### III. Fármacos

Las drogas utilizadas fueron suministradas por el laboratorio de Neurofarmacología del dolor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estas son:

- Naltrexona
- Ácido valproico
- Formalina 2%

Los fármacos fueron disueltos en solución salina y se administraron intraperitonealmente en una relación constante de 10 ml/Kg de peso.

Las dosis utilizadas fueron 10, 30, 100 y 200 mg /kg para del Ácido valproico y 0.1, 1 y 5 mg /Kg para la naltrexona. Se usaron dichas dosis en base a curvas dosis- respuestas determinadas en estudios previos.

La administración única de ácido valproico o naltrexona se realizó 30 minutos previos a la etapa de observación. En otro grupo experimental se inyectó en forma conjunta las dos drogas, donde se administró 30 minutos antes el ácido valproico y luego de 5 minutos la Naltrexona, con respecto a la etapa de observación.

### IV. Método algesiométrico

En un primer momento se evaluará la actividad antinociceptiva usando una modificación del test algesiométrico orofacial de la formalina de Luccarini (9), que permite medir la nocicepción originada por la estimulación del nervio trigémino que es uno de los nervios de mayor inervación del territorio maxilofacial. Para ello se realizará una inyección subcutánea de 20  $\mu$ L de

solución de formalina al 2 % en el labio superior derecho del animal (figura 2).

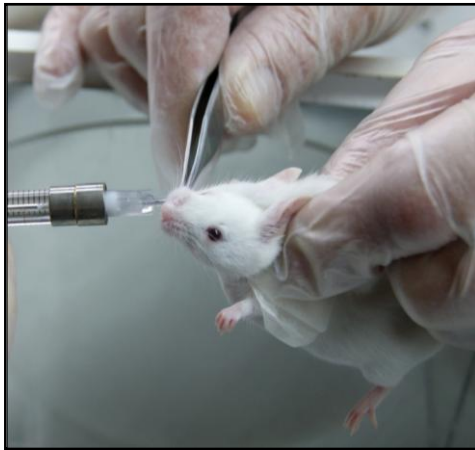


Figura 2: Inyección de solución de formalina al 2% en labio superior del ratón.

Ello induce un sostenido frotamiento de la zona inyectada y un vigoroso restregamiento de la cara en el área perinasal (figura 3).

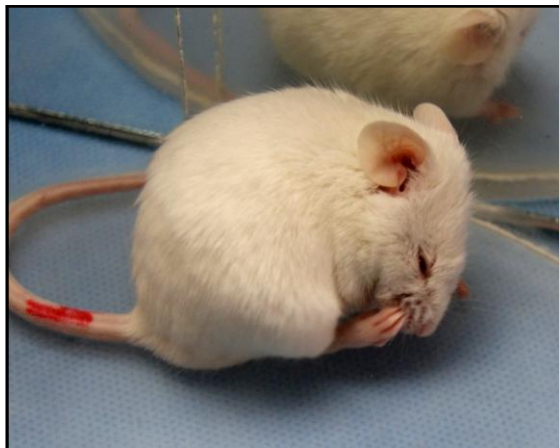


Figura 3: Frotamiento perinasal de ratón

Los ratones se colocan en un cilindro diseñado para la observación (figura 4) y con un cronómetro digital se mide el tiempo total que se frota el área perinasal durante los 5 minutos inmediatos a la inyección y que corresponde a la fase algésica aguda (fase I). Luego se registra a partir de los 20 minutos de la inyección y hasta los 30 minutos, el tiempo durante el cual los animales se frota el labio comprometido y que corresponde a la fase inflamatoria que mide el dolor crónico (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 (9).



Figura 4: Ratón ubicado en cilindro de observación

Previamente se procederá a inyectar ácido valproico 10, 30, 100 y 200 mg/kg a un grupo de 8 ratones por dosis. La inyección se realizará 30 minutos antes de realizar el test de la formalina, lo que corresponde a efecto máximo de la droga determinado previamente en el laboratorio. Entonces se evaluará la cantidad de rasquidos en la fase algésica y analgésica explicada anteriormente. Luego se realizará el mismo experimento pero con naltrexona 0,1, 1 y 5 mg/kg. La vía de administración es intraperitoneal (figura 5) en un volumen constante, de 10 ml/kg.

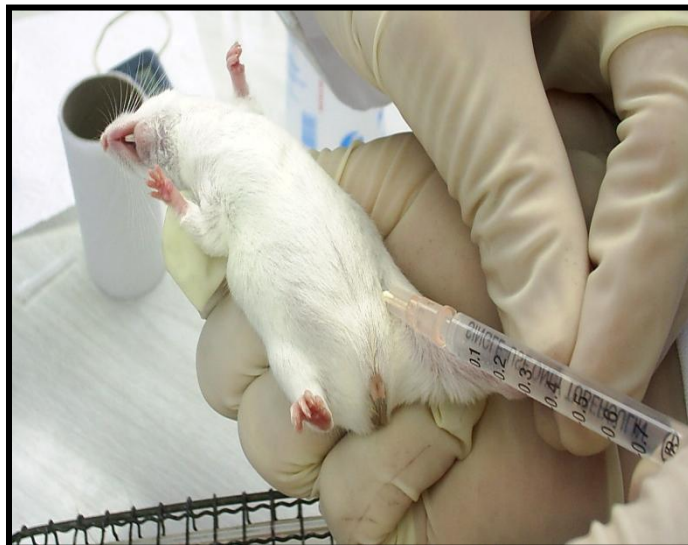


Figura 5: Inyección intraperitoneal de drogas en ratón

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva de ácido valproico se construirá una curva dosis-respuesta de las 4 dosis: 10, 30, 100 y 200 mg/kg. Lo mismo se aplicará para la naltrexona con sus respectivas dosis.

Posteriormente a otro grupo de animales se le inyectará ácido valproico y luego de 5 minutos naltrexona, esto 30 minutos antes de la inyección de la formalina. Se evaluará la interacción de todas las dosis de ácido valproico utilizadas en este estudio con cada una de las concentraciones utilizadas de naltrexona.

Para la evaluación de las interacciones se utilizará el método de Zelcer, que compara la dosis efectiva de un agonista en presencia de un antagonista (10).

Los resultados se expresarán como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (EEM). Los datos obtenidos se expresarán en curvas logarítmicas dosis – respuestas construidas mediante regresión lineal por puntos mínimos y a partir de ellas se determinará las DE50. Los parámetros estadísticos, se calcularán con el programa computacional del laboratorio, y la significancia estadística se determinará por análisis de varianza y pruebas t de Student, considerando un nivel del 5% ( $p < 0,05$ ).

V. Diseño experimental:

Los ensayos fueron realizados en forma ciega, aleatoria y controlada por medio de datos históricos. El tamaño total de la muestra fue de 152 ratones (n=152), que se dividieron en 19 grupos experimentales, cada uno compuesto por 8 ratones:

Grupo	Acido Valproico	Naltrexona
1	10 mg /Kg	—
2	30 mg/Kg	—
3	100 mg/Kg	—
4	200 mg/Kg	—
5	—	0.1mg/Kg
6	—	1 mg/Kg
7	—	5 mg/kg
8	10 mg/Kg	0.1 mg/Kg
9	30 mg/Kg	0.1 mg/Kg
10	100 mg/Kg	0.1 mg/Kg
11	200 mg/Kg	0.1 mg/Kg
12	10 mg/Kg	1 mg/Kg
13	30 mg/Kg	1 mg/Kg
14	100 mg/Kg	1 mg/Kg
15	200 mg/Kg	1 mg/Kg
16	10 mg/Kg	5 mg/Kg
17	30 mg/Kg	5 mg/Kg
18	100 mg/Kg	5 mg/Kg
19	200 mg/Kg	5 mg/Kg

## VI. Evaluación de la analgesia

La evaluación de la actividad antinociceptiva de cada fármaco en forma individual se realizó mediante la construcción de curvas dosis- respuestas, usando al menos 8 animales por cada una de las dosis administradas. Estas curvas se construyeron utilizando el logaritmo de las dosis en la abscisa y el efecto antinociceptivo, expresado como máximo efecto posible (MEP), en la ordenada. El valor del máximo efecto posible (MEP) que representa la antinocicepción o actividad analgésica se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula (11,12,13):

$$\%MEP = 100 - \left[ \left( \frac{\text{tiempo de rascado experimental}}{\text{tiempo de rascado control}} \right) \times 100 \right]$$

A partir de las curvas dosis- respuesta de cada fármaco, se ajusta una recta por análisis de regresión lineal (utilizando mínimos puntos), permitiendo calcular la dosis que produce un 50 % del efecto máximo posible (DE 50) de antinocicepción, cuando cada fármaco es administrado solo (8, 14).

Una curva dosis-respuesta también es obtenida mediante la administración conjunta de ácido valproico y naltrexona en dosis determinadas anteriormente.



## VII. Potencia relativa

Con objeto de comparar el efecto de los fármacos en las diferentes fases del ensayo, se calcula la potencia relativa, que relaciona la cantidad o dosis de un fármaco es tanto o más potente en una u otra fase. Se calcula dividiendo la  $DE_{50}$  de cada fármaco en la fase I en relación a la  $DE_{50}$  de cada fármaco en la fase II:

$$\text{Potencia Relativa} = \frac{DE_{50} \text{ droga X en fase I}}{DE_{50} \text{ droga X en fase II}}$$

## RESULTADOS

- Grupo control

Con el propósito de usar el número de animales experimentales necesarios para nuestro estudio, se utilizaron datos históricos en relación al tiempo total de frotamiento de la zona labial y perinasal derecha tras la administración intraperitoneal (i.p) de solución salina al 0.9 % 30 minutos antes del test de la formalina orofacial al 2% que resultó un total de  $85.25 \pm 3.35$  para la fase I; y de  $99.88 \pm 4.14$  segundos para la fase II.

- Grupo tratado con ácido valproico

La administración intraperitoneal de ácido valproico 30 minutos previo a la inyección de formalina resultó en una disminución del tiempo de frotamiento tanto en la fase I como en la fase II con respecto a los datos del grupo control, valores que se adjuntan en la tabla I.

Dosis (mg/Kg)	Fase I(s) X $\pm$ SEM (%MPE)	Fase II (s) X $\pm$ SEM (%MPE)
Control	85.25 $\pm$ 3.35	99.88 $\pm$ 4.14
10	57.88 $\pm$ 4.38 (32.11)	39.88 $\pm$ 4.79 (40.93)
30	40.38 $\pm$ 4.09 (52.63)	25.75 $\pm$ 3.68 (54.95)
100	24.13 $\pm$ 4.68 (71.70)	18.25 $\pm$ 5.26 (68.00)
200	20.88 $\pm$ 2.86 (78.00)	14.0 $\pm$ 3.41 (81.98)

Tabla I: Tiempo de rascado, en segundos, durante la primera y segunda fase del test de la formalina orofacial del grupo tratado con ácido valproico.

Para el cálculo de la DE<sub>50</sub> de la fase I y II, se construyó la curva dosis-respuesta, expresada en el logaritmo de la dosis de ácido valproico versus el porcentaje del máximo efecto posible (MEP). A partir de esta curva se obtiene la DE<sub>50</sub> del ácido valproico que fue  $28.29 \pm 2.94$  para la fase I (Gráfico 1),  $20.76 \pm 2.43$  para la fase II (Gráfico II) y la potencia relativa es 1.3.

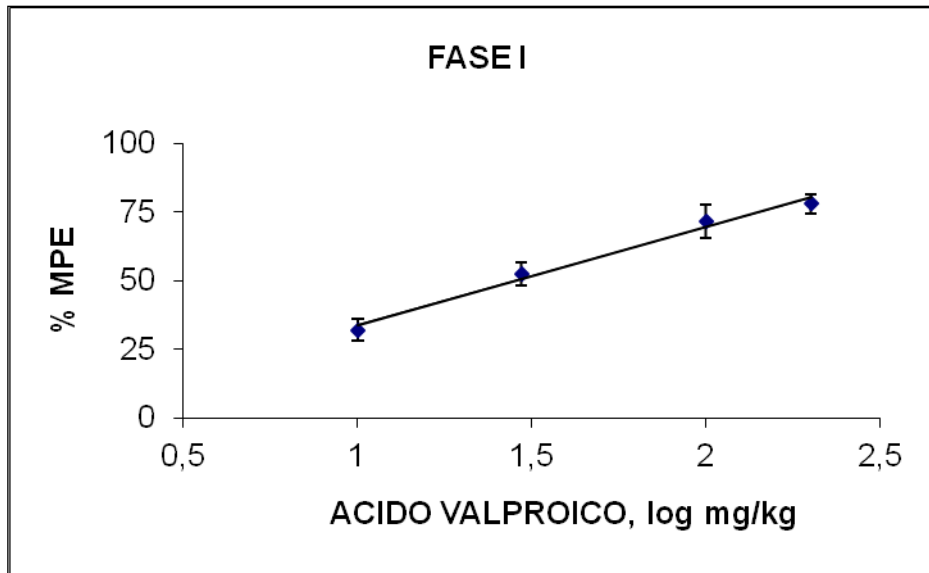


Gráfico N°1: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial.

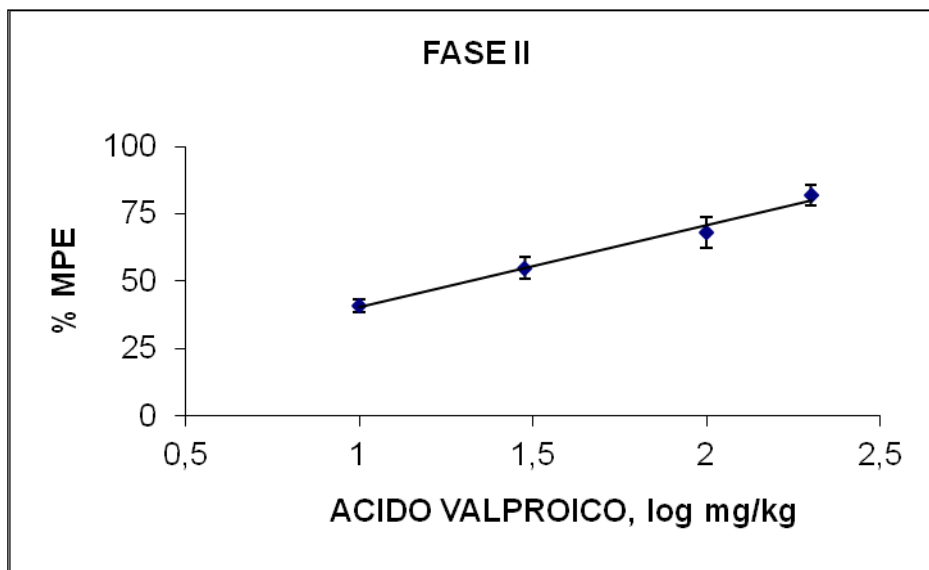


Gráfico N°2: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de ácido valproico en la fase II del test de la formalina orofacial.

- Grupo tratado con naltrexona

La administración intraperitoneal de naltrexona 30 minutos previo a la inyección de formalina resulto en una disminución del tiempo de frotamiento tanto en la fase I como en la fase II con respecto a los datos del grupo control, valores que se adjuntan en la tabla II.

Dosis (mg/Kg)	Fase I X±SEM (%MPE)	Fase II X±SEM (%MPE)
0.1 (n=8)	50.5± 7.19 (58.064)	58.13±4.23 (41.92)
1 (n=8)	41.63±2.96 (68.46)	50.75± 3.26 ( 49.30)
5 (n=8)	21.63±3.90 (74.62)	23.50± 4.14 (76.59)

Tabla II:Tiempo de frotamiento perinatal y de %MPE calculada luego de la inyección intraperitoneal de naltrexona 0.1, 1 y 5 mg/Kg (n= 8 ).

Los datos obtenidos al utilizar naltrexona serán nombrados y no realizará un gráfico a partir de ellos, debido a que no se trata de un analgésico común, pues a dosis menores se produce mayor efecto antinociceptivo.

- Grupo tratado con naltrexona 0.1 y ácido valproico.

La administración i.p. de naltrexona 0.1 mg/kg, 25 minutos previos a la inyección de formalina y de ácido valproico 10, 30, 100 o 200 mg/ Kg 30 minutos previos a la etapa de experimentación produce una disminución en el tiempo de frotamiento con respecto al grupo control, como se observa en la tabla III:

Dosis valproico + naltrexona 0.1	ác. +	Fase I X±SEM (%MPE)	Fase II X±SEM (%MPE)
Control		85.25 ± 3.35	99.88 ± 4.14
10		17.38 ± 1.50 (79.60)	16.00 ± 2.15 (86.00)
30		16.75 ± 1.45 (80.35)	13.25 ± 3.46 (83.74)
100		16.75 ± 2.33 (80.35)	7.88 ± 3.33 (94.11)
200		14.50 ± 1.73 (82.99)	5.00 ± 2.35 (86.98)

Tabla III: Tiempo promedio de rascado durante la primera y segunda etapa del test de la formalina orofacial luego de la administración de naltrexona 0.1 mg/kg y de ácido valproico en diferentes dosis (10,30,100 y 200 mg/kg) cada uno realizado con un tamaño muestral de 8.

Para el cálculo de la  $DE_{50}$  de la fase I y II, se construyó la curva dosis-respuesta, expresada en el logaritmo de la dosis de la naltrexona 0.1 + ácido valproico versus el porcentaje del máximo efecto posible (MEP) para la fase I (gráfico III) y para la fase II (gráfico IV). A partir de esta curva se obtiene la  $DE_{50}$  de la naltrexona + ácido valproico que son significativos desde la decena para la fase I y para la fase II, pero sus valores absolutos no se detallan, porque en el trabajo se consigna sólo hasta 2 decimales, por esta razón, no es posible calcular la Potencia relativa.

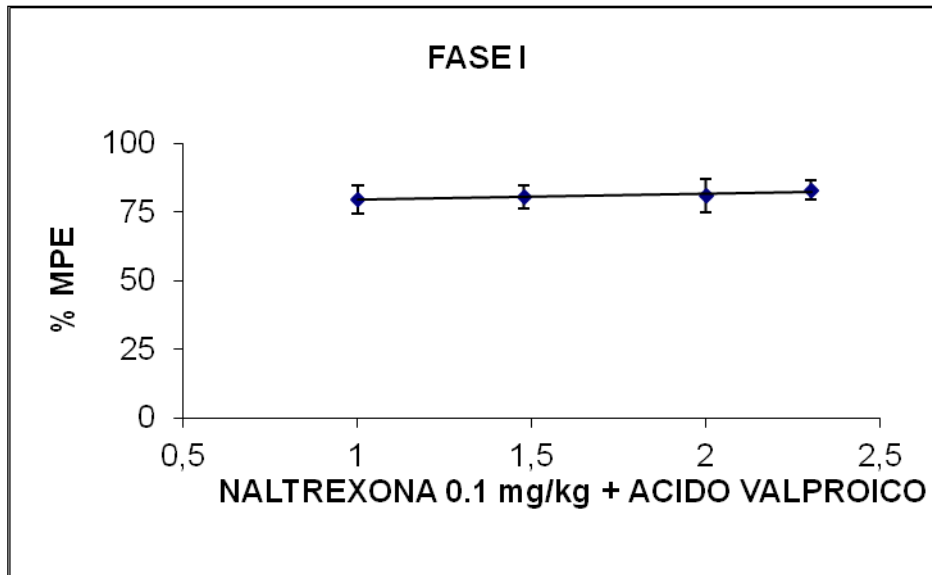


Gráfico N°3: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de naltrexona 0.1 + ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial

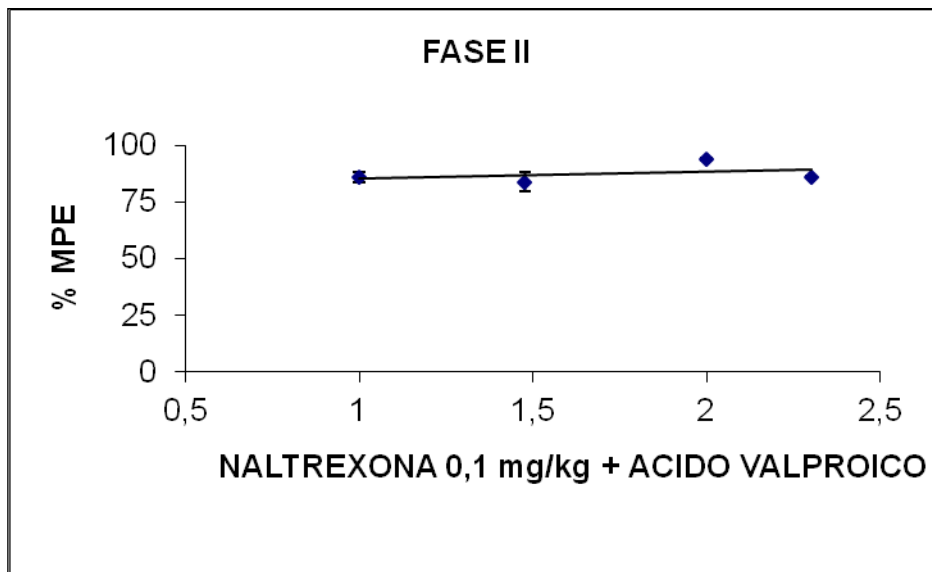


Gráfico N°4: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de naltrexona 0.1 + ácido valproico en la fase II del test de la formalina orofacial

- Grupo tratado con Naltrexona 1 y ácido valproico.

La administración i.p. de naltrexona 1, 25 minutos previos a la inyección de formalina y de ácido valproico 10, 30, 100 o 200 mg/ Kg 30 minutos previos a la etapa de experimentación produce una disminución en el tiempo de frotamiento con respecto al grupo control.

Dosis valproico + naltrexona 1	ác. +	Fase I X±SEM (%MPE)	Fase II X±SEM (%MPE)
Control		85.25 ± 3.35	99.88 ± 4.14
10		22.38 ± 2.38 (73.74)	17.75 ± 2.65 (82.2)
30		18.13 ± 1.77 (78.73)	12.38 ± 1.95 (87.60)
100		9.25 ± 0.94 (89.14)	7.75 ± 2.71 (92.2)
200		5.13 ± 1.77 (94)	5.38 ± 1.27 (94.61)

Tabla IV: Tiempo promedio de rascado durante la primera y segunda etapa del test de la formalina orofacial luego de la administración de naltrexona 1 y ácido valproico en diferentes dosis (10,30,100 y 200) cada uno realizado con un tamaño muestral de 8.

Para el cálculo de la  $DE_{50}$  de la fase I y II, se construyó la curva dosis-respuesta, expresada en el logaritmo de la dosis de la naltrexona 1 + ácido valproico versus el porcentaje del máximo efecto posible (MEP) para la fase I (gráfico V) y para la fase II (gráfico VI). A partir de esta curva se obtiene la  $DE_{50}$  de la naltrexona 1 + ácido valproico que fue  $0.24 \pm 0.44$  para la fase I y fue significativo luego de la decena para la fase II por lo que sus valores no se detallan porque en el trabajo se consigna sólo hasta 2 decimales, por esta razón no es posible calcular la potencia relativa.

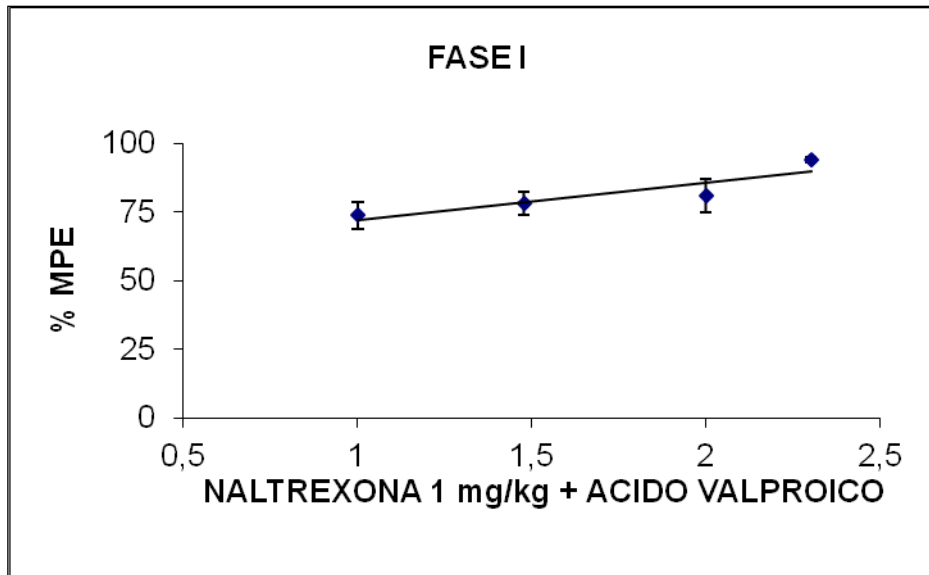


Gráfico N°5: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de naltrexona 1 + ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial

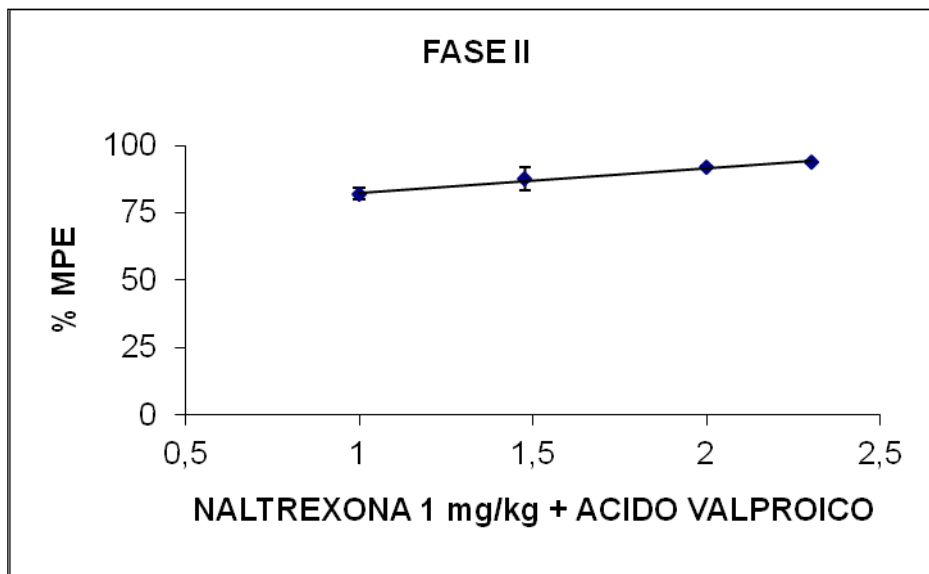


Gráfico N°6: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de naltrexona 1 + ácido valproico en la fase II del test de la formalina orofacial



- Grupo tratado con Naltrexona 5 y ácido valproico.

La administración i.p. de naltrexona 5 mg/Kg, 25 minutos previos a la inyección de formalina y de ácido valproico 10, 30, 100 o 200 mg/ Kg 30 minutos previos a la etapa de experimentación produce una disminución en el tiempo de frotamiento con respecto al grupo control.

Dosis valproico + naltrexona 5	ác. +	Fase I X±SEM (%MPE)	Fase II X±SEM (%MPE)
Control		85.25 ± 3.35	99.88 ± 4.14
10		21.75 ± 3.21 (74.48 )	10.75 ± 1.45 (89.23)
30		15.38 ± 1.70 (81,96)	7.75 ± 1.15 (92.24)
100		12.13 ± 1.5 (85.77)	7.50 ± 1.94 (92.50)
200		8.88± 1.5 ( 89.60)	3.50 ± 1.02 (96.50)

Tabla V: Tiempo promedio de rascado durante la primera y segunda etapa del test de la formalina orofacial luego de la administración de naltrexona 5 y ácido valproico en diferentes dosis (10, 30,100 y 200) cada uno realizado con un tamaño muestral de 8.

Para el cálculo de la  $DE_{50}$  de la fase I y II, se construyó la curva dosis-respuesta, expresada en el logaritmo de la dosis de la naltrexona 5 + ácido valproico versus el porcentaje del máximo efecto posible (MEP) para la fase I y II (gráficos V y VI respectivamente). A partir de esta curva se obtiene la  $DE_{50}$  de la naltrexona 5 + ácido valproico que fue  $0.20 \pm 0.50$  para la fase I y fue significativo para la fase II a partir de la decena por lo que sus valores absolutos no se detallan, porque en el trabajo se consigna sólo hasta 2 decimales, por esta razón la potencia relativa no es posible de calcular.

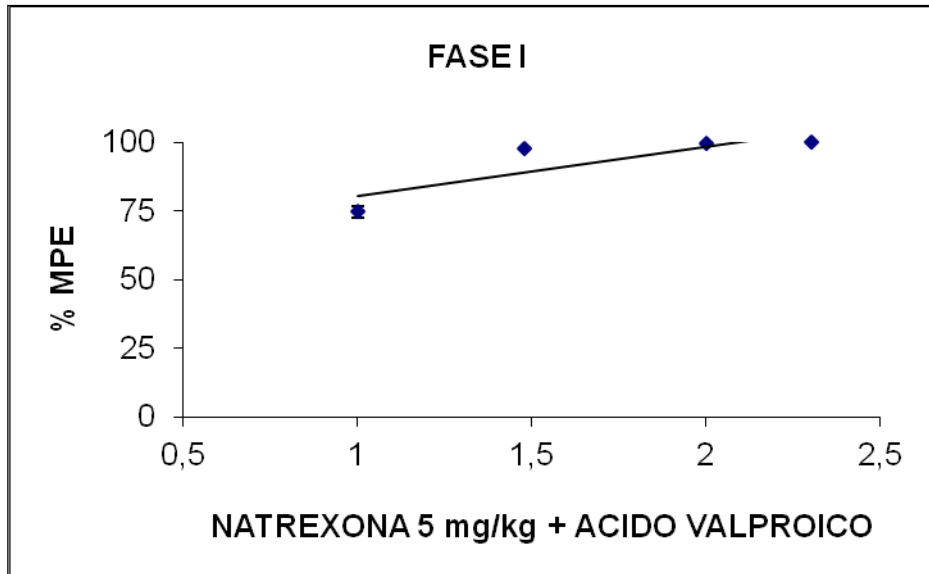


Gráfico N°7: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de naltrexona 5 + ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial

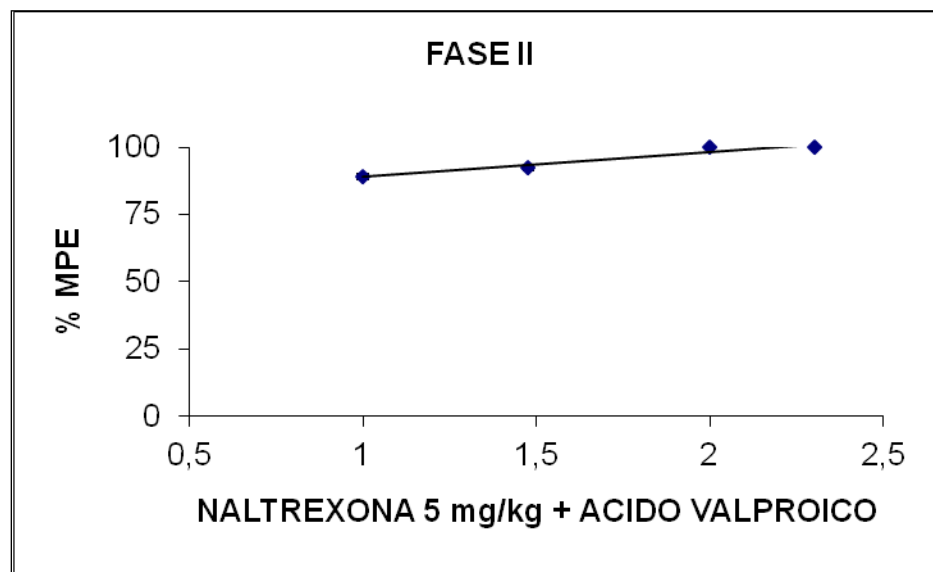


Gráfico N°8: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de naltrexona 5 + ácido valproico en la fase II del test de la formalina orofacial

La tabla resumen de los datos obtenidos durante la observación, de las dosis efectiva 50 y de las respectivas potencias se adjuntan en el anexo n°2 y n°3.

## DISCUSIÓN

En la labor diaria de los profesionales de la salud, es común ver a pacientes con dolor de tipo crónico severo cuya medicación con AINES no es efectiva, por lo que su calidad de vida se ve bastante deteriorada. En el terreno maxilofacial el dolor ocasionado por la neuralgia al trigémino es invalidante para el paciente, por lo que se hace necesario investigar sobre diversas drogas que pueden dar solución a sus problemas.

Para el estudio de este tipo de patologías, existe una prueba llamada test algesiométrico de la formalina orofacial al 2% que permite cuantificar el comportamiento durante el efecto antinociceptivo de fármacos en modelos animales experimentales luego de la inyección de un irritante químico la formalina 2% en el labio superior del animal. La aplicación de esta sustancia genera estimulación nerviosa de las fibras A $\delta$  y C, en neuronas del asta dorsal y núcleos del trigémino, así como el rascado o frotamiento del animal es una respuesta directa a esta, en la que se distinguen dos fases, la algésica –aguda (fase I) y la algésica-inflamatoria (fase II) (15) Esta prueba tiene la ventaja de utilizar bajas concentraciones de formalina que permite estudiar de manera fiable el proceso nociceptivo y destaca por su sencillez de ejecución (16).

Los resultados que se obtuvieron en el presente estudio demuestran que la administración de ácido valproico y naltrexona solos o en conjunto producen actividad antinociceptiva al originar una disminución del tiempo de frotamiento perinasal en los ratones en relación a los datos del grupo control.

El grupo tratado con ácido valproico, aumentó su actividad antinociceptiva, al aumentar la dosis del fármaco en forma progresiva, siendo la dosis de 200 mg/kg la que resultó ser más eficaz en disminuir el número de rascado de los ratones. Esto se demuestra, debido a que el MPE se encontró luego de la aplicación de dicha dosis. Además, los mayores efectos antinociceptivos fueron en la fase II del experimento (tabla I).

Por otra parte, la inyección de naltrexona genera mayor efecto antinociceptivo a dosis menores, siendo 0.1 mg/kg la dosis que tiene mayor potencia analgésica. Además dicho efecto antinociceptivo es mayor en la fase I o aguda del test de la formalina orofacial (tabla II)

La administración conjunta de ácido valproico con naltrexona en sus

diferentes dosis genera mayor efecto nociceptivo que la aplicación de cada una de las dos drogas por separado, generándose una interacción sinérgica entre los dos fármacos. Esto queda demostrado al observar que la mínima MPE es altamente mayor en dosis donde se aplica las drogas de forma conjunta.

La inyección de formalina en el labio superior constituye un modelo de dolor agudo en donde la participación de bradiquinina, TNF- $\alpha$ , interleuquinas, PGs y aminas simpáticas se encuentran descritas (17). Probablemente la acción antinociceptiva del ácido valproico está vinculada principalmente a la recuperación prolongada de los canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje vinculados a la transmisión del impulso eléctrico.

El sinergismo producido durante el uso conjunto de estas drogas nos hace inferir que el ácido valproico ejerce parte de sus efectos usando la vía de los receptores opioides. Esto se debe a que su acción es potenciada por naltrexona y se ha demostrado (18), que los antagonistas opioides son capaces de inducir analgesia en pequeñas dosis, potenciando la acción de los agonistas opioides como la morfina y en este caso el ácido valproico.

Esto conlleva al conocimiento de posibles interacciones farmacológicas del ácido valproico, el cual no se debería administrar como antinociceptivo a pacientes que consuman drogas que actúen en el mismo sitio de acción pues la efectividad de ellos disminuiría, como por ejemplo la gabapentina, fármaco usado para tratar la epilepsia.

El uso de naltrexona en conjunto con el de ácido valproico para tratar el dolor crónico orofacial, nos permite disminuir las dosis de este último y así atenuar los efectos adversos generados como problemas gastrointestinales. Sin embargo, son necesarios mayores estudios en animales para aplicar esta metodología al ser humano.

## CONCLUSIONES

- El ácido valproico produce una actividad antinociceptiva que es dosis dependiente al ser administrado por vía i.p. en el test algesiométrico de la formalina orofacial al 2% en ratones.
- La naltrexona produce mayor actividad antinociceptiva a dosis menores del fármaco.
- El ácido valproico posee mayor potencia analgésica que la naltrexona en la fase II del test de la formalina orofacial.
- La naltrexona posee mayor potencia analgésica que el ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial.
- La administración intraperitoneal de la combinación de ácido valproico y naltrexona en sus diferentes dosis demostró la existencia de una interacción de tipo sinérgica entre ambos fármacos tanto en la fase I como en la fase II del test de la formalina orofacial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Purves (2001). Invitación a la neurociencia. Capítulo 9. Pág. 181- 194
- 2.-Haines (2003), Principios de neurociencia, 2ªedición, Cap 18. Pág. 291-292.
- 3.- Sessle, B.J. (2006) “ Mechanism of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates”. J.Oral Rehabil 33: 243-261
- 4.- Paeile J. Carlos, Bilbeny L.Norberto (2005). El dolor de lo molecular a lo clínico. Tercera edición.
- 5.- Brunton LAURENCE , Lazo John, Parker Keith, (2007), Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición.
- 6.- L. Aliaga, Baños j.e., Barutell, J. Molet, A Rodriguez de la serna Dolor y la utilización clínica de los analgésicos 1996
- 7.- MICROMEDEX (2010) Healthcare Series Vol. 149
- 8.-Miranda Hugo F., Pinardi G. (1997) Farmacodinamia: mecanismo de acción de las drogas. Santiago, Chile. Editorial mediterráneo. P 33-57
- 9.- Luccarini P, Childeric A, Gaydier A.M., Voisin D, Dallel R. 2006 . The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception.The Journal of Pain; 7, 908-14.
- 10.- Zelcer S, Kolesnikov Y, Kovalyshyn I, Pasternak DA, GW. Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Brain Research 2005; 1040: 151– 156
- 11.- González C., Zegpi C., Noriega V., Prieto J.C., Miranda H. (2011). Synergism between dexketoprofen and meloxicam in an orofacial formalin test was not modified by opioid antagonist. Pharmacological reports. 63: 433-440
- 12.-Tallarida R.J. (2001). Drug synergism: its detection and applications. J Pharmacol Exp Ther 298: 865-872
- 13.- Tallarida R.J. (2000). Drug synergism and dose- effect data analysis. Chapman and Hall/ CRC press, New York. P 143- 154
- 14.- Capuano A., De Corato A., Treglia M., Tringali G., Dello., Navarra P. (2009) Antinociceptive Activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. European J of Pharmacol 605: 57-62.
- 15.- Miranda H.F., Sierralta F., Prieto J.C., (2009). Synergism between NSAIDs in orofacial formalin in mice. Pharmacol. Biochem. Behav; 92; 314- 318.

- 16.- Olmos H.M. (2012), "Naturaleza de la interacción entre dexketoprofeno con ketorolaco en dolor orofacial experimental", Trabajo de investigación, requisito para optar al título de cirujano- dentista, Universidad de Chile.
- 17.- Chichorro J.G., Lorenzetti B.B., Zampronio A.R. (2004). Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol* 141 (7): 1175-1184
- 18.- Gourlay G. (2005), *Advances in opioid pharmacology*. *Support care cancer* 13: 153 -159

## ANEXO N°1

Aprobación del comité de Bioética sobre investigación con animales de acuerdo  
al protocolo CBA # 0572 FMUCH



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE**  
**INVESTIGACIÓN EN ANIMALES**

---

### CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *"Rol de Naltrexona en la antinocicepción experimental del Ácido Valproico"*, cuya investigadora responsable es la Srta. Macarena Iriarte, y cuyo tutor es el Dr. Hugo Miranda, no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0572 FMUCH).

La Srta Iriarte y el Dr. Miranda se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto de tesis de Pregrado para obtener el título de Cirujano – Dentista de la Universidad de Chile.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO" después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*



**Dr. Carlos Valenzuela Y.**  
**Presidente**

Santiago, 27 de Diciembre de 2012.

c.c.: Dr. Hugo Miranda, Laboratorio del Dolor, Programa Disciplinario de Farmacología Molecular y Clínica, ICHM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile



## ANEXO N°2: Tablas de datos

## Ácido Valproico 10 mg /Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	30	59	68
2	30	43	51
3	33	47	36
4	22	71	34
5 <sup>a</sup>	23	52	25
6	22	50	31
7	25	72	36
8	24	79	38
Promedio		57.88 ± 4.38	39.88 ± 4.79

## Acido Valproico 30 mg/Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	24	47	21
2	24	58	23
3	24	45	43
4	26	50	15
5	25	27	35
6	24	39	25
7	20	30	32
8	21	27	12
Promedio		40.38 ± 4.09	25.75 ± 3.68

## Ácido valproico 100 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	23	23	4
2	20	16	7
3	22	55	50
4	26	25	23
5	26	15	13
6	26	16	9
7	25	26	26
8	23	17	4
Promedio		24.13 ± 4.68	18.25 ± 5.26

## Ácido valproico 200 mg/Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	25	27	16
2	22	32	12
3	23	20	2
4	20	28	25
5	22	8	5
6	24	20	17
7	26	20	29
8	22	12	6
Promedio		20.88 ± 2.86	14.00 ± 3.41

## Naltrexona 0.1 mg/Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	23	71	60
2	20	42	69
3	25	9	73
4	20	47	59
5	22	58	50
6	21	73	34
7	23	45	59
8	21	59	61
Promedio		50.50 ± 7,19	58,13 ± 4,23

## Naltrexona 1mg/Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	19	52	50
2	22	30	36
3	26	41	56
4	25	33	46
5	22	48	42
6	26	51	53
7	24	43	59
8	25	35	64
Promedio		41.63 ± 2.96	50.75 ± 3.26

## Naltrexona 5mg/Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	24	18	28
2	25	21	33
3	25	31	24
4	25	45	41
5	25	15	4
6	25	14	15
7	27	14	15
8	27	15	28
Promedio		21.63 ± 3.90	23.50 ± 4.14

## Naltrexona 0.1 mg/ kg + Ácido valproico 10 mg/ kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	25	26	9
2	29	14	11
3	24	13	24
4	28	21	12
5	29	16	12
6	30	17	19
7	33	15	10
8	27	17	16
Promedio		17.38 ± 1.50	16.00 ± 2.15

## Naltrexona 0.1 mg/kg + Ácido valproico 30 mg/kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	29	15	24
2	29	21	12
3	28	16	8
4	26	22	10
5	26	17	20
6	27	9	0
7	27	15	7
8	25	19	15
Promedio		16.75 ± 1.45	13.25 ± 3.46

## Naltrexona 0.1/Kg + Ácido valproico 100 mg/Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	26	24	0
2	23	16	0
3	25	17	2
4	25	19	0
5	27	13	8
6	26	14	10
7	26	5	0
8	27	26	27
Promedio		16.75 ± 2.33	7.88 ± 3.33

## Naltrexona 0.1 mg /Kg + Ácido valproico 200 mg /Kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	27	15	3
2	23	11	7
3	24	8	8
4	23	15	3
5	24	21	2
6	23	22	7
7	22	13	8
8	22	11	2
Promedio		14.50 ± 1.73	5.00 ± 2.35

## Naltrexona 1mg/ Kg + Ácido valproico 10 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	24	17	10
2	24	25	30
3	26	23	14
4	27	27	28
5	27	35	11
6	26	14	16
7	25	17	14
8	26	21	19
Promedio		22.38 ± 2.38	17.75 ± 2.65

## Naltrexona 1mg/ Kg + Ácido valproico 30 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	25	18	4
2	24	14	5
3	26	14	18
4	29	16	10
5	32	25	13
6	30	19	15
7	29	13	16
8	25	26	18
Promedio		18.13 ± 1.77	12.38 ± 1.95

## Naltrexona 1mg/ Kg + Ácido valproico 100 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	28	9	25
2	31	11	10
3	31	9	1
4	30	6	6
5	33	11	1
6	30	10	4
7	33	5	7
8	33	13	8
Promedio		9.25 ± 0.94	7.75 ± 2.71

## Naltrexona 1mg/ Kg + Ácido valproico 200 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	29	0	0
2	29	3	6
3	33	0	2
4	35	3	6
5	33	6	4
6	30	5	7
7	32	9	6
8	32	15	12
Promedio		5.13 ± 1.77	5.38 ± 1.27

## Naltrexona 5 mg/ Kg + Ácido valproico 10 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	32	35	10
2	31	27	6
3	31	26	19
4	36	13	12
5	29	25	11
6	31	6	6
7	34	24	10
8	31	18	12
Promedio		21.75 ± 3.21	10.75 ± 1.45



## Naltrexona 5mg/ Kg + Ácido valproico 30 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)	
1	31	12	10	
2	25	16	6	
3	23	13	12	
4	31	23	2	
5	30	9	9	
6	32	12	5	
7	27	21	10	
8	34	17	8	
Promedio		15.38 ± 1.70	7.75 ±	1.15

## Naltrexona 5mg/ Kg + Ácido valproico 100 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)	
1	35	9	7	
2	26	14	7	
3	26	8	6	
4	27	12	9	
5	26	9	2	
6	27	9	5	
7	28	19	20	
8	28	17	4	
Promedio		12.13 ± 1.02	7.50 ±	1.94

## Naltrexona 5mg/ Kg + Ácido valproico 200 mg /kg

Nº	Peso (g)	Fase I (s)	Fase II (s)
1	24	6	2
2	29	17	2
3	25	3	9
4	20	17	2
5	25	5	3
6	27	1	1
7	21	5	2
8	26	17	7
Promedio		8.88 ± 1.03	3.50 ± 1.02

## ANEXO N°3:

Tabla Resumen de DE<sub>50</sub> en mg/kg y de potencia relativa de ácido valproico administrado i.p. en ausencia y en presencia de naltrexona via i.p.

Fármacos	Fase I	Fase II	Potencia Relativa
Acido valproico	28.29 ± 2.94	20.76 ± 2.43	1.3
Id. + naltrexona 0.1 mg/kg	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	N.A
Id. + naltrexona 1 mg/kg	0.24 ± 0.44*	0.00 ± 0.00*	N.A
Id. + naltrexona 5 mg/kg	0.20 ± 0.50*	0.00 ± 0.00*	N.A

\* P<0.05 comparado con ácido valproico solo. Los valores 0.00 son significativos desde la decena, pero sus valores absolutos no se detallan, porque en el trabajo se consigna sólo hasta 2 decimales.

N.A: No es posible calcular.