



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**INTERACCIÓN EXPERIMENTAL DE GABAPENTINA CON ÁCIDO VALPROICO
EN DOLOR OROFACIAL INDUCIDO**

Víctor Torres Aedo

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Hugo F. Miranda

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Fernando Sierralta

**Adscrito a Proyecto “Perfil Farmacológico de Analgésicos en Dolor
Experimental”
Santiago - Chile
2013**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**INTERACCIÓN EXPERIMENTAL DE GABAPENTINA CON ÁCIDO VALPROICO
EN DOLOR OROFACIAL INDUCIDO**

Víctor Torres Aedo

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Hugo F. Miranda

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Fernando Sierralta

**Adscrito a Proyecto “Perfil Farmacológico de Analgésicos en Dolor
Experimental”
Santiago - Chile
2013**

AGRADECIMIENTOS

- A mi madre y padre por el constante apoyo y motivación a largo de todos estos años
- A mis hermanas Soledad y Marisol, y mis sobrinos, por la paciencia y cariño entregado
- Al Dr. Hugo Miranda, por su dedicación, entrega y guía para el desarrollo del presente trabajo
- A mis amigas y amigos, también compañeros de universidad, por entregarme su apoyo y sugerencias a lo largo del estudio
- A los señores A. Correa y J. López por su ayuda, disposición y excelente aporte, lo cual, fue crucial para realizar de manera efectiva y eficaz en el diseño y puesta en marcha de la fase experimental del presente trabajo.
- Al proyecto de investigación Perfil Farmacológico de Analgésicos en Dolor Experimental y todo el departamento de farmacología por su apoyo constante en el desarrollo del proyecto

ÍNDICE

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	2
III.	Marco Teórico.....	3
	1. Dolor.....	3
	1. Definición.....	3
	2. Clasificación.....	3
	2. Fisiología del dolor.....	4
	1. Nociceptor y vías aferentes.....	5
	2. Médula espinal y organización laminar.....	6
	3. Transmisión por vías ascendentes.....	8
	4. Proyecciones supraespinales.....	8
	5. Modulación nociceptiva.....	9
	3. Dolor Crónico y sensibilización neuronal.....	10
	1. Dolor orofacial.....	12
	2. Fisiopatología del dolor orofacial neuropático.....	12
	3. Dolor orofacial neuropático de tipo periférico.....	13
	4. Analgesia multimodal.....	14
	1. Coanalgésicos.....	14
	2. Manejo farmacológico del dolor neuropático.....	15
	3. Antiepilépticos.....	15
	5. Medición experimental del dolor.....	18
	1. Modelos de dolor en animales.....	19
	2. Test de formalina orofacial.....	19
IV.	Hipótesis y objetivos.....	21
	1. Hipótesis.....	21
	2. Objetivos.....	21
	1. General.....	21
	2. Específicos.....	21
V.	Materiales y metodos.....	22
	1. Tipo de investigación.....	22
	2. Animales.....	22
	3. Test de formalina orofacial.....	23

4.	Administración de fármacos.....	24
5.	Evaluación de la actividad nociceptiva.....	25
6.	Estudio de la interacción antinociceptiva de los fármacos.....	26
7.	Análisis de datos.....	27
VI.	Resultados.....	29
1.	Evaluación de la analgesia.....	29
1.	Grupo control.....	29
2.	Efecto antinociceptivo de la gabapentina.....	29
3.	Curvas dosis-respuesta DE ₅₀ gabapentina.....	30
4.	Efecto antinociceptivo del ácido valproico.....	31
5.	Curvas dosis-respuesta DE ₅₀ ácido valproico.....	32
2.	Interacción de gabapentina con ácido valproico.....	34
1.	Grupo tratado con mezcla de gabapentina con ácido valproico en fase I.....	34
2.	Grupo tratado con mezcla de gabapentina con ácido valproico en fase II.....	35
3.	Cálculo de DE ₅₀ de la mezcla.....	36
3.	Análisis isobolográfico.....	37
VII.	Discusión.....	39
VIII.	Conclusiones.....	44
IX.	Bibliografía.....	45
X.	Anexo n° 1.....	49

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El dolor corresponde a una experiencia compleja que comprende: dimensiones sensoriales, cognitivas, emocionales y motivacionales en los individuos. En su forma aguda funciona como un sistema de defensa del organismo; pero al tornarse crónico se desarrolla un estado patológico que debe ser tratado. El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico con características propias, que puede llegar a ser inhabilitante para quien lo padece. A nivel orofacial puede expresarse comúnmente como: neuralgia trigeminal, neuralgia post-herpética y odontalgia atípica. Actualmente, el manejo de este tipo de dolor no obtiene resultados óptimos y se ha descrito que la terapia combinada de fármacos posee mejores resultados que la monoterapia. Al ser los anticonvulsivantes considerados fundamentales en el tratamiento de este tipo de dolor, se han incluido en este estudio la gabapentina y el ácido valproico para evaluar su interacción.

MATERIALES Y MÉTODOS: Gabapentina, Ácido Valproico y la combinación de ambos, fueron administrados vía intraperitoneal (i.p.) en distintas dosis. Midiéndose los efectos antinociceptivos, a través, del test de la formalina orofacial al 2%, comparándolo con el grupo control. Para definir la naturaleza de la interacción se realizó un análisis isoblográfico.

RESULTADOS: La administración de gabapentina, ácido valproico y la combinación de ambos, producen antinocicepción dosis-dependiente tanto en la fase algésica aguda (fase I) como en la inflamatoria (fase II) del test, siendo mayor para la fase II en el grupo tratado con gabapentina, mientras que, el ácido valproico presentó efectos similares en ambas fases y la combinación de ambos fármacos produjo una antinocicepción bifásica dosis dependiente, más eficiente en fase I.

CONCLUSIONES: La gabapentina y el ácido valproico producen un efecto de antinocicepción sinérgica administrados i.p. en ratones y sugiere que esta terapia combinada mejoraría la antinocicepción en casos de dolor neuropático a nivel trigeminal. Es necesario realizar estudios clínicos de esta combinación para poder extrapolar los resultados a humanos.

II. INTRODUCCIÓN

El dolor corresponde a una experiencia compleja que comprende dimensiones sensoriales, cognitivas, emocionales y motivacionales en los individuos, cuyo objetivo final, es informar al cerebro. Sobre el estado del medio ambiente externo e interno, para proteger al organismo y/o limitar el daño (Basbaum, et al., 2009). No obstante, cuando los estados dolorosos se tornan persistentes conlleva una alteración de los mecanismos nociceptivos a nivel central, autoperpetuando el dolor y constituyendo estados de dolor crónico (Latremliere & Woolf, 2009). Una de las áreas mayormente inervadas del organismo es la región orofacial, sitio donde se desarrollan condiciones dolorosas con características propias. Además, de los dolores relacionados a patologías pulpares y periodontales, en ésta zona es posible encontrar dolores de tipo crónico, tales como; neuralgia trigeminal, neuralgia post-herpética y odontalgia atípica (Hargreaves, 2011). Sin embargo, la fisiopatología de estos dolores ha sido escasamente estudiada (Luccarini, et al., 2006). Para el manejo del dolor crónico no existe un tratamiento que sea completamente eficiente y que se pueda aplicar a la mayoría de los pacientes (Raboisson & Dallel, 2004). Lo que está claro es que el dolor orofacial crónico, debido a su gran intensidad implica una disminución de la calidad de vida de quien lo padece (Stucky, et al., 2001). Para el manejo del dolor crónico, los AINEs suelen ser ineficaces, mientras que, los opioides tienen tendencia a presentar efectos no deseados como euforia y sedación (Attal, et al., 2010). El control del dolor crónico de tipo neuropático ha respondido de manera óptima a medicamentos denominados coanalgésicos, que corresponden a fármacos cuyo objetivo inicial no era el manejo del dolor; sin embargo con el tiempo se fueron descubriendo estas propiedades antinociceptivas. Dentro de estos medicamentos encontramos los antiepilépticos, antidepresivos, ansiolíticos, neurolépticos y bloqueadores adrenérgicos (Canadian Pain Society, 2007). Si bien, el efecto en monoterapia ha sido estudiado; la respuesta de la terapia combinada es un campo en desarrollo, y que puede devenir en mejoras para la calidad de vida del paciente, esto debido al posible efecto sinérgico, el cual, permite disminuir las dosis administradas, así como la probabilidad de generar efectos no deseados. A partir de esta problemática, en el presente estudio se evaluó la interacción de ácido valproico con gabapentina, utilizando el análisis isobolográfico, en un modelo de dolor orofacial inducido (Raboisson & Dallel, 2004).

III. MARCO TEORICO

1. Dolor

1.1 Definición de Dolor

La asociación internacional del estudio del dolor, define dolor como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en términos de ese daño” (Merrill, 2007). Correspondiendo a un proceso neurofisiológico complejo, que implica, tanto una dimensión sensorial como una dimensión psicológica (Lumley, et al., 2011).

1.2 Clasificación del dolor

Al profundizar más dentro de las manifestaciones del dolor, éstas se pueden dividir en tres tipos distintos según su función neurobiológica. Primero está el dolor nociceptivo, el cual, actúa como un sistema de alerta de protección fisiológica, esencial para detectar y minimizar el contacto con estímulos perjudiciales o nocivos; presentando un umbral elevado, que solamente se activa en presencia de estímulos intensos. Debido a su rol protector, demanda atención inmediata y activa una acción refleja (figura 1). El segundo tipo de dolor corresponde al dolor inflamatorio, sus funciones también son adaptativas y protectoras, puesto que, disminuye el umbral del dolor luego de un daño tisular y participa indirectamente en la recuperación del tejido dañado provocando una disminución del contacto físico y del movimiento en relación a esta área, todo esto gracias a la hipersensibilidad dolorosa que se presenta frente a estímulos normalmente inocuos pero que ahora provocan dolor. El mecanismo responsable de este proceso está relacionado con la activación de células del sistema inmune ante daño tisular o infección (fig. 1). Por último el dolor patológico, resultante de un funcionamiento anormal del sistema nervioso, provoca una “desadaptación”. Este dolor no corresponde a un síntoma de algún trastorno, sino, más bien a un estado de enfermedad del sistema nervioso, puede estar asociado a un daño del sistema nervioso (dolor neuropático) (fig.1) o bien, presentarse en condiciones en las cuales, no existe daño o inflamación (dolor disfuncional). Algunas condiciones que provocan dolor disfuncional incluyen: fibromialgia, síndrome de colon irritable, cistitis, entre otros síndromes en los cuales existe dolor, pero no un estímulo nocivo y ninguna, o mínima, patología inflamatoria periférica (Clifford, 2010).

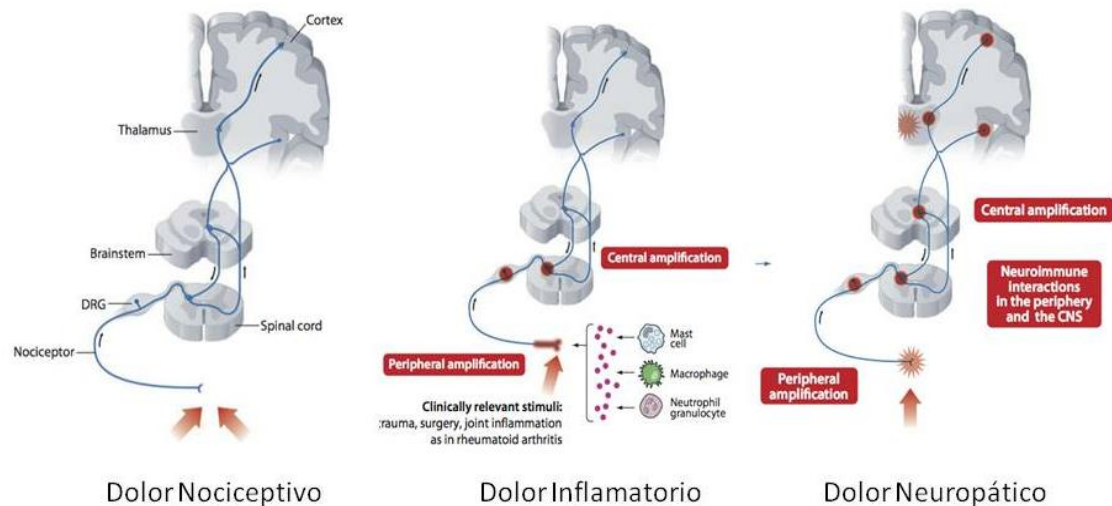


Figura 1 Tipos de dolor según su etiología (Costigan et al. 2009).

1.2.1 Duración: Se divide en “agudo” y “crónico” considerándose 3 meses el límite para diferenciar uno del otro. (Lumley, et al., 2011).

a) **Dolor agudo:** Es causado por estímulos nocivos o bien, una función anormal de músculos u otros órganos. Su duración corresponde al tiempo que demoran los tejidos dañados en sanar (Paeile & Bilbeny, 2005).

b) **Dolor crónico:** También conocido como dolor persistente, es definido como un dolor cuya duración es superior a tres meses, o que por las características de su origen sobrepasa el tiempo que habitualmente podría definir un dolor agudo semejante (Lumley, et al., 2011). El dolor crónico tiene efectos a nivel fisiológico, psicológico y conductual del paciente de manera que su calidad de vida se ve disminuida (Torregrosa, 1994). Se presenta comúnmente de ya sea, de forma continua, donde el dolor permanece estable en su intensidad, o bien, de forma recurrente, caracterizado por que el dolor tendrá periodos de alivio total o parcial, así como periodos de intensidad mayor a la basal. (Paeile & Bilbeny, 2005).

2. Fisiología del dolor

En la percepción de un estímulo doloroso se necesitan distintas estructuras y conexiones, dentro de las cuales destaca: una estructura periférica que actúa como receptor, una sinapsis en la médula espinal, vías de conducción ascendentes desde la médula a centros superiores y; vías de conducción descendentes desde los centros superiores a la médula (Basbaum, et al., 2009) (Torregrosa, 1994).

2.1 Nociceptor y vías aferentes

Los receptores sensitivos son estructuras capaces de responder ante determinados estímulos, cuya función es transformar la energía de estos en un potencial eléctrico, y transmitir éste, a través, de una vía nerviosa, desde la periferia hasta el SNC. Dentro de los receptores sensitivos encontramos los nociceptores, distribuidos en la piel, los músculos, las articulaciones y las vísceras (Voscopoulos & Lema, 2010), poseen un umbral de estimulación alto, y corresponden a terminaciones nerviosas libres, constituyendo la porción más distal de las neuronas aferentes primarias (Almeida, et al., 2004). Los cuerpos celulares de estas neuronas, variarán su localización según el origen del estímulo, si este es originado en la región de cabeza y cuello; los somas neuronales se localizarán en el ganglio trigeminal; mientras que, si el origen es en el resto del cuerpo los somas neuronales se ubican en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) de la médula espinal (Merrill, 2007). La sensación dolorosa es el resultado de la activación directa del nociceptor, ya sea, por estímulos térmicos, mecánicos y químicos; o bien por la activación indirecta producida por la acumulación de sustancias a nivel local o por cambios metabólicos locales, como disminución de pH (Stucky, et al., 2001).

2.1.1 Morfología del nociceptor

Las fibras nerviosas periféricas nociceptivas presentan una morfología única denominada “pseudo-unipolares”, caracterizándose en que los terminales centrales y periféricos salen de un tallo axonal común; el cual, se bifurca, por ende, un axón inerva la periferia y otro a hace sinapsis con la neurona de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal (Dubin & Patapoutian, 2010). La importancia de este tipo morfológico radica en que, ambos extremos pueden ser dirigidos por una variedad de moléculas endógenas que regulan su sensibilidad. Sin embargo solamente el extremo periférico puede responder a estímulos ambientales. La morfología pseudo-unipolar, es el motivo de que el desarrollo terapéutico esté dirigido a ambos terminales para controlar el dolor (Stucky, et al., 2001).

2.1.2 Clasificación

Las fibras aferentes implicadas en la transmisión del impulso nociceptivo se clasifican según su diámetro, estructura y velocidad de conducción en (Merrill,

2007)(Paeile & Bilbeny, 2005):

a) **Fibras A β** : Fibras mielinizadas, de diámetro >10 [μm] y velocidad de conducción entre 30 a 100 [m/s]. Si bien, normalmente no tienen relación con la conducción dolorosa, puesto que, están relacionadas al tacto ligero, una vez que se ha producido una noxa, estas pueden iniciar la transmisión del dolor .

b) **Fibras A δ** : son mielinizadas, poseen un diámetro de 3 a 20 [μm], su velocidad de conducción es 4 a 30 [m/s]. Median el dolor agudo y bien localizado, el cual, se percibe como dolor breve agudo o punzante .

c) **Fibras C**: fibras amielínicas, de diámetro 0,3 a 1,5 [μm], su velocidad de conducción es 0,5 a 2 [m/s], Se asocian al dolor menos localizado y están ligadas a termorreceptores, mecanorreceptores de bajo umbral y receptores específicos para sustancias algogénicas (potasio, acetilcolina, serotonina, prostaglandinas, sustancia P e histamina). Corresponden al 70% de los nociceptores.

2.2 Medula espinal y organización laminar

El primer nivel de integración a nivel del sistema nervioso central, tiene lugar en el asta dorsal de la medula espinal o ganglio trigeminal (según el origen anatómico), donde se produce la primera sinapsis de las fibras nerviosas aferentes primarias. Además, la médula espinal constituye un filtro que permite eliminar aquellos mensajes innecesarios y amplificar los más relevantes. Dentro del asta dorsal se encuentran principalmente las terminaciones centrales de las neuronas de primer orden, neuronas propias del asta dorsal, y por último terminales de aquellas vías descendentes, que permiten la regulación de la información nociceptiva aferente (Almeida, et al., 2004). Respecto a las neuronas propias del asta dorsal, estas se clasifican según el tipo de aferencia que reciben, en tres clases; las primeras son neuronas nociceptivas específicas, activadas por estímulos nociceptivos de alta intensidad, provenientes de fibras A δ y C, se asocian a la codificación de la localización y características físicas del estímulo nociceptivo (Basbaum, et al., 2009). Luego encontramos las Neuronas no-nociceptivas, las cuales son activadas con la información proveniente de estímulos inocuos, provenientes de fibras A δ y A β (Almeida, et al., 2004). Y por último las Neuronas de amplio rango dinámico (siglas en ingles WDR), estas responden

tanto a estímulos nociceptivos, provenientes de fibras A δ y C, como a estímulos no nociceptivos, provenientes de fibras A β . Jugando un papel fundamental en la regulación y codificación de la intensidad del estímulo (Saarto & Wiffen, 2012).

El asta dorsal de la médula espinal está organizada en láminas anatómica y electrofisiológicamente distintas, llamadas láminas de Rexed, numeradas de la I a la VI (Merrill, 2007). Las neuronas tipo A δ se proyectan a la lámina I, II (porción externa) y V. Por otra parte, los nociceptores C se proyectan a las láminas I y II (Luccarini, et al., 2006). Siendo las neuronas de la lámina I de carácter nociceptivo específico. Las neuronas correspondientes a la lámina V son de carácter polimodal (WDR) (figura 2) (Merrill, 2007).

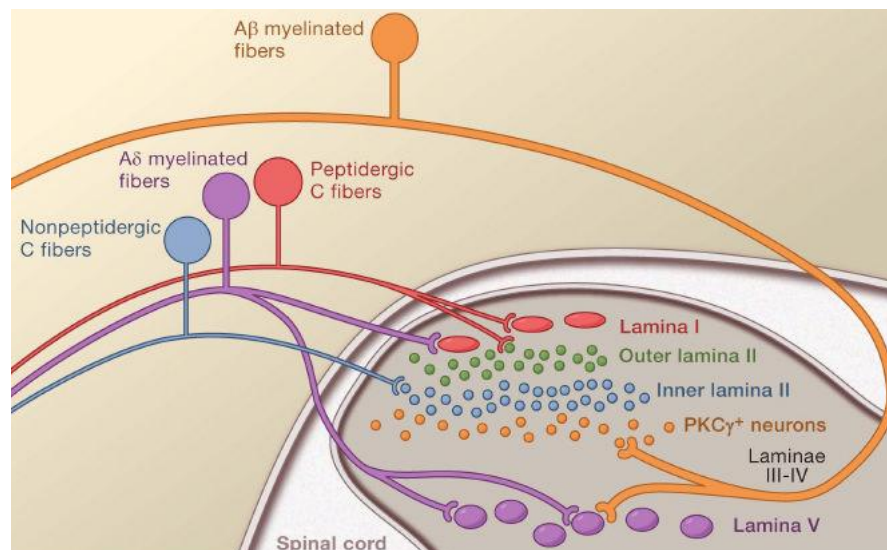


Figura 2 Esquema que representa la organización laminar del asta dorsal de la médula espinal (modificado de Basbaum et al., 2009)

La sinapsis a nivel del asta dorsal puede ser con dos tipos de neuronas (Almeida, et al., 2004): Neuronas de proyección la que prosiguen con la transducción del impulso nociceptivo a centros superiores; o Interneuronas, las cuales se localizan en las láminas II y III. Existiendo algunas con funciones inhibitorias y otras excitatorias que facilitan la transmisión dolorosa.

La sinapsis de la segunda neurona puede producirse con más de una neurona periférica, esto se observa en las neuronas WDR (Canadian Pain Society, 2007), y explicándose de esta manera la existencia del dolor irradiado. Una vez que tiene lugar la sinapsis con la segunda neurona, el haz principal de fibras decusa en la región comprendida entre el conducto del epéndimo y comisura gris

anterior, ascendiendo por el fascículo anterolateral hacia estructuras del tronco encefálico y tálamo (Merrill, 2007).

Los neurotransmisores implicados en la modulación de las aferencias primarias se pueden clasificar en dos tipos según su función, pudiendo ser esta: excitatoria o inhibitoria. Dentro los excitatorios se encuentran el glutamato, aspartato, neurocinina A y el péptido regulador del gen de la calcitonina (GRP). Por otra parte, los neurotransmisores inhibidores corresponden al GABA, la glicina, opioides endógenos, acetilcolina, serotonina, noradrenalina y dopamina. Algunos neurotransmisores, como la colecistoquinina (CCK) y la sustancia P, pueden presentar ambos efectos, dependiendo de la interneurona que presente el receptor blanco de estas sustancias (Basbaum, et al., 2009)(Maizels & McCarberg, 2005).

2.3 Transmisión por vías ascendentes

Las vías ascendentes, son aquellos haces nerviosos conformados principalmente por las neuronas de proyección, las cuales, hacen sinapsis con neuronas ubicadas en sitios supraespinales, como el tálamo, el hipotálamo, el tronco encefálico, entre otras (Zhuo, 2007).

Estas segundas neuronas, cuyos somas se encuentran en el asta posterior, dan origen a tres haces ascendentes contralaterales (Basbaum, et al., 2009)(Paeile & Bilbeny, 2005). Dentro de los haces más importantes para la conducción del dolor hacia los centros superiores encontramos: el haz neoespinalámico, encargado de conducir la información de la ubicación topográfica del dolor; el Haz paleoespinalámico que se relaciona con aspectos emocionales del dolor. Y por último el encargado del componente afectivo y las respuestas neurovegetativas es el haz espinoreticulotalámico.

2.4 Proyecciones supraespinales

Una vez que el estímulo doloroso asciende al sistema nervioso central, específicamente a centros superiores corticales, tales como: corteza sensitiva, circunvolución del cíngulo, corteza prefrontal, amígdala e hipotálamo, esta información es procesada y adquiere una representación mental asociada a experiencias previas o actuales del individuo, estado de conciencia, estímulos sensoriales concomitantes y estado emocional que modifica la percepción del

dolor (Merrill, 2007)(Nieto & Cruciani, 2006). El sitio donde mayoritariamente toma lugar el relevo con destino a la corteza es el tálamo, cuya función es: recibir, integrar y transferir los estímulos dolorosos y proyectarlos desde y hacia sus múltiples núcleos y la corteza, definiendo el circuito funcional de procesamiento del dolor. (Almeida, et al., 2004). A nivel de la corteza cerebral, es donde, tiene lugar el último procesamiento del estímulo nociceptivo (Paeile & Bilbeny, 2005). Las áreas corticales sindicadas como participantes en el procesamiento de la información son: la corteza sensitiva donde se codifica la intensidad y localización del estímulo, a su vez, esta está interconectada con el área postparietal y la ínsula, que se relaciona con el componente afectivo-emocional del dolor y la corteza cingulada anterior, que coordina la información de áreas parietales con regiones frontales (figura 3) (Almeida, et al., 2004).

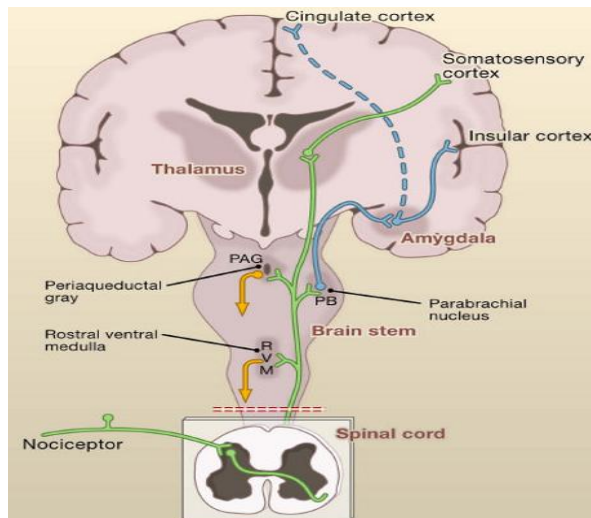


Figura 3 Esquema de la anatomía de las vías nerviosas y sus proyecciones centrales (modificado de Bassbaum et al., 2009)

2.5 Modulación nociceptiva

La modulación de la nocicepción corresponde a cambios reversibles en la excitabilidad de los aferentes primarios y las neuronas centrales, lo que es posible, gracias cambios en la expresión de receptores y canales iónicos (Canadian Pain Society, 2007).

A nivel de la médula espinal se encuentra la primera modulación nerviosa, producida, gracias a las conexiones que se establecen entre las fibras aferentes nociceptivas y las no nociceptivas, las que controlan la información dolorosa transmitida hacia los centros superiores. El mecanismo implicado en este proceso,

se explica mediante la Teoría de la Puerta de Control de Wall y Melzack (Melzack, 2006). Según ésta, el dolor es resultante del equilibrio de la actividad de las fibras aferentes nociceptivas y no nociceptivas. A las láminas I y V del asta dorsal llegan estímulos de fibras nociceptivas ($A\delta$ y C) y fibras no nociceptivas ($A\alpha$ y β), estas últimas activan interneuronas inhibitorias de la lámina II, que inhiben la descarga de las neuronas de la lámina V y, por ende, la salida de la información nociceptiva (“Puerta cerrada”). Las fibras $A\delta$ y C causan la excitación de las neuronas de la lámina V y al mismo tiempo inhiben a las interneuronas inhibitorias de la lámina II, lo que permite la salida de la información nociceptiva (“Puerta abierta”) (Melzack, 2006). El segundo nivel de modulación, se localiza supraespinalmente. Consiste en el control del ingreso de estímulos nociceptivos proveniente de estructuras centrales, a través de vías descendentes; las cuales, son en su mayoría son inhibitorias pero también se han descrito algunas facilitadoras. El origen de esta modulación tiene lugar en el tronco encefálico, la corteza somatosensorial, el hipotálamo, el mesencéfalo, la sustancia gris periacueductal y el rafe magnus. Desde estas zonas descienden las fibras nerviosas hasta el asta posterior de la médula espinal con proyecciones a las láminas I y V, con efecto directo en la integración y el paso de la información nociceptiva. Las neuronas encargadas de la inhibición son descritas en tres tipos interrelacionadas funcionalmente: neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. Pudiendo disminuir la descarga de neurotransmisores pronociceptivos desde fibras aferentes ($A\delta$ y tipo C) y de proyección; o también, de forma indirecta activando neuronas inhibitorias o inhibiendo neuronas excitatorias en el asta dorsal de la médula espinal (Serrano-Atero, et al., 2001). Una tercera modulación que se ha descrito, es la denominada modulación celular, llevada a cabo por células gliales (microglías y astroglias), que están presentes en el asta dorsal. Estas células liberan mediadores pronociceptivos (glutamato, NO, PG, citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α) que modifican el microambiente del asta dorsal (Iwata, et al., 2011).

3. Dolor Crónico y sensibilización neuronal

La sensibilización neuronal corresponde al aumento de la sensibilidad a nivel del nociceptor; esta puede ser: periférica, o bien, central (Merrill, 2007). La sensibilización periférica comienza luego de producirse una injuria, tras lo cual, se

desarrolla una respuesta inflamatoria que libera mediadores en el sitio en cuestión. La sensibilización, implica que los umbrales bajen, desencadenando impulsos nociceptivos ante estímulos inocuos producidos en la zona donde ocurrió la noxa, lo que se denomina hiperalgesia primaria. Varios mecanismos han sido sugeridos en esta sensibilización. Según lo descrito en la literatura, se produce debido a agentes moleculares generados durante el proceso inflamatorio, donde se incluyen citoquinas, factor de crecimiento neuronal, prostaglandinas, leucotrienos, sustancia P y bradicinina) (Perl, 2011).

La sensibilización central implica; una reducción del umbral de activación de las neuronas del asta dorsal, un aumento de la actividad espontánea, el desarrollo de respuestas alteradas frente a estímulos sobre el umbral y un aumento de campos receptivos. Lo que genera dolor en áreas no lesionadas (hiperalgesia secundaria) (Merrill, 2007). Esta situación se origina cuando el proceso inflamatorio y la sensibilización aferente sean de intensidad suficiente, o, si ha ocurrido daño neuronal, estableciéndose el proceso antes descrito. El aumento de la concentración de mediadores excitatorios a nivel central, como glutamato y óxido nítrico (NO) alteran el fenotipo de los nociceptores, generando cambios neuronales que en asociación a la apoptosis de interneuronas inhibitorias desencadenan el dolor crónico (Voscopoulos & Lema, 2010). Los cambios neuronales se basan en la neuroplasticidad, definida como la remodelación de la citoarquitectura neuronal, que modifica las sinapsis, y es propiciada por células gliales (Latremoliere & Woolf, 2009). Dentro de la neuroplasticidad se incluye la modulación y la modificación neurológica. La modificación neuronal corresponde a cambios duraderos de la expresión de neurotransmisores, receptores, canales iónicos y modificaciones de la citoarquitectura, por lo cual, este fenómeno parece ser el nexo entre dolor agudo y crónico (Voscopoulos & Lema, 2010). El dolor agudo persistente potencia la sinapsis de neuronas intrínsecas del asta dorsal, lo que se conoce como wind-up, crucial en la génesis del dolor crónico; generando cambios plásticos tempranos en diversos sistemas de señalización intracelular, que alteran la expresión genética, deviniendo en alteraciones morfofuncionales duraderas (cambios plásticos tardíos).

3.1 Dolor orofacial

Las condiciones dolorosas que encontramos dentro de la región orofacial presentan características propias, debido a la densa inervación que presenta (Hargreaves, 2011). Sin embargo, las investigaciones en relación a los mecanismos asociados a estos dolores son insuficientes (Luccarini, et al., 2006)(Raboisson & Dallel, 2004). El dolor neuropático en el territorio orofacial comprende un grupo heterogéneo de entidades, tales como; la neuralgia post-herpética, la neuralgia trigeminal y glossofaríngea, la odontalgia atípica, el síndrome de boca urente y las cefaleas autonómicas trigeminales. Esta gran variedad de síndromes dificulta determinar de manera certera la epidemiología del dolor neuropático (Latremoliere & Woolf, 2009). Se reporta en algunos estudios una prevalencia de 8% en Reino Unido, 6.9% en Francia, 3.3% en Austria y 2% en América latina, sin embargo, en otros se indica que en Europa alcanza el 10% (Moore, et al., 2011).

3.2 Fisiopatología del dolor orofacial neuropático

La base neuro-anatómica del dolor neuropático se fundamenta en una hiperexcitabilidad a lo largo del axón nervioso (Spencer & Gremillion, 2007). Dos fenómenos generan anormalmente impulsos a lo largo del axón, estos corresponden a la desmielinización y a la axotomía. La desmielinización es la pérdida degenerativa de la integridad de la vaina de mielina, alterando el origen y la conducción de los potenciales de acción. Su etiología es múltiple, se asocia con la compresión originada a nivel de estructuras vasculares, radiación, infección, inflamación y exposición a neurotoxinas (Baron, et al., 2010). La Axotomía es la sección de una porción de fibras aferentes, lo que ocurre en caso de trauma. De esta manera las descargas generadas pueden ser espontáneas o evocadas. Estudios adjudican al aumento de canales de sodio la responsabilidad de las descargas espontáneas (Baron, et al., 2010). Dentro de los factores de riesgo asociados al dolor neuropático encontramos el género y la exposición a esteroides sexuales (Hargreaves, 2011). Esto se debe a que las neuronas trigeminales expresan receptores de estrógenos y sufren cambios de expresión genética, implicando un aumento de neuropéptidos como prolactina capaz de generar sensibilización ante capsaicina y/o calor (Baron, et al., 2010).

3.3 Dolor orofacial neuropático de tipo periférico.

Una gran variedad de condiciones patológicas se relacionan a daños o disfunciones del nervio trigémino y producen dolor neuropático. (Zakrzewska, 2010). Dentro de las cuales encontramos:

a) Neuralgia Trigeminal (NT): Se describe como una descarga eléctrica de pocos segundos hasta dos minutos. Puede ser desencadenada por estímulos considerados inocuos como: tacto suave, lavado de dientes y peinado de cabello, entre otros (Spencer & Gremillion, 2007). No obstante, puede ser desencadenada por trauma, siendo asociada a procedimientos, tales como, cirugía ortognática, exodoncia de 3° molares inferiores, posicionamiento de implantes dentales y tratamiento endodóntico (Iwata, et al., 2011). La Neuralgia Trigeminal es un dolor neuropático asociado comúnmente a V2 y V3 de manera unilateral. Presenta una prevalencia de 27/100.000 personas (Moore, et al., 2011). Su etiología está asociada a la desmielinización por compresión vascular, motivo por el cual, se ha propuesto el procedimiento de Jannetta el que consiste en la descompresión microvascular quirúrgica, con el que se logra alivio en 80% de los casos (Iwata, et al., 2011).

b) Neuralgia post-herpética (NPH): Corresponde a un dolor de característica quemante, que persiste sobre tres meses tras un episodio de herpes zoster (HZ) (Singh & Kennedy, 2003). Posee una prevalencia de 39/100.00 personas, y en general un quinto de pacientes con HZ desarrolla NPH (Moore, et al., 2011). El virus varicela zoster (VVZ) es el causante del HZ, permaneciendo en estado de latencia en ganglios nerviosos, pero puede reactivarse frente al estrés, alteraciones inmunológicas, resfríos y cáncer. Se presenta más frecuentemente en la rama V1 (Iwata, et al., 2011).

c) Odontalgia Atípica: Definida por la Sociedad Internacional del dolor de cabeza (IHS), “como un subgrupo de dolores idiopáticos faciales persistentes, también se incluye el dolor persistente tras una extracción dental (> seis meses) sin signos de patología subyacente” (Spencer & Gremillion, 2007). Siendo los molares del maxilar los más comúnmente afectados (58%). Posee una evolución cercana a los tres meses. Presentándose sensibilidad a la percusión y al frío. El

mecanismo patofisiológico, es desconocido, pero el origen neuropático es la hipótesis más aceptada. La etiología parece ser la pérdida de aferentes primarios, por causas: endodónticas, apicectomías y exodoncias, entre otras. Esto genera alteraciones del plexo nervioso periodontal que determina ramificaciones neuronales proceso denominado sprouting (Baad-Hansen, 2008).

4. Analgesia multimodal

El dolor crónico presenta una elevada refractariedad al ser manejado con los analgésicos clásicos; es por esta razón, que se desarrolla la denominada analgesia multimodal, la cual, corresponde a la administración de dos o más fármacos, que poseen diferente mecanismo de acción, no obstante, presentan efectos analgésicos (Edelsberg, et al., 2011).

Múltiples estudios han demostrado que al utilizar esta terapia se obtienen mejores resultados, especialmente frente al dolor neuropático, que el tratamiento con los mismos fármacos de forma aislada (Edelsberg, et al., 2011). La terapia combinada de dos o más medicamentos, permite alcanzar el alivio adecuado del dolor con la menor posibilidad de aparición de efectos no deseados (Baron, et al., 2010). Estas combinaciones pueden presentar resultados de tipo aditivo el que corresponde a la suma de los efectos que producen cada uno de ellos separadamente. Subaditivos o antagónicos, donde se observa un efecto menor que la suma de cada agente por separado. Y por último los resultados pueden ser sinérgicos o supraaditivos donde se produce un efecto mayor que la suma de los efectos por separado (Tallarida, 2001)

4.1 Coanalgésicos

Corresponden a aquellos fármacos cuyo objetivo original era otro, distinto a la analgesia, sin embargo ha sido comprobada su eficacia frente ciertas condiciones dolorosas. Debido a la gran diversidad de efectos que presentan a nivel central, radicando su importancia en el manejo del dolor neuropático. Los coanalgésicos brindan analgesia ya sea, por sí mismos, o bien, potenciando a los fármacos analgésicos propiamente tales (Nieto & Cruciani, 2006).

Los principales grupos de fármacos incluidos en esta categoría son: Antidepresivos, Anticonvulsivantes, Ansiolíticos, Neurolépticos, Corticoesteroides y Bloqueadores adrenérgicos (Clifford, 2010)(Zakrzewska, 2010).

4.2 Manejo farmacológico del dolor neuropático

Asociados al dolor neuropático confluyen múltiples entidades patológicas que lo generan, por esta variedad de orígenes, es que, un mismo tratamiento no es igualmente efectivo para los distintos tipos de dolor neuropático. El tratamiento de este tipo de dolor constituye un desafío, pues, existen muchos pacientes que no logran obtener un alivio adecuado, lo que se explica, además, por la coexistencia de aspectos psicológicos y emocionales (Baron, et al., 2010). Por ende, más que analgesia, lo que se busca es lograr un manejo adecuado del dolor para obtener una mejora en su calidad de vida, además se debe tener especial cuidado con las expectativas del paciente ya que estas deben ser realistas. Actualmente se habla de cuatro líneas de tratamiento farmacológico, considerando la eficacia analgésica, seguridad, facilidad de uso y costo-efectividad (Canadian Pain Society, 2007).

i. **Tratamientos de primera línea:** El grupo de antidepresivos tricíclicos, que proveen la mejor evidencia de eficacia en el manejo del dolor neuropático y un grupo determinado de anticonvulsivantes dentro de los cuales está la gabapentina.

ii. **Tratamiento de segunda línea:** Incluyen inhibidores de recaptación de serotonina y noradrenalina, y lidocaína tópica.

iii. **Tratamiento de tercera línea:** Tramadol y analgésicos opioides de liberación controlada, para el dolor moderado a severo.

iv. **Tratamiento de cuarta línea:** Incluyen los cannabinoides, metadona, Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (citalopram y paroxetina) y otros anticonvulsivantes como la lamotrigina, topiramato y el ácido valproico.

Considerando los escasos conocimientos de los mecanismos de acción de los medicamentos disponibles para el tratamiento del dolor neuropático, se recomiendan terapias combinadas para alcanzar el alivio adecuado del dolor y una menor cantidad de efectos adversos (Chaparro, et al., 2012).

4.3 Antiepilépticos:

Los antiepilépticos son fármacos cuyo objetivo inicial es la prevención y tratamiento de convulsiones asociadas a cuadros epilépticos, así como, también en la profilaxis de las migrañas (Attal, et al., 2010). Actualmente, se han

comenzado a utilizar en el tratamiento del dolor crónico en ciertas condiciones. Su eficiencia se ha evidenciado clínicamente en el tratamiento de la neuropatía diabética, neuralgia post-herpética (NPH), neuralgia trigeminal (NT), dolor facial y odontalgia atípica (Reisner & Pettengill, 2001). Los antiepilépticos son clasificados como de primera y segunda generación, siendo estos últimos, los que generan menos efectos secundarios sobre el SNC (Edelsberg, et al., 2011). En general actúan provocando la disminución de la neurotransmisión excitatoria aferente, facilitando la inhibición segmentaria (Cheng & Chiou, 2006).

4.3.1 Gabapentina

La gabapentina es un antiepiléptico de segunda generación, considerado como un fármaco de primera línea en el tratamiento del dolor neuropático. En el 2002 se aprobó su prescripción para el tratamiento de NPH (Baad-Hansen, 2008). Su estructura química se asemeja al neurotransmisor GABA e inicialmente se pensó que su mecanismo era sobre los receptores de esta molécula, no obstante, presenta escasa afinidad por estos (Uchitel, et al., 2010). En cambio, la gabapentina genera un aumento de niveles de GABA en el cerebro, probablemente responsable de su acción antiepiléptica y ansiolítica (Maneuf, et al., 2006). La actividad analgésica de la gabapentina y sus análogos, está relacionada a su unión con la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de canales de calcio voltaje-dependientes (Cav) tipo N (Cheng & Chiou, 2006). Genera una alteración del ingreso de calcio presinápticamente, lo que implica, una baja liberación de neurotransmisores (principalmente glutamato). Se describe que en el dolor crónico la expresión de esta subunidad aumenta a nivel de las neuronas sensitivas del asta dorsal, esto explicaría el porqué la gabapentina produce analgesia en condiciones de dolor inflamatorio o neuropático, mas no en dolor agudo (Taylor, 2009). La gabapentina posee una absorción no lineal, con una biodisponibilidad no proporcional al aumento de las dosis. Su vida media plasmática es de 5-9 horas. Atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica. Es excretada de manera inalterada, por vía renal (FDA, 2010). Se utiliza en el tratamiento de crisis epilépticas parciales, trastorno bipolar, fobia social, migraña, en la dependencia de opioides y condiciones de dolor crónico: neuropatía diabética, NPH y NT (Taylor, 2009). Este fármaco provee alivio moderado frente al dolor crónico (disminución

del 30%) en 1 de 2 pacientes, y un alivio sustancial (disminución de 50%) en 1 de 3 pacientes (Moore, et al., 2011). Por lo que se sugiere combinar con medicamentos que presentan diferentes mecanismos de acción y de esta forma lograr mejores niveles de analgesia (Maizels & McCarberg, 2005). La gabapentina presenta algunos efectos adversos asociados como mioclono, aumento de peso, somnolencia, ataxia, mareos, fatiga y edema periférico. Existe relación entre la dosis e incidencia de efectos adversos, por lo que un aumento paulatino de la dosis permite mejor tolerancia (Reisner & Pettengill, 2001). Estos efectos adversos se presentan en 2/3 de las personas que lo consumen, siendo necesario suspender el tratamiento solo en 1 de cada 10 casos (Moore, et al., 2011). La gabapentina es uno de los pocos anticonvulsivos libre de interacciones con otros medicamentos (Singh & Kennedy, 2003).

4.3.2 Ácido Valproico

El ácido 2-npropilpentanoico (ácido valproico) es un ácido graso simple ramificado, estructuralmente relacionado con el GABA (Salas-Puis, 2005), cuyo uso principal es de antiepiléptico de amplio espectro y estabilizador del ánimo (Gill, et al., 2011). Dentro de sus indicaciones encontramos trastornos convulsivos, crisis tónico clónicas, crisis de ausencia y las fases maniáticas en el trastorno bipolar. Cabe mencionar, que ha sido utilizado en el tratamiento del dolor neuropático, siendo considerado como un fármaco de cuarta línea, esto debido a que en la actualidad no existe evidencia sobre su mecanismo de acción y también debido a los efectos adversos e interacciones que presenta (Winkler, et al., 2005). El ácido valproico presenta múltiples mecanismos de acción a nivel neuronal lo que explica su efectividad frente a diversos tipos de crisis epilépticas. Dentro de los mecanismos más destacados están: inhibición de la enzima GABA transaminasa aumentando de esta forma los niveles de GABA a nivel cerebral, el bloqueo los canales de sodio y calcio (Gill, et al., 2011); y el aumento de la inhibición serotoninérgica reduciendo la excitación neuronal mediada por glutamato (Winkler, et al., 2005). La vía de administración es oral y su absorción es casi completa, por ende, su biodisponibilidad llega al 100%. La concentración en el plasma, alcanza sus máximos niveles luego de 90 minutos. Se liga a las proteínas del plasma en un 85-95% y atraviesa la barrera hematoencefálica con un

mecanismo de transporte activo que se satura a dosis altas. El ácido valproico se metaboliza en el hígado, a partir del cual se originan cerca de 30 metabolitos, los cuales son sindicados como responsables de algunos efectos adversos. Su vida media es de 4 a 12 horas (Winkler, et al., 2005). El ácido valproico presenta interacciones al ser administrado en conjunto con otros anticonvulsivantes. Debido a que se produce la inhibición enzimática, se retarda la metabolización y, se mantiene o aumenta la concentración plasmática de diazepam, fenobarbital, fenitoína y lamotrigina. La absorción del ácido valproico se ve interferida por los citotóxicos adriamicina y cisplatino. Mientras que, fármacos como el naproxeno, fenilbutazona y ácido acetilsalicílico desplazan al ácido valproico de las proteínas plasmáticas, por ende, aumenta el riesgo de llegar a concentraciones tóxicas. Dentro de los efectos adversos, el más complejo es el efecto teratogénico, puede producir también toxicidad hepática, desórdenes sanguíneos o hepáticos, pancreatitis, somnolencia, aumento de peso en un 30% de los pacientes, temblor, náuseas, vómitos, diarrea y pérdida de pelo (Salas-Puis, 2005).

5. Medición experimental del dolor

La investigación pre-clínica, en su intento de conocer las bases anatómo-moleculares, fisiológicas y patológicas del dolor; ha generado grandes avances, lo que, se debe en gran parte, a los modelos de dolor en animales (Luccarini, et al., 2006). Durante mucho tiempo ha existido un desconocimiento de los mecanismos, interacciones y nuevas aplicaciones de los fármacos en general y en especial aquellos implicados en la analgesia. Por ende, para lograr obtener el mejor efecto al mínimo costo biológico, es que se realizan estudios experimentales, los que, por motivos de índole ética se hacen imposibles de hacer en humanos pero si se realizan en modelos animales (Paeile & Bilbeny, 2005).

5.1. Modelos de dolor en animales

La nocicepción corresponde a aquellos mecanismos que permiten que los estímulos nocivos sean detectados, codificados y transferidos hacia centros superiores del SNC. Mientras que, el dolor corresponde a una experiencia que necesariamente requiere de integración cortical, implicando componentes afectivos, sensorio-discriminativos, autonómicos y cognitivos (Barrot, 2012). Es por este motivo que en los modelos animales las pruebas no son dirigidas al dolor,

sino más bien a la nocicepción. Puesto que, los componentes corticales del dolor son difíciles, de medir y estandarizar (Bornhof, et al., 2011). Según la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) el dolor en animales se define como “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas, desencadena un comportamiento aprendido de evitación y puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales” (Voscopoulos & Lema, 2010). Por ende, en los modelos experimentales de dolor en animales se valora la reacción de un animal frente a un estímulo nocivo, pudiendo ser este de diferente naturaleza. Dentro de las pruebas más comunes en modelos animales de dolor, encontramos aquellas fundamentadas en latencia de aparición del comportamiento a cuantificar, como tail-flick y hot-plate. Otras pruebas se basan la medición de umbrales del estímulo (filamentos de Von Frey, analgesiómetro de Randall-Selitto). Y por último, están aquellas que se basan en la observación y puntuación de comportamientos específicos bien definidos, como, el test de la formalina y de acetona (Barrot, 2012).

5.2 Test de la formalina orofacial.

El Test de Formalina corresponde a una prueba asociada a la aplicación de un estímulo químico irritante que produce una respuesta inflamatoria que induce alodinia e hiperalgesia (Luccarini, et al., 2006). Esta prueba no mide el umbral, sino, que observa y puntúa el comportamiento específico del animal, definido previamente. Es una de las pruebas más ampliamente usadas en ratones y se considera de mayor relevancia respecto del dolor clínico comparado con otras pruebas como el tail-flick y hot-plate (Le Bars, et al., 2001). Esta prueba consiste en la inyección del compuesto en el labio superior del roedor, lo que produce una reacción bifásica de comportamiento nociceptivo. La fase I, dura entre 3-5 minutos, y se debe a la activación directa de las fibras tipo C (Gómez-Barros & Tortorici, 2009). Luego continúa un período de relativa quietud que dura 10-15 minutos. Posteriormente la fase II, dura entre 20-40 minutos, e implica mecanismos inflamatorios y de sensibilización central a nivel del asta dorsal provocado por la formalina (Baad-Hansen, 2008). La zona de inoculación se debe localizar en el labio superior del ratón, lateral a la nariz del animal. Una vez

inyectada la formalina se observan respuestas conductuales nociceptivas, de frotamiento del área perinasal, ya sean, estas efectuadas con la pata delantera y trasera ipsilateral, lo cual, debe ser contabilizado. La concentración de la formalina esta en directa relación con la duración de la respuesta nociceptiva (Sessle, 2005). Se ha descrito que, con concentraciones de hasta 5% la respuesta nociceptiva inducida será creciente, a concentraciones superiores, ésta relación lineal positiva se disminuye, por lo tanto, no se asociará a una mayor expresividad de la respuesta nociceptiva, sino, que se ve reflejado en el alcance de un efecto “techo”. Concentraciones más altas inducen una conducta de inmovilidad del roedor, también llamada *freezing*, lo cual, puede llevar a una interpretación errónea de la conducta nociceptiva (Paeile & Bilbeny, 2005). La principal limitación hallada en esta prueba tiene que ver con que, la medición de la respuesta nociceptiva, está asociada a una respuesta motora (frotamiento), por lo que cualquier fármaco, que provoque una alteración de ésta, puede propiciar un sesgo en la interpretación de los resultados (Baad-Hansen, 2008).

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis.

La administración intraperitoneal (i.p.) de gabapentina con ácido valproico produce actividad antinociceptiva sinérgica, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial.

2. Objetivos.

2.1. Objetivo general.

Estudiar la actividad antinociceptiva de gabapentina, ácido valproico y su combinación en el test de la formalina orofacial en ratones.

2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de gabapentina en el test de la formalina orofacial.
- Calcular a partir de la curva dosis-respuesta de gabapentina, la dosis que produce el 50% del efecto máximo (DE_{50} del E_{max}).
- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de ácido valproico en el test de la formalina orofacial.
- Calcular a partir de la curva dosis-respuesta de ácido valproico, la dosis que produce el 50% del efecto máximo (DE_{50} del E_{max}).
- Evaluar la naturaleza e intensidad de la interacción farmacológica de gabapentina con ácido valproico en el ensayo antes mencionado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de investigación

La presente investigación corresponde a un estudio con un diseño experimental de laboratorio que se realiza únicamente post-prueba y posee grupo control. La experimentación se realizó basada en el protocolo CBA N°515 aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo N°1) en concordancia con Guías para el uso de animales en investigación de IASP (European Economic Community, 1986), utilizándose el mínimo de animales necesarios para un correcto análisis estadístico. y se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurofarmacología del Dolor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2. Animales

La muestra utilizada fue de 136 ratones (*Mus musculus*) machos, de la cepa CF/1 de 28 a 30 gramos de peso. Los ratones fueron mantenidos al interior de cajas plásticas con acceso libre a comida y agua, con dos horas de anticipación fueron incorporados al ambiente del laboratorio para lograr una adecuada habituación. Cada animal recibió solo una dosis de las drogas, las observaciones fueron efectuadas en forma ciega, aleatoria y controladas con solución salina.

La observación del experimento se realizó a través de un cilindro de acrílico transparente abierto en su parte superior de altura y diámetro 20 centímetros, y un espejo doble ubicado alrededor de este cilindro para lograr visualizar todos los ángulos por parte del observador (Figura N°5). Las sesiones de experimentación se desarrollaron durante la mañana entre las 10:30-13:00 horas, en un ambiente tranquilo. Cada animal fue habituado al cilindro de experimentación por 10 minutos para minimizar el estrés; privados del acceso a alimento o agua dentro del cilindro. El sacrificio de los animales tomó lugar inmediatamente después del experimento, a través, de la dislocación cervical, procedimiento efectuado por personal experimentado. La manipulación de los animales fue bajo estrictas medidas de bioseguridad, como por ejemplo: el uso de desinfectantes, el uso de guantes desechables, mascarillas y delantal, según lo descrito en las guías antes mencionada.



Figura N°5: Cilindro de observación.

3. Test de la formalina orofacial

La actividad antinociceptiva de los fármacos se evaluó una modificación del test algésimétrico orofacial de la formalina de Luccarini (Luccarini, et al., 2004), a través del cual, se puede medir dolor originado tras la estimulación nociceptiva del nervio trigémino en ratones. Para lograr ese objetivo, se realizó una inyección subcutánea de 20 μ L de solución de formalina al 2% en el labio superior del animal (Figura N°6). Provocando en el animal un frotamiento sostenido de la zona inyectada y un vigoroso restregamiento de la cara en la zona perinasal con el cuarto delantero y trasero ipsilateral y en menor proporción, con el cuarto delantero contralateral (Figura N°7). Los ratones se ubicaron al interior del cilindro de observación y con un cronómetro digital se midió el tiempo total que se frotaron el área perinasal durante los 5 minutos inmediatos a la inyección, periodo que corresponde a la fase I. Posteriormente se registró por 10 minutos, comenzando desde los 20 minutos de la inyección y finalizando a los 30 minutos, el tiempo durante el cual los animales se frotaron el labio comprometido y que corresponde a la fase II. Durante el periodo entre la fase algésica y la inflamatoria, no se

contabiliza el tiempo, debido a que el ratón se encuentra en un período de quietud (Luccarini, et al., 2006).



Figura N°6: Inyección de formalina al 2% en labio superior derecho del animal

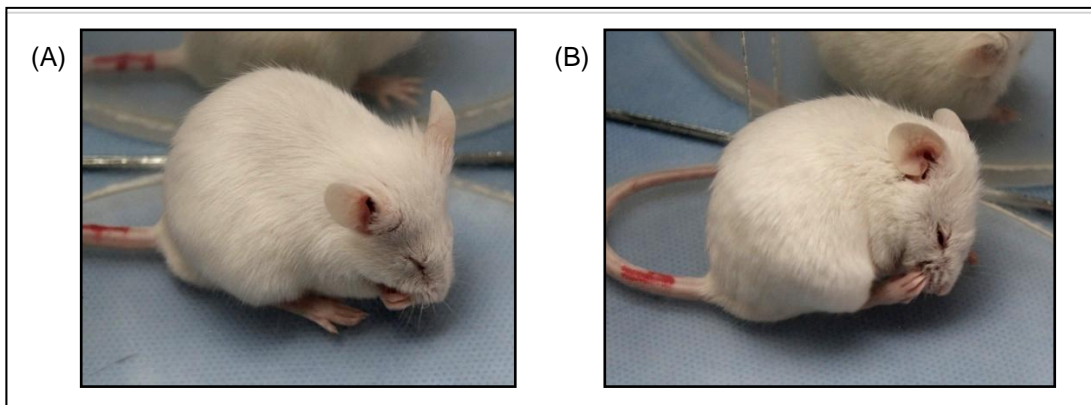


Figura N°7: Ratones realizando rascado de área perinasal tras la inyección de formalina. (A) Frotamiento con extremidad anterior ipsilateral. (B) Frotamiento con extremidad posterior ipsilateral.

4. Administración de fármacos

La inoculación de los fármacos se debe efectuar 30 minutos previo al test algesiométrico, esto nos permite lograr el efecto máximo para cada droga (Raboisson & Dallel, 2004). Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen constante, de 10 mL/kg (Fig. N° 3). En el caso de los sujetos pertenecientes al grupo control recibieron una solución salina administrada por vía i.p. y se utilizó un ejemplar por cada grupo experimental. Las dosis utilizadas para la gabapentina fueron 1, 3, 10 y 18 [mg/kg]. Las dosis utilizadas para el ácido valproico fueron 10, 30, 100 y 250 [mg/kg]. Para cada dosis se utilizaron 8 animales, por lo que la experimentación de cada fármaco por separado implicó la utilización de 4 grupos (n=32). Se utilizó un animal control por cada grupo experimental (n=8) a los que se le inyectó solución salina al 0.9%.



Figura N°8: Inyección intraperitoneal del fármaco.

5. Evaluación de la actividad nociceptiva

Se construyó una curva dosis-respuesta para establecer la relación entre la concentración (dosis) del fármaco y la respuesta en ambas fases, en escala logarítmica. El efecto máximo posible de antinocicepción (MPE) fue calculado de

$$\%MPE = 100 - \left(\frac{TRF}{TRC} \right) \times 100$$

la siguiente forma:

Donde:

%MPE = Máximo efecto posible.

TRF = Tiempo de rascado luego de inyectar el fármaco.

TRC = Tiempo de rascado de los controles.

La interpretación de los resultados de este cálculo implica que un valor cercano a 0% indica que el tiempo de rascado es igual al grupo control, es decir, no existe un efecto antinociceptivo y 100% significa que los animales no realizaron el rascado de la zona.

Luego se calculó la dosis efectiva que produce un 50% del efecto máximo posible (MPE) que en adelante se denominará DE_{50} . La DE_{50} de cada uno de los fármacos y en cada una de las fases se calculó mediante análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos de la curva obtenida.

6. Estudio de la interacción antinociceptiva de los fármacos

El análisis isobolográfico se utilizó para determinar la naturaleza y magnitud de la interacción entre gabapentina y el ácido valproico. El método se basa en la comparación de la combinación de las dosis equiefectivas, la cual, se realiza a partir de las dosis de cada uno de los agentes y que son consideradas equipotentes (Luccarini, et al., 2004). Por lo tanto, a partir de las curvas dosis-respuesta de ambos fármacos por separado se determina la DE_{50} (dosis efectiva que produce el 50% de la respuesta máxima frente a la nocicepción provocada por la formalina) de cada uno. Consecuentemente, se obtiene una curva dosis-respuesta de la coadministración, de ambos, en proporción fija 1:1 de los valores de DE_{50} de cada fármaco por separado. Posteriormente, se administró a grupos separados (DE_{50} gabapentina + DE_{50} ácido valproico)/2, (DE_{50} gabapentina + DE_{50} ácido valproico)/4, (DE_{50} gabapentina + DE_{50} ácido valproico)/8, (DE_{50} gabapentina + DE_{50} ácido valproico)/16. De este modo, a partir de la curva dosis-respuesta obtenida se realizó el análisis isobolográfico (Raboisson & Dallel, 2004). Para cada combinación de los fármacos se determinó la DE_{50} mediante el análisis de regresión lineal de su curva dosis-respuesta. Esta dosis se compara estadísticamente con la dosis que teóricamente representa el efecto aditivo simple, la cual, se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$DE50 \text{ aditividad teórica} = \frac{DE50 \text{ droga1}}{(P1 + R \times P2)}$$

Donde:

- R: relación de potencia entre los fármacos administrados por separado
- P1: proporción de gabapentina en la mezcla.
- P2: proporción de ácido valproico en la mezcla.

El punto experimental resultante fue graficado en un sistema de coordenadas cartesianas, que contiene una línea que conecta la DE₅₀ de gabapentina en la ordenada, con la DE₅₀ de ácido valproico en la abscisa (línea de aditividad simple o teórica). El área del gráfico donde se localiza el punto experimental determina el tipo de interacción. En caso de ubicarse bajo la línea de aditividad la interacción será sinérgica (supraaditiva). Por el contrario, si la interacción fuese antagónica, el punto se ubicará sobre la línea de aditividad, y por último, si el punto se ubica en un sector cercano a la línea de aditividad, la interacción será de simple aditividad. Al mismo tiempo se calculó el índice de interacción entre las drogas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Interacción} = \frac{DE50 \text{ experimental}}{DE50 \text{ teórico}}$$

Si el valor resultante es menor que 1 corresponde a una interacción sinérgica; al resultar igual a 1 la interacción es aditiva, y si es mayor que 1, es antagónica.

7. Análisis de los datos

Los resultados fueron expresados como porcentaje del promedio \pm error estándar de la media (EEM o SEM). El tiempo total de frotamiento (grooming) de cada período, medido en segundos, se convirtió en el porcentaje del máximo posible efecto (MPE), según la siguiente fórmula:

$$\%MPE = 100 - \left(\frac{\text{tiempo grooming postdroga}}{\text{tiempo grooming control salino}} \right) 100$$

La dosis que produce el 50% del MPE (DE₅₀), fue calculada por análisis de regresión lineal de la curva obtenida por el trazado del logaritmo (log) de la dosis

versus %MPE. El análisis estadístico de los datos obtenidos de las curvas log dosis respuestas, se analizaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos para determinar las DE_{50} , ya sea, de los fármacos administrados en forma aislada como de sus combinaciones. Todos los parámetros estadísticos se calcularon con un software del laboratorio (Pharm Tools Pro, version 1.27, The McCarty Group Inc, PA, USA), y la significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student, considerando la significación a un nivel del 5% ($p < 0,05$).

VI. RESULTADOS

1. Evaluación de la analgesia

1.1 Grupo control

Al grupo control se le administró una solución salina al 0,9% vía i.p. y luego de 30 minutos se inyectó formalina al 2% en el labio superior derecho de cada animal. El tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal se detalla en la Tabla N°1.

Tiempo promedio de frotado en grupo control (segundos)	
Fase I	Fase II
89 ± 2,69	97,13 ± 6,20

Tabla N°1: Tiempos de frotado grupo control. Tiempo promedio ± EEM de 8 animales para Fase I y II del test de formalina orofacial.

1.2 Efecto antinociceptivo de gabapentina

La respuesta al test de la formalina orofacial de los grupos tratados con gabapentina, la cual, fue administrada i.p. 30 minutos antes, resultó en una disminución en el tiempo de frotamiento dosis-dependiente respecto al grupo control tanto en la fase I (Gráfico N°1) como en la fase II (Gráfico N°2). Al promedio de las mediciones y sus EEM se les aplicó t-student con respecto al control, cumpliendo con la significancia estadística ($p < 0,05$).

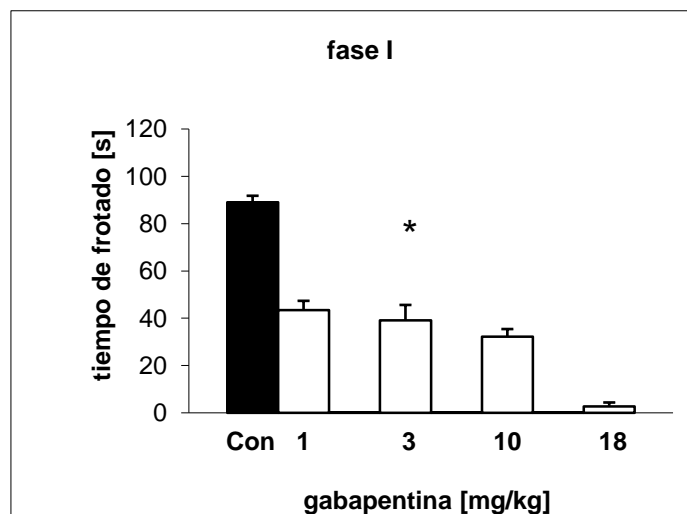


Gráfico N°1: Relación dosis-respuesta de la administración de gabapentina i.p. en fase I del test de la formalina orofacial respecto al grupo control (con). Las barras corresponden al promedio ± EEM de 8 animales para cada dosis. * = $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

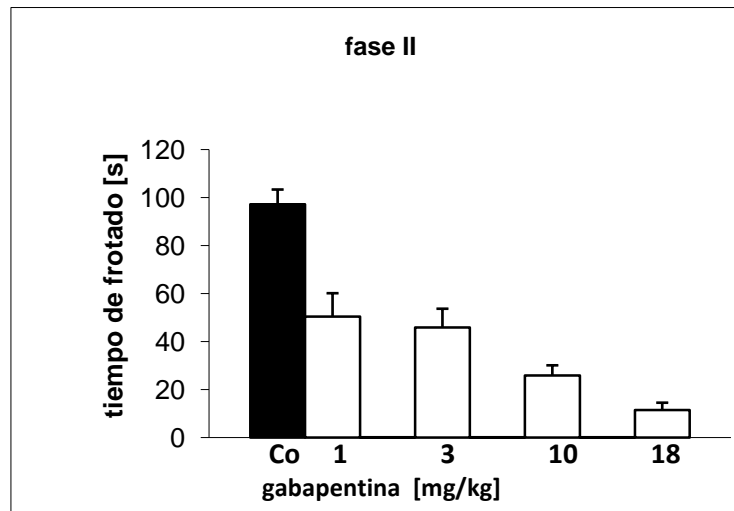


Gráfico N°2: Relación dosis-respuesta de la administración de gabapentina i.p. en fase II del test de la formalina orofacial respecto al grupo control (con). Las barras corresponden al promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis. * = $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

1.2.1 Curvas dosis-respuesta y cálculo de DE_{50} para gabapentina

Se construyeron curvas dosis-respuesta para establecer la relación entre la dosis de gabapentina y su respuesta antinociceptiva para ambas fases. La abscisa, en escala logarítmica, representa las concentraciones de gabapentina. La ordenada, el %MPE (efecto máximo posible de antinocicepción). (Gráficos N°3 y N°4)

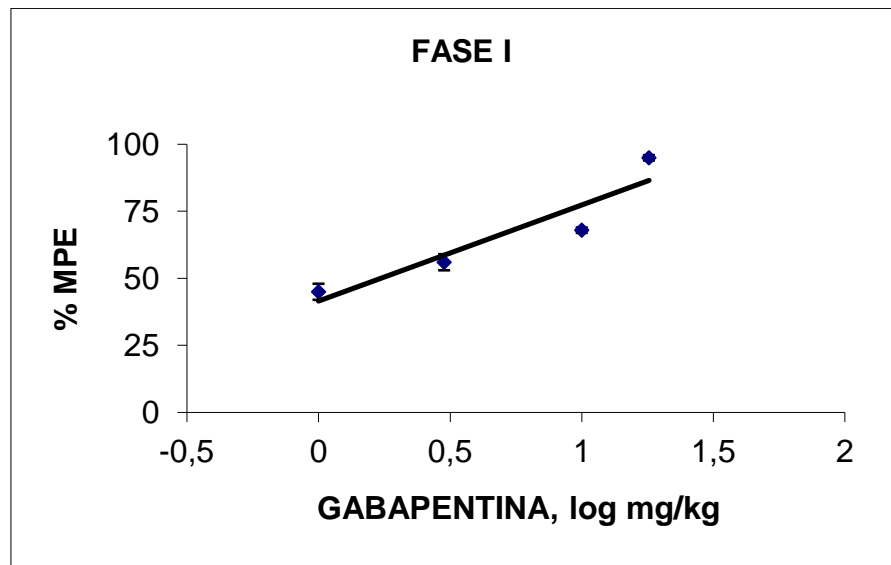


Gráfico N°3: Curva dosis-respuesta para la administración i.p. de gabapentina en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis.

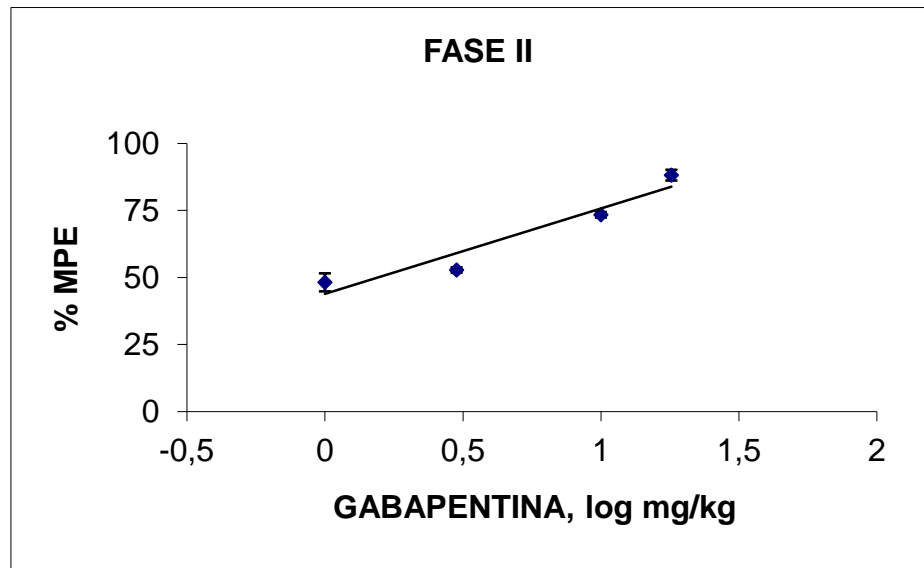


Gráfico N°4: Curva dosis-respuesta para la administración i.p. de gabapentina en la fase II del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis.

Mediante el análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos de los gráficos N°3 y N°4, se obtiene la ecuación para cada fase (Tabla N°2). Una vez despejada la ecuación fijando $y = 50\%$ MPE se puede obtener la DE_{50} . Aplicando el método de estimación del programa Pharm Tools Pro se obtiene el DE_{50} y su EEM para la gabapentina en fase I y II con límite de confianza del 95% (95%CL) (Tabla N°2).

	FASE I	FASE II
Gabapentina	$y=35,891 \cdot x+41,491$	$y=31,942 \cdot x+43,83$
	$DE_{50}: 1,726 \pm 0,711$ [mg/kg]	$DE_{50}: 1,560 \pm 0,513$ [mg/kg]

Donde,
 y: %MPE
 x: log D_F
 D_F : Dosis de gabapentina

Tabla N°2: DE_{50} de gabapentina obtenido a partir de su respectiva ecuación de la recta para fase I y fase II del test de la formalina orofacial.

1.3 Efecto antinociceptivo del ácido valproico

La respuesta al test de la formalina orofacial de los grupos tratados con ácido valproico, el cual, fue administrado i.p. 30 minutos antes, resultó en una disminución en el tiempo de frotamiento dosis-dependiente respecto al grupo control tanto en la fase I (Gráfico N°5) como en la fase II (Gráfico N°6). Al

promedio de las mediciones y sus EEM se les aplicó t-student con respecto al control, cumpliendo con la significancia estadística ($p < 0,05$).

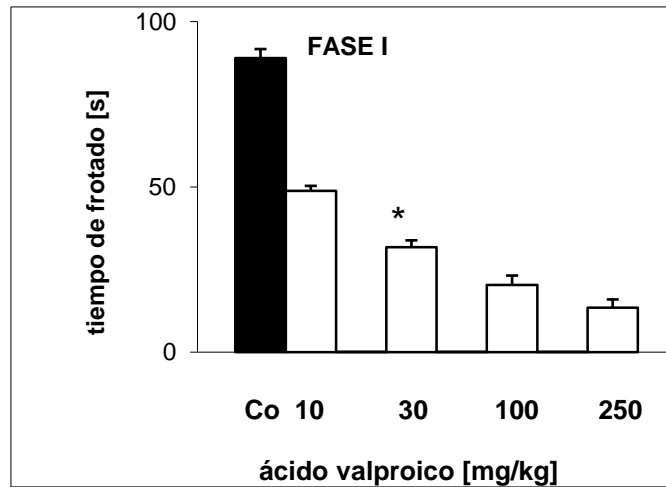


Gráfico N°5: Relación dosis-respuesta de la administración de ácido valproico en fase I del test de la formalina orofacial respecto al grupo control (con). Las barras corresponden al promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis. * = $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

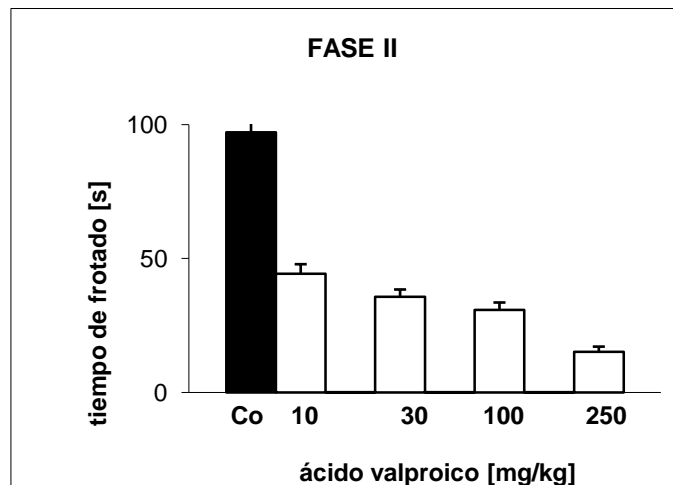


Gráfico N°6: Relación dosis-respuesta de la administración de ácido valproico en fase II del test de la formalina orofacial respecto al grupo control (con). Las barras corresponden al promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis. * = $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

1.3.1 Curvas dosis-respuesta y cálculo de DE_{50} para ácido valproico

Se construyeron curvas dosis-respuesta para establecer la relación entre la dosis de ácido valproico y su respuesta antinociceptiva para ambas fases. La abscisa, en escala logarítmica, representa las concentraciones de ácido valproico. La ordenada, el %MPE (efecto máximo posible de nocicepción). (Gráficos N°7 y

Nº8)

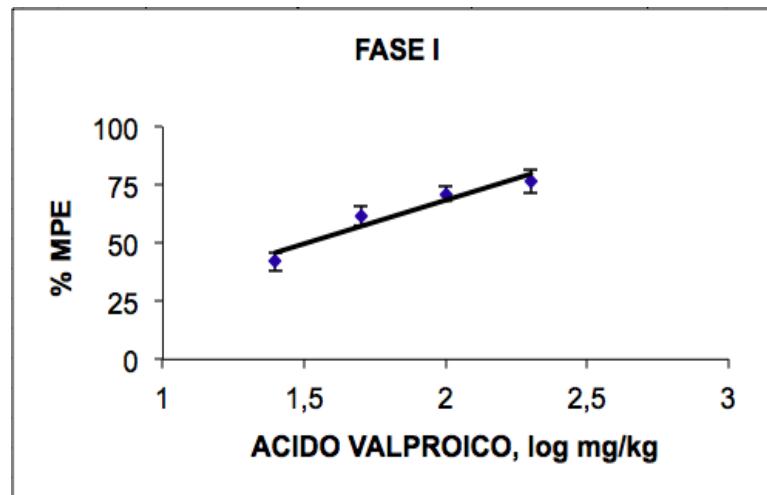


Gráfico N°7: Curva dosis-respuesta para la administración i.p. de ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis.

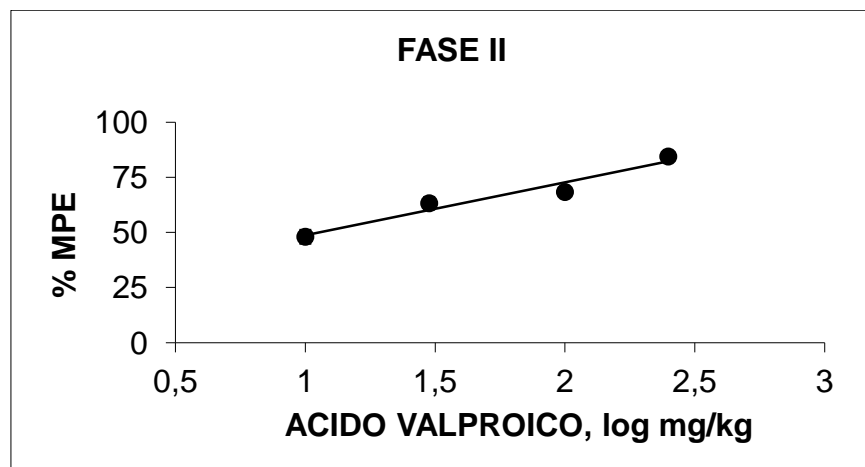


Gráfico N°8: Curva dosis-respuesta para la administración i.p. de ácido valproico en la fase II del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis.

Mediante el análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos de los gráficos N°7 y N°8, se obtiene la ecuación para cada fase (Tabla N°3).

Aplicando el método de estimación del programa Pharm Tools Pro se obtiene el DE_{50} y su EEM para ácido valproico en fase I y II con límite de confianza del 95% (Tabla N°3).

	FASE I	FASE II
Ácido Valproico	$y=28,079*x+19,613$ $DE_{50}: 12,083 \pm 2,598$ [mg/kg]	$y=23,99*x+24,742$ $DE_{50}: 11,294 \pm 3,580$ [mg/kg]

Donde,
y: %MPE
x: log D_F
D_F: Dosis de ácido valproico

Tabla N°3: DE₅₀ de ácido valproico obtenido a partir de su respectiva ecuación de la recta para fase I y fase II del test de la formalina orofacial.

2. Interacción entre gabapentina y ácido valproico

Tras la obtención de los DE₅₀ de ambos fármacos, se sumaron en proporción 1:1 para obtener la mezcla gabapentina/ácido valproico a administrar vía i.p. en sus fracciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 tanto para fase I como para fase II.

2.1 Grupo tratado con mezcla de gabapentina y ácido valproico en fase I

Al coadministrar por vía i.p gabapentina y ácido valproico en proporción 1:1 cada una de sus correspondientes mezclas de DE₅₀ (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) resultó en una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva con respecto al grupo control durante la fase I (Gráfico N°9). Al promedio de las mediciones y sus EEM se les aplicó t-student con respecto al control, cumpliendo con la significancia estadística (<0,05).

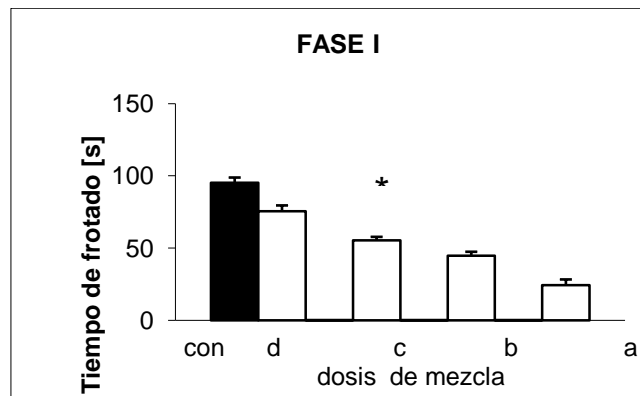


Gráfico N°9: Relación dosis-respuesta de la administración i.p. de la mezcla de gabapentina/ácido valproico durante la fase I del test de la formalina orofacial respecto al grupo control (Con). Las barras corresponden al promedio ± EEM de 8 animales para cada dosis.

2.1.1 Curva dosis-respuesta de la mezcla en fase I

Para el cálculo de la DE_{50} experimental de la mezcla de gabapentina con ácido valproico durante la fase I se realizó una curva dosis-respuesta de la acción antinociceptiva. La abscisa, en escala logarítmica, representa la dosis de la mezcla. La ordenada, el %MPE. (Gráfico N°10)

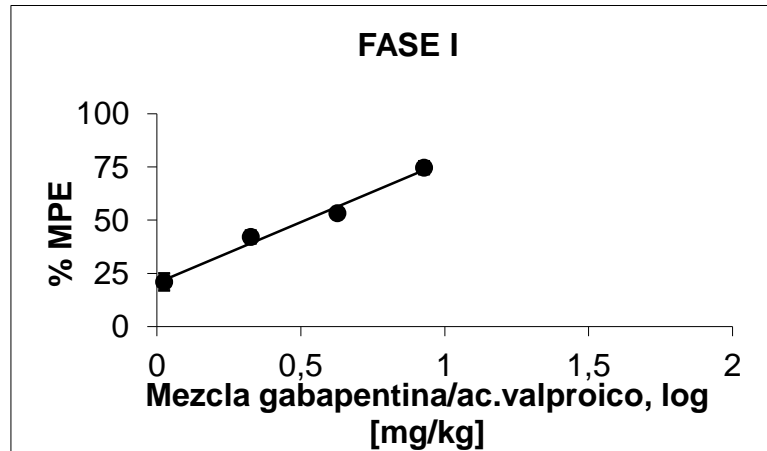


Gráfico N°10: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de la mezcla gabapentina/ácido valproico en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis.

2.2 Grupo tratado con la mezcla de gabapentina y ácido valproico en fase II

Al coadministrar por vía i.p. gabapentina y ácido valproico en proporción 1:1 cada una de sus correspondientes mezclas de DE_{50} (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) resultó en una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva con respecto al grupo control durante la fase II (Gráfico N°11). Al promedio de las mediciones y sus EEM se les aplicó t-student con respecto al control, cumpliendo con $p < 0,05$.

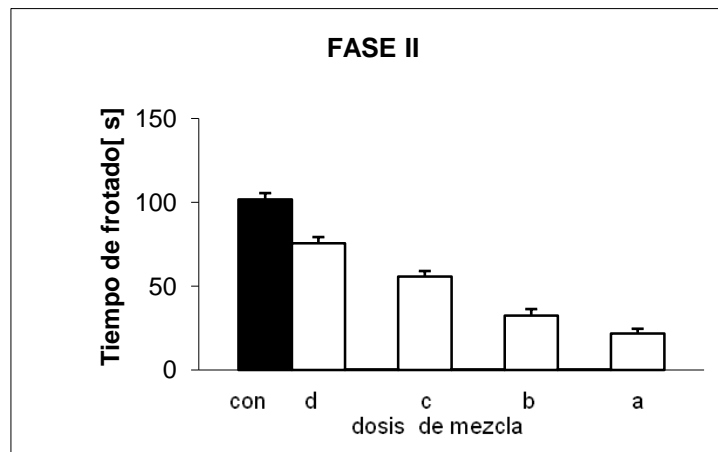


Gráfico N°11: Relación dosis-respuesta de la administración i.p. de la mezcla gabapentina/ácido valproico durante la fase II del test de la formalina orofacial respecto al grupo control (Con). Las barras corresponden al promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis. * = $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

2.2.1 Curva dosis-respuesta de la mezcla en fase II

Para el cálculo de la DE_{50} experimental de la mezcla de gabapentina con ácido valproico durante la fase II se realizó una curva dosis-respuesta de la acción antinociceptiva. La abscisa, en escala logarítmica, representa la dosis de la mezcla. La ordenada, el %MPE. (Gráfico N°12)

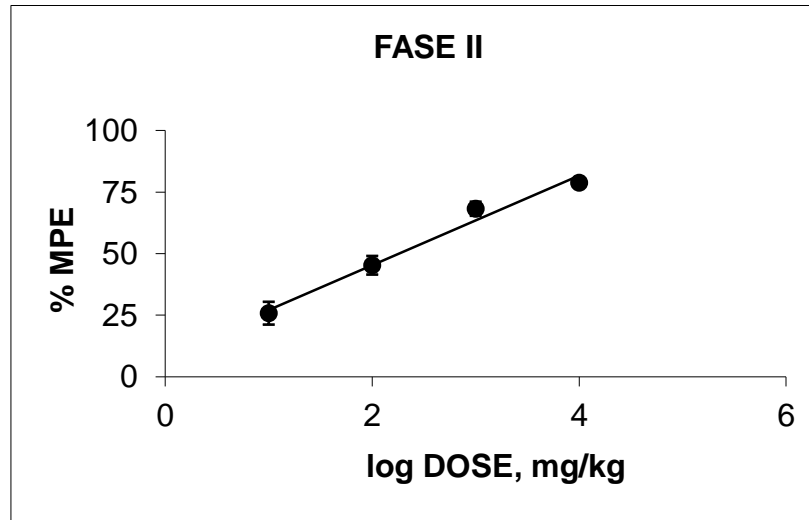


Gráfico N°12: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de la mezcla gabapentina/ácido valproico en la fase II del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 8 animales para cada dosis.

2.3 Cálculo de DE_{50} de la mezcla

Mediante el análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos de los gráficos N°10 y N°12, se obtiene la ecuación para cada fase (Tabla N°4). Una vez despejada la ecuación fijando $y = 50\%$ MPE se puede obtener la DE_{50} . Aplicando el método de estimación del programa Pharm Tools Pro se obtiene el DE_{50} y su EEM para la mezcla gabapentina/ácido valproico (DE_{50} experimental) en fase I y II con límite de confianza del 95% (Tabla N°4).

	FASE I	FASE II
Mezcla	$y=57,17*x+20,41$	$y=60,455*x+10,039$
gabapentina / ácido valproico	$DE_{50}: 1,203 \pm 0,120$ [mg/kg]	$DE_{50}: 1,767 \pm 0,239$ [mg/kg]

Donde,
 y: %MPE
 x: log D_F
 D_F : Dosis de gabapentina/ácido valproico

Tabla N°4: DE_{50} de la mezcla gabapentina/ácido valproico obtenido a partir de su respectiva ecuación de la recta para fase I y fase II del test de la formalina orofacial.

3. Análisis isobolográfico

La actividad antinociceptiva de la administración conjunta vía i.p. de las combinaciones de relación fija (1:1) de fracciones de la DE_{50} de gabapentina y ácido valproico, se evaluó mediante el cálculo de la DE_{50} de la mezcla (gráficos N°10 y 12). La DE_{50} teórica para esta mezcla (1:1) es $8,477 \pm 1,203$ mg/kg para la fase I. En cambio, la DE_{50} experimental para la fase I fue $1,203 \pm 0,120$ mg/kg, y su diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). La DE_{50} teórica para esta mezcla (1:1) es $15,363 \pm 3,249$ mg/kg para la fase II. En tanto, la DE_{50} experimental para la fase II fue $1,767 \pm 0,239$ mg/kg, y su diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.01$). Del análisis isobolográfico de la combinación de gabapentina con ácido valproico, se obtuvo como resultado una interacción antinociceptiva de tipo supraaditiva o sinérgica, tanto para la fase I como para la fase II, con diferencias estadísticamente significativas, para ambas, entre DE_{50} teórica y experimental. Paralelamente el software calcula el índice de interacción de la combinación, que en la fase I resultó ser de 0,142, en tanto para la fase II resultó ser de 0,115.

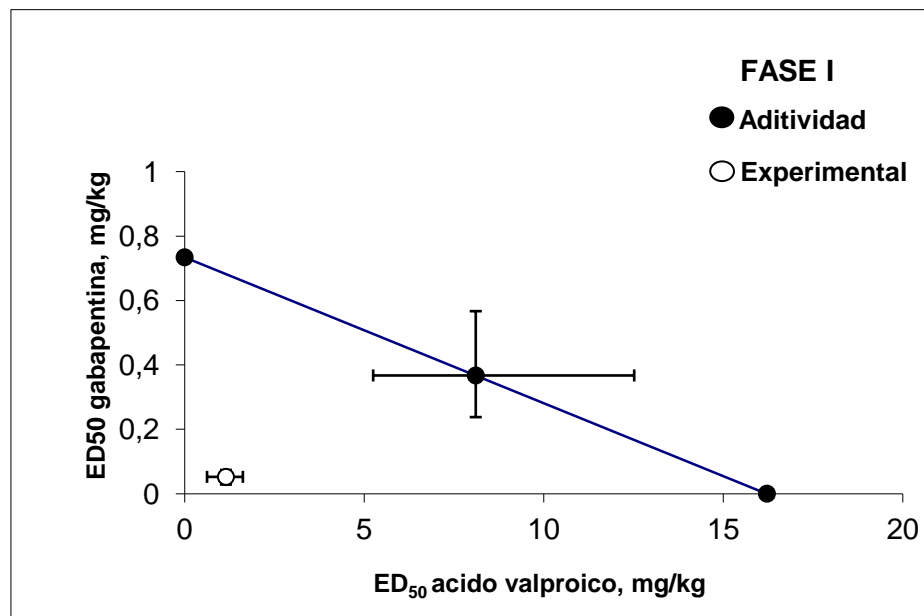


Gráfico 13. Isoblograma de la interacción entre gabapentina y ácido valproico, en el test de la formalina orofacial, en la fase I. El (●) en la línea de aditividad representa el punto de aditividad teórica de la mezcla. El (○) representa el punto de aditividad experimental, cada uno con sus correspondientes (LC) al 95%.

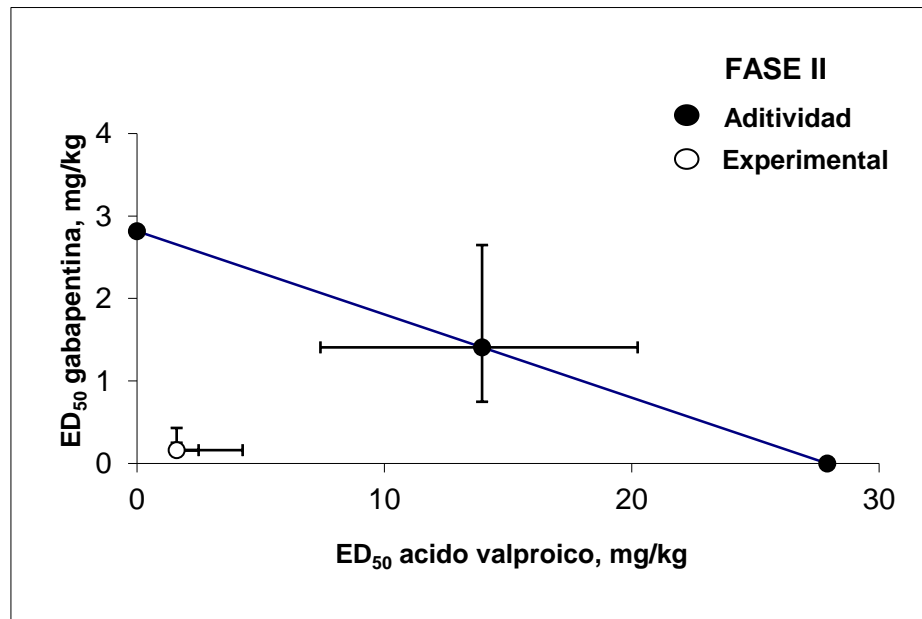


Gráfico 14: Isoblograma de la interacción entre gabapentina y ácido valproico para la fase II en el Test de la Formalina Orofacial. El punto (●) en la línea de aditividad representa el punto de aditividad teórica de la mezcla. El punto (○) representa el punto de aditividad experimental, cada uno con sus correspondientes límites de confianza (LC) al 95%

VII. DISCUSIÓN

El análisis efectuado en la presente investigación, implicó la evaluación del efecto antinociceptivo de la gabapentina y el ácido valproico, tanto de los fármacos en administración combinada, como en cada droga de manera independiente.

El test algesiométrico de la formalina produce inflamación y edema tras su inyección subcutánea (Le Bars, et al., 2001). A su vez, se desarrolla una actividad nociceptiva bifásica, que genera como respuesta el frotamiento de la zona en cuestión (Serrano-Atero, et al., 2001). Se sugiere, que la fase I está relacionada con la activación directa del nociceptor en el dolor agudo; en cambio, la fase II se asocia con la inflamación tisular y la sensibilización de neuronas de segundo orden, por lo cual, se puede relacionar con el dolor crónico neuropático de origen periférico (Raboisson & Dallel, 2004). Para el periodo denominado interfásico, en el cual, se observa quietud del individuo, esto es atribuido a controles inhibitorios del dolor (Le Bars, et al., 2001).

Para el estudio, se utilizó como modelo de experimentación animal, a ratones *mus musculus* de la cepa CF/1, a los cuales, se les fue aplicado el test algesiométrico antes mencionado; que permite, evaluar la respuesta nociceptiva espontánea de frotamiento con las extremidades de la zona en cuestión.

El análisis de los resultados de la administración sistémica de gabapentina (i.p.) en dosis de 1, 3, 10 y 18 [mg/kg]; demostró, efectos inhibitorios de la respuesta nociceptiva, dosis dependiente; presente tanto, en fase I como fase II. Al comparar las ED₅₀ en ambas fases se observa una leve diferencia en la potencia de inhibición nociceptiva entre ambas, siendo 1,1 veces superior la potencia en fase II versus fase I; si bien, la tendencia a tener mayor efectividad en fase II se mantiene, ésta es bastante menor a la observada en estudios similares con inyección orofacial de la formalina, como en el estudio denominado “interacción experimental de gabapentina con nortriptilina en dolor orofacial inducido” , donde la potencia de la ED₅₀ de la gabapentina, sin combinar; es en fase II tres veces superior a la observada en fase I (Loyola, et al., 2012). Esta diferencia puede explicarse, puesto que las dosis administradas en el mencionado trabajo son distintas a las utilizadas en este estudio. Otras investigaciones preclínicas previas, han utilizado la prueba de formalina intraplantar, presentando resultados en los

que se observa, ya sea, una disminución de la respuesta nociceptiva en ambas fases (Shannon, et al., 2005), o bien, tan sólo de la fase II (Heughan & Sawynok, 2002). Otro estudio demuestra la tendencia del efecto inhibitorio dosis dependiente de la respuesta nociceptiva en ambas fases del test de formalina orofacial (Quiñónez, et al., 2009). Mientras que, la administración intratecal de gabapentina reportó una disminución significativa, de la respuesta nociceptiva, sólo en la fase II de la prueba de la formalina orofacial (Grabow et al. 2002).

Al administrar ácido valproico vía i.p., en dosis de 10, 30, 100 y 250 [mg/kg], se observó un efecto inhibitorio dosis dependiente, en ambas fases del test de la formalina orofacial. Al comparar la potencia del efecto antinociceptivo entre las fases, utilizando las ED_{50} ; obteniéndose como resultado una mayor potencia del efecto en fase II versus el efecto en fase I, correspondiendo a 1,06 veces mayor la antinocicepción respectivamente, aumento de potencia considerado leve. Al ser comparado con estudios similares como el de “interacción experimental de nortriptilina con ácido valproico en dolor orofacial inducido”, donde fue aplicado el test de formalina orofacial en ratones, reportándose también actividad antinociceptiva bifásica dosis dependiente del ácido valproico, sin embargo, se observó una mayor potencia de la fase I respecto a la fase II pese a que la diferencia entre ambas resultó ser de 1,06 veces mayor la antinocicepción en fase I que en fase II (Vicentelo, et al., 2013). Estudios relacionados con la evaluación de la efectividad del ácido valproico en modelos animales del dolor han arrojado resultados disímiles, reportándose que el ácido valproico produce un efecto antinociceptivo dosis-dependiente en ambas fases del test de formalina intraplantar (Czuczwar M. et. al. 2001), en otro estudio de similares características, no fue posible constatar diferencias significativas entre fase I y II (Rojas-Corrales, et al., 2003). No obstante, mediante la modalidad intraplantar del test de formalina en ratas, no se reportó un efecto antinociceptivo significativo de este fármaco en ninguna de las dos fases del test (Quiñónez, et al., 2009). A su vez, en otro ensayo preclínico donde se realizó el test de formalina orofacial en ratas previamente inyectadas i.p. con divalproex, (compuesto de valproato de sodio con ácido valproico en proporción 1:1), obteniéndose como resultado que este fármaco era solo efectivo en la fase II del estudio (Neelakantan & Walker, 2012).

Esta gran variabilidad en los resultados observados en especial con el efecto antinociceptivo del ácido valproico se puede deber en parte a la metodología de los estudios, puesto que la localización de la punción de la formalina es distinta – intraplantar u orofacial-. Implicando, por lo tanto vías anatómicas de transducción distintas; ya que, en la primera el estímulo hace sinapsis a nivel del asta dorsal, la que a su vez presenta una organización laminar y vías bidireccionales; mientras que, en la segunda, la sinapsis se produce a nivel del ganglio trigeminal que presenta una organización ascendente; pudiendo implicar, que la modulación entre ambas vías no actúe de la misma manera (Barrot, 2012). No se debe dejar de mencionar también la existencia de variación a nivel de la cepa estudiada, la concentración de la formalina y/o del fármaco. Entre otras variables que inciden en estos resultados disímiles (Yokogawa, et al., 2002).

El efecto antinociceptivo de la gabapentina se fundamenta principalmente en la disminución y atenuación de las descargas ectópicas desde aferentes primarios dañados y en los que se observa un aumento de la expresión de la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de canales de Cav, los cuales, son bloqueados por la gabapentina. Lo que, explicaría la acción de dicho fármaco en la fase II del test. El efecto antinociceptivo en fase I no está completamente dilucidado, los mecanismos reportados se relacionarían con la modulación de las vías descendentes noradrenérgicas a nivel del locus coeruleus, esto podría explicar el efecto antinociceptivo en la fase I (Hayashida, et al., 2008).

En el caso del ácido valproico, su efectividad antinociceptiva está relacionada con el aumento de las concentraciones de GABA a nivel del sistema nervioso central, así como, el bloqueo de la descarga en neuronas que no han logrado ser bien identificadas; lo cual, tendría relación con su acción en la fase aguda del test. Para el mecanismo antinociceptivo de la fase II la identificación ha sido aún más imprecisa y puede deberse a la sensibilización central provocada por mecanismos GABAérgicos (Rojas-Corrales, et al., 2003).

El presente estudio, nos entrega el primer análisis isobolográfico entre la gabapentina y el ácido valproico en el test de la formalina. Dando como resultado un efecto sinérgico o supra-aditivo, dosis dependiente, al ser administrados en combinación vía i.p. Al comparar los valores de ED_{50} de ambos fármacos

conjuntamente, respecto al efecto antinociceptivo en ambas fases, se reporta un efecto más potente en la fase I respecto a la fase II de 1,81 veces. A pesar de este resultado, el efecto de supra-aditividad se sigue presentando en ambas fases y la razón por la cual, se produce esta mayor antinocicepción en fase I se desconoce, pudiéndose vislumbrar una respuesta, dentro de la gran cantidad de receptores blanco, sobre los que actúa el ácido valproico a nivel del sistema nervioso central, y en que el mecanismo que produce la antinocicepción no ha sido determinado claramente; siendo por ende necesaria su investigación, para aprovechar su potencial (Gill, et al., 2011)(Salas-Puis, 2005).

Si bien, es patente la necesidad de realización de más estudios para confirmar la mayor eficacia del efecto antinociceptivo de la mezcla en la fase I, la evidencia nos permite acotar el efecto antinociceptivo de ambos fármacos en combinación como un efecto supraditivo dosis dependiente bifásico. Otros estudios similares se han realizado, en los cuales, se observan resultados sinérgicos bifásicos, con mayor eficiencia en relación a la fase II respecto a la fase I del test de formalina orofacial en ratones cf/1; uno de estos estudios evaluó la mezcla de nortriptilina con gabapentina, dando una eficiencia del efecto antinociceptivo de 3,8 veces en fase II versus fase I. A su vez un segundo estudio evaluó la combinación de la nortriptilina con el ácido valproico produciéndose también, una mayor eficiencia del efecto antinociceptivo en la fase II de 3,4 veces en relación a fase I. A partir de estos datos se puede dilucidar que el aumento de la eficacia antinociceptiva en relación a la fase II, tanto, para la gabapentina como para el ácido valproico están dados por su asociación con un antidepresivo tricíclico, como la nortriptilina.(Loyola, et al., 2012)(Vicentelo, et al., 2013).

El estudio efectuado provee un fundamento para futuras investigaciones sobre la combinación de los fármacos denominados coanalgésicos, en especial de la gabapentina con el ácido valproico; esto, con el objetivo final de proveer una mejora de la calidad de vida de los pacientes que sufren de dolor neuropático a nivel orofacial; disminuyendo el dolor y reduciendo los efectos adversos que estos fármacos pueden provocar al ser utilizados de manera independiente en concentraciones más elevadas; puesto que, el efecto sinérgico de la combinación implica que se puede lograr un nivel de antinocicepción adecuado a menores

dosis (Nash, et al., 2010).

De esta forma sería necesario realizar pruebas de los fármacos a utilizar, las que generalmente se realizan en regiones anatómicas distintas del animal de experimentación, como lo es en la zona plantar; y debido a que las características de inervación del territorio orofacial son distintas al resto del cuerpo, es, por lo que urge darle cabida a pruebas nociceptivas en el territorio orofacial (Barrot, 2012), para de esta forma lograr aliviar o disminuir dolores con características únicas como la neuralgia trigeminal, neuralgia post herpética y odontalgia atípica.

La futura validación clínica del presente estudio experimental será imprescindible para confirmar la validez de esta combinación de fármacos en el manejo del dolor neuropático a nivel orofacial.

VIII. CONCLUSIONES

- La coadministración de gabapentina y ácido valproico, vía intraperitoneal, produce una interacción de tipo sinérgica entre ambos fármacos, en el test de la formalina orofacial.
- La administración intraperitoneal de gabapentina o ácido valproico, así como la combinación de ambos, posee acción antinociceptiva dosis-dependiente tanto en la fase aguda (fase I) como en la fase inflamatoria del dolor (fase II) del test de la formalina orofacial.
- La gabapentina tiene mayor efecto antinociceptivo en la fase inflamatoria del dolor (fase II) que en la aguda (fase I).
- El ácido valproico tiene un efecto antinociceptivo similar tanto en la fase inflamatoria del dolor (fase II) como en la fase aguda (fase I).
- La mezcla gabapentina/ácido valproico tiene mayor eficacia antinociceptiva en la fase aguda del dolor (fase I) en el test de la formalina orofacial.
- La sinergia obtenida tras la administración de gabapentina y ácido valproico podría explicarse de manera hipotética por mecanismos farmacodinámicos, que activan paralelamente diferentes sistemas que modulan una vía inhibitoria común a nivel del Sistema Nervioso Central.
- La importancia de los resultados obtenidos es que dan las bases para la futura investigación clínica respecto a la analgesia multimodal con estos dos fármacos con el fin de lograr avances en la modulación del dolor neuropático a nivel orofacial.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- European Economic Community, 1986. *Directive 86/609/EEC*, Gent, Bruselas: EEC.
- FDA, 2010. *Neurontin® (gabapentin)*. [En línea]
Available at:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020235s050,020882s035,021129s033lbl.pdf
[Último acceso: 22 julio 2013].
- Almeida, T., Roizenblatt, S. & Tufik, S., 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000(1-2), pp. 40-56.
- Attal, N. y otros, 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European Journal of Neurology*, 17(9), p. 1113–1188.
- Baad-Hansen, L., 2008. Atypical odontalgia pathophysiology and clinical management. *Journal of Oral Rehabilitation*, 35(1), pp. 1-11.
- Baron, R., Binder, A. & Wasner, G., 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*, 9(8), pp. 807-19.
- Barrot, M., 2012. Tests and models of nociception and pain in rodent. *Neuroscience*, 10(16), p. 41.
- Barrot, M., 2012. Tests and models of nociception and pain in rodent. *Neuroscience*, 41(12).
- Basbaum, A., Bautista, B., Scherrer, G. & Julius, D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cel*, 139(2), pp. 267-84.
- Bornhof, M. y otros, 2011. The orofacial formalin test in mice revisited-effects of formalin concentration, age, morphine and analysis method. *Journal of Pain*, 12(6), pp. 633-9.
- Canadian Pain Society, 2007. Pharmacological management of chronic neuropathic pain—Consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag*, 12(1), pp. 13-21.
- Chaparro, L., Wiffen, P., Moore, R. & Gilron, I., 2012. Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 11(7), p. CD008943.
- Cheng, J. & Chiou, L., 2006. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(5), pp. 471-86.
- Clifford, W., 2010. What is this thing called pain?. *J Clin Invest*, 120(11), p. 3742–3744.
- Cruccu, G. y otros, 2008. AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. *European Journal of Neurology*, 15(10), pp. 1013-28.
- Dallel, R., Villanueva, L., Woda, A. & Voisin, D., 2003. Neurobiology of trigeminal pain. *Médecine/sciences*, 19(5), pp. 567-74.
- Dubin, A. & Patapoutian, A., 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120(11), p. 3760–3772.
- Edelsberg, J., Lord, C. & Oster, G., 2011. Systematic review and meta-analysis of efficacy, safety, and tolerability data from randomized controlled trials of drugs used to treat postherpetic neuralgia. *Ann Pharmacother*, 45(12), pp. 1483-90.
- Gill, D., Derry, S., Wiffen, P. & Moore, R., 2011. Valproic acid and sodium valproate for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 5(10), p. CD009183.

- Gómez-Barros, J. & Tortorici, V., 2009. Mecanismos del dolor neuropático: del laboratorio a la clínica. *Arch Ven Farm Ter*, 28(1).
- Hargreaves, K., 2011. Orofacial Pain Review. *Pain*, 152(3), pp. 25-32.
- Hayashida, K., Obata, H., Nakajima, K. & Eisenach, J., 2008. Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology*, 109(6), pp. 1077-84.
- Heughan, C. & Sawynok, J., 2002. The interaction between gabapentin and amitriptyline in the rat formalin test after systemic administration. *Anesthesia & Analgesia*, 94(4), pp. 975-80.
- Iwata, K., Imamura, Y., Honda, K. & Shinoda, M., 2011. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *International Review of Neurobiology*, Volumen 97, pp. 227-50.
- Latremoliere, A. & Woolf, C., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of pain*, 10(9), pp. 895-926.
- Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S., 2001. Animals Models of Nociception. *Pharmacol Rev*, 53(4), pp. 597-652.
- Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S., 2001. Animals Models of Nociception. *Pharmacol Rev*, 53(4), pp. 597-652.
- Loyola, P., Miranda, H. & Sierralta, L., 2012. INTERACCION EXPERIMENTAL DE GABAPENTINA CON NORTRIPTILINA EN DOLOR OROFACIAL INDUCIDO. pp. 40-45.
- Luccarini, P. y otros, 2006. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioural model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *The Journal of Pain*, 7(12), pp. 908-14.
- Luccarini, P. y otros, 2004. Synergistic antinociceptive effect of amitriptyline and morphine in the rat orofacial formalin test. *Anesthesiology*, 100(3), pp. 690-6.
- Lumley, M. y otros, 2011. Pain and Emotion: A Biopsychosocial Review of Recent Research. *J Clin Psychol*, 67(9), pp. 942-68.
- Maizels, M. & McCarberg, B., 2005. Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. *Am Fam Physician*, 71(3), pp. 483-90.
- Maneuf, Y., Luo, Z. & Lee, K., 2006. Alpha2delta and the mechanism of action of gabapentin in the treatment of pain. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(5), pp. 565-70.
- Melzack, R., 2006. Gate control theory: on the evolution of pain concepts. *Pain forum*, 5(2), pp. 128-138.
- Merrill, R., 2007. Central Mechanisms of Orofacial Pain. *Dent Clin North Am*, 51(1), pp. 45-59.
- Moore, R., Wiffen, P., Derry, S. & McQuay, H., 2011. Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 16(3), p. CD007938..
- Nash, P. y otros, 2010. Bilateral activation of trigeminothalamic tract by acute orofacial cutaneous and muscle pain in humans. *Pain*, 151(2), pp. 384-93.
- Neelakantan, H. & Walker, E., 2012. Temperature-dependent enhancement of the antinociceptive effects of opioids in combination with gabapentin in mice.. *European Journal of Pharmacology*, 23(10), pp. 43-46.
- Nieto, M. & Cruciani, R., 2006. Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. *Rev Soc Esp Dolor*, 13(5), pp. 312-327.

- Paeile, C. & Bilbeny, N., 2005. de lo molecular a lo clínico. En: *El dolor*. Santiago: Mediterraneo, pp. 25-51, 189-198, 271-281.
- Perl, E., 2011. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. *Prog neurobiol*, 1(20-38), p. 94.
- Quiñónez, B., Silva, E., González, L. & Hernández, L., 2009. Interaction between gabapentin and D-serin in the formalin orofacial test. *Investigación Clínica*, 50(4), pp. 479-89.
- Raboisson, P. & Dallel, R., 2004. The orofacial formalin test. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, 28(2), pp. 219-26.
- Reisner, L. & Pettengill, C., 2001. The use of anticonvulsants in orofacial pain. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, 91(1), p. 2-7.
- Rojas-Corrales, M. y otros, 2003. Antinociceptive effects of tricyclic antidepressants and their noradrenergic metabolites. *European Neuropsychopharmacology*, 13(5), pp. 355-63.
- Saarto, T. & Wiffen, P., 2012. Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(12), pp. 1372-3.
- Salas-Puis, J., 2005. Farmacología del valproato sódico. *Emerg*, 17(9), pp. 79-82.
- Serrano-Atero, M. y otros, 2001. Modulación descendente de la información nociceptiva. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, Volumen 9, pp. 382-390.
- Sessle, B., 2005. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlate. *Minerva Anesthesiol*, 71(4), pp. 117-136.
- Shannon, H., Eberle, E. & Peters, S., 2005. Comparison of the effects of anticonvulsant drugs with diverse mechanisms of action in the formalin test in rat. *Neuropharmacology*, 48(7), pp. 1012-20.
- Singh, D. & Kennedy, D., 2003. The use of gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia. *Clinical Therapeutics*, 25(3), pp. 852-89.
- Spencer, C. & Gremillion, H., 2007. Neuropathic orofacial pain: proposed mechanisms, diagnosis, and treatment considerations. *Dental Clinics of North America*, 51(1), pp. 209-24.
- Stucky, C., Gold, M. & Zhang, X., 2001. Mechanisms of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98(21), pp. 11845-6.
- Takemura, M. y otros, 2006. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Archives of Histology and Cytology*, 69(2), pp. 79-100.
- Tallarida, R., 2001. Drug Synergism: its detection and applications.. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(3), pp. 865-872.
- Taylor, C., 2009. Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin-calcium channel alpha2-delta [Cavalpha2-delta] ligands. *Pain*, 142(1-2), pp. 13-6..
- Torregrosa, S., 1994. Mecanismos y Vías del Dolor. *Boletín Esc. de Medicina P. Universidad Católica de Chile*, Volumen 23, pp. 202-206.
- Uchitel, O., Di Guilmi, M., Urbano, F. & Gonzalez Inchauspe, C., 2010. Acute modulation of calcium currents and synaptic transmission by gabapentinoids. *Channel*, 4(6), p. 490-496.
- Vicentelo, P., Miranda, H. & Sierralta, L., 2013. INTERACCION EXPERIMENTAL DE GABAPENTINA CON ACIDO VALPROICO EN DOLOR OROFACIAL INDUCIDO. pp. 39- 52.
- Voscopoulos, C. & Lema, M., 2010. When does acute pain become chronic?. *Br J Anaest*, 105(1), pp. 69-85.
- Winkler, I. y otros, 2005. Efficacy of antiepileptic isomers of valproic acid and valpromide in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol*, 146(2), pp. 198-208.

- Yokogawa, F. y otros, 2002. An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants. *Anesthesia & Analgesia*, 95(1), pp. 163-8.
- Zakrzewska, J., 2010. Medical management of trigeminal neuropathic pains. *Expert Opin Pharmacother*, 11(8), pp. 1239-54..
- Zhuo, M., 2007. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain*, 6(3), p. 14.

X. Anexo I



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“Interacción experimental de Gabapentina y Ácido valproico en dolor orofacial experimental”* cuyo investigador responsable 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# 0515 FMUCH).

El Dr. Miranda se ha 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 *del Sr. Víctor Torres Aedo* para obtener el título de Odontóloga.

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.

C. Valenzuela
Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

