

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ANALGÉSICA ENTRE  
TRAMADOL Y ÁCIDO VALPROICO EN DOLOR  
NEUROPÁTICO INDUCIDO POR PACLITAXEL EN  
RATONES.**

**EYLEN RODRIGUEZ PEREZ**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCION FARMACOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Hugo Miranda**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata**

**EYLEN RODRIGUEZ PEREZ**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Farmacología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Julio de 2016.**

**Prof. Dr Hugo Miranda Guzmán.  
Director de Tesis  
Laboratorio de Neurofarmacología  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

---

**Prof. Dr. Viviana Noriega**

---

**Prof. Dr. Juan Carlos Prieto**

---

**Prof. Dr. Fernando Sierralta**

---

**Prof. Dr. Ramiro Zepeda**

**Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Jorge Ferreira  
Presidente Comisión**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
MARCO TEORICO .....	9
OBJETIVOS .....	22
Objetivo General .....	22
Objetivos Específicos .....	22
HIPÓTESIS .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Animales .....	24
Fármacos .....	24
Inducción de Neuropatía .....	25
Medición de Actividad Antinociceptiva .....	25
Análisis isobolográfico .....	26
Protocolo de Experimentación .....	28
Análisis estadístico .....	29
Resultados esperados .....	29
RESULTADOS .....	30
Evaluación de la analgesia .....	30
Isobogramas .....	32
DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIONES .....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43
ANEXOS .....	52
Nº 1 Cuadro resumen de DE 50 , Índice de interacción y tipo de interacción.	
Nº2: Aprobación del comité de Bioética de la Facultad de medicina de la universidad de Chile sobre investigación en animales.	

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El dolor neuropático es una de las causas más frecuentes de sufrimiento en los pacientes con dolor crónico debido a la dificultad para establecer un tratamiento adecuado. En el presente estudio se usará un modelo de neuropatía periférica en ratones inducida por la administración de paclitaxel vía intraperitoneal (i.p), se evaluará el efecto de ácido valproico (AV) y tramadol (TRM), y de su asociación. Como ensayos nociceptivos se utilizarán el test de Tail Flick y el test de Hot Plate. Para determinar el tipo y la magnitud de la interacción farmacológica se empleará el análisis isoblográfico. El presente estudio postula que tramadol y ácido valproico tienen actividad antihipernociceptiva, y que su asociación produce una interacción de tipo sinérgico.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se utilizaron 192 ratones a los que se administró vía i.p paclitaxel (grupo tratado), se construyeron las curvas dosis-respuesta, con grupos de 24 animales para cada fármaco y cada test, una vez se determinaron las  $DE_{50}$ , se hicieron las mezclas de la combinación de Tramadol y Acido Valproico, en proporción 1:1 de sus  $DE_{50}$ , haciendo mezclas de fracciones de estas, con los datos obtenidos de la administración de dichas fracciones, se construyeron las respectivas curvas dosis-respuesta y a partir de ellas se calculó las  $DE_{50}$  de las mezclas. La naturaleza de la interacción y su cuantía, se evaluará usando el análisis isoblográfico. La significancia estadística se determinó por pruebas t-Student ( $p < 0.05$ ).

**RESULTADOS:** La coadministración de ambos fármacos produjo una interacción de tipo aditivo en el grupo control y del grupo tratado en el test de Hot Plate, mientras que en el grupo tratado en el test de Tail Flick se observó una interacción de tipo sinérgico.

**CONCLUSIONES:** Tramadol, ácido valproico y su combinación producen antihipernocicepción en ratones a los cuales se les indujo neuropatía con paclitaxel. Solamente en el ensayo de retirada de la cola, la asociación de tramadol y ácido valproico induce una interacción sinérgica.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Neuropathic pain is one of the most common causes of pain in patients with chronic pain due to the difficulty in establishing appropriate treatment. In the present study a model of peripheral neuropathy in mice by administration of paclitaxel intraperitoneally (i.p.) induced is used, the effect of valproic acid (AV) and tramadol (TRM) will be evaluated, and their association. As nociceptive test trials Tail Flick and Hot Plate test will be used. To determine the type and magnitude of the isobolographic analysis drug interaction is used. This study postulates that tramadol and valproic acid have antihypernociceptive activity and their association produces a synergistic interaction.

**MATERIALS AND METHODS:** 192 mice were used that were administered ip paclitaxel (treated group), the dose-response curves were constructed, with groups of 24 animals for each drug and each test, once determined the ED50, were made mixtures of the combination of Tramadol and valproic acid in 1: 1 ratio of the ED50, with mixtures of fractions of these, with the data obtained from administration of these fractions, the respective dose-response curves were constructed and from them ED50 of the mixtures was calculated. The nature of the interaction and the amount will be evaluated using the isobolographic analysis. Statistical significance was determined by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

**RESULTS:** Co-administration of both drugs produced an additive interaction type in the control group and treated in the Hot Plate test group, while in the treated Tail Flick test group of synergistic interaction was observed.

**CONCLUSIONS:** Tramadol, valproic acid and produce antihypernociception combination in mice which were induced neuropathy with paclitaxel. Only testing tail withdrawal, the association of tramadol and valproic acid induces a synergistic interaction.

## INTRODUCCIÓN

El dolor tiene gran impacto en la vida humana, ya que condiciona la morbilidad y la mortalidad. Bónica, en 1953, estableció las bases de la algología moderna en su libro *The management of pain* (1).

La IASP ha definido el dolor como “una sensación emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrita en los términos de dicho daño”. Existen diferentes tipos de dolor, según la duración se ha clasificado en:

- (i) Dolor agudo: es aquel cuya duración es breve, su evolución natural es disminuir hasta desaparecer una vez ha desaparecido la lesión que lo origina. Tiene una importante función biológica de protección.
- (ii) Dolor crónico: su duración se extiende más allá del período de curación de una lesión tisular, responde pobremente a los tratamientos habituales.

Entre los tipos de dolor crónico, el dolor neuropático es una de las causas más frecuentes de sufrimiento en los pacientes con dolor crónico debido a su complejidad y a la dificultad para establecer un manejo adecuado. La neuropatía se origina como resultado de lesiones o alteraciones en vías nerviosas periféricas o centrales. Una vez se desarrolla, persiste en ausencia de un estímulo nocivo evidente. Los síntomas pueden ser focales o generalizados y por lo general se presentan como una sensación basal dolorosa o quemante (disestesia), con hiperalgesia (respuesta exagerada) o percepción de un estímulo cualquiera como doloroso (alodinia). (2)

Es aceptado que varios agentes quimioterápicos causan neuropatía periférica, entre los cuales se incluyen los taxanos, los derivados de platino, los alcaloides de la vinca y los agentes antiangiogénicos e inmunomoduladores. Además deficiencias en vitaminas del complejo B, D y E también pueden inducir neuropatía periférica. (3)

El tratamiento del paciente que padece dolor de este tipo por lo general constituye un desafío y un interesante campo de investigación, ya que en la mayoría de los casos, se hace refractario al tratamiento analgésico de primera línea.

Existen diferentes técnicas que tienen como objetivo inducir estados patológicos en los animales que son utilizados en experimentación preclínica, en estos el objetivo es inducir condiciones similares a las producidas por neuropatía en el hombre y bajo las cuales se puedan hacer de ensayos nociceptivos obteniéndose resultados que sean confiables.

Existen dos opciones para inducir un dolor neuropático en animales: la neuropatía quirúrgica y la neuropatía química. El primer modelo de neuropatía quirúrgica, surgió en la década de los 80, el procedimiento que consistía en hacer una sección completa del nervio (modelo de neuroma), rápidamente cayó en desuso por cuestiones éticas, problemas con la interpretación de los resultados y porque el síndrome humano modelado por este ensayo, (dolor del miembro fantasma) es una condición clínica poco frecuente.

Posteriormente se desarrollaron otros modelos de dolor neuropático que consisten en daños parciales a los nervios, sin embargo, debido a la complejidad de estas cirugías y a la necesidad de modelos que repliquen más exactamente síndromes de dolor clínico, induciendo la enfermedad o el propio estado fisiológico que produce el dolor, se han implementado otras estrategias no quirúrgicas que incluyen quemaduras, dolor por cáncer, dolor neuropático inducido por quimioterapia, síndrome de dolor regional complejo, entre otros, por medio de la administración de fármacos o de sustancias que favorezcan la aparición de estos.

En el presente estudio se usará un modelo de neuropatía periférica en ratones inducida por la administración de paclitaxel (PTX) vía intraperitoneal (i.p.), a dosis de 6 mg/kg durante 5 días, y se evaluará el efecto de ácido valproico (AV) y tramadol (TRM), y de su asociación. Como ensayos nociceptivos se utilizarán el test de retirada de la cola y el test de plancha caliente, estos se realizarán los días 7<sup>o</sup> y 14<sup>o</sup>, después de la primera administración de PTX.

Para determinar el tipo y la magnitud de la interacción farmacológica de la asociación de estos dos medicamentos se empleará el análisis isobolográfico.

El presente estudio postula que tramadol (TRM) y ácido valproico (AV) tienen actividad antihipernociceptiva, y que su asociación produce una interacción de tipo sinérgico.



## MARCO TEORICO

El dolor neuropático se define como “aquel dolor que se origina como resultado de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial, bien sea en el centro o en la periferia” (2). Esta definición incluye como factores causales por un lado a enfermedades que cursan con procesos infecciosos, inflamatorios, autoinmunes, neurodegenerativos, traumas, alteraciones metabólicas, exposición a irradiación o a citotóxicos como en el caso de la quimioterapia, neurotoxinas, cirugías, compresión nerviosa o infiltración tumoral, principalmente, así como también a daño macro o microscópico a las estructuras involucradas en la transmisión del estímulo doloroso (2,4, 6).

Clínicamente el dolor neuropático se caracteriza por un dolor continuo o por exacerbaciones espontáneas que evocan respuestas dolorosas amplificadas como respuesta a estímulos nocivos o no nocivos (2). En otras palabras, el dolor neuropático es una respuesta del sistema nervioso sin que este haya recibido una estimulación adecuada de sus terminaciones sensoriales, esto como consecuencia de una lesión o alteración previa de dicho sistema.

El dolor neuropático representa uno de los problemas crónicos de salud más destacado, se considera que su prevalencia oscila entre 5 – 7,5 % en la población general según el Grupo de Dolor Neuropático del IASP (International Association for the Study of Pain), su incidencia varía según el sexo, la edad y las condiciones sociodemográficas, además se estima que el 25% de las consultas en las clínicas de dolor obedecen a pacientes con este diagnóstico (7, 8, 9).

Otro factor relevante es el grado variable en el que menoscaba la funcionalidad y afecta la calidad de vida del individuo alterando sus esferas física y emocional, lo cual conlleva a una mayor utilización de servicios sanitarios (10). Una encuesta realizada por la Sociedad Norteamericana de Enfermeras Oncólogas (Oncology Nursing Society) señaló que el 28% de los pacientes respondedores a quimioterapia combinada con algún taxano y platino presentan neuropatía dolorosa

moderada a severa que deteriora de forma significativa la calidad de vida hasta en el 40% de los casos (9, 10, 11).

Por lo general, los pacientes con dolor neuropático requieren varios medicamentos y pese a ello, refieren menos alivio que los pacientes con dolores crónicos de otra etiología, esto permite vislumbrar la dificultad actual para tratar adecuadamente a los pacientes con este diagnóstico y la necesidad de indagar acerca de otras farmacoterapias para su manejo (10, 11).

Los mecanismos específicos del dolor neuropático no se han identificado por completo, aún en investigación especializada. Una sencilla lesión focal en un nervio periférico desencadena una serie de procesos del sistema nervioso central y periférico que contribuye a que se produzca dolor persistente y la sensación anormal (7).

Hasta el momento son conocidos dos fenómenos: la sensibilización periférica y la sensibilización central, en el primero, la inflamación, los mecanismos reparadores de los tejidos neurales en respuesta a una lesión y la reacción de los tejidos adyacentes a ésta, llevan a un estado de hiperexcitabilidad en los nociceptores aferentes primarios (13, 14, 15). En el segundo fenómeno, son las neuronas centrales inervadas por dichos nociceptores las que experimentan dramáticos cambios funcionales que incluyen un estado de hiperexcitabilidad. Normalmente, estos fenómenos de sensibilización desaparecen cuando el tejido sana y la inflamación remite. Sin embargo, cuando la función aferente primaria se altera y persiste en el tiempo por una lesión o enfermedad del sistema nervioso, estos procesos se perpetúan y pueden ser altamente resistentes al tratamiento (6).

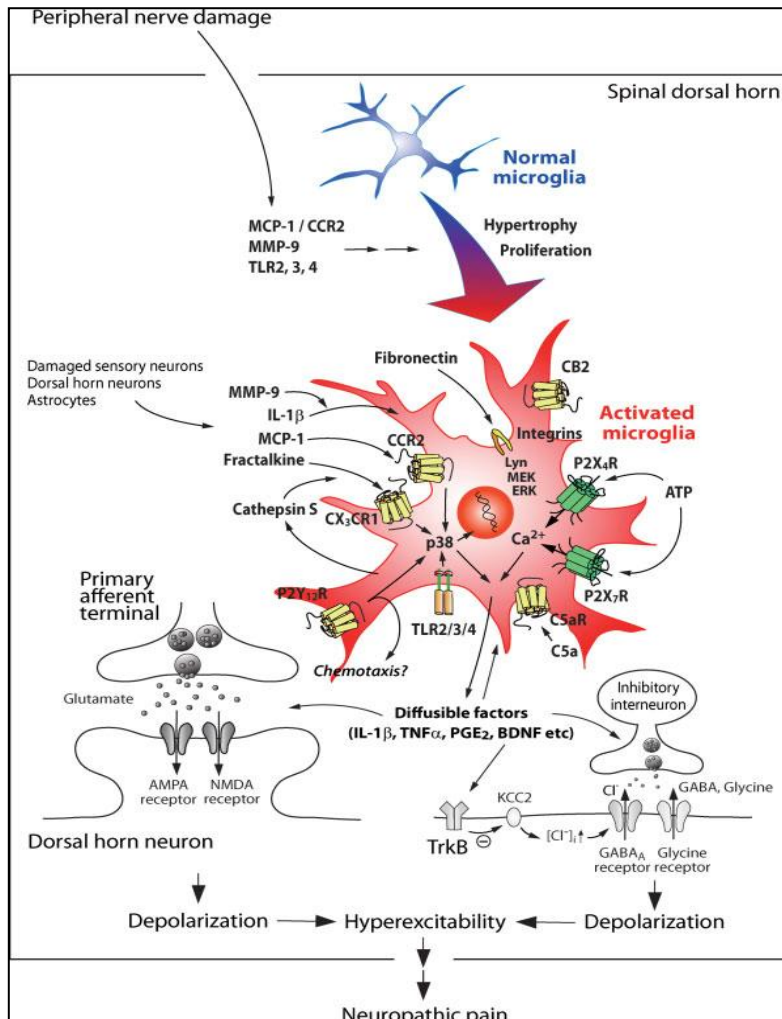
Hasta el momento, se han descubierto muchas anomalías relacionadas con el dolor neuropático y las vías neuronales involucradas. Cuando se altera la continuidad axonal a nivel periférico, ya sea por factores traumáticos, tóxicos, isquémicos o metabólicos, se activan una serie de eventos que incluyen: pérdida de la barrera hemato-neural, proliferación de células de Schwann, reclutamiento de macrófagos circulantes, reorganización del espacio endoneural, cambios en los

componentes de la matriz extracelular (15) y elevación en la producción de neurotrofinas (18), citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , entre otras), factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y c-Jun), metabolitos del ácido araquidónico, además de producirse activación del sistema del complemento (19). Como resultado, tenemos la expresión alterada de receptores adrenérgicos, canales de sodio, potasio y de calcio tipo-N y tipo-L a nivel de los nociceptores afectados y en sus ganglios dorsales asociados, llevando a una disminución del umbral de despolarización, con lo cual se facilita la generación de descargas ectópicas (14, 20, 21, 22, 23, 24).

Las lesiones neurales periféricas pueden provocar la activación aberrante de las vías sensitivas, principalmente a nivel de la raíz del ganglio dorsal y de las astas dorsales de la médula espinal, dando como resultado múltiples alteraciones anatómicas y funcionales (5, 17, 18, 25). Estos eventos además de afectar a las neuronas sensitivas del asta dorsal, también afectan a la microglia espinal, estructuras que normalmente se encuentran en reposo, pero que frente a las noxas en las neuronas periféricas pasan a un estado activado (26).

La microglia puede ser activada por mediadores liberados desde neuronas o desde otras células gliales, entre ellos: citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ), quimioquinas (fractalkina, MCP1), ATP, glutamato, prostaglandinas y neuropéptidos (sustancia P y CGRP – péptido relacionado al gen de calcitonina) (27, 28). La activación de la microglia está caracterizada por proliferación, hipertrofia y aumento en la expresión de marcadores: receptor del complemento tipo 3 (CR3/CF11b), proteínas captadoras de calcio ionizado (IBA1), CD14, TLR4, receptor de canabinoide tipo 2 - CB<sub>2</sub>, proteínas MHC tipo I y II, receptor P2X<sub>4</sub> y activación de las vías de p-38 proteína quinasa mitógena activada (MAPK) (17, 28, 29, 30). Además, liberan grandes cantidades de mediadores inflamatorios, tales como PGE<sub>2</sub>, óxido nítrico, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), los cuales podrían actuar bien sea, facilitando la excitación o suprimiendo la inhibición neuronal (17, 28, 30, 31).

Cualquiera de estos cambios permitiría inferir una alteración en las propiedades intrínsecas de membrana, de la conductancia voltaje-activada o de la conductancia activada sinápticamente en neuronas de transmisión nociceptiva. La principal unidad de transmisión se produce a través de sinapsis glutamatergicas (receptores AMPA y NMDA), mientras que la inhibición está dada, principalmente, por sinapsis GABAérgicas y/o glicinérgicas. Entonces la hiperexcitabilidad puede ser producida, por facilitación de las vías glutamatergicas o por supresión de las vías GABAérgicas y/o glicinérgicas, a nivel presináptico y/o postsináptico, generando respuestas sensitivas amplificadas, tales como la alodinia o la hiperalgesia (Fig. 1) (5, 6, 17, 29).



**Fig. 1.** Extraído de (17) Inoue K., Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. *Glia* 2009; 57: 1469 – 1479.

En la actualidad, la neurotoxicidad periférica inducida por agentes quimioterápicos se encuentra como la segunda causa de efectos adversos, le antecede la toxicidad hematológica, la cual puede ser tratada con factores de crecimiento hematopoyéticos, a diferencia de la neurotoxicidad, que en la actualidad no puede ser tratada y tampoco cuenta con estrategias de prevención eficaces, por el contrario se hace refractaria a las terapias convencionales (32).

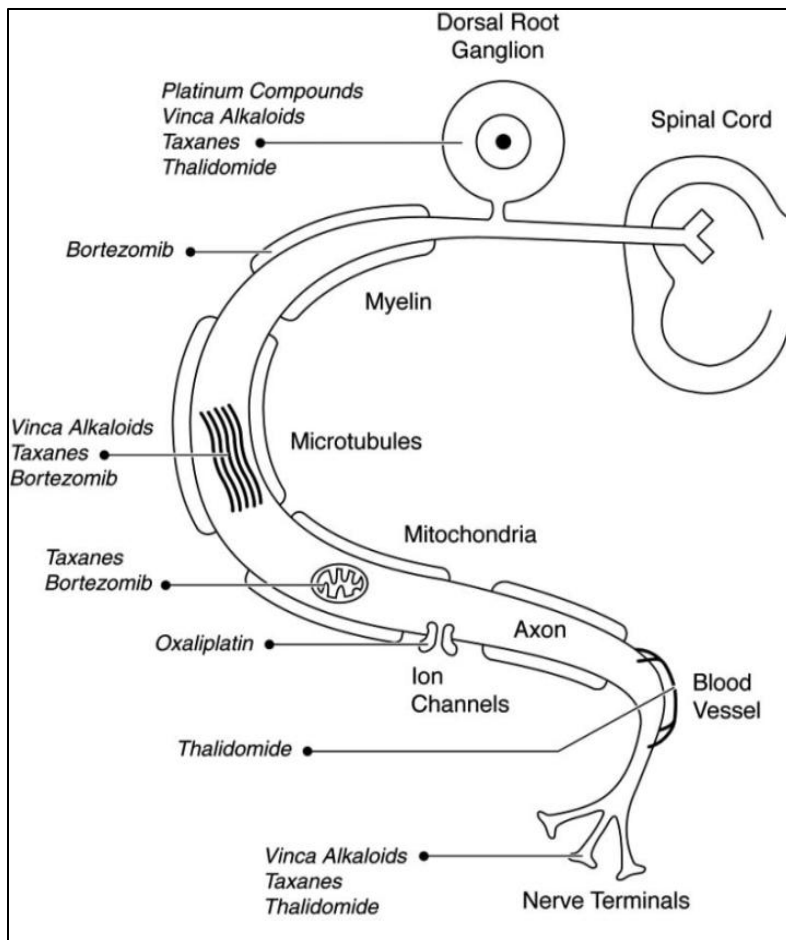
Ambos efectos adversos afectan significativamente el éxito del tratamiento de pacientes con cáncer, ya sea porque obligan a disminuir las dosis requeridas o llevan a la suspensión de la terapia (33, 34). La neurotoxicidad se puede presentar como consecuencia del tratamiento con la mayoría de los fármacos quimioterápicos: derivados del platino, taxanos, alcaloides de la vinca, agentes alquilantes, epotilonas, inmunomoduladores, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos y metaloides, entre otros (33, 35, 36).

Se estima que la incidencia de neuropatía periférica está entre 10 – 100%, dependiendo del fármaco estudiado (37, 38). Características tales como el tipo de neuropatía (sensorial puro, sensorio-motor o autonómico), el desarrollo y la severidad de ésta, se relacionan con factores como: edad, dosis y frecuencia de la administración de la quimioterapia, dosis acumulativa, duración de la terapia, coadministración con otros agentes quimioterápicos neurotóxicos, y preexistencia de condiciones tales como neuropatía periférica o enfermedades que se asocian con el desarrollo de ésta, tales como diabetes o alcoholismo (39, 40).

La aparición de neuropatía periférica se relaciona con la ausencia de barrera hemato-neural en el ganglio raquídeo posterior y con una mayor permeabilidad del *vasa nervorum*, en comparación con la barrera hematoencefálica (34, 35).

Los mecanismos que subyacen a la neurotoxicidad inducida por quimioterápicos son variados, dentro de los que destacan: inducción de apoptosis en el ganglio raquídeo posterior, secundario a daño en la estructura terciaria del DNA

nuclear y aumento en la generación de stress mitocondrial (35, 36, 41); y alteración en la continuidad de la superficie de la membrana axonal mediada por el transportador de microtúbulos, interfiriendo con el transporte axonal y con el resto de las funciones celulares básicas mediadas por éstos, entre ellas, el metabolismo energético, con lo cual ocasiona una disfunción de la neurona que conllevará a la consecuente degeneración axonal distal (35, 36, 40).



**Fig. 2.** Extraído de (36) Park S., Krishnan A., Lin C., Goldstein D., Friedlander M., Kiernan M. Mechanisms underlying chemotherapy-induced

Los taxanos son un grupo de representado por paclitaxel (fig. 2) docetaxel y el abraxane<sup>TM</sup> (nanopartículas de albúmina unidas a paclitaxel), son agentes citotóxicos ampliamente utilizados para el manejo de diversos tumores sólidos como el cáncer de mama, ovario, cabeza y cuello, pulmonar de células pequeñas, gástrico, melanomas y sarcoma de Kaposi (42, 43). Su mecanismo de acción se basa en la unión a las subunidades de  $\beta$ -tubulina, causando hiperestabilización de los

microtúbulos mediante su entrecruzamiento, disminuyendo la capacidad dinámica de reorganizar el citoesqueleto, especialmente inhibiendo el transporte axonal y la división celular, este mecanismo es el que se postula cómo potencial inductor de neurotoxicidad a nivel periférico (34, 44, 45). La neurotoxicidad por paclitaxel aparece como un efecto adverso significativo que limita la dosificación y el cumplimiento del tratamiento con este agente a pesar de que se logró un tratamiento para la mielosupresión (46).

La neuropatía se manifiesta como pérdida sensorial distal simétrica con distribución en guante-y-calceta, parestesias, alodinia mecánica y fría, dolor quemante, y pérdida de reflejos tendíneos profundos conduciendo a déficit en la propiocepción, la marcha y la motricidad fina (34, 38, 50). Los síntomas pueden aparecer después de 24 a 72 horas de iniciado el tratamiento cuando se administran altas dosis ( $\geq 250 \text{ mg/m}^2$ ), pero comúnmente ocurren después de múltiples cursos a dosis convencionales (135 a  $250 \text{ mg/m}^2$ ). La neurotoxicidad severa es poco frecuente a dosis convencionales ( $\leq 200 \text{ mg/m}^2$ ), incluso en pacientes que han recibido previamente otros agentes neurotóxicos, como el cisplatino (46).

En estudios patológicos de neuropatía inducida por paclitaxel en ratas, se ha descrito a nivel histológico degeneración axonal severa e hipomielinización en las raíces dorsales, acumulación intraaxonal de microtúbulos y cambios morfológicos en las células de Schwann, a nivel electrofisiológico se encontró una reducción en la velocidad de conducción de fibras sensitivas gruesas (44, 47, 48). También se ha señalado aumento en la expresión de MMP-3 (metaloproteínasa de la matriz-3) y en la densidad de macrófagos en los ganglios dorsales y en los nervios ciáticos, junto con activación de astrocitos y microglia en la médula espinal, (49, 50, 51). Por otra parte, el uso de paclitaxel se ha asociado a cambios atípicos en las mitocondrias, que incluyen edematización y vacuolización, tanto en fibras delgadas C como en axones mielinizados, dando como resultado despolarización de la membrana y generación de descargas ectópicas (52).

Además de sus efectos sobre las neuronas, paclitaxel causa la activación de los astrocitos, que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias tales como TNF, IL-1 $\beta$  y IL-6. Estas citoquinas causan sensibilización de las neuronas nociceptivas y la inflamación neurogénica, que también involucra a los receptores B1 y B2 de la bradicinina. (53)

El proceso inflamatorio comienza 4-7 días después del tratamiento, cuando el dolor agudo inicial ya ha disminuido, por lo tanto, la inflamación podría contribuir a la persistencia de los síntomas de dolor neuropático. Además el Paclitaxel, produce un aumento en la producción de especies de oxígeno reactivo que ocasiona la interrupción de la cadena de transporte mitocondrial de electrones, alterando la producción de ATP en las neuronas sensoriales. (53)

Existen diferentes técnicas que tienen como objetivo inducir estados patológicos en los animales que son utilizados en experimentación preclínica, en estos el objetivo es inducir condiciones similares a las producidas por neuropatía en el hombre y que bajo las cuales se puedan hacer de ensayos nociceptivos obteniéndose resultados que sean confiables.

Para los modelos de dolor neuropático, existen dos opciones para inducir un dolor de este tipo en los animales: la neuropatía quirúrgica y la neuropatía química. En la neuropatía quirúrgica, se utilizan modelos que surgieron en la década de los 80, en los primeros, se hacía una sección completa del nervio (modelo de neuroma), este tipo de intervención rápidamente cayo en desuso por cuestiones éticas, problemas con la interpretación de los resultados y porque el síndrome humano modelado por este ensayo, que es el dolor del miembro fantasma y que se caracteriza por una conducta de autotomía (automutilación de los dígitos) es una condición clínica poco frecuente. (54)

Posteriormente se desarrollaron otros modelos de dolor neuropático que consisten en daños parciales a los nervios, ocasionados por lesión parcial de él, en estos, se colocan ligaduras sueltas alrededor del nervio con lo cual se produce un edema intraneural que comprime el nervio y conduce a axotomía parcial, este



modelo es más frecuentemente utilizado en la actualidad que los cortes transversales completos del nervio.

Sin embargo, debido a la complejidad de estas cirugías y a la necesidad de modelos que repliquen más exactamente síndromes de dolor clínico, induciendo la enfermedad o el propio estado fisiológico que produce el dolor, se han implementado otras estrategias no quirúrgicas que incluyen quemaduras, dolor por cáncer, dolor neuropático inducido por quimioterapia, síndrome de dolor regional complejo, neuralgia post-herpética, dolor isquémico inducido por trombos (enfermedad arterial periférica) y calculosis ureteral, entre otros, por medio de la administración de fármacos o de sustancias que favorezcan la aparición de estos.(54, 55)

El tratamiento del paciente con dolor neuropático inducido por quimioterápicos comúnmente es refractario al tratamiento de primera línea usado en neuropatía diabética y neuralgia postherpética, en donde existen ensayos clínicos controlados que avalan el uso de antidepresivos tricíclicos (nortriptilina y desipramina), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (duloxetina y venlafaxina), ligandos  $\alpha_2$ - $\delta$  de canal de calcio (gabapentina y pregabalina), parches de lidocaína 5% tópica y agonistas opioides (morfina, oxicodona, metadona, levorfanol y tramadol) (5, 6, 32). Actualmente, el tratamiento de esta condición gira en torno a la prevención (ajuste de dosis y neuroprotección) y al tratamiento sintomático (34, 35, 56).

Es necesario tener en cuenta que las estrategias neuroprotectoras prevengan o disminuyan la neurotoxicidad sin afectar adversamente el beneficio del tratamiento, esto, dado que los que mecanismos de eficacia quimioterápica están frecuentemente relacionados al desarrollo de toxicidad (45, 56). Una de las estrategias preventivas consiste en el ajuste de dosis, esta modifica el régimen de administración, teniendo en consideración la toxicidad individual de los fármacos, la dosis individual acumulada y las características farmacocinéticas individuales, de manera que racionaliza la dosis y la frecuencia de administración para mantener la eficacia, al tiempo que minimiza los efectos tóxicos (34, 57).

Entre las drogas estudiadas en clínica humana y veterinaria, como agentes preventivos se encuentran amifostine, glutamina, calcio/magnesio, vitamina E, glutatión, acetil-L-carnitina, rhuLIF (factor inhibidor de leucemia humana recombinante), NGF (factor de crecimiento nervioso), N-acetilcisteína, eritropoyetina, anticonvulsivantes (carbamazepina y oxcarbazepina), venlafaxina y ácido valproico (34, 35, 36, 39, 56), para el tratamiento sintomático se han estudiado antidepresivos tricíclicos (nortriptilina y amitriptilina), ligandos  $\alpha_2\text{-}\delta$  de canal de calcio (gabapentina y pregabalina), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (duloxetina y venlafaxina), anticonvulsivantes (lamotrigina), ácido  $\alpha$ -lipoico, acetil-L-carnitina y aplicación tópica de lidocaína y baclofeno/amitriptilina/ketamina (32, 35, 39, 56, 58).

Sin embargo, pese al gran número de drogas estudiadas para la prevención y tratamiento de la neuropatía por quimioterápicos, algunos con resultados prometedores (infusión de calcio/magnesio, glutatión, acetil-L-carnitina, ácido  $\alpha$ -lipoico y parches tópicos de baclofeno/amitriptilina/ketamina) (58, 59), ninguno ha demostrado efectividad, por lo que aún no existen pautas claras para recomendar ningún agente debido a la escasa evidencia, haciéndose necesaria la realización de futuros estudios clínicos controlados para confirmar sus efectos, sin que afecten la actividad antitumoral, antes de su implementación en la práctica clínica (34, 35, 45, 56, 58).

Luego de que se conociera que algunos modelos de epilepsia y de dolor neuropático comparten similitudes fisiopatológicas, se dio inicio al uso de anticonvulsivantes como adyuvantes en el manejo sintomático de los trastornos de dolor neuropático, la carbamazepina fue el primer fármaco de este grupo en ser estudiado en ensayos clínicos y utilizado con esta indicación en los años 60 (60, 61).

Más recientemente, gracias al mayor conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos que intervienen en este tipo de dolor, el interés hacia otros medicamentos de este grupo fue aumentando y se ha estudiado la efectividad de

éstos, sobre todo buscando tratamiento a pacientes que no responden a la terapia convencional. (60).

El ácido valproico, está conformado por una serie de ácidos grasos carboxílicos con actividad anticonvulsiva. Su mecanismo de acción es semejante al de la fenitoína y la carbamazepina, ya que bloquea la descarga repetitiva de alta frecuencia de las neuronas en cultivo a concentraciones terapéuticas importantes, su actividad contra las convulsiones parciales puede ser una consecuencia de ese efecto sobre las corrientes de Na<sup>+</sup>. Además se cree que tiene efecto sobre las concentraciones de GABA. Varios estudios han mostrado concentraciones aumentadas de GABA en el cerebro después de la administración de valproato, si bien no se ha definido claramente el mecanismo, se presume que dicho efecto es el resultado del efecto facilitador que el fármaco ejerce sobre la acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), enzima encargada de la síntesis de GABA (62).

El ácido valproico ha sido utilizado con éxito en dolor crónico e incluso en algunos tipos de cefaleas, así mismo ha mostrado eficacia en el manejo del dolor relacionado con la neuropatía diabética dolorosa (63, 64), al igual que otros fármacos de su grupo ha demostrado ser un tratamiento adecuado para el dolor neuropático, eficaz hasta cierto punto dependiendo de la fisiopatología subyacente (65).

En un estudio realizado en 2004 para comprobar la efectividad del ácido valproico en el manejo de la polineuropatía dolorosa, éste no demostró diferencia en su efecto sobre el dolor, comparado con placebo (66), lo anterior, lejos de sugerir que el fármaco no deba ser usado con esta indicación, permite pensar un manejo con analgesia multimodal, en el cual se utilizaría en asociación con otro u otros fármacos analgésicos, logrando con esto una efectividad mayor que si se utilizaran por separado, además de disminuir la incidencia de efectos adversos al reducir la dosis y de aumentar el beneficio para los pacientes (60, 63, 67, 68).

Por otro lado, aunque el manejo del dolor neuropático con opioides es controversial, estudios preclínicos y clínicos han demostrado la eficacia antinociceptiva y seguridad de los opioides en diversos modelos de dolor neuropático, tanto central como periférico, de éstos la oxycodona y el tramadol han demostrado ser superiores al placebo. (5, 6, 28, 63, 74, 75). Existen 3 grandes tipos de receptores opioides ( $\mu$ -MOR,  $\delta$ -DOR y  $\kappa$ -KOR), los cuales están acoplados a proteína G. Por lo tanto, pueden modificar canales iónicos, disposición del calcio intracelular y fosforilación de proteínas.

Presinápticamente, la activación de receptores opioides resulta en cierre de canales de calcio voltaje-dependientes, y por ende, reducción de la liberación de neurotransmisores como norepinefrina, glutamato, serotonina, sustancia P y acetilcolina. Postsinápticamente, los opioides hiperpolarizan la célula por activación de canales de potasio, previniendo la excitación y/o la propagación de potenciales de acción.

Aunque los opioides ejercen su efecto analgésico a través de mecanismos predominantemente centrales, existen también receptores opioides que median efectos analgésicos a nivel periférico. Estos receptores son expresados, principalmente, en neuronas sensitivas de pequeño, mediano y gran calibre de la raíz del ganglio dorsal, donde se coexpresan junto a neuropéptidos sensitivos como sustancia P o péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). Se transportan a los terminales nerviosos periféricos y se acoplan a proteínas  $G_i/o$  que inhiben a la enzima adenilciclase y modulan canales iónicos (75). La disminución de las corrientes de calcio, pero no la modulación de canales de potasio, parece ser el principal mecanismo para la inhibición de las funciones de las neuronas sensitivas (75).

La activación de los receptores de opioides también suprime la modulación pronociceptiva de canales de  $Na^+$  resistentes a tetrodotoxina y corrientes catiónicas no selectivas, corrientes mediadas por el receptor P2X, como también corrientes de

TRPV1 (transient receptor potencial catión channel subfamily V, member 1) vía Gi/o y AMPc. Como resultado, los agonistas opioides pueden atenuar la excitabilidad inducida por inflamación en neuronas primarias aferentes y la liberación de neuropéptidos inflamatorios (sustancia P, CGRP) desde terminales centrales y periféricos. Particularmente dentro de tejidos dañados, estos eventos conducen a efectos antinociceptivos y antiinflamatorios (75, 76).

Por las razones expuestas previamente, se estudiará la asociación de ácido valproico con tramadol, el opioide a usarse representa uno de los analgésicos de amplio uso dentro de dicho grupo. El modelo de neuropatía periférica que se estudiará es el inducido por paclitaxel en ratones y el comportamiento nociceptivo se medirá con los test de la plancha caliente (Hot Plate) y el de retirada de la cola (Tail Flick). Además, se utilizará el análisis isoblográfico de las combinaciones de ácido valproico con tramadol, determinando el tipo y magnitud de la interacción.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Determinar la acción analgésica de Tramadol y ácido Valproico en un modelo de dolor neuropático inducido por paclitaxel en ratones.

### Objetivos Específicos

- Calcular la dosis efectiva 50% ( $DE_{50}$ ) del efecto analgésico máximo para cada fármaco y comparar su potencia relativa.
- Cuantificar la actividad analgésica de Tramadol (TRM) (3-50 mg/kg) y Acido Valproico (AV) (1-200 mg/kg) y su asociación, en el dolor neuropático inducido por la administración de paclitaxel, por medio de la construcción de curvas dosis-respuesta.
- Establecer el tipo y magnitud de la interacción analgésica resultante de la administración concomitante de Tramadol y Acido Valproico por medio del análisis isoblográfico.

## **HIPÓTESIS**

La administración conjunta de Tramadol y ácido Valproico produce efectos analgésicos sinérgicos en el manejo de dolor neuropático inducido por la administración de paclitaxel.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratones machos CF1 de entre 25 y 35 g, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, mantenidos a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^{\circ}$  C), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, los cuales tendrán libre acceso a agua y comida. Los experimentos fueron realizados de acuerdo al Protocolo de Manejo y Cuidados de Animales (Protocolos CBA # 0674). Cada uno de los grupos de experimentación consistió de 6 ratones, número necesario para los objetivos estadísticos. Previo a los experimentos, se realizó un ayuno de 8 horas, con un tiempo de adaptación al ambiente de laboratorio de al menos 2 horas, antes de ser sometidos a las pruebas establecidas en el protocolo de investigación. Los experimentos se realizaron entre las 08:00 a 16:00 horas. Con el objeto de controlar el estado general de los ratones, se controló el peso diario, previo a la realización de los experimentos. Al finalizar cada protocolo, los animales recibieron anestesia con 60 mg/kg de pentobarbital o pentotal y luego eutanasia mediante dislocación cervical.

### Fármacos

Los fármacos utilizados son los mismos que se encuentran actualmente comercializados y disponibles en la práctica clínica en humanos: Paclitaxel (PTX), Tramadol (TRM) y Acido Valproico (AV). Los fármacos individuales y sus asociaciones se disolvieron en solución salina normal (0.9%) previo a su uso. Paclitaxel se administró a dosis de 6 mg/kg e inyectado por vía intraperitoneal (i.p.), diluído en un volumen constante de 10 ml/kg de solución salina normal 0.9%. Tramadol se administró a dosis de 3, 10, 30 y 50 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.), en un volumen constante de 10 ml/kg de solución salina normal 0.9%, 30 min antes de realizar los ensayos nociceptivos para determinar la  $DE_{50}$ , la cual fue usada en los experimentos algiesiométricos posteriores. El Ácido valproico se administró a dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg, por vía intraperitoneal (i.p.), diluído en un volumen constante de 10 ml/kg de solución salina normal 0.9%, 30 min antes de realizar los ensayos nociceptivos para determinar la  $DE_{50}$ .



## Inducción de Neuropatía

La neuropatía periférica fue inducida mediante la administración del agente quimioterápico Paclitaxel, administrado en dosis de 6 mg/kg, por inyección vía intraperitoneal (i.p.), una vez al día, durante 5 días consecutivos (1° - 5° día) (45, 69). Los ratones del grupo control fueron inyectados con 10 ml/Kg de solución fisiológica i.p., durante 5 días consecutivos (1° - 5° día). La evaluación de nocicepción se realizó los días 7° y 14° desde la primera administración de Paclitaxel.

## Medición de Actividad Antinociceptiva

Para realizar dicha medición, se usaron dos test algesiométricos, que evalúan hipernocicepción (hiperalgesia y alodinia) inducida por calor. Las latencias basales se midieron antes del tratamiento con Paclitaxel. Los valores post-tratamiento evaluados los días 7° y 14° post-Paclitaxel, contados desde el primer día en que se inició la administración del mismo.

1. Test de la plancha caliente (Hot-Plate): Se usó el método de plancha caliente previamente descrito (70, 71). Se usó un dispositivo especial diseñado por Ugo Basile S.R.I., Italia. La temperatura de la plancha o base metálica fue regulada a  $50 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  y cada ratón colocado sobre la plancha, sin restricciones de movimiento, en espera de obtener alguna reacción de comportamiento conductual al dolor inducida por calor (lamerse las patas delanteras o saltar fuera de la plancha). El tiempo de reacción se midió en segundos mediante cronómetro digital del aparato. El tiempo de corte de exposición o cut-off fue fijado en 30 segundos, para evitar daño tisular. Se realizaron 2 mediciones en condiciones basales y 2 mediciones posteriores a la administración de los fármacos, cada una separada de la otra por 3 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje del efecto analgésico máximo posible (%MPE), como sigue a continuación:

$$\%MPE = \frac{(\text{Latencia post - droga} - \text{Latencia basal})}{(\text{Tiempo de corte} - \text{Latencia basal})} \times 100$$

2. Test de retirada de la cola (Tail-Flick): este test se aplicará según el método descrito por Miranda H. (72, 84), en un aparato especial diseñado por Ugo Basile S.R.I., Italia, en el cual se coloca al animal dentro de un contenedor diseñado para controlar su movilidad por un periodo de tiempo no mayor a 3 minutos, y se expuso la cola del ratón al calor radiante. Se midió el periodo de “latencia del movimiento de la cola”, es decir el tiempo que transcurre entre el inicio de la emisión de calor hasta el momento en el que la cola es retirada que es el tiempo de reacción, que es interpretado como acción analgésica. Se estipula arbitrariamente un tiempo de corte de exposición o cut-off de 8 segundos para evitar daño en la cola. Las latencias de retirada de la cola se expresaron como el porcentaje del efecto máximo posible (%MPE), calculado de la siguiente manera:

$$\%MPE = \frac{(\text{Latencia post - droga} - \text{Latencia basal})}{(\text{Tiempo de corte} - \text{Latencia basal})} \times 100$$

### **Análisis isobolográfico**

La administración de la combinación de Tramadol y Acido Valproico se realizó a grupos de 6 ratones, en proporción 1:1 de sus DE<sub>50</sub>, en mezclas de fracciones de estas (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16), con los datos obtenidos de dichas fracciones, se construyeron la curva dosis-respuesta y a partir de ellas se calculó la DE<sub>50</sub> de la mezcla experimental.

La naturaleza de la interacción y su cuantía, se evaluó usando el análisis isobolográfico de las diferentes combinaciones (73, 82). Para la construcción de los isobogramas se utilizaron coordenadas cartesianas, graficando la DE<sub>50</sub> de Acido Valproico en la abscisa y la DE<sub>50</sub> del Tramadol en la ordenada, entre estas dos se obtiene una línea denominada “línea de aditividad”. Luego se grafica la DE<sub>50</sub> correspondiente a la mezcla experimental. El valor DE<sub>50</sub> obtenido experimentalmente

se comparará mediante test de Student con el valor  $DE_{50}$  teórico de aditividad, el cual se calculara de la siguiente forma:

$$ED50 \text{ aditividad} = \frac{ED50 \text{ Ac Valproico}}{P \text{ Ac Valproico} + R \times P \text{ Tramadol}}$$

En donde: “R” es la razón de potencia de cada uno de los medicamentos administrados solos; “P Ac Valproico” es la proporción de ácido Valproico usada en la mezcla; y “P Tramadol” es la proporción de Tramadol que se usó en la mezcla.

El punto que representa la  $DE_{50}$  experimental, se representará en el isoblograma y el sitio del gráfico donde el punto experimental se ubique, determina el tipo de interacción. Si el punto experimental queda ubicado por debajo de la línea de aditividad, y es estadísticamente diferente del punto de aditividad, el efecto de la combinación de los fármacos es sinérgico o supra-aditivo. En el caso que el punto experimental se encuentre sobre la línea de aditividad, no existe interacción entre los componentes de la mezcla, y el efecto es simplemente aditivo. (73, 82)

Por otro lado, si el punto se localiza sobre la línea de aditividad y es estadísticamente diferente del punto de aditividad, el efecto de la combinación es antagónico o sub-aditivo. Además con el objeto de documentar la respuesta obtenida con la administración de la mezcla de Tramadol y Acido Valproico, se calculará el Índice de Interacción (I.I.), éste corresponde a la razón de la potencia de la combinación, se calculara así:

$$\text{Índice de Interacción} = \frac{ED50 \text{ Experimental}}{ED50 \text{ Teórico}}$$

Si el valor obtenido es cercano a 1 la interacción es aditiva; si es menor que 1 demuestra que la interacción es supra-aditiva o sinérgica; y si el valor obtenido es mayor que 1, es indicativo de una interacción sub-aditiva o antagónica. (73).

## **Protocolo de Experimentación**

1º Fase: Medición de tiempos basales de reacción en test de retirada de la cola y en test de plancha caliente, en ratones normales.

2º Fase: Medición de tiempos basales de reacción en test de retirada de la cola y en test de plancha caliente, en ratones inyectados con PTX.

3º Fase: Medición de tiempos basales de reacción en test de retirada de la cola y en test de plancha caliente, en ratones normales, pre-tratados con TRM y AVL.

4º Fase: Elaboración de la curva dosis respuesta en test de retirada de la cola y en test de plancha caliente, cálculo de la DE50, en ratones normales, pre-tratados con TRM y AVL.

5º Fase: Medición de tiempos basales de reacción en test de retirada de la cola y en test de plancha caliente, en ratones inyectados con PTX, pre-tratados con TRM y AVL.

6º Fase: Elaboración de la curva dosis respuesta en test de retirada de la cola y en test de plancha caliente, cálculo de la DE50, en ratones inyectados con PTX, pre-tratados con TRM y AVL.

7º Fase: Elaboración y análisis del isoblograma en ratones normales, pre-tratados con TRM y AVL. (Test Hot Plate)

8º Fase: Elaboración y análisis del isoblograma en ratones normales, pre-tratados con TRM y AVL. (Test Tail Flick)

9º Fase: Elaboración y análisis del isoblograma en ratones inyectados con PTX, pre-tratados con TRM y AVL. (Test Hot Plate)

10º Fase: Elaboración y análisis del isoblograma en ratones inyectados con PTX, pre-tratados con TRM y AVL. (Test Tail Flick)

## **Análisis estadístico**

Los resultados serán presentados como promedio  $\pm$  error estándar del promedio o con valores de DE<sub>50</sub> y su límite de confianza 95% (95% CL). Los cálculos se realizarán con el programa Pharm Tools Pro (versión 1.27, The McCary Group Inc., PA, USA). Las diferencias estadísticas entre los valores DE<sub>50</sub> teóricos y experimentales serán calculadas por el test de Student para promedios independientes. Un valor estadístico de P inferior a 0.05 ( $P < 0.05$ ) será considerado como significativo.

## **Resultados esperados**

La administración de i.p. de Paclitaxel en ratones, induce neuropatía periférica luego del 5º día de administración.

El Ácido valproico y el tramadol, administrado i.p independientemente, producen analgesia en el dolor neuropático.

La asociación de Tramadol con Ácido valproico produce una interacción analgésica de tipo sinérgico en el dolor neuropático secundario a la administración del agente citotóxico paclitaxel.

.

## RESULTADOS

### Evaluación de la analgesia

Se tomaron cuatro grupos de 6 ratones cada uno, para cada uno de los test, los animales del grupo control fueron inyectados con solución salina normal (SSN) 0,9% via intraperitoneal por 5 días (0-4), y medidos luego de la administración de ácido valproico y de tramadol en las dosis propuestas.

Los animales del grupo que recibió tratamiento con paclitaxel, recibieron dicho fármaco por cinco días (0-4) para luego ser sometidos a los mismos test algesiométricos que los controles, en este caso las dosis de los fármacos estudiados fueron probadas en cada grupo a los 7 y a los 14 días de haber iniciado la administración de paclitaxel.

Con los datos obtenidos de cada uno de los grupos, se construyeron curvas dosis-respuesta, expresadas como el logaritmo de la dosis tanto del ácido valproico como del tramadol versus el porcentaje del máximo efecto posible (%MPE). A partir de estas graficas se obtuvo la DE<sub>50</sub> para los controles y para los animales que recibieron tratamiento con paclitaxel. A continuación se presentan los datos de las DE<sub>50</sub> según fármaco y test.

#### Grupo control no tratado

Medicamento	Test	N	DE <sub>50</sub>
Acido Valproico	Tail Flick	24	108,59 ± 5,93
Acido Valproico	Hot Plate	24	119,39 ± 9,25
Tramadol	Tail Flick	24	10,34 ± 0,49*
Tramadol	Hot Plate	24	10,29 ± 0,39*

\*= P<0.05 versus ácido valproico

**Grupo tratado con paclitaxel**

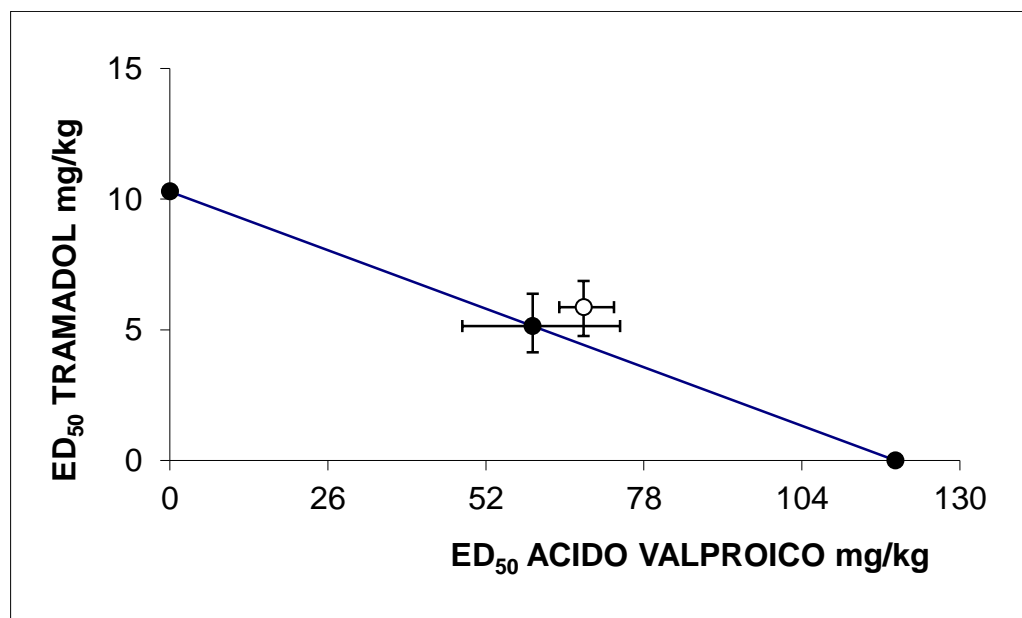
<b>Medicamento</b>	<b>Test</b>	<b>n</b>	<b>DE<sub>50</sub> 7 días</b>	<b>DE<sub>50</sub> 14 días</b>
Tramadol	Hot Plate	24	12,45 ± 0,62*	13,60 ± 0,63*
Tramadol	Tail Flick	24	15,15 ± 1,20*	14,83 ± 1,01*
Ácido valproico	Hot Plate	24	155,12 ± 6,25*	136,97 ± 4,78
Ácido valproico	Tail Flick	24	130,89 ± 13,25	120,42 ± 3,77

\*= P<0.05 versus el mismo fármaco en grupo control.

## ISOBOLOGRAMAS

### 1. Isoblograma controles no tratados en test de Hot Plate

La construcción de isoblogramas en un sistema de coordenadas cartesianas entre Tramadol y ácido valproico en animales controles no tratados, demuestra que la interacción farmacológica entre ambos fármacos es de naturaleza aditiva como se muestra en la figura siguiente.

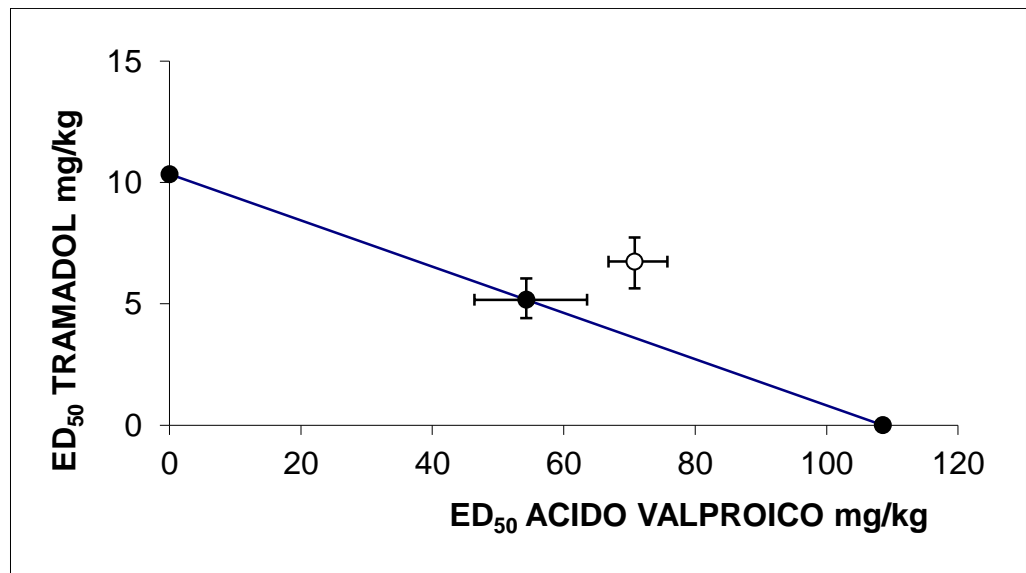


La interacción aditiva se confirma con el índice de interacción de 1.14.



## 2. Isoblograma controles no tratados en test de Tail Flick

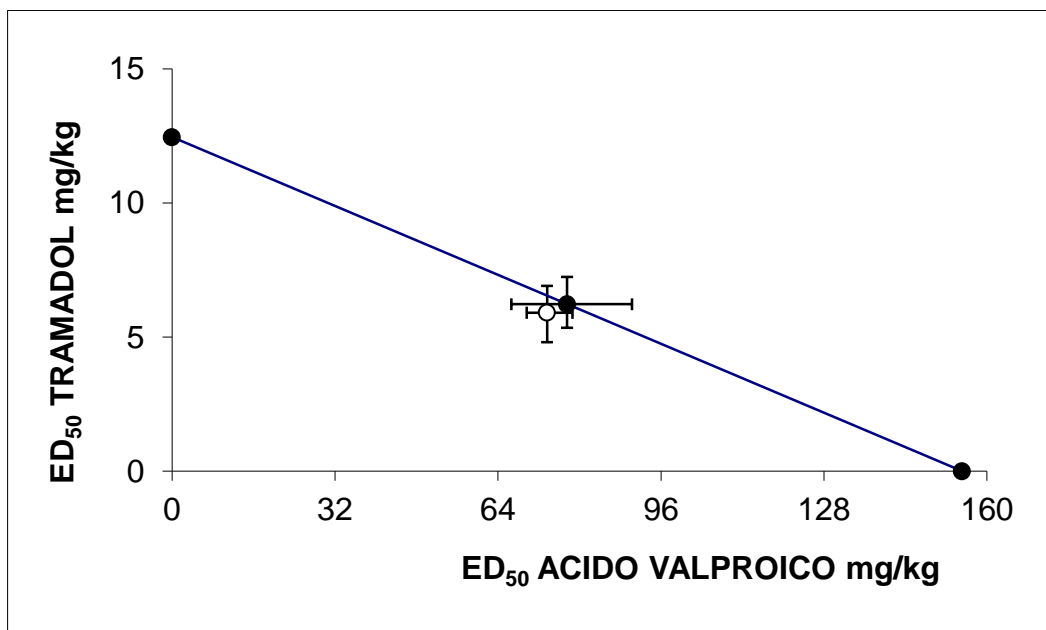
La construcción de isoblogramas en un sistema de coordenadas cartesianas entre Tramadol y ácido valproico en animales controles no tratados, demuestra que la interacción farmacológica entre ambos fármacos es de naturaleza aditiva como se muestra en la figura siguiente.



La interacción aditiva se confirma con el índice de interacción de 1.30

### 3. Isoblograma grupo tratado con paclitaxel en test de Hot Plate 7 días

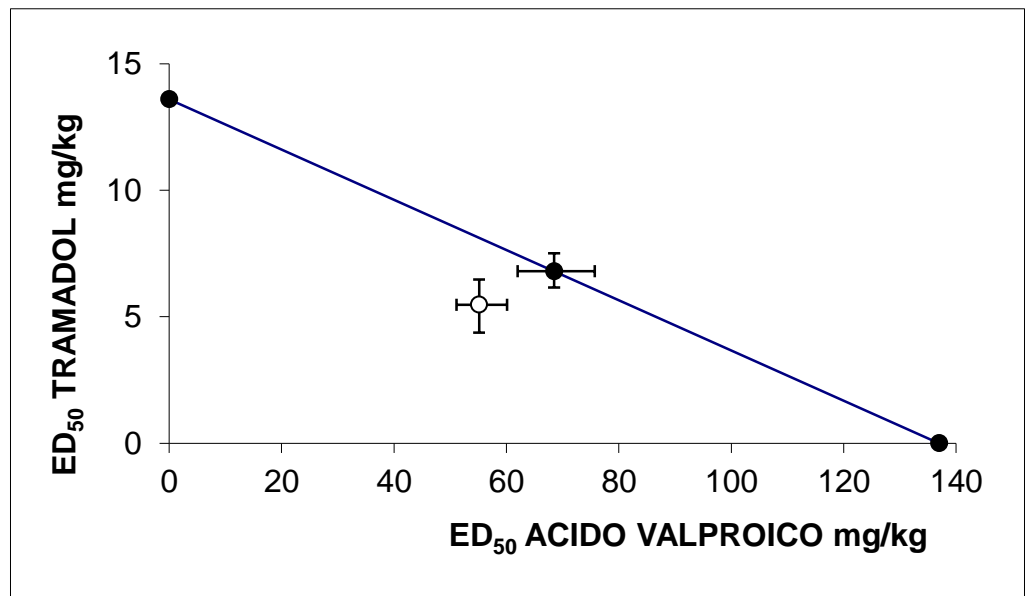
La construcción de isobogramas en un sistema de coordenadas cartesianas entre Tramadol y ácido valproico en animales tratados con Paclitaxel, demuestra que la interacción farmacológica entre ambos fármacos es de naturaleza aditiva como se muestra en la figura siguiente.



La interacción aditiva se confirma con el índice de interacción de 0.94

#### 4. Isoblograma grupo tratado con paclitaxel en test de Hot Plate 14 días

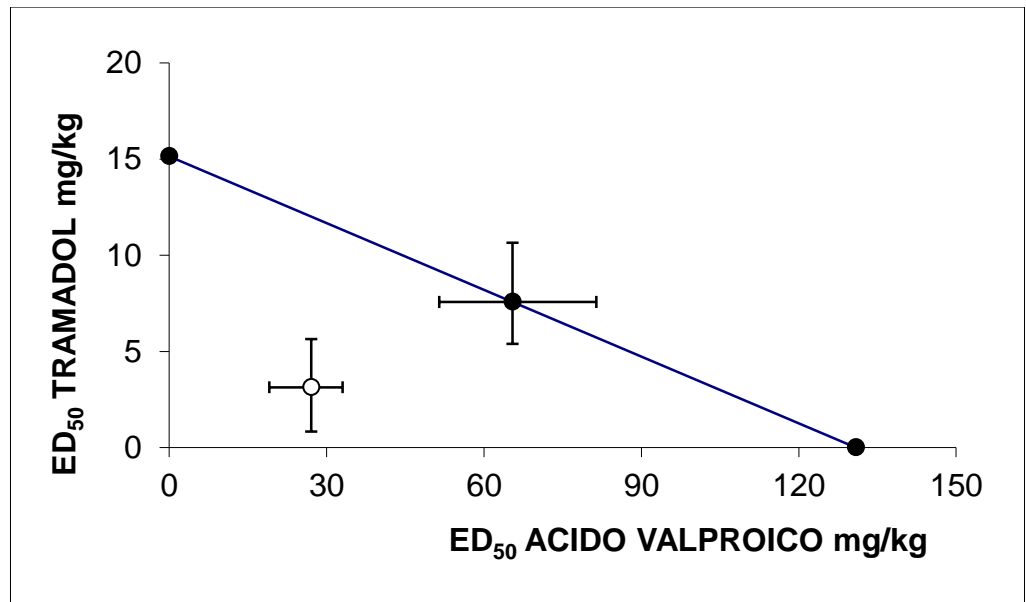
La construcción de isobogramas en un sistema de coordenadas cartesianas entre Tramadol y ácido valproico en animales tratados con Paclitaxel, demuestra que la interacción farmacológica entre ambos fármacos es de naturaleza aditiva como se muestra en la figura siguiente.



La interacción aditiva se confirma con el índice de interacción de 0.80.

## 5. Isoblograma grupo tratado con paclitaxel en test de Tail Flick 7 días.

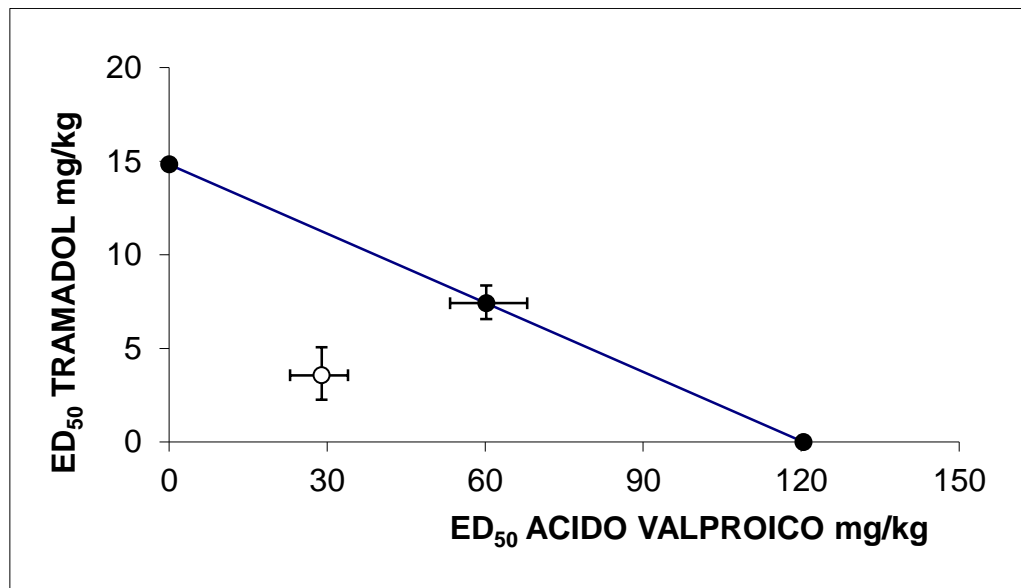
La construcción de isobogramas en un sistema de coordenadas cartesianas entre Tramadol y ácido valproico en animales tratados con Paclitaxel, demuestra que la interacción farmacológica entre ambos fármacos es de naturaleza sinérgica o supraaditiva como se muestra en la figura siguiente.



La interacción supra-aditiva o sinérgica se confirma con el índice de interacción de 0.41.

## 6. Isoblograma grupo tratado con paclitaxel en test de Tail Flick 14 días.

La construcción de isoblogramas en un sistema de coordenadas cartesianas entre Tramadol y ácido valproico en animales tratados con Paclitaxel, demuestra que la interacción farmacológica entre ambos fármacos es de naturaleza sinérgica o supraaditiva como se muestra en la figura siguiente.



La interacción supra-aditiva o sinérgica se confirma con el índice de interacción de 0.48

## DISCUSIÓN

En el presente estudio la administración intraperitoneal repetida de Paclitaxel a dosis de 6 mg/Kg indujo neuropatía periférica en ratones, lo cual se evidenció al hacer la comparación de la necesidad de analgesia entre el grupo control no tratado y los grupos tratados, encontrando significancia estadística en dicha diferencia. ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del presente estudio son concordante con hallazgos anteriores en relación al tiempo en que se alcanza el efecto máximo de hiperalgesia, aunque las dosis de paclitaxel utilizadas fueron diferentes 2 mg/ kg durante 5 días versus 6 mg/kg por 5 días (77). Así, se pudo determinar que el peak de hiperalgesia se alcanza entre los 7-10 días posteriores a la administración del agente citotóxico, esto fue evidente al comparar las  $DE_{50}$  de los medicamentos estudiados, siendo estas mayores al realizar el experimento a los 7 días con respecto al de los 14 días. ( $p < 0,05$ ).

El ácido valproico es un fármaco con acción anticonvulsivante utilizado en clínica para tratar varios tipos de epilepsia, este efecto ocurre por inhibición de la transaminasa del GABA y por un aumento en la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico, actuando indirectamente en el GABA, además tiene efecto sobre los canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje y sobre algunos subtipos de los canales de calcio. (62, 78). Por lo anterior, el ácido valproico tiene efectos tanto en neurotransmisión y neuromodulación de las vías relacionadas con el dolor neuropático, esto en teoría deberían hacer que tuviera más efectividad que drogas tales como carbamazepina o fenitoína que actúan principalmente en los canales iónicos de la membrana neuronal. (61, 81).

Se ha demostrado la acción antinociceptiva del ácido valproico en ratones utilizando modelos de dolor agudo y crónico. Así, el efecto antinociceptivo ha sido descrito en experimento de la administración intraperitoneal de ácido acético en

ratones (writhing test) como en modelos de calor radiante en los mismo especímenes (hot plate) (80, 81). También se ha demostrado la acción antinociceptiva del ácido valproico en modelos de dolor inflamatorio, como es el caso de la inyección de carragenina en la extremidad posterior de ratas, en el cual además, redujo la inmunotinción para TNF- $\alpha$ . En otro modelo animal de dolor inflamatorio, como es el test de la formalina en ratones, redujo ambas fases, mostrando mayor disminución en la fase II. Además, en un modelo de peritonitis por carragenina, se encontró que reduce la infiltración de leucocitos y la liberación de mieloperoxidasa. (78).

El efecto antinociceptivo del ácido valproico, según algunos autores, posiblemente se relaciona a su acción sobre el sistema GABAérgico aumentando la neurotransmisión en dicho sistema, con lo cual podría ser capaz de potenciar la actividad de analgésicos opioides y otros fármacos. (78, 61).

Las DE<sub>50</sub> para ácido valproico, en los animales controles, calculadas en el presente estudio, tanto en el test de Hot Plate como en el test de Tail Flick, fueron altas, sin presentar diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, en los animales tratados solamente se encontró diferencia significativa a los 7 días en el Hot Plate. Todo esto demuestra que dicho fármaco, si bien tiene actividad antinociceptiva, esta es poco potente, siendo una limitante para su uso como único agente analgésico. (82).

En un estudio en el que usaron la asociación de ácido valproico y morfina, se demostró que el ácido valproico aumentaba el efecto de la morfina en un modelo de dolor térmico, pero al administrarlo sin asociarlo con dicho agente analgésico, no mostro ningún efecto sobre el dolor inducido por el calor en ratones. (61).

Por otra parte, en los animales controles con Tramadol, fármaco utilizado en clínica para el tratamiento de dolor moderado o severo, solo o en combinación, las DE<sub>50</sub> obtenidas en éste estudio, fueron de mayor potencia que las DE<sub>50</sub> del ácido

valproico,. La explicación para ésta diferencia podría radicar en el hecho que el Tramadol es un opioide atípico posee buena actividad antinociceptiva, debido a sus dos mecanismos de acción, por una parte, el agonismo que ejerce sobre los receptores opioides  $\mu$  y por otro lado, la inhibición de la recaptación de norepinefrina y serotonina. (83).

Al comparar las  $DE_{50}$  de Tramadol en el grupo tratado con paclitaxel tanto a los 7 como a los 14 días, fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que en el grupo control, es decir que el grupo tratado tuvo un mayor requerimiento de analgesia.

Las diferencias de  $DE_{50}$  de Tramadol y de ácido valproico en los animales tratados con paclitaxel, cuando se administran por separado se podrían explicar en la diferencia de potencia de cada fármaco, atribuible a sus mecanismos de acción. (61, 81, 83)

Lo anterior demuestra por un lado que el tramadol es un fármaco con buena actividad analgésica mientras que el ácido valproico no tiene efecto analgésico por si solo o bien este es débil, como ya se mencionó previamente, y por otro lado que es probable que al asociarlo con analgésicos opioides, potencie el efecto antihipernociceptivo de estos. (61).

Los isobogramas controles en los test de *Hot Plate* y *Tail Flick*, como los de los tratados con paclitaxel, en el ensayo del Hot Plate a los 7 como a los 14 días demostraron una interacción farmacológica de tipo aditivo con su correspondiente índice de interacción confirmatorio. Sin embargo los isobogramas de los ratones neuropáticos por paclitaxel tanto a los 7 días cómo a los 14 días en el ensayo del Tail Flick, resultaron ser sinérgicos con sus correspondientes índices de interacción menores que 1.

Estos hallazgos se correlacionan con el tipo de estudio nociceptivo, ya que a pesar de ser ambos de naturaleza fásica, dependen de la temperatura del ensayo y



de la superficie a la cual se aplica dicha temperatura. Además por la naturaleza del test, la reacción al Tail Flick es netamente espinal y en cambio la del Hot Plate es supraespinal. (84).

Con base a estas consideraciones se podría hipotetizar, por las características precisadas, que solamente en el ensayo del Tail Flick la asociación de Tramadol con ácido valproico es capaz de incrementar significativamente su efecto antinociceptivo comparado con el control. Este hallazgo es concordante con la sinergia reportada en la administración conjunta de ácido valproico y tramadol, usando un modelo de *Writhing test* inducido por la administración de Zymosan A, en dicho estudio, adjudican el sinergismo a los mecanismos de acción diferente y propio de cada uno de ellos. (78, 82).

Por lo anterior, es necesario realizar más estudios, que permitan determinar la naturaleza de la interacción entre estos dos fármacos, utilizando otros test algesiométricos, ya que de comprobarse que dicha interacción es sinérgica, abriría un importante campo de investigación hacia nuevas opciones tratamiento analgésico, utilizando menores dosis de los fármacos, con lo cual se lograrían tratamientos mejor tolerados y más eficientes.

## CONCLUSIONES

El ácido valproico posee un restringido efecto analgésico por sí solo, o bien este efecto es débil.

La administración conjuntamente con un opioide, potencia el efecto antinociceptivo de este último.

El resultado de la administración conjunta de ácido valproico y tramadol en la presente investigación no permite concluir que exista una interacción de tipo sinérgico entre estos fármacos.

Se sugiere realizar otros estudios utilizando otros test, y de ser posible, cuantificar marcadores de inflamación y de dolor crónico.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Busquets Julià Carme.; Ribera Canudas M.<sup>a</sup> Victoria. Unidades de dolor. Realidad hoy, reto para el futuro. Monografies Mèdiques de l'acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears. 2002.
- 2.- Jensen TS.; Baron R.; Haanpaa M.; et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 152:2204–5, 2011.
- 3.- Beran R. Paraesthesia and peripheral neuropathy. *Aust Fam Physician* Mar; 44(3):92-5. 2015
- 4.- Baron R.; Binder A.; Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms and treatment. *Lancet Neurology*. 9: 807 – 819, 2010.
- 5.- Treede R.; Jensen T.; Campbell J.; Cruccu G.; Dostrovsky J.; Griffin J.; Hansson P., Hughes R.; Nurmikko T.; Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 70: 1630 – 1635, 2008.
- 6.- Dworkin R.; Backonja M.; Rowbotham M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 60: 1524 – 1534, 2003.
- 7.- Bouhassira D.; Lantéri-Minet M.; Attal N.; et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 136: 380 -387, 2008.
- 8.- Bowsher D. Neurogenic pain syndromes and their management. *Br Med Bull*. 47: 644 – 666, 1991.
- 9.- Gálvez R.; Marsal C.; Vidal J.; del Real M<sup>a</sup> A.; Ruiz M.; Rejas J. Neurophatic pain as a cause of anxiety, depression and sleep disturbance in standard condition of care: DONEGA naturalistic study. *Rev. Soc. Esp. Dolor* v.13 n.2. 81-95, 2006.
- 10.- O'Connor A. Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics*. 27: 95 – 112, 2009.
- 11.- Anastasia P; Hay JW. Chemotherapy-induced neuropathy: results of an oncology nurse survey. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 21:2618, 2002.

- 12.-Torrance N.; Smith B.; Watson M.; et al. Medication and treatment use in primary care patients with chronic pain of predominantly neuropathic origin. *Family Practice*. 24: 481 – 485, 2007.
- 13.- Pasero Ch. Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*. 5: 3 – 8, 2004.
- 14.- Devor M. Ectopic discharge in A beta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res*. 196: 115 – 128, 2009.
- 15.- Dubovy P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat*. 193: 267 -275, 2011.
- 16.- Perry V.; Brown M.; Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury: a possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med*. 165: 1218 – 1223, 1987.
- 17.- Inoue K.; Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. *Glia*. 57: 1469 – 1479, 2009.
- 18.- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 194: 1 – 14,1999.
- 19.- Cámara-Lemarroy C.; Guzmán-de la Garza F.; Fernández-Garza N. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation*. 17: 314 – 324, 2010.
- 20.- Matzner O.; Devor M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Neurophysio*. 72: 349-359, 1994.
- 21.- Cummins T., Dib-Hajj S., Black J., Waxman S. Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. *Prog Brain Res*. 129: 3-19, 2000.
- 22.- Van Zundert J.; Harney D.; Joosten E.; Durieux M.; Patjin J.; Prins M.; Van Kleef M. The role of the dorsal root ganglion in cervical radicular pain: diagnosis, pathophysiology, and rationale for treatment. *Reg Anesth Pain Med*. 31: 152 – 167, 2006.

- 23.- Beydoun A.; Backonja M. Mechanistic stratification of antineuralgic agents. *J Pain Symptom Manage.* 25: S18 - S30, 2003.
- 24.- Takeda M.; Tsuboi Y.; Kitagawa J.; Nakagawa K.; Iwata K.; Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain.* 7: 5, 2011.
- 25.- Woolf C. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathy pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sciences.* 74: 2605 – 2610, 2004.
- 26.- Lee S.; Zhao Y.; Ribeiro-da-Silva A.; Zhang J. Distinctive response of CNS glial cells in oro-facial pain associated with injury, infection and inflammation. *Mol Pain.* 6: 79, 2010.
- 27.- Watkins L.; Maier S. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev.* 82: 981 – 1011, 2002.
- 28.- Austin P.; Moalem G. The neuroimmune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol.* 229: 26 – 50, 2010.
- 29.- Tsuda M.; Inoue K.; Salter M. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problema from molecules in “small” glia. *Trends in Neuroscience.* 28: 101 – 107, 2005.
- 30.- McMahon S.; Cafferty W.; Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol.* 192: 444 – 462, 2005.
- 31.- Moalem G.; Tracey D. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev.* 51: 240 – 264, 2006.
- 32.- Dworkin R.; O'Connor A.; Audette J.; Baron R.; Gourlay G.; Haanpaa M.; Kent J.; Krane E.; LeBel A.; Levy R.; Mackey S.; Mayer J.; Miaskowski C.; Raja S.; Rice A.; Schmader K.; Stacey B.; Stanos S.; Treede RD.; Turk D.; Walco G.; Wells C. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literatura update. *Mayo Clin Proc.* 85: S3 - S14, 2010.

- 33.- Sioka C.; Kyritsis A. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol*. 63:761 – 767, 2009.
- 34.- Windebank A.; Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 13: 27 – 46, 2008.
- 35.- Velasco R.; Bruna J. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: an unresolved issue. *Neurología*. 25: 116 – 131, 2010.
- 36.- Park S.; Krishnan A.; Lin C.; Goldstein D.; Friedlander M.; Kiernan M. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr Med Chem*. 15: 3081 – 3094, 2008.
- 37.- Cata J.; Weng H.; Lee B.; Reuben J.; Dougherty P. Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Minerva Anesthesiol*. 72: 151 – 169, 2006.
- 38.- Balayssac D.; Ferrier J.; Descoeur J.; Ling B.; Pezet D.; Eschalier A.; Authier N. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf*. 10: 407 – 417, 2011.
- 39.- Wolf S.; Barton D.; Kottschade L.; Grothey A.; Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies. *Eur J Cancer*. 44: 1507 – 1515, 2008.
- 40.- Rowinsky E.; Eisenhauer E.; Chaudhry V.; Arbuck S.; Donehower R. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*. 20:1 – 15, 1993.
- 41.- McDonald E.; Windebank A. Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling. *Neurobiol Dis*. 9: 220 – 233, 2002.
- 42.- Pacharinsak Ch.; Beitz A. Animal models of cancer pain. *Comp Med*. 58: 220 – 233, 2008.
- 43.- Mekhail T.; Markman M. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 3: 755 – 766, 2002.
- 44.- Authier N.; Gillet J.; Fialip J.; Eschalier A.; Coudore F. Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Research*. 887: 239 – 249, 2000.

- 45.- Park S.; Krishnan A.; Lin C.; Goldstein D.; Friedlander M.; Kiernan M. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr Med Chem.* 15: 3081 – 3094, 2008.
- 46.- Rowinsky E.; Donehower R. Paclitaxel (Taxol). *N Engl J Med.* 332: 1004 – 1014, 1995.
- 47.- Cliffer K.; Siuciak J.; Carson S.; Radley H.; Park J.; Lewis D.; Zlotchenko E.; Nguyen T.; García K.; Tonra J.; Stambler N.; Cedarbaum J.; Bodine S.; Lindsay R.; DiStefano P. Physiological characterization of Taxol-induced large fiber sensory neuropathy in the rat. *Ann Neurol.* 43: 46 – 55, 1998.
- 48.- Persohn E.; Canta A.; Schoepfer S.; Traebert M.; Mueller L.; Gilardini A.; Galbiati S.; Nicolini G.; Scuteri A.; Lanzani F.; Giussani G.; Cavaletti G. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *Eur J Cancer.* 41: 1460 – 1466, 2005.
- 49.- Peters C.; Jimenez-Andrade J.; Kuskowski M.; Ghilardi J.; Mantyh P. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Brain Res.* 1168: 46 – 59, 2007.
- 50.- Peters C.; Jimenez-Andrade J.; Jonas B.; Sevcik M.; Koewler N.; Ghilardi J.; Wong G.; Mantyh P. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Exp Neurol.* 203: 42 -54, 2007.
- 51.- Nishida K.; Kuchiiwa S.; Oiso S.; Futagawa T.; Masuda S.; Takeda Y.; Yamada K. Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy. *Cancer Sci.* 99: 1618 – 1625, 2008.
- 52.- Flatters S.; Bennett G. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain.* 122: 245 – 257, 2006.

- 53.- Sisignano M, Baron R, Scholich K, Geisslinger G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. *Nat Rev Neurol.* Dec;10(12):694-707. 2014.
- 54.- Jeffrey S. Mogil. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci.*;10(4):283-94. 2009.
- 55.- Authier N1, Balayssac D, Marchand F, Ling B, Zangarelli A, Descoeur J, Coudore F, Bourinet E, Eschalié A. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics*; 6(4):620-9. 2009
- 56.- Kaley T.; Deangelis L. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Br J Haematol.* 145: 3 – 14, 2009.
- 57.- Mielke S.; Sparreboom A.; Steinberg S.; Gelderblom H.; Clemens U.; Behringer D.; Mross K. Association of paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 11: 4843 – 4850, 2005.
- 58.- Pachman D.; Barton D.; Watson J.; Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 90: 377 – 387, 2011.
- 59.- Barton D.; Wos E.; Qin R.; Mattar B.; Green N.; Lanier K.; Bearden J.; Kugler J.; Hoff K.; Reddy P.; Rowland K.; Riepl M.; Christensen B.; Loprinzi C. A double-blind, placebo-controlled trial of topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCTG trial N06CA. *Support Care Cancer.* 19: 833 – 841, 2011.
- 60.- Martínez-Salio A.; Porta-Etessam J.; Berbel-García A.; García-Morales I.; de la Peña-Mayor P.; Vicente-Fatela L. Antiepileptic drugs and neuropathic pain. *Rev Neurol.* Feb 16-28;32(4):345-50, 2001.
- 61.- Tremont-Lukats IW.; Megeff C.; Backonja MM. Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes: mechanisms of action and place in therapy. *Drugs.* Nov;60(5):1029-52, 2000.



- 62.- Cutrer FM.; Moskowitz MA. Wolff Award 1996. The actions of valproate and neurosteroids in a model of trigeminal pain. *Headache*. Nov-Dec;36(10):579-85, 1996.
- 63.- Zin CS.; Nissen LM.; Smith MT.; O'Callaghan JP.; Moore BJ. An update on the pharmacological management of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *CNS Drugs*. 22(5):417-42, 2008.
- 64.- Sartor H.; Thoden U. Anticonvulsive drugs in therapy of chronic pain--metaanalysis. *Schmerz*. Dec 12;11(6):411-7, 1997.
- 65.- Covington EC. Anticonvulsants for neuropathic pain and detoxification. *Cleve Clin J Med*. 65 Suppl 1:SI21-9; discussion SI45-7, 1998.
- 66.- Otto M.; Bach FW.; Jensen TS.; Sindrup SH. Valproic acid has no effect on pain in polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology*. Jan 27;62(2):285-8, 2004.
- 67.- Moulin DE.; Clark AJ.; Gilron I.; Ware MA.; Watson CP.; Sessle BJ.; Coderre T.; Morley-Forster PK.; Stinson J.; Boulanger A.; Peng P.; Finley GA.; Taenzer P.; Squire P.; Dion D.; Cholkan A.; Gilani A.; Gordon A.; Henry J.; Jovey R.; Lynch M.; Mailis-Gagnon A.; Panju A.; Rollman GB.; Velly A. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag*. Spring;12(1):13-21, 2007.
- 68.- Mugabure Bujedo B.; Tranque Bizueta I.; González S.; Adrián Garde R. Strategies for multimodal approach to pain and postoperative recovery. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim*. 54: 29-40, 2007.
- 69.- Nieto F.; Entrena J.; Cendán C.; Pozo E.; Vela J.; Baeyens J. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain*. 137: 520 – 531, 2008.
- 70.- Romero A.; Miranda H.; Puig M. Analysis of the opioid-opioid combinations according to the nociceptive stimulus in mice. *Pharmacol Res*. 61: 511 -518, 2010.

- 71.- Muñoz F.; Miranda H. Efecto Antinociceptivo de Atorvastatina y Rosuvastatina en Ratones en Modelo de Hot Plate. Unidad de Investigación 2010, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Laboratorio de Farmacología del Dolor.
- 72.- Miranda H.; Puig M.; Romero M.; Dursteler C.; Prieto J.; Pinardi G. Dexketoprofen-induced antinociception in animal models of acute pain: Synergy with morphine and paracetamol. *Neuropharmacology*. 52: 291-296, 2007.
- 73.- Gonzalez C.; Zegpi C.; Noriega V.; Prieto J.; Miranda H. Synergism between dexketoprofen and meloxicam in an orofacial formalin test was not modified by opioid antagonists. *Pharmacological Reports*. 63: 433 – 440, 2011.
- 74.- Dworkin R.; O'Connor A.; Backonja M.; Farrar J.; Finnerup N.; Jensen T.; Kalso E.; Loeser J.; Miaskowski C.; Nurmikko T.; Portenoy R.; Rice A.; Stacey B.; Treede R.; Turk D.; Wallace M. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*. 132: 237-251, 2007.
- 75.- Stein C.; Clark J.; Oh U.; Vasko M.; Wilcox G.; Overland A.; Vanderah T.; Spencer R. Peripheral Mechanisms of Pain and Analgesia. *Brain Res Rev*. 60: 90–113, 2009.
- 76.- Smith H.; Meek P. Pain responsiveness to opioids: central versus peripheral neuropathic pain. *J Opioid Manag*. 7(5):391-400, 2011.
- 77.- Katsuyama S.; Sato K.; Yagi T.; Kishikawa Y.; Nakamura H. Effects of repeated milnacipran and fluvoxamine treatment on mechanical allodynia in a mouse paclitaxel-induced neuropathic pain model. *Biomedical Research* 34 (2) 105-111, 2013.
- 78.- Ximenes, J. C. M.; de Oliveira Gonçalves, D.; Siqueira, R. M. P.; Neves, K. R. T., Cerqueira, G. S.; Correia, A. O., ... & de Barros Viana, G. S. Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 386(7), 575-587, 2013.

- 79.- Kochar, D. K.; Garg, P.; Bumb, R. A.; Kochar, S. K.; Mehta, R. D.; Beniwal, R., & Rawat, N. Divalproex sodium in the management of post-herpetic neuralgia: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Qjm*, 98(1), 29-34, 2004.
- 80.- Abulaban, F. S.; Dhariwal, M. A. H.; Al-Bekairi, A. M.; & Raza, M. Antinociceptive activity of sodium valproate in mice after chronic treatment. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(3), 463-467, 1997.
- 81.- Mesdjian, E.; DeFeudis, F. V.; Valli, M.; Jadot, G.; & Mandel, P. Antinociceptive action of sodium valproate in the mouse. *General Pharmacology: The Vascular System*, 14(6), 697-699, 1983.
- 82.- Chițac, L. C.; Chiriac, S. B.; Neamțu, M.; Bulea, D.; & Bild, V. Isobolographic Analysis of the Interaction of Tramadol with Anticonvulsant Drugs in Mice. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 47(2), 103-112, 2014.
- 83.- Hsu, S. K., Yeh, C. C., Lin, C. J., & Hsieh, Y. J. An open label trial of the effects and safety profile of extended-release tramadol in the management of chronic pain. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, 50(3), 101-105, 2012.
- 84.- Le Bars D.; Gozariu M.; Cadden S. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev* 53:597–652, 2001.

## ANEXOS

**N° 1 Cuadro resumen de DE<sub>50</sub>, indice de interacción y tipo de interacción.**

ISOBOLOGRAMA	TEST	DROGA	DE <sub>50</sub>	INDICE INTERACCION	INTERACCION
<b>Controles</b>	<b>Hot Plate</b>	Ac. Valproico	119,39 ± 9,25	1.14	Aditivo
		Tramadol	10,29 ± 0,39		
	<b>Tail Flick</b>	Ac. Valproico	108,59 ± 5,93	1.30	Aditivo
		Tramadol	10,34 ± 0,49		
<b>Grupo tratado 7 días</b>	<b>Hot Plate</b>	Ac. Valproico	155,12 ± 6,25	0.94	Aditivo
		Tramadol	12,45 ± 0,62		
	<b>Tail Flick</b>	Ac. Valproico	130,89±13,25	0.41	Supra aditivo
		Tramadol	15,15 ± 1,20		
<b>Grupo tratado 14 días</b>	<b>Hot Plate</b>	Ac. Valproico	136,97 ± 4,78	0.80	Aditivo
		Tramadol	13,60 ± 0,63		
	<b>Tail Flick</b>	Ac. Valproico	120,42 ± 3,77	0.48	Supra aditivo
		Tramadol	14,83 ± 1,01		