

Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado



**“Caracterización del efecto anestésico local de Neosaxitoxina
en equinos FSC (Fina sangre Carrera)”**

Gricel Ximena Riquelme Moraga

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas y
Médicas mención Ciencias Ambientales y Biomedicina

Director de Tesis Prof. Dr. Néstor Lagos W.

2014

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I, INTRODUCCIÓN	
Introducción.....	13
Sistema Musculo –esquelético.....	14
Enfermedades del sistema musculo esquelético.....	15
Principales manifestaciones de las enfermedades musculo esqueléticas.....	15
Clasificación del dolor.....	17
Identificación del dolor.....	17
Tratamientos disponibles para el dolor.....	19
Fenilbutazona.....	20
Anestésicos locales.....	21
Bupivacaína.....	22
Neosaxitoxina.....	22
CAPÍTULO II, HIPÓTESIS	
Hipótesis.....	27
CAPÍTULO III, OBJETIVOS	
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO IV, MATERIALES Y MÉTODOS	
Diseño del estudio.....	31
Población.....	31

Fármaco.....	32
Procedimiento de la infiltración local.....	32
Métodos de medición del dolor.....	35
Test de Marcha.....	36
Medición de dolor por uso de Algómetro.....	38
Procedimiento para el uso del Algómetro.....	39
CAPÍTULO V, RESULTADOS	
Ring Bone (Osteoartritis).....	41
Determinación efecto dosis dependiente.....	43
Duración del efecto analgésico de NeoSTX en lesión Ring Bone.....	43
Dosis y efecto de de NeoSTX en cuatro patologías equinas.....	46
Dosis y Efecto de analgesia de NeoSTX en Periostitis Metacarpiana en equinos Fina Sangre Carrera.....	48
Dosis y efecto de analgesia de NeoSTX en Miofibralgia en equinos Fina Sangre de Carrera.....	50
Dosis y efecto de analgesia de NeoSTX en patología Sesamoiditis en equinos Fina Sangre de Carrera.....	53
CAPÍTULO VI, DISCUSIÓN	
Discusión.....	57
CAPÍTULO VII, CONCLUSIONES	
Conclusiones.....	65
CAPÍTULO VIII, PROYECCIONES DE LA TESIS	
Proyecciones de la Tesis.....	68
CAPÍTULO IX, BIBLOGRAFIA	
Bibliografía.....	70

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Nº 1.-	Muestra los puntos de infiltración en los equinos con la patología de Miofibralgia (fotografía A, B y C).	33
Nº 2.-	Infiltración en la zona lateral de la cuartilla (izquierda) y medial (derecha), en equinos Fina Sangre de Carrera.	35
Nº 3.-	Algómetro: Instrumento Kinésico para determinar puntos de dolor, también conocido como Dolorímetro.	38
Nº 4.-	Radiografía normal de la articulación Metacarpo-falángica de un equino sano. Vista oblicua interna (A); Radiografía con Ring Bone de la articulación Metacarpo-falángica de equino corralero (Taberner) (B).	42
Nº 5.-	Gráfico dosis efecto NeoSTX, con dosis de 5 a 50 µg, con el Test de Marcha, para la patología Ring Bone en un equino corralero.	44
Nº 6.-	Gráfico de dosis efecto de NeoSTX con dosis de 50 a 190 µg, con el Test de Marcha, para a patología Ring Bone en un equino corralero.	45
Nº 7.-	Gráfico dosis efecto de NeoSTX con dosis de 200 y 600 µg en equinos de fina sangre de carrera con patologías de Desmitis del ligamento suspensor, Fractura de sesamoide, Enfermedad del navicular y Osteítis Podal.	46
Nº 8.-	Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis 200, 300 y 600 µg en equinos fina Sangre Carrera con Periostitis Metacarpiana, de acuerdo al Test de Marcha.	49
Nº 9.-	Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis de 200, 300 y 600 µg en equino Fina Sangre de Carrera con Periostitis Metacarpiana de acuerdo a Algometría.	50
Nº10.-	Gráfico de dosis efecto de NeoSTX, para dosis de 150 a 300 µg, en equinos de Fina Sangre de Carrera con la patología de Miofibralgia, de acuerdo al Test de Marcha.	51
Nº11.-	Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis 150 a 300 µg en equino Fina Sangre de Carrera en la patología de Miofibralgia de acuerdo a Algometría.	52

N°12.-	Gráfico de duración del efecto de Neosaxitoxina (300 y 600 microgramos) en la patología de Sesamoiditis (2 equinos). Efecto Medido por Test de Marcha.	54
N° 13.-	Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis 300 y 600 µg en equino Fina Sangre de Carrera con patología de Sesamoiditis, efecto medido por Algometría.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Nº1.- Tabla Demográfica de los pacientes equinos estudiados en esta Tesis	34
Nº 2.- Tabla de evaluación de los niveles de cojera en el Test de Marcha	37

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Néstor Lagos por darme la oportunidad de investigar en este interesante e innovador tema y por mostrarme un camino nuevo, de excelencia en investigación en el área clínica.

Un agradecimiento también a los colegas de la Clínica del Club Hípico que colaboraron en la investigación facilitando los equinos estudiados.

Finalmente un agradecimiento a toda mi familia, a mi mamá porque siempre creyó en mí, me levanto cuando caía y siempre me animo a seguir, a mi esposo Juan Cesar por su paciencia, ayuda, confianza, amor y por ser el cable a tierra que muchas veces necesite, mi hijo Nicolás por su comprensión y ser mi compañero incondicional de aventuras, por último a mi Valentina que me acompaña minuto a minuto de mi vida.

RESUMEN

El dolor informa al individuo acerca de un peligro real o potencial para su integridad física. Actualmente, para controlar el dolor se utilizan anestésicos locales, evitando los efectos secundarios sistémicos, provocados por los analgésicos sistémicos, como los opioides. Por esta razón, estas drogas, son consideradas cada vez más en protocolos para el tratamiento del dolor quirúrgico, traumático y post-traumático. Sin embargo, los anestésicos locales actuales tienen una duración temporal corta, máximo 6 horas, limitando su eficacia. Con la idea de desarrollar nuevos anestésicos locales, efectivos, seguros y de efecto prolongado, más de 12 horas, se estudió Neosaxitoxina uno de los compuestos perteneciente a las toxinas paralizantes análogos de Saxitoxina. Neosaxitoxina es la más potente de las toxinas paralizantes.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar al efecto como anestésico local de Neosaxitoxina en 16 equinos Fina Sangre Carrera, que fueron diagnosticados en siete patologías en sus extremidades anteriores a nivel de cuartilla. Neosaxitoxina fue inyectada localmente, midiendo en los equinos su efectividad, seguridad y duración del efecto. Adicionalmente, se controló los efectos secundarios, tales como intoxicación por Neosaxitoxina, reacción local, discapacidad motora, dolor y molestia durante la infiltración. Este trabajo se realizó como estudio exploratorio descriptivo del efecto anestésico de

Neosaxitoxina. Se realizó el seguimiento de los equinos inyectados localmente hasta por 6 meses, no observándose efectos secundarios. Como logro, se generó un anestésico de aplicación local de larga duración de acuerdo a la efectividad por el Test de Marcha y uso de Algómetro (Dolorímetro). Se obtuvo una analgesia de 504 horas a una dosis máxima de 600 microgramos. La dosis mínima que mostró efecto de analgesia local en estas patologías fue de 5 microgramos como dosis total aplicada en dos puntos en la zona de la cuartilla de la extremidad anterior afectada. El efecto anestésico se observó en el 100 % de los equinos infiltrados y su efecto fue dosis dependiente. A partir de este estudio exploratorio y pionero debería surgir una línea de investigación que se focalizará en estudiar los efectos de Neosaxitoxina en cada una de las patologías incluidos en esta Tesis, de manera de validar estos resultados en un número mayor de equinos en cada patología. Se concluye que Neosaxitoxina es un anestésico local de larga duración en equinos FSC con patologías asociadas a extremidades anteriores.

ABSTRACT

Pain is related with a real or potential danger . Currently local anaesthetics are used to pain control, avoiding systemic secondary effects as opioids. For this reason, anaesthetics are considered in protocols for treatment of surgical, traumatic and post-traumatic pain. However, local anaesthetics are not longer than 6 hours, limiting its effectiveness. In order to study new, effective, safe and long-acting anesthetics, over than 12 hours, we studied Neosaxitoxina, wich belongs to the family of paralyzing toxins analogous to Saxitoxina, with the highest potency.

The main objective of this study was to evaluate the anaesthetics effect of Neosaxitoxina, as local anesthetise in 16 thoroughbred horses diagnosed with 7 pathologies in their forelimbs at pastern level. Neosaxitoxina was injected in orden to study effectiveness, safety and action potential period . Additionally, collateral effects were evaluated: poisoning, local reaction, motor disability, pain and discomfort during infiltration. This work has been performed as a descriptive exploratory study of the local anaesthetic effect Neosaxitoxin.

No collateral effects were observed in the injected equines followed during 6 months. The mail results of this study was related with the development pf action period, of local administration, , with long according to the run test and the use of algometer (dolorimeter). The analgesia observed was of 504 hours with a highest dose of 600 micrograms. . The minumun dose with positive effect

was 5 micrograms, infiltrated in two trigger points in the painful anterior extremity.

The anaesthetic effect was observed in 100% of the infiltrated equines and its effect was dose dependent. This exploratory and pioneer study should promote new research, so to study the effect of Neosaxitoxina in each pathologies tested in this work, in order to validate these results with a higher number of horses by pathology. We conclude that Neosaxitoxina is a local anaesthetic with long lasting effects in equines with several forelimbs pathologies.

Capítulo I

Introducción

INTRODUCCION

Independiente de la especie, existen diferencias en la percepción de dolor en todos los animales. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), define el dolor en humanos como “Una experiencia sensorial y emocional no placentera, asociado a un daño tisular actual”. Por otro lado, Zimmermann en 1986, adaptó la definición anterior para que pudiese ser aplicada en los animales. Es así, que el dolor en los animales se define como “una experiencia sensorial aversiva, que provoca acciones motoras protectoras, resultando en un evitar aprendido, y que puede modificar rasgos especie-específicos de conducta, incluyendo el comportamiento social”.

Los animales, y particularmente los equinos, tienen el mismo equipamiento neural para detectar un daño y procesar la información en el SNC que los humanos y se comportan de manera semejante a estos en situaciones que, para los humanos son dolorosas (Batenson, 2004).

La IASP señala que, la incapacidad de comunicarse verbalmente, no niega la posibilidad que un individuo esté experimentando dolor y que necesite de un adecuado tratamiento analgésico.

Sistema Musculo –esquelético.

El diseño del esqueleto equino consiste en un perfeccionamiento del patrón mamífero básico. El equino es un animal ungulado, un miembro del orden de los Perisodáctilos. Los ungulados de dedos extraños, tales como caprinos, bovinos, se paran sobre el casco del tercer dedo. Las principales masas musculares de las extremidades se posicionan en dirección proximal para reducir la energía requerida para moverlas, cuando se balancean hacia adelante y atrás en la locomoción rápida. Las fuerzas musculares se transfieren a los huesos distales a través de las articulaciones, por medio de los tendones largos (Kenneth y col, 2007).

La masa ósea se reduce en las extremidades distales, y los márgenes de seguridad disminuyen hacia las terminales distales de los miembros. En los últimos años, se han asociado este factor con la incidencia de fracturas en los caballos de carrera, la cual es más elevada en los huesos distales que en los proximales (Currey, 2001).

La capacidad para seleccionar y entrenar a los atletas equinos de elite debe ser el resultado de un entendimiento sólido de diversos aspectos de la patobiología equina, desde el nivel celular y molecular hasta el correspondiente al animal como una entidad total. Uno de los sistemas de mayor importancia, relacionado con el rendimiento locomotor, es el musculo-esquelético. La principal estructura de soporte óseo (Kenneth y col, 2007).

Enfermedades del sistema musculo esquelético

Las enfermedades de los órganos de sostén como músculos, huesos y articulaciones, tienen en común, en el sentido de que las principales manifestaciones clínicas de estas enfermedades como son: cojera, dificultad para sostenerse, insuficiencia en la coordinación de los movimientos y deformidad.

Son varias las clasificaciones que se utilizan para las enfermedades del sistema musculo-esquelético, basadas en las diferencias clínicas, anatomo-patológicas y etiológicas, aunque la más precisa es la que divide las enfermedades en dos tipos: degenerativas e inflamatorias. (Radostits y col, 2002).

- Las enfermedades degenerativas de músculos, huesos y articulaciones se denominan miopatías, osteodistrofias y artropatías.
- Las enfermedades inflamatorias se denominan, osteomielitis y artritis.

Principales manifestaciones de las enfermedades musculo esqueléticas

Cojera

La cojera consiste en una marcha anormal, caracterizada por la incapacidad para soportar la carga completa sobre una pata, habitualmente asociada a dolor del sistema musculo-esquelético (Radostits y col., 2002).

Debilidad

Es la incapacidad para mantener una postura, acompañada de una marcha anormal, habitualmente debido a una lesión del músculo o a debilidad generalizada por un estado general, como shock, hipocalcemia o ayuno (Radostits y col, 2002).

Aspectos dolorosos de la cojera

El dolor articular es un componente importante del entrenamiento de todo atleta equino, ya que la claudicación es la mayor causa de morbilidad en estos animales (Kenneth y col , 2007; Merry, 1991).

Hay varios aspectos importantes sobre el alivio del dolor en los animales. El costo ha sido siempre un freno para el empleo de anestésicos locales y analgésicos, los entrenadores, preparadores, jinetes y la actitud apoyadora de los Veterinarios, el control del dolor en los caballos de competición se ha transformado en una preocupación prioritaria, pues esta se refleja directamente en el rendimiento de cada individuo en competencia. Por esto, resulta más evidente la necesidad de desarrollar fármacos y procedimientos que controlen y alivien el dolor permitiendo una mejor calidad de vida en los equinos altamente competitivos. El tratamiento de la lesión causante es una prioridad máxima, aunque la lesión puede ser dolorosa durante períodos variables de tiempo (Merry y col 1991).

Clasificación del dolor

El dolor se clasifica principalmente según su localización anatómica, en superficial (piel), profundo (músculo, tendones, articulaciones, periostio y ligamentos) y según su duración, agudos o crónicos (Anil y col, 2002).

Tanto el dolor superficial como el profundo (llamados en su conjunto dolor somático) son bien localizados, circunscritos a la zona dañada, y no suelen acompañarse de reacciones vegetativas (náuseas, vómitos, sudoración profusa) (Otero, 2006).

El dolor agudo o fisiológico es auto limitado, desapareciendo con la lesión que lo originó. Tiene una función de protección biológica al actuar como una señal de alarma del tejido lesionado y responde al tratamiento analgésico (Anil y col, 2002).

Por otro lado, el dolor crónico puede no tener una causa determinada, no posee una función protectora y más que un síntoma de enfermedad, es en sí mismo una enfermedad (Otero, 2006). No es un proceso auto limitado, pudiendo persistir por tiempo prolongado después de la lesión inicial, incluso en ausencia de lesión periférica y es refractario a múltiples tratamientos analgésicos (Short, 1998).

Identificación del dolor

En contraste con los pacientes humanos, quienes pueden describir el dolor que están sintiendo, los animales comunican su percepción del dolor,

predominantemente, por patrones conductuales y cambios fisiológicos medibles, tales como la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura, medición de cortisol plasmático y glucosa sanguínea, producidos por la actividad de los sistemas simpático - adrenomedular e hipotalámico-hipofisiario – adrenocortical (Short, 1998; Anil y col, 2002).

Estas variables sin embargo, no reflejan necesariamente que el animal este experimentando dolor, ya que son comunes, a otros factores, tales como estrés, ansiedad, sexo, estado fisiológico, ejercicio y temperamento (Anil y col, 2002; Taylor y col, 2002; Pritchett y col, 2003). Por ello, es importante en el diagnóstico de dolor en los animales, considerar la especie, raza, y diferencias individuales, en su respuesta a un daño, así como el estado de salud y edad de los equinos (Short, 1998; Bufalari y col, 2007).

En el caso de los equinos, la conducta en respuesta al dolor puede llegar a ser extremadamente anormal, una intranquilidad generalizada y un movimiento constante, en el cual el caballo avanza hacia delante un par de pasos, se detiene, mueve la cola y baja (posiblemente también agita) la cabeza, seguido de un par de pasos más. Este comportamiento puede ser visto en casos de inicio repentino de dolor intermitente (Dobromylskyj y col, 2000).

El dolor persistente o crónico, eventualmente lleva a que el caballo aparezca deprimido, de pie con la cabeza baja, evitando a otros caballos o parado en un rincón de la pesebrera. El estado mental se encuentra alterado, el animal no

está alerta al medio disminuyendo el interés por el alimento o agua y puede pasar largos períodos echado (Dobromylskyj y col, 2000).

Tratamientos disponibles para el dolor

Dado los múltiples mecanismos y procesos neuroquímicos involucrados en la generación y agravación (sensibilización periférica y central) de la experiencia dolorosa, es razonable asumir que la administración de una única dosis de un solo analgésico con un solo mecanismo de acción, no producirá un efecto analgésico adecuado y de largo plazo, luego de un evento traumático (Lemke y Han, 1997; Livingston, 2006).

La analgesia multimodal consiste, en el uso de varios fármacos con diferentes mecanismos de acción, que interfieren con la transmisión, modulación y percepción del dolor, actuando sinérgicamente. La principal ventaja de la analgesia multimodal es la reducción de las dosis de los fármacos utilizados, disminuyendo la ocurrencia de efectos secundarios. En teoría, los diferentes mecanismos de acción de los fármacos utilizados, aseguran un control más efectivo del dolor a diferentes niveles (Corletto, 2007).

En un estudio realizado por Bussieres y col, en el 2007, se llegó a la conclusión que el protocolo analgésico más eficiente fue el preventivo y multimodal. En Medicina Veterinaria, el método más común para realizar este tipo de analgesia incluye antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Corletto, 2007).

Fenilbutazona

La inflamación es un componente importante de la lesión y del dolor, por esto, los AINEs son usados comúnmente como parte de una técnica analgésica balanceada, debido a sus acciones inhibitorias sobre las enzimas ciclooxigenasas (COX), necesarias para la producción de prostaglandinas durante la respuesta inflamatoria. Se reconocen al menos 3 tipos de enzimas COX: COX-1 involucrada en funciones de homeostasis de la mucosa gástrica, perfusión renal y función plaquetaria, COX-2 presente en eventos inflamatorios, aunque también tiene un rol importante en la perfusión renal y reparación gastrointestinal (Valverde y Gunkel 2005), y COX-3 (derivado de la COX-1) que parece estar involucrada en el control del dolor y la fiebre a nivel cerebral (Pradilla 2004; Blikslager y Jones 2005).

Prügner y col (1991), reportaron una significativa disminución en las conductas dolorosas, durante un período de 5 días, en caballos que recibieron un AINE (eltenaco) en vez de placebo luego de una castración. Probablemente, uno de los AINEs utilizados con mayor frecuencia en medicina equina es fenilbutazona, la cual actúa inhibiendo de manera no selectiva las enzimas COX. El efecto analgésico de fenilbutazona en el dolor postquirúrgico o traumático en caballos, es comparable al de otros AINEs como flunixin y carprofeno, según el trabajo publicado por Johnson y col (1993).

Pese a lo anteriormente mencionado, los AINEs pueden generar una serie de reacciones adversas, relacionadas principalmente con la inhibición de la COX-1,

tales como úlceras gastrointestinales, colitis, nefropatías, hemorragias y tromboflebitis. Además, la administración de fenilbutazona en grandes cantidades, atraviesa la barrera placentaria y puede penetrar la circulación fetal (Lizárraga y Sumano 1998, Moses y Bertone 2002).

Debido a lo anteriormente mencionado, no se recomienda el uso de fenilbutazona por períodos prolongados de tiempo, ni tampoco se debe exceder la dosis de 8 mg/kg/día (Lizárraga y Sumano 1998).

Anestésicos locales

La anestesia regional es una ayuda valiosa en la práctica de la medicina en los equinos para identificar los sitios algésicos y el origen de la claudicación. Por lo general, la anestesia se realiza con la infiltración local de un anestésico para bloquear en forma temporaria la conducción aferente de un nervio específico o por medio de la instilación intrasinovial de un agente que bloquee el dolor articular, bursal o tendovaginal (Colahan y col 1998).

El anestésico local utilizado con mayor frecuencia en Medicina Veterinaria es Bupivacaina (Colahan y col 1998).

La toxicidad de estos anestésicos locales se expresa de modo fundamental a nivel de SNC, y son responsables de diferentes manifestaciones que van desde una ligera depresión y somnolencia, hasta episodios convulsivos de diversa intensidad y duración (Otero, 2006).

Bupivacaína

La bupivacaína posee un pKa de 8,1 y se une en más de un 80% a las proteínas plasmáticas. Su periodo de latencia es prolongado, alrededor de 20 minutos, y tiene un periodo de acción que puede extenderse hasta las 6 horas para el bloqueo motor y hasta 10 horas para el bloqueo sensitivo cuando se emplea al 0,5% (Wallace, 1999, Otero, 2006).

La toxicidad de la bupivacaína se expresa en especial sobre el aparato cardiovascular (Otero, 2006).

La bupivacaína se une estrechamente a los tejidos y esto depende la duración del bloqueo nervioso. La adición de vasoconstrictores prolonga hasta un 50% la duración de los bloqueos plexuales y solo un 10-15% en los bloqueos centrales (epidural). Al igual que el resto de los compuestos amidicos es metabolizada en el hígado. Se emplea en diferentes concentraciones para promover bloqueos nerviosos centrales y periféricos (Otero, 2006, Lees y Higgins , 1985).

Neosaxitoxina

Los anestésicos locales alivian el dolor, evitando los efectos secundarios sistémicos, provocados por los analgésicos y algunos opiodes. Esto hace que este tipo de drogas sean consideradas en protocolos para el tratamiento del dolor quirúrgico . Sin embargo, los anestésicos locales actuales, tienen una duración corta, el de mayor duración de acuerdo al laboratorio farmacéutico que lo produce y comercializa indica 6 horas, aunque la experiencia clínica indica

que solo dura 4 horas. Esta corta duración limita su uso, pues obliga a inyecciones repetitivas con alta frecuencia para obtener una analgesia prolongada. Esto demuestra la necesidad de generar nuevos anestésicos locales pero de efecto prolongado, idealmente que duren más de 24 horas (Rodríguez-Navarro y col, 2007, 2009).

Con este objetivo, se han realizado varios estudios clínicos en Fase II con toxinas del Veneno Paralizante de Marisco que cumplan con este requerimiento.

NeoSTX , es una tetrahidropurina termoestable, que bloquea selectivamente, y con alta afinidad los Canales de Sodio sensibles a voltaje (Hall y col., 1990), presenta un bajo peso molecular (316 Dalton), es hidrofílica y se encuentra cargada positivamente (carga neta +2) a pH fisiológico (Lagos, 1998). Estudios in vivo (Kohane y col., 1998) e in vitro (Strichartz ,1984), la clasifican como la más potente de las toxinas que actúan en el sitio 1. La NeoSTX interactúa reversiblemente con los Nav formando puentes de hidrógeno y de interacción electrostática reversible entre el grupo guanidinium de NeoSTX y el sitio 1 (Strichartz, 1984) ubicado en lado externo de la membrana neuronal y a nivel extracelular, bloqueando de esa forma el poro del canal sin afectar las propiedades de apertura (Cestèle y Catterall, 2000). Se ha demostrado que NeoSTX, administrado por vía subcutánea tiene un efecto anestésico local prolongado, llegando a 24 hrs de duración (Rodríguez-Navarro y col., 2007).

Por otro, lado NeoSTX no presenta cardiotoxicidad (Guo y col., 1987), lo que la potencia como una alternativa más segura.

La capacidad de las Toxinas Paralizantes para inducir relajación muscular en modelos humanos ya ha sido demostrada. En una primera instancia se realizó la inyección local en el esfínter anal de 10 voluntarios sanos demostrándose, a través de manometría ano-rectal y electromiografía, una disminución de la amplitud de la actividad muscular y una caída de la presión de contracción voluntaria máxima del esfínter de 50% a los dos minutos de haber sido inyectada (Garrido y col., 2005). En este estudio, se corroboraron los resultados del perfil farmacocinético de la toxina; comprobándose que no se detecta toxina en las muestras de sangre y orina de los sujetos inyectados localmente a las 4 horas de infiltración. El análisis fue realizado a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en muestras de sangre y orina de los voluntarios sanos (Garrido y col., 2004).

Otros derivados de las Toxinas Paralizantes, de la misma familia que forma parte la NeoSTX, el epímero GTX2/GTX3, se han utilizado como relajante muscular y anestésico local en el esfínter anal de pacientes con fisuras anales agudas y crónicas, con excelentes resultados (Garrido y col., 2005, 2007). El epímero GTX2/GTX3 genera la relajación inmediata del esfínter anal interno y con eso termina la isquemia de los esfínteres hipertónicos, iniciando la epitelización del tejido, la cicatrización de la herida y por último la curación de la patología, sin observarse reacciones adversas a la toxina o efectos secundarios

no deseables (Garrido y col., 2005; Garrido y col., 2007). Por esta razón, que estas Toxinas Paralizantes se perfilan como una alternativa terapéutica, tanto en términos de efectividad como de seguridad en múltiples patologías asociadas a hipertonia muscular y dolor en humano (Garrido y col., 2004, 2005, 2007; Lattes y col., 2009; Rodríguez-Navarro y col., 2007, 2009).

En esta Tesis se realizó un estudio en equinos de Fina Sangre con el objetivo general de evaluar el efecto anestésico local de NeoSTX en un estudio exploratorio descriptivo en el control del dolor, tanto agudo como crónico en equinos con exigencia deportiva. Adicionalmente, se evaluó el poder generar un analgésico de aplicación local, de duración prolongada, por más de 12 horas, como ya se determinó en estudios clínicos en humanos (Rodríguez-Navarro y col, 2009).

Capítulo II

Hipótesis

HIPOTESIS

La aplicación local de Neosaxitoxina, inhibe la sensación de dolor en patologías asociadas a las extremidades anteriores en equinos FSC (Fina Sangre Carrera), evitando así la cojera, el síntoma visible.

Capítulo III

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto anestésico local de Neosaxitoxina, en un estudio exploratorio descriptivo, en control del dolor tanto agudo como crónico, en equinos con exigencia deportiva.

Objetivos específicos

- Medir la duración del efecto anestésico de Neosaxitoxina en equinos con patologías asociada a cojera de las extremidades anteriores.
- Determinar la dosis mínima de Neosaxitoxina, como anestésico local en los equinos con el síntoma de cojera.
- Determinar la dosis máxima de Neosaxitoxina, como anestésico local en los equinos sin producir efectos secundarios indeseables e intoxicación detectable.
- Lograr un anestésico local efectivo, seguro y de efecto prolongado, mayor de 12 horas.

Capítulo IV

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

Diseño del estudio

En esta Tesis se realizó un estudio en equinos de Fina Sangre con el objetivo general de evaluar el efecto anestésico local de NeoSTX en un estudio exploratorio descriptivo en el control del dolor, tanto agudo como crónico en equinos con exigencia deportiva. Adicionalmente, se evaluó el poder generar un analgésico de aplicación local, de duración prolongada, por más de 12 horas, como ya se determinó en estudios clínicos en humanos

Población

Se utilizó una población de 16 equinos machos, de raza FSC; cuya característica en común es cojera de tipo crónica o aguda en sus extremidades anteriores (Tabla 1). Los criterios de exclusión incluyeron: equinos con edad menor de 3 años y hembras preñadas. Como criterio fundamental de inclusión se eligió equinos mayores de 3 años que presentaban cojera. Todos los equinos que se describen en esta Tesis son provenientes del Club Hípico de Chile.

Fármaco

Neosaxitoxina como principio activo en la cantidad requerida en microgramos, en suero fisiológico salino a pH 7,0 e iso-osmótica, en un volumen de 1 ml.

Procedimiento de la infiltración local.

Se utilizaron Jeringas de 5 ml con agujas 25G. La superficie a inyectar se limpió a favor del sentido del pelaje con alcohol y solución yodada. Se aplicó una dosis local de 5 ml total, esta se distribuyó en dos infiltraciones de 2, 5 ml en la zona anatómica de la cuartilla en la extremidad que presentaba la cojera. La dosis de Neosaxitoxina se presenta en ampollas de 1 ml, la cual es diluida en los volúmenes necesarios de solución fisiológica salina de acuerdo al número de puntos a infiltrar (Figura 2).

Esta metodología se aplicó para equinos con patologías tipo Desmitis, fractura de Sesamoideo, Enfermedad del Navicular y Osteítis Podal.

Para Miofibralgía la dosis se infiltró en la escápula (Figura 1A y 1B), inyectándose la mitad de la dosis en el músculo supra espinoso (Figura 1C, puntos verdes) y la otra mitad en el músculo infra espinoso (Figura 1C, puntos azules). La infiltración también incluyó la aplicación en el lomo en el músculo largo dorsal. Las dosis aplicadas van desde 160 a 300 microgramos.

Figura 1.- Muestra los puntos de infiltración en los equinos con la patología de Miofibralgia (fotografía A, B y C).

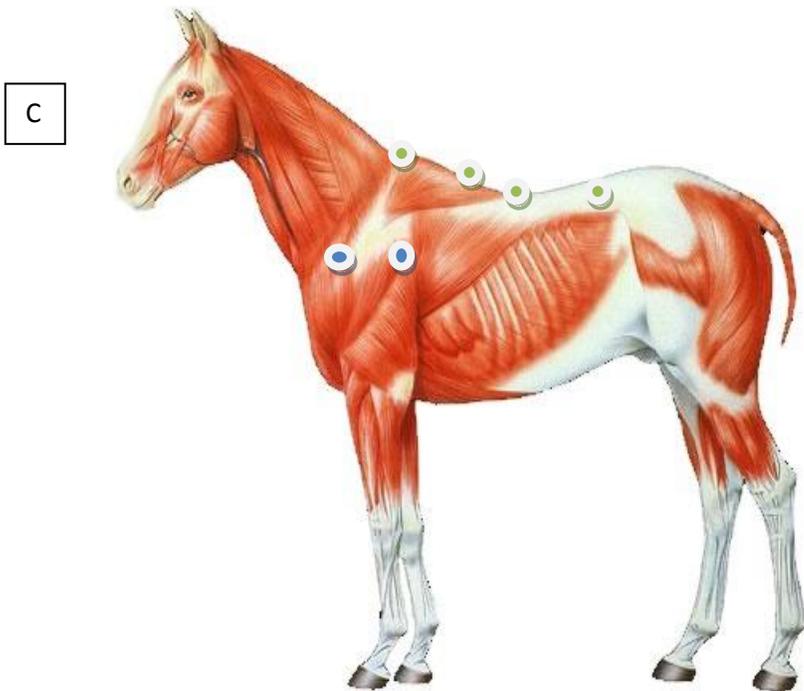
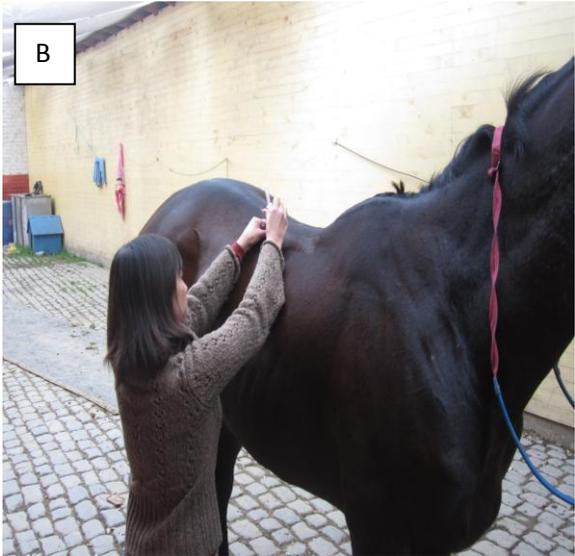


Tabla 1.- Tabla Demográfica de los pacientes equinos estudiados

Nombre equino ó (ID)	Edad (años)	Patología
1	3	Cañera
2	5	Cañera
3	5	Cañera
4	4	Miofibralgia
5	4	Miofibralgia
6	4	Miofibralgia
7	5	Miofibralgia
8	8	Miofibralgia
9	3	Sesamoiditis
10	4,5	Sesamoiditis
11	5	Desmitis del ligamento suspensorio
12	4	Fractura del sesamoideo
13	5	Enfermedad del navicular
14	5,5	Osteítis Podal
Tabernero	5	Ring bone
16	3	Equino control

Figura 2.- Infiltración en la zona lateral de la cuartilla (izquierda) y medial (derecha), en equinos Fina Sangre de Carrera.



Métodos de medición del dolor

El estudio se llevó a cabo durante el año 2012, en las dependencias del Club Hípico de Chile. Se incluyeron 16 equinos en el estudio de esta Tesis, los cuales fueron evaluados con los Test de Marcha y con Algometría (Fischer 1998), cumpliéndose con los criterios de inclusión descritos anteriormente. Es importante destacar que el efecto de Neosaxitoxina, como anestésico local ya estaba probado en estudios clínicos humanos demostrándose que es efectiva en 100 % de los pacientes infiltrados, y que su efecto es medible y su aplicación segura, pues no produce efectos indeseable o secundarios de ningún tipo (Rodríguez-Navarro y col., 2005, 2007, 2009).

Test de Marcha

El Test de Marcha nos da una visión subjetiva de la cojera que es una anomalía de la locomoción producida por el dolor, pérdida del control neuromuscular o factores mecánicos restrictivos. El Test de Marcha, incluye una tabla de evaluación de la cojera que va desde el valor Cero (sin cojera) hasta un valor máximo de 5, evaluación máxima que corresponde a la situación cuando el equino No puede apoyar una de sus extremidades. Esta evaluación la dan los observadores de este Test (Tabla 2) (Kenneth y col, 2007)

El test comienza, sacando el equino de su corral en frío (sin ejercicio previo) para hacerlo caminar (Marcha) en línea recta de ida y regreso aproximadamente 20 metros. Luego se repite el ejercicio, pero esta vez con un trote suave donde el Médico Veterinario observará y asignará finalmente la valoración numérica a la cojera dentro de la escala de Test de Marcha.

Tabla 2.- Evaluación de los niveles de cojera en el Test de Marcha.

Parámetro	Signo	Valoración
Cojera	Cojera imperceptible	0
	Cojera Sutil: Difícil de detectar e inaparente en determinadas ocasiones (llevando peso, caminando en círculo o a paso firme)	1
	Cojera leve: Difícil de detectar en el paseo o al trote en línea recta pero aparente en ciertas ocasiones (llevando peso, caminando en círculo, en superficie firme y en pendiente)	2
	Cojera moderada: Aparente durante el trote en todas las ocasiones	3
	Cojera marcada: Ladeo de cabeza, paseo a “tirones”, con pasos cortos, balanceo de pelvis y cabeza	4
	Cojera evidente: Con supresión de apoyo total o parcial durante la marcha o en reposo, extremidad inmóvil.	5

Medición de dolor por uso de Algómetro

Con la idea de objetivar la medición de dolor, además del Test de Marcha, se utilizó un Algómetro de presión, también denominado Dolorímetro (Figura 3). Este es un instrumento de medición específicamente kinésico en humanos, con una superficie circular que transfiere la fuerza de presión a los tejidos profundos. Permite cuantificar la variable de dolor, midiendo el umbral de presión, que es la presión mínima que el sujeto percibe como dolorosa cuando se aplica en forma gradual y creciente (Fischer 1998). Su unidad de medición es Kg/cm^2 y cuantifica la presión mínima necesaria para estimular los nociceptores. Básicamente, determina las modificaciones que pueda sufrir el umbral del dolor posterior a la maniobra terapéutica o placebo. Especialmente indicando el punto gatillo o “tigger points”, por eso es muy empleado por profesionales con orientación hacia las terapias kinésicas.

Figura 3.- Algómetro: Instrumento Kinésico para determinar puntos de dolor, también conocido como Dolorímetro.



Procedimiento para el uso del Algómetro

El procedimiento con Algómetro implica ejercer presión directa sobre la zona a evaluar, obteniéndose una marca en el instrumento que se relaciona con la presión ejercida. Se considera como respuesta positiva al dolor cuando el equino levanta la extremidad. Se entrena a los caballos a dar una respuesta positiva asociada al dolor, para evitar una respuesta refleja a la presión. Esto se logra después de varias presiones basales mínimas, donde el caballo deja de responder, medición que corresponde a la medición basal. El valor basal, se mide en la extremidad no lesionada que nos sirve de control de la extremidad lesionada.

Ahora en la extremidad lesionada, se infiltra la Neosaxitoxina en la zona de la cuartilla (Figura 2). Se espera 5 minutos y se aplica el Algómetro en la zona afectada, presionando el instrumento hasta lograr la reacción del equino, que se muestra por un levantamiento de la extremidad afectada.

Capítulo V

Resultados

RESULTADOS

Ring Bone (Osteoarthritis)

Con el objetivo de determinar el efecto analgésico y la relación de efecto dosis dependiente, se utilizó un equino corralero denominado “Tabernerero”, que presentaba una lesión crónica conocida como “Ring Bone” (Osteoarthritis). Esta patología se manifiesta, por lesiones repetidas y daño en una articulación, cuando el equino dañado se sigue entrenado y usando en forma continua sin tratar la patología y dando el reposo correspondiente.

El entrenamiento y competición provocan daño en los tejidos que rodean a la articulación (membrana sinovial y cápsula fibrosa), generando un daño irreversible y hasta ahora irreparable. Las lesiones implican una enfermedad articular degenerativa, con proliferación de hueso nuevo periarticular que da el aspecto de un anillo “Ring Bone”, con el tiempo causa anquilosis. La enfermedad es auto limitante, concluyendo con anquilosis de la extremidad afectada.

La Figura 4, muestra dos radiografías, la Imagen A, que corresponde a una extremidad normal sana y la Imagen B que muestra la Radiografía de Tabernerero de su extremidad lesionada. Como se puede observar, la Imagen B muestra el daño del Ring Bone sufrido por Tabernerero y en esta vista oblicua interna, claramente se observa la proliferación del hueso en la superficie dorsal

de la articulación de la primera y segunda falange, exhibiendo la extensión del daño que rodea la articulación la cual tiene una forma de “anillo”, de ahí su nombre.

Figura 4.- Radiografía normal de la articulación Metacarpo-falángica de un equino sano. Vista oblicua interna (A); Radiografía con Ring Bone de la articulación Metacarpo-falángica de equino corralero (Tabernero) (B).



Determinación efecto dosis dependiente de NeoSTX en lesión Ring Bone

Debida a la evidente cojera del equino Tabernero, se utilizó a este paciente para determinar el efecto dosis-dependiente de NeoSTX local y subcutáneamente, en la zona de la cuartilla de la extremidad anterior afectada (Figura 4B). Para su evaluación, solo se utilizó el Test de Marcha, dado que en esta etapa del estudio aun no se incorporaba las mediciones con Algómetro.

Duración del efecto analgésico de NeoSTX en lesión Ring Bone

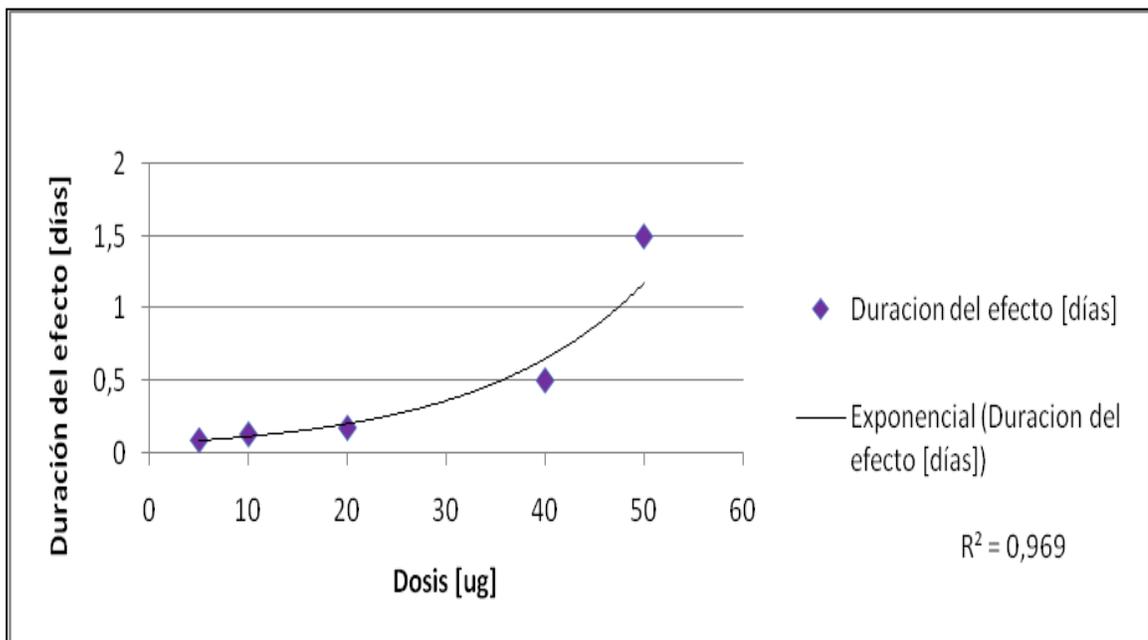
La duración del efecto se estudió en dos rangos de dosis. Desde los 5 a 50 microgramos (Figura 5 dosis bajas) y de 50 a 190 microgramos (Figura 6 dosis altas).

La Figura 5 muestra el efecto medido en horas, indicando las horas que el equino estuvo sin cojear versus la dosis en microgramos de NeoSTX infiltrada. Las concentraciones de las dosis de Neosaxitoxina utilizadas van desde 5 a 50 microgramos en este experimento. Como se observa en esta Figura, a medida que aumenta la dosis aumenta también la duración del efecto.

En este experimento se pudo notar que la dosis mínima que producía efecto en Tabernero, fue de 5 microgramos, efecto de protección que no se observó con dosis de 3 y 1 microgramos, no produciendo efecto en la claudicación (cojera) de Tabernero. Por esta razón, se consideró 5 microgramos como la dosis mínima de NeoSTX para evitar la cojera en esta patología, logrando un

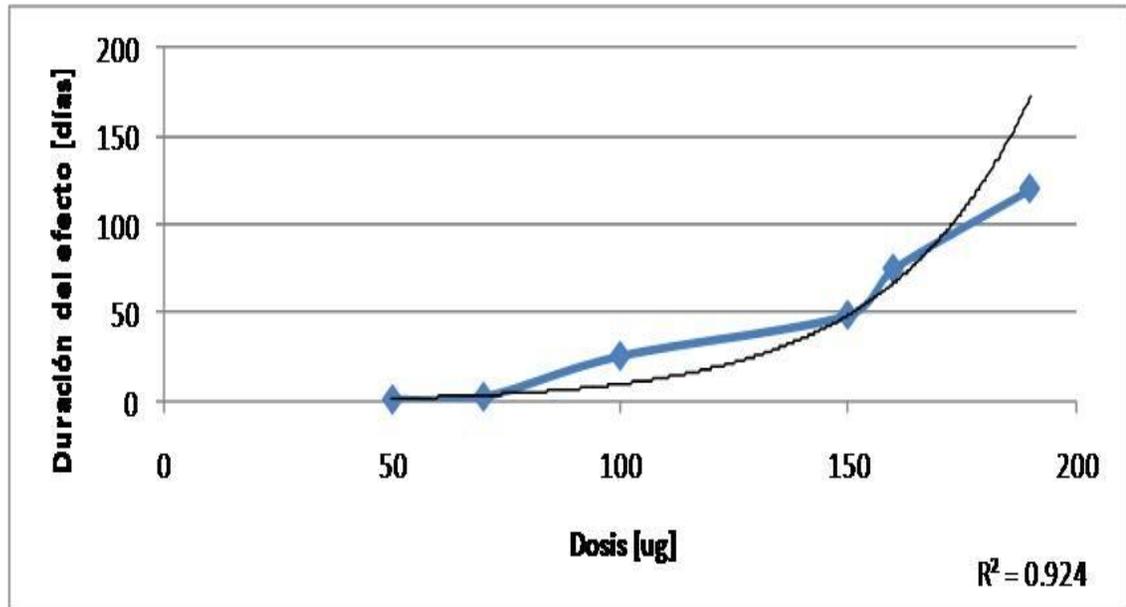
efecto de 4 horas. Test de Marcha utilizado, se determinó por 3 observadores, dos de ellos Veterinarios. Por lo tanto, se consideró que la dosis mínima donde se pudo objetivamente determinar que mejoraba la marcha era de 5 microgramos, cumpliéndose con el segundo objetivo específico de esta Tesis.

Figura 5.- Gráfico dosis efecto NeoSTX, con dosis de 5 a 50 µg, con el Test de Marcha, para la patología Ring Bone en un equino corralero.



Debido a que el efecto después de infiltrar con 50 microgramos de NeoSTX seguía incrementando, se continuó aumentando la dosis hasta llegar a 190 microgramos. Es importante recordar que hasta antes de este estudio no existía antecedente alguno de inyección de NeoSTX en equinos.

Figura 6.- Gráfico de dosis efecto de NeoSTX con dosis de 50 a 190 µg, con el Test de Marcha, para a patología Ring Bone en un equino corralero.



La Figura 6 muestra el efecto de la dosis en control de la cojera (Test de Marcha), en el equino con patología Ring Bone. Se observó una relación dosis efecto, aún cuando no es una relación lineal; con un máximo efecto con una dosis igual a 190 µg. Los datos se ajustan a una curva exponencial.

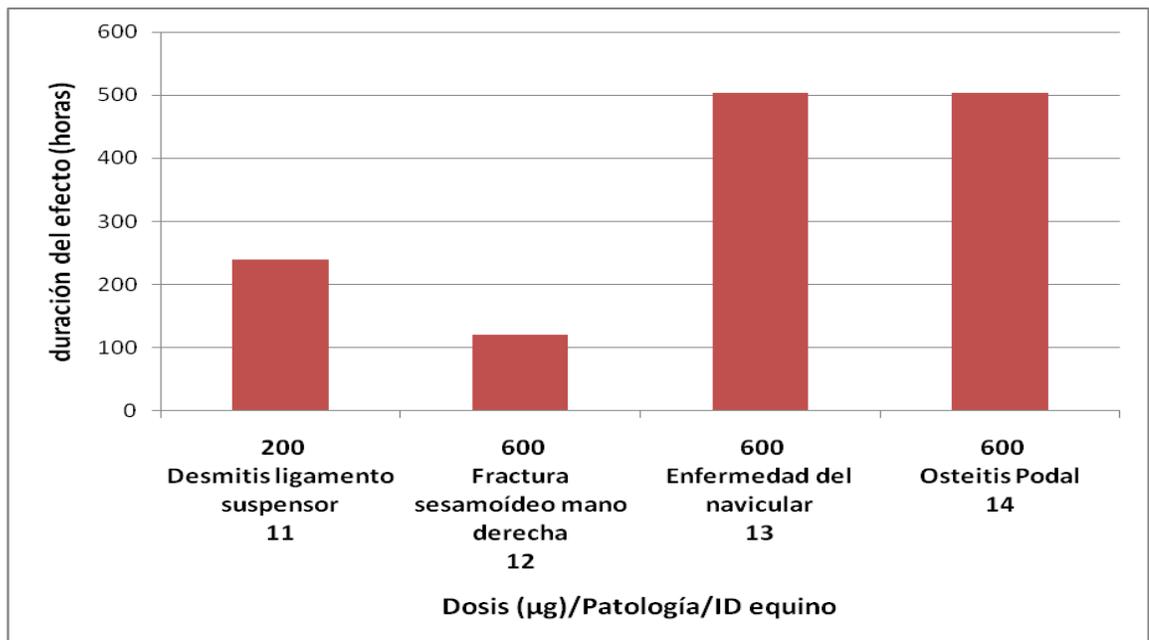
Con la dosis de 190 microgramos se logró un efecto máximo de 120 días. Como se propuso inicialmente en el proyecto de esta Tesis, lo ideal que se buscaba era lograr un efecto de duración de más 12 horas. El máximo efecto (120 días) se logró con una dosis de 190 microgramos.

Dosis y efecto de de NeoSTX en cuatro patologías equinas

La Figura 7, se muestra el efecto de NeoSTX a dos dosis de 200 y 600 microgramos en 4 equinos que padecían 4 patologías distintas todas asociadas a cojera de las extremidades anteriores.

Los 4 equinos fuero infiltrados igual y como se muestra en la Figura N°1. Las patologías son: Desmitis del Ligamento Suspensor, Fractura de Sesamoide, Enfermedad del Navicular y Osteítis Podal.

Figura 7.- Gráfico dosis efecto de NeoSTX con dosis de 200 y 600 µg en equinos de fina sangre de carrera con patologías de Desmitis del ligamento suspensor, Fractura de sesamoide, Enfermedad del navicular y Osteítis Podal.



En cada caso, la dosis total fue aplicada en dos puntos, siendo entonces la dosis aplicada por punto el 50 % de 200 y 600, respectivamente. En los equinos donde se aplicó la dosis de 600 microgramos no se observó ningún efecto indeseable o secundario, tales como incoordinación a la marcha, cólico estomacal, reacción anafiláctica, irritación en la zona, aumento de frecuencia respiratoria y cardíaca, y sialorrea. Es importante destacar que 600 microgramos se transformaron en la dosis máxima infiltrada en un equino en esta Tesis.

Al equino 11, con dolor en el ligamento suspensor (Desmitis) se le aplicó 200 microgramos y su efecto duró 240 horas, determinada por el Test de Marcha. A los tres días de la inyección este caballo compitió en el Hipódromo Chile sin problemas, llegando sin ningún tipo de cojera a la meta. Aun así, el efecto duró 7 días más, logrando un total de 10 días sin cojera.

Al equino 12, con una fractura de sesamoideo, se le inyectó los 600 µg en dos puntos (300 µg cada uno); obteniendo una duración de analgesia de 120 horas. Este paciente se utilizó como el primero en inyectarle la dosis máxima realizada en esta Tesis, debido fundamentalmente a la gravedad de su lesión, una fractura ósea la cual no había sido tratada quirúrgicamente. Aun así, se logró una analgesia de 120 horas.

Este efecto fue el menor observado, de los tres equinos inyectados con 600 µg. Este efecto menor, probablemente se debe a la severidad de su fractura.

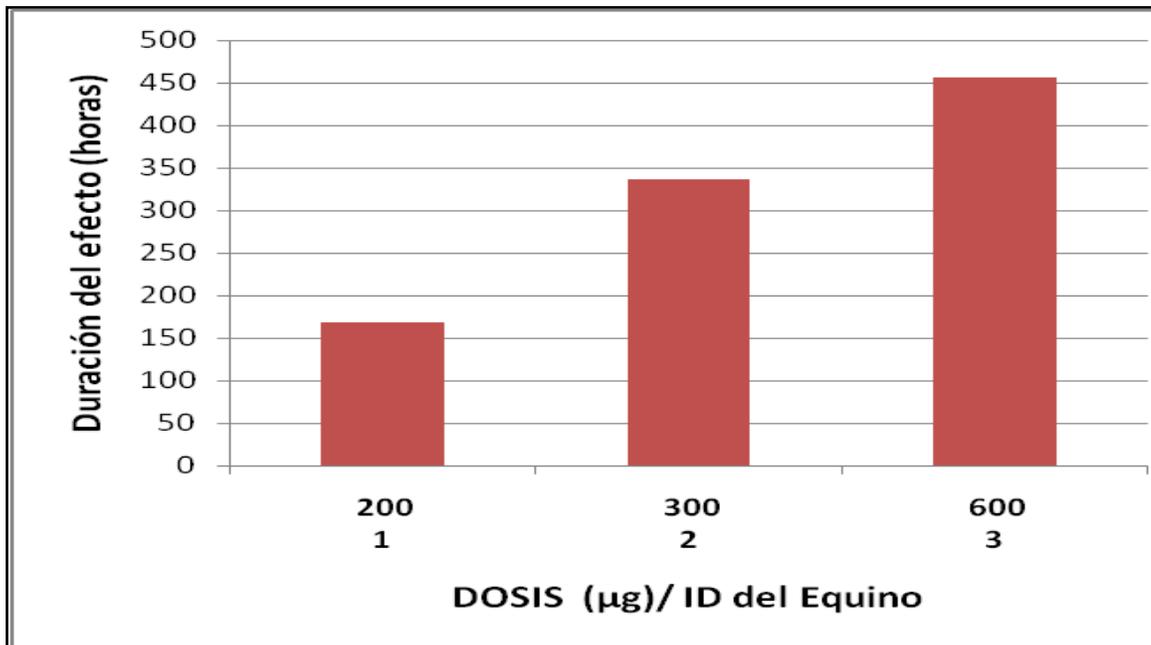
Al equino 13 con Enfermedad del Navicular y al equino 14 con Osteítis Podal, se les inyectó los 600 µg en dos puntos (300 µg cada uno); donde en ambos casos el efecto duró 504 horas, ambas determinadas por el Test de Marcha.

Dosis y Efecto de analgesia de NeoSTX en Periostitis Metacarpiana en equinos Fina Sangre Carrera.

Otra patología estudiada fue la periostitis metacarpiana o comúnmente denominada “cañera”. Esta afección es generalmente producida por una conmoción (golpes) en equinos jóvenes, donde los huesos no están completamente osificados y estarían involucradas micro fracturas mejor conocidas como fracturas por estrés. En este caso se tuvo acceso a tres pacientes que presentaron tal diagnóstico.

La Figura 8, muestra la duración del efecto a tres diferentes dosis de 200, 300 y 600 microgramos de NeoSTX en una sola patología (Periostitis Metacarpiana). La dosis de menor a mayor fue aplicada usando el criterio de cronicidad de la patología. Al equino que llevaba menor tiempo con esta lesión se le aplicó la dosis menor y al de mayor tiempo, con la lesión se aplicó la dosis mayor. El efecto anestésico logrado tuvo relación con la dosis aplicada, observándose a mayor dosis una mayor duración del efecto. El máximo efecto de 456 horas, se obtuvo con una dosis de 600 µg.

Figura 8.- Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis 200, 300 y 600 μg en equinos fina Sangre Carrera con Periostitis Metacarpiana, de acuerdo al Test de Marcha.

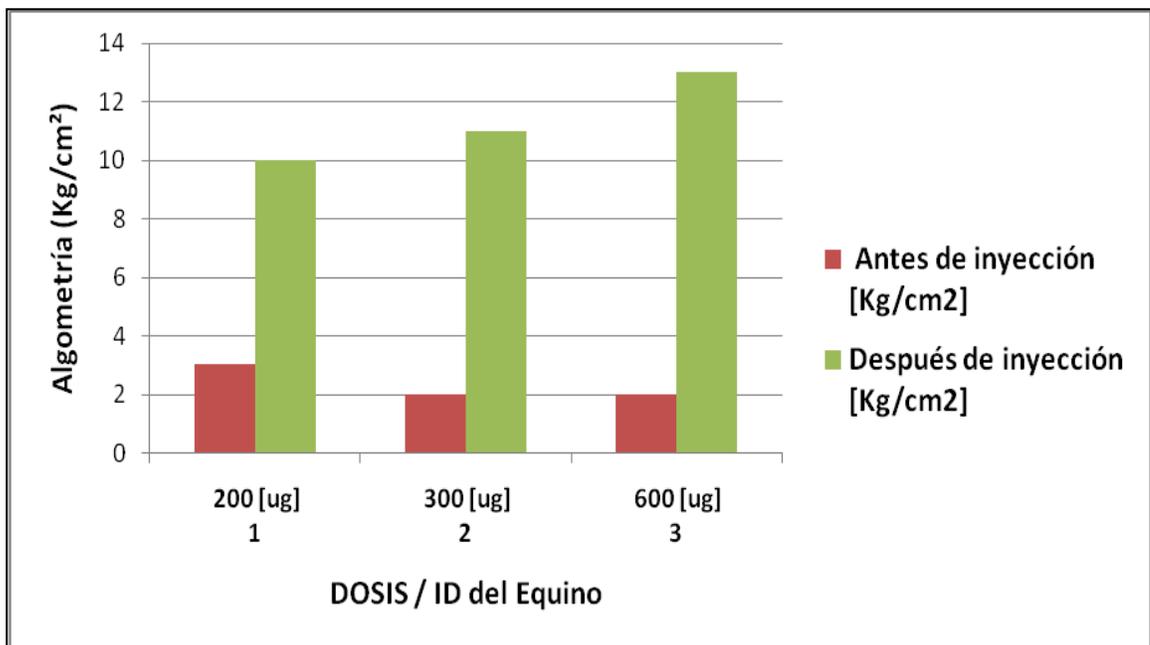


La Figura 9, muestra el efecto protector de la infiltración de NeoSTX a 200, 300 y 600 microgramos en los tres equinos anteriormente mencionados en la Figura 8, de acuerdo a las medidas del Dolorímetro.

La Figura 9, muestra la duración del efecto a las tres dosis (200, 300 y 600 microgramos) en los 3 equinos con Periostitis Metacarpiana. Se observa claramente que la algometría mide significativamente el efecto analgésico, mostrando una concordancia con el efecto protector de la cojera medido por el Test de Marcha (Figura 8).

El Dolorímetro, permitió cuantificar en Kg/cm² el dolor. El valor basal (barras rojas) de los 3 equinos varía entre 2 y 3 Kg/cm², generando un valor basal promedio de los 2,0 Kg/cm². Aún cuando, se trataron 3 equinos diferentes se pudo observar un mayor efecto con la dosis mayor (600 µg), equivalente a 13 Kg/cm².

Figura 9.- Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis de 200, 300 y 600 µg en equino Fina Sangre de Carrera con Periostitis Metacarpiana de acuerdo a Algometría.



Dosis y efecto de analgesia de NeoSTX en Miofibralgia en equinos Fina Sangre de Carrera.

Otra Patología estudiada fue la Miofibralgia, en esta patología se tuvo acceso a 5 equinos, siendo la patología con más ejemplares estudiados. Esta patología

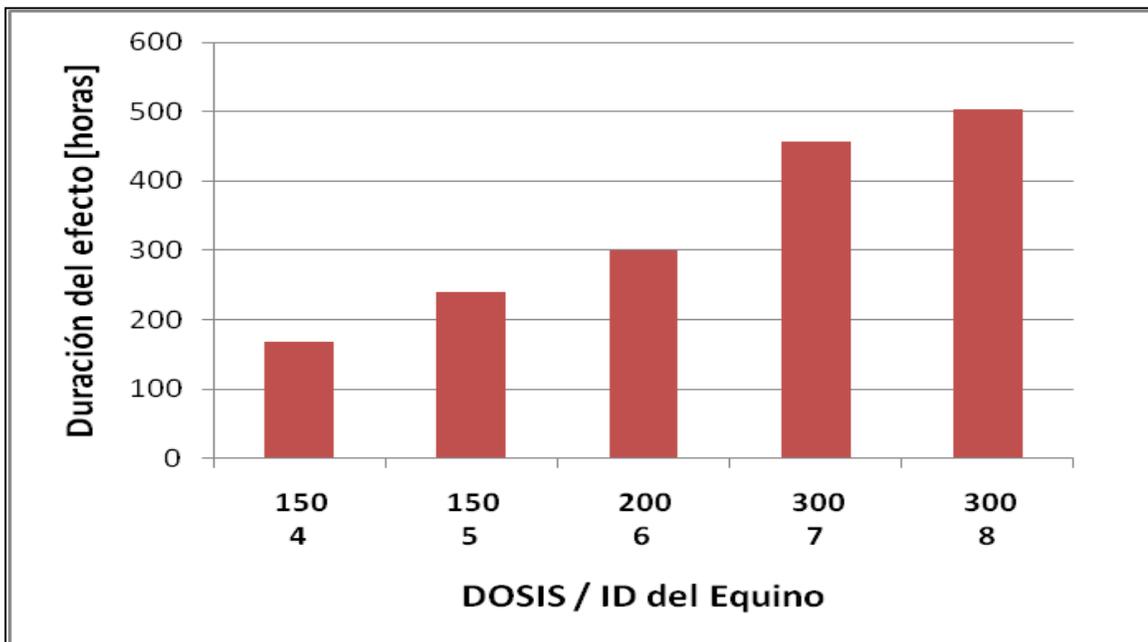
presenta una inflamación de las fascias de varios músculos, presentando una gran extensión de la zona con dolor que involucra los músculos asociados al lomo y a la escápula. En general esta patología se presenta en equinos inmunosuprimidos, manifestado un dolor intenso y diseminado.

La Figura 10, muestra efecto de NeoSTX, en 3 dosis diferentes (150, 200 y 300) en equinos con Miofibralgia. Como se observa en la figura, el máximo efecto protector (504 horas) se obtuvo con una dosis de 300 µg en el equino 8.

Esta dosis también genero una respuesta importante en término de horas de efecto, en un segundo equino (7).

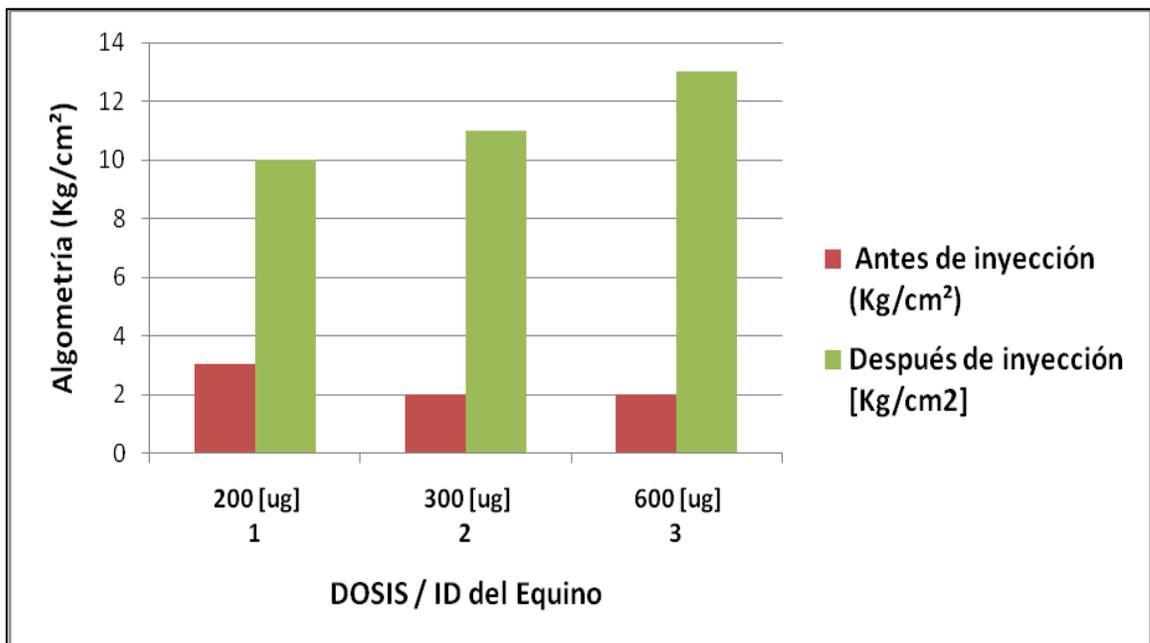
Esto podría sugerir, que una mayor dosis de NeoSTX, se relaciona con una mayor respuesta para la patología de Miofibralgia.

Figura 10.- Gráfico de dosis efecto de NeoSTX, para dosis de 150 a 300 µg, en equinos de Fina Sangre de Carrera con la patología de Miofibralgia, de acuerdo al Test de Marcha.



Se corroboró que la Algometría, usando el Dolorímetro, es una buena herramienta para cuantificar (Kg/cm^2) el efecto protector de NeoSTX, en una patología compleja como es la Miofibralgia. Este gráfico 11, SE muestra que el Dolorímetro discrimina el efecto basal (barras rojas), del efecto analgésico producido por NeoSTX (barras verdes). El efecto menor observado en los dos últimos equinos, que además fueron infiltrados con la dosis de 300 microgramos, se podría explicar por la mayor cronicidad de la patología en estos dos pacientes los cuales llevaban meses sufriendo y manifestando el dolor.

Figura 11.- Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis 150 a 300 μg en equino Fina Sangre de Carrera en la patología de Miofibralgia de acuerdo a Algometría.

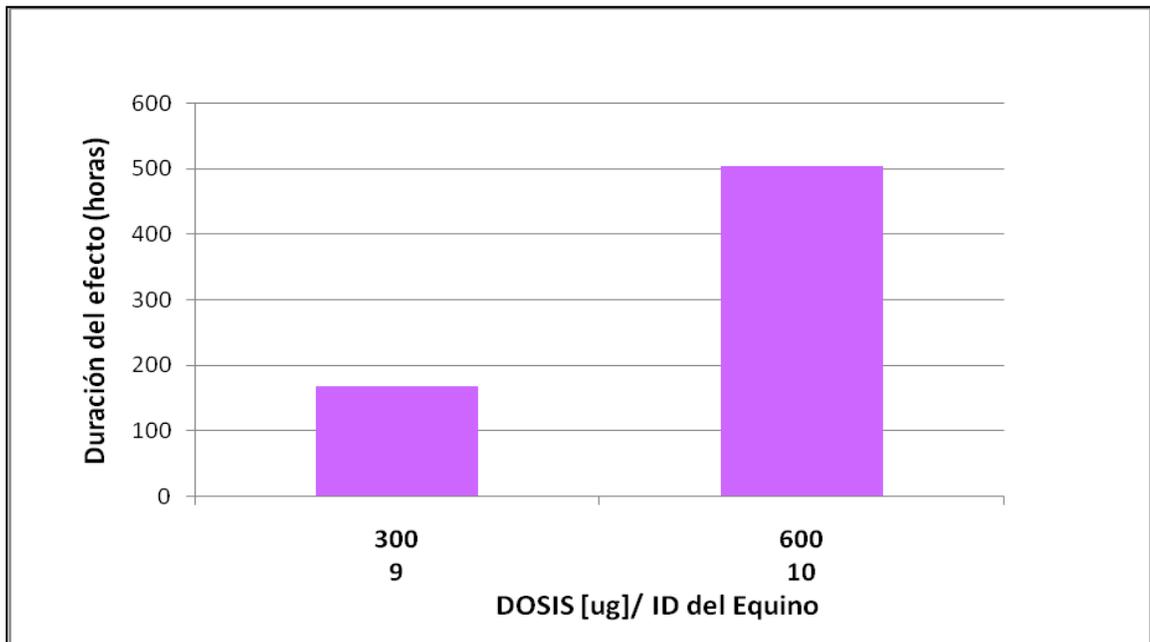


Dosis y efecto de analgesia de NeoSTX en patología Sesamoiditis en equinos Fina Sangre de Carrera

La última patología estudiada es Sesamoiditis, patología que se produce debido a la gran presión ejercida sobre la primera y segunda falange de las extremidades anteriores durante el ejercicio rápido, provocando un desgarro de la inserción de ligamentos suspensores y de los ligamentos distales de los sesamoides.

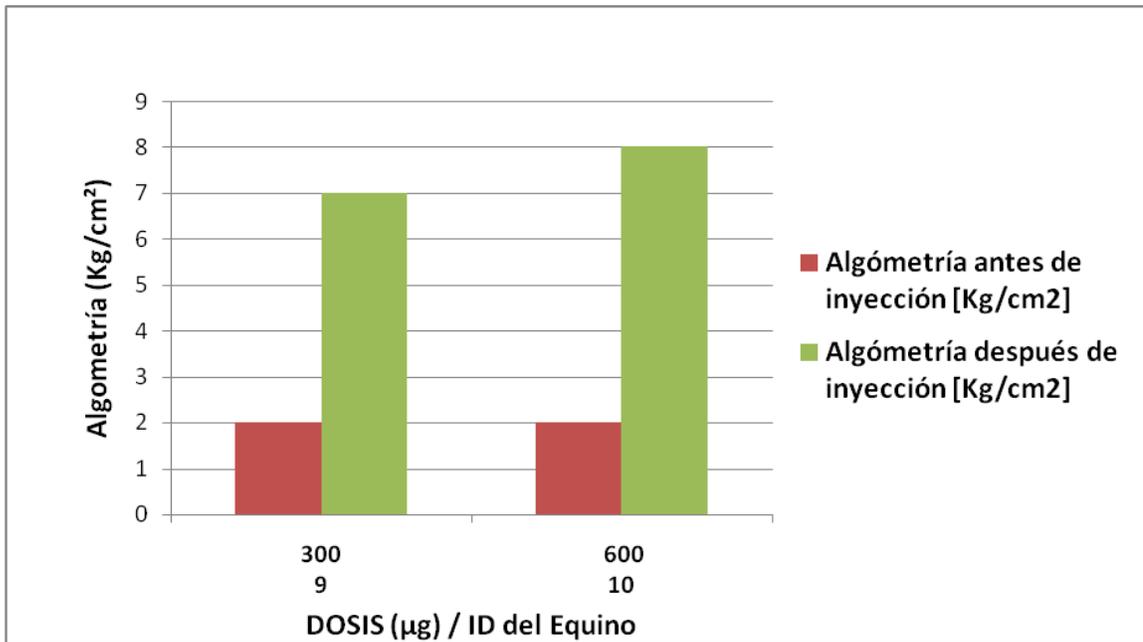
En este trabajo de tesis se trataron dos equinos con esta patología. Estos fueron tratados a dos dosis distintas para ver el efecto de duración. Se inyectó 300 y 600 microgramos, respectivamente. En la Figura 12, se muestra la duración del efecto protector (sin cojera) medido con el Test de Marcha. Con la dosis de 300 µg se logró una duración de 168 horas (Equino 9). Este equino presentaba una sesamoiditis leve, donde luego de administrada la dosis pudo regresar a las carreras sin muestra de cojera ni dolor, recuperado totalmente. El equino 10, cuya patología tenía una cronicidad de meses, el cual además presentaba una conducta indócil y de difícil manejo, al infiltrarse, mostró un efecto protector que llegó a 504 horas con 600 ug, cambiando su actitud, generando un equino dócil y regresando a las pistas.

Figura N° 12.- Gráfico de duración del efecto de Neosaxitoxina (300 y 600 microgramos) en la patología de Sesamoiditis (2 equinos). Efecto Medido por Test de Marcha.



En la Figura N° 13 se muestra el gráfico que cuantifica los resultados obtenidos con la prueba de Algometría aplicada a ambos pacientes de Sesamoiditis. La infiltración aquí se realizó en dos puntos medial lateral de las extremidades anteriores, cercanas a los ligamentos colaterales. Se observa que la prueba por Algometría antes de administrada la dosis (basal) determinó para ambos equinos 2 Kg/ cm². La presión ejercida por el Algómetro llega a 7 Kg/cm² en el Equino 9 pos infiltración con una dosis de 300 microgramos de Neosaxitoxina y el Equino10 llega a 8 Kg/ cm² con una dosis de 600 microgramos.

Figura 13.- Gráfico dosis efecto de NeoSTX, para dosis 300 y 600 μg en equino Fina Sangre de Carrera con patología de Sesamoiditis, efecto medido por Algometría.



Capítulo VI

Discusión

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio pionero a nivel nacional e internacional permiten afirmar que la inyección de Neosaxitoxina como agente analgésico local, es seguro y efectivo en equinos FSC. Se demostró que el efecto es dosis dependiente, en todos los casos estudiados. Es decir, a mayor dosis inyectada mayor efecto protector medido en el tiempo (sin cojera), aún cuando no en forma líneal.

Las patologías estudiadas fueron: Sesamoiditis, Enfermedad del Navicular, Periostitis Metacarpiana, Miofibralgia, Osteítis Podal, Rin Bone, Fractura de Sesamoideo y Desmitis del ligamento suspensor.

Se determinó que la dosis mínima donde se observa el efecto anestésico local corresponde a 5 microgramos de Neosaxitoxina, cuando esta se aplicó en las extremidades anteriores.

Cuando se afirma que se observa el efecto, se refiere a que fue medido objetivamente bajo dos métodos: Test de Marcha y Algometría, donde la medida es en Kg /cm², presión tolerada por el equino, utilizando un Algómetro y presionando en la zona lesionada. Utilizando ambos métodos se pudo cuantificar la duración del efecto en horas y días.

La dosis máxima inyectada en este estudio correspondió a 600 microgramos, la que fue tolerada muy bien por los pacientes logrando un efecto anestésico local de hasta 504 horas. Este efecto fue la máxima duración observada en los 5 equinos que fueron infiltrados con la dosis máxima. No se observaron efectos

secundarios de ningún tipo; específicamente se buscaron síntomas negativos tales como: i falta de incoordinación a la marcha, cólico estomacal, reacción anafiláctica, irritación en la zona, sialorrea, aumento de frecuencia respiratoria y cardiaca. Los únicos efectos detectados y medidos fueron la supresión de la cojera post infiltración y la vuelta a la cojera en el tiempo, la cual se detectaba usando el Test de Marcha. Adicionalmente, se utilizó el Algómetro midiendo la reacción del paciente frente a la presión aplicada con el instrumento.

De ambos métodos, sin duda el que presentó una relación más objetiva fue del Test de Marcha, por esta razón todas las patologías estudiadas fueron las relacionadas con cojera visible de las extremidades anteriores. Cojera totalmente visible a lo menos por dos observadores. No hubo ningún caso donde este síntoma no fuera totalmente visible. El efecto medible era el término de la cojera y su duración corresponde al tiempo transcurrido desde la inyección hasta donde aparece nuevamente este signo. El 100 % de los equinos en este estudio, fueron medidos por el Test de Marcha.

En el caso de la utilización del Dolorímetro, este instrumento presentó una similar precisión y correspondencia con el término de dolor y término de la cojera, esto siempre en todas las patologías asociadas al dolor generado por lesiones de las extremidades anteriores. En estas patologías ambos métodos cuantitativos se correlacionaron bien.

Sólo en el caso de Miofibralgia, se observa una diferencia. En esta patología se mantiene la relación de los Kg/cm^2 medidos pre y post infiltración por el

Dolorímetro, es decir se mantiene el hecho de que los Kg/cm² aplicados después de la infiltración son mayores que la basal (pre infiltración). Sin embargo, a dosis mayores los Kg/cm² disminuyeron tanto en la basal como en la post infiltración. Aun así, siempre se mantiene la relación en que son mayores los Kg/cm² en el caso post infiltración. Es probable que esta diferencia en relación al Test de Marcha se deba a la medición de Algometría en músculos escapulares. Estos resultados sugieren que las lecturas con el Algómetro se correlacionan mejor con el Test de Marcha en las patologías asociadas a lesiones en las extremidades que con otras lesiones o patologías como es el caso de la Miofibralgia. Esta última patología no es tan localizada y que corresponde a un área extendida, como corresponde al área anatómica dorso lumbar.

Como experiencia pionera en la medición del efecto anestésico en equinos lesionados, en esta Tesis se determinó que la manera más fácil y objetiva es el método de Test de Marcha en donde la eliminación de la cojera y la vuelta de la cojera en los equinos con dolor, es un síntoma totalmente detectable incluso para un ojo menos experto.

Como los únicos estudios clínicos que están publicados son los estudios en humanos, podemos decir que los resultados de esta tesis corroboran y concuerdan con estos estudios publicados con las Toxinas Paralizantes en diferentes patologías y en su uso como anestésico local en humanos (Rodríguez-Navarro y col., 2007, 2009). En ambos casos, en esta Tesis y en

los estudios clínicos en humanos publicados, la dosis mínima se encuentra en el rango de los 5 microgramos. En los estudios clínicos humanos la dosis mínima se encuentra en el rango de 10 a 20 microgramos (Garrido y col., 2004, 2007). Adicionalmente considerando la dosis máxima utilizada en este Tesis (600 microgramos) infiltrada en equinos FSC de un peso promedio de 580 kilos, se puede calcular una dosis máxima efectiva de 1,03 microgramos por kilo peso. En los estudios clínicos en humanos previamente publicados, donde se ha usado la dosis más alta (100 microgramos) (Rodríguez-Navarro y col., 2009), considerando como un peso promedio de 70 kilos en pacientes humanos, la dosis máxima efectiva resultó 1,42 microgramos por kilo peso. Es decir ambas dosis efectivas máximas se encuentra en el mismo rango de efectividad.

En la veterinaria actual en el tratamiento de equinos con lesiones de las extremidades anteriores los fármacos más utilizados son: Fenilbutazona y Bupivacaina. La inflamación es un componente importante de la lesión y del dolor, por esto, los AINEs son también aplicados comúnmente como parte de una técnica analgésica balanceada, debido a sus acciones inhibitorias sobre las enzimas ciclo-oxigenasas (COX), necesarias para la producción de prostaglandinas durante la respuesta inflamatoria. Se reconocen al menos 3 tipos de enzimas COX: COX-1 involucrada en funciones de homeostasis de la mucosa gástrica, perfusión renal y función plaquetaria, COX-2 presente en eventos inflamatorios, aunque también tiene un rol importante en la perfusión

renal y reparación gastrointestinal (Valverde y Gunkel, 2005), y COX-3 (derivado de COX-1) ,que parece estar involucrada en el control del dolor y la fiebre a nivel cerebral (Pradilla, 2004; Blikslager y Jones, 2005). Adicionalmente, Prügner y col., 1991, describieron una significativa disminución en las conductas dolorosas durante un período de 5 días en caballos que recibieron un AINE, en vez de placebo luego de una castración.

De los AINEs utilizados, el con mayor frecuencia en medicina equina es Fenilbutazona, la cual actúa inhibiendo de manera no selectiva las enzimas COX. El efecto analgésico de Fenilbutazona en el dolor postquirúrgico o traumático en caballos, es comparable al de otros AINEs. Pese a lo anteriormente mencionado, los AINEs pueden generar una serie de reacciones adversas, cuando se aplican en cronicidad. Esto último principalmente cuando se relaciona con la inhibición de COX-1, tales como úlceras gastrointestinales, colitis, nefropatías, hemorragias y tromboflebitis. Además, la administración de Fenilbutazona en grandes cantidades, atraviesa la barrera placentaria y puede penetrar la circulación fetal (Lizárraga y Sumano, 1998). De acuerdo a lo anteriormente mencionado, no se recomienda el uso de Fenilbutazona por períodos prolongados de tiempo, ni tampoco se debe exceder la dosis de 8 mg/kg/día (Lizárraga y Sumano, 1998).

Otra de las herramientas farmacológicas corresponde a la anestesia regional, la cual es una ayuda valiosa en la práctica de la medicina en los equinos para identificar los sitios algésicos y el origen de la claudicación. Por lo general, la

inhibición del dolor se realiza con la infiltración local de un anestésico para bloquear en forma temporal la conducción aferente de un nervio específico o por medio de la instilación intrasinovial de un agente que bloquee el dolor articular, bursal o tendovaginal (Colahan y col., 1998). El anestésico utilizado con mayor frecuencia es Bupivacaina (Colahan y col., 1998). La toxicidad de Bupivacaina se manifiesta fundamentalmente a nivel de SNC, y son responsables de diferentes manifestaciones que van desde una ligera depresión y somnolencia, hasta episodios convulsivos de diversa intensidad y duración (Otero, 2006). Bupivacaina posee un pKa de 8,1 y se une en más de un 80% a las proteínas plasmáticas, de ahí su alta dosis. Su efecto dura alrededor de 20 minutos en equinos, y tiene un periodo de acción que puede extenderse hasta las 6 horas para el bloqueo motor y hasta 10 horas para el bloqueo sensitivo cuando se emplea al 0,5 %. Adicionalmente, Bupivacaina es cardiotóxica (Otero, 2006). Su uso farmacéutico comprende aplicaciones locales a diferentes concentraciones para promover bloqueos nerviosos centrales y periféricos (Lees, 1985).

El mecanismo de acción a nivel molecular de Neosaxitoxina, corresponde a un bloqueo selectivo del poro exterior del canal de sodio dependiente de voltaje, interrumpiendo la despolarización de las células excitables (Catterall, 2000). Como resultado, estos compuestos pueden evitar la propagación del potencial de acción e interrumpir la comunicación neural, cuya expresión clínica es la parálisis flácida de la zona inervada. Adicionalmente, al aplicarlo localmente se

bloquea no sólo la neuronas periféricas motoras responsables de la parálisis, también se bloquean las neuronas sensoriales que son las responsables de la transmisión del dolor hacia el SNC, es aquí donde se manifiesta también el efecto analgésico. Ambos efectos, se manifiestan conjuntamente al aplicar este fármaco localmente.

Si comparamos Neosaxitoxina, el anestésico local probado en esta Tesis, la cual presenta un mecanismo molecular totalmente distintos a ambas drogas mencionas anteriormente, podemos ver que a dosis del orden los microgramos se obtienen respuestas de hasta 504 horas de efecto analgésico, y usando dosis de hasta 600 microgramos en equinos, no se observaron efectos tóxicos a nivel nervioso y tampoco cardiovascular. Las toxinas paralizantes han demostrado no ser cardio y tampoco neuro tóxicas en humanos (Andrinolo y col., 1999; Garrido y col., 2004, 2005, 2007; Lattes y col., 2009; Rodríguez-Navarro y col., 2007, 2009).

En esta Tesis, se demuestra que Neosaxitoxina a dosis muy bajas (microgramos) producen efecto anestésico local más prolongado que los dos fármacos más utilizados en veterinaria en equinos, sin los efectos secundarios indeseados, no mostrando las toxicidades a nivel del SNC y cardiovascular ya descritas para Bupivacaina y Fenilbutazona (Lizárraga y Sumano, 1998).

Capítulo VII

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se demuestra que el uso de Neosaxitoxina, para fines terapéuticos en equinos FSC, es efectiva y segura usada en el rango de 5 a 600 microgramos.
2. Se demuestra que Neosaxitoxina es un anestésico local **de efecto prolongado**, siendo efectivo hasta 504 horas a la dosis de 600 microgramos. En esta Tesis se genera un anestésico local de larga duración para equinos. Anestésico local hasta ahora no existente en el manejo de dolor en la veterinaria actual.
3. Se demostró que Neosaxitoxina es capaz de inhibir la sensación de dolor en equinos FSC, y de esa manera eliminar la cojera.
4. Neosaxitoxina produce un efecto anestésico local que es dosis dependiente, como cualquier fármaco. Efecto que se observa en lesiones agudas como en patologías crónicas.
5. Se determinó en 5 microgramos la dosis mínima para visualizar el efecto de inhibición de dolor utilizando el Test de Marcha para cuantificar.
6. En esta Tesis, se utilizó como mayor dosis 600 microgramos, sin producir efectos secundarios tales como: incoordinación a la marcha, cólico estomacal, reacción anafiláctica, irritación en la zona, sialorrea, aumento de frecuencia respiratoria y cardiaca.

7. Se determinó como dosis mayor efectiva en equinos FSC de peso promedio de 580 kilos, la dosis de 1,034 microgramos por kilo peso.

Capítulo VIII

Proyecciones de la

Tesis

Proyecciones de la Tesis

A partir de este estudio exploratorio y pionero debería surgir una línea de investigación que se focalizara en estudios de cada una o las principales patologías individualmente probadas en esta Tesis, en un mayor número de equinos.

Por otra parte, sería interesante estudios a dosis mayores a las estudiadas y efectos tóxicos, de manera de optimizar la dosis máxima no tóxica para cada patología.

Capítulo IX

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Andrinolo D, Michea LF, Lagos N (1999). Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon* 37:447-64
- Anil S, Anil L, Deen J (2002). Challenges of pain assessment in domestic animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol.220 (3):313-319.
- Basbaum AI, Woolf CJ (1999) Pain. *Curr Biol* 9:R429-3
- Batenson P.2004. Do animals suffer like us?-The assessment in domestic animals. *The veterinary journal* 168(2): 110-111.
- Blikslager A, Jones S (2005). NSAIDs. *J Equine Vet Sci*, 25: 98-102
- Bufalari, A., Adami, C., Angeli, G. and Short, C.E.,(2007) Pain assessment in animals. *Veterinary Research Communications*, 31(1) 55–58.
- Bussièrès G, C Jacques, O Lainay, G Beauchamp, A Leblond, J-L Cadoré, L-M Desmaizières,SG Cuvelliez, E Troncy. 2007. Development of a composite orthopedic pain scale in horses. *Res Vet Sci* 85, 294-306
- Catterall WA (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26:13-25
- Cestèle S, Catterall WA (2000). Molecular mechanisms of neurointoxication on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82: 883-92.

- Colahan P, Mayhew I. G, Merrit A. M, Moore J. N (1998) Medicina y Cirugía Equina. Buenos Aires. Argentina. Editorial Inter--médica.pp.1049-1073.ISBN 9789505552030.
- Corletto F. (2007).Multimodal and Balance Analgesia. Vet Res Common 31,59-63.
- Currey J.(2001) .Ontogenetic changes in compact bone material properties. Bones Mechanics Handbooks. Edited by Stephen C.London.pp.19-16.
- Dobromulskyi P, Flecknell P, Lascelles B, Livingston, Taylor P, Waterman-Pearson A (2000). Pain Assessment.En: Flecknell PA, A Waterman-Pearson (eds).Pain Managementin Animals.WB Saunders, London, UK, Pp 55,65,67.
- Fischer A. (1998). Algometry in Diagnosis of Musculoskeletal Pain and Evaluation of Treatment Outcome: An Update. J. of Musculoskeletal Pain. 6 (1): 5-32.
- Garrido R, Lagos N, Lattes K, Azolas C.G, Bocic G, Cuneo A, Chiong H, Jensen C, Henríquez AM, Fernandez C (2004) .The gonyautoxin 2/3 epimers reduces anal tone when injected in the anal sphincter of healthy adults. Biol Res, 37:395-403.
- Garrido R, Lagos N, Lattes K, Azolas CG, Bocic G, Cuneo A, Chiong H, Jensen C, Henriquez AM, García C (2005). Gonyautoxin: New treatment for healing acute and chronic anal fissures. Dis Col Rect, 48:335-343.

- Garrido R, Lagos N, Lagos M, Rodriguez-Navarro A.J, García C, Truan D, Henríquez, A (2007). Treatment of Chronic Anal Fissure by Gonyautoxin. *Colorectal Disease*, 9: 619-624.
- Goldin AL. (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels .*Ann N Y Acad Sci*, 868:38-50.
- Guo X, Uchara A, Rabidran SH, Bryant S, Moczydlowski E (1987). Kinetic basis for insensitivity to tetrodotoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry*, 26: 7546-7556.
- Hall S, Strichartz G, Moczydlowsky E, Ravindran A, Reichardt PB (1990) The saxitoxins: sources chemistry and pharmacology.In:.*Marine Toxins: Origin.Structure and Molecular Pharmacology*. Ed., Hall A, Strichartz G. American Chemical Society Symposium series. American Chemical Society, Washington DC. Pag, 29-65.ISBN 0841217335.
- International Association for the Study of Pain.(<[http:// www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain](http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain)>).(Consulta 10 de Agosto 2013).
- Johnson CB, Taylor PM, Young SS, Brearley JC (1993) Postoperative analgesia using phenylbutazone, flunixin or carprofen in horses. *Vet Rec* 133: 336-338.
- Julius D, Basbaum A (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413:203-210.

- Kenneth W, Hinchcliff A, Kaneps R (2007) Medicina y cirugía en los equinos de deporte. Ciencias básicas y Clínicas de los equinos de deporte. Buenos Aires. República Argentina. Edición Intermedica.pp.284-287.
- Kohane DS, Yieh J, Lu NT, Langer R, Strichartz GR, Berde CB (1998) A re-examination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia. *Anesthesiology*, 89:119-31.
- Lagos N (1998). Microalgal Bloom: a global issue with negative impact in Chile. *Biol Res*, 31:375-386.
- Lagos, N (2003). Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: occurrence in South America. *Comments on Toxicology*, 9: 175 -193.
- Lagos N, García C, Lattes K, Lagos M, Garrido R, Azolas R, Bocic G, Cuneo A, Chiong H, Jensen C, Henríquez A (2004) Paralytic Shellfish Poison: toxins that can kill and heal. *Proceeding Chemical and Biological Medical Treatment Symposium*, 25-30 April (2004), Spiez Laboratory, Switzerland. Pag, 197-202.
- Lattes K, Venegas P, Lagos N, Lagos M, Pedraza L, Rodriguez-Navarro AJ, and García C (2009). Local infiltration of gonyautoxin is safe and effective in treatment of chronic tension-type headache. *Neurological Research*, 1:128-295.
- Lizárraga I, Sumano H (1998). Bases farmacológicas del uso de antiinflamatorios no esteroidales en caballos. *Vet Méx*, 29: 83-99.

- Lemke K, Han N (1997). Understanding the pathophysiology of perioperative pain. *The Canadian Veterinary Journal*. 45(5):405-413.
- Less P, Higgins AJ (1985). Clinical pharmacology and therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horses. *Equine Vet J*, 17:83-96.
- Livingston A.(2006).Physiological basis of pain management. En: Doherty T, Valverde A (eds). *Manua o equine Anesthesia and Analgesia* .Blackwell, Oxford.Pp.293-300.
- Merry P, Williams R, Cox N (1991). Comparative study of intra-articular pressure dynamics in oints with acute traumatic and chronic inflammatory effusions: Potential implications for hypoxic-reperfusion injury. *Annals of the Rheumatic Diseases*.50 (12).pp. 917-920.
- Moses VS, AL Bertone. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs.*Veterinary clinics of North American: Equine Practice* .18, 21-27.
- Otero E.P (2006). *Dolor, evaluación y tratamiento en pequeños animales*. Editorial Inter-Medica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires,ISBN 9789505552740.
- Pradilla OE. (2004). Ciclooxygenasa 3: la nueva iso-enzima en la familia. *Med UNAB*, 7:181-184.
- Pritchett LC, C Ulibarri, MC Roberts, RK Schneider, DC. Sellon. (2003). Identification of potencial physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. *Appl Anim Behav Sci* 80, 31-43.

- Prügner W, Huber R, Lühmann L (1991). Eltenac, a new anti-inflammatory and analgesic drug for horses: clinical aspects. *J Vet Pharmacol Ther*, 14:193-199.
- Radostits, O.M.Gay, Clive C, Arundel, J.H, Blood D (2002). *Enfermedades del sistema musculoesquelético. Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª.ed.en español .Buenos Aires. McGraw-Hill-Interamericana.pp.649-653.*
- Rodríguez-Navarro A.J, Lagos N, Lagos M, Braghetto I, Csendes A, Hamilton J, Figueroa C, Truan D, Garcia C, Iglesias V, Brunet L, Alvarez F (2007). Neosaxitoxin as a Local Anesthetic: Preliminary Observations from a First Human Trial. *Anesthesiology*, 106: 339-345.
- Rodriguez-Navarro A, Lagos M, Figueroa C, García C, Recabal P, Silva P, Iglesias V, Lagos N (2009). Potentiation of Local Anesthetic Activity of Neosaxitoxin with Bupivacaine or Epinephrine: Development of a Long-Acting Pain blocker. *Neurotox Res*, 16:408-415.
- Short E (1998). Fundamentals of pain perception in animals. *Applied Animal Behaviour Science*. 1 (59):125-133.
- Strichartz G (1984). Structural Determinants of the Affinity of Saxitoxin for Neural Sodium Channels. *J. Gen Physiol* 84:281-305.
- Taylor P, Pascoe P, Mama K.(2002). Diagnosing and treating pain in the horse. Where are we today? *Vet Clin North Am Equine Pract*. 18:1-19.

- Valverde A, Gunkel C (2005). Pain management in horses and farm animals. *J Vet Emerg Crit Care* 15:295-307.
- Wallace JL (1999). Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). *Am J Med*, 107:11S-17S.
- Woolf FC, Salter M. W (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288:1765-1769
- Yu FH, Catterall WA (2004). The VGIL channel: A protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *STKE Science's* 253: re15.
- Zeilhofer HU (2007). Prostanoids in nociception and pain. *Biochem Pharmacol*, 73:165-74.
- Zimmermann M (1986). Behavioral investigations of pain in animals. In: *Assessing pain in farm animals*. Ed., Duncan IJ, Molony H. Bruxelles, Office for Official Publications of the European Communities. Pag, 16-29.