



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**“INTERACCION DE GABAPENTINA CON NAPROXENO EN DOLOR OROFACIAL
EXPERIMENTAL”**

CECILIA VERONICA PARRA ORREGO

TRABAJO DE INVESTIGACION

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Hugo Miranda Guzmán

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Fernando A. Sierralta G.

Adscrito a Proyecto Perfil Farmacológico de Analgésicos en Dolor

Experimental

Santiago – Chile

2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**“INTERACCION DE GABAPENTINA CON NAPROXENO EN DOLOR OROFACIAL
EXPERIMENTAL”**

CECILIA VERONICA PARRA ORREGO

TRABAJO DE INVESTIGACION

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Hugo Miranda Guzmán

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Fernando A. Sierralta G.

**Adscrito a Proyecto Perfil Farmacológico de Analgésicos en Dolor
Experimental**

Santiago – Chile

2015

“No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda y se calle el viento, aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños.”

Mario Benedetti

Agradecimientos

Doy gracias a Dios, por ser mi sustento en este largo y a veces tortuoso peregrinar.

A mi gran amor, compañero y amigo, Jorge, un apoyo incondicional.

A mi familia, que me han acompañado en este largo camino.

Al Dr. Hugo Miranda, por su dedicada guía, apoyo, y su gran calidad humana.

Al Sr. José López por su valiosa ayuda en la parte técnica.

A los Profesores Alfredo Molina, José Jara y Vicente Torres quienes revisaron con acuciosidad y dedicación este trabajo.

A todos quienes gracias a su apoyo y comprensión permitieron que este gran emprendimiento pudiera concretarse.

Muchas Gracias!!!

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
I. DOLOR.....	3
Concepto de dolor.....	3
Tipos y clasificación.....	3
II. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR.....	4
III. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR OROFACIAL.....	6
Nervios craneales.....	6
IV. DOLOR NEUROPÁTICO OROFACIAL	9
V. CONTROL DEL DOLOR CON FÁRMACOS.....	12
Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	13
Naproxeno.....	14
Antiepilépticos.....	16
Gabapentina.....	17
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	21
1.- Objetivo General.....	21
2.- Objetivos Específicos.....	21
MATERIALES Y METODO.....	22
Animales.....	22
Administración de las drogas.....	23
Test de la formalina.....	24

Criterios de exclusión.....	24
Diseño experimental.....	25
Evaluación de la analgesia.....	26
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	30
Evaluación de la antinocicepción.....	30
Grupo Control.....	30
Grupo tratado con Gabapentina.....	30
Grupo tratado con Naproxeno.....	31
Grupo tratado con mezcla de gabapentina y naproxeno.....	33
Análisis Isobolográfico.....	33
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS: Aprobación del comité de Bioética sobre investigación en animales....	43

RESUMEN

Introducción: El dolor orofacial es la primera causa de consulta en salud oral, en particular, el dolor crónico de tipo neuropático; dado el porcentaje de la población que se ve afectada, éste representa un problema de salud pública. Es cierto que en algunos casos las terapias combinadas de fármacos antiepilépticos y antidepresivos, tienen mejores resultados que la monoterapia, en términos de tolerancia y eficacia frente a este tipo de dolor, pero no es adecuado generalizar. Existe evidencia que sugiere, que la combinación de gabapentina (antiepiléptico) con AINEs, tiene beneficios claros comparados con la monoterapia. En éste estudio se evaluó la analgesia de 2 de ellos: gabapentina, naproxeno y su combinación, según el método algiesiométrico de la formalina orofacial.

Material y Método: Se utilizaron 120 ratones (*Mus musculus*), machos, de la cepa CF/1. Se administró vía intraperitoneal (i.p.) una solución de gabapentina, de naproxeno y de su combinación, para posteriormente realizar el ensayo algiesiométrico, que consiste en la inyección en el labio superior del animal de formalina al 2%, evaluando el tiempo de frotado de la zona inyectada, tanto en la fase I (algésica), como en fase II (inflamatoria). El análisis estadístico fue expresado como promedio \pm E.E.M. (error estándar del promedio) y se calculó con el programa computacional Pharm Tools Pro (versión 1.27, McCary Group Inc., USA). La significación estadística se determinó por análisis de varianza y pruebas *t* de Student, considerando la significancia a un nivel del 5% ($p < 0,05$).

Resultados: La administración de Gabapentina, Naproxeno y su combinación, produce un efecto antinociceptivo dosis-dependiente en ambas fases, siendo Gabapentina más potente en ambas fases y la coadministración de ellos, demostró, a través del análisis isoblográfico, que tienen una interacción de tipo supraaditiva o sinérgica en ambas fases del test.

Conclusiones: los resultados del presente estudio, podrían contribuir al tratamiento del dolor neuropático, a fin de obtener una adecuada analgesia a dosis menores de los fármacos por su administración conjunta, que además produciría una disminución de las reacciones adversas medicamentosas.

INTRODUCCION

La capacidad para detectar estímulos nocivos es esencial para la sobrevivencia y bienestar del organismo. Esto se evidencia claramente en aquellos individuos afectados por anomalías congénitas, que los hacen incapaces de detectar estímulos dolorosos, no permitiéndoles desarrollar comportamientos protectivos. El dolor y la nocicepción son críticos para la subsistencia, encienden alarmas que tienen la capacidad de iniciar respuestas adaptativas, a través de un aprendizaje asociativo emocional (Barrot, 2012).

El dolor es la única de las sensaciones que va acompañado de un fuerte componente emocional, intrínsecamente desagradable; es una experiencia compleja y que cada individuo vive de forma única, y es por esto que la experiencia dolorosa es difícil de definir y de tratar (Rowbotham y cols., 1998). Su interpretación depende de la experiencia previa (Costigan y cols., 2009) o, como en el caso de los animales, a reacciones conductuales para esa sensación (Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, 1999).

Así, el dolor no es una experiencia nociceptiva pura (sensorial), sino que involucra componentes psicológicos previos inseparables de la sensación dolorosa; cabe acotar que la definición no establece que el dolor es producido únicamente por daño tisular, pudiendo entonces aparecer, sin causa somática que lo justifique. Además, inherente a la definición, se encuentra la premisa que el dolor es subjetivo, individual y multidimensional; incluyendo no sólo la sensación dolorosa en sí misma, sino también la experiencia emocional asociada a ella (Sluka, 2009).

Por lo tanto, se deduce que es muy difícil que el dolor pueda ser cuantificado por un método en particular, que abarque todas sus dimensiones. Es por esta dificultad, que la asociación internacional para el estudio del dolor (IASP), lo definió como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular existente o potencial, descrito en términos de daño” (Bonica, 1990(a); Sluka, 2009).

En la actualidad disponemos de diversos tratamientos para el manejo del dolor, como la acupuntura, la hipnosis, la estimulación eléctrica transcutánea (TENS), y los fármacos. Entre los fármacos más utilizados encontramos los analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) y opioides. Además de algunos antidepresivos, relajantes musculares, antiepilépticos, anestésicos locales y cannabinoides como coanalgésicos o coadyuvantes.

Este trabajo de investigación busca evaluar el efecto analgésico de la gabapentina y el naproxeno, por separado y en combinación; fármacos ampliamente usados en el dolor neuropático desconociéndose el tipo de interacción que pueda ocurrir entre ellos (Attal y cols., 2010; Setiawati y cols., 2009).

Marco Teórico

I. Dolor

Concepto de Dolor:

Es considerado como uno de los “signos más tempranos de morbilidad en la naturaleza” y es, sin lugar a dudas, el síntoma más frecuente de enfermedad. Este síntoma proporciona una señal de mal funcionamiento en alguna zona del organismo. La acción médica debe tratar de anularlo o en su defecto hacerlo más soportable, minimizándolo lo máximo posible (Barrot, 2012; Basbaum y cols., 2000).

Tipos y Clasificación

El dolor se puede clasificar según su duración en: agudo y crónico.

El dolor agudo es una sensación dolorosa de corta duración, es decir, limitado en el tiempo. Corresponde a una respuesta protectora, frente a injurias, generalmente es nociceptivo, siendo resultado de daño o inflamación de tejido somático o visceral (Basbaum y cols., 2000).

El dolor crónico en tanto, es una situación dolorosa de más de tres meses de duración, por lo que puede ser ilimitado en su duración y persiste después de la lesión que lo originó. Es una respuesta desadaptativa del organismo, pudiendo ser de tipo nociceptivo o neuropático. Éste último, al afectar a más del 3% de la población general, representa un problema de salud pública, aunque la prevalencia varía según las diferentes etiologías del dolor neuropático (Costigan y cols., 2009; Voscopoulos y Lema, 2010). Actualmente se sabe que este tipo de dolor se acompaña de alteraciones psicológicas de diversa severidad, y la terapéutica disponible permite la adaptación del paciente a su condición, más que a la desaparición de la misma (Reichling y Levine, 2009).

Según su patogenia es posible clasificarlo en: nociceptivo, neuropático,

psicógeno y oncológico.

El dolor nociceptivo es producido por estimulación anormal de nociceptores periféricos somáticos o viscerales (superficiales o profundos), por diversas causas inflamatorias, y es conducido por vías nerviosas específicas, introduciéndose al sistema nervioso central por el asta dorsal de la médula espinal (láminas I y II de Rexed), hasta alcanzar centros dolorosos superiores en el tálamo y corteza cerebral (Voscopoulos y Lema, 2010).

El dolor neuropático es definido por la IASP como “el dolor iniciado o causado por lesiones primarias o disfunciones en el sistema nervioso central y/o periférico. (Basbaum y cols., 2000; Costigan y cols., 2009) Se caracteriza por ser espontáneo, además es continuo e intermitente. Es descrito como lacerante, un ardor o quemazón y fulgurante (Costigan y cols., 2009; Hargreaves, 2011). Este dolor puede ser desencadenado por estímulos inocuos (alodinia), en otras ocasiones existe un aumento de la respuesta frente a un estímulo doloroso (hiperalgesia) y también pueden ocurrir sensaciones desagradables espontáneas de calor, frío, o tirantez (disestesia) (Hargreaves, 2011; Iwata y cols., 2011).

El dolor psicógeno, es un tipo de dolor complejo, mediatizado por la angustia, el miedo y la ansiedad del enfermo. Este tipo de dolor no responde al tratamiento analgésico habitual y no existe ningún paralelismo entre dolor y la lesión (Campbell y Meyer, 2006).

Finalmente el dolor de tipo oncológico, el cual está presente en casi la mitad de los pacientes con cáncer en situación terminal, llegando a afectar al 70%-90% de los mismos. En este caso coexisten varios tipos de dolor, siendo el más frecuente de tipo crónico, nociceptivo, somático (Epstein y cols., 2010).

II. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR

Si se simplifica todo el proceso de la sensación dolorosa, se puede resumir

en una cadena formada por tres neuronas, donde la de primer orden, va de la periferia hacia la médula espinal, la de segundo orden, asciende hasta centros superiores, y la de tercer orden se proyecta a la corteza cerebral. También puede existir comunicación con otras neuronas sensitivas, y neuronas descendentes inhibitorias que provienen del cerebro medio, y que modulan el estímulo doloroso, una forma más compleja del sistema (Bonica y cols., 2001).

Este proceso neurofisiológico puede dividirse en etapas: transducción (activación y sensibilización de los nociceptores periféricos), transmisión, modulación e integración de la antinocicepción por transmisión mediante las vías ascendentes (espino-encefálicas) y, control descendente por las vías encéfalo-espinales.

- Transducción: corresponde al proceso en el cual los nociceptores transforman los estímulos que reciben: químicos, térmicos y mecánicos en impulsos nerviosos. Existen dos tipos de procesos de transducción, por una parte, la activación, que genera el potencial de acción, y por otra, la modulación, que puede ser a una mayor sensibilidad (up-regulation) o a una menor sensibilidad (down-regulation), cabe acotar que una mayor sensibilidad implica una mayor cantidad de receptores y menor umbral de excitación (Ito y Okuda-Ashitaka 2001; Puebla 2005).

- Transmisión: Se realiza la sinapsis con la neurona de segundo orden para llevar la información al encéfalo, en el hasta dorsal de la médula, en las denominadas Láminas de Rexed (Almeida y cols., 2004, Bonica y Loeser 2001).

- Modulación: la información nociceptiva que llega a la médula espinal es procesada por sistemas de control segmentarios y suprasegmentarios. Los primeros corresponden a la neuromodulación en un determinado nivel medular, con un alcance más localizado. Los segundos, tienen su origen en estructuras nerviosas que se encuentran por encima de la médula: el tronco del encéfalo y el bulbo ventromedial (RBVM). Existen dos mecanismos principales de control: Teoría de la compuerta (Gate control) y el Sistema

inhibitorio descendente (Bonica y Loeser 2001, Paeile y Bilbeny 2005).

III. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR OROFACIAL.

Nervios craneales

A diferencia de lo que ocurre en el resto del cuerpo, cuando los estímulos dolorosos se originan en los nociceptores en la cabeza, son transmitidos por los nervios craneales hacia los ganglios craneales, desde ahí, se proyectan hacia los núcleos centrales, ubicados en el tronco del encéfalo, para luego hacer conexiones con el tálamo y la corteza somatosensitiva, al igual que en el resto del cuerpo (Sessle, 1999).

La región orofacial, es uno de los territorios más abundantemente inervados, y en particular, más por el nervio trigémino, y representa un territorio en donde se desarrollan condiciones dolorosas con características propias, que lo diferencian del dolor del sistema nociceptivo espinal (Hargreaves, 2011), pero los mecanismos asociados a estos dolores son escasamente conocidos, pues existen insuficientes investigaciones relacionadas al área facial (Luccarini y cols., 2006; Raboisson y Dallel, 2004). Dada la alta prevalencia del dolor orofacial, es importante buscar alivio éste, ya que constituye un problema relevante de salud pública, asociado con una disminución importante de la calidad de vida de quienes lo padecen (Stucky y cols., 2001; Takemura y cols., 2006).

El dolor orofacial deriva de diversos tejidos, como meninges, pulpa dental, córnea, mucosa nasal/oral y también de la articulación temporomandibular (ATM). La región orofacial, es sitio de dolores neuropáticos únicos, como las neuralgias paroxísticas: glossofaríngea y trigeminal. Otros dolores crónicos neuropáticos, comunes en el área orofacial lo constituyen las cefaleas trigeminales y neuralgia post-herpética. La neuralgia post-herpética presenta una prevalencia relativamente alta, afectando al 25% de los pacientes que han sufrido un episodio de herpes zoster (Baron y cols., 2010; Hargreaves, 2011; Zakrzewska y McMillan, 2011).

Los impulsos nerviosos que codifican el dolor a nivel orofacial, se originan principalmente en la distribución periférica sensorial de cuatro nervios craneales: el nervio trigémino (V par craneal), y en menor medida los nervios facial (VII par craneal), glosofaríngeo (IX par craneal) y vago (X par craneal); y la terminación de los tres nervios cervicales superiores (Bonica, 1990(b)).

El Nervio Trigémino, corresponde al nervio dominante que transmite los impulsos sensoriales del área orofacial al sistema nervioso central, nace en la superficie mediolateral de la protuberancia, con una raíz sensitiva grande y una raíz motora pequeña. Se divide en tres ramas: la oftálmica, maxilar y mandibular, las que emergen del cráneo por la fisura orbitaria superior, el agujero redondo y el agujero oval respectivamente. Es mixto, sus fibras sensitivas inervan la parte anterior de la cara, tejido cutáneo, tejidos intraorales, dientes, membranas mucosas de las cavidades orales y nasales, conjuntiva, duramadre y vasos sanguíneos extra e intracraneales (Bonica, 1990(b)).

La organización somatotópica es la característica más importante y de relevancia clínica del sistema trigeminal, tiene su centro en el ganglio de Gasser, la raíz sensorial, el complejo núcleo sensorial trigeminal. Los terminales centrales del nociceptor trigeminal, para la rama mandibular, se encuentran en la parte dorsal o dorsomedial del núcleo sensorial del Trigémino; para la oftálmica, están localizados en la parte ventral o ventrolateral y maxilar en la región intermedia. En el subnúcleo caudal, este patrón somatotópico de la representación de la cara y boca está invertido, la región perioral está representada en la parte cefálica y regiones más laterales de la cara en el sector más caudal del subnúcleo (figura 1) (Bonica, 1990(b); Sessle, 2005; Takemura y cols., 2006).

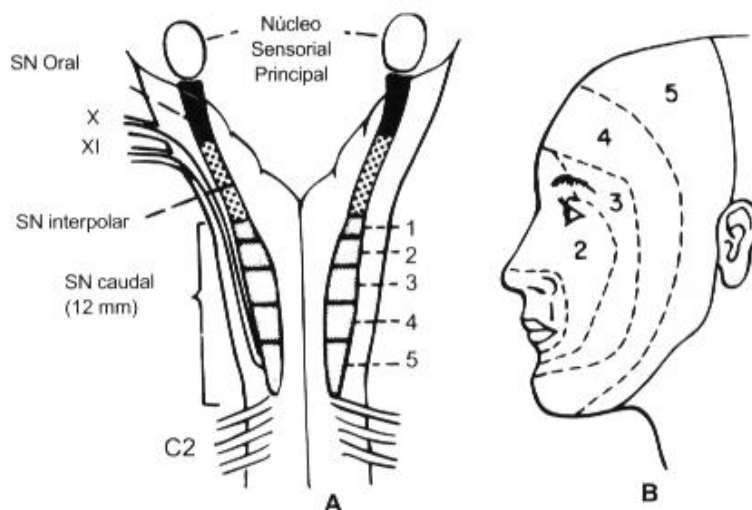


Figura 1: La organización somatotópica en sentido rostro-caudal del subnúcleo caudal (Bonica, 1990(b))

La primera neurona de este sistema posee un soma que se encuentra en el ganglio de Gasser; prolongaciones periféricas, que son terminaciones libres de sus tres ramas terminales (Oftálmica, Maxilar superior y Mandibular), que constituyen los receptores para el dolor del sistema trigeminal; y una prolongación central, que penetra en la protuberancia, para hacer conexiones con los núcleos sensitivos. Específicamente, la información correspondiente al dolor, es transmitida hacia el Subnúcleo Caudal del Núcleo Espinal.

En el Subnúcleo Caudal, se produce la sinapsis con la segunda neurona (neurona T o target). Esta segunda neurona cruza la línea media, y en un porcentaje muy importante, llega al núcleo ventroposteromedial del tálamo (haz Trigémico talámico ventral). Las vías ascendentes trigeminales, por donde viaja la información dolorosa son varias: el Haz Neotrigeminotalámico, el Haz Paleotrigeminotalámico y el Haz Reticulotrigeminotalámico.

Desde el Tálamo, la información dolorosa se proyecta por estas vías hacia la corteza somestésica primaria, y, además, hacia dos estructuras denominadas Corteza Insular y Circunvolución Cingular. Esta última es parte del sistema límbico, que está involucrado con el procesamiento afectivo y emocional del dolor; la Corteza Insular, en cambio, procesa información del estado interno del cuerpo, integrando,

de esta forma, el aspecto sensorial (localización), cuantitativo y afectivo, en la percepción del dolor. Como resultado tenemos la integración de los aspectos sensoriales, cognitivos y afectivos de la consensuadamente definida experiencia dolorosa (figura 2) (Bonica, 1990(b); Sessle, 2005; Takemura y cols., 2006).

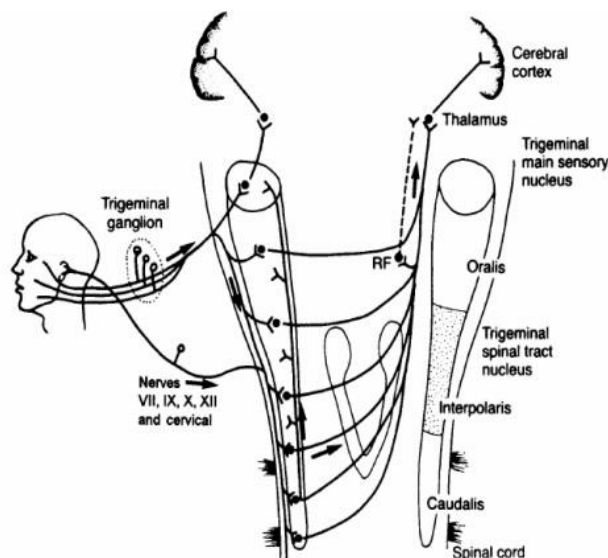


Figura 2: La principal vía del dolor transmite información sensorial desde la boca y la cara. (Reichling y Levine, 2009).

IV. DOLOR NEUROPÁTICO OROFACIAL

Muchos son los factores implicados, en la etiología de los dolores neuropáticos asociados al área orofacial, entre los que encontramos, injuria o compresión del nervio trigémino, daño inflamatorio del mismo, infección con virus herpes, entre otros (Baron y cols., 2010; Zakrzewska y McMillan, 2011). Sin embargo, no todas las injurias que sufre el V par craneal dan lugar a dolor neuropático, inclusive su incidencia es relativamente baja tras extracciones dentales, trauma facial, cirugías ortognáticas y colocación de implantes dentales (Hargreaves, 2011; Iwata y cols., 2011).

El patrón individual de los síntomas sensitivos refleja el mecanismo que causa el dolor y puede además determinar la razón para la respuesta al tratamiento

individual y diferencial. Por lo tanto, se propuso una nueva estrategia de clasificación en la cual el dolor es analizado en base al fenotipo sensitivo, más que en la causa subyacente.

Una técnica psicofísica estandarizada para evaluar los sistemas aferentes nociceptivos y no-nociceptivos fue propuesta por la red alemana de dolor neuropático (DFNS). Este protocolo usa 13 estímulos sensitivos distintos mecánicos y térmicos, evaluados en un ensayo clínico multicéntrico que comprende perfiles sensitivos completos de 1.200 pacientes con distintos tipos de dolor neuropático. La combinación de los distintos signos sugiere la presencia de uno u otro mecanismo fisiopatológico. Por ejemplo, la hiperalgesia al calor combinada con alodinia mecánica e hiperalgesia mecánica puede indicar actividad ectópica periférica en los nociceptores sensibles al calor, gatillando la sensibilización central.

El tratamiento de este tipo de dolor constituye un desafío, pues existen muchos pacientes que no logran obtener un alivio adecuado, dada la coexistencia de aspectos psicológicos y emocionales (Baron y cols., 2010).

Algunos modelos de dolor neuropático en animales implican la constricción crónica del nervio infraorbitario o del nervio alveolar inferior, por lo que una de las terapéuticas propuestas para este tipo de dolor son procedimientos de descompresión nerviosa. Sin embargo, este procedimiento es altamente invasivo por lo que se reserva para situaciones excepcionales (Sindou, 2010; Zakrzewska y McMillan, 2011).

Respecto al manejo farmacológico del dolor, clásicamente se han utilizado anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), que se reservan para el dolor leve a moderado, y analgésicos del tipo opioide para el dolor severo (Miranda y cols., 2009; Pelissier y cols., 2002; Puebla, 2005). Sin embargo, los AINEs suelen ser insuficientes para aliviar el dolor neuropático a un nivel aceptable. Por otra parte, el tratamiento con analgésicos opioides tradicionales, como morfina y similares puede no ser óptimo, causando efectos secundarios tales como estreñimiento, euforia, sedación y náuseas (Miranda y cols., 2009; Rowbotham, y cols., 1998). El manejo

de este tipo de dolor, responde mejor a medicación antiepiléptica y a fármacos antidepresivos (Reisner y Pettengill, 2001).

En general, los fármacos utilizados comparten mecanismos de acción, como la disminución de la excitabilidad, y conducción de potenciales de acción a través de fibras nerviosas (Attal y cols., 2010),, aunque los mecanismos para algunos medicamentos no están del todo dilucidados, como es el caso de la gabapentina (Cheng y Chiou 2006; Uchitel y cols., 2010).

En vista de la necesidad de encontrar la manera más eficaz para el tratamiento del dolor neuropático, los investigadores continúan intentando identificar nuevas terapias. Si bien es cierto que en algunos casos las terapias combinadas de fármacos antiepilépticos y antidepresivos, tienen mejores resultados que la monoterapia, en términos de tolerancia y eficacia frente a este tipo de dolor, no es adecuado generalizar (Selph y cols., 2011).

Existe evidencia que sugiere, que la combinación de gabapentina (antiepiléptico) con AINEs, tiene beneficios claros comparados con la monoterapia. El naproxeno, es un AINE con propiedades analgésicas, antipiréticas y anti-inflamatorias, siendo su sal sódica, de absorción más rápida para su uso como analgésico. Su mecanismo de acción, al igual que otros AINEs, aunque no definido completamente, está ligado a la inhibición de las ciclooxigenasas (COXs), tanto COX-1 como COX-2 (Setiawati y cols., 2009).

Los estudios en animales, permiten la investigación de los mecanismos fundamentales asociados al dolor, no obstante, es imprescindible realizar la distinción, entre los conceptos de nocicepción y dolor cuando se utilizan pruebas de nocicepción en animales.

De acuerdo a la IASP la nocicepción se define como “mecanismos neuronales de codificación y procesamiento de estímulos nocivos”, incluye todos los mecanismos por los cuales los estímulos nocivos son detectados, codificados y transferidos hacia centros superiores, así como también las respuestas reflejas para

proteger el organismo. En cambio, el dolor es una experiencia consciente que requiere de integración cortical y de la interpretación de la información nociceptiva, con componente afectivo. Es por esta razón, que se habla de test de nocicepción y no de dolor, pues clínicamente los pacientes describen el dolor verbalmente, lo cual en modelos animales no es posible (Barrot, 2012).

Múltiples pruebas y modelos de nocicepción han sido desarrollados en roedores, algunas de las cuales utilizan estímulos térmicos, eléctricos, mecánicos y químicos para medir nocicepción, que han permitido un progreso rápido en el conocimiento de las bases anatómo-moleculares, fisiológicas y patológicas del dolor. Existen pocos modelos de comportamiento en animales de laboratorio dedicados al estudio de la nocicepción en la región trigeminal, y se han llevado a cabo pocos estudios con analgésicos en esta área comparativamente (Barrot, 2012; Luccarini y cols., 2006; Puebla, 2005).

V. CONTROL DEL DOLOR CON FÁRMACOS

El ser humano desde siempre ha buscado mitigar el dolor, y los fármacos siempre han jugado un rol preponderante en este propósito. Sin embargo, no fue hasta alrededor 1960, que nacen las primeras unidades para el estudio y tratamiento del dolor, cuya base científica, son los cimientos de lo que se sigue investigando actualmente.

Para el control del dolor se dispone de un número considerable de medicamentos, que difieren en su composición química, así como en la vía de administración. Según sea su sitio de acción, pueden actuar en tres niveles: en la conducción (analgésicos locales), a nivel central (analgésicos opioides), y a nivel periférico (AINEs o corticoides) por citar algunos. (Miranda y Pinardi, 1997; Pelissier y cols., 2002).

Cabe mencionar que existen otro tipo de fármacos, los α -adrenérgicos, colinérgicos, nitridérgicos, serotoninérgicos, antidepresivos tricíclicos,

anticonvulsivantes y cannabinoides, que ejercen su función en receptores presinápticos y postsinápticos en neuronas a nivel espinal y supraespinal (α -adrenérgicos, serotoninérgicos, y muscarínicos) ya mencionados (Reisner y Pettengill, 2001).

Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de medicamentos ampliamente usados para tratar el dolor, la inflamación y la fiebre. En este grupo se incluyen medicamentos tan conocidos y usados como el ácido acetil-salicílico, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, piroxicam, etc. (Florez y cols., 2003; Martin y Forouzanfar, 2011).

Se trata de fármacos que se han utilizado para aliviar síntomas como el dolor, la inflamación aguda y crónica y así han contribuido de forma muy importante a mejorar la calidad de vida del ser humano puesto que son de gran utilidad para controlar enfermedades incapacitantes como las enfermedades reumáticas (Florez y cols., 2003; Miranda y Pinardi, 1997).

En su mayoría son ácidos orgánicos débiles que cuentan con una composición molecular variada, compartiendo el mecanismo de acción, que consiste en la inhibición de la ciclooxigenasas (COXs), enzimas encargadas de catalizar la transformación del Ácido Araquidónico en Prostaglandinas, que regulan múltiples sitios a lo largo de la vía nociceptiva e intensifican el proceso de transducción (efecto de sensibilización periférica), como el de transmisión (efecto de sensibilización central). Por lo tanto, cuentan con acciones farmacológicas comunes a nivel periférico y algunos también a nivel central (Gonzalez y cols., 2011; Vane, 2003).

Los AINEs no sólo actúan sobre las COXs, sino que tienen otras muchas acciones implicadas en la respuesta inflamatoria, como la producción de radicales libres, la síntesis de óxido nítrico, etc. que pueden contribuir a su efecto terapéutico. La mayoría de estos fármacos tienen acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética, pudiendo ser su eficacia relativa distinta para cada una de ellas. Sin

embargo, se conocen varios efectos adversos que restringen su prescripción (Florez y cols., 2003; Klasser y Epstein, (2005); Vane, 2003; Warner y Mitchell, 2004).

Naproxeno

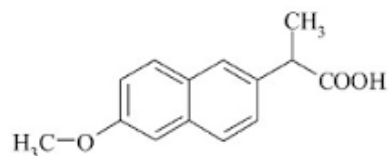


Figura 3: Esquema de la estructura química del naproxeno. (Florez y cols., 2003)

El naproxeno es un derivado del ácido propiónico, es un inhibidor no selectivo de las COXs (Florez y cols., 2003; Mendoza, 2008). Es liposoluble, prácticamente insoluble en agua a pH menor a 4 y muy soluble en metanol y agua con pH alto. Es un AINE con propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias (fig. 3). La sal de naproxeno ha sido desarrollada como una formulación de absorción más rápida para su uso como analgésico. Se indica para el tratamiento del dolor leve a moderado (Setiawati y cols., 2009).

El mecanismo de acción del ión naproxeno, no se comprende totalmente, pero se relaciona con la inhibición de ambas COXs (COX-1 y COX-2) en forma balanceada. Es de rápida absorción, que se ve influenciada por la presencia de alimento en el estómago.

En cuanto a la absorción, se hace rápida y eficientemente, con una biodisponibilidad por vía oral, cercana al 95%. La vida media de eliminación está entre 12 y 17 horas. El estado estable (steady state) se alcanza, después de 4 a 5 días de administración continuada. El peak de concentración plasmática se obtiene entre 2 y 4 horas luego de su administración oral, y su aparición es más prolongada que en las formas farmacéuticas donde el Naproxeno es una sal sódica.

En lo que se refiere a la distribución, al volumen de distribución es de 0,16 L/kg. A las concentraciones terapéuticas se une a las proteínas plasmáticas en un 99%. Cruza la barrera placentaria y se excreta en la leche materna, alcanzando concentraciones equivalentes al 1% de la máxima concentración plasmática. Vida

media plasmática: está entre 12 y 17 horas. La correspondiente a sus dos metabolitos principales y sus respectivos conjugados, es menor de 12 horas.

Es extensamente metabolizado en el hígado a 6-orto-desmetil naproxeno, un metabolito sin actividad antiinflamatoria de importancia. Esta O-desmetilación es llevada a cabo por 3 isoenzimas del complejo del citocromo P-450 (1A2, 2C8, 2C9). Pero ni la sustancia madre ni sus metabolitos, inducen enzimas del complejo de metabolización de fármacos. Tanto el Naproxeno como el 6-orto-desmetil naproxeno son posteriormente transformados en sus respectivos derivados acil-glucurónidos y finalmente excretados por orina y heces.

En cuanto a su excreción, aproximadamente el 95% de la dosis administrada es excretada por la orina y 3% o menos, por las heces. Como Naproxeno ácido (sustancia madre) < 1%, como 6-orto-desmetil naproxeno < 1% y como metabolitos conjugados del 66 al 92%. La depuración de Naproxeno (clearance) es de 0,13 ml/min/kg. En pacientes con insuficiencia renal, los metabolitos pueden acumularse (Setiawati y cols., 2009).

Varios estudios han determinado que el Naproxeno es un efectivo analgésico en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio, con baja incidencia de efectos adversos. Y posee mayor eficacia que otros en dolor agudo en pacientes con osteoartritis (Moore y cols., 2011(b); Singh y cols., 2006).

Reacciones adversas medicamentosas (RAM)

Estos fármacos así como tienen efectos terapéuticos favorables, también pueden presentar las llamadas reacciones adversas medicamentosas (RAMs), esto es, cualquier respuesta no deseada y no intencionada que ocurre con la administración en sus dosis terapéuticas. Las principales reacciones adversas que se registran en la mayoría de los casos son: gastrointestinales, hematológicas, renales, hepáticas, hipersensibilidad, sistema cardiovascular y embarazo (Florez y cols., 2003; Warner y Mitchell, 2004).

A fin de disminuir los efectos adversos, la investigación no ha cesado en busca de mejorar su eficacia y que a la vez sean más seguros. Las estrategias empleadas para el desarrollo de los AINEs, se han abordado desde distintos enfoques: mejorar su especificidad de acción; considerar que todas las PGs sintetizadas independiente de la COX están implicadas en la aparición de inflamación, fiebre, dolor; combinar los inhibidores de la COX con lo que se busca obtener un sinergismo de fármacos que permita disminuir las dosis de cada fármaco y los efectos adversos (Herrero y cols., 2003).

Antiepilépticos

Los primeros antiepilépticos o anticonvulsivantes fueron los bromuros que se utilizaron a finales del siglo XIX. El fenobarbital fue el primer medicamento orgánico sintético que poseía actividad anticonvulsiva. Las estructuras químicas de muchos de los fármacos introducidos antes de 1965 tenían relación cercana con el fenobarbital e incluyeron las hidantoínas y las succinimidas (Florez y cols., 2003).

Entre 1965 y 1990 se introdujeron las benzodiazepinas con estructuras diferentes (carbamazepina, ácido valproico) y es en la década del '90 que se identifica entre otros a un análogo tricíclico de GABA (gabapentina).

Son medicamentos que se utilizan para la prevención y tratamiento de las convulsiones. No obstante este uso claro y establecido para estos medicamentos; en el último tiempo, medicamentos de este grupo, se han usado para el tratamiento de condiciones dolorosas crónicas. Clínicamente han mostrado eficacia en el tratamiento de la neuropatía diabética, la neuralgia post herpética, neuralgia del trigémino, dolor orofacial y odontalgia atípica (Attal y cols., 2010; Reisner y Pettengill, 2001).

Los anticonvulsivantes se clasifican en: clásicos, de primera y segunda generación; nuevos de tercera generación (entre los cuales se encuentra la gabapentina) y otros. (Reisner y Pettengill, 2001).

Los antiepilépticos producen gran variedad de efectos directos, indirectos y compensatorios que hace difícil saber con seguridad cuál es el responsable de su acción anticonvulsivante.

La acción de los antiepilépticos es en general más inespecífica: su efecto estabilizador de la membrana y modificador del tono neurotransmisor ejerce un efecto protector independientemente de la causa específica, y muchas veces desconocida. De hecho, la mayor parte de los fármacos antiepilépticos tienen poco efecto sobre el foco epiléptico; más bien impiden la propagación de la descarga a estructuras normales vecinas. Es decir, que implican la disminución de la neurotransmisión excitatoria aferente y facilitan la inhibición segmentaria.

Dentro de sus múltiples mecanismos de acción podemos indicar la inhibición de los canales de sodio (carbamazepina, fenitoína), la facilitación de la inhibición GABAérgica, la inhibición de la excitación glutamatérgica y la inhibición de los canales T de calcio talámicos en los distintos grupos (Cheng y Chiou, 2006; Reisner y Pettengill, 2001).

GABAPENTINA

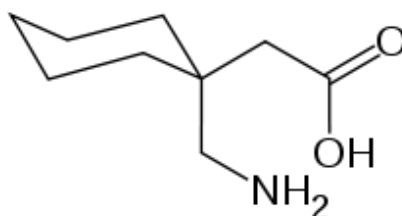


Figura 4: Esquema de la estructura química de la gabapentina. (Florez y cols., 2003)

La Gabapentina, fue aprobada inicialmente por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de EE.UU. en 1994, para su uso como un medicamento complementario para controlar las convulsiones parciales. En 2002, conserva su uso y se añadió una indicación para el tratamiento del dolor neuropático (Pfizer: Product Monograph Neurontin® — PDF, 2006).

Como ya se estableció, se encuentra clasificada en el grupo de los nuevos antiepilépticos o de tercera generación, es un derivado aminoacídico estructuralmente análogo al GABA, que consta de una molécula de GABA unida en forma covalente a un anillo lipófilo de ciclohexano. La gabapentina se creó pensando en un agonista de GABA de acción central.

Su mecanismo de acción ha sido extensamente estudiado, y existen múltiples hipótesis al respecto, pero no está ciertamente establecido. Se sabe que se une con gran afinidad, a una proteína de las membranas corticales con una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la de la subunidad $\alpha 2\delta-1$ del conducto de Ca^{2+} .

Aún no se establece si la unión de la gabapentina con la $\alpha 2\delta-1$, regula la excitación neuronal ni la manera como lo hace, ni si los efectos anticonvulsivos y analgésicos son mediados por modificaciones de las corrientes de Ca^{2+} y, de ser así, como lo hacen. Los canales de calcio se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC; por este motivo, estos fármacos modifican la función neuronal en múltiples localizaciones (Moore y cols., 2011; Reisner y Pettengill, 2001).

Se absorbe rápidamente por vía oral y utiliza el sistema de transporte de los L-aminoácidos, que puede saturarse cuando se utilizan dosis elevadas, dando lugar a una cinética dosis-dependiente de tipo decreciente; con dosis por encima de 1.800 mg/día, su fracción de absorción disminuye desde el 60% hasta el 27%. Por otra parte, los antiácidos reducen en el 25 % su fracción de absorción.

Pasa con rapidez al SNC utilizando de nuevo el sistema de transporte de los L-aminoácidos, que tiene importancia en su paso a través de la barrera hematoencefálica y para la absorción intestinal, pero no tiene relación con su acción analgésica. El uso de este sistema, puede provocar una deficiencia de leucina, isoleucina y valina que reduzca la síntesis de ácido glutámico; esto podría explicar el retraso que se observa entre los niveles cerebrales de gabapentina y sus efectos. No se une a las proteínas del plasma y no se metaboliza, excretándose por la orina

en forma inalterada. La insuficiencia renal reduce su eliminación, requiriendo reducir las dosis (Cheng y Chiou, 2006, Reisner y Pettengill, 2001).

La gabapentina posee una absorción no lineal, que se explica por su transporte por medio de transportadores saturables (L-aminoácido) lo que resulta en una biodisponibilidad no proporcional al aumento de las dosis. Su vida media plasmática es de 5-7 horas. No obstante, las concentraciones medias, en general, se comportan de un modo dependiente de la dosis, pero sin llegar a una estabilidad proporcional, posiblemente porque el fármaco se difunde todavía en el intestino de forma pasiva. Como ya se ha dicho, la gabapentina se creó pensando en un agonista de GABA de acción central, y dada su mayor lipofiliidad que GABA, puede cruzar con facilidad la barrera hematoencefálica, pero aunque aumenta el tono gabaérgico, ni se convierte en GABA, ni tiene efectos directos sobre el receptor GABA.

En el fluido espinal se encuentra entre 5-35% de la concentración plasmática y un 80% de esta se encuentra a nivel cerebral. Es excretada de manera inalterada, completamente por vía renal (Pfizer: Product Monograph Neurontin® — PDF, 2006; Singh y Kennedy, 2003).

Sus aplicaciones terapéuticas incluyen el tratamiento de crisis epilépticas parciales, trastorno bipolar, fobia social, migraña, tratamiento de la dependencia de opioides y condiciones de dolor crónico: neuropatía diabética, NPH y NT (Cheng y Chiou, 2006).

Se estima que este fármaco provee un alivio moderado frente al dolor crónico (disminución del 30%) en 1 de 2 pacientes, y un alivio sustancial (disminución de 50%) en 1 de 3 pacientes (Moore y cols.,2011(a)). A raíz de esto último, se desprende que la combinación de medicamentos con diferentes mecanismos de acción, podría ser adecuada para alcanzar mayores niveles de eficacia (Maizels y McCarberg, 2005).

Existe evidencia que sugiere beneficios de la terapia combinada de gabapentina

con otros fármacos con otros mecanismos de acción, lo que resulta en una analgesia sinérgica, permitiendo una mayor eficacia y tolerancia (Attal y cols., 2010; Setiawati y cols., 2009).

Reacciones Adversas Medicamentosas (RAMs)

En general la gabapentina es bien tolerada y sus efectos secundarios más frecuentes son: somnolencia, mareo, ataxia y fatiga. Estos efectos suelen ser leves a moderados, pero desaparecen en unas dos semanas de tratamiento continuo. Pertenecen a la categoría C para el embarazo (Maizels y McCarberg, 2005; Pfizer: Product Monograph Neurontin® — PDF, 2006). También la gabapentina se asocia con mioclono, aumento de peso, y edema periférico. Los estudios demuestran una relación entre la dosis y la incidencia de efectos adversos, por lo que un aumento paulatino de la dosis permite mejor tolerancia (Uchitel y cols., 2010). Estos efectos adversos se presentan en 2/3 de las personas que lo consumen, siendo necesario suspender el tratamiento solo en 1 de cada 10 casos (Moore y cols., 2011(a)).

Una de las principales ventajas de la gabapentina es que no influye sobre el metabolismo de otros fármacos, ni en su eliminación resulta influida por otros antiepilépticos. Pero, la eliminación de la gabapentina es reducida por cimetidina (Florez y cols., 2003).

HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal (i.p.) de Gabapentina en combinación con Naproxeno, induce un efecto antinociceptivo de tipo sinérgico, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones.

Objetivo General

Estudiar la actividad antinociceptiva de Gabapentina, Naproxeno y su combinación en el test de la formalina orofacial en ratones.

Objetivos Específicos

1.- Evaluar el efecto antinociceptivo inducido por la administración Intraperitoneal (i.p.) de gabapentina y naproxeno en el test de la formalina orofacial en ratones. Para esto se realizará:

- Cuantificación del tiempo total de frotamiento del área perinasal.
- Determinación de la dosis que produce el 50% del efecto máximo (DE_{50} del E_{max}).

2.- Determinar la naturaleza e intensidad de la interacción farmacológica de gabapentina con naproxeno a través de la construcción de isobogramas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 120 ratones machos de la cepa CF/1 (*Mus Musculus*), con un peso entre 28 g. a 30 g. (fig. 5). Los animales fueron aclimatados al entorno del laboratorio al menos dos horas antes de realizar cada experimento, manteniéndose en condiciones estándar de temperatura (22° C a 24°C), humedad e iluminación según las normas éticas internacionales que rigen este tipo de experimentación (Protocolo 637 de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina).

Para realizar la observación se utiliza un cilindro acrílico transparente, cuyas dimensiones son: 20 cm. de alto y 20 cm. de diámetro, con un sistema de espejos posteriores que forman un ángulo recto entre sí y permiten la observación completa de sus movimientos. Cada animal fue puesto en el cilindro 10 min antes de realizar el experimento para su habituación y minimización del stress, y evitar así conductas de exploración durante la realización del test.

Basándose en las normas bioéticas internacionales que rigen este tipo de experimentación y el protocolo CBA N° 0238 FMUCH, cada uno recibió sólo una dosis de las drogas y la cantidad de animales utilizada es: 24 controles, 24 con naproxeno, 24 con gabapentina, 24 para combinación de fármacos para estudio en Fase I, 24 para combinación de fármacos para estudio en Fase II en el experimento, por lo tanto, se utilizó la cantidad necesaria para la realización de un correcto análisis estadístico.

Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de realizado el experimento por personal capacitado mediante dislocación cervical bajo anestesia con pentotal, 60mg/kg, i.p.

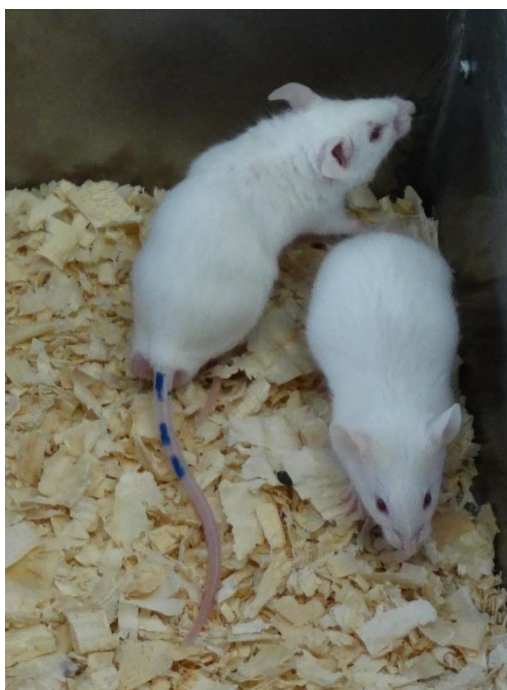


Figura 5: Ratones macho de la cepa CF/1 Mus Musculus.

Administración de drogas

Los fármacos y materiales fueron suministrados por el Laboratorio de Neurofarmacología del dolor de la facultad de medicina de la Universidad de Chile.

- Fármacos administrados: Gabapentina (Neurotin, Pfizer, Chile); Naproxeno (Eurogesic, Saval, Chile).
- Solución administrada: Formalina al 2% y Solución Salina al 0,9 %
- Jeringas: Tuberculina (1 ml) para inyección intraperitoneal (i.p.) y Hamilton (50 μ l) para inyección subcutánea.
- Agujas: 27 Gauge.
- Cronómetros digitales.

Los fármacos se administraron disueltos en solución salina (i.p.) en un volumen constante de 10 ml/kg de peso.

Las dosis utilizadas fueron 3,10, 30 y 100 mg/kg tanto para Gabapentina como

Naproxeno. La inyección intraperitoneal se realizó 30 min antes del ensayo algesiométrico, puesto que existen evidencias que demuestran que es el tiempo necesario para alcanzar el efecto analgésico máximo de ambos fármacos. El grupo control sólo recibió solución salina fisiológica.

Test de la Formalina

La evaluación de la actividad nociceptiva y antiinflamatoria se efectuó a través del test algesiométrico orofacial de la formalina, para evaluar el dolor producido por la estimulación del nervio trigémino. Se utilizó una modificación al test algesiométrico de Luccarini. Se realizó una inyección subcutánea con 20µl de solución de formalina al 2% en el labio superior derecho de cada ratón, para luego dejarlo nuevamente en el cilindro de observación. La inyección induce un frotamiento de la zona inyectada, con sus extremidades delanteras o traseras ipsilaterales. Luego de la inyección se cuantificó el tiempo total de frotamiento del área perinasal por un observador (fig.6) (Le Bars y cols., 2001).

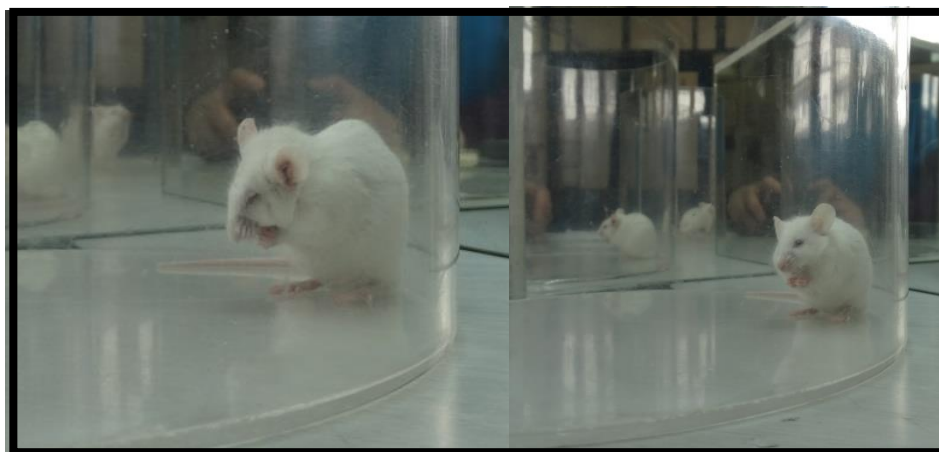


Figura 6 : Frotamiento de la zona perinasal con ambas patas delanteras.

Criterios de exclusión

Inyección incompleta de formalina o sangrado excesivo en el sitio de la inyección.

Diseño experimental

Los ensayos se realizaron en forma ciega, aleatoria y controlada con solución salina. El tamaño total de la muestra fue de 120 ratones ($n=120$), separados en 5 grupos e inyectados intraperitonealmente con las distintas soluciones incluidas en el estudio. (fig.7)

Grupo control: los ratones recibieron la administración de 10 ml/kg de solución salina al 0,9% vía i.p. 30 minutos antes de la inyección de solución de formalina al 2%. Se utilizaron 24 animales.

Grupo de estudio de Gabapentina: los ratones fueron inyectados con Gabapentina vía i.p. con dosis de 3, 10, 30, 100 mg/kg. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.

Grupo de estudio de Naproxeno: los ratones fueron inyectados con Naproxeno vía i.p. con dosis de 3, 10, 30, 100 mg/kg. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.

Grupo de estudio de la combinación de Gabapentina y Naproxeno para Fase I: los ratones fueron inyectados vía i.p. con la combinación de ambos fármacos con la proporción 1:1, en fracciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus correspondientes DE_{50} durante la Fase I. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.

Grupo de estudio de la combinación de Gabapentina y Naproxeno para Fase II: los ratones fueron inyectados vía i.p. con la combinación de ambos fármacos con la proporción 1:1, en fracciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus correspondientes DE_{50} durante la Fase II. Para cada una de las dosis se utilizaron 6 animales.



Figura 7: a) Inyección intraperitoneal (i.p.) del fármaco o solución salina.
b) Inyección subcutánea de formalina al 2% en el labio superior.

Evaluación de la analgesia

La evaluación de cada uno de los fármacos en cuanto a su actividad antinociceptiva, se realizó gracias a la construcción de curvas dosis respuesta.

Las curvas se construyeron usando el logaritmo de las dosis en la abscisa y el efecto antinociceptivo, expresado como máximo efecto posible (MEP), en la ordenada. Este máximo efecto posible, representa la actividad analgésica y se obtuvo con la fórmula (Tallarida, 2001):

$$\%MEP = 100 - [(tiempo\ de\ frotamiento\ experimental / tiempo\ de\ frotamiento\ control) \times 100]$$

Una vez obtenidas las curvas dosis respuesta de cada uno de los fármacos, se ajusta una recta por análisis de regresión lineal obtenida por los cuadrados mínimos, permitiendo calcular la dosis que produce un 50% del efecto máximo posible (DE_{50}) de analgesia, cuando se administra cada fármaco individualmente.

La administración conjunta de Gabapentina y Naproxeno en proporción fija basada en las fracciones de sus respectivas DE_{50} (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) también genera una curva dosis-respuesta.

En el análisis isoblográfico se utilizaron las dosis isoeffectivas de los valores de

DE₅₀ de cada fármaco obtenidos en la prueba de la formalina orofacial.

A fin de comparar el efecto de los distintos fármacos se calcula la potencia relativa, que relaciona la cantidad o dosis de fármaco administrada y la acción que produce. Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Potencia relativa} = \text{DE}_{50} \text{ droga x} / \text{DE}_{50} \text{ droga y}$$

En donde:

Droga x: es la que presenta el mayor valor de DE₅₀.

Droga y: es la que presenta el menor valor de DE₅₀.

El método isobolográfico es un método descrito por Tallarida y colaboradores, integrado en el Programa Pharm Tools Pro, versión 1.27 (McCary Groups, Inc. PA, USA) (Tallarida, 2000), modificado en el Laboratorio de Neurofarmacología del dolor, de la Universidad de Chile, su propósito es evaluar la interacción producida entre los fármacos (en ambas fases), el programa permite saber si hay interacción entre ellos, de que tipo y cuál es su magnitud. Esto se logra a través de gráficos de dosis isoefectivas de cada uno de los fármacos en estudio. Se administró en forma conjunta los fármacos, en proporciones de 1:1, por vía i.p. de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sus DE₅₀, en un esquema de proporciones fijas para ambas fases. Luego, las curvas dosis-respuesta fueron analizadas con regresión lineal por cuadrados mínimos para calcular las DE₅₀ de las mezclas. Esta dosis se comparó estadísticamente con la DE₅₀ que representa teóricamente la adición simple de efectos, que se obtiene con la fórmula:

$$\text{DE}_{50} \text{ aditividad teórica} = \text{DE}_{50} \text{ droga1} / (\text{P1} + \text{R} \times \text{P2})$$

Donde

R: relación de potencia entre los fármacos administrados por separado

P1: proporción de Gabapentina en la mezcla.

P2: proporción de Naproxeno en la mezcla.

El punto experimental resultante se grafica en un sistema cartesiano que tiene

una línea que conecta la DE_{50} de Gabapentina en la ordenada (línea simple o teórica), con la DE_{50} de Naproxeno en la abscisa. La región del gráfico donde se ubica el valor del punto experimental en relación al valor teórico determina el tipo de interacción. Si el valor experimental se ubica bajo la línea de aditividad y es estadísticamente diferente al valor teórico de la DE_{50} , la interacción es de tipo sinérgica o supraaditiva. En cambio, si el punto experimental se sitúa sobre la línea de aditividad y es estadísticamente distinto de la DE_{50} teórica, la interacción será subaditiva o antagónica, mientras que si se ubica cerca de la línea de aditividad y además estadísticamente no es diferente de la DE_{50} teórica, será una interacción de simple aditividad.

Por otra parte el programa permite conocer el índice de interacción (I.I) de los fármacos, este es un valor que confirma la naturaleza de la interacción entre las drogas, a través de esta fórmula:

$$\text{Índice de interacción} = DE_{50} \text{ experimental} / DE_{50} \text{ teórica}$$

El cociente permitirá identificar la magnitud de la interacción, valores menores a 1 indican una interacción sinérgica, si es igual a 1 es aditiva y si es mayor a 1 es antagónica. (Luccarini y cols., 2006)

Análisis Estadístico

En el presente estudio los resultados se consideran como el promedio \pm error estándar del promedio (EEM) o con su límite o intervalo de confianza correspondiente al 95% (LC 95%). Todos los parámetros se calcularon con el programa Pharm Tools Pro, versión 1.27 (McCary Groups, Inc. PA, USA) elaborado en base a las publicaciones de Tallarida, y la significación estadística fue considerada a un nivel de 5% ($p < 0,05$) evaluado por el test de Student (Tallarida R. 2000).

El número mínimo de ratones de todos los experimentos se calculó de acuerdo a la variabilidad de los procedimientos experimentales y de acuerdo a la variación

intrínseca entre los animales.

La determinación del número mínimo de muestra, se realizó según la ecuación $n=2(Z\alpha +Z\beta)^2 \times S^2/\delta^2$ basado en lo descrito por Zar J. 1984, n: sujeto necesario en cada una de las muestras; S:desviación estándar; δ :diferencia que se espera estimar como estadísticamente significativa; $Z\alpha$: probabilidad de cometer un error estadístico tipo I (5%); $Z\beta$: probabilidad de cometer un error estadísticamente significativo tipo II (20%).

Se determinará la normalidad de los datos y según eso se realizarán test para población con una distribución normal test paramétricos (T de Student o ANOVA). Por otro lado, si los datos no presentan una distribución normal se utilizará un test no paramétricos. De acuerdo a esto utilizando un nivel de confianza del 95%, una potencia del test del 80%, y considerando un 15% de pérdidas se estima utilizar 6 a 8 animales para cada grupo (control + tratados) (Dell and cols., 2002).

RESULTADOS

Evaluación de la antinocicepción

Grupo Control

Los ratones pertenecientes al grupo control presentaron como resultado un tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal derecha de 85.25 ± 3.35 para la fase I (n=24) y de 99.88 ± 4.14 para la fase II (n=24).

Grupo Tratado con Gabapentina

La administración i.p. de Gabapentina, produjo una disminución en el tiempo de frotamiento de forma dosis dependiente con respecto al grupo control; tanto en la fase algésica aguda (fase I) como en la fase inflamatoria (fase II) del ensayo.

Luego de estas curvas se obtiene la DE_{50} de la Gabapentina que fue de 1.084 ± 0.430 mg/kg. para la fase I (gráfico 1) y 0.926 ± 0.094 mg/kg. para la fase II (gráfico 2).

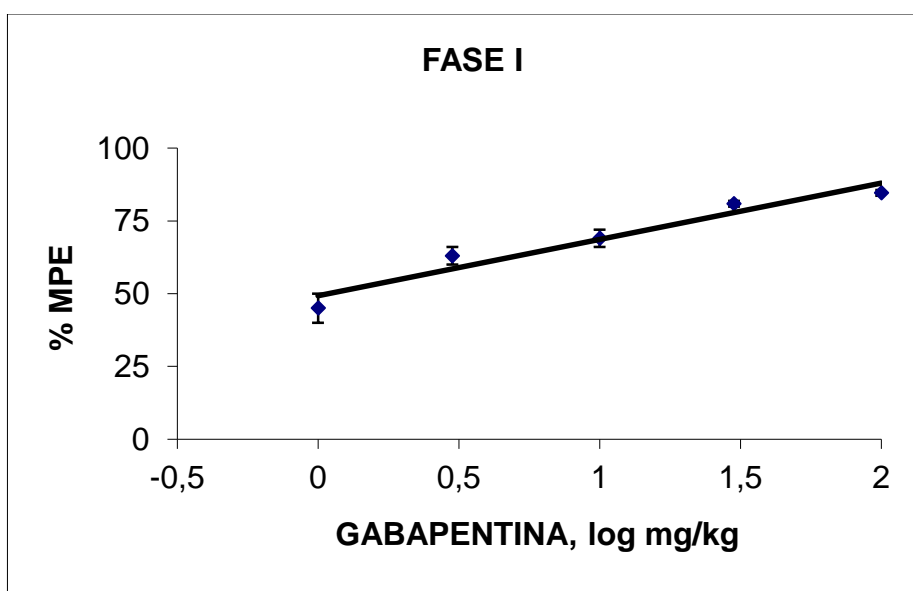


Gráfico N°1: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de Gabapentina en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM (n=6 para cada dosis).

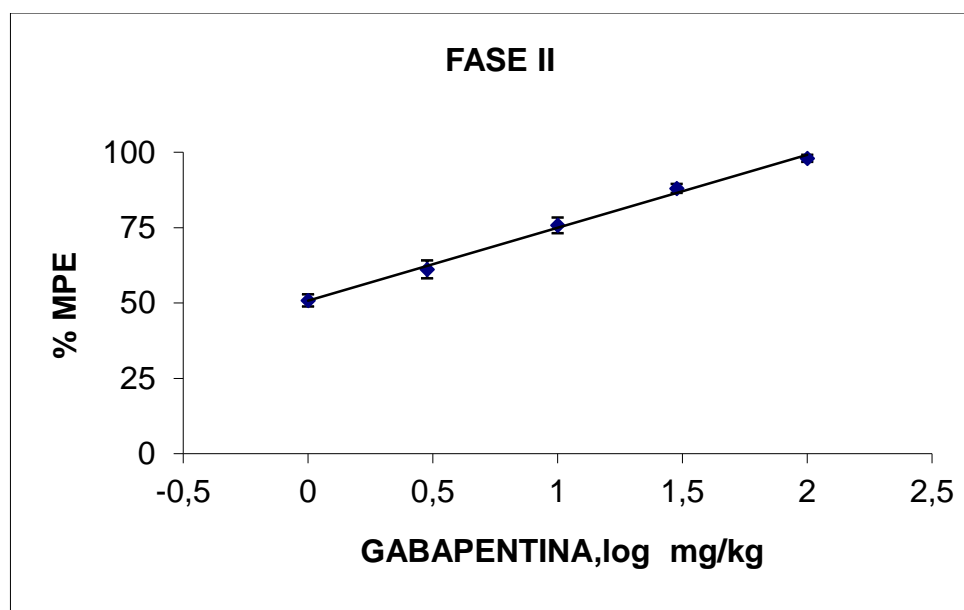


Gráfico N°2: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de Gabapentina en la fase II del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM (n=6 para cada dosis).

Grupo Tratado con Naproxeno

La administración i.p. de Naproxeno, disminuyó el tiempo de frotamiento de forma dosis dependiente con respecto al grupo control; tanto en la fase I, como en la fase II, del ensayo algiesiométrico orofacial.

Luego de estas curvas se obtiene la DE_{50} del Naproxeno que fue de 46.028 ± 4.005 mg/kg. para la fase I (gráfico 3) y 45.456 ± 2.929 mg/kg. para la fase II (gráfico 4).

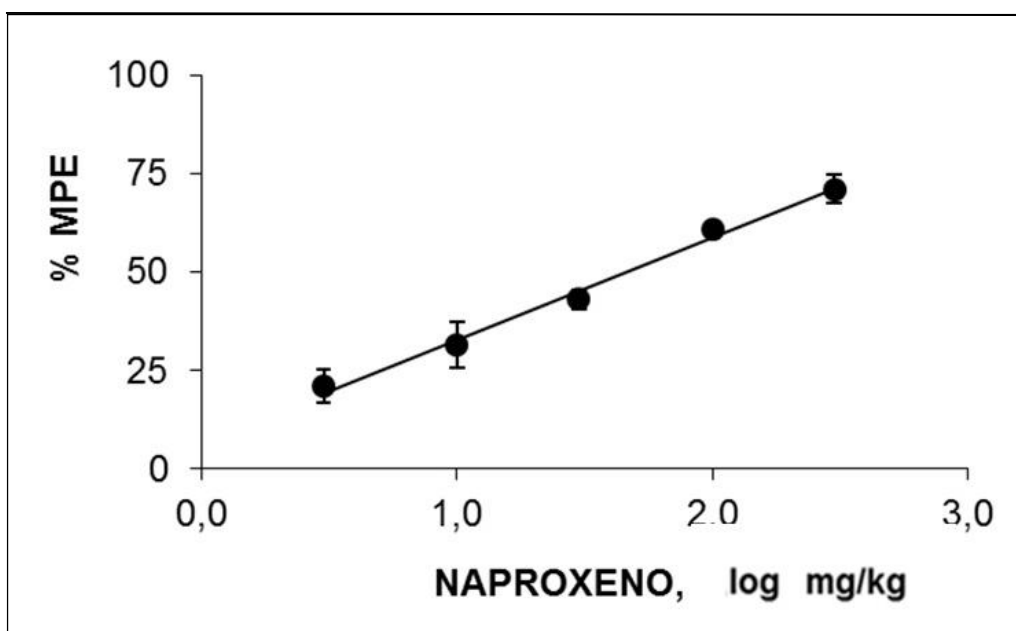


Gráfico N°3: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de Naproxeno en la fase I del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM (n=6 para cada dosis).

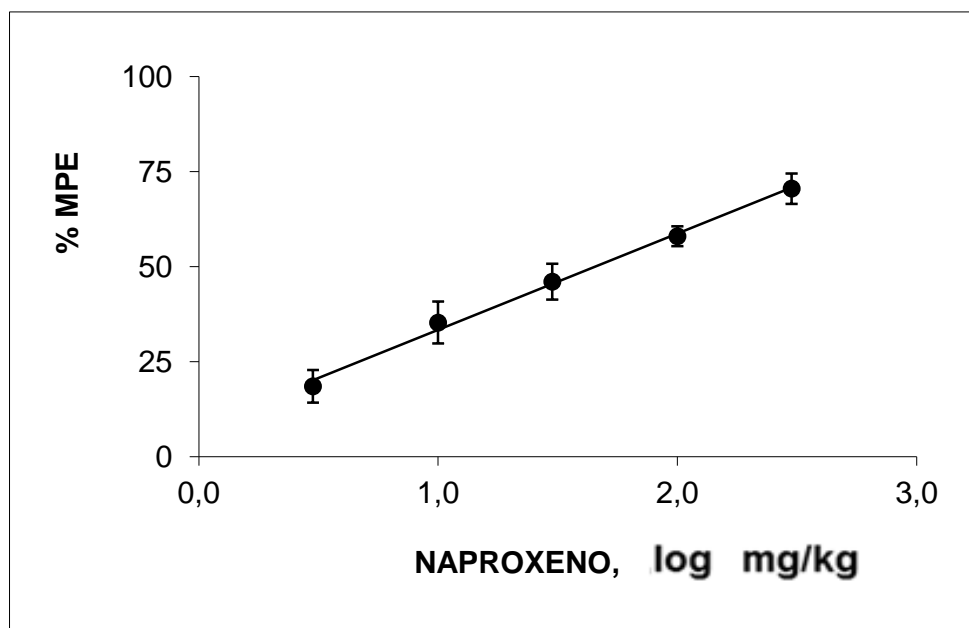


Gráfico N°4: Curva dosis-respuesta de la administración i.p. de Naproxeno en la fase II del test de la formalina orofacial. Cada punto representa el promedio \pm EEM (n=6 para cada dosis).

Grupo tratado con mezcla de gabapentina y naproxeno

Al administrar vía i.p la combinación de gabapentina y naproxeno en proporción 1:1 de cada una de sus respectivas DE_{50} , se obtuvo una actividad antinociceptiva dosis-dependiente en ambas fases, I y II. A partir de ellos se obtiene la DE_{50} para la combinación de los fármacos en estudio, que es: 0.36 para la fase I y 0.199 para la fase II.

2.- Análisis Isobolográfico

Del análisis isobolográfico de la combinación de fármacos, se obtuvo como resultado una interacción antinociceptiva de tipo supraaditiva o sinérgica, tanto para la fase I como para la fase II, esto se concluye por la ubicación del punto experimental, bajo la línea de aditividad, y con índices de interacción estadísticamente menores a 1 en ambas fases. - Gráficos 5 y 6.

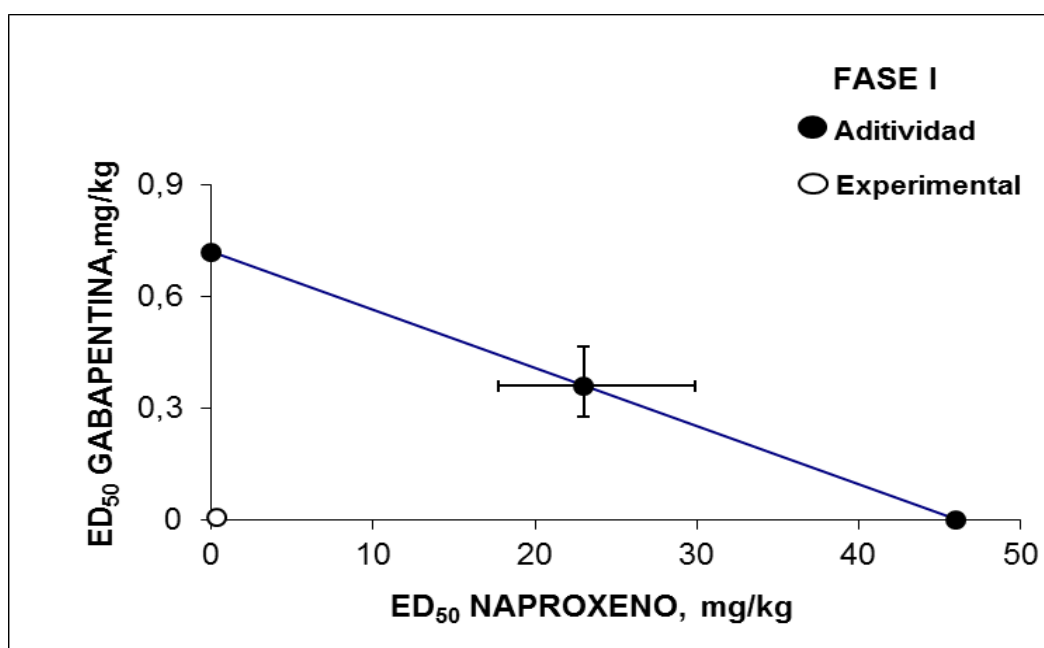


Gráfico 5: Isoblograma de interacción entre gabapentina y naproxeno, en el test de la formalina orofacial, en la fase I. El (●) en la línea de aditividad representa el punto de aditividad teórica de la mezcla y el (○) es el de aditividad experimental, cada uno con sus correspondientes LC al 95%.

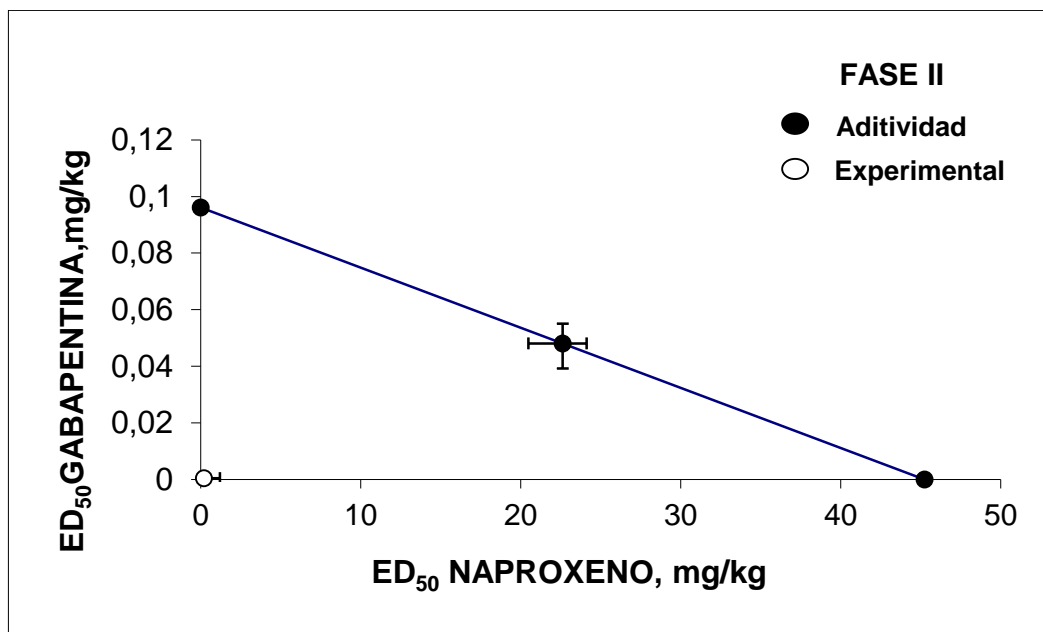


Gráfico 6: Isoblograma de interacción entre gabapentina y naproxeno, en el test de la formalina orofacial, en la fase II. El (●) en la línea de aditividad representa el punto de aditividad teórica de la mezcla y el (○) es el de aditividad experimental, cada uno con sus correspondientes LC al 95%.

DISCUSIÓN

El test algiesiométrico de la formalina orofacial, permite cuantificar el efecto antinociceptivo de fármacos en un modelo experimental con animales. Éste modelo resulta ser el modelo adecuado y útil para estudiar el dolor en el territorio trigeminal, ya que se considera similar a la respuesta dolorosa en humanos, porque la formalina (estímulo nociceptivo) genera una reacción de las fibras A δ y C, neuronas del asta dorsal de la médula y núcleos del trigémino, siendo el rascado o frotamiento por parte del animal una respuesta directa a ésta, en la que se distinguen dos fases, una algésica (Fase I) y otra algésica-inflamatoria (Fase II) (Capone y Aloisi, 2004; Luccarini y cols., 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la administración intraperitoneal de Naproxeno y Gabapentina produce una actividad antinociceptiva en ambas fases del ensayo, esto se deduce de la disminución significativa de los tiempos de rascado en los animales tratados farmacológicamente respecto del grupo control. Además indican que la respuesta antinociceptiva es dosis dependiente en ambas fases del ensayo. Esto concuerda con investigaciones previas que demuestran que la administración sistémica de AINEs (en este estudio Naproxeno) y antiepilépticos (en este estudio Gabapentina) producen actividad antinociceptiva en diversos modelos algiesiométricos en animales (Luccarini y cols., 2006; Maizels y McCarberg, 2005).

De acuerdo a los valores obtenidos de DE₅₀ de la actividad antinociceptiva, la Gabapentina presentó una potencia similar en ambas fases, así como el Naproxeno. A partir del análisis isoblográfico, donde se estudió la asociación de Gabapentina y Naproxeno, se obtuvo como resultado una interacción antinociceptiva de tipo supraaditiva o sinérgica, que se observó, tanto para la fase I como para la fase II. Esto se concluye dada la ubicación del punto experimental, que está bajo la línea de aditividad, y con índices de interacción estadísticamente menores a 1 en ambas fases. El sinergismo que queda evidenciado a través de este trabajo experimental, es concordante con la teoría general de interacción de drogas, que establece que la combinación de fármacos, es más efectiva que su acción individual (a través de

mecanismos de acción diferentes) y por lo tanto la posibilidad que actúen de forma supraaditiva es mayor. Es necesario considerar además, que aunque no existe un criterio definitivo que explique el mecanismo por el que se produce la sinergia entre fármacos, hay diversas teorías que proponen posibles mecanismos (Barrera y cols., 2005; Gonzalez y cols., 2011; Hargreaves, 2011; Moore y cols., 2011(a)).

La inyección de formalina en el labio superior constituye un modelo de dolor agudo orofacial, el Naproxeno produce por su parte una inhibición poco selectiva de la COX-1 y COX-2. La Gabapentina por su parte aumenta la concentración del neurotransmisor GABA a nivel cerebral que actúa como un agente sedante y equilibra la actividad de los nervios impidiendo que se produzcan descargas nerviosas rápidas y repetidas. Su mecanismo de acción exacto es desconocido, pero su acción terapéutica en el dolor neuropático implicaría la actividad de los canales iónicos de calcio tipo N dependientes de voltaje. Se piensa que se une a la subunidad $\alpha 2\delta$ de los mismos en el sistema nervioso central. La gabapentina alivia las molestias al modificar la forma en que el cuerpo siente el dolor.

Esta sinergia puede ser relevante, ya que permitiría disminuir las dosis terapéuticas de cada uno de éstos fármacos para obtener el efecto deseado, y a la vez reducir los efectos secundarios de cada uno en sus dosis terapéuticas (Barrera y cols., 2005; Florez y cols., 2003; Klasser y Epstein, 2005).

Por tanto, se proyectaría, una probable utilidad clínica de la presente investigación al evidenciar el comportamiento de estos dos fármacos que al ser coadministrados producen un efecto antinociceptivo sinérgico y dada ésta sinergia, la asociación de estos fármacos podría constituir una nueva herramienta farmacológica para el tratamiento del dolor neuropático.

CONCLUSIONES

- La administración intraperitoneal tanto de gabapentina como de naproxeno produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente, en el test algesiométrico de la formalina orofacial, tanto en la fase I como en la fase II.
- Naproxeno posee similar potencia analgésica en ambas fases.
- Gabapentina posee similar potencia analgésica en ambas fases.
- La coadministración intraperitoneal de Naproxeno y Gabapentina demostró una interacción de tipo sinérgica entre ambos fármacos en ambas fases en el test de la formalina orofacial.
- La coadministración de estos fármacos (Naproxeno y Gabapentina) permitiría una nueva alternativa farmacológica para producir un mayor efecto analgésico con menores dosis y reducción de los efectos adversos o secundarios no deseados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida T., Roizenblatt S., Tufik S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*. 1000: 40 – 56.
- Attal N., Cruccu G., Barón R., Haanpaa M., Hansson P., Jensen T.S., Nurmikko T., (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain. *European Journal of Neurology*; 17(9), págs. 1113-1188.
- Baron R., Binder A., Wasner G., (2010) Neuropathic pain, Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*; 9 (8), págs. 807-819.
- Barrera N.P., Morales B., Torres S., Villalón M. (2005). Principles mechanisms and modeling of synergism in celular responses. *Trends in Pharmacological Sciences* 26: 526-532
- Barrot M. 2012. Test and models of nociception and pain in rodents, neuroscience.
- Basbaum AI, Jessell TM. The Perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM eds. *Principles of Neural. Sciences*. 4th edition. NY. Mc Graw Hill 2000; 472-91.
- Bonica J.J. (1990). Definitions and taxonomy of pain. *The management of pain 2° edición*. Philadelphia, Lea & Febiger. Cap. 2 págs. 18-27
- Bonica J.J. (1990). Anatomic and physiology basics of nociception and pain. *The management of pain 2° Edición*. Philadelphia, Lea & Febiger. Cap. 3 págs. 28-94
- Bonica J.J. Loeser J.D. *History of pain Concepts and Therapies*. 3° edición. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Campbell J.N., Meyer R.A., 2006. Mechanisms of neuropathic Pain *Rev. Neuron*; 52 (1), págs. 77-92.
- Capone F., Aloisi AM (2004). Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann Ist super Sanita*.40(2):223-229.
- Cheng J.K., Chiou L.C., 2006. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin, *Journal of Pharmacological Sciences*; 100(5), págs. 471-486.
- Costigan M, Scholz J., Woolf C.J., 2009. Neuropatic pain: a maladaptative response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*; 32, págs. 1-32.
- Epstein J.B., Hong C., Logan R.M., Barash A., Gordon S.M., Oberle-Edwards L., McGuire D., Napenas J.J., Elting L.S., Spijkervet F.K., Brennan M.T., 2010. A

sistematic review of orofacial pain in patients receiving cancer therapy. *Supportive Care In Cancer*; 18(8), págs. 1023-1031.

Florez J., Armijo J.A., Mediavilla A.F. "Farmacología Humana". 4o Edición, Masson, Barcelona, España. 2003; cap. 20, págs. 3-361; cap. 22, págs. 355-387; cap. 29, págs.489-511.

Dell R., Holleran S., Ramakrishnan R. "Sample Size Determination" *ILAR J* (2002) 43 (4): 207-213 doi:10.1093/ilar.43.4.207.

Gonzalez C., Zegpi C., Noriega V., Prieto J.C., Miranda H. (2011). Synergism between dexketoprofen and eloxicam in an orofacial formalin test was not modified by opioid antagonist. *Pharmacological reports*. 63: 433 – 440.

Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (1999). Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council. Edición mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. Copyright National Academy Press, Washington, D.C.

Herrero J.F., Romero – Sandoval E. A., Gaitán G., Mazario J., (2003). Antinociception and the new COX inhibitors: research approaches and clinical perspectives. *CNS Drug Rev*. 9: 227 – 252.

Hargreaves KM. 2011. Orofacial Pain Review; *Pain*, 152 (3), Págs. 25-32.

Ito S., Okuda-Ashitaka E., Minami T., "Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin". *Neuroscience Res*. 2001; 41 (4), págs. 299-332.

Iwata K., Imamura Y., Honda K., Shinoda M., 2011. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *International Review of Neurobiology*; 97, págs. 227-250.

Klasser G.D., Epstein J. "Nonsteroidal Anti-inflammatory drugs: confusión, controversy and dental implications". *J Can dent Assoc*. 2005; 71 (8): 7-80.

Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. "Animal Models Of Nociception". *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 597 – 652.

Luccarini P., Childeric A., Gaydier A.M., Voisin D., Dallel R. (2006). The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J. Pain* 12: 908 – 914.

Maizels M, McCarberg B. 2005. Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain; *American Family Physician*; 71(3), pp. 483-90.

- Martin W.J., Forouzanfar T. (2011) The efficacy of anticonvulsants on orofacial pain: a systematic review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*; 111(5), págs. 627-633
- Mendoza N. (2008). *Farmacología Médica*. Editorial Médica Panamericana. México D.F. Cap. 2.2.3 págs. 289-302
- Miranda H., Sierralta F., Prieto J.C. (2009). Synergism Between NSAIDS in the orofacial formalin test in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92: 314 – 318.
- Miranda H., Pinardi G., (1997). *Farmacodinamia: Mecanismo de acción de las drogas*. Santiago, Chile. Editorial Mediterráneo, págs. 33-53.
- Moore R, Wiffen P, Derry S, McQuay H. Gabapentina para el dolor neuropático crónico y la fibromialgia en adultos. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011 Issue 3. Art. No.: CD007938. DOI: 10.1002/14651858.CD007938
- Moore, R. A., Derry, S., McQuay, H. J., & Wiffen, P. J. (2011). Single dose oral analgesics for acute postoperative pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9), CD008659. doi:10.1002/14651858.CD008659.
- Paeile C., Bilbeny N., (2005). *El dolor de lo molecular a lo clínico*. 3° edición. Editorial Mediterráneo. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 1, 2 y 19 págs. 26 – 70 y 272–281.
- Pelissier T. Pajot J., Dallel R. (2002) The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain*; 96 (1-2), págs. 81-87
- Puebla F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS. *Dolor iatrogénico. Oncología* 28 (3): 139 – 145.
- Pfizer: Product Monograph Neurontin® — PDF (251 KiB) Retrieved 14 August 2006/
<http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=630#S8.1>
- Raboisson P., Dallel R., The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28: 219 – 226.
- Reichling DB, Levine J.D., (2009). Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends in Neurosciences*; 32 (12), págs. 611-618.
- Reisner L., Pettengill C.A. (2001). The use of anticonvulsants in orofacial pain. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*; 91 (1), págs. 2-7
- Rowbotham MC, Harden N., Stacey B., Bernsein P., Magnus-Miller L. Gabapentin for the treatment postherpetic neuralgia: A randomized controlled trial. *JAMA* 1998;

280:1837-42.

Selph S., Carson S., Fu R., Thakurta S., Low A., McDonagh M., (2011). Drug Class Review: Neuropathic Pain: Final Update 1 Report [internet]. Portland (OR): Oregon Health & Science University.

Setiawati E. Deniati S.H., Yunaidi D.A., et al. Bioequivalence study with two naproxen sodium tablet formulations in healthy subjects. *J Bioequivalence & Bioavailability*. (2009) 28: 28-33.

Sessle B.J., (2005) Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol*. 71: 117-136.

Sessle. Neural Mechanisms and Pathways in Craniofacial Pain. *Can. J. Neurol. Sci*. 1999; 26:Suppl. 3-S7-S11

Sindou M. (2010). Trigeminal neuralgia, a plea for microvascular decompression is the first surgical option. Anatomy should prevail. *Acta neurochirurgica*; 15 (2), págs.. 361-364.

Singh D, Kennedy DH. 2003. The use of gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia; *Clinical Therapeutics*; 25(3), pp. 852-89.

Singh G, Fort JG, Goldstein JL, Levy RA, Hanrahan PS, Bello AE, Andrade-Ortega L, Wallemark C, Agrawal NM, Eisen GM, Stenson WF, Triadafilopoulos G. Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-I Study. *The American journal of medicine*. 2006;119(3):255-66.

Sluka K. (2009). Mechanisms and management of pain for the physical therapist. IASP Press, Seattle. págs 3 – 72.

Stucky C.L., Gold M.S., Zhang X., (2001) Mechanisms of pain. *Proceedings of The National Academy Of Sciences of USA*; 98(21), págs. 11845-6.

Takemura M., Sujiyo S., Moritani M., Kobayashi M., Yonehara N. (2006). Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Archives of histology and cytology*; 69(2), págs. 79-100.

Tallarida R. J. (2001) Drug synergism: its detection and applications. *J. Pharmacol Exp Ther*. 298: 865 – 872.

Tallarida R.J. (2000). *Drug Synergism and dose – effect data analysis*. Chapman and Hall/CRC Press, New York págs. 143 – 154.

Uchitel O.D., Di Guilmi M., Urbano F. J., Gonzalez Inchauspe C., (2010). Acute modulation of calcium currents and synaptic transmission by gabapentinoids.

Channels; 4 (6), págs. 490-496.

Vane J. "The mechanism of action of anti-inflammatory drugs". *Int. J Clin Pract Suppl.* 2003; (135):2.

Voscopoulos C., Lema M. 2010. When does acute pain become chronic? *British Journal of Anaesthesia*; 10 (1), págs. 69-85.

Warner T.D., Mitchell J.A. "Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors and lessons from the clinic". *FASEB J.* 2004; 18: 790-804.

Wilson EA, Sills GJ, Forrest G, Brodie MJ. High dose gabapentin in refractory partial epilepsy: clinical observations in 50 patients. *Epilepsy Res* 1998; 29: 161-6.

Zakrzewska J.M., McMillan R., (2011) Trigeminal neuralgia, The diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain.

Anexo: Aprobación del comité de Bioética sobre investigación en animales



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

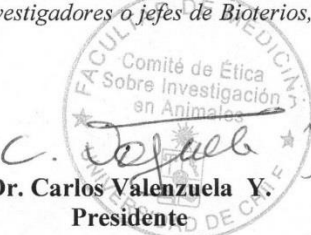
CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: **“Interacción analgésica entre Gabapentina y Naproxeno en dolor orofacial experimental en ratones”** cuyo investigador responsable es el **Dr. Hugo Miranda**, no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (**Protocolo CBA# 0637 FMUCH**).

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

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

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


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 13 de noviembre de 2013