

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE RESVERATROL EN DOLOR
ONCOLÓGICO ÓSEO ES MEDIADO POR SIRT1.***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Farmacología:**

SEBASTIÁN CAMILO LUX FEBRÉ

Director de Tesis: Dr. Alejandro Hernández Kunstmann

Co-director de Tesis: Dr. Luis Constandil Córdova

Santiago-CHILE

Enero 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

SEBASTIÁN CAMILO LUX FEBRÉ

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Farmacología, en el examen público rendido el día 23 de enero de 2019.

Director de Tesis:

Dr. Alejandro Hernández K.

Co-director de Tesis:

Dr. Luis Constandil C.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Carla Delporte V. (presidente)

Dra. Mercedes López N.

Dr. Rodrigo Castillo P.

AGRADECIMIENTOS

Siete años fueron los que duró este camino y hay muchas personas a las que agradecer. Sin estas valiosas personas no hubiese podido concluir mi investigación.

Al profesor Hugo Miranda, que me recibió en su laboratorio y me enseñó todo lo necesario para poder empezar y avanzar en esta tesis.

A la profesora Teresa Pelissier que también me abrió las puertas de su laboratorio y me enseñó la rigurosidad de la metodología y la experimentación. Agradezco su amistad y su ayuda gratuita en este trabajo.

A don José López que se transformó en mi gran compañero de laboratorio. Gracias por toda la ayuda que me brindó, además de su compañía y grandes consejos. Sin su ayuda no hubiese podido avanzar en este camino.

Al profesor Luis Constandil, que me adoptó como alumno, me brindó toda la ayuda estructural, técnica y económica para poder iniciar y concluir la tesis. Codo a codo terminamos este trabajo. Siempre estuvo presente.

Al profesor Alejandro Hernández por su guía y su apoyo incondicional.

A Cristina por su compromiso y voluntad.

A la comisión de doctorado: la profesora Delporte que aportó enormemente en la forma, a la profesora López, siempre dispuesta a aportar y al profesor Rodrigo Castillo que siempre sumó con su conocimiento y pragmatismo.

Al doctor Juan Carlos Prieto y a la profesora Viviana Noriega por esos gratos y cálidos momentos de café en las mañanas de trabajo.

Al profesor Juan Diego Maya por darme la oportunidad de participar en la docencia, por su calidez y amistad.

A Natalia Ciudad una gran amiga que conocí en el laboratorio con la que compartimos muchos momentos hasta ahora.

A mi compañero y gran amigo de la vida Nicolás Lobos, que juntos decidimos comenzar este camino y que para ambos esta llegando a su fin.

A la compañera Carlyne Lespay por su tiempo y dedicación.

Al compañero Edison Salas por su compromiso y compañerismo.

A todos los compañeros que conocí en el doctorado: Katherine, Pablo, Samir, Juan, José, Sabrina, Paula, Javier, Andrea, Catalina, Edison y Johanna.

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo que me dieron todos estos años. En especial a mi esposa Belén por su paciencia todo este tiempo hasta hoy y siempre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONICYT beca número 21140171 por el apoyo económico entre los años 2014-2017 a través del pago de arancel, estipendio y gastos operacionales.

ÍNDICE

RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
NEUROBIOLOGÍA DEL DOLOR AGUDO Y CRÓNICO.....	10
DOLOR Y CÁNCER EN HUESO.....	12
MANEJO FARMACOLÓGICO DEL DOLOR ÓSEO.	15
RESVERATROL COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA.	16
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS	27
FIGURA 1: EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y PROGRESIÓN TUMORAL EN RATONES BALB/C.	28
FIGURA 2: DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTA ALGÉSICA EN RATONES BALB/C CON INYECCIÓN DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS A DISTINTAS CONCENTRACIONES CELULARES.	31
FIGURA 4: EFECTO DE UNA DOSIS ÚNICA DE RESVERATROL EN EL MODELO DE CÁNCER ÓSEO EN EL DÍA 14 EXPERIMENTAL VÍA I.P. E I.T.	37
FIGURA 5: EFECTO DE SELISSTAT EN LA ADMINISTRACIÓN ÚNICA DE RESVERATROL.....	39
FIGURA 6: EFECTO DE SELISSTAT EN LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE RESVERATROL.	40
FIGURA 7: EXPRESIÓN DE SIRT1 ANTE LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE RESVERATROL.....	41
DISCUSIÓN	42
FIGURA 8: REPRESENTACIÓN DE LA VÍA NOCICEPTIVA, COMPONENTES CELULARES ASOCIADOS, EFECTO DE RESVERATROL SOBRE SIRT1 Y LAS PROTEÍNAS REGULADAS RÍO ABAJO DE SIRT1	51
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	65
FIGURA SUPLEMENTARIA 1: ESQUEMA TEMPORAL DE EXPERIMENTOS DE LOS CINCO OBJETIVOS.	66
FIGURA SUPLEMENTARIA 2: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS GLIALES EN MÉDULA ESPINAL DE RATÓN CON CÁNCER ÓSEO.	67
FIGURA SUPLEMENTARIA 3: EXPRESIÓN DE MARCADORES GLIALES ANTE LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE RESVERATROL.	68

FIGURA SUPLEMENTARIA 4: EJEMPLOS DE DISTINTAS PUNTUACIONES DE LESIONES OSTEOLÍTICAS EN FÉMUR DERECHO DE RATÓN BALB/C CON INYECCIÓN INTRAÓSEA DE 1.000.000 DE CÉLULAS BJ3Z.....	70
TABLAS.....	71
TABLA 1: CODIFICACIÓN DEL DAÑO ÓSEO.	71
TABLA 2: CODIFICACIÓN FUNCIONAL DINÁMICA DE LA PATA CON CÁNCER.....	71
TABLA 3: PUNTUACIÓN RADIOLÓGICA DE LA RESORCIÓN ÓSEA GENERADA POR EL TUMOR A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CÉLULAS EN EL FÉMUR INYECTADO Y CONTROL	72
TABLA 4: RESULTADOS DE LUMINISCENCIA EN EL FÉMUR INYECTADO EN LA UNIDAD CUENTAS DE LOS TRES GRUPOS DE RATONES CON SUS RESPECTIVOS CONTROLES.....	72
TABLA 5: PESO Y SU EVOLUCIÓN DURANTE LOS 28 DÍAS DE EXPERIMENTO EN CADA GRUPO. .	73
TABLA 6: VALORES DEL TEST DE VON FREY EN LOS CINCO GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE LOS 28 DÍAS.	74
TABLA 7: VALORES DEL TEST DE PLANCHA CALIENTE EN LOS CINCO GRUPOS EXPERIMENTALES.	75
TABLA 8: VALORES DEL TEST DE MARCHA FORZADA EN LOS CINCO GRUPOS EXPERIMENTALES.	76
TABLA 9: TEST DE VON FREY EN ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE RESVERATROL IP, IT O METADONA IP.	77
TABLA 10: TEST DE ROTAROD EN ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE RESVERATROL I.P., I.T. O METADONA I.P.	78
TABLA 11: TEST DE VON FREY EN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE RESVERATROL I.P., I.T. O METADONA I.P.	79
TABLA 12: TEST DE ROTAROD EN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE RESVERATROL I.P., I.T. O METADONA I.P.	80
TABLA 13: TEST DE VON FREY EN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE RESVERATROL I.P. O VEHÍCULO Y SELISISTAT S.C. O VEHÍCULO.	81
TABLA 14: DELTA ROTAROD EN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE RESVERATROL IP O VEHÍCULO Y SELISISTAT SC O VEHÍCULO.	82
TABLA 15: TEST DE VON FREY EN ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE RESVERATROL I.P. O VEHÍCULO Y SELISISTAT S.C. O VEHÍCULO.	83
TABLA 16: TEST DE ROTAROD EN ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE RESVERATROL I.P. O VEHÍCULO Y SELISISTAT S.C. O VEHÍCULO.	84
PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA.....	85
PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO	86

RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte en países desarrollados y el dolor por cáncer es su manifestación clínica más frecuente. Entre ellos el cáncer óseo es aquel que genera uno de los dolores crónicos más intensos. La inyección intrafemoral de células tumorales es una técnica validada para el estudio del dolor oncológico óseo y permite estudiar la efectividad de diversos fármacos como resveratrol. Resveratrol es una fitoalexina abundante en el vino y otros frutos con demostradas propiedades antioxidantes, antitumorales, analgésicas, antiresortivas y como protector cardiovascular. Sin embargo, su uso en el dolor oncológico óseo no ha sido evaluado. Junto a lo anterior, un potencial blanco intracelular de resveratrol es la deacetilasa SIRT1 que ha sido involucrada en procesos biológicos como supervivencia celular, diferenciación, inflamación y metabolismo. Además, SIRT1 se ha implicado en la inactivación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), un factor clave en la resorción ósea. Nuestra hipótesis propone un efecto antihiperalgésico y antiresortivo presentado por resveratrol en el modelo de dolor oncológico óseo, el que sería mediado por la participación de SIRT1. El modelo de dolor óseo se generó por la inyección de células *BJ3Z* neoplásicas en una perforación realizada en el fémur distal de una rata sana. Las células *BJ3Z* implantadas generaron una masa tumoral que incrementó de tamaño, produjo resorción ósea e hiperalgnesia en los animales estudiados. La administración de resveratrol en dosis única o repetida produjo un efecto antihiperalgésico mecánico y mejoró la funcionalidad de la extremidad afectada por el cáncer. El efecto antinociceptivo de resveratrol se suprimió ante la administración de selisistat, un antagonista de SIRT1. El uso de resveratrol no tuvo impacto en la expresión de marcadores astrocíticos ni microgliales. La administración de resveratrol no modificó la expresión de SIRT1 en la médula espinal. Estos datos sustentan el potencial uso que podría tener resveratrol en el manejo del dolor por cáncer óseo en humanos.

SUMMARY

Cancer is the second leading cause of death in developed countries and cancer pain is its most frequent clinical manifestation. Among them, bone cancer is one that generates one of the most severe chronic pain. Intrafemoral injection of tumor cells is a validated technique for the study of bone cancer pain and allows to study the effectiveness of various drugs such as resveratrol. Resveratrol is an abundant phytoalexin in wine and other fruits with proven antioxidant, antineoplastic, analgesic, antiresorptive and cardiovascular protective properties. However, its use in bone cancer pain has not been evaluated. Along with the above, a potential intracellular target of resveratrol is SIRT1 deacetylase, which is involved in biological processes such as cell survival, differentiation, inflammation and metabolism. In addition, SIRT1 has been implicated in the inactivation of the nuclear factor enhancing the kappa light chains of activated B cells (NF- κ B), a key factor in bone resorption. Our hypothesis proposes that resveratrol has antihyperalgesic and antiresorptive effects in the bone cancer pain model, which are mediated by the participation of SIRT1. The bone pain model was generated by the injection of neoplastic BJ3Z cells in a perforation performed in the femur of a normal rat. The implanted BJ3Z cells generated a tumor mass that increased in size, and produced bone resorption and hyperalgesia in the animals studied. The administration of resveratrol in single or repeated doses, produced a mechanical antihyperalgesic effect and improved the functionality of the limb affected by cancer. The antinociceptive effect of resveratrol was suppressed upon administration of selisistat, an antagonist of SIRT1. The use of resveratrol had no impact on the expression of astrocytic or microglial markers. The administration of resveratrol had no effect on the expression of SIRT1 in the spinal cord. These data support the potential use that resveratrol could have in the management of bone cancer pain in humans.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en países desarrollados y es responsable de 9.6 millones de muertes. De hecho, a nivel global, 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer (WHO, 2018). En Chile, el año 2013, murieron 24.592 personas por tumores malignos, a una tasa de 139 por 100.000 habitantes (DEIS, 2013). El dolor es una de las manifestaciones más frecuentes del cáncer y éste se puede producir por la infiltración directa del tumor en el tejido, metástasis en distintos tejidos, post quirúrgico, tratamiento quimioterapéutico y radiación recibida como tratamiento. Entre el 75 y el 95% de los pacientes con cáncer localizado en la médula ósea, ya sea primario o metastásico, experimentan una fuerte percepción de dolor (Mantyh y cols., 2005). Actualmente se conoce que el dolor producido en el cáncer óseo puede ser causado por una expansión tumoral local, la secreción de moléculas inflamatorias o la infiltración de plexos nerviosos (Mantyh, 2013). El dolor por cáncer óseo se divide en dos tipos: uno, es un dolor persistente, de carácter sordo, y progresivo en intensidad; el otro, es un dolor agudo, debilitante que puede o no estar asociado al movimiento y que se percibe en ausencia de una causa precipitante (Lozano-Ondoua y cols., 2013). La intensidad de la percepción dolorosa varía según la sensibilidad del individuo, el tipo de cáncer y la ubicación de la lesión (Slosky y cols., 2015). A pesar de que existe un amplio conocimiento de la fisiopatología del cáncer, los fármacos disponibles para su tratamiento analgésico presentan una baja efectividad (Delaney y cols., 2008). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos neurobiológicos asociados a la percepción del dolor en el cáncer óseo, son claves para diseñar nuevas terapias adecuadas para su alivio.

La terapéutica del dolor por cáncer se ha basado en un tratamiento gradual siguiendo la recomendación de la "escalera analgésica" propuesta originalmente por la Organización Mundial de la Salud en 1986. Esta escalera se encuentra formada por 3 peldaños, comenzando por medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), siguiendo con la transición a AINES más un opioide débil (tramadol o codeína) y finalmente cuando el dolor se vuelve severo, se propone adicionar un opioide fuerte como morfina (Meldrum, 2005). Además, a estos peldaños pueden sumarse otros

fármacos conocidos como coadyuvantes, entre los que se encuentran los antiepilépticos (gabapentina, pregabalina, carbamazepina) y los antidepresivos (amitriptilina, imipramina, venlafaxina), entre otros (Desandre y Quest, 2009). Actualmente, el concepto de “escalera analgésica” ha sido sustituido en algunos casos por el de “ascensor analgésico”, proponiendo que es mejor pasar o subir directamente al piso requerido para tratar el dolor de acuerdo con su origen y evitar la necesidad de pasar por todos los peldaños, lo que ahorra tiempo y molestias al paciente (Torres y cols., 2002). Ahora, a pesar de que esta metodología logra un alivio cercano al 75% de los pacientes con dolor por cáncer, los actuales medicamentos presentan efectos adversos que limitan su uso, tales como hepatotoxicidad a dosis altas del paracetamol, el sangrado gastrointestinal de la aspirina, las reacciones alérgicas y el daño renal en el caso del ibuprofeno y de los otros AINES. En cuanto a utilizar opioides débiles, como tramadol o codeína, sus efectos adversos a nivel gastrointestinal limitan también su uso a dosis altas y para opioides fuertes en el tratamiento del dolor severo, el fármaco estándar es la morfina. Lamentablemente, tanto el rápido ascenso de dosis como la tolerancia y dependencia que presenta la morfina son un problema en sí mismo, que no se ha podido controlar. Por este motivo ha sido de vital importancia la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para lograr una mejor efectividad y menores efectos adversos en tratamientos para los dolores de cáncer, particularmente para el de tipo óseo (Colvin y Fallon, 2008; King y Porreca, 2010; Slosky y cols., 2015).

Neurobiología del dolor agudo y crónico.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, del inglés International Association for the Study of Pain) define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada al daño tisular real o potencial de los tejidos o descrito en términos de dicho daño” (Merskey y Bogduk, 1994).

Frente a un daño tisular o a una estimulación nociceptiva (nociva o dolorosa), nuestro sistema de protección se activa generando la percepción de una sensación de dolor, localizada en el sitio de la lesión o estímulo, y graduada de acuerdo con la intensidad del estímulo. La percepción de un estímulo doloroso se inicia cuando un receptor de

membrana transforma un estímulo físico nocivo en un estímulo biológico o potencial de acción, proceso conocido como nocicepción. Posteriormente, la información nociceptiva, en forma de potenciales de acción, es conducida hacia la médula espinal a través de fibras nerviosas de mediano y pequeño calibre (fibras A δ mielinizadas y fibras C amielínicas) (D`Mello y Dickenson, 2008). En la médula espinal la información nociceptiva pasa a una segunda neurona de proyección que conduce esta información hacia centros nerviosos superiores a través de diversas vías, una directa al tálamo (tracto espinotalámico) y otras indirectas (tracto espinoreticulotalámico y tracto espinohipotalámico) que incluyen sinapsis en la formación reticular y en el núcleo parabraquial del tronco encefálico (Todd, 2002). Finalmente, la información nociceptiva es conducida desde el tálamo hacia la corteza por una tercera neurona. Esta vía sensorial distribuye la información nociceptiva hacia las cortezas cerebral somatosensorial primaria, secundaria, corteza cingulada anterior, corteza prefrontal, hipotálamo, amígdala y corteza insular, lugares donde ocurre la integración de la información nociceptiva y se identifica el lugar de la lesión, la intensidad de ella, la asociación con emociones y la memoria para futuras percepciones. Es decir, se alerta al cerebro sobre la potencial amenaza y éste genera los patrones conductuales para evitarla (Todd, 2002). Adicionalmente a las neuronas de proyección ascendentes, existen vías descendentes inhibitorias desde el cerebro que llegan al asta dorsal de la médula espinal, donde modifican la transmisión sináptica mediante señales químicas que incluyen opioides endógenos, serotonina y norepinefrina (Cheng, 2010). La conducción de la información dolorosa, desde el sitio de la lesión a la corteza cerebral, es conocida como la vía nociceptiva. La activación de esta vía es dependiente de la lesión inicial, y una vez que el daño tisular ha sido reparado, el dolor desaparece. Este tipo de dolor se conoce como dolor agudo (Lundemberg y Ekholm, 2002).

En ocasiones la sensación de dolor persiste incluso después que la lesión que lo originó ha sido reparada, o la sensación de dolor aparece y se mantiene sin una lesión aparente. En estos casos el dolor se denomina dolor crónico y es considerado como una patología. El dolor crónico pierde totalmente su función fisiológica. En los humanos, se considera que un dolor es crónico cuando persiste al menos tres meses (Threede y cols., 2015). El dolor crónico se puede clasificar dependiendo del tipo de lesión que lo causa; en efecto,

si es generado por inflamación en el tejido periférico o si es producto de una lesión directamente en el sistema nervioso, se conocen como dolor crónico de tipo inflamatorio o neuropático respectivamente. El dolor neuropático, generado frente a una lesión directa del sistema somatosensorial es muy similar al que generan tumores en expansión en territorios ricamente inervados como la médula ósea (Mantyh, 2013). En el dolor crónico se ha observado que el tejido nervioso, tanto periférico como central, presenta múltiples alteraciones o adaptaciones patológicas que ayudan a mantener el dolor crónico en el tiempo, así como aumentar la sensibilidad a los estímulos. En su conjunto este fenómeno es conocido como sensibilización central o periférica dependiendo de donde se origine. La sensibilización central se caracteriza por modificaciones neuronales a nivel molecular, sináptico y de redes neurales, cuya consecuencia es el incremento de la comunicación sináptica nociceptiva e hiperexcitabilidad neuronal (Havelin y cols., 2017).

Una de las modificaciones más estudiadas en las últimas décadas es la activación de células gliales tales como los astrocitos y microglia. Los astrocitos y la microglia participan en la transmisión sináptica nociceptiva espinal, adquiriendo relevancia principalmente en la modulación de la información nociceptiva en el estado de dolor crónico (Cao y Zhang, 2008). La activación de las células gliales implica aumento de citoplasma y prolongaciones citoplasmáticas, secreción de gliotransmisores, liberación de citoquinas, síntesis de filamentos intermedios y división celular (Mika y cols., 2013).

Dolor y cáncer en hueso.

Los avances en la detección y tratamiento del cáncer, además del aumento en la supervivencia, han llevado a enfocar el problema en la mejoría de la calidad de vida. Para muchos pacientes el dolor puede ser el primer signo de enfermedad y el 30 al 50% de los pacientes experimentarán dolor moderado a severo (Mercadante y Arcuri, 1998; Portenoy y cols., 1999). El dolor por cáncer puede ocurrir prácticamente en cualquier momento del desarrollo de la enfermedad. Además, este tipo de dolor va a ser frecuente e intenso mientras más sitios sean involucrados y va a depender del mecanismo por el cual se genere este dolor (Mantyh, 2013). Varias tipos de cáncer tienen predilección por

el tejido óseo como el de mama, próstata, pulmón que son los más frecuentes, pero también mieloma, cáncer renal, melanoma, vejiga y tiroides (Coleman, 2006).

En líneas generales el hueso está compuesto por médula ósea, hueso mineralizado que se compone de un compartimiento cortical y medular, y una capa fibrosa que recubre el hueso llamada periostio. El tejido óseo está siendo constantemente remodelado de manera concertada por células óseas. El osteoclasto se encarga de resorber hueso mientras que el osteoblasto ejecuta la formación de hueso. Otro tipo de célula, el osteocito, funciona como mecanosensor y orquestador del proceso de remodelación ósea. Este proceso está bajo control de factores locales, como factores de crecimiento y citoquinas, y bajo factores sistémicos como calcitonina y estrógenos los cuales en conjunto contribuyen a la homeostasis ósea (Florencio-Silva y cols., 2015). Todos los componentes del hueso, como la médula ósea, el hueso mineralizado y el periostio, están inervados por fibras sensitivas, pero con distinta densidad de inervación. Por cada 100 fibras que van a inervar periostio, 2 inervan médula ósea y 0,1 hueso mineralizado (Mantyh, 2013). El hueso está inervado por fibras A δ positivas para TrkA y fibras C, las que se activan cuando hay un daño en el hueso, generando unas estructuras tipo neuroma que pueden gatillar actividad espontánea (Sevcik y cols., 2005). Esta diseminación de fibras y generación de neuromas está directamente relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el receptor TrkA. Se ha demostrado que la inhibición de este factor disminuye la diseminación y formación de neuromas sin afectar el proceso de resorción del hueso (Ghilardi y cols., 2010).

Diferentes mecanismos han sido involucrados en la generación de dolor por cáncer óseo, entre ellos la acidosis inducida por el tumor, fracturas patológicas y la secreción de moléculas inflamatorias. La acidosis en el ambiente estromal implica la acción de protones sobre canales sensibles a protones como TRPV-1 y ASIC (Olson y cols., 1998; Guo y cols., 1999; Julius y Basbaum., 2001). El tejido necrótico, las células apoptóticas y las células inflamatorias que circundan la zona con cáncer también favorecen el ambiente ácido. Por otra parte, los osteoclastos cuando resorben hueso también generan un pH ácido (4,0-5,0) en la interfaz entre el hueso y el osteoclasto, generando también estímulos nociceptivos (Sabino y Mantyh, 2005). En una situación normal, la resorción ósea osteoclástica está en equilibrio con la formación ósea mediada por los

osteoblastos. En procesos neoplásicos, tanto osteolíticos como osteogénicos, la actividad osteoclástica está aumentada. La destrucción del tejido óseo mediante los osteoclastos genera dolor al destruir fibras sensitivas y hueso, lo que genera una predisposición a fracturas (Sevcik y cols., 2004, Mantyh, 2013). Por otro lado, las células neoplásicas metastásicas liberan moléculas como IL-1, IL-6, TNF- α , endotelina, EGF, TGF- β , PDGF y péptidos similares a la hormona paratiroidea (rPTH), todas las cuales han sido implicadas en la modulación de los procesos nociceptivos. Las prostaglandinas secretadas por las células neoplásicas, producto del aumento de la expresión de ciclooxygenasa-2 (COX-2), están involucradas en la sensibilización y/o excitación directa de nociceptores al unirse a sus receptores presentes en las fibras sensitivas (Vasko, 1995). Las células neoplásicas también liberan otras moléculas, como iones de potasio, bradicininas y factores activadores de osteoclasto, que pueden incrementar la percepción dolorosa (Sabino y Mantyh, 2005; Lozano-Ondoua y cols., 2010; Lozano-Ondoua y cols., 2013). Adicionalmente, las células neoplásicas secretan una proteína denominada RANK-L, la que se une a su receptor RANK en el osteoclasto, produciendo un aumento en su proliferación y resorción ósea. En condiciones fisiológicas la actividad del receptor RANK se encuentra regulada por la proteína osteoprotegerina (OPG), que, al unirse a RANK, lo bloquea e impide su activación por su ligando endógeno, es decir RANK-L (Honore y cols., 2000). Esta situación queda en evidencia en experimentos donde la administración de OPG, a murinos con cáncer óseo, produce la disminución de la proliferación osteoclástica y también la disminución de la conducta nociceptiva (Honore y cols., 2000).

El tumor óseo, ya sea primario o una metástasis, no solo está compuesto por células cancerosas, sino que también tiene células estromales asociadas. Más aún, estas células son las que predominan en número en estas lesiones y están compuestas por células endoteliales, fibroblastos, células del sistema inmune, entre ellas macrófagos, mastocitos, neutrófilos y linfocitos T. Tanto las células tumorales como las células asociadas son capaces de secretar varios factores que están relacionados directamente con la generación de dolor por cáncer (Mantyh, 2013).

A nivel espinal también se han descrito modificaciones en neuronas y glía involucradas en la inervación ósea en presencia de tumores. Por ejemplo, se ha descrito un aumento

de la expresión de c-Fos y dinorfina tanto en neuronas como en glía. También se ha reportado hipertrofia astrocitaria y aumento de marcadores de daño en el ganglio dorsal como factor de transcripción activante (ATF, del inglés Activating Transcription Factor) y galanina (Schwei y cols., 1999). Además, se han observado fenómenos de hipersensibilidad, aumento del campo receptivo y generación de actividad espontánea, producido por el aumento de la relación entre neuronas nociceptivas y neuronas de rango dinámico amplio (WDR del inglés wide dynamic range), así como la disminución de sus umbrales de activación (Gordon-Williams y cols., 2007).

Manejo farmacológico del dolor óseo.

Una gran variedad de fármacos y anticuerpos han sido propuestos para el tratamiento del dolor producto del cáncer óseo, entre ellos, los bifosfonatos, antagonistas del receptor TRPV₁, inhibidores selectivos de la COX-2, agonistas del receptor de cannabinoides CB₂ y anticuerpos contra NGF.

Los bifosfonatos han sido usados fundamentalmente para la osteoporosis con buenos resultados. Alendronato, un fármaco de esta familia, fue probado en el modelo de tumor óseo murino mostrando disminución del dolor y disminución de la resorción ósea comparado con el placebo (Sevcik y cols., 2004). Ibandronato, otro bifosfonato mostró buenos resultados en cuanto a disminución del dolor, remodelación ósea, necrosis tumoral y sensibilización central (Halvorson y cols., 2008). Sin embargo, la esofagitis, nefrotoxicidad y la osteonecrosis de la mandíbula limitarían su uso crónico en humanos.

El uso del anticuerpo monoclonal anti-factor de crecimiento nervioso (anti-NGF), tanezumab, ha mostrado analgesia en distintos modelos animales de dolor, como en el de artritis reumatoide, fractura femoral, pancreatitis y dolor oncológico óseo. Este anticuerpo, administrado en el día 6 y 11 post inyección tumoral ha mostrado buenos resultados en cuanto a la reducción de la conducta dolorosa en ratones y sensibilización, tanto periférica como central, sin embargo, no mostró impacto en la progresión tumoral (Sevcik y cols., 2005). Este anticuerpo monoclonal ha sido utilizado con éxito en pacientes con cáncer metastásico, mostrando utilidad en pacientes

usuarios de opioides de manera crónica (Sopata y cols., 2015). Por otro lado, ARRY-470, antagonista del receptor tirosina-kinasa A (TrkA), receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF); mostró una reducción del dolor inducido por cáncer óseo y reducción en la formación de estructuras similares a neuroma por cáncer óseo, pero no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor o la remodelación (Ghilardi y cols., 2010).

La administración de antagonistas del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV₁) también ha mostrado disminución de la conducta dolorosa y de la sensibilización periférica correlacionado con la disminución de la expresión de c-Fos en las láminas I-II a nivel de L3-L4 en ratones (Ghilardi y cols., 2005).

La administración aguda y crónica de un inhibidor selectivo de la COX-2 (NS398) disminuyó la conducta dolorosa inducida por el movimiento y por la palpación. Además, redujo la expresión de c-Fos en la médula dorsal, y disminuyó la hipertrofia y proliferación osteoclástica. Estos experimentos muestran la relevancia de la síntesis de prostaglandinas por el tumor y la posibilidad de revertir este proceso farmacológicamente (Sabino y cols., 2002).

El uso de AM1241, un agonista cannabinoide del receptor CB2, en ratones con tumor óseo, demostró disminuir el dolor, la resorción y el tamaño tumoral del sarcoma murino (Lozano-Ondoua y cols., 2010). Otro agonista del receptor cannabinoide CB2 (JWH015), atenuó significativamente la remodelación ósea, alivió el dolor espontáneo y disminuyó la carga tumoral primaria en cáncer de mama humano (Lozano-Ondoua y cols., 2013). Pese a toda la evidencia expuesta y a pesar de que se ha avanzado en la investigación de la fisiopatología del dolor por cáncer y se ha comprendido algunos de los mecanismos fisiopatológicos involucrados, aún es necesario investigar nuevas y mejores terapias para tratar el dolor oncológico óseo.

Resveratrol como alternativa terapéutica.

Resveratrol es una fitoalexina que está presente en la uva y el vino, y que se sintetiza en plantas en respuesta a noxas como estrés, luz solar excesiva, radiación ultravioleta o una infección fúngica (Tomé-Carneiro y cols., 2013). La información existente muestra

que resveratrol tiene variados efectos biológicos beneficiosos como antioxidante, analgésico, antiinflamatorio y antiresorción ósea entre otras. La primera evidencia de utilidad del resveratrol tiene relación con la paradoja francesa en la que personas del sur de Francia, con alto consumo de grasas, presentan menor riesgo cardiovascular que personas de otros lugares de ese país.

Desde el punto de vista de la terapia contra el dolor, el resveratrol ha mostrado efecto analgésico y antiinflamatorio en distintos modelos animales.

En modelos de dolor tipo inflamatorio, resveratrol ha mostrado un efecto antihiperálgico medido por vocalización en ratas en la prueba de carragenina, sin embargo, no hay diferencias en cuanto a disminución del edema generado por carragenina en respuesta a las distintas dosis de resveratrol (Gentili y cols., 2001). El efecto antihiperálgico a nivel molecular es mediado por la reducción de la síntesis de prostaglandinas (PGE₂) y la reducción de la expresión de la COX-2, tanto bilateralmente en los ganglios dorsales como en la médula espinal. Además, el efecto de resveratrol se asocia a la disminución de la expresión de c-Fos en láminas superficiales (I y II) y profundas (IV y V) (Pham-Marcou y cols., 2008). En otro artículo, la administración oral de resveratrol mostró una disminución de la conducta algésica en respuesta a la inyección intraplantar de capsaicina o glutamato. En el mismo artículo, la administración de resveratrol intratecal e intracerebroventricular sólo tuvo efecto antinociceptivo en el modelo de carragenina, tanto en la disminución de la expresión de COX-2 como en la expresión de c-Fos en la médula espinal (Bazzo y cols., 2013).

En el modelo de neuropatía diabética inducida por la administración de estreptozotocina (STZ) en ratón, se evidenció que el tratamiento con resveratrol de manera crónica disminuyó significativamente la hiperálgia térmica asociada a la disminución del TNF- α sérico y a la liberación de óxido nítrico (NO) cerebral de manera dosis dependiente (Sharma y cols., 2007).

En el modelo neuropático de constricción de nervio espinal se demostró que resveratrol tiene un efecto antialodínico que se correlaciona con la restauración de la expresión de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y el restablecimiento de la función de las NOS dependientes de calcio, ipsilateral a la constricción de nervio espinal (Pérez-Severiano y cols., 2008).

En el modelo neuropático de constricción de nervio ciático en ratones, se observó que resveratrol presentó un efecto antihiperalgésico térmico mediado por receptores serotoninérgicos 5HT₇. Adicionalmente, resveratrol presentó un efecto antidepresivo que es bloqueado por SB-258719, un antagonista del receptor 5HT_{1A} (Zhao y cols., 2014). En el mismo modelo, en ratas, se evidenció que resveratrol administrado de manera repetida por catorce días vía intraperitoneal, disminuye la alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica. Además, se demostró que al final del tratamiento, la expresión de receptores de citoquinas antiinflamatorias IL-1R2 y IL-4R α así como del antagonista del receptor IL-1 (IL-1RA) aumentaron en médula espinal (Xu y cols., 2018).

En el modelo neuropático de constricción del nervio infraorbitario se demostró que la administración oral de resveratrol tuvo un efecto antinociceptivo mediado por la disminución de la activación glial, evaluado por la reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β y la fosforilación de MAPK vía la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK; adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Yang y cols., 2016).

En el modelo de dolor post quirúrgico la inyección local de resveratrol indujo un efecto antialodínico mecánico. Además, en neuronas en cultivo del ganglio trigeminal de ratón se mostró que el efecto de resveratrol está mediado por la activación de la vía AMPK y la inhibición de la vía mTOR y ERK, siendo esta modulación concentración dependiente, tiempo dependiente y reversible (Tillu y cols., 2012).

En el modelo de cáncer óseo inducido por la inyección intraósea de células de carcinoma de glándula mamaria, se observó que la administración intratecal de resveratrol reduce la hipersensibilidad de las ratas, así como reduce la expresión de CX3CR1 y la activación de las células de la glia espinal (Cheng y cols., 2014).

Según la evidencia reportada en estudios preclínicos, resveratrol administrado en forma aguda o crónica tiene acción antihiperalgésica en diferentes modelos de dolor agudo o crónico, y dicho efecto puede ser mediado por cambios en los niveles de prostaglandinas, citoquinas inflamatorias, óxido nítrico, receptores de glutamato, TRPV1 y el sistema de serotonina. Además, entre los blancos del resveratrol han sido implicadas las células gliales y moléculas como AMPK, mTOR, ERK y sirtuinas (Tillu y

cols., 2012; Shao y cols., 2014; Yang y cols., 2016). Todas estas moléculas son mensajeros intracelulares que han mostrado jugar un rol importante en procesos fisiológicos y fisiopatológicos como diabetes, enfermedad cardiovascular, cáncer y neurodegeneración. En el caso de las sirtuinas, estas son enzimas del tipo deacetilasa dependiente de NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) que actúan sobre las histonas, afectando al metabolismo celular mediante la regulación epigenética de la expresión de genes específicos. Dentro de las sirtuinas, existe creciente evidencia que involucra a SIRT1 en la fisiología de la percepción dolorosa. En un modelo de constricción ciática se ha observado que el aumento de la expresión de SIRT1 mediado por troxerutina se correlaciona con la disminución de la hiperalgesia y alodinia. Este efecto ha sido correlacionado con la disminución de TNF- α , IFN- γ e IL-1 β espinal (Gui y cols., 2015). Parte del efecto antihiperalgésico de resveratrol se produce debido a que se une al extremo amino terminal de SIRT1 aumentando su actividad (Denk y cols., 2013). En un modelo de dolor por quemadura, en la pata derecha en ratones, la administración de resveratrol intratecal disminuyó la conducta algésica y aumentó la expresión de SIRT1, lo que fue antagonizado por el antagonista específico selisistat (EX527) (Cheng y cols., 2016). Un efecto antinociceptivo similar presenta resveratrol en el modelo de constricción ciática en ratas (Yin y cols., 2013). Además, en este mismo modelo, resveratrol disminuyó la expresión y actividad SIRT1, como también disminuyó NAD y aumentó la nicotinamida (Vitamina B3), lo que resulta ser revertido con selisistat (Shao y cols., 2014).

Resveratrol tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y de protección cardiovascular (Xia y cols., 2017). Estos efectos han sido estudiados en distintos modelos y evaluados distintos mecanismos. De acuerdo con la evidencia presentada, resveratrol tiene efecto antinociceptivo que ha sido probado en modelos de dolor agudo y crónico, como los de neuropatía periférica y los modelos de dolor por cáncer óseo. Sin embargo, el mecanismo por el cual este efecto es generado no está del todo estudiado. Más aún, la relación del SIRT1 y el dolor por cáncer óseo nos permitirá acercarnos un poco más a un tratamiento más específico del dolor en este tipo de cáncer.

HIPÓTESIS

Resveratrol presenta un efecto antinociceptivo modulando la enzima SIRT1 en un modelo de cáncer óseo murino.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar un modelo de dolor crónico en ratón inducido por cáncer óseo, y estudiar si los efectos analgésicos del resveratrol son producto de la activación de la enzima SIRT1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Desarrollar un modelo oncológico óseo en ratón (Balb/c).
- 2) Caracterizar la conducta algésica y la activación de las células de la glía en el modelo de dolor por cáncer óseo en ratones.
- 3) Evaluar el efecto antinociceptivo por la administración crónica de resveratrol en un modelo de dolor por cáncer óseo en ratones.
- 4) Identificar si el efecto antinociceptivo agudo de resveratrol se produce en el sistema nervioso central o periférico.
- 5) Evaluar la participación de SIRT1 en el mecanismo antinociceptivo del resveratrol en un modelo oncológico murino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c de 22-35 gramos, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los ratones se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad 12:12 (08:00-20:00 luz) y se alimentaron e hidrataron ad libitum. Todas las pruebas conductuales fueron realizadas entre las 9:00 y las 13:00 los lunes y jueves de cada semana. Los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011), el Comité de directrices para publicaciones científicas que involucran estudios en animales (Committee on Guidelines for Scientific Publications Involving Animal Studies, 2011) y la publicación titulada “Prácticas para una mejor reproducibilidad de los datos y un mejor bienestar animal en estudios de dolor” (Carbone y Austin, 2016). Además, los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo el protocolo número CBA 0721 FMUCH desde enero de 2015 hasta enero de 2018. El grupo “naïve” mencionado en el objetivo 2 y figuras 1, 2 y 3 representan ratones sin intervención alguna.

Inducción del cáncer óseo.

Línea celular (BJ3Z): Las células neoplásicas utilizadas para generar el modelo de cáncer óseo fueron obtenidas a partir células mamarias estromales murinas transformadas (BJ3Z), las cuales expresan la proteína fluorescente verde ZsGreen. Esto se logró mediante la transducción viral y selección de células mediante citometría de flujo (Pinto y cols., 2010; Pinto y cols., 2014). Debido a que las células utilizadas en la tesis expresan la proteína ZsGreen pueden ser fácilmente identificadas con la tecnología apropiada. La línea celular BJ3Z-ZsGreen fue facilitada gentilmente por el Dr. Mauricio Pinto. Las células BJ3Z-ZsGreen fueron incubadas en medio DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential médium, por sus siglas en inglés) mas suero fetal bovino al 5%, a 37°C, a 5% de CO₂ y 95% de aire ambiental. El medio de cultivo fue cambiado dos

veces por semana. Esto se realizó el Centro de Medicina Integrativa y Ciencia Innovada (CIMIS).

Inyección intraósea: La generación del modelo de cáncer óseo es una modificación del protocolo reportado por Honore y colaboradores el año 2000. El cáncer óseo fue desarrollado mediante la inyección de células neoplásicas del tipo BJ3Z-ZsGreen en una perforación intercondílea femoral izquierda en el ratón. Para esto los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con ketamina (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg). Se realizó un corte de la piel al nivel de la rodilla izquierda, se ubicó el músculo cuádriceps femoral y se realizó una incisión de 2 mm en su unión con la rótula. Luego se desplazó lateralmente el ligamento rotuliano quedando visible la región intercondílea del fémur. A continuación, se realizó una perforación mediante una fresa redonda de 1 mm, montada en una “pieza de mano”, en un micromotor Freedom, generando una muesca sin perforar hacia el espacio medular. Usando aguja de 27G se creó un espacio dentro del hueso y con una aguja de 29G se inyectó 15 μ L de una solución que contenía 250.000, 500.000 o 1.000.000 células neoplásicas BJ3Z-ZsGreen, o medio de cultivo como control (sham). Por último, se obturó la muesca realizada con ionómero de vidrio, se reposicionó el ligamento rotuliano, y se suturó la musculatura y piel de forma independiente (Honore y cols. 2000). Una vez terminado el procedimiento se administró ketoprofeno 50 mg/Kg intraperitoneal (i.p.) en el post operatorio.

Resorción ósea: La evaluación de la resorción ósea fue realizada con rayos X, con el equipo IN-VIVO MS FX PRO (Carestream, EUA) facilitado por el Laboratorio de Nanopartículas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que dirige el Dr. Marcelo Kogan. Los ratones fueron evaluados los días 3, 10, 17, 24 y 31 post cirugía. Previa anestesia con ketamina (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg), los ratones se introducen en el equipo en posición prono con las caderas en semiflexión, rotación externa y con las rodillas en flexión en 90 grados. Se graba la imagen de rayos X y se procede al análisis según la codificación explicitada (Tabla 1). Al finalizar el experimento, el día 31, los ratones fueron eutanasiados mediante sobredosis de pentobarbital y los fémures fueron extraídos para evaluar el avance del daño óseo

producido por el tumor, mediante rayos X con el hueso desnudo utilizando la misma escala antes descrita (Tabla 1).

Evaluación del crecimiento tumoral por inoculación de células neoplásicas.

El crecimiento de la masa tumoral fue evaluada al día 31 por luminiscencia observada con el equipo IN-VIVO MS FX PRO (Carestream, EUA), debido a que las células BJ3Z-ZsGreen expresan la proteína verde fluorescente ZsGreen. Los fémures de ambas patas fueron extraídos, desde los animales eutanasiados, para medir la luminiscencia debido a que el equipo IN VIVO no presenta la sensibilidad necesaria para detectar la fluorescencia desde el interior del hueso cuando se encuentra *in situ* en el animal. Las imágenes fueron adquiridas a una excitación a 490 nm, y a una emisión a 510 nm, y la imagen se obtiene después de 5 minutos de exposición. El número de cuentas se evaluó en un área fija de la porción distal de ambos fémures de cada ratón (383 pixeles). En cada caso se comparó la pata tratada con la respectiva pata contralateral de cada ratón (Figura 1^a y 1B).

Evaluación de la alodinia mecánica.

La evaluación de la alodinia mecánica se realizó con el algiesiómetro “Von Frey electrónico” (“e-VF Handheld Electronic Von Frey of original design”, code 38450, Ugo Basile, Italia), similar a lo realizado por Civi y cols. en 2016. Este experimento fue realizado con un pre-acondicionamiento tres días antes y el día de la inyección de células neoplásicas (día 0), y a posterior se realizaron los días 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 desde la inyección. Cada día experimental, los ratones se colocaron en celdas rectangulares de acrílico de 10 x 8 centímetros con una malla metálica en la base con celditas de 4 x 4 milímetros en la superficie inferior por 30 min como aclimatación. Cuando el ratón está apoyado en sus cuatro patas se incide verticalmente con el algiesiómetro en la pata izquierda hasta que el ratón levante la pata estimulada. El valor (unidad de fuerza) cuantificado corresponde al umbral de retirada de la pata del ratón que se interpreta como la menor fuerza aplicada que induce nocicepción en el ratón y que produce el retiro reflejo o levante de la pata estimulada. Este proceso se realiza por cinco veces separadas por 1 minuto, cada día de evaluación.

Evaluación de la hiperalgesia térmica.

La evaluación de la hiperalgesia térmica se realizó con el equipo Hot plate (Hot/cold plate, Ugo Basile, Italia) tres días antes y justo antes de realizar la inyección de las células neoplásicas (día 0), así como los días 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 posterior a la inyección de las células tumores. Los ratones se posicionan sobre una plancha metálica a una temperatura de 50 grados Celsius y limitada por una celda cilíndrica de acrílico de 20 centímetros de diámetro. El tiempo 0 comienza desde el momento en que el animal toma contacto con la plancha. Cuando el ratón evaluado se lame alguna de sus patas o salta, el cronómetro se detiene y se registra el tiempo (latencia). El tiempo máximo de exposición en la tabla es de 20 segundos (cut-off) para evitar algún daño en las patas.

Evaluación de la funcionalidad dinámica.

La evaluación de la funcionalidad dinámica se realiza con la máquina Rotarod (Digital rotarod, hecho en India). Este experimento se llevó a cabo tres días antes de la inyección de las células neoplásicas, el día de la inyección de las células previo a la intervención quirúrgica (día 0) así como los días 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 posterior a la inyección de las células. Los ratones se colocan en un rodillo giratorio a 20 ciclos por minuto. Los ratones son entrenados previamente a lo menos durante dos sesiones, antes del primer registro. En este experimento se evalúa la funcionalidad de acuerdo a lo que se resume en la tabla 2 (Honore y cols., 2000). El tiempo de permanencia máxima del ratón en el rodillo giratorio fue de 180 segundos (cut-off).

Tratamiento farmacológico.

En el tercer objetivo, los ratones fueron inyectados diariamente por siete días, vía i.p. entre los días 14 y 20 post cirugía con alguno de los siguientes fármacos: resveratrol (R5010, Sigma-Aldrich) 30, 100 y 200 mg/Kg, metadona (Biosano) 2,5 mg/Kg o DMSO 10% v/v en un volumen de 100 µl por cada 10 gramos de ratón. En el cuarto objetivo los ratones fueron inyectados vía i.p. en el día 14 por una vez con resveratrol 200 mg/Kg, metadona 2,5 mg/Kg, o DMSO 10% en un volumen de 100 µL por cada 10 gramos de ratón, o alternativamente vía intratecal (i.t.) con resveratrol 100 µg o DMSO

10% en un volumen de 5 μ L. En el quinto objetivo, desde el día catorce post inyección de células neoplásicas, se administró diariamente por 7 días vía i.p. resveratrol 100 mg/Kg o DMSO 10%. Junto a lo anterior, el día 14 post operación, los animales fueron implantados con una bomba ALZET (modelo 1007D, ALZET, USA) subcutánea la cual libera selisistat o DMSO 10% a un flujo de 0,5 μ L/hora por 7 días. Quince minutos antes de la implantación de la bomba ALZET, a los ratones se les inyectó 10 mg/Kg de selisistat ip. para realizar los experimentos agudos (Figura suplementaria 1). Las bombas fueron extraídas el día 20. La administración de DMSO como vehículo está respaldada por trabajos anteriores (Cheng y cols. 2014; Zhu y cols., 2017).

Western Blot.

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital previo a la inyección de las células (día 0) y los días 7, 14, 21 y 28 post inyección de células. La porción izquierda de la médula espinal a nivel de L4-L5 fue disecada, removida, lavada en PBS 3 veces y guardada inmediatamente a una temperatura de - 80°C. Los tejidos fueron homogenizados en buffer de lisis RIPA (TRIS-HCl 1M pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, tritón 100x 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%) y un conjunto de inhibidores de proteasas y fosfatasa (cOmplete™, Mini, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablet, Roche). El homogenizado fue centrifugado a 15.000 rpm por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue recolectado para determinar la concentración de proteínas mediante la técnica del ácido bicincoínico (Bicinchoninic acid kit, Sigma-Aldrich).

Alícuotas conteniendo 50 μ g de proteína fueron cargadas en un gel de poliacrilamida 10% (Mini-protean) y una electroforesis se corrió a 60 volt por media hora y luego 100 volt por 2 horas utilizando una fuente de poder Bio-Rad (BIORAD, USA). Se realizó una transferencia semi-seca de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Trans blot turbo mini nitrocelulose transfer packs, BIORAD) usando el equipo Transwell (BIORAD, USA) durante 7 minutos.

Se utilizaron los anticuerpos primarios SIRT1 (1:1000, Abcam, n°Ab110304), GFAP (1:10000, Abcam, n°Ab68428), Iba1 (1:2500, Abcam, n°Ab178847,) y β -actina (1:2000, Abcam, n°Ab8226) para detectar SIRT1, GFAP como marcador de astrocitos, Iba1 como marcado de microglia y β -actina como proteína de referencia, respectivamente.

Anticuerpos secundarios apropiados fueron usados: para SIRT1 un anticuerpo monoclonal anti-ratón (1/1000; Jackson Immunoresearch, n°115035174), para GFAP anticuerpo anti-conejo (1/20000; Jackson Immunoresearch, n°111035003), para Iba- 1 un anticuerpo anti-conejo a (1/10000; Jackson Immunoresearch, n°111035003) y para β -actina un anticuerpo anti-ratón (1/10000; Jackson Immunoresearch, n°115035174). A las membranas incubadas con los respectivos anticuerpos y posteriormente lavadas, se les agregó 200 μ L del reactivo de revelado quimioluminiscente (Supersignal, Thermofisher SCIENTIFIC) y fueron visualizadas y analizadas usando el equipo Chemiscope.

Análisis Estadístico.

Se calculó un tamaño de la muestra de $n=6$ según la siguiente fórmula: $n=2*(Za + Zb)^2*S^2/d^2$, en donde S =desviación estándar, d =variabilidad poblacional, Za =significancia del test y Zb =diferencia entre la población. En los experimentos iniciales se consideró un 25% de fallo en la implantación tumoral, por lo que se aumentó a $n=8$ los ratones con inyección de células neoplásicas. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación entre dos valores se utilizó t de Student; para más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni, y para los test en que se tuvo dos variables se utilizó ANOVA de dos vías seguido de test post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 7.0 (Graph Pad Inc, San Diego, CA).

RESULTADOS

1. Desarrollo de un modelo oncológico óseo en la cepa Balb/c murina.

1.1. Evaluación de la resorción ósea a distintas concentraciones de células.

La generación del modelo de cáncer óseo murino se basó en los modelos de inyección tumoral directa de xenógrafos en el fémur del ratón basado en trabajos publicados por los investigadores Schwei y Honore (Schwei y cols., 1999; Honore y cols., 2000). En ratones previamente anestesiados se realizó una artrotomía, se perforó la región intercondílea femoral, se introdujo células neoplásicas (BJ3Z-ZsGreen) en la médula ósea femoral y se finalizó con la oclusión de la perforación. Esto permite el desarrollo de un tumor sin la posibilidad de generar diseminación fuera de la médula ósea, durante la fase inicial del crecimiento tumoral. Para la elección de la concentración de células a utilizar se tomaron en cuenta dos elementos. El primero es que la resorción ósea sea evaluable mediante rayos X. El segundo es que la resorción ósea no sea tan severa como para invalidar cualquier tratamiento a utilizar. Para los experimentos preliminares se eligió tres concentraciones de células neoplásicas BJ3Z-ZsGreen: 250.000, 500.000 y 1.000.000 de células. La inyección intra-femoral de las 3 concentraciones de células neoplásicas generó lesiones óseas evaluadas mediante rayos X con una escala de resorción ósea conocida (Honore y cols., 2000) (Tabla 1). En los tres grupos se observó un aumento progresivo del daño óseo hasta el día 31. En general no hubo una proporcionalidad entre la cantidad de células inyectadas y la resorción ósea. En el grupo con 1.000.000 de células la resorción ósea fue mayor que los otros dos grupos a partir del día 10 y significativa respecto al día cero ($p < 0,05$), aunque en días posteriores no hubo diferencias entre los grupos (Figura 1C; Tabla 3). Este es el principal motivo por el cual se decidió utilizar la inyección de 1.000.000 células para realizar los estudios. El peso promedio de cada grupo aumentó en los 28 días de experimento, excepto el grupo de 500.000 células, el cual no varió de manera significativa su peso inicial. (Figura 1D; Tabla 5).

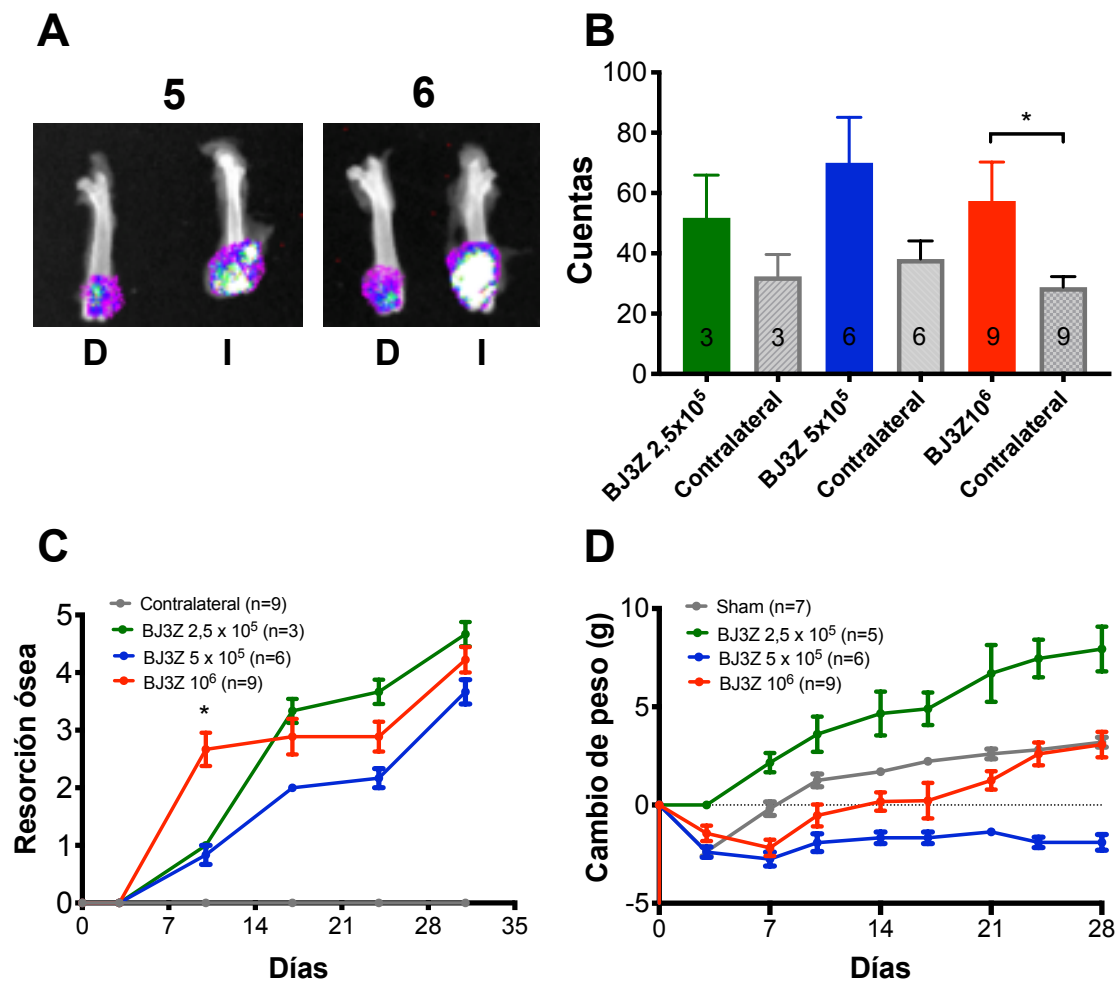


Figura 1: Evaluación de la presencia y progresión tumoral en ratones Balb/c.

(A) Fusión de la radiografía y la luminiscencia de los ratones 5 y 6 del grupo de 1.000.000 de células; (B) Cuantificación de la luminiscencia en la pata afectada vs. pata contralateral de cada grupo estudiado; (C) Progresión de la resorción ósea en cada grupo estudiado; (D) Cambio de peso respecto al peso inicial de cada grupo. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación entre dos valores se utilizó t de Student y para los test en que se tuvo dos variables se utilizó ANOVA de dos vías seguido de test post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. “*” representa diferencia significativa entre BJ3Z y contralateral en B y representa la diferencia intergrupo contra tiempo 0 en C.

1.2. Evaluación de la emisión de luminiscencia de las células BJ3Zg en fémur del ratón.

La presencia de células neoplásicas se realizó utilizando el equipo IN-VIVO MS FX PRO el cual permitió captar la luminiscencia emitida por las células neoplásicas BJ3Z-ZsGreen (que expresan la proteína ZsGreen luminiscente; Pinto y cols., 2014) en el fémur tratado y extraído al día 31 en el ratón post-mortem (Figura 1A). La visualización in situ de la presencia de células marcadas no fue posible debido a que la presencia de pelo del animal interfirió con la señal emitida por las células.

La luminiscencia se cuantificó seleccionando un área de 383 píxeles en la porción distal de cada fémur, misma área en todos los fémures evaluados, tanto inyectados como controles. En cada una de las patas inyectadas con células hubo un aumento de la luminiscencia comparado con la pata contralateral de cada animal (Figura 1B; Tabla 4). Únicamente en el grupo de 1.000.000 de células se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de la luminiscencia ipsilateral (izquierdo) comparado con la pata contralateral (derecho) en el área seleccionada.

2. Caracterización de la conducta algésica y la activación de la glía en el modelo de color por cáncer óseo en ratones.

2.1 Caracterización de la conducta algésica.

Las células neoplásicas implantadas en el fémur generaron un cuadro de hiperalgesia que se mantuvo hasta el final del experimento. Tres pruebas, dos algesiométricas y una de coordinación neuromuscular, se utilizaron para caracterizar el cuadro de hiperalgesia generada por el cáncer óseo, el **test de alodinia táctil** conocido como el test de Von Frey, el **test de plancha caliente** conocido como “hot plate” y un tercer test conocido como **test de marcha forzada** o “Rotarod” para identificar problemas de coordinación neuromuscular en animales de experimentación y en este trabajo en particular, para cuantificar la claudicación de la pata inoculada con cáncer.

Conducta algésica en el test de alodinia táctil. La evaluación nociceptiva usando el test de alodinia táctil en la pata de ratones con inoculación de células BJ3Z-ZsGreen y en los sham mostró una disminución en el umbral de retiro de la pata a partir del día 3,

llegando a los valores más bajos el día 7. Posteriormente, el umbral nociceptivo de animales controles/sham retorno a valores normales el día 14. Los umbrales nociceptivos de los grupos de animales implantados con células neoplásicas permanecieron bajos hasta el día 28 de experimentación, excepto el grupo que fue implantando con 500.000 células en el que su umbral nociceptivo incrementó a niveles normales justo el día 28 (Figura 2A; Tabla 6). Para comparar el efecto nociceptivo de la inyección de células en el hueso se cuantificó el área bajo la curva entre el día 14 y el día 28. Se obtuvo que en los tres grupos inyectados con células hubo una menor área bajo la curva comparado con sham (Figura 2B; Tabla 6).

Conducta algésica en el test de marcha forzada. Esta prueba se realizó en forma paralela a la de la plancha caliente, valorando el grado de lesión (cojera) de la pata afectada. Los tres grupos inyectados con células neoplásicas presentaron un aumento del puntaje de cojera, lo que representa una menor funcionalidad desde el día 3 hasta el final del estudio (día 28) a diferencia del grupo sham que presentó una recuperación al día 7 (Figura 2C; Tabla 8) que se mantuvo hasta terminada la observación. Al comparar el área bajo la curva de los tres grupos vs. sham se observó que en los tres grupos hay un aumento de la algesia, siendo significativos los grupos de 250.000 y 1.000.000 de células (Figura 2D; Tabla 8).

Conducta algésica en el test de la plancha caliente. La evaluación de la sensibilidad térmica se realizó en la plancha caliente siguiendo el mismo esquema temporal que el de alodinia táctil. Los tres grupos inoculados con células neoplásicas más el grupo sham mostraron una disminución en el tiempo de retiro de la pata (Figura 2E; Tabla 7). Al comparar el área bajo la curva entre los grupos inoculados vs. sham no hubo diferencias (Figura 2F; Tabla 7).

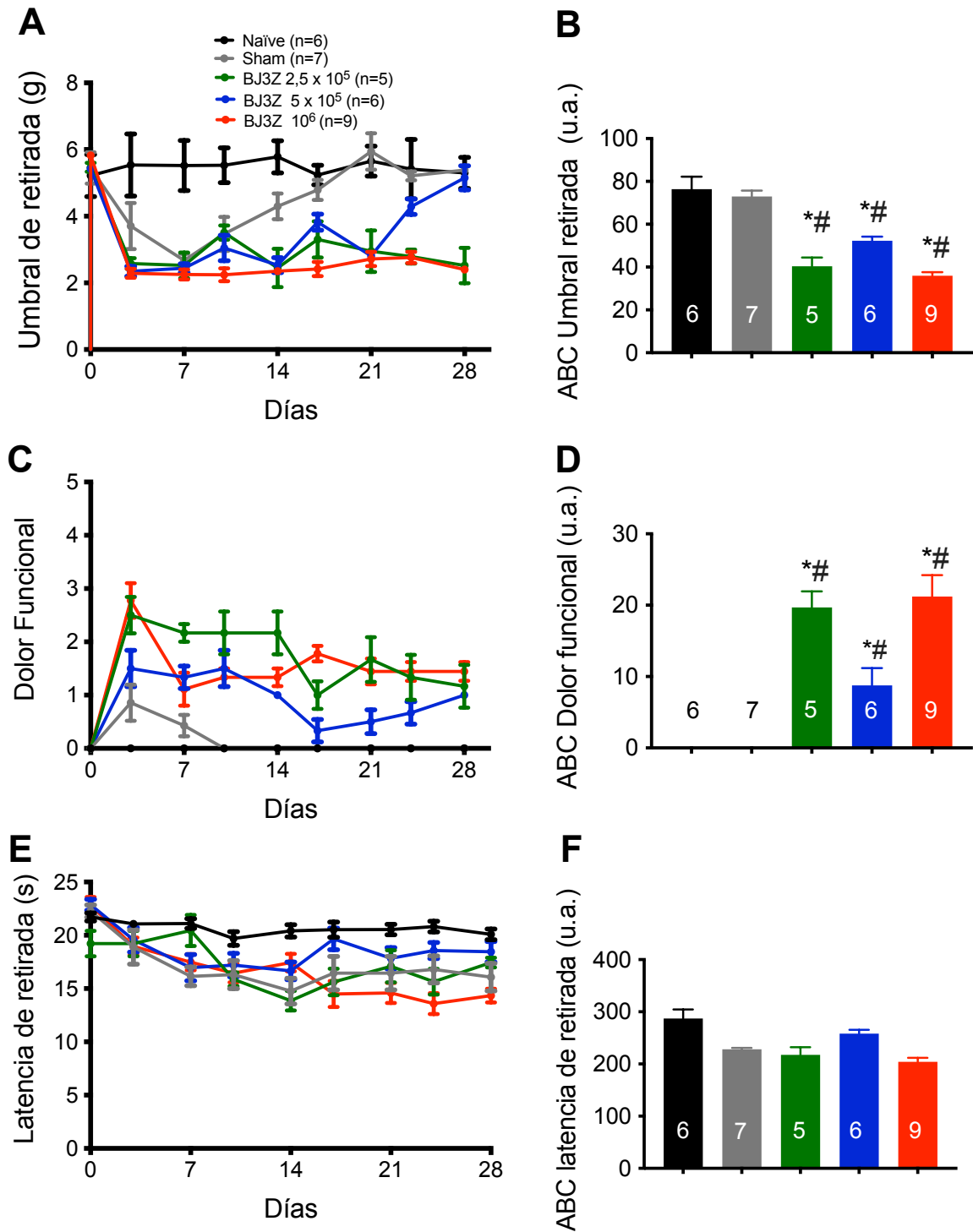


Figura 2: Determinación de la conducta algésica en ratones Balb/c con inyección de células neoplásicas a distintas concentraciones celulares. (A) Test de alodinia táctil; (B) ABC Test de alodinia táctil; (C) Test de marcha forzada; (D) ABC Test de marcha forzada; (E) Test de la plancha caliente; (F) ABC Test de la plancha caliente. Los

datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación entre dos valores se utilizó t de Student; para más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni y para los test en que se tuvo dos variables se utilizó ANOVA de dos vías seguido de test post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. “*” representa diferencia significativa comparado contra vehículo; “#” representa diferencia significativa comparado contra sham. “ABC” representa área bajo la curva; “u.a.” representa unidades arbitrarias.

2.2. Evaluación de la expresión de las proteínas gliales GFAP e Iba-1 en el modelo de cáncer óseo murino.

En este estudio se evaluó la relación entre la glía y el desarrollo de dolor óseo inducido por la inyección de células neoplásicas, antes (día 0) y los días 7, 14, 21 y 28 pos inyección de células neoplásicas. La evaluación de la relación entre el dolor por cáncer óseo sobre las células gliales se realizó cuantificando la expresión de proteínas de células de la glía espinal, la proteína GFAP característica de astrocitos y la proteína Iba1 característica de microglia. Para la extracción de la muestra se tomó en consideración el segmento medular correspondiente a la aferencia de fibras sensitivas del territorio somático (Hald y cols., 2009) y se procesó solamente el segmento hemimedular. La expresión de la proteína GFAP se utilizó como marcador de astrocitos y la proteína Iba-1 como marcador de la microglia. La expresión de la proteína GFAP no se modificó en el grupo de ratones inoculados con las células neoplásicas en ninguno de los tiempos estudiados, siendo además no significativamente diferentes a los del grupo sham, a pesar de que los gráficos muestran una tendencia a la disminución (Figura suplementaria 2A-B). En los animales sham, la expresión de Iba-1 en médula espinal aumentó los días 4 y 7 días, sin diferencias a posterior con ratones sanos al día 0. Además, la expresión de Iba-1 en el grupo de ratones inyectados con células neoplásicas observó un incremento al día 21 disminuyendo hacia el final del experimento (Figura suplementaria 2C-D).

Tomando en cuenta los estudios de caracterización de la hiperalgesia observados en ratones con cáncer óseo, se decidió utilizar, de aquí en adelante, la cantidad de 1 millón de células neoplásicas para generar el modelo de dolor por cáncer óseo.

3. Evaluación del efecto antinociceptivo por la administración crónica (repetida) de resveratrol en un modelo de dolor por cáncer óseo en ratones.

3.1. Efecto de resveratrol sobre la alodinia táctil desarrollada en el modelo de cáncer óseo murino.

Resveratrol comenzó a ser administrado 14 días posterior a la inoculación de células neoplásicas debido a que a partir de ese día se disocia el comportamiento algésico entre los animales controles (sham) y aquellos con cáncer óseo. El efecto antihiperalgésico de la administración i.p. repetida (siete días) de resveratrol 30, 100 y 200 mg/Kg, metadona 2,5 mg/Kg (control positivo) y/o DMSO 10% (vehículo) fue evaluado entre los días 14 y 21 post-inducción del cáncer óseo. La administración resveratrol (30, 100 y 200 mg/Kg i.p.) entre los días 14 y 21, aumentó el umbral nociceptivo en el test de alodinia táctil desde el día 17 hasta el día 24. Mientras que la administración de DMSO 10% y metadona 2,5 mg/Kg i.p. no modificaron el umbral nociceptivo (Figura 3A; Tabla 9). Los efectos de resveratrol acumulados en el tiempo, que se obtienen desde el área bajo la curva (ABC) entre los días 17 y 21, mostraron que las 3 dosis de resveratrol evaluadas tienen un efecto antinociceptivo significativamente mayor respecto a la administración de DMSO 10% o metadona (Figura 3B; Tabla 9).

3.2. Efecto de resveratrol sobre la marcha forzada en modelo de cáncer óseo murino.

El estudio de resveratrol sobre la coordinación neuromuscular o deterioro de la funcionalidad generado por la inoculación de células neoplásicas intrafemoral mostró que las administraciones repetidas, una vez al día por 7 días consecutivos, de resveratrol (30, 100 y 200 mg/Kg i.p.) generó una mejoría en la funcionalidad de la pata en los tres grupos. En el grupo de resveratrol 100 mg/Kg el efecto persistió hasta al menos el día 28 (Figura 3C; Tabla 10) y en los grupos de 30 y 200 mg/Kg el efecto

persistió hasta el día 24. Al determinar el área bajo la curva del efecto total de resveratrol sobre la funcionalidad de la pata afectada, en los tres grupos evaluados se observó una disminución del área bajo la curva de funcionalidad, sin embargo, sólo los dos grupos de mayor dosis mostraron significancia estadística contra vehículo. Las diferentes dosis utilizadas no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, al igual que en los experimentos de alodinia táctil, metadona no mostró un efecto significativo en la funcionalidad de la pata con la dosis utilizada de 2,5 mg/Kg i.p. (Figura 3D; Tabla 10).

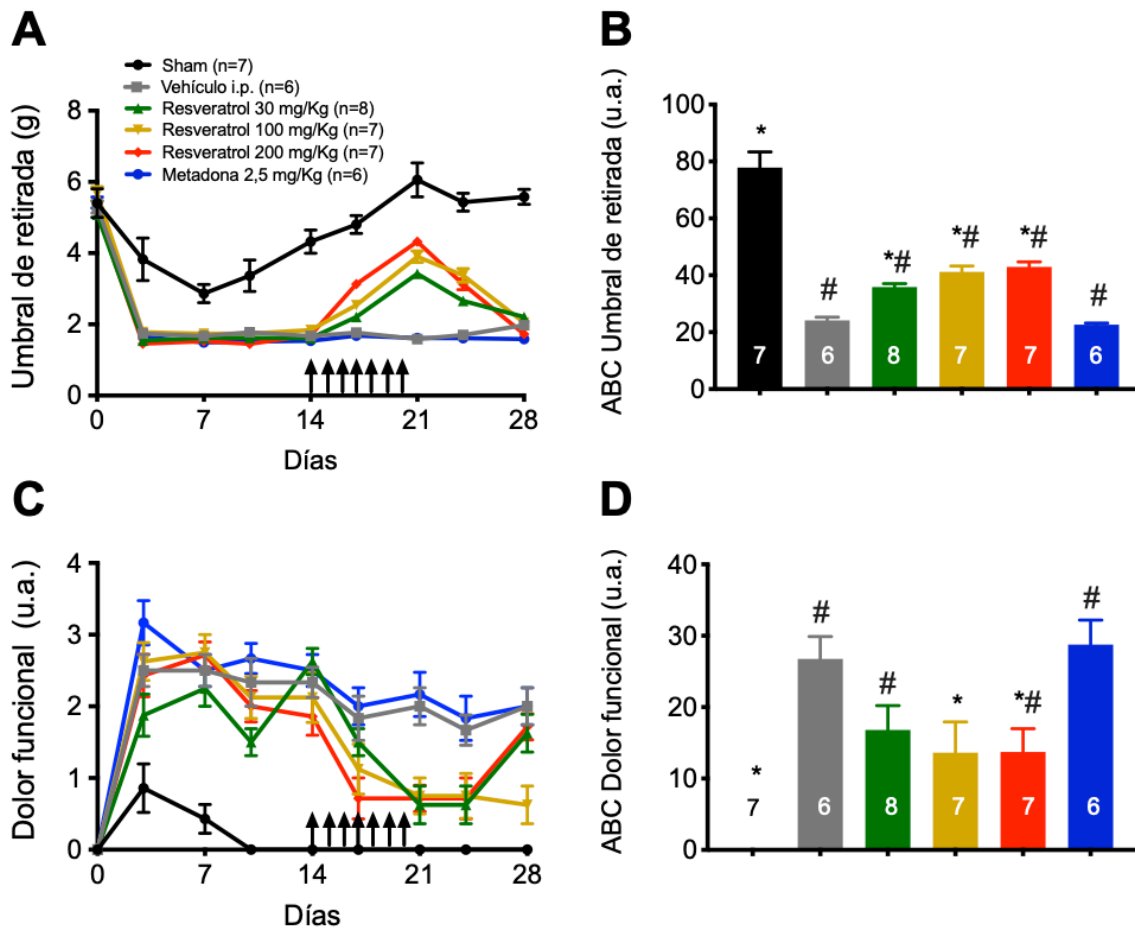


Figura 3: Efecto de la administración repetida de resveratrol en el modelo de cáncer óseo murino. (A) Test de alodinia táctil; (B) ABC test de alodinia táctil; (C) Test de marcha forzada; (D) ABC test de marcha forzada. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación de más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni y para los test en que se tuvo dos variables se

utilizó ANOVA de dos vías seguido de test post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. “*” representa diferencia significativa comparado contra vehículo; “#” representa diferencia significativa comparado contra sham. “ABC” representa área bajo la curva; “u.a.” representa unidades arbitrarias.

3.3. Expresión de proteínas gliales como GFAP e Iba-1 ante la administración repetida de resveratrol.

La administración de resveratrol a concentración de 100 mg/Kg no mostró cambios en los niveles de expresión de GFAP (Figura suplementaria 3A y 3B) ni de Iba-1 (Figura suplementaria 3C y 3D).

4. Identificación del sitio de acción de resveratrol: central o periférico

La identificación del sitio de acción del efecto antihiperalgésico de resveratrol se realizó estudiando los efectos de la administración a nivel periférico a través de la vía i.p. y a nivel central a través de la vía i.t., en dosis única y estudiamos los cambios en la hiperalgesia durante las 3 h siguientes. Estos estudios se realizaron 14 días posteriores a la administración de las células neoplásicas. Resveratrol administrado por vía i.p. mostró un efecto antihiperalgésico entre 1 y 2 horas posterior a la inyección, mientras que metadona tuvo un efecto antihiperalgésico inmediato y se mantuvo por 1,5 h. Por otro lado, una inyección i.t. de resveratrol mostró un efecto antihiperalgésico que se mantuvo los primeros 45 minutos (Figura 4A). Al analizar el área bajo la curva de la administración de los fármacos i.p. e i.t., se observó que resveratrol i.p. fue superior a DMSO (Figura 4B) y a metadona i.p.. En forma similar, también resveratrol i.t. fue superior al vehículo i.t. (Figura 4C) en lo que respecta a la evaluación de la antihiperalgesia (Tabla 11).

Además, se determinó el efecto de resveratrol i.p. e i.t. en la funcionalidad. Se obtuvo que el efecto de resveratrol i.p. fue mejor que DMSO 10% y metadona i.p. (2,5 mg/Kg). Además, se observó que resveratrol 100 µg vía i.p. mejoró la funcionalidad respecto a DMSO (Figura 4D). Al evaluar el área bajo la curva de ambas vías de administración

tanto la vía i.p. (Figura 4E) como i.t. (Figura 4F) se observó que se genera una mejoría en la funcionalidad (Tabla 12). Por último, se compararon las curvas efecto vs tiempo de cada vía de administración. Se determinó que el efecto antinociceptivo de la administración i.t. fue más rápido que su efecto por la vía de administración i.p. en el test de alodinia táctil (Von Frey) ($t_{max} \text{ i.p.} > \text{i.t.}$) y en el test de marcha forzada ($t_{max} \text{ i.p.} > \text{i.t.}$).

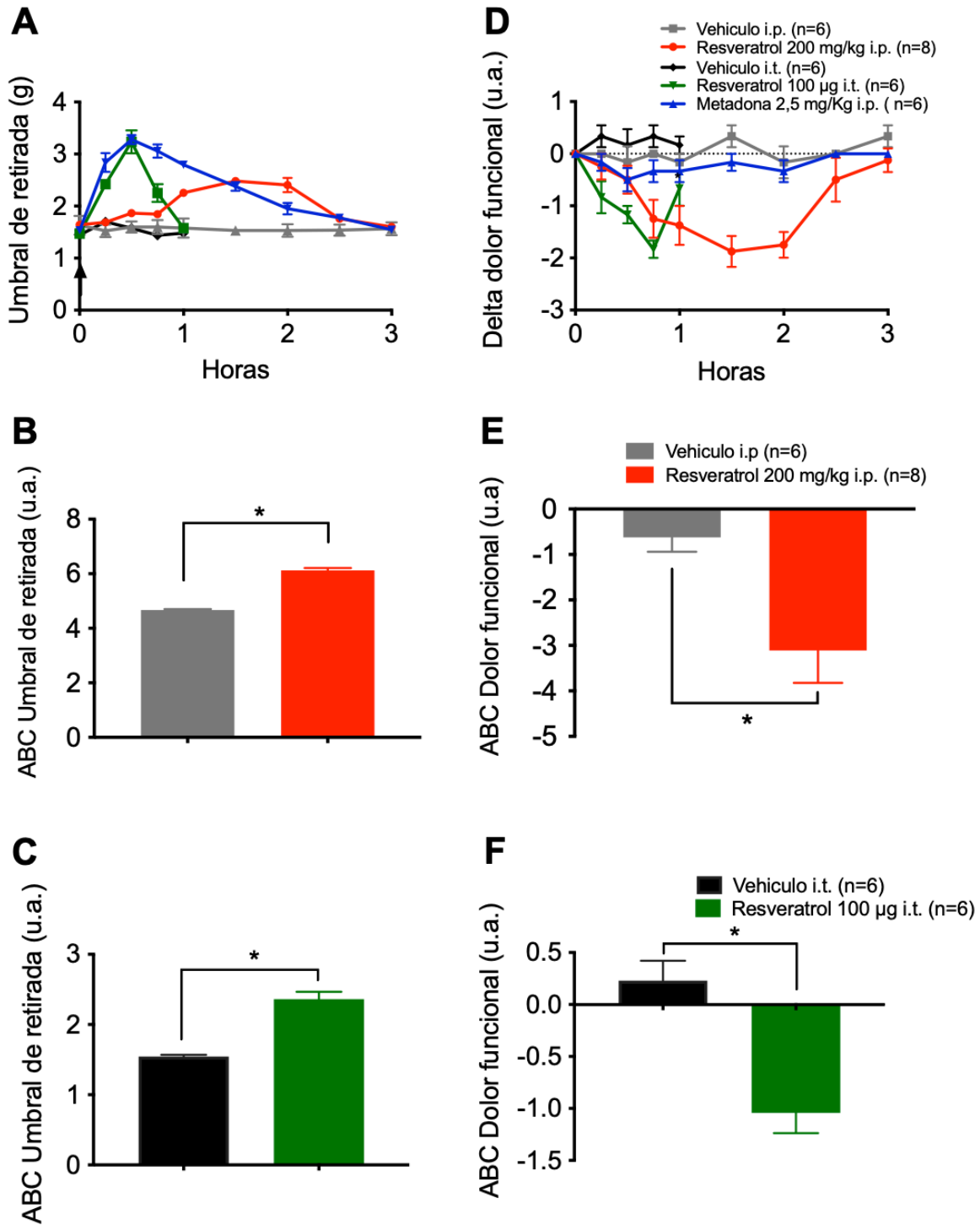


Figura 4: Efecto de una dosis única de resveratrol en el modelo de cáncer óseo en el día 14 experimental vía i.p. e i.t. (A) Test de alodinia táctil; (B) ABC de la administración i.p. de resveratrol en el test de alodinia táctil; (C) ABC de la administración i.t. de resveratrol en el test el test de alodinia táctil; (D) Test de marcha

forzada; (E) ABC de la administración i.p. de resveratrol en el test de marcha forzada; (F) ABC de la administración i.t. de resveratrol en el test de marcha forzada. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación de dos valores se utilizó t de Student. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. “*” representa diferencia significativa. “ABC” representa área bajo la curva; “u.a.” representa unidades arbitrarias.

5. Participación de SIRT1 en el mecanismo antinociceptivo del resveratrol en un modelo cáncer óseo en ratón.

5.1. Inhibición del efecto antihiperalgésico de resveratrol por selisistat, un antagonista de SIRT1.

Selisistat (EX527), un antagonista de SIRT1 (Cheng y cols. 2016), fue administrado por vía subcutánea (s.c.) (10 mg/Kg/día) mediante bomba ALZET entre los días 17 y 21 posinducción del cáncer óseo. Antes de la implantación de la bomba ALZET, se administró selisistat 10 mg/Kg s.c. Esto permitió realizar un estudio agudo, el primer día de administración y estudios crónicos, en los 7 días siguientes. La administración de selisistat (10 mg/Kg s.c.) 5 minutos previo a la primera inyección de resveratrol (100 mg/Kg i.p.), suprimió su efecto antihiperalgésico en el test de alodinia táctil. El área bajo la curva del umbral de retiro de pata, durante las 3 h de estudio, mostró que selisistat eliminó el efecto antihiperalgésico mostrado por resveratrol (Figura 5A-B; Tabla 13). Además, cuando se evaluó la funcionalidad, se evidenció que la administración de selisistat disminuyó el área bajo la curva del efecto de resveratrol y retardó el efecto máximo del fármaco. (Figura 5C-D; Tabla 14). En el modelo de dosis repetida de resveratrol a 100 mg/Kg i.p. por siete días, la administración de selisistat a 10 mg/Kg/día s.c. administrado de forma continua mediante bomba ALZET desde el día catorce, abolió el efecto antihiperalgésico de resveratrol disminuyendo el área bajo la curva en el grupo que se administró selisistat comparado con el grupo que se administró solo resveratrol (Figura 6A-B; Tabla 15). Cuando se evaluó la funcionalidad se observó una supresión del efecto de resveratrol cuando se administró selisistat en infusión continua (Figura 6C-D; Tabla 16).

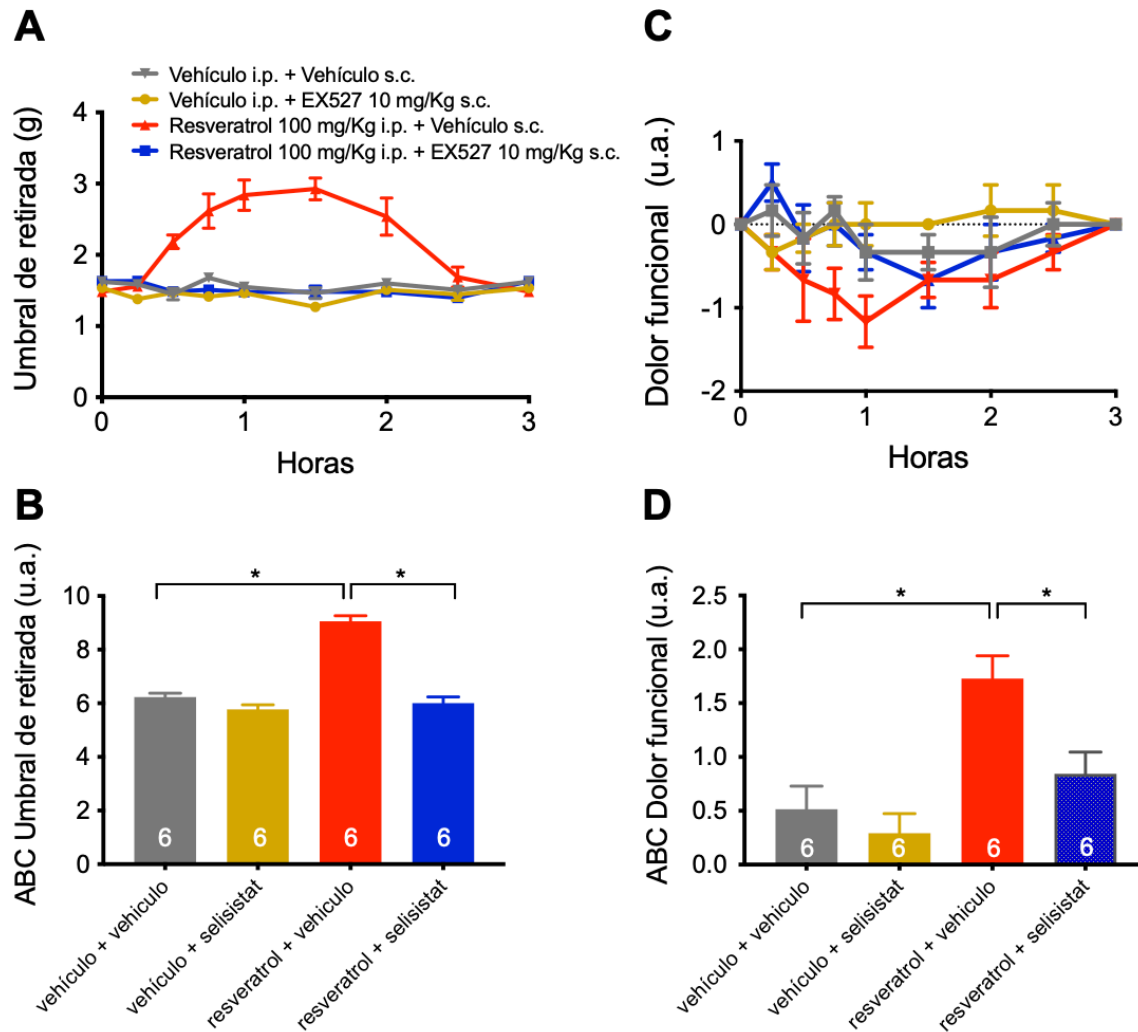


Figura 5: Efecto de selisistat (EX527) en la administración única de resveratrol.

(A) Test de alodinia táctil; (B) ABC del test de alodinia táctil; (C) Test de marcha forzada; (D) ABC del test de marcha forzada. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación de más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. “*” representa diferencia significativa. “ABC” representa área bajo la curva; “u.a.” representa unidades arbitrarias.

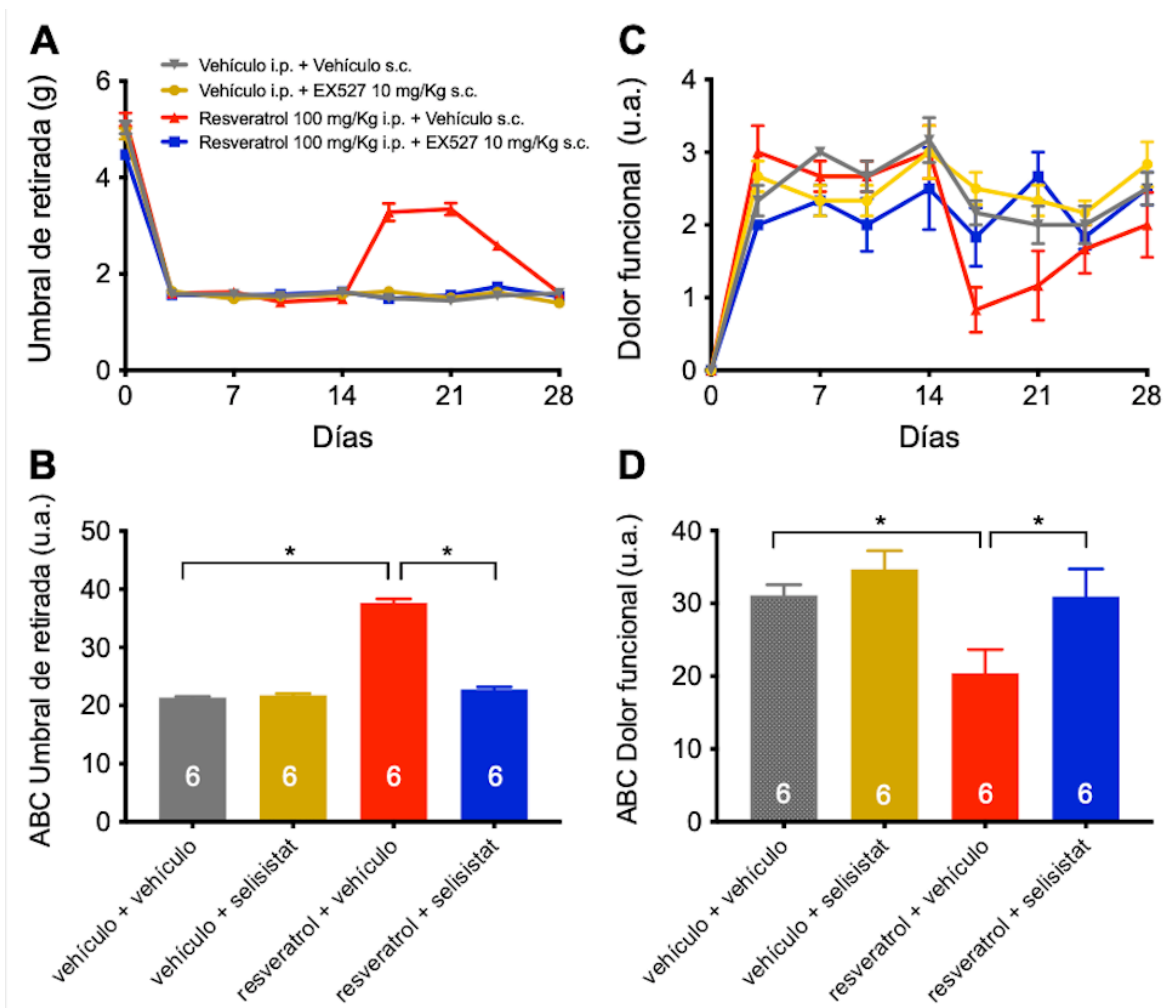


Figura 6: Efecto de selisistat en la administración repetida de resveratrol. (A) Test de alodinia táctil curva dosis respuesta; (B) ABC del test de alodinia táctil; (C) Test de marcha forzada; (D) ABC del test de marcha forzada. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación de más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue aceptado como estadísticamente significativo. “*” representa diferencia significativa. “ABC” representa área bajo la curva; “u.a.” representa unidades arbitrarias.

5.2. Evaluación de la expresión medular de SIRT1 en el modelo de dolor oncológico óseo murino y el efecto de resveratrol sobre la expresión de SIRT1.

Para evaluar la expresión de SIRT1 en relación a la administración de resveratrol de

manera crónica se realizó western blot para SIRT1 al día 14, 21 y 28 post inducción tumoral. La administración de resveratrol de manera repetida por siete días no genera cambio en la expresión de SIRT1 (Figura7A y 7B).

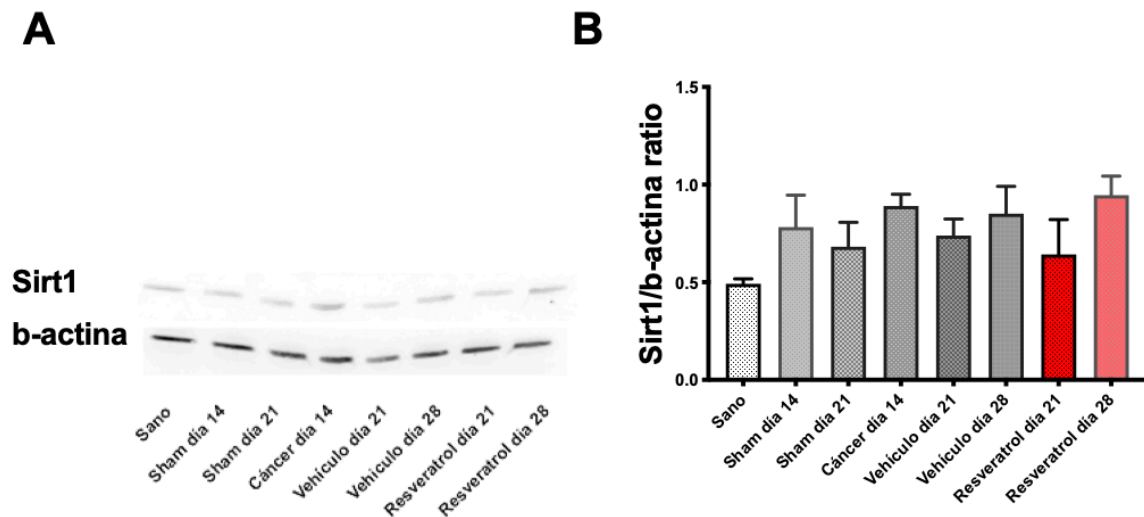


Figura 7: Expresión de SIRT1 ante la administración repetida de resveratrol. (A) Expresión de Sirt1 al administrar resveratrol de manera repetida. (B) Cuantificación de Sirt1 respecto a β -actina. Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Para la comparación de más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que resveratrol tiene propiedades antihiperalgésicas en un modelo de dolor por cáncer óseo, y además que en este efecto antihiperalgésico participa la vía de SIRT1. Se reprodujo exitosamente un modelo de cáncer óseo en el ratón (Honore y cols., 2000; Ducourneau y cols., 2014; Sabino y cols., 2002). El uso de ratones para implementar el modelo de cáncer óseo se basa en la facilidad para la manipulación, la tecnología disponible y los menores costos asociados a la compra y mantención de esta especie. Respecto al estado inmunitario del ratón, el modelo de dolor óseo inducido por cáncer se divide en dos tipos: inmunocomprometido e inmunocompetente. En los ratones inmunocomprometidos, ya sea el modelo de ratones atímicos o bien con inmunodeficiencia severa combinada, el cáncer se induce por la inoculación de células humanas, lo que permite estudiar la biología del cáncer de estirpe humana, pero al carecer de sistema inmune, el control de la proliferación e inflamación, el proceso algésico se ve totalmente modificado, ya que las células del sistema inmune son importantes en los procesos inflamatorios y en dolor crónico. A diferencia, en el modelo de ratón inmunocompetente el microambiente que se desarrolla alrededor del tumor representa una manera más fidedigna de estudiar esta patología (Goldstein y cols., 2010). La inoculación directa de células neoplásicas y la posibilidad de sellar el sitio de inyección permite que el tumor permanezca confinado al espacio medular, así el tumor prolifera dentro del hueso e inicialmente no invade los tejidos blandos adyacentes. Una inyección tumoral sin sello permitiría la invasión de tejidos circundantes, generaría sitios de metástasis secundarios y destruiría fibras sensitivas generando dolor neuropático (Sabino y cols., 2002).

En el modelo de cáncer óseo se estudió la conducta algésica mediante tests algesiométricos, con los que se evaluó la generación de alodinia táctil, hipersensibilidad térmica y funcionalidad. En las pruebas de alodinia táctil y funcionalidad se obtuvo una respuesta algésica progresiva y constante durante todo el tiempo distinto al grupo sham a partir desde el día catorce. Al evaluar el área bajo la curva en el test de alodinia

táctil (Von Frey) y de marcha forzada se observó una conducta hiperalgésica cuantificable y distinta al grupo sham. Además, no hubo una relación directa entre la cantidad de células inyectadas y el área bajo la curva de nocicepción. Respecto a la evaluación de la hiperalgesia térmica, hubo una disminución de la latencia de la pata afectada en los tres grupos estudiados, sin embargo, al calcular el área bajo la curva ningún grupo mostró diferencia con el grupo sham.

Las mediciones de comportamiento nociceptivo no solo deben detectar respuestas nociceptivas sino que deben ser consistentes con la experiencia clínica de dolor. La utilización de pruebas (test) que miden respuestas reflejas y que determinan umbrales algésicos han sido utilizadas ampliamente. Sin embargo, como el dolor es una experiencia multisensorial, hay otras mediciones que implican la valoración de conductas espontáneas y procesamiento cortical. Es sabido que en modelo de dolor óseo por cáncer hay afectación tanto de la sensibilidad mecánica como térmica, dolor gatillado por la palpación y dolor evocado por el movimiento (Gregory y cols., 2013). Los métodos utilizados para medir nocicepción se dividen en gatillado por estímulo y no gatillado por estímulo. El primero está representado en este trabajo por el test de Von Frey, el que representa una respuesta espinal ante un estímulo algésico y cuyos resultados obtenidos en el modelo de dolor mostrado en esta investigación son similares a los presentados por otros autores (Lozano-Ondoua y cols., 2013). El segundo es el test de marcha forzada en el cilindro rotatorio. En este test la alteración de la marcha y la cojera se considera como un equivalente de nocicepción y típicamente se cataloga como independiente de estímulo o no provocado, al igual que otras pruebas que evalúan marcha como el análisis de marcha (Adams y cols., 2016). Estas pruebas miden respuestas no evocadas, tienen una mayor concordancia con lo que ocurre con el ser humano, lo que ha llevado a un aumento de la implementación de estas pruebas. Al utilizar el test de marcha forzada, se puede evaluar la marcha en un ratón con cáncer óseo, permite utilizar un fármaco y observar una respuesta que dará mayor certeza de que tal fármaco podría ser utilizable en humanos. Este test no sólo involucra conductas reflejas de retiro, sino que además conductas moduladas en sistemas superiores. La aplicación de un estímulo térmico está representado por el test de la plancha caliente.

Este test no sólo representa una respuesta refleja, sino que considera la integración de respuestas supraespinales. Además, considera respuesta nociceptiva no solo el levantar la pata o el lengüeteo, sino que también adquirir una postura algésica o saltar (Espejo y Mir, 1993). Otro elemento es que el ratón puede estar apoyado en sus cuatro patas más la cola, afectando la respuesta medida en modelos que generen dolor de manera local. Un factor que incrementa la complejidad de la interpretación de los resultados es que el ratón puede aprender una conducta que puede disminuir el tiempo de latencia (Plone y cols., 1996). Por estos motivos, el test de plancha caliente puede generar datos con gran variabilidad. En este trabajo se observó que hay una disminución de la latencia en el test de plancha caliente, sin embargo, no fue diferente estadísticamente del grupo sham. Es posible que el daño generado por la cirugía sea equivalente al estímulo generado por el cáncer óseo en lo que se refiere a hiperalgesia térmica en esta cepa de ratones. Otros estudios han mostrado una disminución de la latencia en ratones con cáncer óseo en el test de Hargreaves, otro tipo de test térmico (Guo y cols., 2016; Wei y cols., 2017).

Los astrocitos son las células más abundantes en el sistema nervioso central y juegan un rol relevante en el desarrollo del dolor por cáncer óseo. Al activarse cambian su forma y tamaño. La proteína GFAP, expresada en los astrocitos, en la actualidad es considerada como marcador neuroquímico de nocicepción y de astrogliosis. Cuando se evaluó la expresión proteica de GFAP en el segmento de médula correspondiente, se observó que no hay diferencia entre el grupo inyectado con células neoplásicas vs sham. Las primeras observaciones de activación astrocítica medular medido por GFAP se hicieron en ratones inyectados con células de sarcoma en fémur (Honore y cols., 2000). En concordancia, se ha visto que existiría un aumento de GFAP en el día 8, 14 y 21 post inyección tumoral evaluado por inmunohistoquímica (Hald y cols., 2009). En este trabajo, no solo hay activación en el segmento medular en donde llegan las aferencias, sino que también hay propagación a segmentos medulares superiores e inferiores. En otro trabajo, la inyección intrafemoral de células NCTC 2472 aumentó la expresión de GFAP medular (Pevida y cols., 2013). Sin embargo, otros autores, han demostrado que no siempre hay activación astrocítica. En el modelo de cáncer óseo en ratas utilizando

células MRMT-1, se demostró que no hay diferencia respecto a la expresión medular de GFAP en la pata inyectada con células neoplásicas vs el grupo control, ni vs la pata contralateral en los días 3, 7, 10, 14, 17 y 21 post cirugía, evaluado por inmunohistoquímica. Tampoco hubo diferencias en la cuantificación de mRNA ni de proteínas por Western blot (Ducourneau y cols., 2014). Por otro lado, se ha visto que la expresión de GFAP no es un prerequisite para la generación de gliosis reactiva (Pekny y cols., 1995). En este sentido, es posible generar un modelo de dolor por cáncer, con expresión algésica alodínica e hiperalgésica, sin que haya expresión de marcadores de astrogliosis. Esto implica que la astrogliosis no es siempre esencial en el desarrollo del dolor, o bien, no siempre la astrogliosis se relaciona con la expresión de GFAP. Es posible, que los astrocitos liberen sustancias implicadas en la sensibilidad térmica y mecánica que no han sido evaluadas, y que no necesariamente se correlacionen con expansión glial.

Paralelamente, la microglia representa el sistema inmune en el sistema nervioso central. Tiene una proporción reducida (5-20%), y habitualmente en el modelo de cáncer óseo aumenta en número, cambia su morfología y cambia la expresión de proteínas en su superficie. Cuando se evaluó la expresión proteica de Iba-1 en la médula espinal, se evidenció una diferencia significativa al día 21 entre el ratón con cáncer vs sham. Desde la primera observación de microgliosis en médula espinal en modelo de cáncer óseo (Zhang y cols., 2005) se ha publicado información contrapuesta. En ratones, la inyección intrafemoral de células NCTC 2472 aumenta la expresión de Iba-1 medular (Pevida y cols., 2013). En otros trabajos se ha visto que en el modelo de dolor por cáncer óseo no hay un aumento de la expresión de Iba-1 evaluado por inmunohistoquímica en los días 8, 14 y 21 post cirugía (Hald y cols., 2009). En otra publicación, en ratones inyectados con células neoplásicas MRMT-1, no hubo diferencias en la expresión de Iba-1 al día 21 post cirugía comparado con sham evaluado por inmunohistoquímica (Ducourneau y cols., 2014). Esta evidencia respalda que no siempre hay una correlación entre el desarrollo de dolor por cáncer y activación microglial. Esto no significa que no haya activación de estas células. Es posible que la activación de señales intracelulares no sea evidenciable por cambios morfológicos como la activación de la vía PI3K/Akt

(Guan y cols., 2015) y el sistema NF- κ B (Xu y cols., 2014) o liberación de moléculas implicadas en la generación de alodinia e hiperalgesia como IL-1, IL-6 o TNF- α (Mao-Ying y cols., 2012), lo cual no fue evaluado en este estudio.

Se eligió metadona como alternativa de opioide a morfina por su mayor vida media (que es 22-48 horas en administración repetida), corta latencia y efectividad. Además, estudios recientes han mostrado que metadona tiene un similar perfil analgésico que morfina a un menor costo (Nicholson y cols., 2017). Es posible que la administración continua de metadona hubiese podido generar un perfil analgésico más permanente que intermitente. Por otro lado, es probable que la administración de metadona de forma continua genere desensibilización y tolerancia (Cahill y cols., 2016).

En este trabajo se pudo demostrar que resveratrol tiene un efecto antinociceptivo disminuyendo tanto la alodinia mecánica y mejorando el puntaje de funcionalidad. Se observa que hay un efecto dosis dependiente, en lo que respecta a alodinia mecánica. Más aún, resveratrol tiene un efecto post administración del fármaco. En cáncer óseo se han postulado algunos mecanismos de acción de resveratrol. La administración de resveratrol en el modelo de cáncer óseo en ratas disminuye la expresión del receptor de fractalkina CX3CR1, que está sobre expresado en este modelo en médula espinal. En ese trabajo, se demostró que la disminución de la expresión de CX3CR1 tiene relación con la atenuación de la respuesta de astrocitos y microglia (Cheng y cols., 2014). La disminución de la nocicepción generada por resveratrol se asocia a disminución de moléculas proinflamatorias como NF- κ B y TNF- α (Moon y cols., 2006). El efecto antinociceptivo de resveratrol también se asocia a disminución de la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α y al aumento de IL-10 (Tao y cols., 2016). En el modelo, estas moléculas contribuirían a la sensibilización periférica de neuronas sensitivas llevando a una serie de cambios, entre ellos, a la activación microglial. Otros autores han postulado que el efecto de resveratrol tiene relación con la activación de AMPK en el modelo de cáncer óseo. La administración de resveratrol vía oral en ratas genera antinocicepción que es revertida con compuesto C, un inhibidor

de AMPK. Al estudiar la médula espinal se demostró que resveratrol aumenta la fosforilación de AMPK y que esta enzima se localizaría junto a neuronas, astrocitos y microglia. Además, la administración de resveratrol disminuye la expresión medular de IL-1 β , TNF- α y la fosforilación de la kinasa PKC y su blanco NR1 también en médula espinal (Song y cols. 2015). Resveratrol no sólo tendría mecanismos centrales de antinocicepción. Uno de los elementos que explica el dolor óseo es la sensibilización periférica. Recientemente se estudió la relación entre el efecto antinociceptivo de resveratrol con la función de ASIC3. Se demostró que la administración de resveratrol a dosis de 0.3, 1 y 3 mg/Kg i.p. genera antinocicepción. En el mismo trabajo, la administración de resveratrol en células SH-SY5Y disminuyó la expresión de ASIC3 en la membrana celular (Zhu y cols., 2017). Los trabajos concuerdan en que resveratrol tiene un efecto antinociceptivo disminuyendo la inflamación medular mediada por citoquinas como IL-1 β y TNF- α con cierta participación de la glía. El mecanismo preciso por el cual resveratrol ejerce su efecto en el modelo de cáncer óseo permanece sin dilucidar.

Cuando se administró el resveratrol de manera única, se obtuvo antinocicepción en ambos test evaluados con un efecto máximo a las 1,5 horas y cese del efecto a las 3 horas y comparable con metadona. Al inyectar de manera única resveratrol vía i.t. se obtuvo un efecto antinociceptivo en ambos test, pero con un perfil más rápido de acción, con un efecto máximo a los 30 minutos y cese de este efecto a la hora. En este sentido, se puede afirmar que el efecto farmacológico tiene un componente en el sistema nervioso central. En otros trabajos se ha visto, que la administración de resveratrol i.t. previene de manera aguda el efecto nociceptivo de la administración de fractalkina intratecal, evidenciando que en parte puede ser que este efecto agudo este mediado por receptores microgliales como CX3CR1 (Cheng y cols., 2014). Río abajo, este receptor puede generar la secreción de varias moléculas desde la glía, interleuquinas como IL-1 β o TNF- α , amplificando el efecto inflamatorio (Cao y Zhang, 2008). El efecto antinociceptivo agudo de resveratrol también ha sido ligado a la vía opioide. La administración de trans-resveratrol vía i.p. fue revertido con naloxona intraperitoneal en un modelo de hiperalgesia inducida por carragenina (Gupta y cols., 2004). La vía de

las sirtuinas también ha sido implicada en modelos agudos. En un modelo de quemadura en ratas, se demostró que la administración de resveratrol i.t. revierte parcialmente y de manera aguda la alodinia mecánica. Este efecto se anula al administrar un inhibidor selectivo de SIRT1 (Cheng y cols., 2016). A pesar de que la evidencia apunta a que resveratrol tiene efectos antinociceptivos modulando la inflamación, el mecanismo por el cual lo hace aún no ha sido dilucidado.

Con los datos obtenidos, se demostró que el efecto antinociceptivo de resveratrol es suprimido por el inhibidor selisistat en el modelo oncológico óseo murino. En este contexto se pueden obtener dos conclusiones. La primera es que SIRT1 podría ser un blanco directo o indirecto de resveratrol. Esto está respaldado por datos recientes que indican que, por un lado, resveratrol es un activador alostérico directo de SIRT1 in vivo e in vitro a través de la unión al dominio de activación amino-terminal de SIRT1 (Sinclair y cols., 2014) y, por otro lado, resveratrol influiría en la activación de AMPK que a su vez activaría de manera indirecta SIRT1 (Kulkarni y Cantó, 2015). La segunda conclusión tiene relación con que la inhibición de SIRT1 por selisistat puede antagonizar el efecto de resveratrol en el modelo de cáncer óseo, lo que sugiere que SIRT1 y sus sustratos median la transducción de señales implicadas en la generación del dolor. Es probable que el acoplamiento mecánico entre la activación de SIRT1 y las respuestas nociceptivas reducidas en cáncer de hueso dependa de la señalización de SIRT1 corriente abajo, incluida la regulación de la expresión génica en el nivel transcripcional al influir en la remodelación de la cromatina actuando sobre la deacetilación de histonas junto con la modulación directa de las proteínas mediante la eliminación de los grupos funcionales acetilo (Zhang y cols., 2010). Los sustratos probables para la deacetilación mediada por SIRT1 podrían ser algunos mediadores pronociceptivos como NF- κ B, IL-6, TNF- α y iNOS. Se ha encontrado que los niveles de expresión de la médula espinal de estos mediadores se reducen después de la activación de SIRT1 en un modelo de rata con neuropatía, junto con la disminución paralela de la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica (Gui y cols., 2015). Otro posible objetivo río abajo de SIRT1 podría ser la región promotora Grm1/5 de los genes que codifican la transcripción de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos mGluR1/5. Se sabe

que estos receptores juegan un papel clave en la sensibilización central y el dolor neuropático. Se ha encontrado que el nivel de expresión espinal de estos receptores disminuye después de la activación de SIRT1, en conjunto con la existencia de niveles reducidos de acetilación H3 en las regiones promotoras de Grm1/5 en la médula espinal de animales diabéticos neuropáticos (Zhou y cols., 2017). La función de SIRT1 se ha relacionado también con apoptosis neuronal. La activación de SIRT1 con SRT1720 i.t., un agonista específico de SIRT1, reduce la expresión de Drp1. Además, regula Bcl-2/BAX, disminuye la activación de caspasa-3 y previene la fisión mitocondrial (Li y cols., 2018). Recientemente se demostró que la administración de SRT1720 i.t. disminuye la alodinia mecánica, lo que se correlaciona con el aumento de la expresión de SIRT1 y disminución de la expresión de mGluR1/5 en la médula espinal. Además, la administración de SIRT1-shRNA indujo disminución del umbral mecánico y aumento de la expresión de mGluR1/5. Esto sugiere que SIRT1 tiene un rol clave en el desarrollo y mantenimiento del dolor óseo en este modelo (Yang y cols., 2019). La vía CREB/CRTC1 ha sido relacionada previamente con el desarrollo de inflamación y dolor neuropático. Estos mismos autores demostraron que el efecto SRT1720 se relaciona con la disminución de la expresión de p-CREB (pero no t-CREB) y su coactivador CRTC1, lo que lleva a pensar que parte del efecto antinociceptivo de SRT1720 y, por ende, la función de SIRT1, tiene relación directa con la vía de señalización de CREB/CRTC1 (Yang y cols., 2019).

En este trabajo la expresión de SIRT1 no se modificó ni con la inducción de cáncer óseo, ni con el tratamiento con resveratrol. En otros estudios, la expresión de SIRT1 sí se ha modificado. En un modelo neuropático de constricción ciática en ratas, se mostró que al día 7, hay una disminución de la expresión de SIRT1 en médula espinal, lo que se revierte parcialmente por la administración de resveratrol i.t. evaluado por Western blot e inmunohistoquímica (Yin y cols., 2013). En un modelo de cáncer óseo en ratas, se demostró que resveratrol disminuye la hiperalgesia al día 21 y que el tratamiento con resveratrol en dosis nanomolar a células SH.SY5Y aumenta la expresión de SIRT1 (Zhu y cols., 2017). En contraposición, en un modelo de quemadura cutánea, se ha visto que la expresión de SIRT1 aumenta al día 21 post noxa térmica. Se postula como mecanismo

a un feedback positivo que estimularía la expresión de SIRT1 como compensación (Cheng y cols., 2016). En modelos celulares, se ha visto que la activación de SIRT1 por resveratrol aumenta su actividad y deacetila FoxO1, el cual viaja al núcleo actuando como factor de transcripción para la síntesis de mRNA de SIRT1, como modelo de autofeedback positivo (Xiong y cols., 2011). Sin embargo, esto no ha sido estudiado en cáncer óseo. Otra forma de acercarse al problema es medir la actividad de SIRT1. Una forma es evaluar el efecto de la deacetilasa sobre blancos río abajo. En un modelo de neuropatía por constricción de nervio ciático, se demostró que el tratamiento con resveratrol aumenta la acetilación de la histona H4-K en la posición 16 (Shao y cols., 2014). Puede ser que, en este trabajo, los cambios de la expresión de SIRT1 no sean relevantes en cáncer óseo o bien no sean cuantificables. Por otro lado, puede ser que lo más importante sea la medición de la actividad de la enzima midiendo acetilación de histonas u otros blancos río abajo, no realizados en este trabajo.

En este sentido resveratrol y el efecto directo de este fármaco sobre SIRT1, en el contexto de búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del dolor por cáncer óseo primario o bien metástasis ósea, puede ser una alternativa efectiva, de bajo costo, con escasas reacciones adversas para el manejo de este síntoma. Es un fármaco conocido con mecanismo de acción novedoso, con un perfil pleiotrópico y con múltiples efectos farmacológicos en distintas vías metabólicas, con efecto analgésico, antiinflamatorio, antiresortivo y antioxidante que puede ser muy importante a futuro para el manejo del cáncer con metástasis ósea o bien cáncer óseo primario (Figura 8).

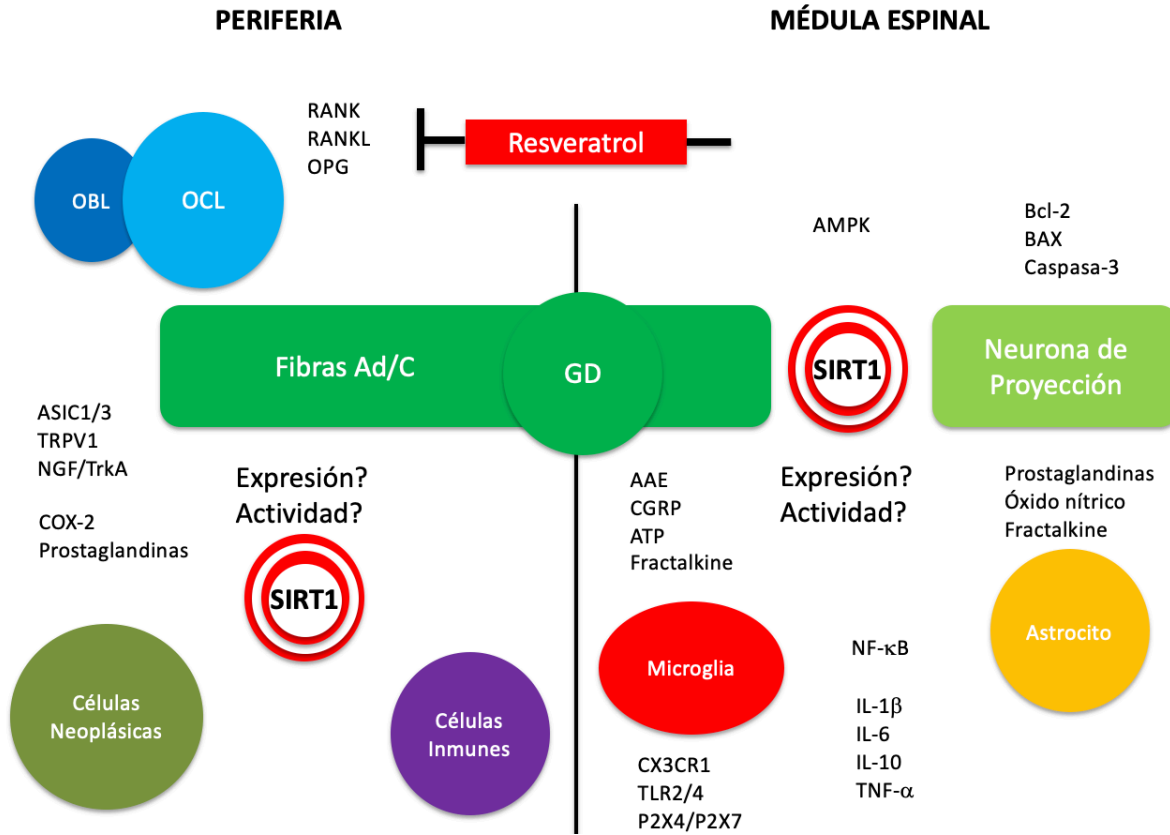


Figura 8: Representación de la vía nociceptiva, componentes celulares asociados, efecto de resveratrol sobre SIRT1 y las proteínas reguladas río debajo de SIRT1.

CONCLUSIONES

- El modelo de cáncer óseo en ratones es reproducible en el laboratorio.
- La técnica de radiografía permite evaluar la resorción ósea en ratones con cáncer óseo.
- La técnica luminiscencia permite evaluar la presencia tumoral utilizando células BJ2Z marcadas con proteína fluorescente verde en ratones.
- El daño óseo genera nocicepción factible de medir en el laboratorio mediante los test conductuales disponibles.
- No hay astrogliosis medida por GFAP en los días evaluados en el modelo de cáncer óseo en ratones.
- Hay microgliosis medida por iba-1 al día veintiuno de inyección tumoral en el modelo de cáncer óseo.
- Resveratrol tiene un efecto antinociceptivo en ratones tanto en administración única como repetida en ratones con cáncer óseo.
- El efecto de resveratrol está relacionado con la dosis administrada en cáncer óseo en ratones.
- El efecto de las dosis repetidas persiste al menos tres días post administración del fármaco.
- Resveratrol no tiene efecto sobre la glía en el modelo de cáncer óseo en ratones.
- El efecto de la administración de resveratrol intratecal es mas rápido y potente que el efecto de la administración intraperitoneal en ratones con cáncer óseo.
- El blanco molecular de resveratrol está ubicado predominantemente en el sistema nervioso central.
- Resveratrol tiene un efecto antinociceptivo en ratones en el modelo de cáncer óseo a través de activación de SIRT1, directa o indirectamente, tanto en administración única como repetida.
- Resveratrol no aumenta la expresión de SIRT1 en la médula espinal en ratones con cáncer óseo.

REFERENCIAS

Adams, BL., Guo, W., Gors, RT., Knopp, KL. (2016). Pharmacological interrogation of a rodent forced ambulation model: leveraging gait impairment as a measure of pain behavior pre-clinically. *Osteoarthritis Cartilage*, 24(22): 1928–1939.

Bazzo, KO., Souto, AA., Lopes, TG., Zanin, RF., Gomez, MV., Souza, AH., Campos, MM. (2013). Evidence for the analgesic activity of resveratrol in acute models of nociception in mice. *JNatProd*, 76(1):13-21.

Cao H. y Zhang YQ. (2008). Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci Biobehav Rev*, 32:972-983.

Carbone, L. y Austin, J. (2016). Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PLoS One*, 11(5): e0155001.

Cheng HT. (2010). Spinal cord mechanisms of chronic pain and clinical implications. *Curr Pain Headache Rep*. 14(3):213-220.

Cheng, W., Zhao, Y., Liu, H., Fan, Q., Lu, FF., Yin, Q., Yan, CD. (2014). Resveratrol attenuates bone cancer pain through the inhibition of spinal glial activation and CX3CR1 upregulation. *Fundam Clin Pharmacol*, 28(6):661–670.

Cheng W., Wang JF., Yang CX., Wu L., Yin Q., Liu H., Fu ZJ. (2016). Intrathecal injection of resveratrol attenuates burn injury pain by activating spinal sirtuin 1. *Pharmacogn Mag*, 12(Suppl 2):S201-205.

Civi, S., Emmez, G., Dere, ÜA., Börcek, AO., Emmez, H. (2016). Effects of quercetin on chronic constriction nerve injury in an experimental rat model. *Acta Neurochir (Wien)*, 158(5):959-965.

Colvin, L., Fallon, M. (2008). Challenges in cancer pain management - bone pain. *Eur J Cancer*, 44(8):1083–1090.

Coleman, R. (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*, 12(20):6243s–6249s.

Committee on Guidelines for Scientific Publications Involving Animal Studies. Guidance for the Description of Animal Research in Scientific Publications. Washington, D.C.: National Academy of Sciences; 2011. 31 p.

D`Mello, R., Dickenson, AH. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*, 101(1):8-16.

Delaney, A., Fleetwood-Walker, SM., Colvin, LA., Fallon, M. (2008). Translational medicine: cancer pain mechanisms and management. *Br J Anaesth*, 101(1) 87:94.

Departamento de Estadística e Información en Salud. Ministerio de Salud de Chile (DEIS). Tasa de Tumores Malignos según Sexo, Chile 1997-2013. 2013. <http://www.deis.cl/series-y-graficos-de-mortalidad/>.

Denk, F., Huang, W., Sidders, B., Bithell, A., Crow, M., Grist, J., Sharma, S., Ziemek, D., Rice, AS., Buckley, NJ., McMahon, SB. (2013). HDAC inhibitors attenuate the development of hypersensitivity in models of neuropathic pain. *Pain*, 154(9): 1668–1679.

Desandre, PL y Quest TE. (2009). Management of cancer-related pain. *Emerg Med Clin North Am*, 27(2):179:194.

Ducourneau. VR., Dolique, T., Hachem-Delaunay, S., Miraucourt, LS., Amadio, A., Blaszczyk, L., Jacquot, F., Ly, J., Devoize, L., Oliet, SH., Dallel, R., Mothet, JP., Nagy, F., Fénelon, VS., Voisin, DL. (2014). Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers. *Pain*, 155(2):275-291.

Espejo, EF., Mir, D. (1993). Structure of the rat's behaviour in the hot plate test. *Behav. Brain Res*, 56(2):171-176.

Cahill CM., Walwyn W., Taylor AMW., Pradhan AAA., Evans CJ. (2016). Allostatic mechanisms of opioid tolerance beyond desensitization and downregulation. *Trends Pharmacol Sci*, 37(11):963-976.

Florencio-Silva R., Sasso CE., Simoes MJ., Cerri PS. (2015). Biology of bone tissue: structure, function and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*, 421746.

Gentili, M., Mazoit, JX., Bouaziz, H., Fletcher, D., Casper, RF., Benhamou, D., Savouret, JF. (2001). Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci*, 68(11):1317-1321.

Ghilardi, JR., Freeman, KT., Jimenez-Andrade, JM., Mantyh, WG., Bloom, APA., Mantyh, PW. (2010). Administration of a tropomyosin receptor kinase inhibitor attenuates sarcoma-induced nerve sprouting, neuroma formation and bone cancer pain. *Mol Pain*, 6(1):87.

Ghilardi, JR., Röhrich, H., Lindsay, TH., Sevcik, MA., Schwei, MJ., Kubota, K., Halvorson, KG., Poblete, J., Chaplan, SR., Dubin, AE., Carruthers, NI., Swanson, D., Kuskowski, M., Flores, CM., Julius, D., Mantyh, PW. (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci*, 25(12): 3126-3131.

Goldstein, RH., Weinberg, RA., Rosenblatt, M. (2010). Of mice and (wo)men: mouse models of breast cancer metastasis to bone. *JBone MinerRes*, 25(3):431-436.

Gordon-Williams, RM., Dickenson, AH., (2007). Central neuronal mechanisms in cancer-induced bone pain. *Curr Opin Support Palliat Care*, 1(1):6-10.

Gregory, NS., Harris, AL., Robinson, CR., Dougherty, PM., Fuchs, PN., Sluka, KA. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*, 14(11):1255-1269.

Guan, X., Fu, Q., Xiong, B., Song, Z., Shu, B., Bu, H., Xu, B., Manyande, A., Car, F., Tian, Y. (2015). Activation of PI3K gamma/Akt pathway mediates bone cancer pain in rats. *J Neurochem*, 134(3):590-600.

Guo, A., Vulchahova, L., Wang, J., Li, X., Elde, R. (1999). Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the p2X3 purine receptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci*, 11(3):946-958.

Gui, Y., Li, A., Chen, F., Zhou, H., Tang, Y., Chen, L., Chen, S., Duan, S. (2015). Involvement of AMPK/SIRT1 pathway in anti-allodynic effect of troxerutin in CCI-induced neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 769:234-241.

Gupta YK., Shamra M., Briyal S. (2004). Antinociceptive effect of trans-resveratrol in rats: involvement of an opioidergic mechanism. *Methods Find Exper Clin Pharmacol*, 26(9):667-672.

Hald, A., Nedergaard, S., Hansen, RR., Ding, M., Heegaard, AM. (2009). Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. *Eur J Pain*, 13(2):138-145.

Halvorson, KG., Sevcik, MA., Ghilardi, JR., Sullivan, LJ., Koewler, NJ., Baus, F., Mantyh, PW. (2008). Intravenous ibandronate rapidly reduces pain, neurochemical indices of central sensitization, tumor burden, and skeletal destruction in a mouse model of bone cancer. *J Pain Symptom Manage*, 36(3):289-303.

Havelin, J., Imbert, I., Cormier, J., Allen, J., Porreca, F., King, T. (2017). Central sensitization and neuropathic features of ongoing pain in a rat model of advanced osteoarthritis. *J Pain*, 17(3): 374-382.

Honore, P., Luger, NM., Sabino, MA., Schwei, MJ., Rogers, SD., Mach, DB., O'Keefe, PF., Ramnaraine, ML., Clohisy, DR., Mantyh, P. (2000). Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med*, 6(5):521-528.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Institute for Laboratory Animal Research NRC. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011. 220 p

Julius, D. y Basbaum, A. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852):203-210.

King, T., Porreca, F. (2010). Opioids in Cancer Pain : New Considerations. *Pain Clin Update.*; 18(1):1-6.

Kulkarni, S. y Cantó, C. (2015). The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*, 1852(6):1114-1123.

Li, M., Ding, J., Tang, Q., Hao, M., Wang, B., Wu, J., Yu, L., Jiao, M., Luo, B., Xie, M., Zhu, H. (2018). SIRT1 activation by SRT1720 attenuates bone cancer pain via preventing Drp1-mediated mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1;1865(3):587-598.

Lozano-Ondoua, AN., Symons.Ligouri, AM., Vanderah, TW. (2013). Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. *Neurosci Lett*, 17(557):52-59.

Lozano-Ondoua, AN., Wrigh, C., Vardanyan, A., King, T., Largent-Milnes, TM., Nelson, M., Jimenez-Andrade, JM., Mantyh, PW., Vanderah, TW. (2010). A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Scis*, 86(17-18):646-653.

Lozano-Ondoua, AN., Hanlon, KE., Symons-Liguori, AM., Largent-Milnes, TM., Havelin, JJ., Ferland, HL 3rd., Chandramouli, A., Owusu-Ankomah, M., Nikolich-Zugich, T., Bloom, AP., Jimenez-Andrade, JM., King, T., Porreca, F., Nelson, MA., Mantyh, P., Vanderah, TW. (2013). Disease modification of breast cancer-induced bone remodeling by cannabinoid 2 receptor agonists. *Jone and MinerRes*, 28(1):92-107.

Lundenberg, T., Ekholm, H. (2002). Pain-from periphery to brain. *Disabi Rehabil*, 24(8): 402-406.

Mantyh, P. (2013). Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain*, 154: Suppl 1:S54-62.

Mao-Ying, QL., Wang, XW., Yang, CJ., Li, X., Mi, WL., Wu, GC., Wang, YQ. (2012). Robust spinal neuroinflammation mediates mechanical allodynia in Walker 256 induced bone cancer rats. *Mol Brain*, 5:16.

Mercadante, S. y Arcuri, E. (1998). Breakthrough pain in cancer patients: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev*, 24(6):425-432.

Meldrum, M. (2005). The ladder and the clock : cancer pain and public policy at the end of the twentieth century. *J Pain Symptom Manage*, 29(1):41-54.

Merskey, H., Bogduk, N. (1994). Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage". Clasification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, pp 209-214.

Mika, J., Zychowska, M., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., Przewlocka, B. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 716(1-3):106-119.

Moon, SOJ., Lee, S., Kang, KP., Kim, DH., Lee, SY., So, JN., Park, SK. (2006). Resveratrol suppresses tumor necrosis factor alfa induced fractalkine expression in endothelial cells. *Mol. Pharmacol*, 70(1):112-119.

Nicholson AB., Watson GR., Derry S., Wiffen PJ. (2017). Methadone for cancer pain. *Cochrane Database of Syst Rev*, 2: CD003971.

Olson, TH., Riedl, MS., Vulchanova, L., Ortiz-Gonzalez, XR., Elde, R., (1998). An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport*, 9(6):1109-1113.

Pekny, M., Levéen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, CH., Westermarck, B., Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acid protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J*, 14(8):1590-1598).

Pérez-Severiano, F., Bermúdez-Ocaña, DY., López-Sánchez, P., Ríos, C., Granados-Soto, V. (2008). Spinal nerve ligation reduces nitric oxide synthase activity and expression: Effect of resveratrol. *Pharmacol Biochem Behav*, 90(4):742-747.

Pevida, M., González-Rodríguez, S., Lastra, A., García-Suarez, O., Hidalgo, A., Menéndez, L., Baamonde, A. Involvement of spinal chemokine CCL2 in the hiperalgesia evoked by bone cancer in mice: a role for astroglia y microglia. (2013). *Cell Mol Neurobiol*, 34(1):143-156.

Pinto, MP., Badtke, MM., Dudevoir, ML., Harrell, JC., Jacobsen, BM., Horwitz, KB. (2010). Vascular endothelial growth factor secreted by activated stroma enhances angiogenesis

and hormone-independent growth of estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res*, 70(7):2655-2664.

Pinto, MP., Dye, WW., Jacobsen, BM., Horwitz, KB. (2014). Malignant stroma increases luminal breast cancer cell proliferation and angiogenesis through platelet-derived growth factor signaling. *BMC Cancer*, 14:735.

Pham-Marcou, TA., Beloeil, H., Sun, X., Gentili, M., Yaici, D., Benoit, G., Benhamou, D., Mazoit, JX. (2008). Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain*, 140(2):274-283.

Plone, MA., Emerich, DF., Lindner, MD. (1996). Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain*, 66(2-3):265-270.

Portenoy, RK., Payne, D., Jacobsen, P. (1999). Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. *Pain*, 81(1-2):129-134.

Sabino, MA., Ghilardi, RJ., Jongen, JL., Keyser, CP., Luger, NM., Mach, DB., Peters, CM., Rogers, SD., Schwei, MJ., De Felipe, C., Mantyh, PW. (2002). Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *Cancer Res*, 62(24):7343-7349.

Sabino, MA. y Mantyh, PW. (2005). Pathophysiology of bone cancer pain. *J Support Oncology*, 3(1):15-24.

Schwei, MJ., Honore, P., Rogers, SD., Salak-Johnson, JL., Finke, MP., Ramnaraine, ML., Clohisy, DR., Mantyh, PW. (1999). Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *JNeurosci*, 19(24):10886-10897.

Sevcik, MA., Ghilardi, JR., Peters, CM., Lindsay, TH., Halvorson, KG., Jonas, BM., Kubota, K., Kuskowski, MA., Boustany, L., Shelton, DL., Mantyh, PW. (2005). Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain*, 115(1-2):128-141.

Sevcik, MA., Luger, NM., Mach, DB., Sabino, MA., Peters, CM., Ghilardi, JR., Schwei, MJ., Röhrich, H., De Felipe, C., Kuskowski, MA., Mantyh, PW. (2004). Bone cancer pain: the effects of the biphosphonate alendronate on pain, skeletal remodeling, tumor growth and tumor necrosis. *Pain*, 111(1-2): 169-180.

Sharma, S., Kulkarni, SK., Chopra, K. (2007). Effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *FundamClin Pharmacol*, 21(1):89-94.

Shao, H., Xue, Q., Zhang, F., Luo, Y., Zhu, H., Zhang, X., Zhang, H., Ding, W., Yu, W.. (2014) Spinal SIRT1 activation attenuates neuropathic pain in mice. *PLoS One*, 9(6):e100938.

Sinclair, DA. y Guarente, L. (2014). Small-molecule allosteric activators of sirtuins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 54: 363-380.

Slosky, LM., Largent-Milnes, TM., Vanderah, TW. (2015). Use of Animal Models in Understanding Cancer-induced Bone Pain. *Cancer Growth Metastasis*, 8(Suppl 1):47-62.

Song, H., Han, Y., Pan, C., Deng, X., Dai, W., Hu, L., Jiang, C., Yang, Y., Cheng, Z., Li, F., Zhang, G., Wu, X., Liu, W. (2015). Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses neuroinflammation and ameliorates bone cancer pain: Involvement of Inhibition on Mitogen-activated Protein Kinase. *Anesthesiology*, 123(5):1170-1185.

Sopata M., Katz N., Carey W., Smith M., Keller D., Verburg K., West C., Wolfram G., Brown MT. (2015). Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of pain from bone metastases. *Pain*, 156(9):1703-1713.

Tao, L., Ding, Q., Gao, C., Sun, X. (2016). Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. *Int Immunopharmacol*, 34:165-172.

Threede, RD., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, MI., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, NB., First, MB., Giamberardino, MA., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand`homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, BH., Svensson, P., Viaeyen, JW., Wang, SJ. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, 156(6):1003-1007.

Tillu, DV., Melemdejian, OK., Asiedu, MN., Qu, N., De Felice, M., Dussor, G., Price, TJ. (2012). Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Mol Pain*, 8:5.

Todd, AJ. (2002). Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol*, 87(2): 245-249.

Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, FA., García-Conesa, MT., Espín, JC. (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Curr Pharm Des*, 19(34):6064-6093.

Torres, LM., Calderón, E., Pernia, A., Martínez-Vasquez, J., Mico J. (2002). De la escalera al ascensor. *Rev Soc EspDolor*, 9: 289-290.

Vasko, MR. (1995). Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord. *Prog Brain Res*, 104:367-380.

World Health Organization. Cancer. Key Facts. September 2018. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Xia, N., Daiber A., Förstermann U., Li H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Brjff Pharmacol*, 174:1633-1646.

Xiong, S., Salazar, G., Patrushev, N., Alexander, W. (2011). FoxO1 Mediates a autofeedback loop regulating SIRT1 expression. *J Biol Chem*. 18;286(7):5289-99.

Xu, J., Zhu, MD., Zhang, X., Tian, H., Zhang, JH., Wu, XB., Gao, YJ. (2014). NFkappaB-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice. *J Neuroinflammation*, 11:38.

Xu, M., Cheng, Z., Ding, Z., Wang, Y., Guo, Q., Huang, C. (2018). Resveratrol enhances IL-4 receptor-mediated anti-inflammatory effects in spinal cord and attenuates neuropathic pain following sciatic nerve injury. *Mol Pain*, 14:1744806918767549.

Yang, C., Huang, X., Wang, S., Han, M., Kang, F., Zhang, Z., Li, J. (2019). Intrathecal administration of SRT1720 relieves bone cancer pain by inhibiting the CREB/CRTC1 signalling pathway. *Neurosci Lett*, 10:134623.

Yang, C., Kang, F., Wang, S., Han, M., Zhang, Z., Li, J. (2019). SIRT1 activation attenuates bone cancer pain by inhibiting mGluR1/5. *Cell Mol neurobiol*. 39(8);1165-1175.

Yang, YJ., Hu, L., Xia, YP., Jiang, CY., Miao, C., Yang, CQ., Yuan, M., Wang, L. (2016). Resveratrol suppresses glial activation and alleviates trigeminal neuralgia via activation of AMPK. *J Neuroinflammation*. 13(1):84.-95.

Yin, Q., Lu, FF., Zhao, Y., Cheng, MY., Fan, Q., Cui, J., Liu, L., Cheng, W., Yan, CD. (2013) Resveratrol facilitates pain attenuation in a rat model of neuropathic pain through the activation of spinal Sirt1. *Reg Anesth Pain Med*, 38(2):93-99.

Zhao, X., Yu, C., Wang, C., Zhang, JF., Cui, WG., Ye, F., Xu, Y. (2014). Chronic resveratrol treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects co-morbid depressive like

behaviors in mice with mononeuropathy: Involvement of serotonergic system. *Neurpharmacology*. 85:131-141.

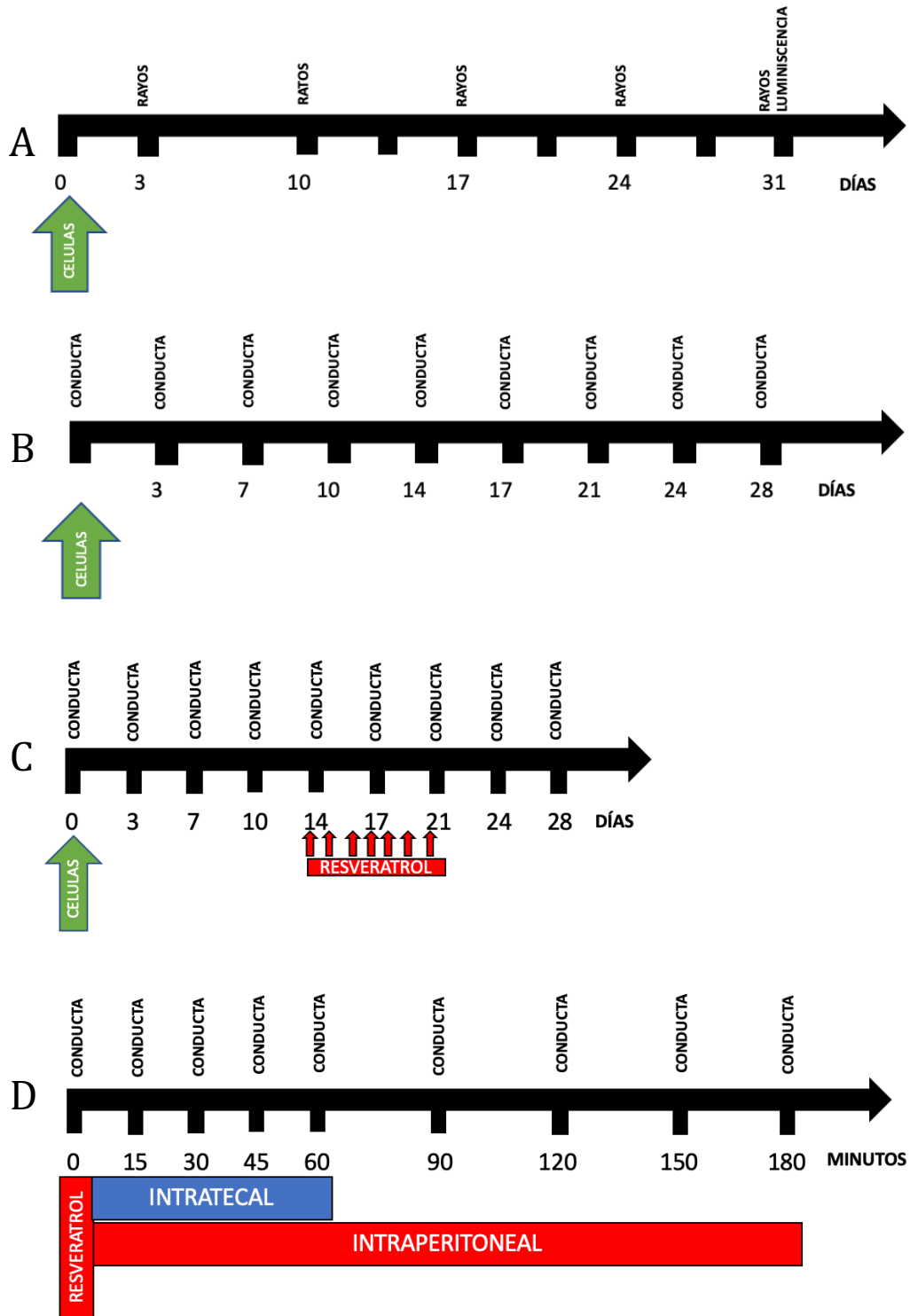
Zhang, RX., Liu, B., Wang L., Ren, K., Qiao JT., Berman, BM., Lao, L. (2005). Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain*, 118(1-2):125-136.

Zhang, T., Kraus, WL. (2010). SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*, 1804(8):1666–1675.

Zhou, CH., Zhang, MX., Zhou, SS., Li, H., Gao, J., Yin, XX. (2017). SIRT1 attenuates neuropathic pain by epigenetic regulation of mGluR1/5 expressions in type 2 diabetic rats. *Pain*, 158(1):130-139.

Zhu, H., Ding, J., Wu, J., Liu, T., Liang, J., Tang, Q., Jiao, M. (2017). Resveratrol attenuates bone cancer pain through regulating the expression levels of ASIC3 and activating cell autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 49(11):1008-1014.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS



E

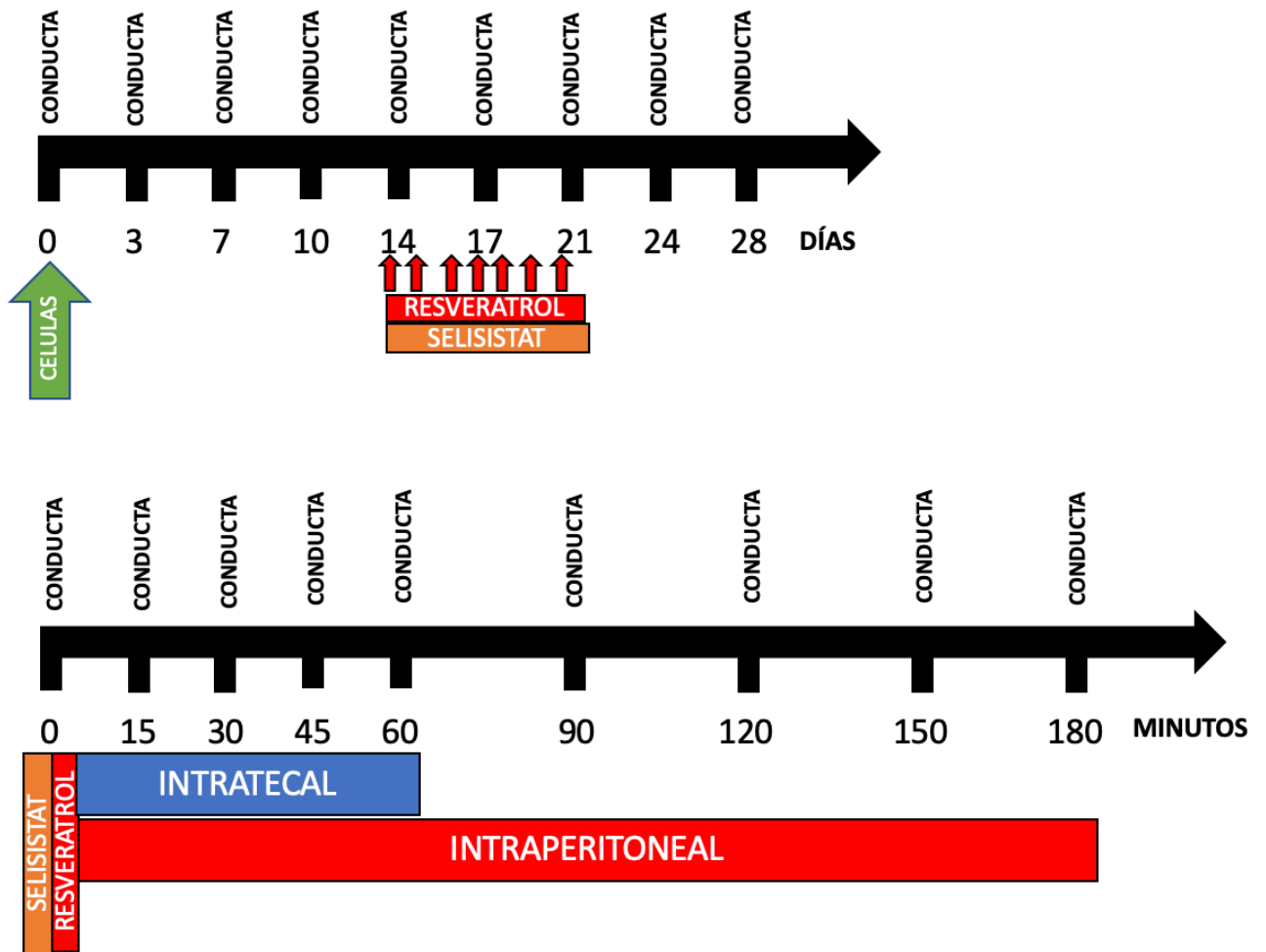


Figura suplementaria 1: Esquema temporal de experimentos de los cinco objetivos. (A) Objetivo 1; (B) Objetivo 2; (C) Objetivo 3; (D) Objetivo 4; (E) Objetivo 5.

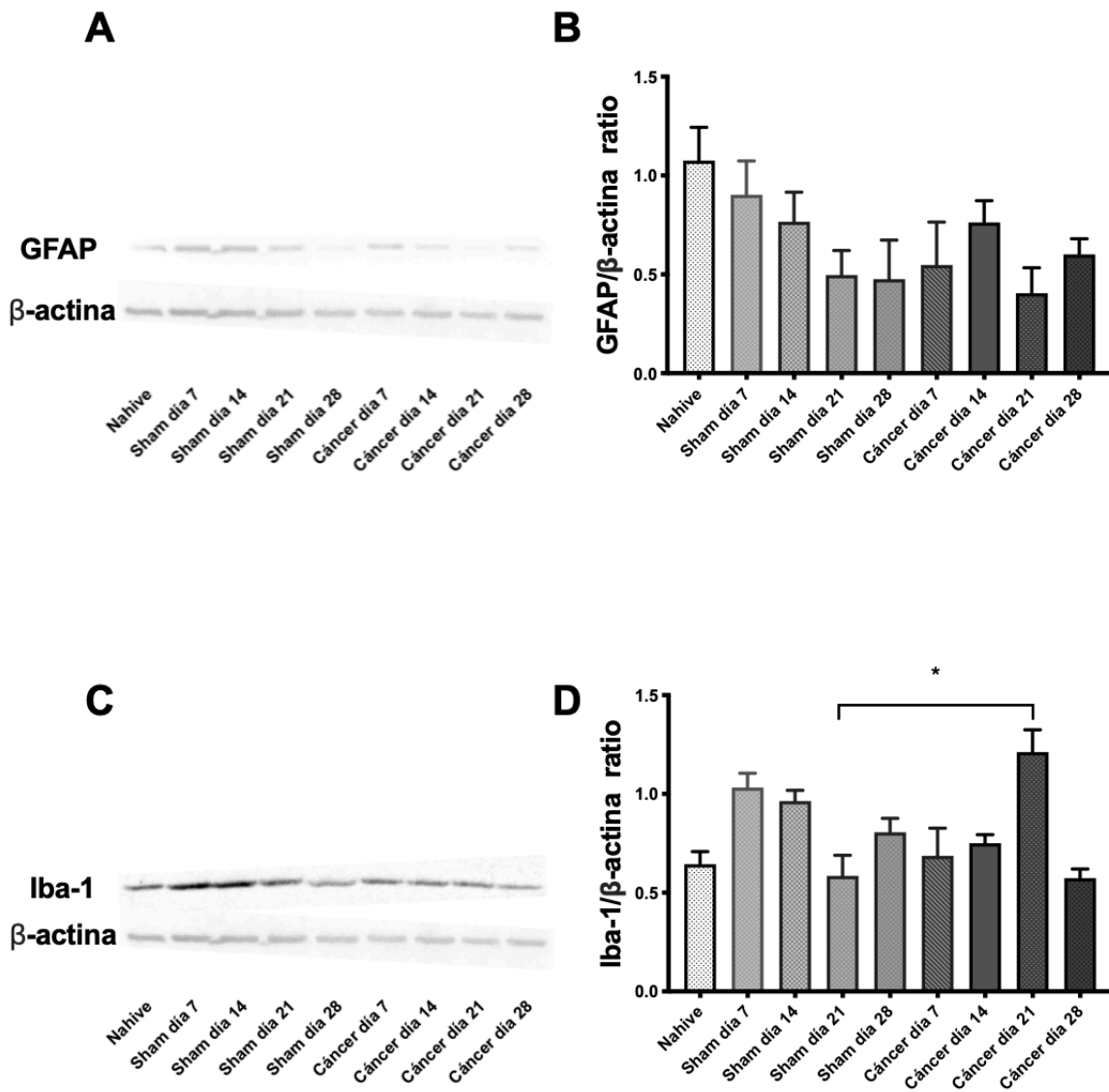


Figura suplementaria 2: Expresión de proteínas gliales en médula espinal de ratón con cáncer óseo. (A) GFAP; (B) Cuantificación GFAP/β-actina; (C) Iba-1; (D) Cuantificación Iba-1/β-actina. Los datos son presentados como media ± SEM. Para comparar más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni.

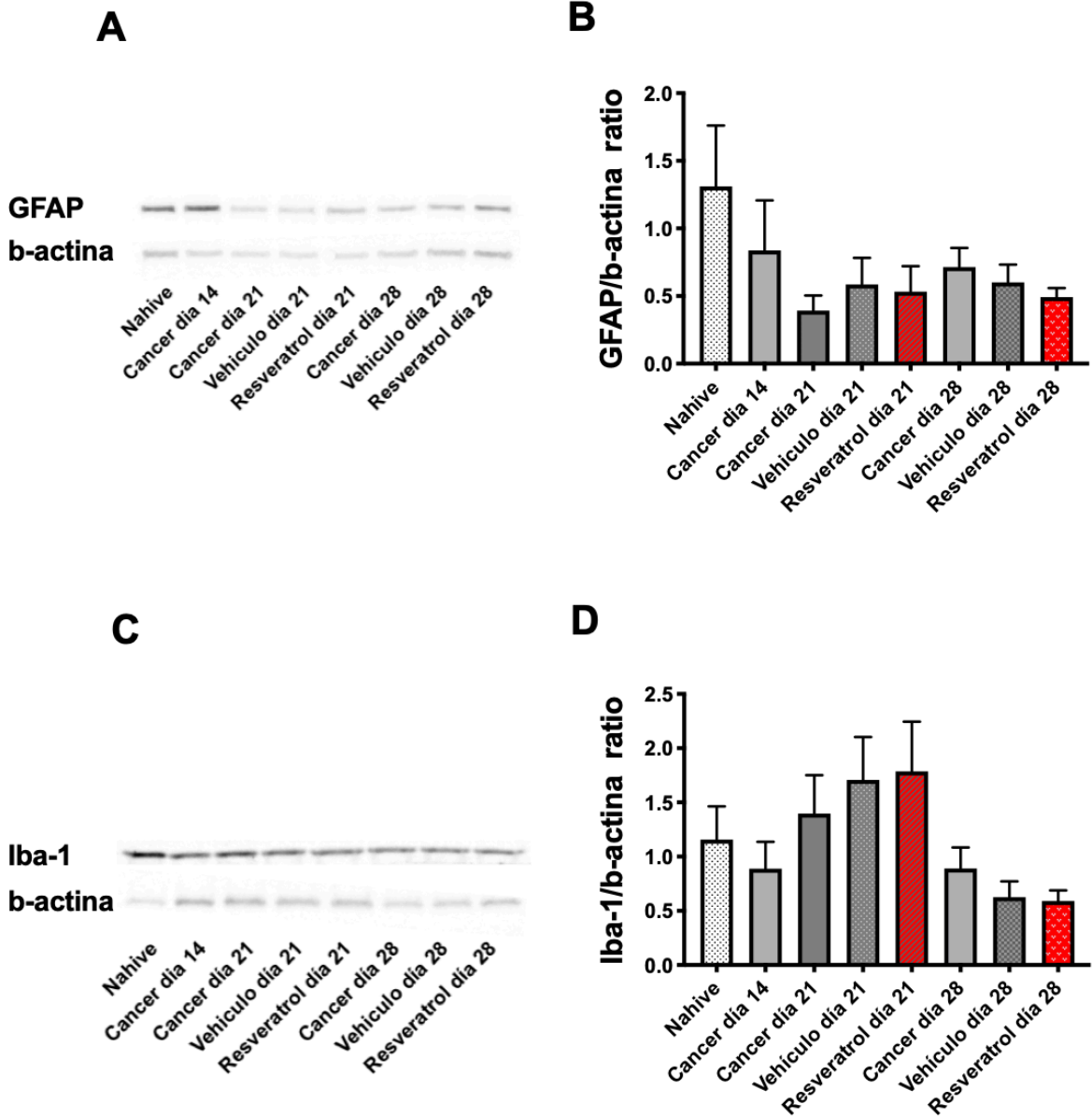


Figura suplementaria 3: Expresión de marcadores gliales ante la administración repetida de resveratrol. (A) Expresión de GFAP; (B) Cuantificación de la expresión de GFAP respecto a β -actina; (C) Expresión de Iba-1; (D) Cuantificación de la expresión de Iba-1 respecto a β -actina. Los datos son presentados como media \pm SEM. Para comparar más de dos valores se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni.



0: Hueso Normal.



1: Erosiones óseas (1-3), (flechas).



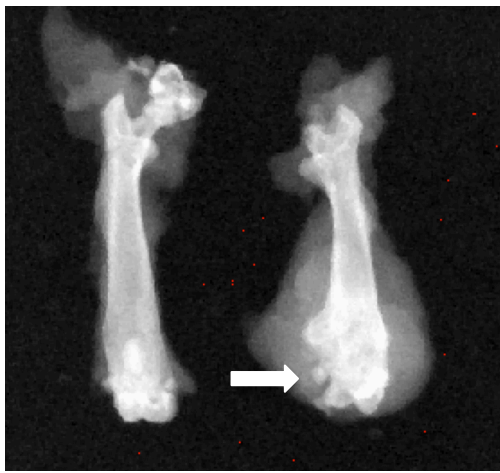
2: Pérdida de hueso medular (área).



3: Pérdida de hueso medular (área) y erosión de una cortical (flecha).



4: Pérdida completa de una cortical (flecha).



5: Fractura completa (flecha).

Figura suplementaria 4: Ejemplos de distintas puntuaciones de lesiones osteolíticas en fémur derecho de ratón Balb/c con inyección intraósea de 1.000.000 de células BJ3Z.

TABLAS

Tabla 1: Codificación del daño óseo.

0: hueso normal, sin signos de destrucción.
1: pequeñas lesiones radio-lúcidas indicativas de destrucción ósea (1-3 lesiones).
2: número aumentado de lesiones radio-lúcidas (3-6) y pérdida de hueso medular.
3: pérdida de hueso medular y erosión del hueso cortical.
4: pérdida de hueso cortical.
5: pérdida de hueso bi-cortical y fractura desplazada de fémur.

Tabla 2: Codificación funcional dinámica de la pata con cáncer.

0: el ratón mueve la pata donde se inocularon células neoplásicas, normalmente.
1: cojera mínima en la pata lesionada.
2: cojera sustancial.
3: cojera sustancial y el ratón esconde parcialmente la pata.
4: cojera sustancial y el ratón esconde totalmente la pata.
5: el ratón no utiliza la pata afectada.

Tabla 3: Puntuación radiológica de la resorción ósea generada por el tumor a distintas concentraciones de células en el fémur inyectado (izquierda) y control (derecha).

Día	BJ3Z 10 ⁶ (n= 9)		BJ3Z 5 x 10 ⁵ (n= 6)		BJ3Z 2,5 x 10 ⁵ (n= 6)	
	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	2,67 ± 0,28*,#,+	0,00 ± 0,00	0,83 ± 0,16*	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00
17	2,89 ± 0,30*,#	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00	3,33 ± 0,21*	0,00 ± 0,00
24	2,88 ± 0,26*,#,+	0,00 ± 0,00	2,16 ± 0,16*	0,00 ± 0,00	3,66 ± 0,21*	0,00 ± 0,00
31	4,22 ± 0,22*	0,00 ± 0,00	3,66 ± 0,21*	0,00 ± 0,00	4,66 ± 0,21*	0,00 ± 0,00

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra el día 3. Los “#” representan la diferencia intergrupo entre BJ3Z 10⁶ vs BJ3Z 5x10⁵ y + representa la diferencia entre BJ3Z 10⁶ vs BJ3Z 2,5x10⁵. Se consideró como significativo “*”, “#” y “+” p < 0,05. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni.

Tabla 4: Resultados de luminiscencia en el fémur inyectado en la unidad cuentas de los tres grupos de ratones con sus respectivos controles.

BJ3Z 2,5x10 ⁵ (n=3)	Contralateral (n=3)	BJ3Z 5x10 ⁵ (n=6)	Contralateral (n=6)	BJ3Z10 ⁶ (n=9)	Contralateral (n=9)
46,03 ± 10,03 *	27,09 ± 2,89	70,04 ± 15,07 *	38,09 ± 6,05	51,75 ± 14,18 *	32,34 ± 7,26

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia entre el grupo inyectado versus su control. Se consideró como significativo * p<0,05. Se utilizó t de Student para la comparación entre dos grupos.

Tabla 5: Peso y su evolución durante los 28 días de experimento en cada grupo.

Día	sham (n=7)	BJ3Z x 10 ⁶ (n=9)	BJ3Z 5 x 10 ⁵ (n=6)	BJ3Z 2,5 x 10 ⁵ (n=5)
0	31,4 ± 1,6	34,7 ± 0,8	40,1 ± 0,7	22,9 ± 0,4
3	30,0 ± 1,8	32,7 ± 0,8	37,7 ± 0,7	22,8 ± 0,4
7	30,9 ± 1,7	31,9 ± 0,7	37,3 ± 0,7	27,0 ± 0,8
10	31,4 ± 1,6	33,6 ± 0,6	38,2 ± 0,7	28,4 ± 0,5
14	35,1 ± 1,9	34,3 ± 0,9	38,1 ± 0,7	29,5 ± 0,2
17	35,6 ± 1,5	34,3 ± 1,2	38,4 ± 0,5	29,7 ± 1,0
21	31,4 ± 1,6	35,4 ± 1,1	38,7 ± 0,6	31,5 ± 0,7
24	32,3 ± 1,7	36,7 ± 1,0	38,2 ± 0,5	32,3 ± 0,3
28	32,7 ± 1,8	37,2 ± 0,7	38,2 ± 0,5	32,8 ± 0,1

Los datos fueron presentados como media ± SEM.

Tabla 6: Valores del test de Von Frey en los cinco grupos experimentales durante los 28 días.

Día	naïve (n=6)	sham (n=7)	BJ3Z x 10 ⁶ (n=9)	BJ3Z 5 x 10 ⁵ (n=6)	BJ3Z 2,5 x 10 ⁵ (n=6)
0	5,2 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,8 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,46 ± 0,13
3	5,5 ± 0,4	3,8 ± 0,6*	2,3 ± 0,1*,#	2,4 ± 0,2*	2,6 ± 0,2*,#
7	5,5 ± 0,3	2,9 ± 0,3*	2,6 ± 0,1*	2,4 ± 0,1*,#	2,5 ± 0,4*,#
10	5,5 ± 0,2	3,4 ± 0,4*	2,2 ± 0,2*,#	3,0 ± 0,4*,#	3,5 ± 0,2*,#
14	5,8 ± 0,2	4,3 ± 0,3	2,4 ± 0,1*,#	2,5 ± 0,2*,#	2,4 ± 0,6*,#
17	5,2 ± 0,1	4,8 ± 0,6	2,4 ± 0,2*,#	3,8 ± 0,4*	3,3 ± 0,5*,#
21	5,7 ± 0,2	6,1 ± 0,5	2,7 ± 0,2*,#	2,8 ± 0,1*	3,0 ± 0,6*,#
24	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2*,#	4,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2*,#
28	5,3 ± 0,2	5,6 ± 0,2	2,4 ± 0,1*,#	5,2 ± 0,4,#	2,5 ± 0,5*,#
ABC	76,3 ± 2,4	73,0 ± 2,6	35,9 ± 1,6#	52,3 ± 1,9#	40,4 ± 4,0#

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo. Los # representan la diferencia intergrupo. Se considera significativo * o # <0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. “ABC” representa área bajo la curva.

Tabla 7: Valores del test de plancha caliente en los cinco grupos experimentales.

Día	naïve (n=6)	sham (n=7)	BJ3Z x 10 ⁶ (n=9)	BJ3Z 5 x 10 ⁵ (n=6)	BJ3Z 2,5 x 10 ⁵ (n=6)
0	21,7 ± 0,4	22,3 ± 0,6	22,8 ± 0,8	22,9 ± 0,5	19,2 ± 1,2
3	21,9 ± 0,2	18,9 ± 1,6*	19,0 ± 0,8*	19,6 ± 1,2	19,21 ± 1,2
7	21,1 ± 0,5	16,1 ± 0,9*	17,5 ± 0,8*	17,0 ± 1,2	20,5 ± 1,5
10	19,7 ± 0,6	16,3 ± 1,3*	16,44 ± 0,9*	17,2 ± 1,1	15,9 ± 0,6#
14	20,4 ± 0,6	14,8 ± 1,2*	17,4 ± 0,8*	16,7 ± 0,8	13,9 ± 0,9*
17	20,5 ± 0,7	16,4 ± 1,6*	14,5 ± 1,2*	19,7 ± 1,0	15,6 ± 1,2
21	20,5 ± 0,5	16,4 ± 1,6*	14,6 ± 0,9*	17,8 ± 1,0	17,1 ± 1,5
24	20,8 ± 0,5	16,4 ± 1,6*	13,6 ± 1,0*	18,6 ± 0,8	15,6 ± 1,2
28	20,1 ± 0,5	16,4 ± 1,6*	14,3 ± 0,6*	18,5 ± 1,0	17,4 ± 0,5

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo. Los # representan la diferencia intergrupo. Se considera significativo * o # p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. "ABC" representa área bajo la curva.

Tabla 8: Valores del test de marcha forzada en los cinco grupos experimentales.

Día	naïve (n=6)	sham (n=7)	BJ3Z x10 ⁶ (n=9)	BJ3Z 5 x 10 ⁵ (n=6)	BJ3Z 2,5 x 10 ⁵ (n=6)
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
3	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,3*	2,8 ± 0,3*,#	1,5 ± 0,3*	2,5 ± 0,3*,#
7	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	1,1 ± 0,3*	1,3 ± 0,2*,#	2,2 ± 0,2*,#
10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2*,#	1,5 ± 0,3*,#	2,2 ± 0,4*,#
14	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2*,#	1,0 ± 0,0*,#	2,2 ± 0,4*,#
17	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,1*,#	0,3 ± 0,2	1,0 ± 0,3*,#
21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,2*,#	0,5 ± 0,2	1,7 ± 0,4*,#
24	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,2*,#	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,4*,#
28	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,2*,#	1,0 ± 0,0*,#	1,2 ± 0,4*,#
ABC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	21,2 ± 3,0#	8,6 ± 2,4#	19,7 ± 2,2#

Los datos fueron presentados como media ± SEM.. Los * representan la diferencia intragrupo respecto al día 0. Los # representan la diferencia con el grupo control (sham). Se considera significativo * o # p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. "ABC" representa área bajo la curva.

Tabla 9: Test de Von Frey en administración crónica de resveratrol ip, it o metadona ip.

Día	sham (n=7)	vehículo (n=6)	resveratrol 30 mg/Kg (n=8)	resveratrol 100 mg/Kg (n=7)	resveratrol 200 mg/Kg (n=7)	metadona 2.5 mg/Kg (n=6)
14	4,3±0,3	1,7±0,1	1,6±0,1	1,9±0,1	1,7±0,1	1,5±0,0
17	4,8±0,3	1,8±0,1	2,2±0,1	2,5±0,1*,#	3,1±0,1*,#	1,7±0,0
21	6,1±0,4	1,6±0,1	3,4±0,1*,#	3,9±0,2*,#	4,3±0,1*,#	1,6±0,0
24	5,4±0,2	1,7±0,1	2,7±0,1*,#	3,4±0,2*,#	3,1±0,2*,#	1,6±0,0
28	5,6±0,2	2,0±0,1	2,2±0,1	2,1±0,1	1,8±0,1	1,6±0,0
ABC	77,8±5,5	24,2±1,1	35,8±1,2#	41,2±2,1#	43,0±1,8#	22,7±0,6

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo respecto al día 14. Los # representan la diferencia con el grupo control (sham). Se considera significativo * o # p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. "ABC" representa área bajo la curva.

Tabla 10: Test de rotarod en administración crónica de resveratrol i.p., i.t. o metadona i.p.

Día	sham (n=7)	vehículo (n=6)	resveratrol 30 mg/Kg (n=8)	resveratrol 100 mg/Kg (n=7)	resveratrol 200 mg/Kg (n=7)	metadona 2.5 mg/Kg (n=6)
14	0,0±0,0	2,3±0,2	2,6±0,2	2,1±0,4	1,9±0,3	2,5±0,2
17	0,0±0,0	1,8±0,3	1,5±0,1*	1,1±0,4*	0,7±0,3*,#	2,0±0,3
21	0,0±0,0	2,0±0,3	0,6±0,3*,#	0,8±0,3*,#	0,7±0,2*,#	2,2±0,3
24	0,0±0,0	1,7±0,2	0,6±0,3*,#	0,8±0,3*,#	0,7±0,3*,#	1,8±0,3
28	0,0±0,0	2,0±0,3	1,6±0,3*	1,6±0,3*,#	1,7±0,2	2,0±0,3
ABC	0,0±0,0	26,8±3,1	16,8±3,4#	13,6±4,3#	13,7±3,3#	28,8±3,4

Los datos fueron presentados como media \pm SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró como significativo "*" o "#" $p < 0,05$. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. "ABC" representa área bajo la curva.

Tabla 11: Test de Von Frey en administración aguda de resveratrol i.p., i.t. o metadona i.p.

Hora	resveratrol 200 mg/Kg i.p. (n=8)	vehículo i.p. (n=6)	metadona 2,5 mg/Kg i.p. (n=6)	resveratrol 100 µg/5µl i.t. (n=6)	vehículo i.t. (n=6)
0	1,64 ± 0,06	1,63 ± 0,07	1,53 ± 0,04	1,47 ± 0,04	1,44 ± 0,03
0,25	1,68 ± 0,06	1,52 ± 0,05	2,83 ± 0,17 *	2,42 ± 0,08 *	1,69 ± 0,06
0,5	1,86 ± 0,07	1,59 ± 0,04	3,28 ± 0,08 *	3,23 ± 0,22 *	1,57 ± 0,06
0,75	1,85 ± 0,02	1,59 ± 0,05	3,05 ± 0,12 *	2,25 ± 0,17 *	1,43 ± 0,07
1	2,25 ± 0,06 *	1,57 ± 0,07	2,79 ± 0,07 *	1,57 ± 0,05	1,48 ± 0,09
1,5	2,48 ± 0,07 *	1,53 ± 0,01	2,37 ± 0,08 *		
2	2,40 ± 0,13 *	1,53 ± 0,04	1,95 ± 0,11 *		
2,5	1,75 ± 0,03	1,53 ± 0,05	1,77 ± 0,04		
3	1,60 ± 0,03	1,56 ± 0,05	1,54 ± 0,05		
ABC	6,1 ± 0,1	4,3 ± 0,0	6,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró como significativo “*” o “#” p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. “ABC” representa área bajo la curva.

Tabla 12: Test de rotarod en administración aguda de resveratrol i.p., i.t. o metadona i.p.

Hora	resveratrol 200 mg/Kg i.p. (n=8)	vehículo i.p. (n=6)	metadona 2,5 mg/Kg i.p. (n=6)	resveratrol 100 µg/5µl i.t. (n=6)	vehículo i.t. (n=6)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,25	-0,25 ± 0,25	0,00 ± 0,00	-0,16 ± 0,16 *	-0,83 ± 0,30 *	0,33 ± 0,21
0,5	-0,50 ± 0,26	-0,16 ± 0,30	-0,50 ± 0,22 *	-1,16 ± 0,16 *	0,16 ± 0,30
0,75	-1,25 ± 0,36 *	0,00 ± 0,00	-0,33 ± 0,21 *	-1,83 ± 0,16 *	0,33 ± 0,21
1	-1,37 ± 0,37 *	-0,16 ± 0,16	-0,33 ± 0,21 *	-0,66 ± 0,33*	0,16 ± 0,16
1,5	-1,87 ± 0,29 *	0,33 ± 0,21	-0,16 ± 0,16 *		
2	-1,75 ± 0,25 *	-0,16 ± 0,30	-0,33 ± 0,21 *		
2,5	-0,50 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
3	-0,12 ± 0,22	0,33 ± 0,21	0,00 ± 0,00		
ABC	0,5 ± 0,2	1,6 ± 0,0		-3,1 ± 0,8	0,4 ± 0,4

Los datos fueron presentados como media ± SEM.. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró como significativo “*” o “#” p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. “ABC” representa área bajo la curva.

Tabla 13: Test de Von Frey en administración aguda de resveratrol i.p. o vehículo y selisistat s.c. o vehículo.

Hora	selisistat 10 mg/Kg s.c. + vehículo i.p. (n=6)	selisistat 10 mg/Kg s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + vehículo i.p. (n=6)
0	1,53 ± 0,04	1,63 ± 0,07	1,48 ± 0,05	1,62 ± 0,05
0,25	1,37 ± 0,04	1,63 ± 0,05	1,55 ± 0,07	1,58 ± 0,06
0,5	1,46 ± 0,04	1,48 ± 0,07	2,18 ± 0,09 *, #	1,45 ± 0,08
0,75	1,41 ± 0,04	1,5 ± 0,05	2,61 ± 0,02 *, #	1,67 ± 0,07
1	1,46 ± 0,06	1,47 ± 0,06	2,83 ± 0,02 *, #	1,55 ± 0,07
1,5	1,27 ± 0,03	1,48 ± 0,08	2,92 ± 0,01 *, #	1,46 ± 0,07
2	1,50 ± 0,06	1,48 ± 0,04	2,53 ± 0,02 *, #	1,60 ± 0,07
2,5	1,44 ± 0,08	1,39 ± 0,04	1,68 ± 0,01	1,50 ± 0,05
3	1,53 ± 0,07	1,63 ± 0,07	1,48 ± 0,05	1,62 ± 0,05
ABC	5,7 ± 0,2	6,0 ± 0,2	9,1 ± 0,2#	6,2 ± 0,1

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró como significativo “*” o “#” p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. “ABC” representa área bajo la curva.

Tabla 14: Delta rotarod en administración aguda de resveratrol ip o vehículo y selisistat sc o vehículo.

Hora	selisistat 10 mg/Kg s.c. + vehículo i.p. (n=6)	selisistat 10 mg/Kg s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + vehículo i.p. (n=6)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,25	-0,33 ± 0,21	0,5 ± 0,22	-0,33 ± 0,21	0,16 ± 0,31
0,5	-0,16 ± 0,17	-0,16 ± 0,40	-0,66 ± 0,49	-0,16 ± 0,31
0,75	0,00 ± 0,26	0,00 ± 0,26	-0,83 ± 0,31 *, #	0,16 ± 0,17
1	0,00 ± 0,26	-0,33 ± 0,21	-1,16 ± 0,31 *	-0,33 ± 0,33
1,5	0,00 ± 0,00	-0,66 ± 0,33	-0,66 ± 0,21	-0,33 ± 0,21
2	0,16 ± 0,31	-0,33 ± 0,33	-0,66 ± 0,33	-0,33 ± 0,42
2,5	0,16 ± 0,31	-0,16 ± 0,17	-0,33 ± 0,21	0,00 ± 0,26
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ABC	0,3 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2#	0,5 ± 0,2

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró como significativo "*" o "#" p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. "ABC" representa área bajo la curva.

Tabla 15: Test de Von Frey en administración repetida de resveratrol i.p. o vehículo y selisistat s.c. o vehículo.

Día	selisistat 10 mg/Kg s.c. + vehículo i.p. (n=6)	selisistat 10 mg/Kg s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + vehículo i.p. (n=6)
0	4,90 ± 0,11	4,47 ± 0,07	5,2 ± 0,13	5,03 ± 0,13
14	1,57 ± 0,07	1,63 ± 0,07	1,48 ± 0,05	1,62 ± 0,05
17	1,63 ± 0,10	1,48 ± 0,06	3,27 ± 0,18 *, #	1,49 ± 0,08
21	1,50 ± 0,03	1,56 ± 0,05	3,34 ± 0,12 *, #	1,44 ± 0,06
24	1,61 ± 0,04	1,73 ± 0,06	2,58 ± 0,07 *, #	1,54 ± 0,06
28	1,39 ± 0,05	1,53 ± 0,06	1,60 ± 0,05	1,60 ± 0,04
ABC	21,8 ± 0,3	22,8 ± 0,4	37,7 ± 0,6#	21,3 ± 0,2

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró como significativo “*” o “#” p<0,05. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni.. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. “ABC” representa área bajo la curva.

Tabla 16: Test de rotarod en administración repetida de resveratrol i.p. o vehículo y selisistat s.c. o vehículo.

Día	selisistat 10 mg/Kg s.c. + vehículo i.p. (n=6)	selisistat 10 mg/Kg s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + resveratrol 100 mg/Kg i.p. (n=6)	vehículo s.c. + vehículo i.p. (n=6)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14	3,00 ± 0,36	2,50 ± 0,56	3,00 ± 0,36	3,16 ± 0,30
17	2,50 ± 0,22	1,83 ± 0,40	0,83 ± 0,30 *, #	2,16 ± 0,16 *
21	2,33 ± 0,21	2,66 ± 0,33	1,16 ± 0,47 *	2,00 ± 0,25 *
24	2,16 ± 0,16	1,83 ± 0,16	1,6 ± 0,33 *	2,00 ± 0,25 *
28	2,83 ± 0,30	2,50 ± 0,22	2,00 ± 0,44 *	2,5 ± 0,22
ABC	34,7 ± 2,5	30,9 ± 3,8	20,4 ± 3,2 #	31,1 ± 1,5

Los datos fueron presentados como media ± SEM. Los * representan la diferencia intragrupo de cada punto contra tiempo cero. Los # representan la diferencia intergrupo de cada grupo contra vehículo. Se consideró significativo "*" o "#" $p < 0,05$. Se utilizó ANOVA de una vía cuando hubo una variable y mas de dos grupos a analizar con test post hoc de Bonferroni. Se utilizó ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables a analizar con test post hoc de Bonferroni. "ABC" representa área bajo la curva.

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA

Publicaciones.

The antinociceptive effect of resveratrol in bone cancer pain is inhibited by the Silent Information Regulator 1 inhibitor selisistat. Lux S., Lobos N., Lespay-Rebolledo C., Salas-Huenulao E., Kogan M., Flores C., Pinto M., Hernandez A, Pelissier T., Constandil L. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2018.

Presentaciones en congresos.

Efecto crónico de resveratrol en un modelo de dolor oncológico óseo en ratones. XXXIII Congreso Anual, Hotel Enjoy Castro, Chiloé, Chile. 26/29 Noviembre 2016.

Efecto agudo de resveratrol en un modelo de dolor oncológico óseo en ratones. XXXIII Congreso Anual, Hotel Enjoy Castro, Chiloé, Chile. 26/29 Noviembre 2016.

The Antinociceptive Effect of Resveratrol in Bone Cancer Pain is Suppressed By Selisistat. Sebastian Lux, Nicolas Lobos, Caroline Lespay-Rebolledo, Edison Salas, Cristian Flores, Mauricio Pinto, Alejandro Hernandez, Teresa Pelissier, Luis Constandil. IASP World Congress 2018, Boston, USA.



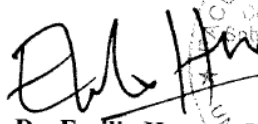
CERTIFICACIÓN

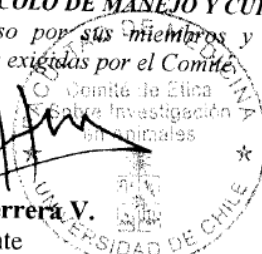
El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado “EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE RESVERATROL EN DOLOR ONCOLÓGICO ÓSEO”, cuyo Investigador Responsable es el Sr. **Sebastián Lux Febre**, y cuyo Patrocinante es el Dr. **Ramiro Zepeda I.**, 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 0721 FMUCH).

El Sr. Lux se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por 36 meses, tiempo estimado de la realización de su Tesis del Programa de Doctorado en Farmacología, en el Laboratorio de Neurofarmacología del Dolor, Programa Disciplinario de Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. 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 sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Emilio Herrera V.
Presidente
Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 29 de enero de 2015.