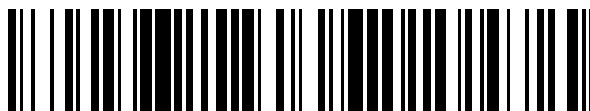


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 739**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 31/415** (2006.01)

**A61K 31/4418** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07785870 .2**

96 Fecha de presentación: **29.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2049090**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **USO DE AGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT7 PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR.**

30 Prioridad:  
**29.06.2006 EP 06013496**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.02.2012**

73 Titular/es:  
**LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A.**  
**AVDA MARE DE DÉU DE MONTSERRAT 221**  
**08041 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:  
**VELA HERNANDEZ, Jose, Miguel;**  
**TORRENS-JOVER, Antonio;**  
**BUSCHMANN, Helmut, H. y**  
**ROMERO-ALONSO, Luz**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 739 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> para el tratamiento del dolor

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al uso de agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> para el tratamiento del dolor y los síntomas del dolor, concretamente algunos subtipos de dolor como el dolor neuropático, tal como alodinia, la prevención o la profilaxis del dolor y los síntomas del dolor, concretamente algunos subtipos de dolor tal como dolor neuropático, tal como alodinia.

**Antecedentes de la invención**

- 10 El tratamiento de las afecciones de dolor es de gran importancia en medicina. Actualmente existe una necesidad en todo el mundo de tratamientos adicionales para el dolor. La apremiante necesidad de un tratamiento específico de afecciones de dolor o también un tratamiento de afecciones de dolor específicas que sea correcto para el paciente, que debe entenderse como el tratamiento del dolor exitoso y satisfactorio para los pacientes, está documentada en el gran número de trabajos científicos que han aparecido recientemente y a lo largo de los años en el campo de los analgésicos aplicados o en la investigación básica en nocicepción.

- 15 The International Association for the Study of Pain (IASP) define el DOLOR como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial", o lo describe en términos de dicho daño (IASP, Classification of chronic pain, 2ª edición, IASP Press (2002), 210). A pesar de que el dolor es siempre subjetivo sus causas o síndromes pueden clasificarse.

- 20 Concretamente el dolor neuropático, que en los últimos años ha devenido en un problema de salud muy importante en amplias áreas de la población, necesita un tratamiento muy específico, especialmente considerando que cualquier tratamiento de dolor neuropático es extremadamente sensible a las causas subyacentes al dolor, ya sea la enfermedad que lo causa en último término o la ruta mecanística a lo largo de la cual se desarrolla.

- 25 La hiperalgesia y la alodinia explican estados clínicamente relevantes tales como inflamación y dolor neuropático. Estas afecciones se caracterizan por alteraciones de la percepción del dolor que incluyen sensibilidad potenciada a estímulos nocivos (hiperalgesia) y sensibilidad al dolor anormal frente a estímulos no dolorosos anteriormente (alodinia). Desde el punto de vista mecanístico, se ha reconocido la relación entre la sensibilización central y estos comportamientos asociados con el dolor, hiperalgesia y alodinia. La sensibilización central es un término acuñado para describir la excitabilidad potenciada de las neuronas nociceptoras del SNC desencadenada por excitación persistente o lesión periférica (Woolf, 1983). De hecho, muchos modelos populares de hipersensibilidad posterior a lesión giran en torno a la idea de sensibilización central, en la que descargas aferentes provocadas por la lesión hacen que las neuronas de la médula espinal reduzcan su umbral de estimulación para expandir sus campos receptivos y para incrementar su capacidad de respuesta a diferentes estímulos periféricos (Woolf, 1983; Hylden y col., 1989; Woolf y Thompson 1991; Coderre y Katz, 1997).

- 35 Muchos sistemas de neurotransmisores, canales iónicos y enzimas diferentes se han implicado en la transmisión, procesamiento y control del dolor. Entre ellos, se ha descrito que la serotonina (5-hidroxitriptamina [5-HT]), producida por neuronas serotoninérgicas centrales y periféricas pero también por plaquetas y mastocitos después de lesión tisular, ejerce efectos algésicos o analgésicos dependiendo del sitio de acción y del subtipo de receptor sobre el que actúa (Eide y Hole, 1993; Millan, 2002). En el nivel periférico, después de lesiones nerviosas, se libera 5-HT en cantidades aumentadas e interacciona con diferentes receptores de 5-HT presentes en fibras C (Sommer, 2004). Actuando en combinación con otros mediadores inflamatorios, la 5-HT puede excitar y sensibilizar ectópicamente fibras nerviosas aferentes, contribuyendo así a la sensibilización periférica e hiperalgesia que siguen a la inflamación y las lesiones nerviosas (Beck y Handwerker, 1974; Obata y col., 2000). El sistema de serotonina central también ha sido objeto de una investigación considerable a lo largo de los últimos veinte años. Las rutas de inhibición descendente mediadas tanto por 5-HT como por noradrenalina (NE) se han descrito extensamente. Estas vías monoaminérgicas surgen del mesencéfalo y el tronco encefálico y terminan en la médula espinal para suprimir la transmisión sensorial y, consecuentemente, producir analgesia. Sin embargo, las vías descendentes que proyectan hacia el asta posterior no sólo suprimen (inhibición descendente) sino que también pueden potenciar (facilitación descendente) mensajes nociceptores. En el caso del sistema de 5-HT descendente, se han descrito tanto la inhibición como la facilitación dependiendo del receptor 5-HT implicado y de su localización neuronal divergente (Millan, 2002; Suzuki y col., 2004; Oyama y col., 1996).

- 50 Se han investigado y/o usado como analgésicos diferentes fármacos que actúan sobre el sistema de 5-HT central. Entre ellos, los antidepresivos se usan frecuentemente como adyuvantes para el tratamiento analgésico del dolor. Una cantidad significativa de pruebas apoya el uso de antidepresivos tricíclicos (TCA) y otros inhibidores de la recaptación de 5-HT y NE (SNRI) en el tratamiento del dolor crónico, pero debido a sus efectos sobre múltiples sistemas, se asocian con numerosos efectos secundarios indeseables (Carter y Sullivan, 2002; Mattia y col., 2002; Parkin y Barkin, 2005). Los inhibidores de la recaptación de 5-HT selectivos más nuevos (SSRI), que sólo tienen efectos secundarios mediados por receptores 5-HT, no se han estudiado en profundidad pero parecen ser menos eficaces que los TCA y SNRI en el tratamiento del dolor crónico (Barkin y Fawcett, 2000; Bomholt y col., 2005; Briley,

2004; Maizels y McCarberg, 2005; Sindrup y col., 2005; Stahl y col., 2005). Además, los datos disponibles sugieren que los niveles de 5-HT incrementados no inhiben invariablemente el procesamiento nociceptor. Al contrario, desencadenan un espectro de acciones pro- y antinociceptoras que son dependientes de receptor y una función de calidad y modalidad de estímulo (Millan, 2002; Suzuki y col., 2004).

- 5 Como revisó Millan (2002), se han implicado diferentes receptores 5-HT en analgesia. Entre ellos, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>3</sub> han recibido la mayor parte de la atención (Eide y Hole, 1993; Oyama y col., 1996; Obata y col., 2000; Kayser y col., 2002; Colpaert, 2006).

- 10 Un reciente estudio inmunocitoquímico que investigaba la distribución del receptor 5-HT<sub>7</sub> en la zona lumbar reveló que el inmunomarcaje de 5-HT<sub>7</sub> se localiza principalmente en las dos láminas superficiales del asta posterior y en células de los ganglios de la raíz posterior de tamaño pequeño y mediano, lo cual es compatible con un papel predominante en en la nocicepción (Doly y col., 2005). En los ganglios de la raíz posterior humanos y de rata también se ha detectado la presencia de ARN mensajero del receptor 5-HT<sub>7</sub> (Pierce y col., 1996, 1997). El examen al microscopio electrónico del asta posterior reveló tres localizaciones principales: 1) una localización postsináptica sobre cuerpos celulares peptidérgicos en las láminas I-III y en numerosas dendritas; 2) una localización presináptica sobre fibras peptidérgicas no mielinizadas (probablemente de origen aferente primario) y con mielinización fina (de células intrínsecas); y 3) una localización sobre astrocitos de la lámina I y II (Doly y col., 2005).

- 15 Con respecto a su función, se ha descrito un posible papel pronociceptor de receptores 5-HT<sub>7</sub> periféricos y espinales en la prueba de la formalina basada en administración local en la pata e intratecal de 5-HT o el agonista serotoninérgico no selectivo 5-carboxamidotriptamina (5-CT) y la reversión de sus efectos por el antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> SB-269970 (Rocha-González, 2005).

Dado que el dolor neuropático en especial ha devenido en un problema de salud muy importante en amplias áreas de la población y requiere un tratamiento muy específico, el problema subyacente resuelto por esta invención era encontrar nuevas maneras de tratar el dolor, concretamente el dolor neuropático, tal como alodinia.

- 25 Por tanto, el principal objetivo de esta invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista total o parcial en la producción de un medicamento para el tratamiento de la alodinia, caracterizado porque el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad al menos 10 veces mayor (expresado como un valor de K<sub>i</sub>) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

- 30 Este/estos compuesto/s pueden estar en forma neutra, en forma de base o ácido, en forma de sal, preferentemente una sal fisiológicamente aceptable, en forma de un solvato o de un polimorfo y/o en forma de su racemato, estereoisómeros puros, concretamente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, concretamente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción adecuada.

- 35 Durante el trabajo sobre compuestos que se unen al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúan allí como agonistas, se descubrió sorprendentemente que estos compuestos podrían actuar sobre el tratamiento del dolor, concretamente dolor neuropático, tal como alodinia, con una gran potencia. Todo esto resultó más sorprendente porque había una tendencia clara en la técnica a esperar que fueran los compuestos que se unen al receptor 5-HT<sub>7</sub> pero que actúan allí como antagonistas los que pudieran usarse para el tratamiento del dolor, concretamente dolor neuropático. Se descubrió que, claramente, éste no era el caso, especialmente no para dolor neuropático, tal como alodinia.

- 40 "Tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente solicitud se definen como que incluyen el tratamiento de los síntomas del dolor, concretamente dolor neuropático, concretamente ciertos subtipos de dolor neuropático, tal como alodinia (así como el tratamiento de la enfermedad o las consecuencias de la enfermedad que provoca los síntomas, la prevención o profilaxis de los síntomas de dolor, concretamente dolor neuropático, concretamente algunos subtipos de dolor neuropático, tal como alodinia) así como la prevención o la profilaxis de la enfermedad o las consecuencias de la enfermedad que provoca los síntomas. Preferentemente, "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente solicitud se definen como que incluyen el tratamiento de los síntomas del dolor, concretamente dolor neuropático, concretamente ciertos subtipos de dolor neuropático, tal como alodinia (así como el tratamiento de las consecuencias de la enfermedad que provoca los síntomas, la prevención o profilaxis de los síntomas de dolor, concretamente dolor neuropático, concretamente algunos subtipos de dolor neuropático, tal como alodinia) así como la prevención o la profilaxis de las consecuencias de la enfermedad que provoca los síntomas. Lo más preferentemente, "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente solicitud se definen como que incluyen el tratamiento de los síntomas de dolor, concretamente de dolor neuropático, concretamente algunos subtipos de dolor neuropático, tal como alodinia, y la prevención o la profilaxis de los síntomas de dolor, concretamente de dolor neuropático, concretamente algunos tipos de dolor neuropático, tal como alodinia.

- 55 La superfamilia de receptores de serotonina (5-HT) incluye 7 clases (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>) que comprenden 14 subclases humanas que están descritas en muchas ubicaciones en la bibliografía, concretamente por D. Hoyer, y col., Neuropharmacology, 1997, 36, 419. Así:

"El receptor 5-HT<sub>7</sub>" como se usa en la presente solicitud se conoce bien y está bien definido.

"El receptor 5-HT<sub>1A</sub>" como se usa en la presente solicitud se conoce bien y está bien definido.

Todos los demás "receptores 5-HT" como se usan en la presente solicitud se conocen bien y están bien definidos.

"Compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub>" como se usa en la presente solicitud se define/definen como que tienen un valor de K<sub>i</sub> para su unión al receptor 5-HT<sub>7</sub> ≤ 2 μM.

- 5 Los ensayos que pueden usarse para determinar la afinidad y selectividad de un agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> y/u otras afinidades por receptores 5-HT se conocen bien en la técnica y, concretamente, las mediciones de afinidades por estos receptores son ofrecidas por empresas de servicios como CEREP (128, rue Danton, 92500 Rueil. Malmaison, Francia) o MDS Pharma Servicios (Rosa de Lima 1bis, 2º 28290 Las Matas (Madrid), España). Es posible clasificar un compuesto con afinidad por un receptor 5-HT como agonista (también como antagonista o
- 10 agonista inverso) de acuerdo con la referencia de S.M. Stahl, Essential Psychopharmacology, Neuroscientific basis and practical applications, Ed. Cambridge, 1996, Capítulo 3. La parte correspondiente de la bibliografía se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la divulgación.

- Un "agonista" se define como un compuesto que se une a un receptor y tiene un efecto intrínseco y, por tanto, incrementa la actividad basal de un receptor cuando entra en contacto con el receptor. Los agonistas totales muestran el máximo efecto, como en el caso de 5CT o AS-19 sobre el receptor 5-HT<sub>7</sub>, mientras que un agonista parcial como MSD-5a da menos (p. ej., el 80 %) de la respuesta del agonista total como máximo.
- 15

- El término "sal" debe entenderse como que significa cualquier forma del compuesto activo de acuerdo con la invención en la cual éste adquiere una forma iónica o está cargado y está acoplado con un contraión (un catión o anión) o está en disolución. También deben entenderse por esto complejos del compuesto activo con otras moléculas e iones, en particular complejos que están complejados mediante interacciones iónicas.
- 20

- La expresión "sal fisiológicamente aceptable" se entiende en particular, en el contexto de esta invención, como una sal (como se define anteriormente) formada, o bien con un ácido tolerado fisiológicamente, es decir, sales del compuesto activo concreto con ácidos orgánicos o inorgánicos que son tolerados fisiológicamente (especialmente si se usan en seres humanos y/o mamíferos), o bien con al menos un catión, preferentemente inorgánico, que se tolera fisiológicamente (especialmente si se usa en seres humanos y/o mamíferos). Ejemplos de sales de ácidos concretos toleradas fisiológicamente son las sales de: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, bromhidrato, monobromhidrato, monoclóhidrato o clorhidrato, metioduro, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido hipúrico, ácido pícrico y/o ácido aspártico. Las sales de metales alcalinos y metales alcalinotérreos y con NH<sub>4</sub> son ejemplos de sales fisiológicamente toleradas de bases concretas.
- 25
- 30

- El término "solvato" de acuerdo con esta invención debe entenderse como que significa cualquier forma del compuesto activo de acuerdo con la invención en la cual este compuesto tiene unida mediante enlace no covalente otra molécula (lo más probable, un disolvente polar), incluyendo especialmente hidratos y alcoholatos, p. ej., metanolato.
- 35

- En una realización de la presente invención, se aplican las siguientes condiciones a los compuestos usados en esta invención:

- con la condición de que esté excluido el compuesto epinastina.

En una realización de la presente invención, se aplican las siguientes condiciones a los compuestos usados en esta invención:

- 40
- con la condición de que esté excluido el compuesto 8-OH-DPAT (8-hidroxi-dipropilaminotetralina).

Algunos subgrupos de dolor conocidos son dolor agudo, dolor crónico, dolor visceral e incluyendo también dolores de cabeza, concretamente migraña. Un subgrupo de dolor de especial interés en relación con esta invención es el dolor neuropático, tal como alodinia, que es el dolor tratado como realización altamente preferida de la invención. Otro subgrupo de dolor no reivindicado es el dolor inflamatorio.

- 45 Por lo tanto un uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista total o parcial en la producción de un medicamento para el tratamiento del dolor en el que el dolor es dolor neuropático, concretamente alodinia, caracterizado porque el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad al menos 10 veces mayor (expresado como un valor de K<sub>i</sub>) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

- 50 Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista total o parcial en la producción de un medicamento para el tratamiento del dolor en el que el dolor es dolor neuropático que implica alodinia, caracterizado porque el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad al menos 10 veces mayor (expresado como un valor de K<sub>i</sub>) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

Otro uso no reivindicado es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como agonista en la producción de un medicamento para el tratamiento del dolor en el que el dolor es hiperalgesia.

Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista total o parcial en la producción de un medicamento para el tratamiento del dolor en el que el dolor es alodinia, caracterizado porque el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad al menos 10 veces mayor (expresado como un valor de K<sub>i</sub>) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

Otro uso no reivindicado de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como agonista en la producción de un medicamento para el tratamiento del dolor en el que el dolor es dolor inflamatorio.

La IASP define "dolor neuropático" como "dolor iniciado o provocado por una lesión o disfunción primaria en el sistema nervioso" (IASP1 Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 210). Para el fin de esta invención, se incluye bajo este epígrafe o se considera sinónimo "dolor neurogénico", definido por la IASP como "dolor iniciado o provocado por una lesión, disfunción o perturbación transitoria primarias en el sistema nervioso periférico o central". Una de las muchas razones que provocan dolor neuropático es la diabetes, concretamente la diabetes II.

De acuerdo con la IASP, "alodinia" se define como "un dolor debido a un estímulo que normalmente no produce dolor" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 210).

De acuerdo con la IASP, "hiperalgesia" se define como "una respuesta incrementada a un estímulo que normalmente es doloroso" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 211).

En una realización preferida de la invención el medicamento se usa para el tratamiento de dolor neuropático tal como alodinia en el que el estímulo que provoca el dolor (concretamente el dolor neuropático tal como alodinia) es mecánico.

En otra realización de la invención el medicamento se usa para el tratamiento de dolor neuropático tal como alodinia en el que el estímulo que provoca el dolor (concretamente el dolor neuropático tal como alodinia) es térmico.

En otra realización de la invención no reivindicada el medicamento se usa para el tratamiento de dolor inflamatorio en el que el estímulo que provoca el dolor (concretamente el dolor inflamatorio) es mecánico.

En otra realización de la invención no reivindicada el medicamento se usa para el tratamiento de dolor inflamatorio en el que el estímulo que provoca el dolor (concretamente el dolor inflamatorio) es térmico.

En otra realización no reivindicada del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático se selecciona de entre dolor central, hiperpatía, dolor neuropático periférico (concretamente dolor neuropático somático periférico o cefálico) o dolor neurogénico periférico, causalgia, hiperestesia, neuralgia, neuritis o neuropatía.

De acuerdo con la IASP "dolor central" se define como "un dolor iniciado o provocado por una lesión o disfunción primaria en el sistema nervioso central" (IASP Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 211).

De acuerdo con la IASP "causalgia" se define como "un síndrome de dolor urente sostenido, alodinia e hiperpatía tras una lesión nerviosa traumática, frecuentemente combinado con disfunciones vasomotoras y sudomotoras y cambios tróficos posteriores" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 210).

De acuerdo con la IASP, "hiperestesia" se define como "sensibilidad incrementada a la estimulación, excluyendo los sentidos" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 211).

De acuerdo con la IASP, "neuralgia" se define como "dolor en la distribución de un nervio o nervios" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 212).

De acuerdo con la IASP, "neuritis" se define como "inflamación de un nervio o nervios" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 212).

De acuerdo con la IASP "neuropatía" se define como "una alteración de la función o cambio patológico en un nervio: en un nervio, mononeuropatía, en varios nervios, mononeuropatía múltiple, si es difusa y bilateral, polineuropatía" (IASP, Clasificación de dolor crónico, 2ª Edición, IASP Prensa (2002), 212).

De acuerdo con la IASP "hiperpatía" se define como "un síndrome doloroso caracterizado por una reacción anormalmente dolorosa a un estímulo, concretamente un estímulo repetitivo, así como por un umbral incrementado" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Press (2002), 210).

La IASP establece la siguiente diferencia entre "alodinia", "hiperalgesia" e "hiperpatía" (IASP, Classification of chronic pain, 2ª Edición, IASP Prensa (2002), 212):

|              |                                        |                                                                      |
|--------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Alodinia     | Umbral reducido                        | Es estímulo y el modo de respuesta difieren                          |
| Hiperalgesia | Respuesta incrementada                 | El intervalo de estímulo y respuesta coinciden                       |
| Hiperpatía   | Umbral elevado; Respuesta incrementada | El intervalo de estímulo y respuesta pueden ser iguales o diferentes |

Las realizaciones de la invención especialmente preferidas comprenden el uso de un compuesto con una unión muy específica al receptor 5-HT<sub>7</sub>, siendo en su perfil de unión más específico en su afinidad (mostrando por tanto una K<sub>i</sub> más baja) por el receptor 5-HT<sub>7</sub> que en su afinidad por otros receptores 5-HT.

- 5 Por lo tanto, otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista, en el que el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad al menos 30 veces mayor (expresada como un valor de K<sub>i</sub> más bajo) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, más preferentemente con una afinidad al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente con una afinidad al menos 100 veces mayor.
- 10 A modo de ejemplificación del párrafo anterior un compuesto X (específico para el receptor 5-HT<sub>7</sub>) que se supone que tiene una afinidad (expresada como un valor de K<sub>i</sub>) de 1 nM y una afinidad por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> de un valor de K<sub>i</sub> de 42 nM.

- 15 Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista, en el que el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad mayor (expresada como un valor de K<sub>i</sub> más bajo) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que a cualquier otro receptor 5-HT, uniéndose concretamente con una afinidad al menos 10 veces mayor, preferentemente con una afinidad al menos 30 veces mayor, más preferentemente con una afinidad al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente con una afinidad al menos 100 veces mayor.

- 20 Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista, en el que el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> con un valor de K<sub>i</sub> menor de 1000 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 50 nM, muy preferentemente menor de 25 nM, lo más preferentemente, menor de 10 nM.

- 25 Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista, en el que el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> con un valor de K<sub>i</sub> menor de 1000 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 50 nM, muy preferentemente menor de 25 nM, lo más preferentemente, menor de 10 nM y

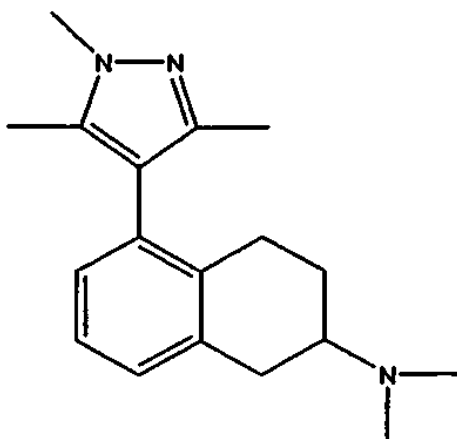
- 30 se une con una mayor afinidad (expresada como un valor de K<sub>i</sub> más bajo) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, uniéndose concretamente con una afinidad al menos 10 veces mayor, preferentemente con una afinidad al menos 30 veces mayor, más preferentemente con una afinidad 50 veces mayor, lo más preferentemente con una afinidad al menos 100 veces mayor.

- 35 Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista, en el que el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> con un valor de K<sub>i</sub> menor de 1000 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 50 nM, muy preferentemente menor de 25 nM, lo más preferentemente menor de 10 nM y se une con una afinidad mayor (expresada como un valor de K<sub>i</sub> más bajo) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que a cualquier otro receptor 5-HT, uniéndose concretamente con una afinidad al menos 10 veces mayor, preferentemente con una afinidad al menos 30 veces mayor, más preferentemente con una afinidad al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente con una afinidad al menos 100 veces mayor.

- 40 Otro uso preferido de acuerdo con la invención es el uso de un compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista, en el que el compuesto es un agonista total o parcial.

- 45 En otro uso preferido de acuerdo con la invención el compuesto usado es AS-19 o MSD5a, especialmente AS-19, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, concretamente enantiómeros o diastereómeros, o en forma de mezclas de estereoisómeros, concretamente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción adecuada; en la forma mostrada o en forma del ácido o la base o en forma de una sal, concretamente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, concretamente un hidrato.

AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino) tetralina] está definida por la fórmula que se representa a continuación y está comercialmente disponible (p. ej. a través de TOCRIS).



MSD-5a (corresponde al compuesto 5a en Thomson y col., 2004; Merck Sharp & Dohme Research Laboratories) [2-(6-fenilpiridin-2-iltio)-N,N-dimetil etanamina] está descrita en esta bibliografía incluyendo su síntesis.

- 5 Cualquier uso de un compuesto que es un profármaco de un compuesto usado de acuerdo con la invención (concretamente AS-19 y MSD-5a) está dentro del alcance de la invención. El término "profármaco" se usa en su sentido más amplio y comprende aquellos derivados que se convierten in vivo en los compuestos de la invención. Tales derivados resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los presentes compuestos: ésteres, ésteres de aminoácido, ésteres de fosfato, ésteres sulfonados de sales metálicas, carbamatos y amidas.
- 10 Los ejemplos de procedimientos bien conocidos para producir un profármaco de un compuesto activo dado son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden encontrarse, p. ej., en Krogsgaard-Larsen y col. "Textbook of Drug design and Discovery" Taylor y Francis (Abril de 2002).

- A menos que se establezca de otro modo, también se pretende que los compuestos de acuerdo con la invención (concretamente AS-19 y MSD-5a) incluyan compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por el reemplazo de un hidrógeno por un deuterio o un tritio, o el reemplazo de un carbono por carbono enriquecido  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  o nitrógeno enriquecido  $^{15}\text{N}$  están dentro del alcance de esta invención.
- 15

- En tratamientos de seres humanos, la dosis administrada puede ser bastante baja, dependiendo de la vía de administración. Generalmente, una cantidad administrada eficaz de un compuesto de la invención dependerá de la eficacia relativa del compuesto elegido, la gravedad del trastorno que se está tratando y el peso del paciente. Aun así, los compuestos activos se administrarán normalmente una vez o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces por día, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de desde 0,1 hasta 1.000 mg/kg/día.
- 20

Cualquier medicamento de acuerdo con la invención contiene el ingrediente activo, así como, opcionalmente, al menos un material auxiliar y/o aditivo y/u opcionalmente cualquier otro ingrediente activo.

- 25 El material auxiliar y/o aditivo puede seleccionarse concretamente de entre agentes conservantes, emulsionantes y/o vehículos para aplicación parenteral. La selección de estos materiales auxiliares y/o aditivos y de las cantidades que se van a utilizar depende de cómo se va a aplicar la composición farmacéutica. Los ejemplos incluyen aquí concretamente formulaciones de aplicación parenteral, como intravenosa o subcutánea, o intramuscular, pero que también podrían usarse para otras vías de administración.

- 30 Las vías de administración pueden incluir inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, sublingual, bucal, parche transdérmico, ingesta oral, bomba osmótica implantable, implantes de colágeno, aerosoles o supositorio.

- En esta invención también se incluyen procedimientos de tratamientos de un paciente o un mamífero, incluidos seres humanos, que padecen dolor, concretamente dolor neuropático, usando un compuesto que se une al receptor y actúa como un agonista.
- 35

### **Procedimientos farmacológicos:**

#### **Procedimiento 1: Unión y funcionalidad**

##### **Unión**

- 40 Las afinidades de unión se determinaron en ensayos de unión de radioligando de acuerdo con sus protocolos de ensayo estándar. En el caso 1, se realizaron los ensayos incluidos en el paquete LeadProfilingScreen más 5-HT<sub>1</sub> no

selectivo, 5-HT<sub>2</sub> no selectivo, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. En el caso 2, se realizaron los ensayos incluidos en el perfil de alto rendimiento más 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2By</sub> 5-HT<sub>4e</sub>. Para AS-19 se llevaron a cabo ensayos adicionales para completar su curva de selectividad para receptores de serotonina, incluyendo 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>4e</sub>.

## 5 **Funcionalidad**

Se realizaron medidas de AMPc usando un sistema basado en fluorescencia resuelta con tiempo homogéneo (HTRF) (Gabriel y col., 2003). Esta tecnología permite la medida directa del AMPc en células HEK-293F que expresan receptores 5-HT<sub>7</sub> humanos de forma estable. El principio de este ensayo está basado en la competición entre el AMPc producido por células y el conjugado de AMPc-XL665 por la unión con el conjugado anti-AMPc monoclonal-criptato. El kit de HTRF de AMPc de CisBio se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El procedimiento experimental se realizó como se indica a continuación. Tras la incubación durante la noche sin suero, las células suspendidas (20.000 células por pocillo) se añadieron a placas de cultivo de 96 pocillos en tampón de incubación compuesto por Ham F12 (Gibco) más 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX Sigma) y paragilina 20 µM (Sigma).

Para experimentos de agonista y antagonista, se añadieron 2 µl de compuesto o vehículo a cada pocillo en 40 µl de suspensión de células a diferentes concentraciones, preincubando las placas durante 10 min a temperatura ambiente tras la adición del compuesto. Después, se añadieron 10 µl de vehículo o 5-HT, incubando durante 30 min a 37 °C. La reacción se paró lisando las células con una mezcla de 25 µl de criptato y 25 µl de XL-665 preparada en el tampón de lisis suministrado por el fabricante. Las placas se incubaron durante otra hora a temperatura ambiente y se leyeron a 665 nm/620 nm usando un lector de placas Ruby Star (BMG Lab Tech).

## **Procedimiento 2: Ensayo de capsaicina**

### **Material y procedimientos**

#### **Animales**

En estos estudios se usaron ratones CD1 macho de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupos de cinco, se les suministró comida y agua a voluntad y se mantuvieron en condiciones de laboratorio controladas con la temperatura mantenida a 21 ± 1 °C y la luz en ciclos de 12 horas (encendido a las 07:00 h y apagado a las 19:00 h). Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de experimentación insonorizada y climatizada. El número de ratones por grupo en cada experimento individual fue de 16.

#### **Fármacos**

La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) se disolvió en DMSO al 1 % (vehículo). Los fármacos utilizados para los tratamientos fueron: AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino) tetralina), MSD-5a (corresponde al compuesto 5a en Thomson y col., 2004; Merck Sharp & Dohme Research Laboratories) [2-(6-fenilpiridin-2-iltio)-N,N-dimetil etanamina], SB-258719 [(R)-3,N-dimetil-N-(1-metil-3-(4-metilpiperidin-1-il) propil) bencenosulfonamida], SB-269970 [(R)-3-(2-(2-(4-metilpiperidin-1-il) etil) pirrolidin-1-sulfonil) fenol], WAY-100635 [(N-{2-[4-(2-metoxi-fenil)-1-piperazinil] etil}-N-(2-piridinil) ciclohexanocarboxamida] y F-13640 [(3-cloro-4-fluoro-fenil-[4-fluoro-4-[[[5-metilo-piridin-2-ilmetil]-amino]-metil]piperidin-1-il] metanona]. AS-19 se disolvió en DMSO al 1 % y el resto de compuestos se prepararon como soluciones acuosas. Las dosis se calcularon basándose en el peso molecular de la base libre. Todos los compuestos y vehículos (DMSO al 1 % o solución salina fisiológica) se administraron en un volumen de 5 ml/kg por vía subcutánea (s.c.). Cuando se coadministraron dos compuestos, se inyectaron s.c. en flancos opuestos de los ratones.

### **Modelo de dolor neurogénico por capsaicina**

La inyección subplantar de capsaicina provoca inicialmente un comportamiento nocifensor que se caracteriza por el levantamiento y la protección de la pata inyectada y que normalmente dura hasta 5 minutos tras la inyección. Después, se hace evidente la hipersensibilidad a estímulos tanto térmicos como mecánicos (Gilchrist y col., 1996). En este estudio, se usó la sensibilización por inyección subplantar de capsaicina para evaluar el efecto de varios ligandos 5-HT<sub>7</sub> sobre la alodinia mecánica.

Los ratones se inyectaron con capsaicina (1 µg o 4 ng en 20 µl de DMSO al 1 %) o DMSO al 1 % (vehículo) en la superficie de la mitad de la planta de la pata posterior derecha. Se realizaron tratamientos de fármacos con ligandos 5-HT<sub>7</sub> 30 min antes de la inyección de capsaicina y se determinaron las latencias de retirada ante un estímulo mecánico 15 min después de la inyección de capsaicina (Fig. 1).

### **Evaluación de la alodinia mecánica: prueba de von Frey automática**

La alodinia mecánica se cuantificó midiendo la latencia de respuesta de retirada de la pata trasera derecha frente a la estimulación con filamentos de von Frey. Los ratones se colocaron en recintos compartimentados en una cámara de ensayo con un suelo delimitado de malla metálica y se dejó que se aclimataran a su entorno durante 120 min

antes de realizar las pruebas. Durante este tiempo el animal inicialmente mostró un comportamiento exploratorio, pero posteriormente dejó de explorar y se quedó quieto, con momentos de acicalamiento ocasionales. El estímulo mecánico se aplicó a la superficie plantar de la pata trasera derecha inyectada con capsaicina desde abajo del suelo de malla utilizando un dispositivo de ensayo automatizado (estesiómetro plantar dinámico, Ugo Basile, Italia) que levanta un filamento recto (0,5 mm de diámetro). El filamento ejerció una presión ascendente fija (1 g o 0,25 g) sobre la superficie plantar. Cuando el animal retiró su pata trasera, el estímulo mecánico cesó automáticamente y se registró el tiempo de latencia. La latencia se definió como el tiempo desde el comienzo de la exposición al filamento hasta el cese de la presión cuando el sensor detectó la retirada de la pata. Se impuso una latencia de corte de 60 s. Se midieron las latencias de retirada de la pata por triplicado para cada animal.

## **Protocolo experimental**

Cuando se fija en 1 g, la presión ejercida por el filamento es insuficiente para inducir respuestas dolorosas oportunas en ratones de control normales (en ausencia de capsaicina) y, por tanto, la respuestas rápidas de retirada observadas 15 min después de la sensibilización con 1 µg de capsaicina reflejan alodinia mecánica. Este enfoque permitió evaluar el posible efecto antialodínico de ligandos 5-HT<sub>7</sub>.

Alternativamente, en algunos experimentos, se inyectaron sólo 4 ng (en vez de 1 µg) de capsaicina en la pata y la presión ejercida por el filamento se redujo a 0,25 g (en vez de 1 g). Los ratones que recibieron esta cantidad menor de capsaicina (250 veces menos que las usadas para inducir alodinia) no mostraron alodinia cuando se los estimuló mecánicamente con un presión baja hacia arriba de 0,25 g. Este enfoque se usó para ensayar la posibilidad de que los tratamientos pudieran ejercer un efecto proalodínico. La Figura 1 resume los dos enfoques experimentales diferentes llevados a cabo en este estudio.

## **Análisis de los datos.**

Los datos se representan como las respuestas de latencia de retirada de la pata medias en  $s \pm EEM$ . Las respuestas de retirada de la pata trasera inyectada con capsaicina antes de estimulación mecánica de ratones tratados se compararon con las de ratones no tratados (tratados con vehículo). El análisis estadístico de las comparaciones entre grupos del ensayo se realizó usando un análisis de varianza inicial de un sentido seguido de la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. El nivel de significancia se estableció en  $p < 0,05$ .

## **Procedimiento 3: Ligadura parcial del nervio ciático**

### **Material y procedimientos**

#### **Animales**

En estos estudios se usaron ratones CD1 macho de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupos de cinco, se les suministró comida y agua a voluntad y se mantuvieron en condiciones de laboratorio controladas con la temperatura mantenida a  $21 \pm 1$  °C y la luz en ciclos de 12 horas (encendido a las 07:00 h y apagado a las 19:00 h). Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de experimentación insonorizada y climatizada.

#### **Fármacos**

Los fármacos usados para los tratamientos fueron: AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino) tetralina], MSD-5a (corresponde al compuesto 5a en Thomson y col., 2004; Merck Sharp & Dohme Research Laboratories) [2-(6-fenilpiridin-2-iltio)-N,N-dimetil etanamina], SB-258719 [(R)-3,N-Dimetil-N-(1-metil-3-(4-metilpiperidin-1-il) propil) bencenosulfonamida]. La AS-19 se disolvió en DMSO al 1 % en forma de base libre y solución salina con las sal de dihidroclorhidrato. El resto de compuestos se prepararon como soluciones acuosas. Las dosis se calcularon basándose en el peso molecular de la base libre. Todos los compuestos y vehículos (DMSO al 1 % o solución salina fisiológica) se administraron en un volumen de 5 ml/kg a través la vía subcutánea (s.c.). Cuando se coadministraron dos compuestos, se inyectaron s.c. en flancos opuestos de los ratones.

#### **Cirugía**

El modelo de ligadura parcial del nervio ciático se usó para inducir dolor neuropático, de acuerdo con el procedimiento descrito previamente (Seltzer y col., 1990; Malmberg y Basbaum, 1998). Este modelo consiste en lesionar parcialmente el nervio ciático a la altura de la mitad de muslo. Todos los procedimientos quirúrgicos para la lesión nerviosa se realizaron bajo anestesia con isoflurano (IsoFlo®, Abbott-Laboratorios Dr. Esteve, S.A., Barcelona, Spain) (inducción: 3 %; cirugía: 2%). Brevemente, los ratones fueron anestesiados y se expuso el nervio ciático común a la altura de la mitad del muslo de la pata posterior derecha. La lesión nerviosa parcial se produjo a aproximadamente 1 cm de proximidad de la trifurcación del nervio atando una ligadura ajustada alrededor de aproximadamente el 33 al 50 % del diámetro del nervio ciático usando seda de sutura virgen irreabsorbible de 9-0 (Alcon surgical, Texas, EE. UU.). La ligadura comprendió el 1/3-1/2 exterior del nervio ciático, mientras que el resto del nervio (2/3-1/2 interior) se dejó "sin lesionar". El músculo se cosió después con seda de sutura de 6-0 y la incisión en la piel se cerró con grapas. Los ratones control, testigos quirúrgicos, fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico y el nervio ciático se expuso, pero no se ligó. Después de la cirugía, se dejó que los

animales se recuperaran durante 5 días, antes de la iniciación de los ensayos de comportamiento nociceptor (véanse los protocolos experimentales a continuación).

#### **Ensayos de comportamiento nociceptor**

- 5 La alodinia frente a estímulos mecánicos y la hiperalgesia frente a estímulos térmicos nocivos se usaron como medidas indicadoras de dolor neuropático y como indicadores del posible efecto antinociceptor de los tratamientos con fármacos.

#### **Evaluación de la alodinia mecánica: prueba de von Frey automática**

- 10 La alodinia mecánica se cuantificó midiendo el umbral táctil de retirada de la pata trasera derecha tras la estimulación con filamentos de von Frey. El día de la prueba, los ratones fueron colocados en recintos compartimentados en una cámara de ensayo con un suelo delimitado de malla metálica y se dejó que se aclimataran a su entorno durante 1 h antes de realizar las pruebas. El estímulo mecánico se aplicó a la superficie plantar de la pata trasera derecha desde abajo del suelo de malla utilizando un dispositivo de ensayo automatizado (estesiómetro plantar dinámico, Ugo Basile, Italia) que levanta un filamento recto (0,5 mm de diámetro). El filamento ejerció una presión hacia arriba cada vez mayor sobre la superficie plantar. La presión aumentó linealmente con el tiempo (0,1 g/s; de 0 a 5 g en 50 s) hasta que el ratón retiró su pata. Cuando el animal retiró su pata trasera, el estímulo mecánico cesó automáticamente y se registró la fuerza como el umbral mecánico. Así, el umbral mecánico se definió como la presión a la que el sensor detectó la retirada de la pata. Se impuso un umbral de corte de 5 g (50 s). Se midieron las latencias de retirada de la pata por triplicado para cada animal.

#### **Evaluación de la alodinia mecánica: prueba de Frey manual**

- 20 La alodinia mecánica se cuantificó midiendo la respuesta de retirada de la pata trasera frente a la estimulación con filamentos de von Frey, como se indicó previamente (Chaplan y col., 1994). En primer lugar se usó el filamento de 0,4 g. Después, la fuerza del siguiente filamento se redujo cuando el animal respondió o se incrementó cuando el animal no respondió. Este procedimiento de subida y bajada se paró cuatro medidas después del primer cambio en la respuesta del animal y se calculó el umbral de respuesta. La retirada clara de la pata, agitándola, se consideró como una respuesta de tipo nociceptor.

#### **Evaluación de la hiperalgesia térmica: prueba plantar**

- 30 La hiperalgesia térmica se evaluó usando la prueba plantar mediante la determinación de las latencias de retirada frente a un estímulo térmico siguiendo una modificación de la prueba descrita por Hargreaves y col. (1988). El día de la prueba, los ratones fueron colocados en un dispositivo de ensayo (Prueba plantar, Ugo Basile, Italia) y se dejó que se aclimataran a su entorno durante 1 h antes de realizar las pruebas. El dispositivo de la prueba plantar consistía en un cubículo de plástico con un suelo de vidrio a través del cual se aplicó un haz de luz infrarroja móvil sobre la superficie plantar de la pata posterior derecha. Se determinó el tiempo de latencia de retirada de la pata frente al estímulo térmico. La intensidad del haz de luz infrarroja se ajustó para producir latencias de respuesta medias en ratones control no tratados de aproximadamente 8 a 12 segundos. Esta latencia de respuesta se determinó usando un temporizador conectado con los sensores de movimiento de fotodiodo del dispositivo de la prueba plantar. La latencia de respuesta se definió como el tiempo desde el comienzo de la exposición al haz de luz infrarroja hasta el cese del haz de luz infrarroja cuando el sensor de movimiento de fotodiodo detectó la retirada de la pata de ratón. Las latencias de retirada se midieron por triplicado para cada animal y el valor medio se usó para análisis. Se impuso una latencia de corte de 20 segundos para evitar daño tisular.

#### **Protocolo experimental: Diseño de cuadrado latino.**

- 40 Se investigó la efectividad de tratamientos agudos con ligandos 5-HT<sub>7</sub> comparados con vehículo sobre la expresión de dolor neuropático basándose en el siguiente protocolo experimental. Los ratones fueron habituados durante 1 h al entorno de las diferentes pruebas experimentales (prueba de von Frey o plantar, dependiendo del experimento) durante 4 días. Tras el periodo de habituación, se establecieron en cada prueba respuestas basales anteriores a la lesión durante 2 días consecutivos. Un día después de las medidas basales, se indujo la lesión nerviosa o la operación de testigos como se ha descrito anteriormente. Los ratones se sometieron entonces a ensayos, bien con la prueba de von Frey o bien la plantar en el día 5 después del procedimiento quirúrgico para controlar respuestas posteriores a la lesión. Las respuestas basales posteriores a la lesión de ratones tratados con vehículo se obtuvieron en el día 10 (basal anterior al tratamiento). En los días 11-13 los ratones recibieron tratamiento con tres dosis diferentes de ligandos 5-HT<sub>7</sub> siguiendo un diseño de cuadrado latino. Finalmente, en el día 14 después de la cirugía, se evaluaron las respuestas basales en ratones tratados con vehículo (basal post-tratamiento) como un control interno para asegurar que la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica no estaban influenciadas por tratamientos previos en el diseño de cuadrado latino. La evaluación del comportamiento se realizó siempre 30 min después del tratamiento con vehículo o con ligandos 5-HT<sub>7</sub>. La Figura 15 resume la cronología del protocolo experimental.

#### **Protocolo experimental. Diseño de dosis única**

Los ratones fueron habituados durante 2 h al entorno de las diferentes pruebas experimentales (prueba de von Frey

o plantar, dependiendo del experimento) durante 1-2 días. Después del periodo de habituación, se establecieron las medidas en cada prueba tras 1 h de habituación mediante la prueba de von Frey manual o la plantar, 30 y 45 min, respectivamente, tras la administración del vehículo o los compuestos ensayados. Un día después de la medida basal, se indujo la lesión nerviosa como se describe anteriormente y 5 días después se obtuvieron los valores basales posteriores a la lesión en las pruebas mencionadas. En el día 10 tras la lesión, los ratones recibieron vehículo y se realizaron medidas para obtener los valores basales anteriores al tratamiento. El día de la prueba, en el día 11 tras la lesión, se realizaron medidas en ratones tratados con fármaco (Fig. 16).

### **Análisis de los datos.**

Los datos se presentaron en primer lugar como presión (gramos) requerida para alcanzar el umbral de respuesta (retirada de la pata) en la prueba de von Frey o como latencia (segundos) de retirada de la pata en la prueba plantar. En algunos casos, los datos se presentaron como porcentajes respecto de los valores basales anteriores al tratamiento. Los valores fueron siempre la media  $\pm$  EEM. Los datos obtenidos en las pruebas de von Frey y plantar en ratones tratados se compararon con aquellos de los ratones no tratados (tratados con vehículo). El análisis estadístico de las comparaciones entre grupos del ensayo se realizó usando un análisis de varianza inicial de un sentido seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas si la probabilidad de error era menor del 5 % (el nivel de significancia se estableció en  $p < 0,05$ ).

### **Referencias**

Barkin RL, Fawcett J. (2000) The management challenges of chronic pain: the role of antidepressants (Retos en el tratamiento del dolor crónico: el papel de los antidepresivos).; Am J Ther, 7:31-47.

Barkin RL, Barkin S. (2005) The role of venlafaxine and duloxetine in the treatment of depression with decremental changes in somatic symptoms of pain, chronic pain, and the pharmacokinetics and clinical considerations of duloxetine pharmacotherapy (Papel de la venlafaxina y la duloxetina en el tratamiento de la depresión con cambios decrecientes en síntomas somáticos de dolor, dolor crónico y las consideraciones farmacocinéticas y clínicas de la farmacoterapia con duloxetina). Am J Ther, 12:431-438.

Beck PW, Handwerker HO. (1974) Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibers (Efectos de la bradicinina y la serotonina sobre diversos tipos de fibras nerviosas cutáneas). Pflugers Arch, 347:209-222.

Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G. (2005) Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain (Efectos antinociceptores de los antidepresivos amitriptilina, duloxetina, mirtazapina y citalopram en modelos animales de dolor agudo, persistente y neuropático). Neuropharmacology, 48:252-263.

Briley M. (2004) Clinical experience with dual action antidepressants in different chronic pain syndromes (Experiencia clínica con antidepresivos de acción dual en diferentes síndromes de dolor crónico). Hum Psychopharmacol, Suppl 1:S21-25.

Carter GT, Sullivan MD. (2002) Antidepressants in pain Management (Antidepresivos en el tratamiento del dolor). Curr Opin Investig Drugs, 3:454-458.

Coderre TJ, Katz J. (1997) Peripheral and central hyperexcitability: differential signs and symptoms in persistent pain. Behav Brain Sci, 20:404-419.

Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Cosi C, Carilla-Durand E., Assie MB, Vacher B. (2002) Large-amplitude 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia (Activación de gran amplitud del receptor 5-HT<sub>1A</sub>: un nuevo mecanismo de analgesia central profunda). Neuropharmacology, 43:945-958.

Colpaert FC. (2006) 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief. (Activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub>: nuevos mecanismos moleculares y neuroadaptativos de alivio del dolor) Curr Opin Investig Drugs, 7:40-47.

Doly S, Fischer J, Brisorgueil MJ, Verge D, Conrath M. (2005) Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in rat dorsal spinal cord: immunocytochemical evidence (Localización pre- y post-sináptica del receptor 5-HT<sub>7</sub> en médula espinal dorsal de rata: pruebas inmunocitoquímicas). J Comp Neurol, 490:256-269.

Eide PK, Hole K. (1993) The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensitivity (Papel de los subtipos de receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT) y la plasticidad de los sistemas 5-HT en la regulación de la sensibilidad nociceptora). Cephalalgia, 13:75-85.

Forbes IT, Dabbs S, Duckworth DM, Jennings AJ, King FD, Lovell PJ, Brown AM, Collin L, Hagan JJ, Middlemiss DN, Riley GJ, Thomas DR, Upton N. (1998) (R)-3,N-dimethyl-N-[1-methyl-3-(4-methyl-piperidin-1-

yl) propyl]benze-nesulfonamide: the first selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist ((R)-3,N-dimetil-N-[1-metil-3-(4-metil-piperidin-1-il)propil]bencenosulfonamida: el primer antagonista selectivo del receptor 5-HT<sub>7</sub>). J Med Chem, 41:655-657.

- 5 Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, Fletcher A. (1995) A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635 (Perfil farmacológico del antagonista selectivo silencioso del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, WAY-100635). Eur J Pharmacol, 281:81-88.
- Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA (1996) Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats (Respuestas potenciadas de retirada frente al calor y estímulos mecánicos tras inyección subplantar de capsaicina en ratas). Pain, 67:179-188.
- 10 Harte SE, Kender RG, Borszcz GS. (2005) Activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors In the parafascicular nucleus suppresses the affective reaction of rats to noxious stimulation (La activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el núcleo parafascicular anula la reacción afectiva de las ratas frente a estimulación nociva). Pain, 113:405-415.
- 15 Hylden JL, Nahin RL, Traub RJ, Dubner R. (1989) Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn mechanisms (Expansión de campos receptores de las neuronas de la proyección espinal de la lámina I en ratas con inflamación unilateral inducida por adyuvante: la contribución de los mecanismos del asta dorsal). Pain, 37:229-243.
- 20 Kayser V, Aubel B, Hamon M, Bourgoin S. (2002) The antimigraine 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain (Los agonistas antimigrañosos del receptor 5-HT<sub>1B/1D</sub> sumatriptán, zolmitriptán y dihidroergotamina atenúan el comportamiento relacionado con el dolor en un modelo de dolor neuropático trigeminal en rata). Br J Pharmacol, 137:128T-129T.
- 25 Khawaja X, Evans N, Reilly Y, Ennis C, Minchin MC. (1995) Characterisation of the binding of [3H]WAY-100635, a novel 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor antagonist, to rat brain (Caracterización de la unión de [3H]WAY-100635, un antagonista novedoso del receptor 5-hidroxitriptamina <sub>1A</sub>, en cerebro de rata). J Neurochem, 64:2716-2726.
- 30 Lovell PJ, Bromidge SM, Dabbs S, Duckworth DM, Forbes IT, Jennings AJ, King FD, Middlemiss DN, Rahman SK, Saunders DV, Collin LL, Hagan JJ, Riley GJ, Thomas DR. (2000) A novel, potent, and selective 5-HT<sub>7</sub> antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970) (Un antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> novedoso, potente y selectivo: (R)-3-(2-(2-(4-metilpiperidin-1-il)etil)pirrolidin-1-sulfonil) fenol (SB-269970)). J Med Chem. 2000, 43: 342-345.
- 35 Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Danielson PE, Sutcliffe JG, Erlander MG (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms (Un receptor de serotonina (5-HT<sub>7</sub>) novedoso activador de adenilil ciclase implicado en la regulación de ritmos circadianos en mamíferos). Neuron, 11:449-458.
- 40 Mahé C, Loetscher E, Feuerbach D, Muller W, Seller MP, Schoeffter P. (2004) Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptors (Eficacias diferenciales de agonistas inversos de SB-258719, SB-258741 y SB-269970 en receptores 5-HT<sub>7</sub> de serotonina recombinantes humanos). Eur J Pharmacol, 495:97-102.
- 45 Malzels M, McCarberg B. (2005) Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain (Fármacos antidepresivos y antiepilépticos para dolor crónico no canceroso). Am Fam Physician, 71:483-490.
- Mattia C, Paoletti F, Coluzzi F, Boanelli A. (2002) New antidepressants in the treatment of neuropathic pain. A review (Nuevos antidepresivos en el tratamiento del dolor neuropático. Una revisión). Minerva Anestesiol, 68:105-114.
- 50 Millan MJ. (2002) Descending control of pain (Control descendente del dolor). Prog Neurobiol, 66:355-474.
- Obata H, Saito S, Ishizaki K, Goto F. (2000) Antinociception in rat by sarpogrelate, a selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, is Peripherals (La antinocicepción por sarpogrelato, un antagonista del receptor 5-HT<sub>2A</sub> selectivo, en rata es periférica). Eur J Pharmacol, 404:95-102.
- Oyama T, Ueda M, Kuraishi Y, Akaike A, Satoh M. (1996) Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord (Efecto dual de la serotonina sobre la nocicepción inducida por formalina en la médula espinal de rata). Neurosci Res, 25:129-135.
- Perez-García GS, Meneses A. (2005) Effects of the potential 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist AS 19 in an autoshaping

learning task (Efectos de agonista potencial del receptor 5-HT<sub>7</sub> AS 19 en una tarea de aprendizaje automodelado). *Behav Brain Res*, 163:136-140.

Perrone R, Berardi F, Colabufo NA, Lacivita E, Leopoldo M, Tortorella V. (2003) Synthesis and structure-affinity relationships of 1-[omega-(4-aryl-1-piperazinyl)alkyl]-1-aryl ketones as 5-HT<sub>7</sub> receptor ligands (Síntesis y relaciones estructura-afinidad de 1-[omega-(4-aril-1-piperazinil)alkil]-1-aril cetonas como ligandos del receptor 5-HT<sub>7</sub>). *J Med Chem*, 46: 646-649.

Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. (1996) 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study (ARN mensajeros de subtipos de receptores de 5-hidroxitriptamina en ganglios sensoriales y simpáticos periféricos de rata: un estudio de reacción en cadena de la polimerasa). *Neuroscience*, 70:553-559.

Pierce PA, Xie GX, Meuser T, Peroutka SJ. (1997) 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: a polymerase chain reaction study (ARN mensajeros de subtipos de receptores de 5-hidroxitriptamina en ganglios de la raíz dorsal humana: un estudio de reacción en cadena de la polimerasa). *Neuroscience*, 81:813-819.

Rocha-Gonzalez HI, Meneses A, Carlton SM, Granados-Soto V. (2005) Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the formalin test (Papel pronociceptor de receptores 5-HT<sub>7</sub> periféricos y espinales en la prueba de la formalina). *Pain*, 117:182-192.

Reissig CJ, Eckler JR, Rabin RA, Winter JC. (2005) The 5-HT<sub>1A</sub> receptor and the stimulus effects of LSD in the rat (El receptor 5-HT<sub>1A</sub> y los efectos estimuladores del LSD en rata). *Psychopharmacology (Berl)*, 182:197-204.

Sanin A, Brisander M, Rosqvist S, Mohell N, Malberg A, Johansson A. (2004) 5-Aryl substituted (S)-2-(dimethylamino) tetralins novel serotonin 5HT<sub>7</sub> receptor ligands (Ligandos novedosos del receptor 5HT<sub>7</sub> de (S)-2-(dimetilamino) tetralinas 5-aril sustituidas). En: *Proceedings of the 14h Camerino-Noord Symposium. Ongoing Progress in the Receptor Chemistry (Procedimientos del 14º simposio Camerino-Noord. Progreso actual en la química de receptores)*, p.27.

Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A. (1995) Identification of 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment (Identificación de sitios de unión del receptor 5-hidroxitriptamina 7 en hipotálamo de rata: sensibilidad frente al tratamiento antidepresivo crónico). *Mol Pharmacol*, 47:99-103.

Stahl SM, Grady MM, Moret C, Briley M. (2005) SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants (IRS: su farmacología, eficacia clínica y tolerabilidad en comparación con otras clases de antidepresivos). *CNS Spectr*, 10(9):732-747

Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. (2004) Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing (Malas noticias para el cerebro: vías descendentes de 5-HT que controlan el procesamiento del dolor espinal). *Trends Pharmacol Sci*, 25:613-617.

Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. (2005) Antidepressants in the treatment of neuropathic pain (Antidepresivos en el tratamiento del dolor neuropático). *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96:399-409.

Sommer C. (2004) Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery (La serotonina en el dolor y la analgesia: acciones en la periferia). *Mol Neurobiol*, 30:117-125.

Thomson CG, Beer MS, Curtis NR, Diggle HJ, Handford E, Kulagowski JJ. (2004) Thiazoles and thiopyridines: novel series of high affinity h5HT<sub>7</sub> ligands (Tiazoles y tiopiridinas: series novedosas de ligandos 5HT<sub>7</sub>h de alta afinidad). *Bioorg Med Chem Lett*. 14:677-680.

Wilcox RE, Ragan JE, Pearlman RS, Brusniak MY, Eglen RM, Bonhaus DW, Tenner TE Jr, Miller JD. (2001) High-affinity interactions of ligands at recombinant guinea pig 5HT<sub>7</sub> receptors (Interacciones de alta afinidad de ligandos en receptores 5-HT<sub>7</sub> recombinantes de conejillos de indias). *J Comput Aided Mol Des*, 15:883-909.

Woolf CJ. (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity (Pruebas de un componente central de la hipersensibilidad al dolor posterior a lesión). *Nature*, 306:686-688.

Woolf CJ, Thompson SW. (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states (La inducción y la manutención de la sensibilización central depende de la activación del receptor del ácido N-metil-D-aspartico; implicaciones para el tratamiento de estados de hipersensibilidad al dolor tras lesión). *Pain*, 44:293-299.

You HJ, Colpaert FC, Arendt-Nielsen L. (2005) The novel analgesic and high-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist F 13640 inhibits nociceptive responses, wind-up, and after-discharges in spinal neurons and withdrawal reflexes (El agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> novedoso, analgésico y de alta eficacia, F 13640 inhibe respuestas nociceptoras, de terminación y posteriores a descarga en neuronas espinales y reflejos de retirada). Exp Neurol, 191:174-183.

#### **Procedimiento 4: Lesión por constricción crónica del nervio ciático (CCI-SN)**

##### **Material y procedimientos**

##### **Animales**

Se alojaron ratas Sprague-Dawley macho adultas (175-200 g a su llegada) en un entorno con temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) con un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. La comida y el agua estaban disponibles a voluntad. Se dejó que las ratas se habituaran a las instalaciones de alojamiento durante al menos 1 semana antes de la cirugía. En estos estudios se cumplieron las directrices éticas del Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor) (1983).

##### **Fármacos**

Los fármacos utilizados para los tratamientos fueron: AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino) tetralina], MSD-5a (corresponde al compuesto 5a en Thomson y col., 2004; Merck Sharp & Dohme Research Laboratories) [2-(6-fenilpiridin-2-iltio)-N,N-dimetil etanamina], SB-258719 [(R)-3,N-Dimetil-N-(1-metil-3-(4-metilpiperidin-1-il) propil) bencenosulfonamida]. Todos los compuestos se prepararon como soluciones acuosas. AS-19 y MSD-5a se administraron por vía subcutánea (s.c.), mientras que SB-258719 y SB-269970 se administraron a través de la vía intraperitoneal (i.p.). Cuando se coadministraron dos compuestos, uno se inyectó s.c. y el otro i.p.

##### **Cirugía**

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) y la CCI-SN se realizó de acuerdo con el procedimiento de Bennett y Xie (1988). Brevemente, el nervio ciático común se expuso a la altura de la mitad del muslo por disección roma a través del músculo bíceps femoral. Cerca de la trifurcación, se separaron  $\approx 10$  mm de nervio del tejido adherente y se ataron cuatro ligaduras flojas (cátgut crómico 5.0) alrededor del nervio ciático (separadas  $\approx 1$  mm). Para obtener el grado deseado de constricción, se aplicó el criterio formulado por Bennett y Xie (1988): las ligaduras redujeron el diámetro del nervio lo justo para que pudiera observarse y retrasaron, pero no interrumpieron, la circulación epineural. En las ratas control, testigos quirúrgicos, se realizaron disecciones idénticas en el lado derecho, permitiendo liberar el nervio ciático del tejido circundante, pero no se ligaron. Finalmente, el músculo y la piel se cerraron en capas con hilo de seda.

##### **Procedimientos de pruebas nociceptoras**

Se midieron umbrales nociceptores mecánicos, expresados como gramos (g), usando la prueba de Randall-Sellito (analgesímetro Ugo Basile, Bioseb, Chaville, Francia). Se aplicó una presión creciente a la pata posterior con el nervio lesionada de ratas no controladas hasta que se obtuvo la retirada de la pata (PW) y después un chillido (es decir, el umbral de vocalización cuando la pata se mantuvo bajo presión). Como la PW es un reflejo coordinado espinal, mientras que la vocalización es una respuesta integrada supraespinal (Kayser y Christensen, 2000), esta prueba permitió la evaluación de la contribución correspondiente del mecanismo espinal frente al supraespinal.

##### **Referencias**

Bennett GJ, Xie YK. Peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man (Mononeuropatía periférica en ratas que produce trastornos de sensación dolorosa como los observados en seres humanos). Pain 1988; 33: 87-107.

Kayser V, Christensen D. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration (El efecto antinociceptor de la gabapentina sistémica en ratas mononeuropáticas depende de las características de los estímulos y el nivel de integración de las pruebas). Pain. 2000; 88:53-60.

Thomson CG, Beer MS, Curtis NR, Diggle HJ, Handford E, Kulagowski JJ. Thiazoles and thiopyridines: novel series of high affinity h5HT<sub>7</sub> ligands (Tiazoles y tiopiridinas: series novedosas de ligandos 5HT<sub>7</sub> de alta afinidad). Bioorg Med Chem Lett 2004; 14:677-680.

**Procedimiento 5: Lesión por constricción crónica del nervio intraorbital (CCI-ION)****Material y procedimientos****Animales**

- 5 Se alojaron ratas Sprague-Dawley macho adultas (175-200 g a su llegada) en un entorno con temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) con una caja de 12 h de luz/12 h de oscuridad. La comida y el agua estaban disponibles a voluntad. Se dejó que las ratas se habituaran a las instalaciones de alojamiento durante al menos 1 semana antes de la cirugía. En estos estudios se cumplieron las directrices éticas del Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (1983).

**Fármacos**

- 10 Los fármacos utilizados para los tratamientos fueron: AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino) tetralina], MSD-5a (corresponde al compuesto 5a en Thomson y col., 2004; Merck Sharp & Dohme Research Laboratories) [2-(6-fenilpiridin-2-iltio)-N,N-dimetil etanamina], SB-258719 [(R)-3,N-Dimetil-N-(1-metil-3-(4-metilpiperidin-1-il) propil) bencenosulfonamida]. Todos los compuestos se prepararon como soluciones acuosas. AS-19 y MSD-5a se administraron por vía subcutánea (s.c.), mientras que SB-258719 y SB-269970 se administraron a través de la vía intraperitoneal (i.p.). Cuando se coadministraron dos compuestos, uno se inyectó s.c. y el otro i.p.

**Cirugía**

- 20 Tras la anestesia inducida con pentobarbital, la cabeza de la rata se fijó en un marco estereotáctico y se realizó una escisión con bisturí en la línea media, exponiendo el cráneo y el hueso nasal. Después, se expuso la parte infraorbital del nervio infraorbital derecho. El borde de la órbita, formado por los huesos maxilar, frontal, lagrimal y cigomático, se liberó por disección y los contenidos orbitales se desviaron suavemente para dar acceso al nervio infraorbital. Éste se liberó entonces por disección en su punto más rostral en la cavidad orbital, justo caudal al foramen infraorbital. Se ataron dos ligaduras de cántut crómico (5-0) flojas (con una separación de aproximadamente 2 mm) alrededor del nervio (Vos y col., 1994; Kayser y col., 2002). Se tuvo cuidado para evitar cualquier interrupción de la circulación epineural. En ratas testigos quirúrgicos, se expuso el nervio infraorbital derecho, pero no se ligó.

**Procedimientos de pruebas nociceptoras**

- 25 En esta ratas con ligaduras unilaterales en el nervio infraorbital, se evaluó la sensibilidad frente a estimulación mecánica en el territorio vibrilal ipsilateral mediante la determinación del umbral de presión, suministrada a través de filamentos de von Frey (monofilamentos Semmes-Weinstein, Stoelting, Wood Dale, IL, EE. UU.), necesaria para desencadenar una respuesta conductual defensiva (retirada de la cabeza brusca; ataque; reacción de escape). Para cada filamento de estímulo (correspondiente a una presión calibrada de 0,217, 0,445, 0,745, 0,976, 2,35, 4,19, 6,00, 7,37 o 12,5 g), se realizaron tres aplicaciones consecutivas (separadas por 1 s) con el fin de verificar la estabilidad de la respuesta. Se determinaron valores umbral tanto en las ratas con ligaduras en el nervio ciático como en el nervio infraorbital en los dos primeros días antes de la cirugía, después, 14 días más tarde, en el momento en que la capacidad de hiper respuesta frente a estimulaciones mecánica y térmica se había desarrollado completamente (Vos y col., 1994).

**Referencias**

- 40 Kayser V, Aubel B, Hamon M, Bourgoin S. The antimigraine 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain (Los agonistas antimigrañosos del receptor 5-HT<sub>1B/1D</sub> sumatriptán, zolmitriptán y dihidroergotamina atenúan el comportamiento relacionado con el dolor en un modelo de dolor neuropático trigeminal en rata). Br. J. Pharmacol. 2002; 137: 1287-97.
- Thomson CG, Beer MS, Curtis NR, Diggle HJ, Handford E, Kulagowski JJ. Thiazoles and thiopyridines: novel series of high affinity 5HT<sub>7</sub> ligands (Tiazoles y tiopiridinas: series novedosas de ligandos 5HT<sub>7</sub> de alta afinidad). Bioorg Med Chem Lett 2004; 14:677-680.
- 45 Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioural evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to rat's infraorbital nerve (Pruebas conductuales de dolor neuropático trigeminal tras lesión por constricción crónica del nervio infraorbital de ratas). J. Neurosci. 1994; 14: 2708-23.

**Procedimiento 6: Dolor neuropático derivado de neuropatía de tipo diabético inducido por estreptozotocina.****Material y procedimientos****Animales**

- 5 En estos estudios se usaron ratones CD1 macho de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupos de cinco, se les suministró comida y agua a voluntad y se mantuvieron en condiciones de laboratorio controladas con la temperatura mantenida a  $21 \pm 1$  °C y la luz en ciclos de 12 horas (encendido a las 07:00 h y apagado a las 19:00 h). Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de experimentación insonorizada y climatizada.

**Fármacos**

- 10 La estreptozotocina se compró de Tocris (500 mg, ref. 1261) y se administró por vía intraperitoneal (ip) a 200 mg/kg en un volumen de 10 ml/kg. La estreptozotocina se disolvió en solución salina inmediatamente antes de la administración. El fármaco usado para los tratamientos fue AS-19 (Ref. 1968, Tocris; Sanin y col., 2003). La AS-19 se disolvió en solución salina. Las dosis se calcularon basándose en el peso molecular de la base libre y se administraron en un volumen de 10 ml/kg a través de vía subcutánea (i.p).

**Evaluación de la alodinia mecánica: prueba de Frey manual**

- 15 La alodinia mecánica se cuantificó midiendo la respuesta de retirada de la pata trasera frente a la estimulación con filamentos de von Frey, como se indicó previamente (Chaplan y col., 1994). Los filamentos de 0,4 g y 4 g fueron el primero y el último usados, respectivamente. Después, la fuerza del siguiente filamento se redujo cuando el animal respondió o se incremento cuando el animal no respondió. Este procedimiento de subida y bajada se paró cuatro medidas después del primer cambio en la respuesta del animal y se calculó el umbral de respuesta. La retirada clara de la pata, agitándola, se consideró como una respuesta de tipo nociceptor.
- 20

**Protocolo experimental**

- Debido a que el indicador principal de la inducción exitosa de diabetes tipo I usando este modelo animal es el desarrollo de hiperglucemia, es necesario mediar el nivel de glucosa en la circulación sanguínea. La hiperglucemia diabética se define en este estudio como una concentración de glucosa superior a 250 mg/dl sin ayuno. Tras una lectura basal con los pelos de von Frey y un nivel de control de glucosa, se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 200 mg/kg de estreptozotocina preparada en solución salina en la semana 7 tras el nacimiento.
- 25

- Los niveles de glucosa se monitorizaron una semana después del tratamiento con estreptozotocina para confirmar la adquisición de diabetes, se recogieron muestras de sangre a través de la vena maxilar y se estimaron los niveles de glucosa en plasma mediante el procedimiento de diagnóstico con el kit Accu-Chek Sensor Comfort System. Sólo se seleccionaron los animales con niveles de glucosa superiores a 250 mg/dl para medir la alodinia mecánica.
- 30

Las lecturas con los pelos de von Frey se realizaron 30 min después del tratamiento con vehículo, en el día 21, 24 y 29 después de la estreptozotocina y después del tratamiento con AS-19 (1, 5 y 10 mg/kg) en el día 22, 25 y 30 después de la estreptozotocina, respectivamente.

**Referencias**

- 35 Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw (Evaluación cuantitativa de la alodinia táctil en patas de rata). J Neurosci Methods. 1994 Jul;53(1):55-63
- Sanin A, Brisander M, Rosqvist S, Mohell N, Malberg A, Johansson A. 5-Aryl substituted (S)-2-(dimethylamino)-tetralins novel serotonin 5HT7 receptor ligands (Ligandos novedosos del receptor 5HT7 de (S)-2-(dimetilamino) tetralinas 5-aril sustituidas). En: Proceedings of the 14th Camerino-Noord Symposium. Ongoing Progress in the Receptor Chemistry (Procedimientos del 14º simposio Camerino-Noord. Progreso actual en la química de receptores) 2004, p.27.
- 40

**Procedimiento 7: Modelo de dolor inflamatorio por carragenina****Material y procedimientos****Animales**

- 45 En estos estudios se usaron ratones CD1 macho de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupos de cinco, se les suministró comida y agua a voluntad y se mantuvieron en condiciones de laboratorio controladas con la temperatura mantenida a  $21 \pm 1$  °C y la luz en ciclos de 12 horas (encendido a las 07:00 h y apagado a las 19:00 h). Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de experimentación insonorizada y climatizada.

**Fármacos**

- 50 Los fármacos utilizados para los tratamientos fueron: AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino)

tetralina]. La AS-19 se disolvió en DMSO al 1 %. Las dosis se refieren al peso de sal. La AS-19 se administró en un volumen de 5 ml/kg a través de la vía subcutánea (s.c.).

### **Protocolo experimental**

Se inyectaron ratones CD1 macho (Harlan Ibérica, Barcelona) con  $\lambda$ -carragenina (50  $\mu$ l de una solución al 2,5 %) o solución salina (vehículo) en la superficie plantar de la pata posterior derecha. La inyección subplantar de carragenina da como resultado edema en la pata, alodinia e hiperalgesia y representa un modelo animal estándar para identificar compuestos antiinflamatorios y analgésicos. En este estudio, se evaluó el efecto de la AS-19 sobre la alodinia mecánica o la hiperalgesia térmica 3 horas (inflamación aguda) o 4 días (inflamación crónica) después de la inyección subplantar de carragenina. Se determinaron el umbral de retirada o las latencias frente a estímulos mecánicos o térmicos usando la prueba de von Frey automática o la plantar, respectivamente.

### **Evaluación de la alodinia mecánica: prueba de von Frey automática**

La alodinia mecánica se cuantificó midiendo el umbral táctil de retirada de la pata trasera derecha tras la estimulación con filamentos de von Frey. El día de la prueba, los ratones se colocaron en recintos compartimentados en una cámara de ensayo con un suelo delimitado de malla metálica y se dejó que se aclimataran a su entorno durante 1 h antes de realizar las pruebas. El estímulo mecánico se aplicó a la superficie plantar de la pata trasera derecha desde abajo del suelo de malla utilizando un dispositivo de ensayo automatizado (estesiómetro plantar dinámico, Ugo Basile, Italia) que levanta un filamento recto (0,5 mm de diámetro). El filamento ejerció una presión hacia arriba cada vez mayor sobre la superficie plantar. La presión aumentó linealmente con el tiempo (0,1 g/s; de 0 a 5 g en 50 s) hasta que el ratón retiró su pata. Cuando el animal retiró su pata trasera, el estímulo mecánico cesó automáticamente y se registró la fuerza como el umbral mecánico. Así, el umbral mecánico se definió como la presión a la que el sensor detectó la retirada de la pata. Se impuso un umbral de corte de 5 g (50 s). Se midieron las latencias de retirada de la pata por triplicado para cada animal.

### **Evaluación de la hiperalgesia térmica: prueba plantar**

La hiperalgesia térmica se evaluó usando la prueba plantar mediante la determinación de las latencias de retirada frente a un estímulo térmico siguiendo una modificación de la prueba descrita por Hargreaves y col. (1988). El día de la prueba, los ratones fueron colocados en un dispositivo de ensayo (Prueba plantar, Ugo Basile, Italia) y se dejó que se aclimataran a su entorno durante 1 h antes de realizar las pruebas. El dispositivo de la prueba plantar consistía en un cubículo de plástico con un suelo de vidrio a través del cual se aplicó un haz de luz infrarroja móvil sobre la superficie plantar de la pata posterior derecha. Se determinó el tiempo de latencia de retirada de la pata frente al estímulo térmico. La intensidad del haz de luz infrarroja se ajustó para producir latencias de respuesta medias en ratones control no tratados de aproximadamente 8 a 12 segundos. La latencia de respuesta se determinó usando un temporizador conectado con los sensores de movimiento de fotodiodo del dispositivo de la prueba plantar. La latencia de respuesta se definió como el tiempo desde el comienzo de la exposición al haz de luz infrarroja hasta el cese del haz de luz infrarroja cuando el sensor de movimiento de fotodiodo detectó la retirada de la pata del ratón. Las latencias de retirada se midieron por triplicado para cada animal y el valor medio se usó para análisis. Se impuso una latencia de corte de 20 segundos para evitar daño tisular.

### **Referencias**

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia (Un nuevo procedimiento nuevo y sensible para medir la nocicepción térmica en hiperalgesia cutánea). Pain. 1988 Jan;32(1):77-88.

### **Procedimiento 8: Modelo de dolor inflamatorio de formalina**

#### **Animales**

En estos estudios se usaron ratones CD1 macho de 20 a 32 gramos de peso. Los animales se alojaron en grupos de cinco, se les suministró comida y agua a voluntad y se mantuvieron en condiciones de laboratorio controladas con la temperatura mantenida a  $21 \pm 1$  °C y la luz en ciclos de 12 horas (encendido a las 07:00 h y apagado a las 19:00 h). Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de experimentación insonorizada y climatizada.

#### **Fármacos**

Los fármacos utilizados para los tratamientos fueron: AS-19 [(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimetilpirazolin-4-il)-2-(dimetilamino) tetralina]. Las dosis se refieren al peso de sal. La AS-19 se disolvió en goma arábica al 5 %. La AS-19 se administró en un volumen de 10 ml/kg a través de la vía intraperitoneal (i.p).

### **Protocolo experimental**

La formalina (20  $\mu$ l al 5 %) se inyectó s.c. en la superficie plantar de la pata posterior trasera de ratones CD1 macho (Harlan Ibérica, Barcelona) 5 minutos antes de recibir AS-19 o vehículo (goma arábica al 5 %). Los efectos analgésicos de la AS-19 sobre la inhibición del comportamiento frente al dolor (tiempo de lamida) de cada ratón se

observaron durante un periodo de 15 minutos (25-40 min después de la inyección del fármaco, fase II de la prueba de la formalina). Se ha demostrado que el efecto analgésico de la segunda fase de la prueba de la formalina tiene una buena correlación con la eficacia analgésica en el modelo neuropático tanto para ratas como para ratones (Visser y col., 2006).

## 5 **Referencias**

Visser KCP, Geenen F, Biermans R, Meert TF. Pharmacological correlation between the formalin test and the neuropathic pain behavior in different species with chronic constriction injury (Correlación farmacológica entre la prueba de la formalina y el comportamiento de dolor neuropático en diferentes especies con lesión por constricción crónica). *Pharmacol Biochem Behav* (84) 2006: 479-486.

- 10 Los ejemplos y figuras de la siguiente sección que describen ensayos farmacéuticos son meramente ilustrativos y la invención no puede considerarse en modo alguno restringida a estas aplicaciones.

### **Figuras:**

#### **Figura 1) Esquema que resume el protocolo experimental en el ensayo de capsaicina.**

- 15 Los ratones fueron habituados durante 120 min y recibieron tratamiento s.c. con ligandos 5-HT<sub>7</sub> o vehículo 30 min antes de la inyección subplantar de capsaicina o vehículo. Las latencias de retirada de la pata frente a un estímulo mecánico (estimulación de von Frey) se determinaron 15 min después de la inyección subplantar de capsaicina o vehículo. Para ensayar el posible efecto antialodínico de los fármacos, se indujeron respuestas alodínicas rápidas inyectando 1 µg de capsaicina seguido de estimulación con 1 g de presión. En contraste, para detectar posibles efectos antialodínicos de los fármacos, se usaron una dosis baja ineficaz de 4 ng de capsaicina y una presión mecánica baja inferior al umbral de 0,25 g.

#### **Figura 2) Efecto de la inyección subplantar de capsaicina en la latencia de retirada de la pata frente a estimulación mecánica: alodinia mecánica**

- 25 La Figura 2 se refiere al ejemplo 2a). Los ratones que recibieron una inyección subplantar de 1 µg de capsaicina desarrollaron alodinia mecánica, como quedó patente por sus latencias de retirada de la pata frente a estimulación con un filamento de 1 gramo de presión significativamente reducidas al compararlas con las de ratones con inyección subplantar de vehículo (DMSO al 1 %). Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*\* p<0,001 frente a vehículo.

#### **Figura 3) Efecto de respuesta a dosis de AS-19 sobre la alodinia mecánica inducida por capsaicina**

- 30 La Figura 3 se refiere al Ejemplo 2b). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1 µg de capsaicina fue inhibida de forma dependiente de dosis tratando ratones con AS-19. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*\* p<0,001 frente a vehículo.

#### **Figura 4) Efecto de respuesta a dosis de MSD-5a sobre la alodinia mecánica inducida por capsaicina**

- 35 La Figura 4 se refiere al Ejemplo 2b). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1 µg de capsaicina fue inhibida tratando los ratones con MSD-5a. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 frente a vehículo.

#### **Figura 5) Efecto de respuesta a dosis de SB-258719 sobre la alodinia mecánica inducida por capsaicina**

- 40 La Figura 5 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1 µg de capsaicina no se vio afectada por el tratamiento de ratones con SB-258719 a 2,5, 5 y 10 mg/kg. Por el contrario, el tratamiento con SB-258719 a 20 mg/kg incrementó significativamente las latencias de retirada de la pata respecto de los ratones tratados con vehículo. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*\* p<0,001 frente a vehículo.

#### **Figura 6) Reversión dependiente de dosis del efecto antialodínico de AS-19 con SB-258719 en el ensayo de capsaicina**

- 45 La Figura 6 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1 µg de capsaicina no se vio afectada por el tratamiento de los ratones con SB-258719 a 2,5 y 5 mg/kg, pero estas dosis de SB-258719 fueron capaces de revertir el efecto antialodínico de 5 mg/kg de AS-19. Además de la gráfica resumiendo los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\* p<0,01 frente a vehículo; # p<0,05 frente a AS-19 (5).

#### **Figura 7) Reversión del efecto antialodínico de AS-19 con SB-269970 en el ensayo de capsaicina**

- 50 La Figura 7 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1 µg de capsaicina no se vio afectada por el antagonista de 5-HT<sub>7</sub> SB-269970 (10 mg/kg), pero al coadministrarlo con

AS-19 (5 mg/kg) bloqueó el efecto antialodínico del agonista. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*  $p < 0,01$  frente a vehículo; #  $p < 0,001$  frente a AS-19 (5).

**Figura 8) Reversión del efecto antialodínico de MSD-5a con SB-258719 en el ensayo de capsaicina**

5 La Figura 8 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1  $\mu$ g de capsaicina fue inhibida con MSD-5a (10 mg/kg) y SB-258719 (5 mg/kg) bloqueó este efecto antialodínico. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*\*  $p < 0,001$  frente a vehículo; ###  $p < 0,001$  frente a MSD-5a (10).

**Figura 9) Efecto de respuesta a dosis de WAY-100535 sobre la alodinia mecánica inducida por capsaicina**

10 La Figura 9 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1  $\mu$ g de capsaicina no se vio afectada por el tratamiento de los ratones con WAY-100635 a 0,1 y 0,3 mg/kg, pero no a 0,5 y 1 mg/kg, dosis a las cuales se observó un incremento significativo de la latencia de retirada de la pata. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*  $p < 0,05$  frente a vehículo.

**Figura 10) Reversión del efecto antialodínico de F-13640 con WAY-100635 en el ensayo de capsaicina**

15 La Figura 10 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1  $\mu$ g de capsaicina fue inhibida con F-13640 (1 mg/kg) y WAY-100635 (0,3 mg/kg) bloqueó este efecto antialodínico. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*  $p < 0,01$  frente a vehículo; ###  $p < 0,001$  frente a F-13640 (1).

**Figura 11) Reversión del efecto antialodínico de AS-19 con SB-258719 o WAY-100635 en el ensayo de capsaicina**

20 La Figura 11 se refiere al Ejemplo 2c). La alodinia mecánica en ratones que recibieron una inyección subplantar de 1  $\mu$ g de capsaicina no se vio afectada tras el tratamiento con SB-258719 (5 mg/kg) o WAY-100635 (0,3 mg/kg). Sin embargo, SB-258719 pero no WAY-100635 inhibieron significativamente el efecto antialodínico de AS-19. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  frente a vehículo; #  $p < 0,01$  frente a AS-19 (10).

**Figura 12) Potenciación de la alodinia mecánica inducida por capsaicina por SB-258719 y SB-269970.**

30 La Figura 12 se refiere al Ejemplo 2d). En ausencia de capsaicina o cuando se inyectó una dosis mínima de 4 ng en la pata, los ratones no mostraron alodinia cuando fueron estimulados mecánicamente con una presión baja hacia arriba de 0,25 g. Sin embargo, la alodinia se hizo evidente en ratones que recibieron 4 ng de capsaicina cuando fueron tratados con los antagonistas de 5-HT<sub>7</sub> SB-258719 y SB-269970 a 10 mg/kg, mostrando un efecto proalodínico de los antagonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub>.

Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*\*  $p < 0,001$  frente a "sin capsaicina".

**Figura 13) Potenciación dependiente de dosis de la alodinia mecánica inducida por capsaicina por SB-258719**

35 La Figura 13 se refiere al Ejemplo 2d). SB-258719 promovió de forma dependiente de dosis la alodinia en ratones con inyecciones subplantares de una dosis menor de 4 ng y estimulados mecánicamente con una presión baja hacia arriba de 0,25 g. Además de la gráfica que resume los resultados, la figura muestra el esquema del protocolo experimental. \*\*\*  $p < 0,001$  frente a vehículo.

**Figura 14) Reversión dependiente de dosis del efecto proalodínico de SB-269970 y SB-269970 por AS-19 en el ensayo de capsaicina**

40 La Figura 14 se refiere al Ejemplo 2d). El tratamiento subcutáneo con AS-19 no tuvo efecto en afecciones no alodínicas tras la inyección subplantar de 4 ng de capsaicina y estimulación por presión baja (0,25 g), pero fue capaz de revertir el efecto proalodínico de SB-258719 o SB-269970 (5 mg/kg, s.c.). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a vehículo; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  frente a SB-258719 (5); &&  $p < 0,01$  frente a SB-269970 (5).

**Figura 15). Esquema que resume el protocolo experimental de la ligadura parcial del nervio ciático: diseño de cuadrado latino.**

50 Los ratones fueron habituados durante 4 días y se obtuvieron los valores basales anteriores a la lesión durante los siguientes 2 días consecutivos mediante las pruebas de von Frey automática o plantar. Al día siguiente se sometió a los ratones a cirugía y 5 días después se obtuvieron los valores basales posteriores a la lesión en las pruebas mencionadas. En el día 10 tras la lesión, los ratones recibieron vehículo y se realizaron medidas para obtener los valores basales anteriores al tratamiento. Las medidas en ratones tratados con fármaco se realizaron en los días 11-

13 tras la lesión siguiendo un diseño de cuadrado latino. Finalmente, se obtuvieron valores basales posteriores al tratamiento en el día 14. La habituación de los ratones durante los primeros 4 días y cada vez antes de las medidas duró 1 h. Cuando se los trató, las medidas se realizaron siempre 30 min después de la administración de vehículo o el compuesto ensayado.

5 **Figura 16). Esquema que resume el protocolo experimental de la ligadura parcial del nervio ciático: diseño de dosis única.**

Los ratones fueron habituados durante 1-2 días y se obtuvieron los valores basales anteriores a la lesión durante los siguientes 2 días consecutivos mediante las pruebas de von Frey automática o plantar. Al día siguiente se sometió a los ratones a cirugía y 5 días después se obtuvieron los valores basales posteriores a la lesión en las pruebas mencionadas. En el día 10 tras la lesión, los ratones recibieron vehículo y se realizaron medidas para obtener los valores basales anteriores al tratamiento. Las medidas en los ratones tratados con fármaco se realizaron en el día 11 tras la lesión. La habituación de los ratones durante los primeros 1-2 días y cada vez antes de las medidas duró 2 h. Cuando se los trató, las pruebas de von Frey manual y plantar se realizaron 30 y 45 min, respectivamente, después de la administración del vehículo o el compuesto ensayado.

15 **Figura 17) Efecto de respuesta a dosis de AS-19 sobre la alodinia mecánica inducida por ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 17 se refiere al ejemplo 3a). El umbral de presión para provocar la retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estimulación con filamentos de von Frey se evaluó en ratones con lesión nerviosa (A) y testigos quirúrgicos (B) antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en los días 11-13 después del tratamiento con diferentes dosis de AS-19 y, finalmente, en el día 14 después de la lesión tras el tratamiento con vehículo (posterior al tratamiento). Obsérvese que la alodinia mecánica se desarrolla tras la ligadura parcial del nervio ciático (pero no en los testigos quirúrgicos) y que la AS-19 a dosis de 1-10 mg/kg ejerció efectos antialodínicos. \*\*\*  $p < 0,001$  frente a antes de la lesión; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  frente a antes y después del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

25 **Figura 18) Efecto de respuesta a dosis de AS-19 sobre la hiperalgesia térmica inducida por ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 18 se refiere al ejemplo 3b). La latencia de retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estímulo térmico se evaluó en ratones con lesión nerviosa (A) y testigos quirúrgicos (B) antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después del tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en los días 11-13 después de la lesión, tras el tratamiento con diferentes dosis de AS-19 y, finalmente, en el día 14 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (posterior al tratamiento). Obsérvese que la hiperalgesia térmica se desarrolla tras la ligadura parcial del nervio ciático (pero no en los testigos quirúrgicos) y que AS-19 a dosis de 1 y 10 mg/kg ejerció efectos antihiperálgicos. \*\*\*  $p < 0,01$  frente a antes de la lesión; #  $p < 0,05$  frente a antes y después del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

35 **Figura 19) Efecto de respuesta a dosis de MSD-5a sobre la alodinia mecánica inducida por ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 19 se refiere al ejemplo 3a). El umbral de presión para provocar la retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estimulación con filamentos de von Frey se evaluó en ratones con lesión nerviosa (A) y testigos quirúrgicos (B) antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en los días 11-13 después de la lesión, tras el tratamiento con diferentes dosis de MSD-5a y, finalmente, en el día 14 después de la lesión tras el tratamiento con vehículo (posterior al tratamiento). Obsérvese que la alodinia mecánica se desarrolla tras la ligadura parcial del nervio ciático (pero no en los testigos quirúrgicos) y que la MSD-5a a dosis de 1-3 mg/kg ejerció efectos antialodínicos. \*  $p < 0,05$ . \*\*\*  $p < 0,001$  frente a antes de la lesión; ###  $p < 0,001$  frente a antes del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

45 **Figura 20) Efecto de respuesta a dosis de la MSD-5a sobre la hiperalgesia térmica inducida por ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 20 se refiere al ejemplo 3b). La latencia de la retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estímulo térmico se evaluó en ratones con lesión nerviosa (A) y testigos quirúrgicos (B) antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en los días 11-13 después de la lesión, tras el tratamiento con diferentes dosis de MSD-5a y, finalmente, en el día 14 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (posterior al tratamiento). Obsérvese que la hiperalgesia térmica se desarrolla tras la ligadura parcial del nervio ciático (pero no en los testigos quirúrgicos) y que la MSD-5a a dosis de 1-3 mg/kg ejerció efectos antihiperálgicos. \*  $p < 0,01$  frente a antes de la lesión; ###  $p < 0,01$  ####  $p < 0,001$  frente a antes y después del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

55 **Figura 21) Efecto proalodínico de respuesta a dosis de SB-258719 sobre la alodinia mecánica inducida por ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 21 se refiere al ejemplo 3a). El umbral de presión para provocar la retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estimulación con filamentos de von Frey se evaluó en ratones con lesión nerviosa (A) y testigos quirúrgicos (B) antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en los días 11-13 después de la lesión, tras el tratamiento con diferentes dosis de SB-258719 y, finalmente, en el día 14 después de la lesión tras el tratamiento con vehículo (posterior al tratamiento). Obsérvese que la alodinia mecánica se desarrolla tras la ligadura parcial del nervio ciático (pero no en los testigos quirúrgicos) y que SB-258719 a dosis de 10 mg/kg ejerció efectos proalodínicos en ratones neuropáticos, pero también en testigos quirúrgicos. \*p <0,05, \*\*\* p<0,001 frente a antes de la lesión; #p<0,05 frente a antes del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

**Figura 22) Efecto nulo de SB-258719 sobre la hiperalgesia térmica inducida por ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 22 se refiere al ejemplo 3b). La latencia de retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estímulo térmico se evaluó en ratones con lesión nerviosa (A) y testigos quirúrgicos (B) antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en los días 11-13 después de la lesión, tras el tratamiento con diferentes dosis de SB-258719 y, finalmente, en el día 14 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (posterior al tratamiento). Obsérvese que la hiperalgesia térmica se desarrolla tras la ligadura parcial del nervio ciático (pero no en los testigos quirúrgicos) y que SB-258719 a dosis de 0,1-10 mg/kg no ejerció ningún efecto. \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 frente a antes de la lesión (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

**Figura 23) Reversión de los efectos de AS-19 y MSD-5a por SB-258719 sobre la alodinia mecánica inducida por la ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 23 se refiere al ejemplo 3a). El umbral de presión para provocar la retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estimulación por filamentos de von Frey se evaluó en ratones con lesión nerviosa antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en el día 11 después de la lesión tras el tratamiento con un agonista, un antagonista o una combinación de ambos. Obsérvese que SB-258719 (5 mg/kg) bloqueó los efectos antialodínicos ejercidos por AS-19 (5 mg/kg) y MSD-5a (10 mg/kg) en ratones con lesión nerviosa. \*\*\* p<0,001 frente a antes de la lesión; ### p<0,001 frente a antes del tratamiento; && p<0,01 frente a MSD-5a (10); &&& p<0,001 frente a AS-19 (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

**Figura 24) Reversión de los efectos de AS-19 y MSD-5a por SB-258719 sobre la hiperalgesia térmica inducida por la ligadura parcial del nervio ciático.**

La Figura 24 se refiere al ejemplo 3b). La latencia de retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estímulo térmico se evaluó en ratones con lesión nerviosa antes de la cirugía (antes de la lesión), en el día 10 después de la lesión, tras el tratamiento con vehículo (antes del tratamiento), en el día 11 después de la lesión tras el tratamiento con un agonista, un antagonista o una combinación de ambos. Obsérvese que SB-258719 (5 mg/kg) bloqueó significativamente los efectos antihiperálgicos ejercidos por AS-19 (5 mg/kg) y mostró una tendencia a revertir MSD-5a (10 mg/kg) sin significancia en ratones con lesión nerviosa. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 frente a antes de la lesión; # p<0,05, ## p<0,01 frente a antes del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA); & p<0,05 frente a AS-19 (5) (prueba de la t de student no pareada).

**Figura 25) Efectos antihiperálgico/antialodínico de la estimulación del receptor 5-HT<sub>7</sub> por AS-19 en ratas con el nervio ciático ligado**

**Figura 26) Efectos antihiperálgico/antialodínico de la estimulación del receptor 5-HT<sub>7</sub> por MSD5a en ratas con el nervio ciático ligado**

**Figura 27) Bloqueo por SB-269970 de antihiperálgico/antialodinia inducida por AS-19 en ratas con el nervio ciático ligado.**

**Figura 28) Bloqueo por SB-258719 de hiperalgesia/antialodinia inducida por MSD5a en ratas con el nervio ciático ligado.**

**Figura 29) Efectos antihiperálgico/antialodínico de la estimulación del receptor 5-HT<sub>7</sub> por AS-19 en ratas con el nervio infraorbital ligado**

**Figura 30) Efectos antihiperálgico/antialodínico de la estimulación del receptor 5-HT<sub>7</sub> por MSD-5a en ratas con el nervio infraorbital ligado**

**Figura 31) Bloqueo por SB269970 de hiperalgesia/antialodinia inducida por AS-19 en ratas con el nervio infraorbital ligado.**

**Figura 32) Bloqueo por SB269970 de hiperalgesia/antialodinia inducida por MSD-5a en ratas con el nervio infraorbital ligado.****Figura 33) Efecto de respuesta a dosis de AS-19 sobre alodinia mecánica en dolor neuropático derivado de neuropatía de tipo diabético inducida por estreptozotocina.**

- 5 El umbral de presión para provocar la retirada de la pata posterior ipsilateral frente a estimulación con filamentos de von Frey fue evaluada en ratones diabéticos antes del tratamiento con estreptozotocina (basal), en el día 21, 24 y 29 después de la estreptozotocina, tras el tratamiento con vehículo, en el día 22, 25 y 30 después de la estreptozotocina, tras el tratamiento con AS-19 (1, 5 y 10 mg/kg), un agonista de 5-HT<sub>7</sub>. AS-19 a 10 mg/kg ejerció un claro efecto antialodínico en ratones diabéticos. \*\* p<0,001 frente a basal (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA); ### p<0,01 frente a vehículo (prueba de la t de student pareada).

**Figura 34) Efecto del tratamiento con AS-19 sobre la alodinia mecánica inducida por carragenina (inflamación aguda, 3 horas)**

- 15 Tres horas después de la inyección de carragenina, se observó la alodinia mecánica en la pata ipsilateral (derecha) afectada al compararla con la pata contralateral de control (izquierda). La administración de A-19 (10 mg/kg, s.c.) produce un significativo efecto antialodínico. Los datos son la media ± EEM de 10 ratones por grupo. \* p<0,05, \*\*\* p<0,001 frente a pata contralateral del grupo tratado con vehículo; #### p<0,001 frente a pata ipsilateral del grupo tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

**Figura 35) Efecto del tratamiento con AS-19 sobre la hiperalgesia térmica inducida por carragenina (inflamación crónica, 4 días)**

- 20 Cuatro días después de la inyección de carragenina, la hiperalgesia térmica era evidente en la pata ipsilateral afectada de los ratones tratados con vehículo. El tratamiento con AS-19 (10 mg/kg, s.c.) suprimió la hiperalgesia térmica. Los datos son la media ± EEM de 10 ratones por grupo. \*\* p<0,01 frente a pata contralateral del grupo tratado con vehículo; ## p<0,01 frente a pata ipsilateral de grupos tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

**Figura 36) Efecto del tratamiento con AS-19 sobre el dolor inflamatorio inducido por formalina**

- 25 La inyección de formalina induce dolor inflamatorio como demuestra el incremento del tiempo de lamida en el grupo tratado con vehículo. El tratamiento con AS-19 (5 mg/kg, i.p.) reduce la duración del tiempo de lamida inducido por formalina. Los datos son la media ± EEM de 8 ratones por grupo. \*\*\* p<0,001 frente a grupo tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls posterior a ANOVA).

**Ejemplos:****Ejemplo 1: Unión y funcionalidad****Selectividad y funcionalidad de los fármacos**

- 35 Existe una necesidad destacable de ligandos 5-HT<sub>7</sub>, concretamente agonistas. Esto ha obstaculizado los estudios farmacológicos que exploran el papel desempeñado por este receptor. En este estudio, se presentan pruebas farmacológicas para demostrar la implicación del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el control de comportamientos nociceptores. La información sobre la selectividad de las herramientas farmacológicas usadas es, por tanto, un asunto clave y se ha recopilado en esta sección. AS-19 es un agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> (K<sub>i</sub> = 0,605 nM, Emáx = 77,0±2,3 %, CE50 = 8,87±0,57 nM). Desafortunadamente, como señalan Pérez-García y Meneses (2005), hay una carencia de información en la bibliografía con respecto a su afinidad por los receptores distintos de 5-HT<sub>7</sub>. Por ello, se evaluó la
- 40 afinidad de AS-19 por un total de 70 receptores, transportadores o canales iónicos en un paquete de análisis comercial (MDS Pharma Services) y se presentó el perfil de unión en la Tabla 1. AS-19 no sólo tiene una afinidad alta por los receptores 5-HT<sub>7</sub> sino que también tiene una afinidad significativa por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (K<sub>i</sub> = 89,7 nM), y 5-HT<sub>5A</sub> (K<sub>i</sub> = 98,5 nM), no mostrando afinidad significativa por otros subtipos de receptores de 5-HT u otros receptores, transportadores o canales iónicos incluidos en el paquete de análisis.

- 45 MSD-5a es también un agonista de 5-HT<sub>7</sub> (K<sub>i</sub> = 0,6 nM, Emáx = 60,8±1,9 %, CE50 = 6,82±1,45 nM), pero su selectividad frente a 5-HT<sub>1A</sub> (K<sub>i</sub> = 16 nM) no es tan alta como en el caso de AS-19 (Tabla 1). Además, tiene actividad agonista parcial, dando un 80 % de la respuesta del agonista total 5-CT en receptores 5-HT<sub>7</sub> (Thomson y col., 2004).

- 50 SB-258719 se identificó como el primer antagonista selectivo de 5-HT<sub>7</sub>, con una selectividad 100 veces mayor con respecto a una selección de otros receptores (Forbes y col., 1998). SB-269970 también se identificó como un antagonista potente y selectivo del receptor 5-HT<sub>7</sub> (Lovell y col., 2000). Especialmente digna de mención es la carencia de afinidad por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> de ambos antagonistas de 5-HT<sub>7</sub> usados en este estudio (Forbes y col., 1998; Lovell y col., 2000). en cuanto a la funcionalidad, SB-258719 y SB-269970 se han descrito como un antagonista puro y un agonista inverso, respectivamente (Mahé y col., 2004). Aun así, ambos antagonistas de 5-HT<sub>7</sub> deberían considerarse agonistas inversos, ya que se ha demostrado actividad intrínseca negativa para estos

compuestos (Romero y col., 2006).

Las dosis escogidas en nuestros experimentos de agonista o antagonistas ya han sido ensayadas en otros experimentos in vivo como ensayos sensibles a la formación de memoria, estados psicóticos y de ansiedad potenciales o fármacos antidepresivos (Pérez-García y col., 2005; Guscott y col., 2005). El conocimiento de estos compuestos nos ha ayudado a escoger el mejor intervalo de dosis para estudiar con el fin de evitar la aparición de efectos secundarios.

Tabla 1. Perfiles de afinidad del receptor en ensayos de unión de radioligando

| Receptor                        | Afinidad [(K <sub>i</sub> (nM))] |        |           |           |
|---------------------------------|----------------------------------|--------|-----------|-----------|
|                                 | AS-19                            | MSD-5a | SB-258719 | SB-269970 |
| h5-HT <sub>1A</sub>             | 89,7                             | 16     | n.s.      | n.s.      |
| h5-HT <sub>1B</sub>             | -                                | --     | n.s.      | 1000      |
| h5-HT <sub>1D</sub>             | --                               | --     | n.s.      | n.s.      |
| h5-HT <sub>1E</sub>             | --                               | --     | n.s.      | n.s.      |
| H5-HT <sub>1F</sub>             | --                               | --     | n.s.      | n.s.      |
| r5-HT <sub>1</sub> no selectivo | 48,1                             | -      | --        | --        |
| h5-HT <sub>2A</sub>             | --                               | 320    | n.s.      | n.s.      |
| h5-HT <sub>2B</sub>             | n.s.                             | --     | n.s.      | n.s.      |
| h5-HT <sub>2C</sub>             | n.s.                             | --     | n.s.      | n.s.      |
| r5-HT <sub>2</sub> no selectivo | n.s.                             | -      | --        | -         |
| h5-HT <sub>3</sub>              | n.s.                             | --     | --        | --        |
| h5-HT <sub>4</sub>              | --                               | -      | n.s.      | n.s.      |
| gp5-HT <sub>4</sub>             | n.s.                             | --     | --        | -         |
| h5-HT <sub>5A</sub>             | 98,5                             | --     | --        | 63        |
| h5-HT <sub>6</sub>              | n,s,                             | -      | n,s,      | n,s,      |
| h5-HT <sub>7</sub>              | 0,6                              | 0,6    | 31,6      | 1,25      |

n.s. no significativo (K<sub>i</sub> > 1 µM o % de inhibición a 1 µM inferior al 50 %); -- datos no disponibles.

h, humano; gp, conejillo de indias; m, ratón; r, rata; rb, conejo. Datos MDS Pharma Services, Cerep, Thomson y col. (2004).

Tabla 2. Perfiles de funcionalidad

| Compuesto | Emáx (%)   | CE50 (nM)   | pCE50       |
|-----------|------------|-------------|-------------|
| 5-HT      | 100,0      | 11,4±0,58   | 7,89± 0,02  |
| MSD-5a    | 60,8 ± 1,9 | 6,82 ± 1,45 | 8,21 ± 0,13 |
| AS-19     | 77,0±2,3   | 8,87±0,57   | 8,06±0,03   |

Los valores de Emáx y CE50 mostrados en la tabla se obtuvieron a partir de curvas de concentración-respuesta mediada por AMPc.

Los datos corresponden a valores de media ± EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

## Ejemplo 2: Ensayo de capsaicina:

### a) Sensibilización con capsaicina.

la sensibilización con capsaicina produce alodinia mecánica. Los ratones inyectados con capsaicina (1 µg) en la mitad de la superficie plantar de la pata posterior derecha desarrollaron alodinia mecánica 15 min después de la inyección. La presión ejercida por el filamento (1 g) estaba por debajo del umbral de sensibilidad de las patas de los ratones control (las latencias de retirada control de ratones inyectados con DMSO al 1 % fueron próximas al corte de 60 s). Aun así, 15 min después de la inyección subplantar de capsaicina, la misma presión "inocua", "no nociva" (1 g) fue percibida como dolorosa y la latencia de retirada se redujo drásticamente (Fig. 2). Esta sensibilidad al dolor anormal frente a estímulos mecánicos no dolorosos anteriormente se conoce como alodinia mecánica y en nuestro

modelo es consecuencia de la sensibilización con capsaicina.

**b) Los agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> inhiben dependiendo de la dosis la alodinia mecánica inducida por capsaicina**

La administración sistémica subcutánea del agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> AS-19 inhibió dependiendo de la dosis la alodinia mecánica inducida por capsaicina (Fig. 3). Se observaron latencias de retirada de la pata incrementadas significativamente en ratones tratados con AS-19 a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg al compararlas con ratones tratados con vehículo. El efecto antialodínico alcanzó el máximo a la dosis de 10 mg/kg.

De forma similar a AS-19, MSD-5a, otro agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> usado en este estudio, ejerció efectos antialodínicos (Fig. 4). A dosis de 3, 10 y 30 mg/kg, la administración de MSD-5a a ratones que recibieron capsaicina incrementó las latencias de las respuestas de retirada de la pata nociceptoras frente a estimulación mecánica en comparación con los ratones tratados con vehículo. Las diferencias fueron significativas ( $p > 0,05$ ) a las tres dosis ensayadas y alcanzaron el máximo a 10 mg/kg.

**c) Reversión del efecto antialodínico de los agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> por antagonistas selectivos del receptor 5-HT<sub>1</sub>**

Con el fin de confirmar que la activación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> es responsable de forma inequívoca de la inhibición de la alodinia mecánica inducida por capsaicina ejercida por AS-19 y MSD-5a, usamos dos antagonistas diferentes del receptor 5-HT<sub>7</sub> (SB-258719 y SB-269970) para intentar revertir farmacológicamente el efecto antialodínico de los agonistas. En primer lugar, realizamos un estudio de respuesta a dosis del efecto de SB-258719 por sí mismo sobre la alodinia mecánica inducida por capsaicina (Fig. 5). Se inyectó SB-258719 a dosis de 2,5, 5, 10 y 20 mg/kg y no se observaron efectos, excepto a la dosis más alta, a la que se hizo evidente un efecto antialodínico.

En el siguiente experimento, se escogieron dosis bajas de SB-258719 que no tenían efectos antialodínicos para intentar revertir el efecto antialodínico ejercido por 5 mg/kg de AS-19. Como se muestra en la Fig. 6, SB-258719 a 2,5 y 5 mg/kg no tuvo ningún efecto, mientras que el tratamiento con AS-19 (5 mg/kg) incrementó las latencias de retirada de la pata. Curiosamente, el efecto analgésico (antialodínico) de AS-19 era inhibido dependiendo de la dosis al coadministrarse con SB-258719.

La reversión farmacológica del efecto antialodínico de AS-19 también se llevó a cabo de forma exitosa usando otro antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub>, SB-269970, a una dosis (10 mg/kg) que por sí misma no modificaba las latencias de retirada de la pata tras la inyección subplantar de capsaicina (Fig. 7). Finalmente, también bloqueamos el efecto antialodínico producido por el otro agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub>, MSD-5a (10 mg/kg), usando el antagonista SB-258719 (5 mg/kg) (Fig. 8). En resumen, los datos anteriores usando dos agonistas diferentes del receptor 5-HT<sub>7</sub> y la confirmación mediante reversión farmacológica con dos antagonistas diferentes del receptor 5-HT<sub>7</sub>, sugieren claramente que la activación de receptores 5-HT<sub>7</sub> ejerce un efecto antialodínico tras la sensibilización con capsaicina. Como AS-19 tiene cierta afinidad por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> además de unirse a los receptores 5-HT<sub>7</sub> (véase la Tabla 1), y como se sabe que los agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> ejercen efectos analgésicos en diversidad de modelos animales (Colpaert, 2006), después evaluamos la posibilidad de que las acciones de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> pudieran contribuir también a los efectos antialodínicos de AS-19. Para llevar esto a caso, se administró AS-19 junto con el antagonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub> WAY-100635 (Foster y col., 1995; Khawaja y col., 1995) a 0,3 mg/kg, una dosis que no tuvo efecto sobre la alodinia mecánica inducida por capsaicina (Fig. 9) pero que bloqueó en gran medida el efecto del agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub> F-13640 (Colpaert y col., 2002) (Fig. 10). Análogamente, se ha demostrado que esta dosis bloquea los efectos mediados por 5-HT<sub>1A</sub> inducidos por 8-OH-DPAT (DI50 = 0,01 mg/kg) (Foster y co., 1995) y otros agonistas de 5-HT<sub>1A</sub> (Reissig y col., 2005; You y col., 2005). Curiosamente, el efecto antialodínico de AS-19 a 5 y 10 mg/kg no se vio afectado en presencia de WAY-100635, pero fue suprimido por SB-258719 (Fig. 11), indicando que la activación de los receptores 5-HT<sub>7</sub>, pero no de los 5-HT<sub>1A</sub>, subyace al efecto antialodínico ejercido por AS-19.

**d) Los agonistas selectivos del receptor 5-HT<sub>7</sub> ejercen efectos proalodínicos**

La activación de receptores 5-HT<sub>7</sub> por agonistas selectivos tiene un efecto antialodínico en ratones sensibilizados con capsaicina, pero ¿ejercen los antagonistas selectivos del receptor 5-HT<sub>7</sub> un efecto proalodínico? Para investigar esta posibilidad redujimos tanto la dosis de capsaicina (de 1 µg a 4 ng) como la presión hacia arriba ejercida por el filamento (de 1 g a 0,25 g). Bajo estas condiciones, los ratones no mostraron alodinia mecánica. Aun así, cuando se los trató con SB-258719 o SB-269970, los ratones que recibieron esta cantidad mínima de capsaicina (4 ng) y fueron sometidos a esta estimulación con presión baja (0,25 g) mostraron una alodinia marcada (Fig. 12). Curiosamente, el efecto proalodínico de los antagonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> se observó en ratones inyectados con 4 ng de capsaicina pero no en ratones inyectados con vehículo (DMSO al 1 %), sugiriendo la necesidad de una exposición sensibilizadora mínima para que los antagonistas ejerzan su efecto.

El efecto proalodínico de SB-258719 era dependiente de dosis (Fig. 13) y fue inhibido por AS-19 dependiendo de la dosis (Fig. 14). La promoción de la alodinia por el otro antagonista, SB-269970, también fue inhibida por AS-19 (Fig. 14), señalando la implicación de los receptores 5-HT<sub>7</sub> en un efecto de ese tipo.

## Conclusiones

Los receptores 5-HT<sub>7</sub> desempeñan un papel clave en el control de la alodinia mecánica desencadenada por sensibilización con capsaicina:

- **La activación de receptores 5HT<sub>7</sub> por agonistas selectivos inhibe dependiendo de la dosis la alodinia mecánica inducida por capsaicina.**

El efecto antialodínico se evidenció usando dos agonistas selectivos diferentes del receptor 5HT<sub>7</sub> (AS-19 y MSD-5a). AS-19 y MSD-5a bloquearon esta manifestación conductual de dolor y restablecieron la respuesta nociceptora de ratones sensibilizados con capsaicina a valores basales encontrados en ratones control no afectados.

- **En contraste, el bloqueo de receptores 5HT<sub>7</sub> por antagonistas selectivos produce un efecto proalodínico dependiente de dosis.**

El efecto proalodínico se evidenció usando dos antagonistas selectivos diferentes del receptor 5HT<sub>7</sub> (SB-258719 y SB-269970).

- **Los efectos antialodínicos y proalodínicos de los antagonistas pueden revertirse por antagonistas y agonistas, respectivamente.**

Los efectos analgésicos (antialodínicos) tanto de AS-19 como de MSD-5a fueron inhibidos usando dos antagonistas selectivos diferentes del receptor 5HT<sub>7</sub> (SB-258719 y SB-269970). Del mismo modo, la promoción de la alodinia por los antagonistas SB-258719 y SB-269970 fue bloqueada por el agonista AS-19.

Estos resultados revelan la implicación del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el control del dolor en afecciones que implican sensibilización central y apuntan a un nuevo uso terapéutico potencial de los agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> como analgésicos, especialmente en dolor neuropático.

### Ejemplo 3: Ligadura parcial del nervio ciático

El dolor neuropático se refiere a dolor como resultado del daño (debido a lesión o enfermedad) del sistema nervioso, incluyendo nervios, médula espinal y algunas zonas del SNC (Woolf y Mannion, 1999; Zimmermann, 2001). Los pacientes con dolor neuropático sufren frecuentemente dolor espontáneo, alodinia (respuesta dolorosa a estímulos normalmente inocuos) e hiperalgesia (dolor exagerado provocado por estímulos nocivos). La evaluación directa del dolor espontáneo en animales no es posible, aunque se han sugerido algunos signos tales como acicalamiento excesivo, cambios en el comportamiento exploratorio o ganancia de peso como indicadores del dolor espontáneo. En contraste, el dolor provocado (alodinia e hiperalgesia) por estímulos térmicos o mecánicos puede observarse claramente en la mayoría de modelos animales de dolor neuropático. Desde el punto de vista mecanístico, los comportamientos asociados con dolor neuropático, alodinia e hiperalgesia giran en torno a la idea de sensibilización central, en la que descargas aferentes incrementadas y persistentes provocadas por la lesión hacen que las neuronas de la médula espinal reduzcan su umbral de estimulación para expandir sus campos receptivos y para incrementar su capacidad de respuesta a diferentes estímulos periféricos (Woolf, 1983; Hylden y col., 1989; Woolf y Thompson 1991;Coderre y Katz, 1997).

La mayoría de los modelos de dolor neuropático se hacen produciendo enfermedades o provocando lesiones en nervios periféricos. Estos procedimientos para inducir dolor neuropático difieren en la localización y el tipo de lesión nerviosa periférica. Éstas incluyen transección, ligadura floja o ajustada, aplastamiento, inflamación perineural, invasión tumoral, infección y afectación tóxica (Wang y Wang, 2003). En un intento de simular causalgia como resultado de la lesión parcial de nervios en seres humanos, Seltzer y col. (1990) desarrolló un modelo de dolor neuropático que implica la ligadura de desde 1/3 hasta 1/2 del grosor del nervio ciático. Las ratas con ligadura parcial del nervio ciático muestran una alodinia marcada frente a la estimulación con pelos de von Frey e hiperalgesia frente a estímulos nocivos tanto térmicos como mecánicos en la pata con el nervio ligado ipsolateral. El dolor provocado aparece al cabo de varias horas después de la ligadura y permanece durante más de 7 meses. Resultados similares en ratones fueron obtenidos por Malmberg y Basbaum (1998), quienes establecieron algunas correlaciones conductuales y neuroanatómicas adicionales y señalaron la fiabilidad y objetividad del modelo de dolor neuropático en ratón por ligadura parcial del nervio ciático.

#### a) Efecto de ligandos del receptor 5-HT<sub>7</sub> en dolor neuropático: prueba de von Frey-alodinia mecánica

La ligadura parcial del nervio ciático indujo alodinia mecánica. Esto se evidenció como un umbral de presión reducido para provocar la retirada de la pata posterior ipsolateral en el día 10 después de la lesión, en comparación con los valores basales anteriores a la lesión (Fig. 17A). La administración sistémica del agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> AS-19 en los días 11-13 a dosis de 1, 5 y 10 mg/kg inhibió significativamente la alodinia mecánica. A estas tres dosis, AS-19 restableció los umbrales de la respuesta de retirada nociceptora de las patas con lesión nerviosa a los valores basales anteriores a la lesión. El efecto analgésico (antialodínico) desapareció tan pronto como se detuvo el tratamiento con AS-19 (los umbrales posteriores al tratamiento el día después de la administración no eran

distinguibles de los anteriores al tratamiento). Los tratamientos con dosis más bajas (0,1 y 0,3 mg/kg) de AS-19 fueron ineficaces, ya que no se observó modificación alguna de esta manifestación conductual de dolor neuropático en comparación con los ratones tratados con vehículo.

En los testigos quirúrgicos no se indujo alodinia mecánica, pero se encontraron frecuentemente ligeras (no significativas) reducciones del umbral de la respuesta de retirada nociceptora en ratones testigos quirúrgicos 10 días después de la cirugía (Fig. 17B). AS-19 sólo produjo efectos menores en ratones testigos quirúrgicos, aunque a dosis de 1 y 5 mg/kg AS-19 incrementó el umbral nociceptor.

De forma similar a AS-19, MSD-5a, otro agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> usado en este estudio, ejerció efectos antialodínicos (Fig. 19). La administración sistémica de MSD-5a en los días 11-13 a dosis de 1 y 3 mg/kg inhibió significativamente la alodinia mecánica. A estas dosis, MSD-5a restableció los umbrales de la respuesta de retirada nociceptora de las patas con lesión nerviosa a los valores basales anteriores a la lesión. El efecto analgésico (antialodínico) desapareció al día siguiente después de la última administración de MSD-5a (los umbrales eran indistinguibles de los anteriores al tratamiento). El tratamiento con dosis más baja (0,3 mg/kg) de MSD-5a fue ineficaz, ya que no se observó modificación alguna de esta manifestación conductual de dolor neuropático en comparación con los ratones tratados con vehículo. En los testigos quirúrgicos no se indujo alodinia mecánica, pero se encontraron frecuentemente ligeras (no significativas) reducciones del umbral de la respuesta de retirada nociceptora en ratones testigos quirúrgicos 14 días después de la cirugía (Fig. 19B). MSD-5a no produjo ningún efecto en ratones testigos quirúrgicos.

La activación de receptores 5-HT<sub>7</sub> por el agonista selectivo AS-19 tiene efectos antialodínicos en ratones con lesión nerviosa, pero para investigar la posibilidad de que un antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> ejerza efectos proalodínicos, el antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> SB-258719 fue administrado a ratones neuropáticos. Observamos que el tratamiento con SB-258719 a 10 mg/kg redujo significativamente el umbral mecánico para provocar la retirada de la pata posterior con lesión nerviosa ipsolateral, por debajo de los valores posteriores a la lesión (Fig. 21A). Curiosamente, el tratamiento con SB-258719 no sólo promovió la alodinia en ratones con lesión nerviosa, sino que también fue capaz de inducir alodinia mecánica en ratones testigos quirúrgicos (Fig. 21B).

Con el fin de fortalecer la idea de que la activación de receptores 5-HT<sub>7</sub> es responsable del efecto analgésico ejercido por AS-19 y MSD-5a, se intentó revertir farmacológicamente su efecto antialodínico con el antagonista SB-258719. El antagonista SB-258719 a la dosis de 5 mg/kg no tuvo efecto antialodínico y fue capaz de revertir el efecto antialodínico ejercido por AS-19 y MSD-5a a 5 y 10 mg/kg, respectivamente (Fig. 23).

#### **b) Efecto de ligandos del receptor 5-HT<sub>7</sub> en dolor neuropático: prueba plantar - hiperalgesia térmica**

La ligadura parcial del nervio ciático indujo hiperalgesia térmica como se evidenció por la reducción de la latencia de retirada de la pata frente a estímulo térmico en el día 10 después de la lesión en comparación con los valores basales anteriores a la lesión (Fig. 18A). Sin embargo, se observó una disminución significativa de dicha hiperalgesia en los días 11-13 después de la lesión en ratones que recibieron tratamiento con el agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> AS-19. De hecho, el tratamiento con AS-19 a dosis de 1 y 10 mg/kg incrementó la latencia de retirada de las patas con lesión nerviosa a niveles indistinguibles de los valores control basales anteriores a la lesión. Dosis más bajas (0,1 mg/kg) de AS-19 no ejercieron efecto analgésico (antihiperalgésico). En los testigos quirúrgicos no se produjo ninguna modificación significativa de la respuesta nociceptora y la administración de AS-19 a ratones testigos quirúrgicos no tuvo efectos (Fig. 18B). De forma similar a AS-19, MSD-5a, otro agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub> usado en este estudio, a dosis de 1 y 3 mg/kg incrementó la latencia de retirada de patas con lesión nerviosa a niveles no distinguibles de los valores basales control anteriores a la lesión (Fig. 20A). Dosis más bajas (0,3 mg/kg) de MSD-5a no ejercieron efecto analgésico (antihiperalgésico). En los testigos quirúrgicos no se produjo ninguna modificación significativa de la respuesta nociceptora y la administración de MSD-5a a ratones testigos quirúrgicos no tuvo efectos (Fig. 20B). Curiosamente, el tratamiento con SB-258719 no promovió la hiperalgesia en ratones con lesión nerviosa (Fig. 22A) pero fue capaz de revertir el efecto antihiperalgésico de agonistas de 5-HT<sub>7</sub> (Fig. 24). Como se muestra en la Fig. 24, el efecto antihiperalgésico de los agonistas, AS-19 (5 mg/kg) y MSD-5a (10 mg/kg) fue inhibido al coadministrarse con el antagonista SB-258719 (5 mg/kg).

### **Conclusiones**

#### **Los receptores 5-HT<sub>7</sub> desempeñan un papel clave en el control del dolor neuropático:**

• La activación de receptores 5HT<sub>7</sub> ejerce un efecto analgésico en dolor neuropático: los agonistas del receptor 5HT<sub>7</sub>, AS-19 y MSD-5a inhiben comportamientos asociados con dolor neuropático (alodinia mecánica e hiperalgesia térmica).

Los efectos antialodínico e hiperalgésico se lograron completamente usando dosis bajas (1 mg/kg) del agonista selectivo del receptor 5HT<sub>7</sub>, AS-19.

En contraste, el bloqueo de receptores 5HT<sub>7</sub> promueve el dolor neuropático: el antagonista del receptor 5HT<sub>7</sub> SB-258719 exacerba las manifestaciones conductuales de dolor neuropático (alodinia mecánica e hiperalgesia térmica). El antagonista selectivo del receptor 5HT<sub>7</sub> SB-258719 potencia la alodinia y la

hiperalgesia en afecciones de dolor neuropático tras lesión nerviosa. Además, SB-258719 precipitó la aparición de manifestaciones conductuales de dolor neuropático en ratones testigos quirúrgicos.

• **El efecto analgésico del agonista del receptor 5HT<sub>7</sub> y el efecto algésico del antagonista del receptor 5HT<sub>7</sub> pueden revertirse farmacológicamente mediante la coadministración de ambos compuestos.**

- 5 Estos resultados revelan la implicación del receptor 5-HT<sub>7</sub> en el control del dolor neuropático y apuntan a un nuevo uso terapéutico potencial de los agonistas del receptor 5-HT<sub>7</sub> como analgésicos.

#### **Ejemplo 4: Lesión por constricción crónica del nervio ciático (CCI-SN)**

- 10 La estimulación directa del receptor 5-HT<sub>7</sub> por AS-19 y MSD5a ejerce efectos antihiperalgésicos claramente definidos en ratas con ligadura del nervio ciático (Fig. 25 y 26, respectivamente). Estos efectos son bloqueados por antagonistas de 5-HT<sub>7</sub> (Fig. 27 y 28). La estimulación directa del receptor 5-HT<sub>7</sub> por AS-19 ejerce efectos antihiperalgésicos de larga duración en ratas con ligadura del nervio ciático (Fig. 25 y 26).

#### **Ejemplo 5: Lesión por constricción crónica del nervio intraorbital (CCI-ION)**

- 15 Tras la operación el umbral de respuesta (g) se reduce considerablemente en las ratas con lesión nerviosa y el tratamiento con solución salina no produjo ninguna modificación del umbral nociceptor (Fig. 29-32). Por otro lado, los agonistas de 5-HT<sub>7</sub> AS-19 y MSD5a incrementaron claramente el umbral (Fig. 29 y 30). El efecto antialodínico del agonista de 5-HT<sub>7</sub> es bloqueado por el antagonista de 5-HT<sub>7</sub> (Fig. 31 y 32).

AS-19 es bastante potente y muy eficaz para reducir la alodinia mecánica en ratas con ligadura del nervio infraorbital.

#### **Conclusiones:**

- 20 • Los receptores 5-HT<sub>7</sub> desempeñan un papel clave en el control del dolor neuropático en ratas.
- Los receptores 6-HT<sub>7</sub> pueden ser un objetivo pertinente para aliviar el dolor neuropático tanto cefálico y como extracefálico (somático).

#### **Ejemplo 6: Dolor neuropático derivado de neuropatía de tipo diabético inducida por estreptozotocina.**

- 25 La neuropatía es una de las complicaciones más comunes de la diabetes mellitus, una enfermedad crónica grave. Se estima que el 50 % de los diabéticos desarrollan alguna forma de neuropatía periférica, sufriendo aproximadamente el 32 % dolor crónico, grave y no remitente. La manifestación de neuropatía diabética descrita con más frecuencia es una polineuropatía simétrica distal. Los pacientes diabéticos de tipo 1 son diagnosticados cuando la destrucción inflamatoria de células beta es casi total. La estreptozotocina es una toxina que tiene efectos citotóxicos directos sobre células β cuando se inyecta en dosis elevadas. Los ratones tratados con STZ conducen a
- 30 la destrucción de células β mediada por autoinmunidad, desarrollando diabetes manifiesta, con hiperglucemia, hipoinsulinemia, polidipsia y polifagia marcadas.

Tras el tratamiento con estreptozotocina, el umbral de respuesta (g) se reduce considerablemente (Fig. 33). Se observó un efecto de respuesta a dosis de AS-19, con un claro efecto antialodínico en ratones diabéticos a 10 mg/kg (Fig. 33).

#### **Ejemplo 7: Modelo de dolor inflamatorio de carragenina**

##### **a) Efecto de AS-19 sobre la alodinia mecánica (medida mediante von Frey automático) en afecciones inflamatorias agudas (3 h después de la carragenina)**

- 40 Tres horas después de la inyección de carragenina, se observó una hinchazón prominente en la pata ipsilateral afectada. El edema estaba acompañado por alodinia mecánica, como probó el umbral reducido de retirada de la pata en la pata tratada con carragenina ipsilateral (pata derecha) con respecto a la pata contralateral control (pata izquierda) en ratones tratados con vehículo (Fig. 34). La administración sistémica de AS-19 (10 mg/kg, s.c.) 30 minutos antes de la prueba de von Frey redujo significativamente la alodinia mecánica inducida por carragenina.

##### **b) Efecto de AS-19 sobre la hiperalgesia en afecciones inflamatorias crónicas (4 días después de la carragenina)**

- 45 Cuatro días después de la inyección de carragenina la hinchazón era aún notable y la pata ipsilateral mostraba hiperalgesia térmica. Una sola inyección con AS-19 (10 mg/kg, s.c.) en el 4º día inhibió significativamente la hiperalgesia térmica en la pata afectada (Fig. 35). De hecho, no se observó hiperalgesia térmica en los ratones que recibieron AS-19, ya que la latencia de retirada de la pata tratada con carragenina afectada no fue significativamente diferente de la de la pata contralateral no afectada del grupo vehículo.

50

**Ejemplo 8: Modelo de dolor inflamatorio de formalina.**

Efecto de AS-19 después de inyección de formalina

AS-19 (5 mg/kg i.p.) ejerció una disminución significativa en el tiempo de lamida de la pata en la segunda fase de la prueba de formalina (Fig. 36).

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que se une al receptor 5HT<sub>7</sub> y que actúa como un agonista total o parcial en la producción de un medicamento para el tratamiento de alodinia, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor de 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad con un factor de al menos 10 veces mayor (expresado como un valor de Ki) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>.
2. Uso, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el estímulo que provoca la alodinia es mecánico.
3. Uso, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el estímulo que provoca la alodinia es térmico.
4. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad con un factor de al menos 30 veces mayor (expresada como un valor de Ki) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, más preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente, con una afinidad con un factor de al menos 100 veces mayor.
5. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une con una afinidad (expresada como un valor de Ki) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que a cualquier otro receptor 5-HT, uniéndose especialmente con una afinidad con un factor de al menos 10 veces mayor, preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 30 veces mayor, más preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente, con una afinidad con un factor de al menos 100 veces mayor.
6. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> con un valor de Ki menor de 1000 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 50 nM, muy preferentemente menor de 25 nM, lo más preferentemente, menor de 10 nM.
7. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> con un valor de Ki menor de 1000 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 50 nM, muy preferentemente menor de 25 nM, lo más preferentemente menor de 10 nM y se une con una afinidad mayor (expresada como un valor de Ki) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, uniéndose concretamente con una afinidad con un factor de al menos 10 veces mayor, preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 30 veces mayor, más preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente al menos 100 veces mayor.
8. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> con un valor de Ki menor de 1000 nM, preferentemente menor de 200 nM, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 50 nM, muy preferentemente menor de 25 nM, lo más preferentemente menor de 10 nM y se une con una afinidad mayor (expresada como un valor de Ki) al receptor 5-HT<sub>7</sub> que a cualquier otro receptor 5-HT, uniéndose concretamente con una afinidad con un factor de al menos 10 veces mayor, preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 30 veces mayor, más preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 50 veces mayor, lo más preferentemente con una afinidad con un factor de al menos 100 veces mayor.
9. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> actúa como agonista total o parcial, concretamente como agonista total.
10. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el compuesto que se une al receptor 5-HT<sub>7</sub> es AS-19 o MSD5a, especialmente AS-19, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, concretamente enantiómeros o diastereómeros, o en forma de mezclas de estereoisómeros, concretamente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción adecuada; en la forma mostrada o en forma del ácido o la base o en forma de una sal, concretamente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato.

Figura 1:

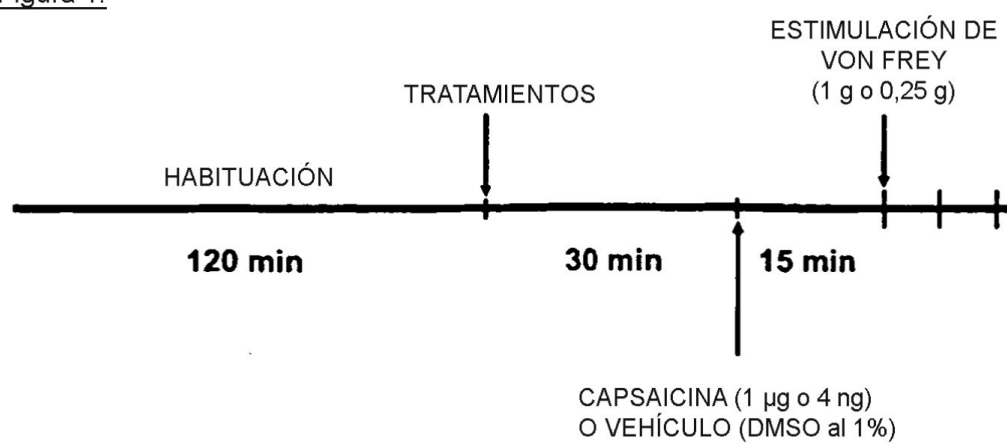


Figura 2:

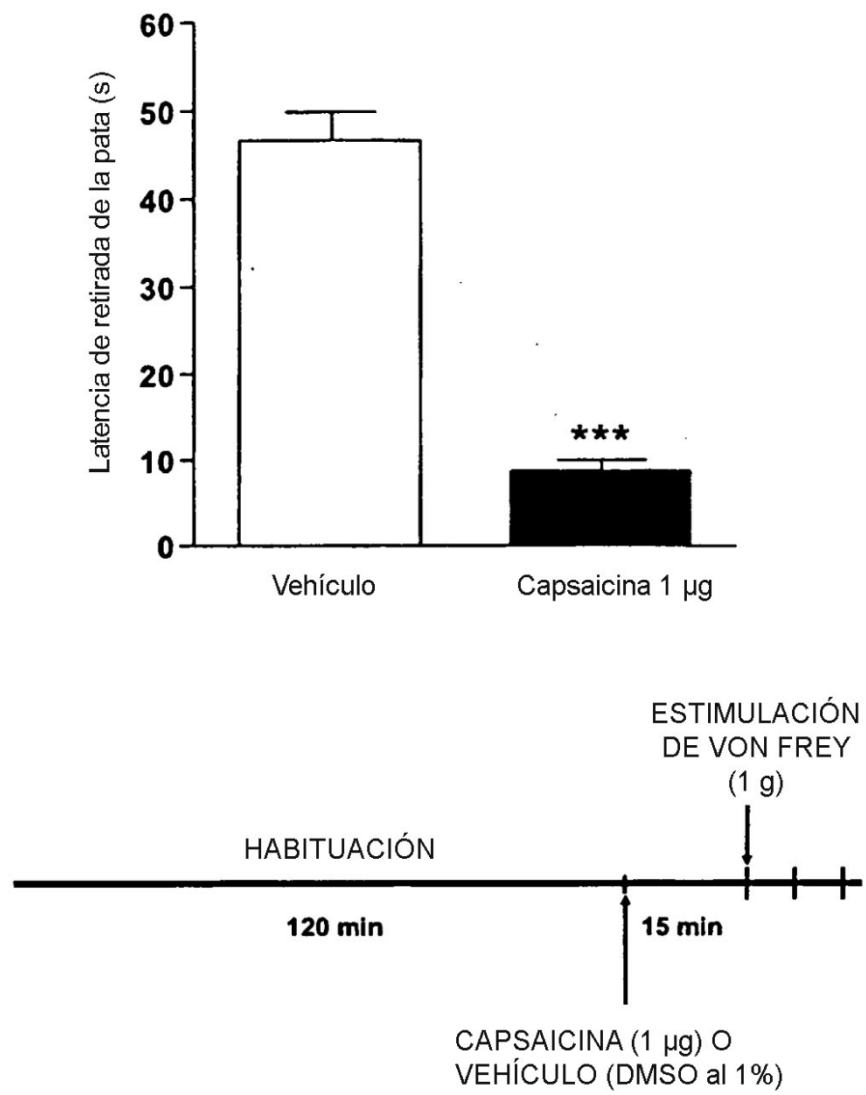


Figura 3:

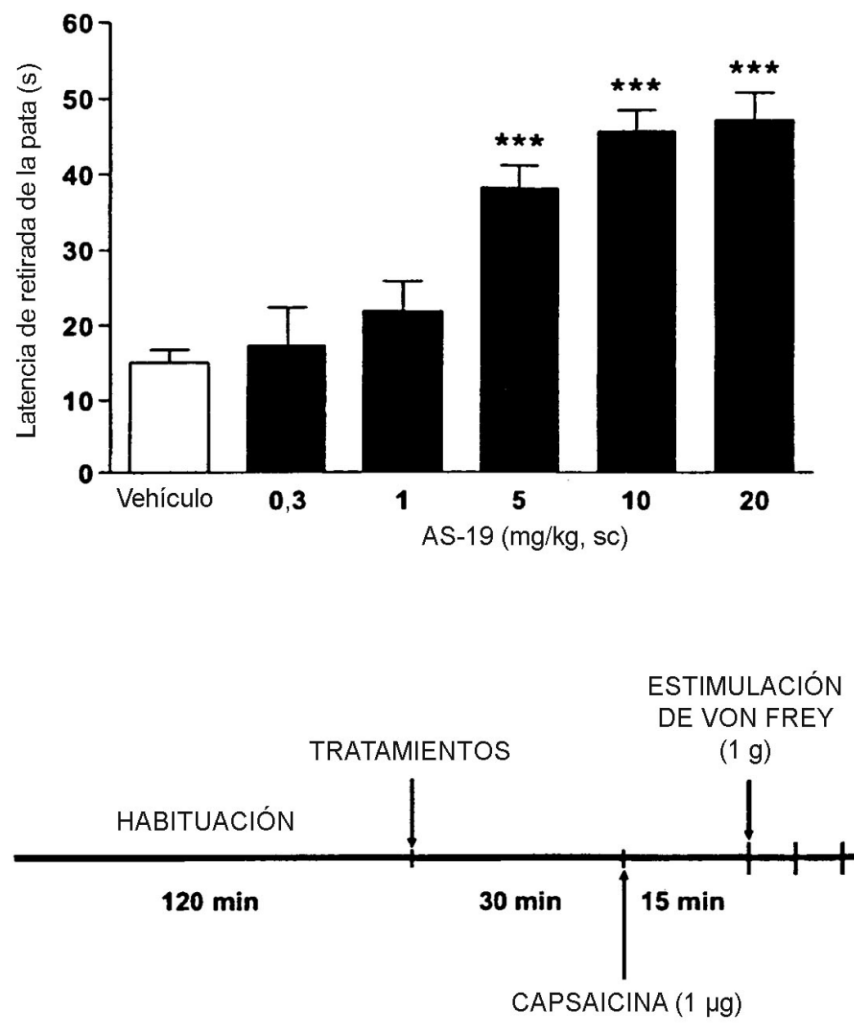


Figura 4:

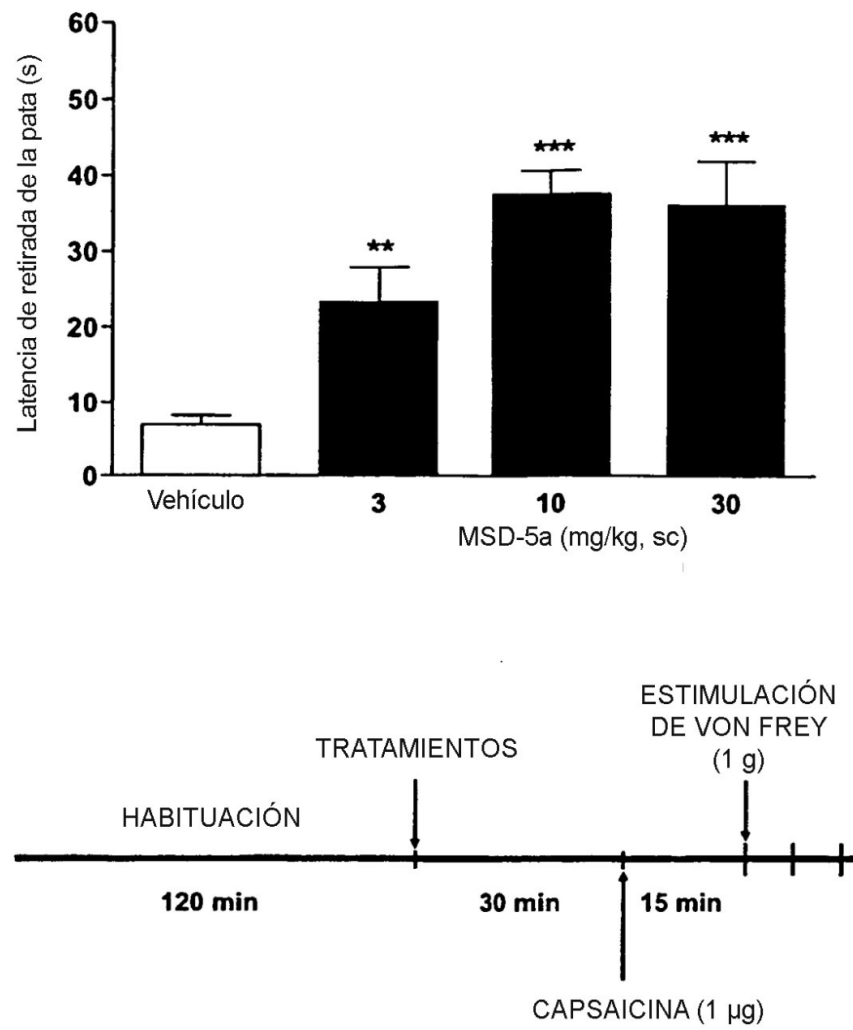


Figura 5:

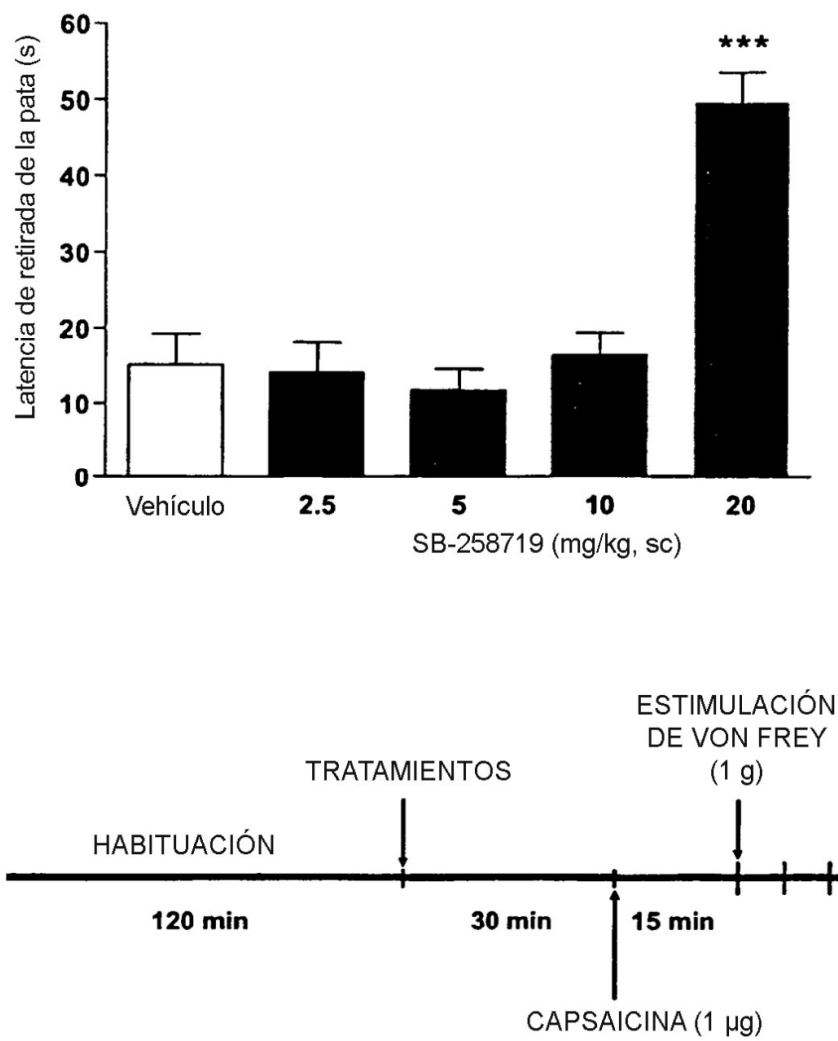


Figura 6:

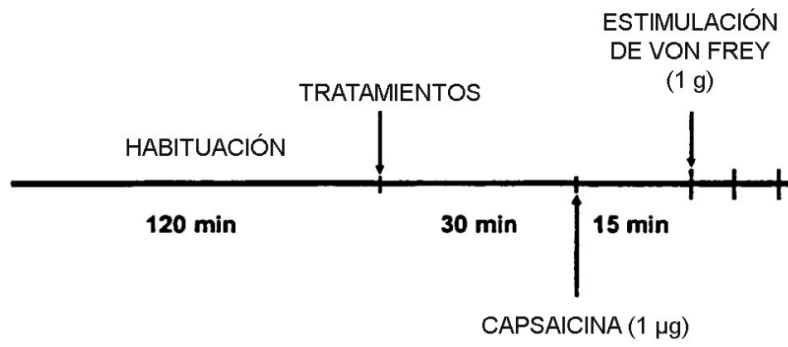
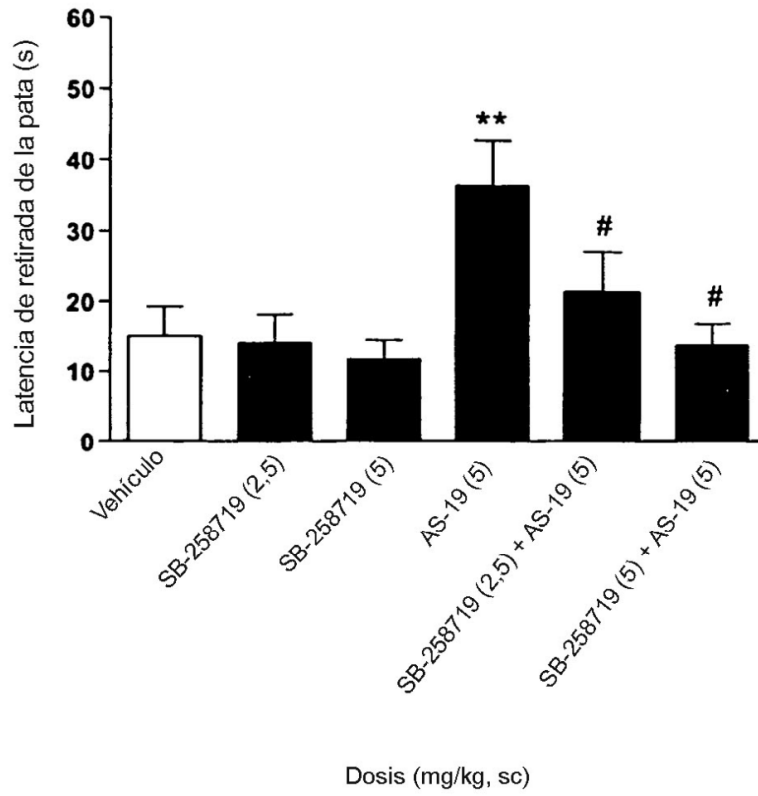


Figura 7:

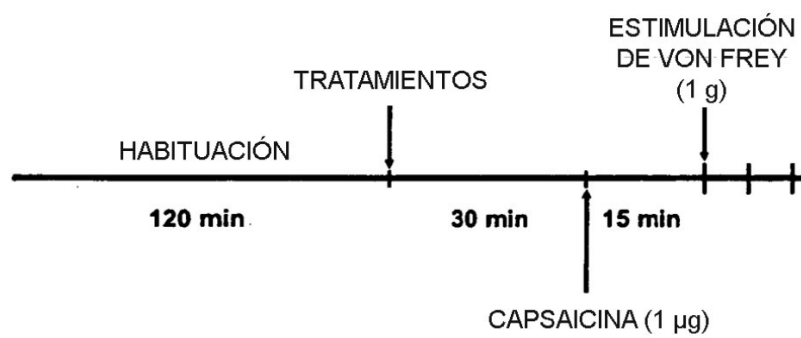
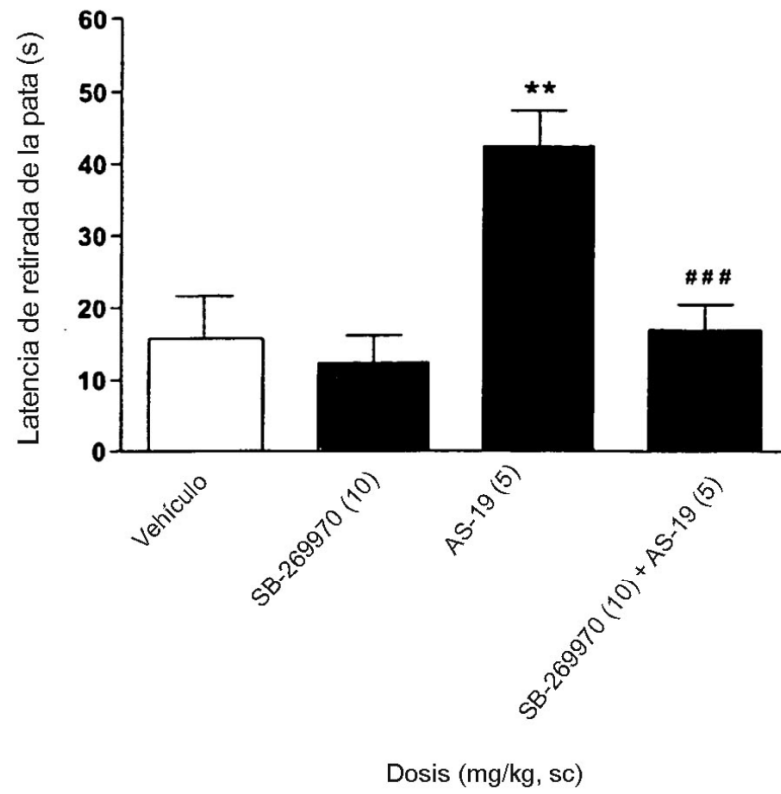


Figura 8:

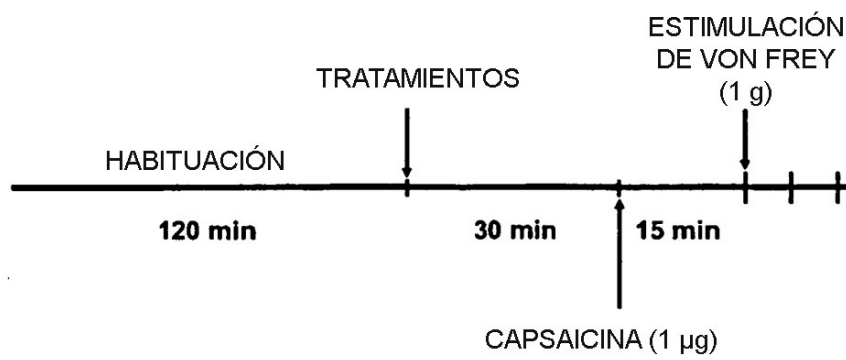
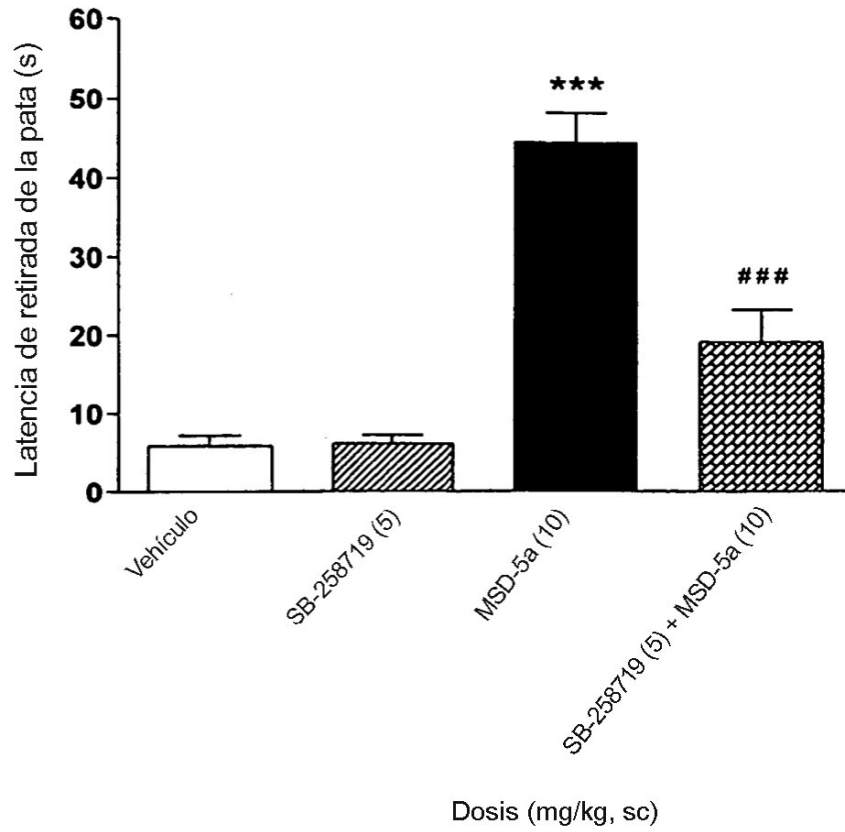


Figura 9:

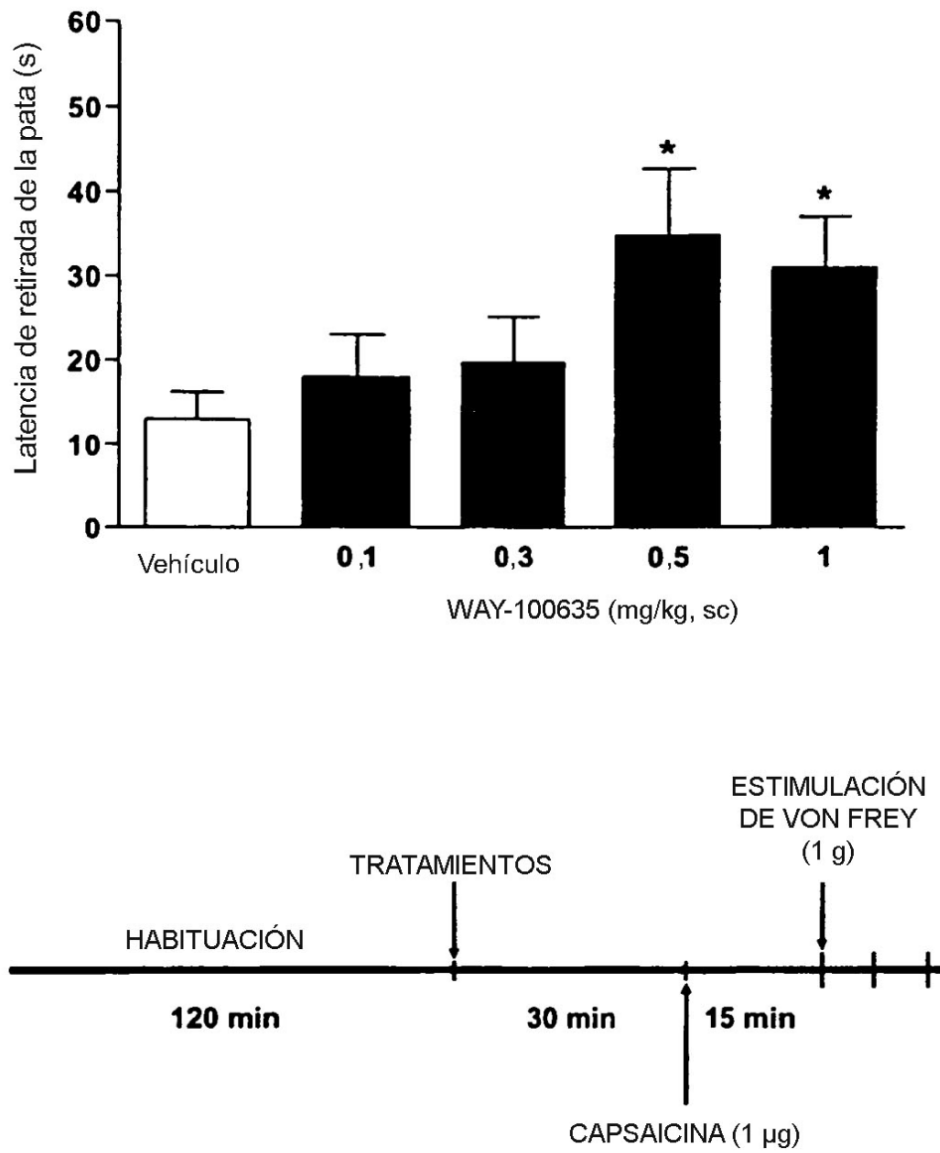


Figura 10:

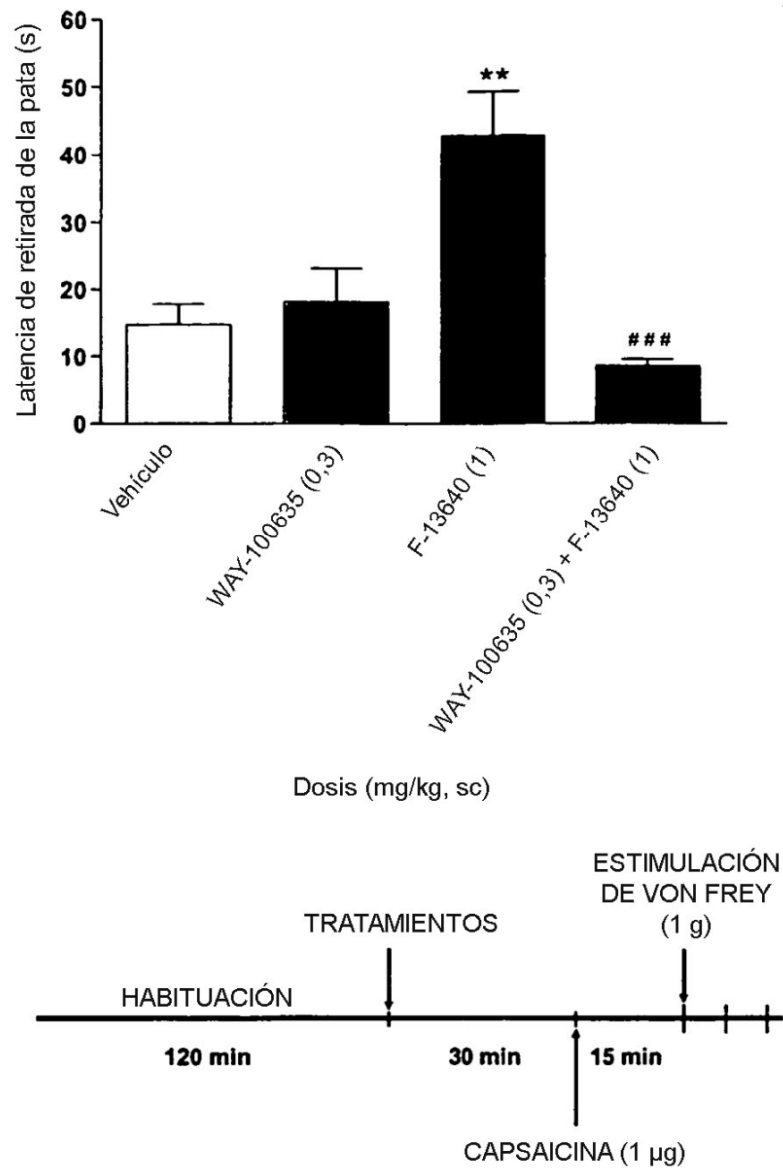


Figura 11:

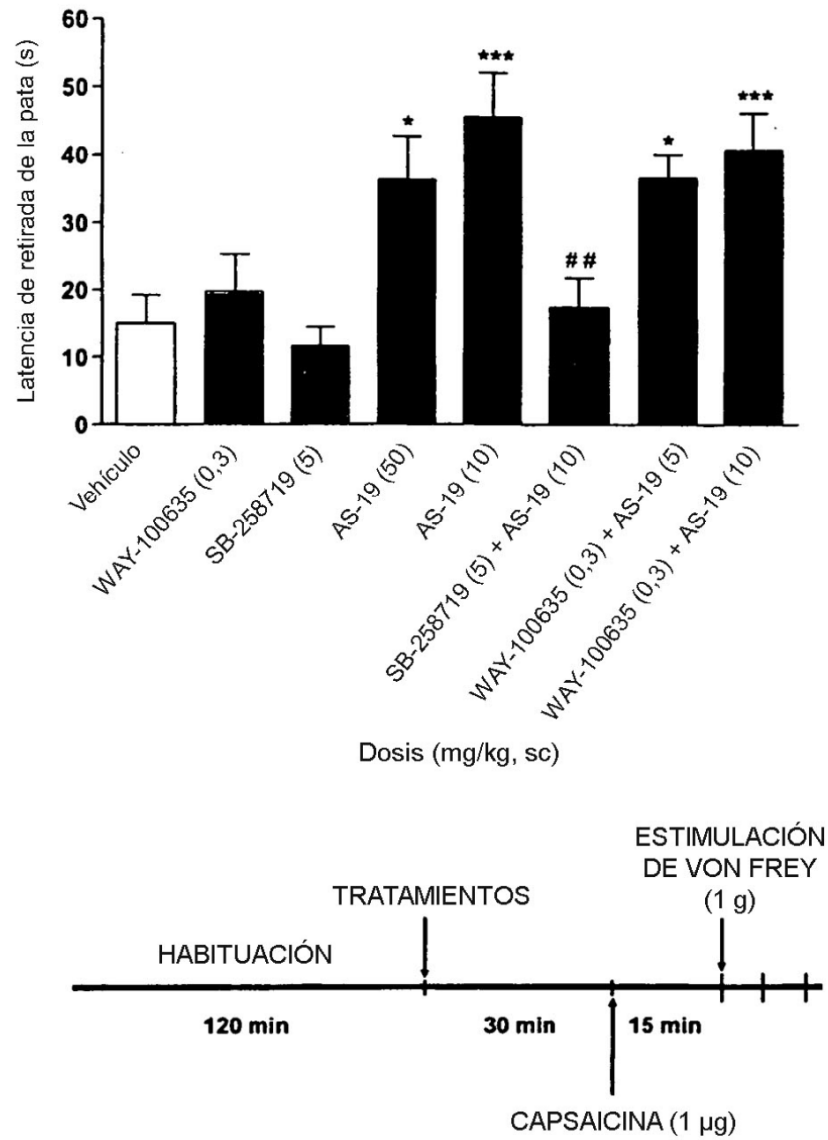


Figura 12:

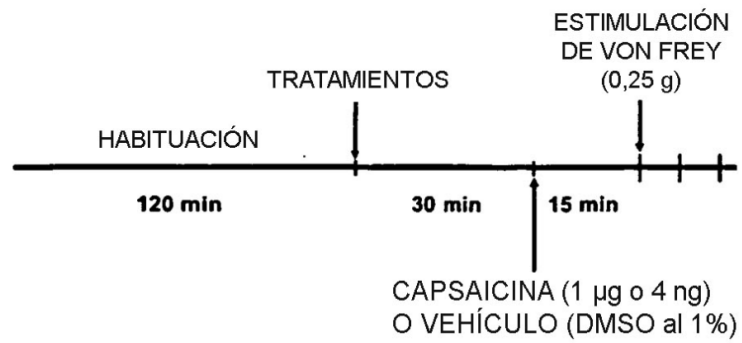
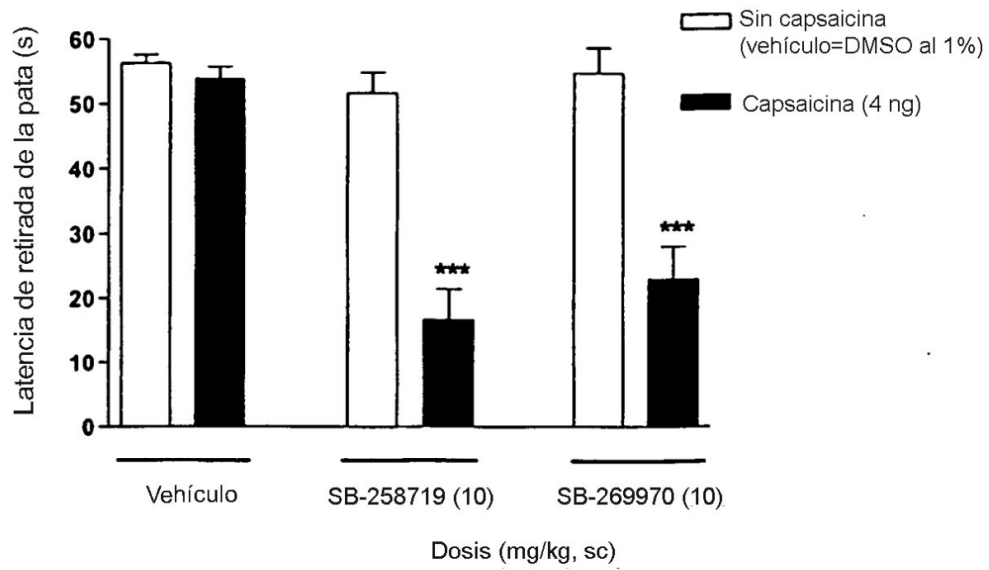


Figura 13:

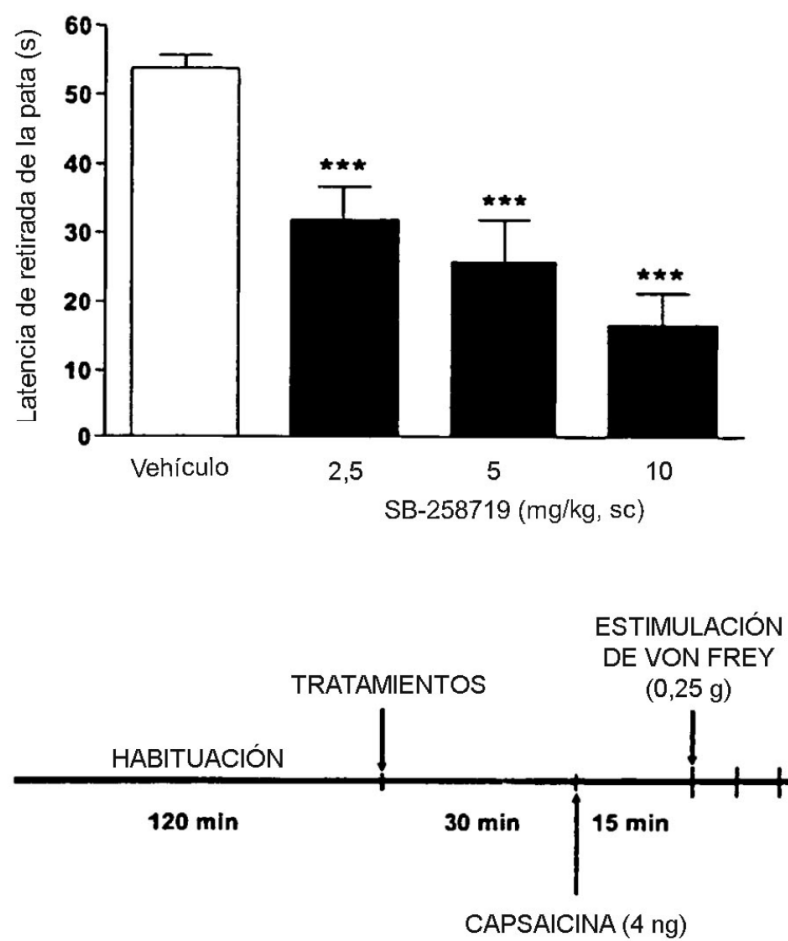


Figura 14:

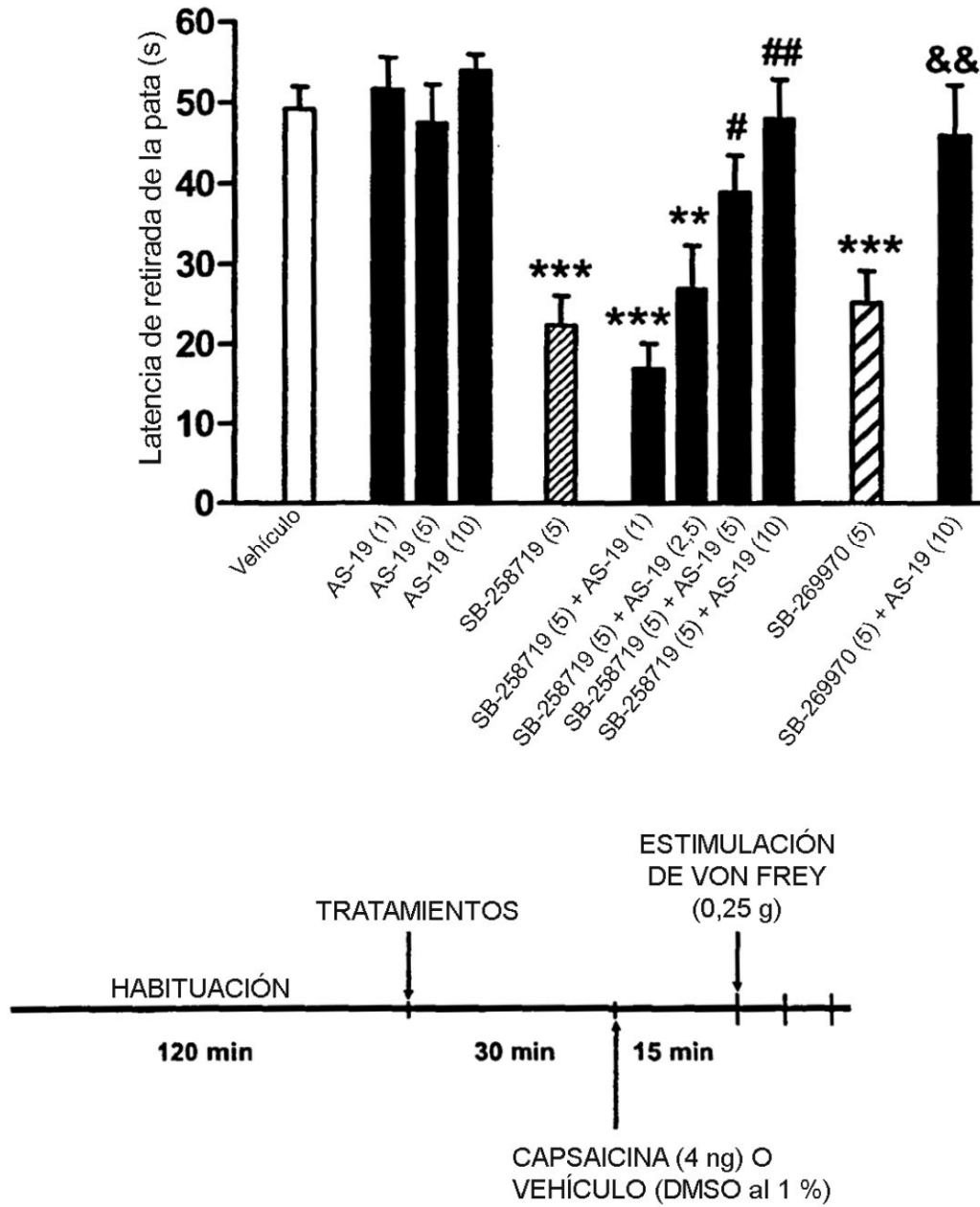


Figura 15:

| Días -3 a -6          | Días -1 y -2              | Día 0                                | Día 5                 | Día 10                                                  | Días 11-13                                           | Día 14                                                   |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 4 días de habituación | Basal, antes de la lesión | Cirugía                              | Basal, tras la lesión | Basal, antes del tratamiento (tratamiento con vehículo) | Evaluación de fármaco (tratamiento con fármaco)      | Basal después del tratamiento (tratamiento con vehículo) |
| Habitación            | Habitación y medidas      | Lesión nerviosa o testigo quirúrgico | Habitación y medidas  | Habitación, tratamiento y medidas                       | Habitación, tratamientos (cuadrado latino) y medidas | Habitación, tratamiento y medidas                        |

Figura 16:

| Días -2 a -3            | Día -1                    | Día 0                                | Día 5                 | Día 10                                         | Día 11                                        |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1-2 días de habituación | Basal, antes de la lesión | Cirugía                              | Basal, tras la lesión | Basal, antes del tratamiento                   | Evaluación de fármaco                         |
| Habitución              | Habitución y medidas      | Lesión nerviosa o testigo quirúrgico | Habitución y medidas  | Habitución, tratamiento con vehículo y medidas | Habitución, tratamiento con fármaco y medidas |

Figura 17:

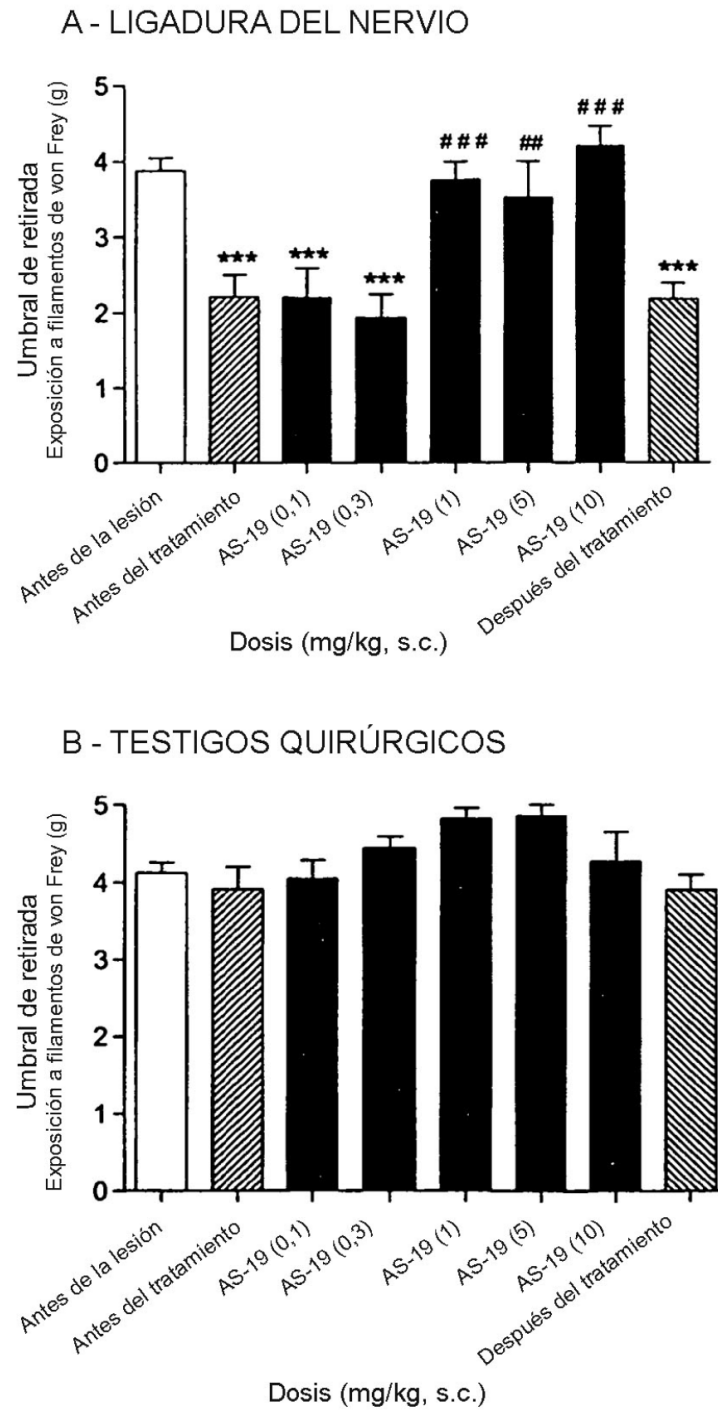
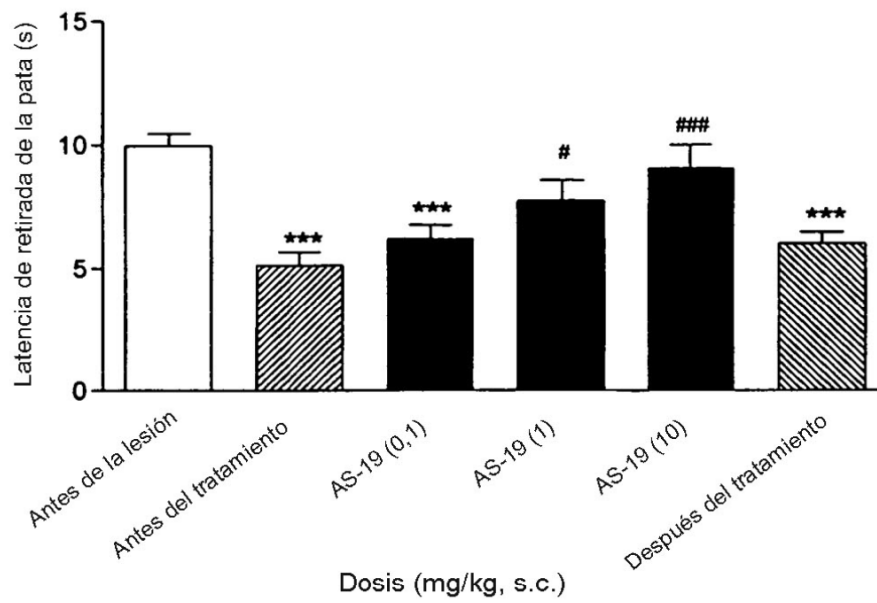


Figura 18:

A - LIGADURA DEL NERVIO



B - TESTIGOS QUIRÚRGICOS

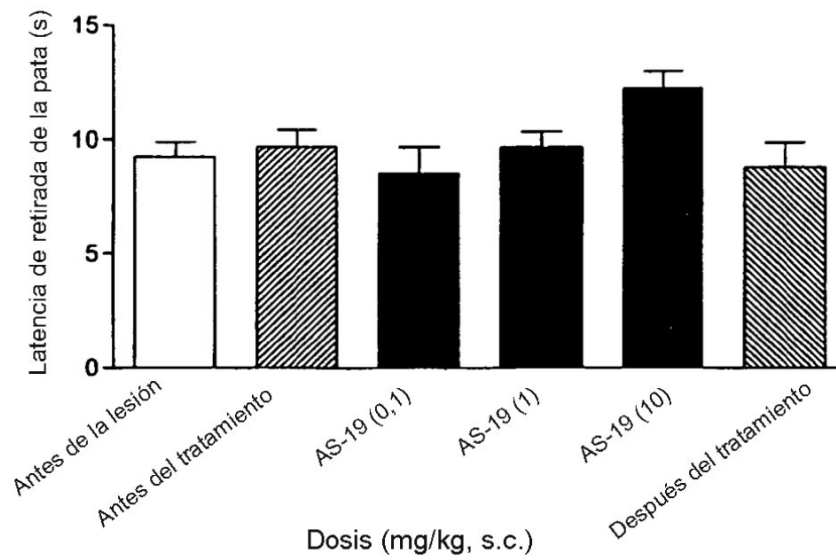


Figura 19:

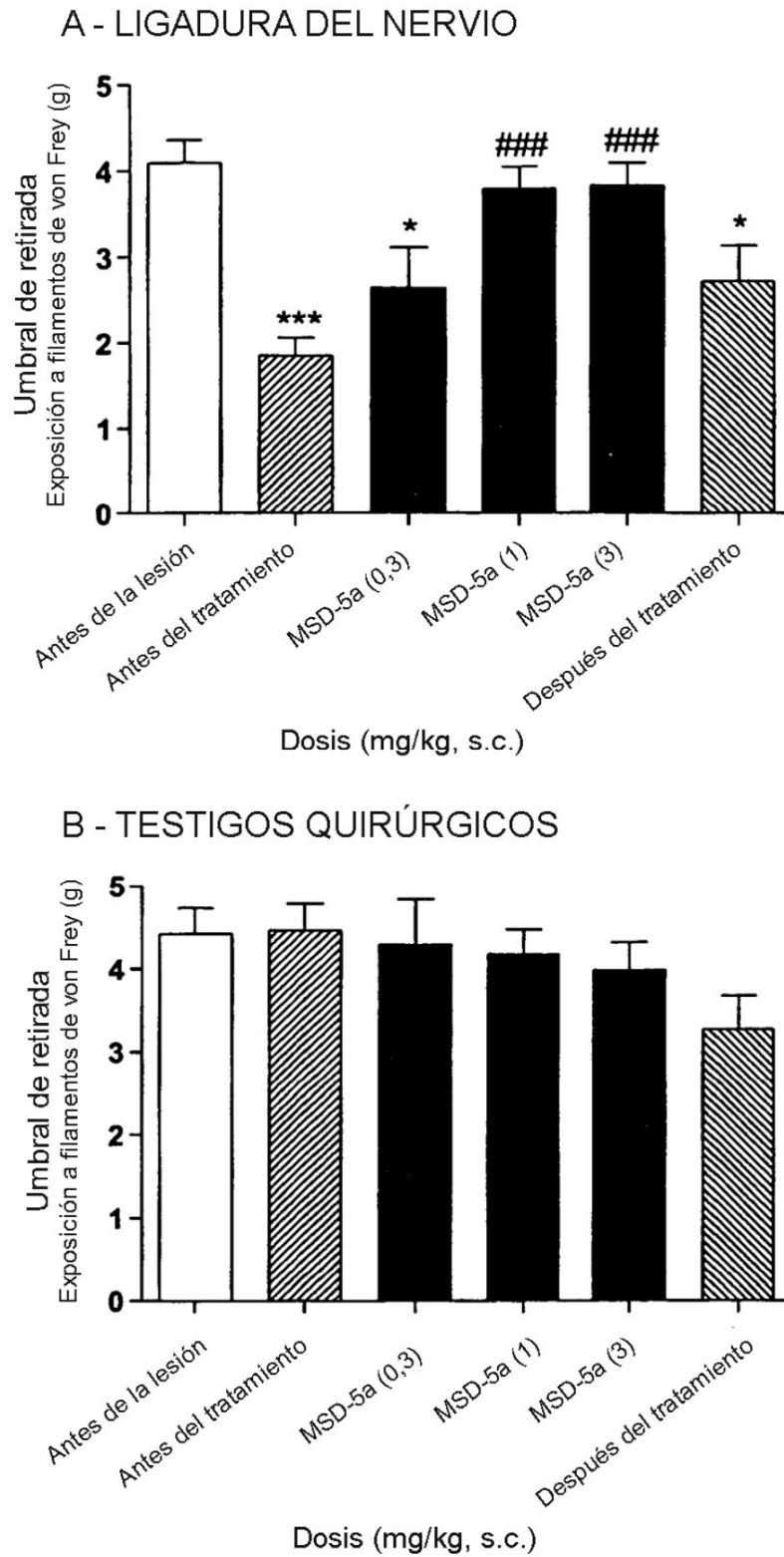


Figura 20:

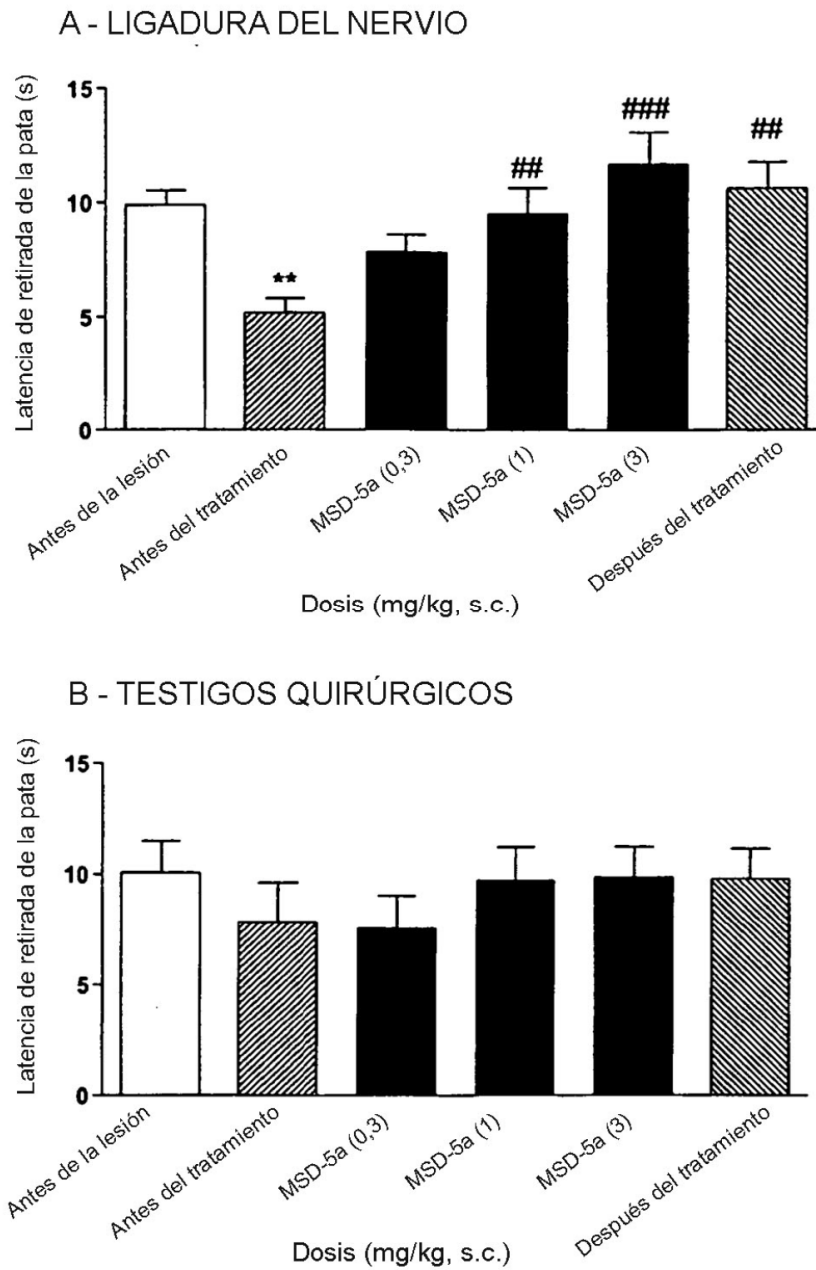
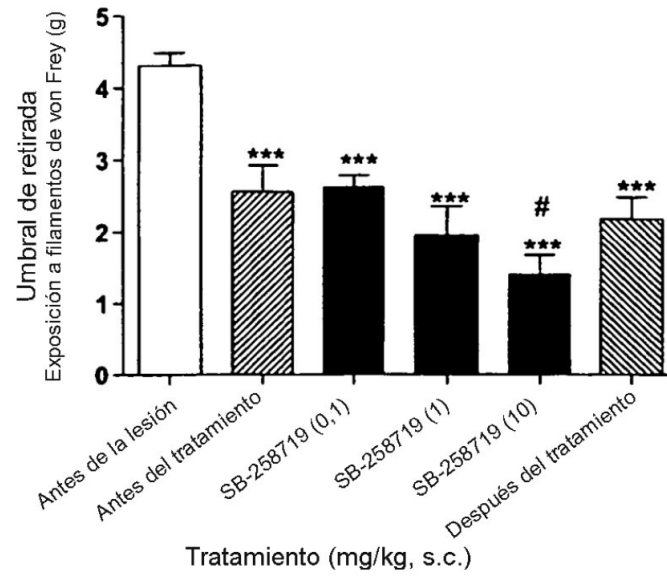


Figura 21:

A - LIGADURA DEL NERVIO



B - TESTIGOS QUIRÚRGICOS

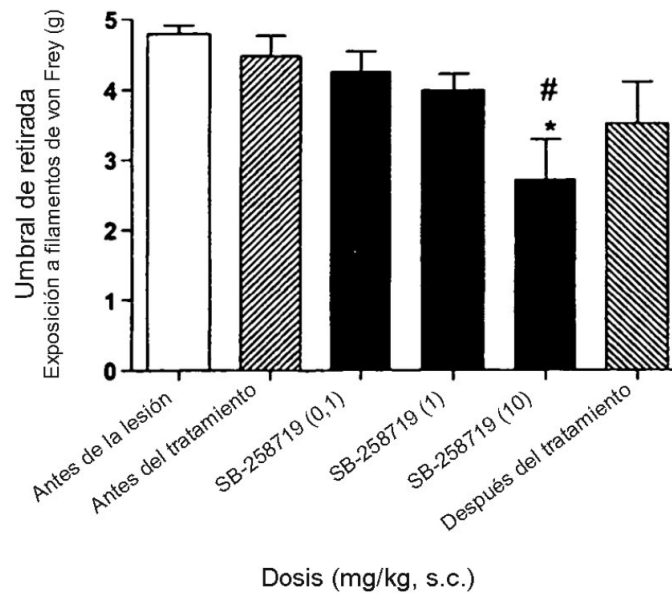


Figura 22:

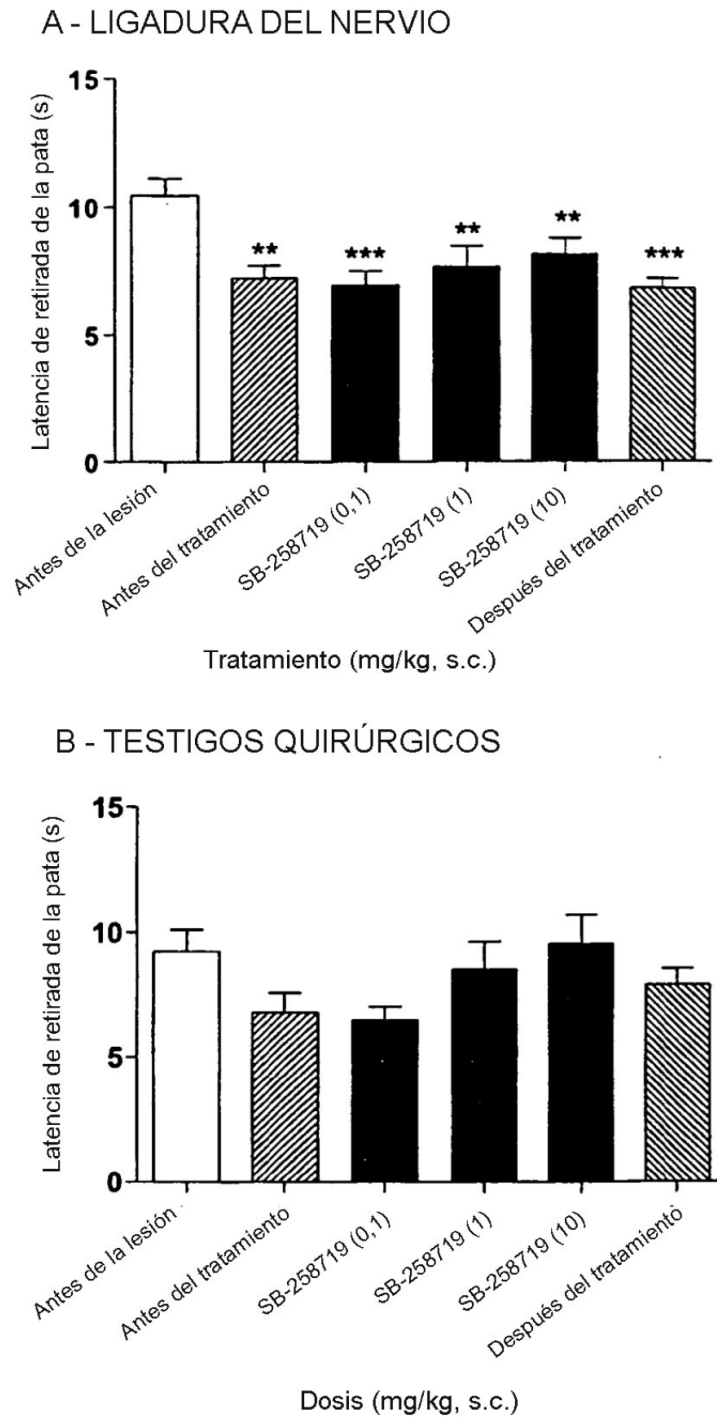


Figura 23:

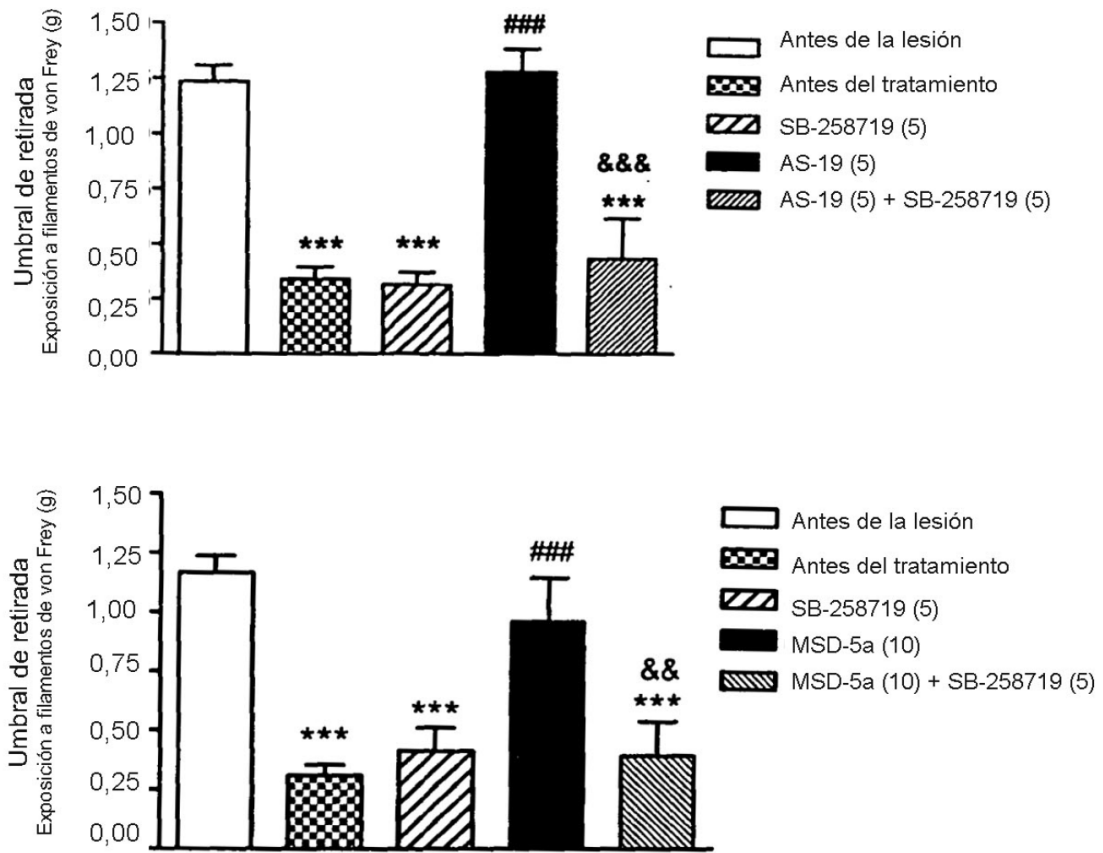


Figura 24:

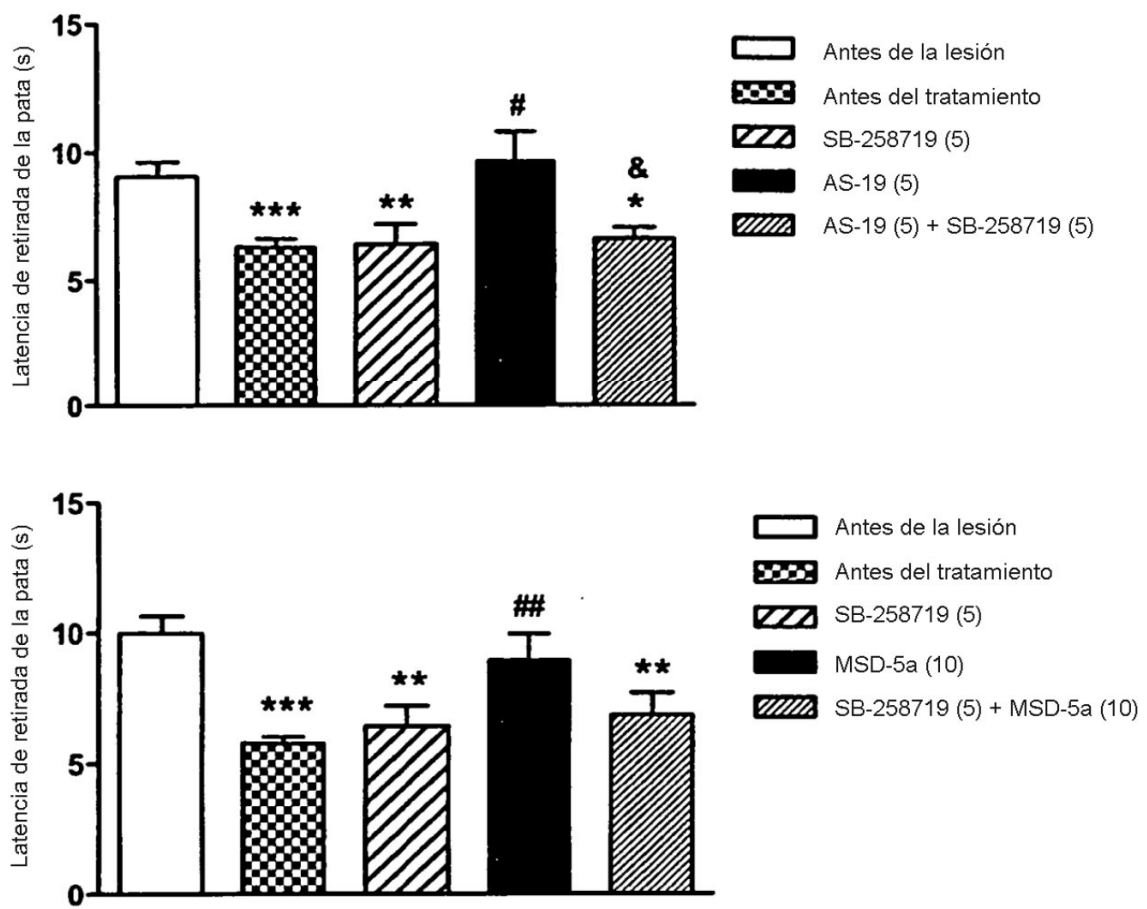
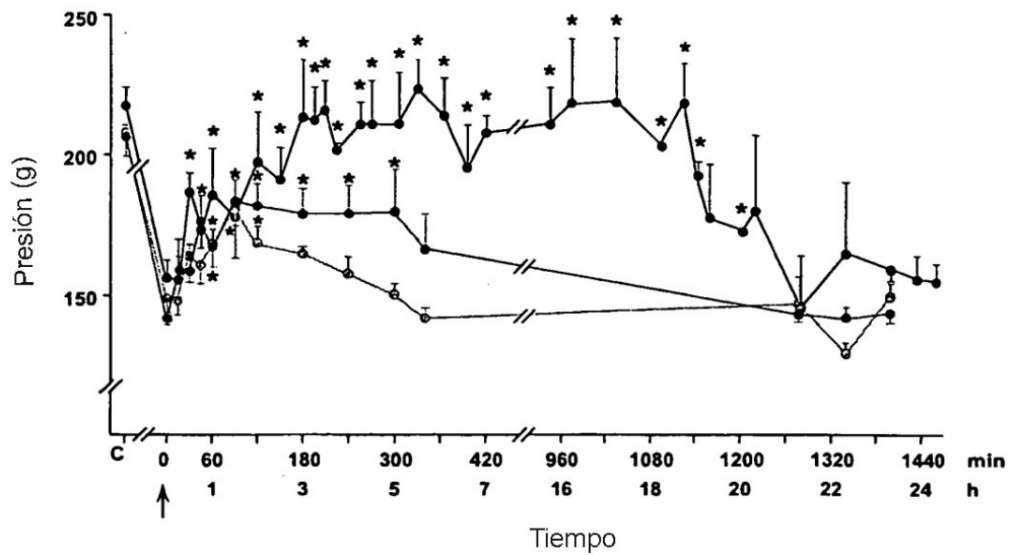


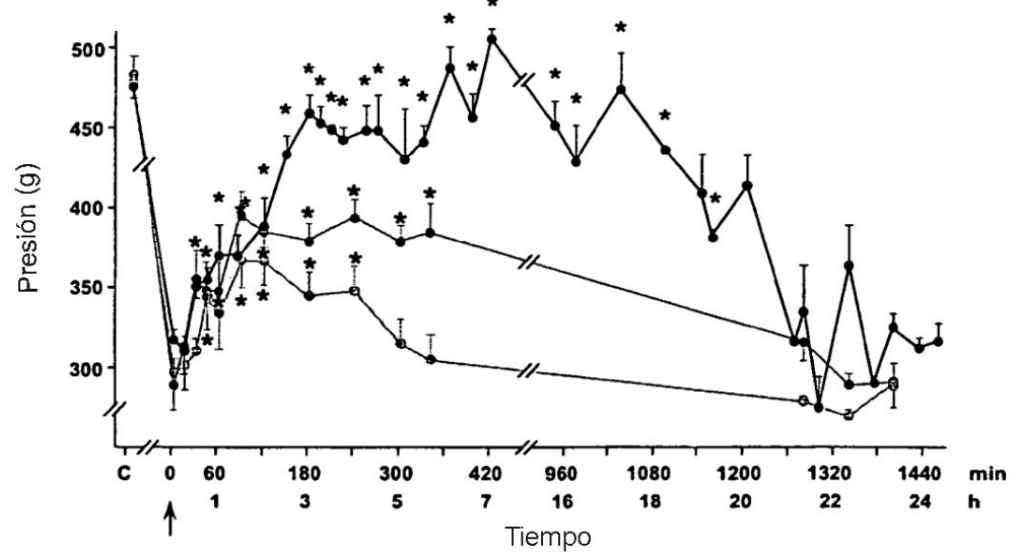
Figura 25:

CCI-SN, Umbral de retirada de la pata

Prueba de Randall-Selitto



CCI-SN, Umbral de vocalización

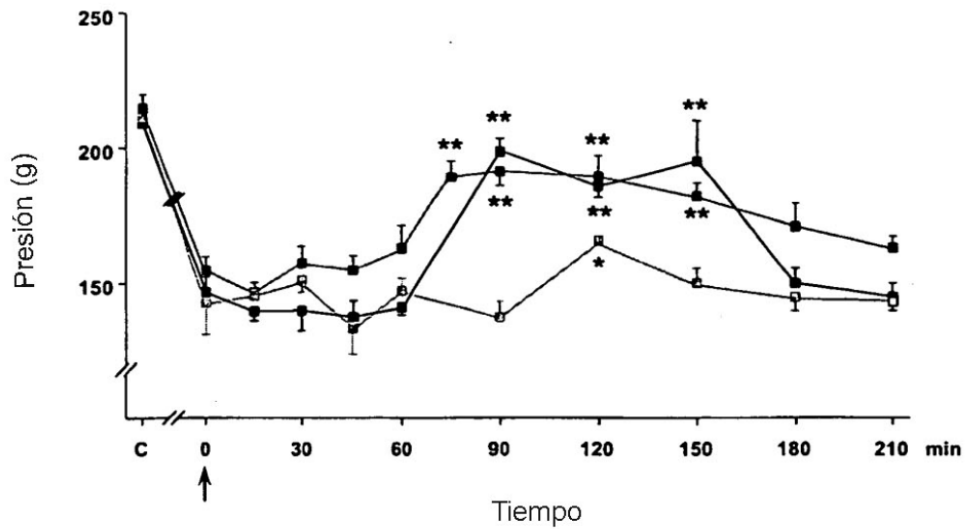


- solución salina + AS 19 2,5 mg/kg s.c. (n = 5-8)
- solución salina + AS 19 5 mg/kg s.c. (n = 5-8)
- solución salina + AS 19 10 mg/kg s.c. (n = 5-13)

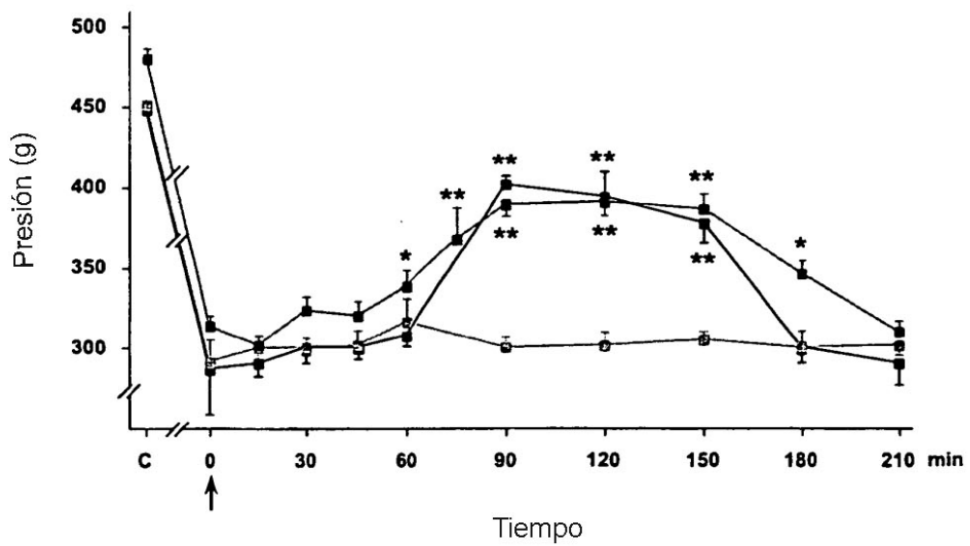
Figura 26:

CCI-SN, Umbral de retirada de la pata

Prueba de Randall-Selitto



CCI-SN, Umbral de vocalización

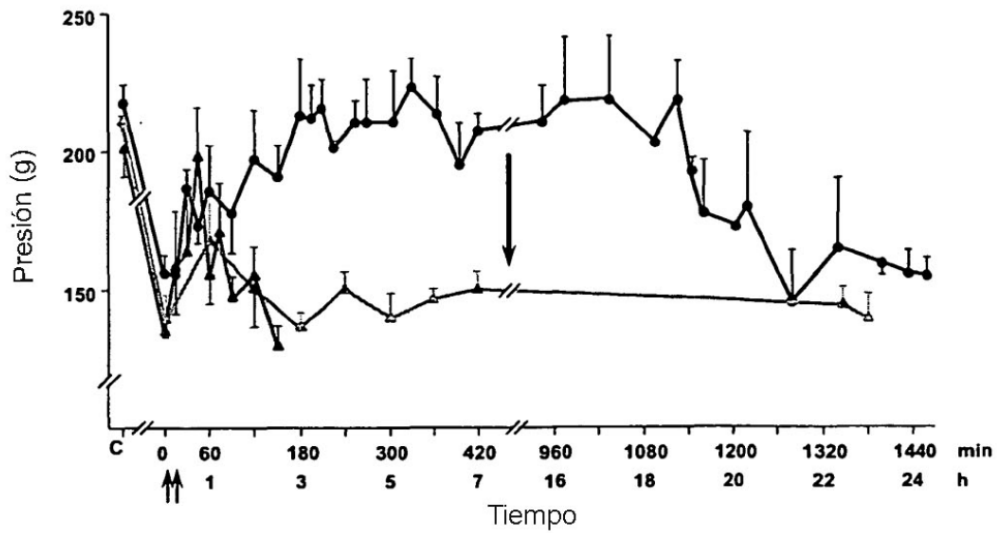


- solución salina + MSD-5a 5 mg/kg s.c. (n = 6)
- solución salina + MSD-5a 10 mg/kg s.c. (n = 9)
- solución salina + MSD-5a 15 mg/kg s.c. (n = 6)

Figura 27:

CCI-SN, Umbral de retirada de la pata

Prueba de Randall-Selitto



CCI-SN, Umbral de vocalización

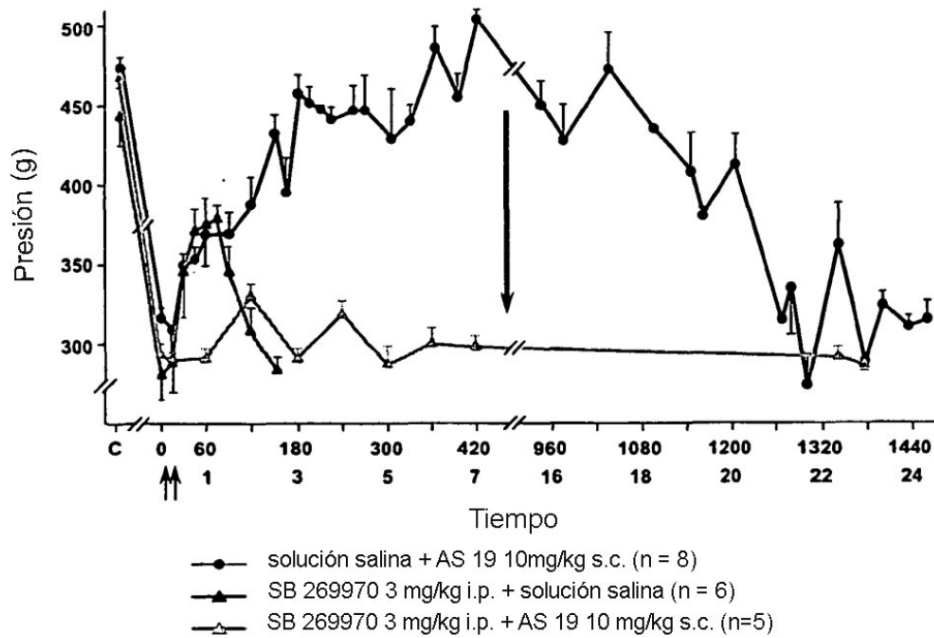
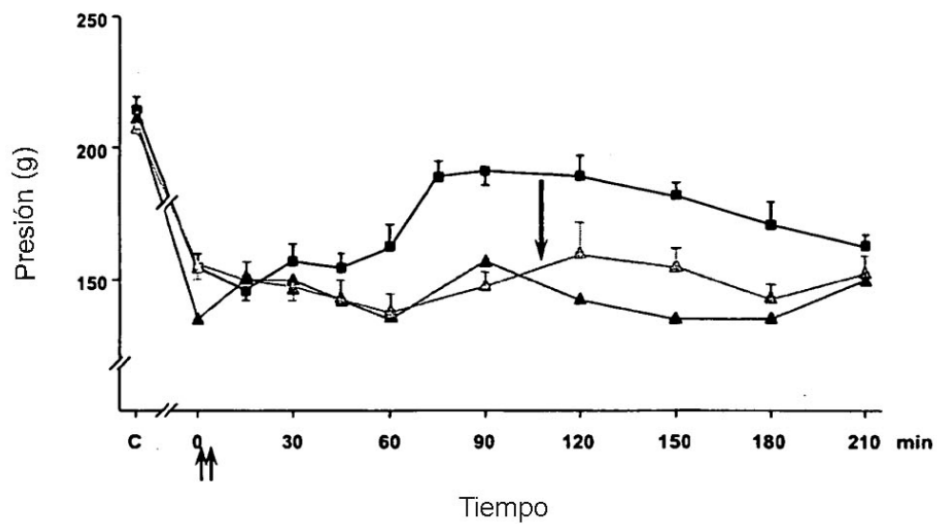


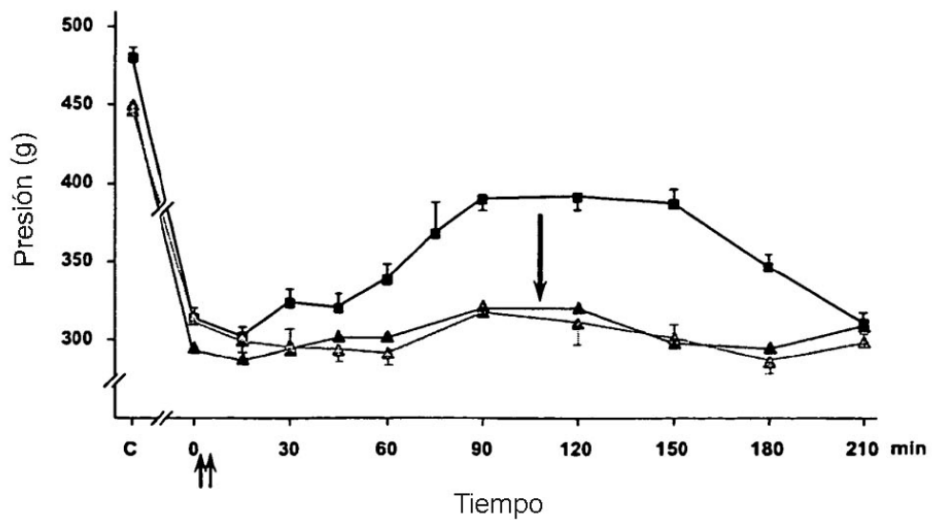
Figura 28:

CCI-SN, Umbral de retirada de la pata

Prueba de Randall-Selitto



CCI-SN, Umbral de vocalización



- Solución salina + MSD-5a 10 mg/kg s.c. (N=9)
- ▲ SB 258719 + solución salina (n=2)
- △ SB 258719 3 mg/kg + MSD-5a 10 mg/kg s.c. (N=6)

Figura 29:

**CCI-IoN**

Filamentos de von Frey

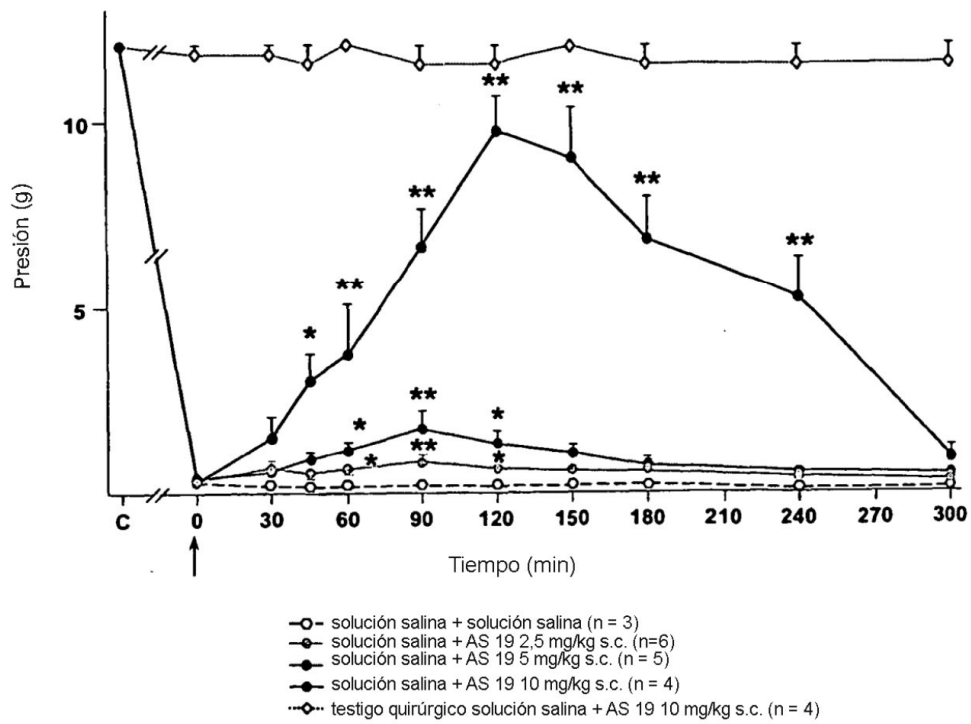


Figura 30:

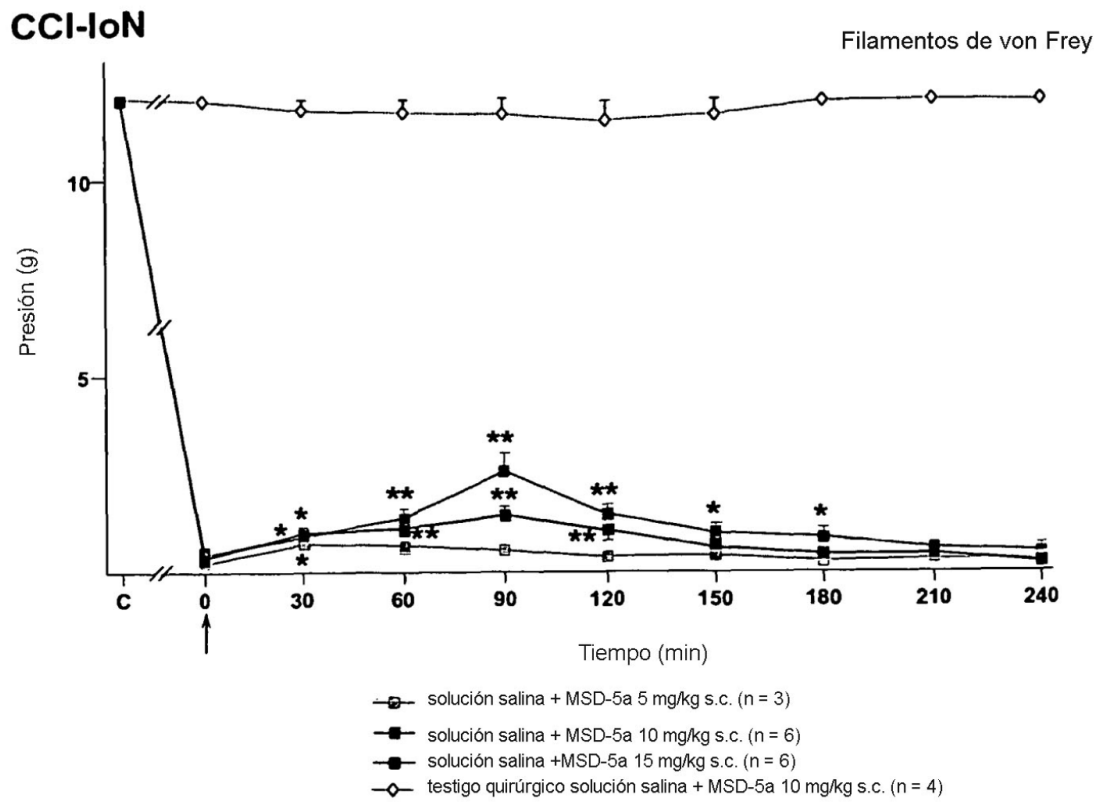


Figura 31:

CCI-IoN

Filamentos de von Frey

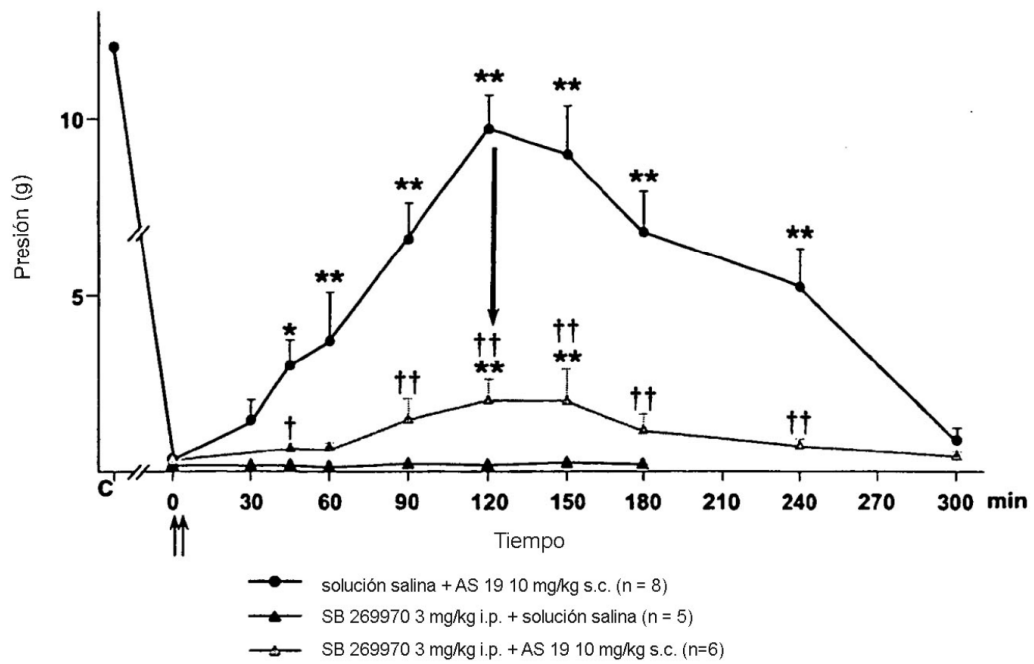


Figura 32:

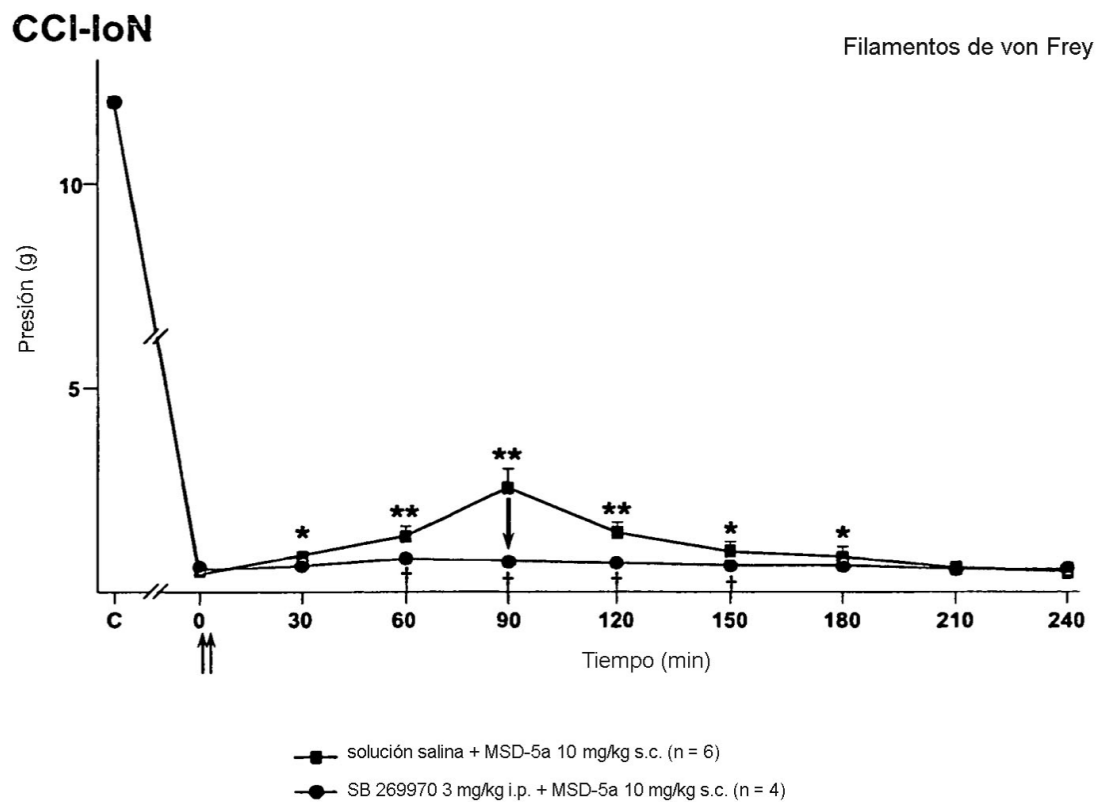


Figura 33:

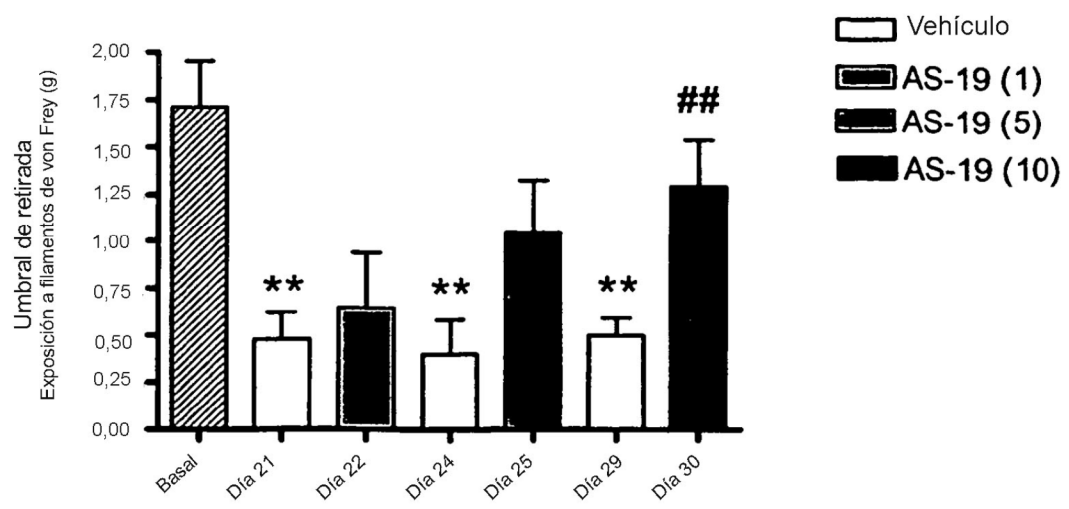


Figura 34:

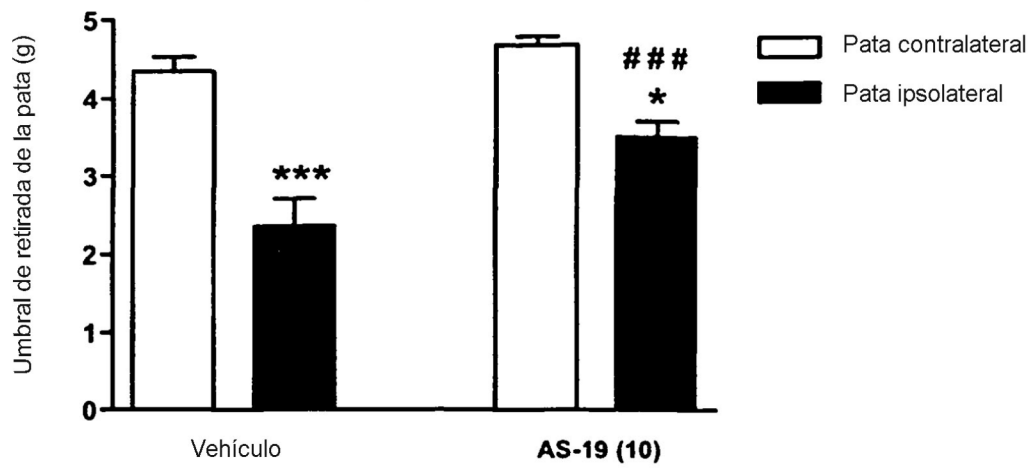


Figura 35:

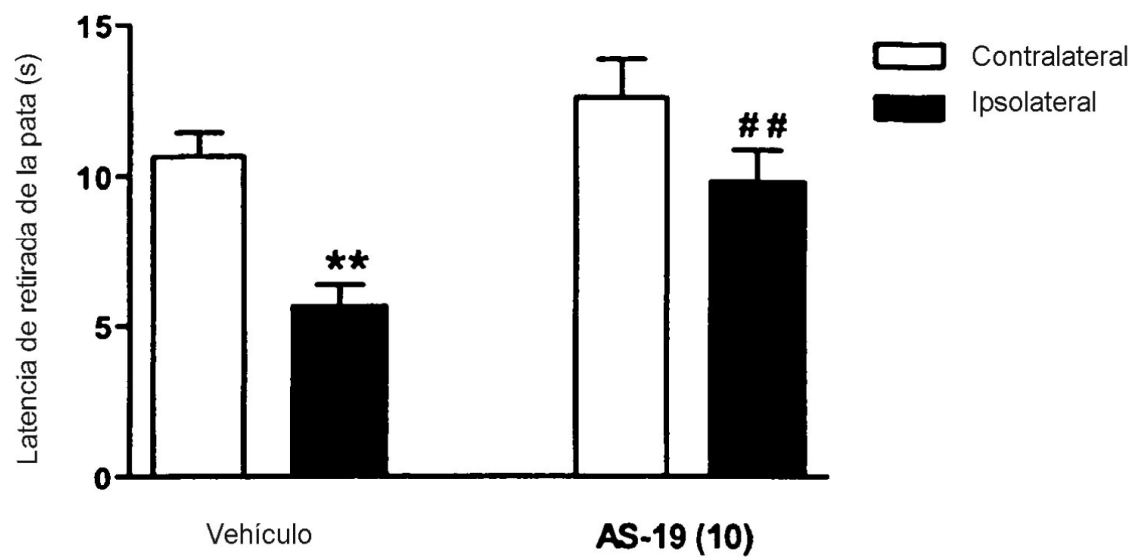


Figura 36:

