

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 463**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 23/02 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2001** **E 10180006 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013** **EP 2298306**

54 Título: **Un procedimiento de analgesia**

30 Prioridad:

18.09.2000 CN 00124517

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.12.2013

73 Titular/es:

WEX MEDICAL LIMITED (100.0%)
Unit A, 34/F, Manulife Tower, 169 Electric Road
North Point-Hong Kong, CN

72 Inventor/es:

DONG, QINGBIN y
SHUM, FRANK HAYKONG

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 435 463 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

Un procedimiento de analgesia

Campo de la invención

- 5 La presente invención presenta una composición de alivio del dolor, tal como dolor central, dolor que surge de cáncer y dolor del miembro fantasma, por administración sistémica de compuestos bloqueantes de los canales de sodio, incluyendo tetrodotoxina y saxitoxina.

Antecedentes de la invención

- 10 El dolor es una sensación que duele. Puede provocar incomodidad, malestar o sufrimiento. Puede ser constante o pulsátil. Puede ser punzante, sordo, o lancinante. Sin embargo el dolor se siente, sólo si la persona que experimenta el dolor puede describirlo o definirlo. Debido a que el dolor es tan individual, no se puede evaluar realmente el dolor por una tercera persona cualquiera.

La Organización mundial de la salud (OMS) reconoce una "escalera analgésica de tres etapas" para el control farmacológico del dolor. La escalera comienza con una dosis relativamente baja de potencia baja y continúa con dosis mayores de compuestos más potentes. Las tres etapas implican el uso de:

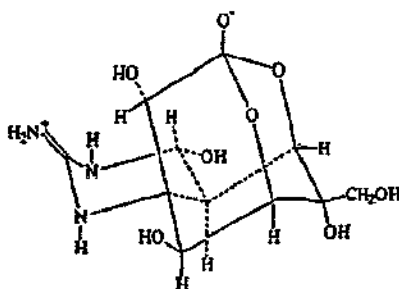
- 15 Analgésicos no opioides con o sin coanalgésicos, tales como Nonsteroid Anti-inflammatory Drugs (AINE);
- Opioides de potencia menor con o sin coanalgésicos según el dolor persista o se incremente hasta niveles moderados;
- Opioides de potencia alta con o sin coanalgésicos no opioides según el dolor persista o se incremente hasta niveles graves.

- 20 El uso de analgésicos opioides, incluso para el tratamiento de dolor grave, es controvertido en la comunidad médica debido a la posibilidad de adicción. Véase, por ejemplo, S.E. Weitz et al., New Jersey Medicine, Vol. 97: 63-67 (2000).

La tetrodotoxina es una neurotoxina no proteinácea que se encuentra en múltiples especies de animales diversos, incluyendo pez globo, gobio, tritón, ranas y el pulpo de anillos azules.

- 25 La tetrodotoxina se puede obtener a partir de los ovarios y huevos de varias especies de pez globo del suborden *Gymnodontes*. La tetrodotoxina es el agente de la intoxicación que se produce con el consumo de pescado fugu mal preparado en bares de sushi. La tetrodotoxina también se puede obtener a partir de tritones de California del género *taricha*.

- 30 Una actividad biológica de la tetrodotoxina es la unión de los canales de sodio neuronales y alfa. La tetrodotoxina tiene una fórmula química de $C_{11}H_{17}N_3O_8$, y tiene un peso molecular de 319,28. The Merck Index, 10^a Ed. (1983), establece que la tetrodotoxina es el nombre genérico para el compuesto octahidro-12-(hidroximetil)-2-imino-5,9:7,10a-dimetano-10aH- (1,3)dioxocino(6,5-d)-pirimidin-4,7,10,11,12-pentol, que tiene la siguiente estructura:



- 35 The Merck Index, 10^a Ed. (1983), establece que la tetrodotoxina también se denomina maculotoxina, esferoidina, taricatoxina, tetrodontoxina, veneno del fugu y TTX.

- De acuerdo con la patente de los EE. UU. N.º 6.030.974, "tetrodotoxina" o "TTX" se refiere a los compuestos de amino-perhidroquinazolina que tienen la fórmula molecular $C_{11}H_{17}N_3O_8$ y a derivados de los mismos, incluyendo pero sin limitarse a anhidrotetrodotoxina, tetrodaminotoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, desoxitetrodotoxina y ácido tetrodónico (Kao). Los ejemplos de análogos de TTX incluyen análogos de TTX novedosos aislados de varios organismos, así como los sintetizados químicamente de forma parcial o total. Yotsu, M. et al. Agric. Biol. Chem., 53(3):893-895 (1989). Dichos análogos se unen al mismo sitio en la subunidad alfa de de los canales de sodio que lo hace la TTX.
- 40

Adams, et al., patentes de los EE. UU. N.º 4.022.899 y 4.029.793 pertenecen a una composición anestésica local que comprende una mezcla en un vehículo farmacéuticamente aceptable de una toxina particular, a saber tetrodotoxina o desoxitetrodotoxina, y otro compuesto, en general un compuesto anestésico local convencional o un compuesto similar que tiene propiedades de bloqueo nervioso. El anestésico local convencional puede ser una aminoacilanilida tal como lidocaína, un benzoato de aminoalquilo tal como procaína, cocaína, un aminocarbamato tal como diperodon, una N-fenilamidina tal como fenacina, una N-aminoalquilamida tal como dibucaína, una aminocetona tal como falicaína, o un aminoéter tal como pramoxina.

De acuerdo con la patente de los EE. UU. N.º 6.030.974, "saxitoxina" o "STX" se refiere a un compuesto que comprende un resto de tetrahidropurina compuesto de dos unidades de guanidina condensadas juntas en un enlace aza-cetal estable, que tiene una fórmula molecular $C_{10}H_{17}N_7O_4$ (peso mol. 299,30) y a derivados del mismo, incluyendo pero sin limitarse a hidroxisaxitoxinas y neosaxitoxina. Bower et al., Nonprotein Neurotoxins. Clin. Toxicol. 18(7): 813-863 (1981).

La tetrodotoxina y su trascendencia en el estudio de fenómenos se ha revisado por C.Y. Kao, Pharmacological Reviews, Vol. 18, N.º 2, 997-1049 (1966). Kao destaca que una de las acciones más destacadas de la tetrodotoxina en todo el animal es un debilitamiento rápidamente progresivo y marcado de todos los músculos voluntarios, incluyendo los músculos respiratorios (Kao, en 1016). Sin embargo, Kao destaca que la acción específica de la tetrodotoxina sobre el sistema nervioso central es discutible (Kao, en 1022, línea 3).

Pan et al., patente de los EE. UU. 5.846.975, divulga el uso de compuestos de quinazolina aminohidrogenados, tales como tetrodotoxina, para tratar la drogodependencia en seres humanos. Se ha demostrado que la tetrodotoxina es eficaz contra los síntomas de la abstinencia de opio, heroína, morfina, cocaína, anfetamina, dolandina, dihidroetorfina y metadona. Las cantidades eficaces para aliviar los síntomas de la abstinencia se describen en esta patente.

La tetrodotoxina se puede usar como anestésico local y es diez mil veces más potente que los no narcóticos locales usados comúnmente, como se analiza por C.Y. Kao y F.A. Fulman, J. Pharmacol., 140, 31-40 (1965). Las preparaciones de tetrodotoxina en combinación con otros anestésicos ampliamente usados se han destacado en la patente de los EE. UU. N.º 4.022.899 y la patente de los EE. UU. N.º 4.029.793.

La patente de los EE. UU. N.º 6.030.974 describe un procedimiento de producción de una anestesia local en un mamífero que experimenta dolor en una región de tejido epitelial. El procedimiento incluye administrar por vía tópica en la región en un vehículo farmacéutico adecuado, una dosis eficaz de un compuesto bloqueante de los canales de sodio de acción prolongada. El compuesto bloqueante de los canales de sodio de la patente de los EE. UU. N.º 6.030.974 puede ser una formulación de tetrodotoxina o saxitoxina en una concentración de entre 0,001 -10 mM.

Zapata et al., Pain 72:41-49 (1997) analiza la utilización de tetrodotoxina para la inhibición de la actividad ectópica neuropática en neuromas, ganglios de la raíz posterior y neuronas del asta posterior. La actividad neuronal surge del neuroma provocado por lesión mecánica, química o isquémica. Se investigó el efecto de la TTX administrada por vía intravenosa sobre la inducción neuronal por nervios ciáticos en machos. Sin embargo, las dosificaciones y los efectos estudiados por Zapata et al. se aplicaron a animales bajo anestesia y ventilación artificial, por tanto estas dosis están por encima de la dosis máxima tolerada y la administración se realizó bajo condiciones que no son aplicables para el uso clínico destinado actualmente de la tetrodotoxina.

Aunque se ha producido una amplia investigación sobre la eficacia de la TTX y sus derivados como bloqueante de los canales de sodio y anestésico local, nunca se ha divulgado la administración sistémica de TTX pura como analgésico. Parece que no se ha descrito el potencial de TTX para aliviar el dolor que surge de la actividad en el sistema nervioso central, más bien la estimulación de nervios periféricos.

El alivio del dolor grave crónico, tal como el que surge del cáncer y el "dolor del miembro fantasma" es un tema importante en la medicina moderna. El cáncer es altamente invasivo en la población humana.

Una persona que padece cáncer experimenta con frecuencia dolor grave. Este dolor también se puede conocer como dolor central o dolor crónico. Sin embargo, no es necesario que un paciente padezca cáncer para experimentar dolor central o dolor crónico. Un tipo relacionado de dolor es el dolor del miembro fantasma. Estos tipos de dolor se han tratado por opiáceos tales como morfina. Una desventaja de la analgesia opiácea es la naturaleza adictiva de los opiáceos.

El dolor local agudo puede surgir, por ejemplo, de dolores de muelas, irritación ocular, inflamación en una región del tejido nervioso, aftas, úlceras genitales, y dolor en tejidos epiteliales provocados por quemaduras, intervención quirúrgica o inflamación.

La percepción del dolor también se puede dividir en tres áreas; procesamiento nociceptivo agudo, dolor facilitado que surge de la entrada eferente persistente (como después de lesión tisular) y dolor neuropático que surge del procesamiento alterado después de lesión nerviosa.

Algunos compuestos bloqueantes de los canales de sodio, por ejemplo, lidocaína y mexiletina, usados típicamente como anestésicos locales, también se han administrado sistémicamente. Parece que estos compuestos son

ligeramente eficaces en el bloqueo del procesamiento nociceptivo agudo, y existe algún efecto observable sobre el procesamiento espinal y la liberación de sustancia P, lo que indica efectos sobre el dolor facilitado. Sin embargo, las dosis eficaces están por encima de la dosis máxima tolerada y por tanto los efectos secundarios han descartado el uso de estos compuestos como analgésicos sistémicos. Además, previamente se ha descubierto que los bloqueantes de los canales de sodio son totalmente ineficaces en el control del dolor neuropático. Véase, M.S. Wallace, "Calcium and Sodium channel blocking compounds for the Treatment of Pain". Clin. J. Pain, Vol. 16: S80-S85 (2000).

Se han usado varios bloqueantes de los canales de sodio tales como lidocaína y carbamazepina en el tratamiento del dolor neuropático y la neuralgia trigeminal. Estas sustancias pueden bloquear los canales de sodio para suprimir la actividad anormal de los nervios periféricos en concentraciones que no bloquean la conducción nerviosa. Sin embargo, puesto que puede provocar graves daños a la función del hígado, se debe restringir el uso de carbamazepina en mujeres en un estadio temprano de embarazo y durante el periodo de lactancia, y se debe usar con precaución en ancianos y en personas que tienen glaucoma o angiodisplasia grave. Por otra parte, la lidocaína tiene tal excitación, efecto sobre el sistema nervioso central que puede provocar temblores, escalofríos y espasmos clónicos, se considera que estos dos fármacos son inapropiados para su promoción como nuevos analgésicos para un uso sistémico. Esto ha suscitado interés en el desarrollo de otros fármacos bloqueantes de los canales de sodio.

En 1998, Rabert et al demostraron la existencia de más de un tipo de canales de sodio en las neuronas sensoriales de ganglios de la raíz dorsal (DRG) de rata. Estos canales de sodio se han distinguido en base a una sensibilidad diferencial a la TTX: un canal de sodio sensible a TTX (TTX-S) se bloquea por TTX con una CI_{50} de 1-20 nM. Un canal de sodio resistente a la TTX (TTX-R) se bloquea por TTX con una CI_{50} de ~100 μ M. Los canales de sodio rBIIA, rBII1, rSKM1, rPN1 y rPN4 son todos TTX-S, mientras que los canales de sodio rPN3/SNS son TTX-R. Además, existen dos tipos de canales de sodio en neuronas sensoriales de DRG humanas: hPN1 es un canal TTX-S y hPN3 es un canal TTX-R bloqueado por TTX con una CI_{50} = 80 μ M. Rabert también mostró que los canales de sodio en neuronas sensoriales de DRG expresan al menos dos corrientes de sodio: una corriente sensible a TTX (TTX- SI_{Na}) con una cinética de inactivación rápida y una corriente resistente a TTX (TTX- RI_{Na}) con una cinética de inactivación más lenta. No se ha perfilado el papel biológico de las dos corrientes de sodio, en tanto que numerosos estudios indicaron que las propiedades de las corrientes de TTX- RI_{Na} en ganglios de la raíz dorsal parecen muy adecuadas para contribuir a la descarga neuronal sostenida característica de la mayoría de las afecciones de dolor neuropático.

Los nociceptores son principalmente neuronas aferentes que responden a estímulos nocivos o que dañan potencialmente el tejido y son únicos entre las neuronas sensoriales porque se pueden sensibilizar. La disminución en el valor umbral y el incremento en la respuesta a un estímulo constante que son características de la sensibilización de los nociceptores se cree que son la base de la hiperalgesia o del dolor con palpación asociado con la lesión tisular. Los agentes liberados en el sitio de la lesión tisular sensibilizan los nociceptores iniciando una cascada de acontecimientos que probablemente dan como resultado un cambio en la conductancia iónica del terminal del nociceptor periférico. Se sabe que las neuronas sensoriales de diámetro pequeño en el DRG expresan una actividad del canal TTX-R. Una variedad de lesiones inflamatorias y daños directos a las fibras neuronales sensoriales producen una disminución en los valores umbrales de la activación de las neuronas sensoriales, mientras que la activación prolongada de las neuronas sensoriales puede dar lugar a una sensibilización central a la entrada nociva dentro de la médula espinal. Cuando las neuronas sensoriales estaban altamente excitadas, la actividad de los canales de sodio y la corriente de sodio activada por voltaje se incrementaron significativamente. Recientes estudios numerosos sugieren que el incremento de TTX- RI_{Na} puede desempeñar un papel significativo en la hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales. Un incremento en TTX- RI_{Na} puede contribuir a dolor agudo y crónico muy variado tal como dolor neuropático y dolor por neuroma que se indujo por inflamación y daño nervioso. Se han usado técnicas electrofisiológicas de pinzamiento zonal de membrana para estudiar los efectos de agentes hiperalgésicos que modulan TTX- RI_{Na} en neuronas de DRG de cultivos primarios. Las pruebas sugieren que la prostaglandina E_2 (PGE_2), adenosina y serotonina incrementan la magnitud de TTX- RI_{Na} , cambia su relación conductancia-voltaje en una dirección hiperpolarizada, e incrementan su tasa de activación e inactivación. En contraste, tromboxano B_2 , un producto de ciclooxigenasa que no produce hiperalgesia, no afecta a TTX- RI_{Na} . Estos resultados sugieren que un incremento en TTX- RI_{Na} subyace en el incremento en la sensibilización neuronal nociceptora inducida por agentes hiperalgésicos. La administración intratecal de oligodesoxinucleótidos sentido y antisentido (ODN), que se dirigieron contra una secuencia única de rPN3 o SNS se usaron para examinar el papel de estos canales en la hiperalgesia inducida por PGE_2 . Solo los ODN antisentido dieron lugar a una disminución en una hiperalgesia inducida por PGE_2 . La hiperalgesia inducida por PGE_2 se recuperó parcialmente 4 días después de la última inyección de ODN antisentido, y se recuperó totalmente en 7 días. Los ODN antisentido redujeron de forma selectiva y significativa la densidad de corriente de TTX- RI_{Na} en neuronas sensoriales cultivadas. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la modulación de TTX- RI_{Na} contribuye a la hiperalgesia inflamatoria.

Novakovic et al por sus estudios inmunohistoquímicos, mostraron que los canales de sodio, en especial los canales PN3, se acumularon en el sitio de lesión. La distribución subcelular de los canales PN3 también cambió después de la lesión neuropática, y la conducción nerviosa se alteró significativamente. El transporte axonal anterógrado de los canales de sodio se bloquea completamente en los modelos de dolor neuropático y dolor por neuroma, y se reduce significativamente en el modelo de lesión por constricción crónica de dolor neuropático (CCI). Debido a que los canales de sodio, que incluyen presumiblemente canales TTX-R, están siendo transportados constantemente a terminales periféricas, las alteraciones en el transporte axonal dan como resultado en última instancia la acumulación del canal en

el sitio de lesión. Se pudo observar degeneración nerviosa y posterior regeneración de muchas ramificaciones axonales nuevas en el sitio de lesión en los modelos de CCI y de neuroma. Muchas de estas ramificaciones nuevas parece que son inmunopositivas para PN3. La sobreacumulación de los canales de sodio se produce en las fibras de regeneración. La sensibilización del SNC es una característica importante del dolor neuropático. El establecimiento y el mantenimiento de la sensibilización del SNC se basan en la información de sentido llevada a cabo por las fibras nerviosas nociceptoras. En el estado de dolor, debido a que los canales TTX-R están implicados en la información de codificación del sentido del dolor, se cree que los canales TTX-R desempeñan un papel importante en la percepción central de la entrada de dolor.

En resumen, se cree que la modulación de los canales de sodio TTX-R desempeña un papel en la sensibilización de los nociceptores en el estado de dolor persistente. La distribución tisular de los canales TTX-R está restringida a una subpoblación de neuronas sensoriales con propiedades de nociceptores. Es posible que el diseño de un agente farmacoterapéutico que bloquee selectivamente los canales TTX-R será eficaz para el alivio del dolor. El hPN3 puede llegar a ser un objetivo valioso para un agente terapéutico para el tratamiento de dolor agudo y crónico.

El bloqueo de la TTX de los canales TTX-R puede contribuir a la acción antinociceptiva de TTX en animales. En modelos animales de dolor, neuromas, dolor neuropático o disestesias persistente iniciados por daño artificial a los nervios sensoriales periféricos se producen descargas ectópicas que se originan tanto en el sitio de lesión como en los ganglios de la raíz dorsal relacionados, y en consecuencia hiperexcitabilidad en las neuronas del asta posterior (DH) asociadas de la médula espinal. La TTX inhibe la actividad ectópica neuropática en neuromas, DRG, y neuronas del DH en un patrón dependiente de la dosis. Sin embargo, en la actualidad, la contribución relativa de los canales TTX-S y TTX-R a la generación de descargas ectópicas en neuromas, DRG, y neuronas del DH no está clara.

La TTX produce una acción antinociceptiva en niveles de dosis que no cambian significativamente el comportamiento de los animales. Sin embargo, a estos niveles de dosis, la TTX no modula la distribución ni la función de los canales de sodio, y TTX tampoco bloquea totalmente la conducción nerviosa en varios tipos de afecciones con dolor. Estos resultados sugieren que la TTX puede actuar de forma inesperada sobre los canales de sodio de TTX-R para producir una acción antinociceptiva.

La patente china ZL 96119454,5/1145225 divulga la administración de TTX una vez o dos veces al día en una dosis de 1 µg durante un periodo de 7-12 días o de 3 meses a pacientes con cáncer que padecen de cáncer de pulmón, hígado, linfático, de tubo digestivo, lengua, mama o hueso y que sienten dolor grave para producir analgesia.

Sumario de la invención

El dolor puede ser agudo o crónico. El dolor agudo puede ser grave, pero dura un periodo de tiempo relativamente corto. Normalmente es una señal de que el tejido corporal se está lesionando de algún modo, y en general, el dolor desaparece cuando se cura la lesión. El dolor crónico puede variar de leve a grave, y está presente en algún grado durante periodos de tiempo largos. A menudo, el dolor crónico surge en ausencia de lesiones detectables.

La TTX también es eficaz para aliviar el dolor agudo inducido por estimulación mecánica y química, e inflamación.

La tetrodotoxina (TTX) ha demostrado ser eficaz en dolores producidos por cáncer de hígado, cáncer rectal, leiomiomas, cáncer de hueso, cáncer de estómago, cáncer linfático, cáncer esofágico y otros tipos de cáncer principales. La TTX también es eficaz en el dolor central, dolor crónico y dolor de miembro fantasma.

La tetrodotoxina es eficaz en todos los dolores crónicos graves. La tetrodotoxina puede generar analgesia en un mamífero que experimente dolor agudo o crónico. El procedimiento de la presente invención incluye administrar sistémicamente (en general, a todo el cuerpo), en un vehículo farmacéutico adecuado, una dosis eficaz de un compuesto bloqueante de los canales de sodio de acción prolongada, es decir, tetrodotoxina.

La TTX se administra en un intervalo de dosificación de 0,1-1 µg/kg. La TTX se administra en una pauta de dosis de hasta 4 dosis por día durante un periodo de tiempo de 3 días. Con frecuencia, la eficacia de la dosis dura hasta 20 días. Normalmente, la pureza de la TTX es de un 96 % o superior.

La saxitoxina (STX) es un compuesto bloqueante de los canales de sodio altamente selectivo y altamente activo. De acuerdo con la patente de los EE. UU. 6.030.974, tanto TTX como STX se unen específicamente a un sitio en una región extracelular de una subunidad alfa de los canales de sodio. El sitio está en una región SS1 o bien en una región SS2 (Evans, Tetrodotoxin, Saxitoxin, and Related Substances: Their Applications in Neurobiology, International Review of Neurobiology, Vol. 15, p. 83-166, 1972, Academic Press).

La DL₅₀ de saxitoxina para ratones por inyección intraperitoneal es de 10 µg/kg (Schantz, E. J., McFarren, E. F., Schaeffer, M. L. y Lewis, K. H.: Purified shellfish poison for bioassay standardization. J. Assoc. Official Agric. Chem. 41: 160-168, 1958.); en ratas, la DL₅₀ intraperitoneal es de 10,5 microgramos/kg (Watts, J. S., DaCosta, F. y Reilly, J.: Some factors influencing the action of paralytic shellfish poison in rats. Fed. Proc. 24: 392, 1965); la dosis letal humana estimada (oral) de entre 300 µg a 1,0 mg (Bower et al., Clin. Toxicol., 18(7):813-863, 1981).

En vista del modo de acción y toxicidad similares de TTX y STX, las dosificaciones de las dos toxinas para analgesia

también son similares.

Descripción detallada de la invención

El dolor se puede originar por muchos motivos. Una causa familiar es un traumatismo, tal como un esguince o una lesión muscular o un hueso roto o por intervención quirúrgica. También es familiar para muchos el dolor debido a inflamación, tal como un dolor de muelas. La cefalea es una experiencia común y surge a menudo por motivos desconocidos.

Los pacientes con cáncer pueden tener dolor por una variedad de motivos. Puede deberse a los efectos de cáncer en sí, o podría ser el resultado de procedimientos de tratamiento. Por ejemplo, después de una intervención quirúrgica una persona siente dolor como resultado de la operación en sí. No todas las personas con cáncer tienen dolor, y los que sí lo tienen no sienten dolor todo el tiempo.

El dolor por cáncer puede depender del tipo de cáncer, del estadio (extensión) de la enfermedad, y del valor umbral de dolor del paciente (tolerancia al dolor). El dolor por cáncer que dura unos pocos días o más puede resultar de:

- El tumor que provoca presión en órganos, nervios o el hueso.
- Circulación sanguínea mala debido a que el cáncer ha bloqueado vasos sanguíneos.
- Bloqueo de un órgano o un tubo en el cuerpo.
- Metástasis- células cancerosas que se han extendido a otros lugares en el cuerpo.
- Infección o inflamación.
- Efectos secundarios de quimioterapia, tratamiento por radiación o intervención quirúrgica.
- Rigidez por inactividad.
- Respuestas psicológicas a la enfermedad tales como tensión, depresión o ansiedad.

La diferencia entre dolor agudo y crónico se analiza por Joseph T. Dipiro, "Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach", Tercera edición, Appleton & Lange (1997) p. 1263. Dipiro explica que el dolor agudo puede ser un proceso fisiológico útil que alerta a los individuos de estados de enfermedad y de situaciones potencialmente perjudiciales. Desafortunadamente, el dolor grave, persistente, tratado inadecuadamente, cuando ha perdido su utilidad biológica, puede producir muchos efectos perjudiciales tales como problemas psicológicos. Cuando el dolor no se trata eficazmente, el estrés y reacciones reflejas concurrentes a menudo provocan hipoxia, hipercapnia, hipertensión, actividad cardíaca excesiva, y dificultades emocionales permanentes. Los problemas asociados con estas reacciones varían desde un tiempo de recuperación prolongado hasta la muerte.

En condiciones normales, el dolor agudo se calma rápidamente a medida que el proceso de curación disminuye los estímulos que producen el dolor. Sin embargo, en algunos casos el dolor puede persistir durante meses hasta años, lo que da lugar a un estado de dolor crónico con características bastante diferentes de las del dolor agudo. Típicamente, el dolor crónico se divide en cuatro subtipos: dolor que persiste más allá del tiempo de curación normal para una lesión aguda, dolor relacionado con una enfermedad crónica, dolor sin causa orgánica identificable, y dolor que implica dolor tanto agudo como crónico asociado con cáncer. Los pacientes con dolor crónico a menudo desarrollan problemas psicológicos graves provocados por miedo y recuerdo de dolor pasado. Además, los pacientes con dolor crónico pueden desarrollar dependencia y tolerancia a analgésicos, tienen problemas para dormir, y reaccionan más fácilmente a cambios ambientales que pueden intensificar el dolor y la respuesta al dolor. La diferenciación entre los estados de dolor crónico y agudo es muy importante debido a que las técnicas de control son diferentes.

El dolor agudo y crónico se puede clasificar también por su duración. El dolor agudo dura o se prevé que dure menos de 1 mes, por ejemplo, dolor postoperatorio. El dolor crónico se define normalmente como dolor que persiste más de 1 mes, por ejemplo, dolor por cáncer y dolor por miembro fantasma.

El National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health (<http://healthlink/mcw.edu/article/921391401.html>; 29 de junio de 2000) describe un síndrome de dolor central como una afección neurológica provocada por daño específicamente en el sistema nervioso central (SNC) - cerebro, tronco encefálico o médula espinal. El dolor es estacionario y se describe normalmente como una sensación de quemazón, dolor sordo, o corte. De forma ocasional, pueden existir ráfagas breves, intolerables de dolor fuerte.

El dolor central se caracteriza por una mezcla de sensaciones de dolor, siendo el más prominente una quemazón constante. Mezcladas con la quemazón están sensaciones de frío, cosquilleo como "hormigueo", y proximidad nerviosa (como la de una sonda dental en un nervio expuesto). La sensación de quemazón estacionaria se incrementa significativamente por cualquier toque ligero. A los pacientes se les entumecen de algún modo las áreas afectadas por este dolor de quemazón. Normalmente, la quemazón y la pérdida de reconocimiento del tacto son más graves en las partes distantes del cuerpo, tales como los pies o las manos. El dolor puede ser de moderado a grave en intensidad y a menudo está exacerbado por el movimiento y cambios en la temperatura, normalmente temperaturas frías.

El síndrome del dolor central se puede meses o incluso años después de una lesión o daño en el SNC. El trastorno se produce en pacientes que tienen, o han tenido, apoplejías, esclerosis múltiple, amputaciones de extremidades, o lesiones en el cerebro o la médula espinal.

En general, las medicaciones para el dolor proporcionan poco o ningún alivio para los que están afectados por el síndrome de dolor central. Los pacientes se deben sedar y el sistema nervioso se debe mantener en calma y lo más libre de estrés como sea posible. El síndrome de dolor central no es un trastorno mortal. Pero para la mayoría de los pacientes, el síndrome provoca un dolor intratable.

- 5 La mejor forma de controlar el dolor es tratar su causa. Por ejemplo, siempre que sea posible, la causa del dolor por cáncer se trata retirando el tumor o disminuyendo su tamaño. Para realizar esto, el médico puede recomendar una intervención quirúrgica, tratamiento por radiación o quimioterapia. Cuando no se puede realizar ninguno de estos procedimientos, o cuando se desconoce la causa del dolor, se usan procedimientos de alivio del dolor.

- 10 En el pasado, los analgésicos se diferenciaban como periféricos (por ejemplo, aspirina, acetaminofeno) y analgésicos de acción central (opioides). Debido a la mejor comprensión actual del alivio del dolor y de los analgésicos, ahora es está más aceptado diferenciar entre analgésicos no opioides y opioides.

A menudo, los analgésicos no opioides son eficaces para el dolor leve a moderado y en el tratamiento del dolor que surge de artritis reumatoide. Los analgésicos no opioides típicos son aspirina, acetaminofeno y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, ibuprofeno, piroxicam, y naproxeno.

- 15 Opiode (u opiáceo) es un término general para las sustancias naturales o sintéticas que se unen a receptores opioideos específicos en el sistema nervioso central produciendo una acción agonista. Los analgésicos opioides son extremadamente útiles en el control del dolor agudo grave, dolor postoperatorio y dolor crónico incluyendo dolor por cáncer. Los analgésicos opioides típicos son codeína, morfina, metadona y fentanilo.

- 20 Los procedimientos de alivio de dolor por cáncer tradicionales incluyen el uso de opiáceos tales como codeína, hidromorfona (Dilaudid), levorfanol (Levo-Dromoran), metadona (Dolophine), morfina, oxycodona (en Percodan), y oximorfona (Numorphan). Se pueden tomar por la boca (por vía oral, o PO), por inyección (por vía intramuscular, o IM), a través de una vena (por vía intravenosa, o IV), o por supositorio rectal. Además, existen otros procedimientos de proporcionar medicinas para el dolor para un alivio del dolor más continuo. No todos los narcóticos están disponibles en cada una de estas formas.

- 25 Los AINE similares a ibuprofeno (en dosis mayores, el ibuprofeno requiere una prescripción) se usan para el tratamiento de dolor por cáncer. En este grupo de analgésicos están incluidos Motrin, Naprosyn, Nalfon y Trilisate. Son útiles para el dolor moderado a grave. Pueden ser especialmente eficaces en el tratamiento del dolor por metástasis ósea.

- 30 Se cree que la tetrodotoxina no es un agonista opioideo puesto que no se une a receptores opioideos específicos en el SNC (sistema nervioso central) produciendo una acción agonista. La tetrodotoxina es un bloqueante de los canales de sodio específicos. Los bloqueantes de los canales de sodio se usan como anestésicos locales, por ejemplo, lidocaína. Es evidente que la tetrodotoxina no es un agonista opioideo y por lo tanto se puede asignar a la clase de los analgésicos no opioides. Como resultado, la tetrodotoxina tiene el potencial de ser no opioide muy fuerte sin riesgo de adicción.

- 35 Los inventores han descubierto que la tetrodotoxina (TTX), sus análogos y derivados son eficaces en dolores producidos por cánceres tales como cáncer de hígado, cáncer rectal, leiomiomasarcoma, cáncer de hueso, cáncer de estómago, cáncer linfático, cáncer esofágico y otros tipos de cáncer principales. La tetrodotoxina y sus análogos y derivados son eficaces en el alivio del dolor en seres humanos y otros mamíferos que resulta de neoplasia maligna (cánceres) u otros tumores. Estos cánceres se pueden producir en órganos genitales (incluyendo próstata), sistema digestivo (incluyendo estómago, colon), mama, sistema respiratorio (incluyendo pulmón y bronquios), sistema urinario, linfoma y cáncer de piel.

- 45 Una persona a la que se le ha amputado un brazo o pierna mediante una intervención quirúrgica todavía puede sentir dolor u otras sensaciones desagradables como si vinieran del miembro ausente. Los médicos no están seguros de por qué se produce, pero el dolor por miembro fantasma es real; no es imaginario. Esto también se puede producir si a una paciente se le ha extirpado una mama, dando como resultado una sensación de dolor en la mama que falta.

No hay un único procedimiento de alivio del dolor que controle el dolor por miembro fantasma en todos los pacientes en todo momento. Se han usado muchos procedimientos para tratar este tipo de dolor, incluyendo medicina para el dolor, tratamiento físico, y estimulación nerviosa. La tetrodotoxina administrada de acuerdo con el procedimiento de la invención proporciona alivio del dolor asociado con el dolor por miembro fantasma.

- 50 Puesto que la tetrodotoxina tiene una actividad fisiológica alta, toxicidad fuerte y un valor umbral de seguridad bajo, es necesario controlar de forma exacta y precisa la formulación y la dosificación. Varios procedimientos informados en la literatura para la determinación de tetrodotoxina incluyen medida biológica, espectrofotometría UV, fluorometría, cromatografía de gas, cromatografía líquida, etc. Todas las técnicas tienen sus ventajas y limitaciones. El procedimiento de medida biológica es muy sensible y se considera una técnica factible. Sin embargo, también tiene deficiencias como una mala reproducibilidad, muchos factores influyentes, gran variación entre animales de prueba, y deficiencia de objetividad. La CCF tiene una cantidad de muestra relativamente grande (20 µg) y un límite de detección bajo. El procedimiento de fluorometría requiere un espectrofotómetro. La espectrofotometría UV no puede separar la

tetrodotoxina de impurezas relacionadas, y su exactitud es mala. La CG y el procedimiento de electroforesis también tienen sus limitaciones, respectivamente.

5 Puesto que proporciona una alta especificidad, alta sensibilidad, y puede proporcionar identificación y determinaciones sobre el contenido simultáneamente, la HPLC se usa como el procedimiento de detección principal para la determinación del contenido. Por experimentación rutinaria conocida por el experto en la técnica, la fase estacionaria, las fases móviles y las condiciones de detección se optimizan para establecer un procedimiento de separación y detección fiable. Como resultado, la tetrodotoxina y las principales sustancias relacionadas se pueden separar bien. Los procedimientos de HPLC proporcionan una sensibilidad de detección alta, conveniencia de operación y reproducibilidad de sonido.

10 La tetrodotoxina útil en el procedimiento de la presente invención se puede obtener a partir de tejidos animales, tales como órganos del pez globo.

Una descripción detallada de un procedimiento para la producción de tetrodotoxina y derivados de la misma se proporciona en la solicitud china n.º 00124516.3, presentada el 18 de septiembre de 2000.

15 Los análogos típicos de TTX poseen sólo de 1/8 a 1/40 de toxicidad de TTX, en base a un bioensayo en ratones. Se ha observado que los análogos producen una acción analgésica de unión, y no interaccionan de forma adversa.

La invención concierne a todos los compuestos bloqueantes de los canales de sodio tales como tetrodotoxina y saxitoxina. Se puede usar Chiriquitoxina (CTX). También son eficaces análogos de tetrodotoxina tales como 4-epi-tetrodotoxina, y anhidro-4-epi-tetrodotoxina.

20 La tetrodotoxina o TTX se refiere al compuesto amino perhidroquinazolina que tiene la fórmula molecular $C_{11}H_{17}N_3O_8$ y a derivados del mismo, incluyendo anhidrotetrodotoxina, tetrodaminotoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, desoxitetrodotoxina y ácido tetrodónico. Los ejemplos de análogos de TTX incluyen análogos de TTX novedosos aislados de otros organismos, así como los sintetizados químicamente de forma parcial o total. Véase, por ejemplo, Yotsu, M. et al. Agric. Biol. Chem., 53(3):893-895 (1989). Dichos análogos se unen al mismo sitio en la subunidad alfa de los canales de sodio que lo hace la TTX.

25 La saxitoxina o STX se refiere a un compuesto que comprende un resto de tetrahidropurina compuesto de dos unidades de guanidina condensadas juntas en un enlace aza-cetal estable, que tiene una fórmula molecular $C_{10}H_{17}N_7O_4$ (peso mol. 299,30) y a derivados del mismo, incluyendo pero sin limitarse hidroxisaxitoxinas y neosastoxina. Bower et al., Nonprotein Neurotoxins, Clin. Toxicol. 18(7): 813-863 (1981).

30 Los compuestos preferentes para su uso en la invención son tetrodotoxina, 4-epi-tetrodotoxina, y anhidro-4-epi-tetrodotoxina.

Las vías de administración de tetrodotoxina pueden incluir inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, sublingual, parche transdérmico, ingestión oral, bomba osmótica implantable, implantes de colágeno, aerosoles o supositorio. Las vías de administración, la dosificación y la pauta de administración se muestran en la tabla 1.

35 Tabla 1. Administración de tetrodotoxina.

Vía de administración	Dosis (μ g/50 kg del sujeto)	Pauta
Inyección intramuscular	5-50	4 ~ 2/día
Inyección intravenosa	5-30	3 ~ 2/día
Inyección subcutánea	5-50	4 ~ 2/día
Sublingual	5-30	3 ~ 2/día
Parche transdérmico	5-60	4 ~ 2/día
Ingestión oral	5-30	3 ~ 2/día
Bomba osmótica implantable	30-60	1
Implantes de colágeno	30-60	1
Aerosol	5-50	4 ~ 2/día
Supositorio	5-30	3 ~ 2/día

Típicamente, el ingrediente activo tetrodotoxina o saxitoxina se formula en agua purificada o en un tampón de ácido acético-acetato de sodio como vehículo. Sin embargo, la formulación puede contener otros componentes, incluyendo medios tamponadores para mantener o ajustar el pH, tales como tampones de acetato, tampones de citrato, tampones

de fosfato y tampones de borato; agentes que incrementan la viscosidad tales como alcohol polivinílico, celulosas, tales como hidroxipropilmetilcelulosa y carbómero; conservantes, tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, acetato de fenilmercurio y nitrato de fenilmercurio; ajustadores de tonicidad, tales como cloruro de sodio, manitol y glicerina; y potenciadores de penetración, tales como glicoles, ácido oleico y alquilaminas. También es posible la adición de un vasoconstrictor a la formulación. También son posibles formulaciones de combinación incluyendo el compuesto bloqueante de los canales de sodio de acción prolongada y un antibiótico, un fármaco antiinflamatorio esteroideo o no esteroideo y/o un vasoconstrictor.

En general, la formulación para cada vía de administración en la tabla 1, se considera conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, "Remington, the Science and Practice of Pharmacy", 19ª ed., A.R. Gennaro, ed., c. 1995 por The Philadelphia College of Pharmacy and Science, (en especial la parte 7). Como se muestra en la tabla 1, la dosis típica varía desde 5 hasta 60 µg por adulto. Una dosis más típica es de desde 20 hasta 40 µg por adulto.

La tetrodotoxina, sus análogos y derivados son eficaces en el alivio del dolor en seres humanos y otros mamíferos que resulta de neoplasia maligna (cánceres) u otros tumores. Estos cánceres se pueden producir en órganos genitales (incluyendo próstata), sistema digestivo (incluyendo estómago, colon), mama, sistema respiratorio (incluyendo pulmón y bronquios), sistema urinario, linfoma y cáncer de piel, como se muestra en los siguientes ejemplos.

Sorprendentemente, los bloqueantes de los canales de sodio han demostrado que son eficaces como analgésicos sistémicos a largo plazo para el alivio de dolor grave. También es sorprendente que se observan efectos secundarios mínimos, siendo el principal el entumecimiento en los labios y las extremidades, tras la administración sistémica. Los pacientes debilitados por dolor son capaces de volver a sus vidas casi normales durante periodos de más de 20 días después de un único curso de tratamiento con TTX. Que TTX y otros bloqueantes de los canales de sodio se puedan usar como analgésicos sistémicos que sean más eficaces que la morfina y otros analgésicos opioides en el tratamiento de dolor agudo, central y crónico dolor es totalmente inesperado.

Una cantidad de un compuesto "eficaz para el alivio del dolor" es una cantidad que da como resultado una disminución en la percepción del dolor de un paciente en 2 unidades o más en la escala numérica de la intensidad del dolor. Una cantidad que sea "muy eficaz para el alivio del dolor" es una cantidad que da como resultado una disminución en la percepción del dolor de un paciente en 4 unidades o más en la escala numérica de la intensidad del dolor. Una cantidad de un compuesto "eficaz para eliminar el dolor" es una cantidad que da como resultado una disminución en la percepción del dolor de un paciente hasta cero en la escala numérica de la intensidad del dolor.

Referencias

1. Ran HP, Bevan SJ, Dray A. Nociceptive peripheral neurones: cellular properties. In: Wall PD, Melzack R., editors. Textbook of pain, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994; 57-78.
2. Woolf CJ, Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold A β -fibre inputs. Current opinion in Neurobiology 1994; 4:525-534.
3. Dray A. Tasting the inflammatory soup: the role of peripheral neurones. Pain Reviews. 1994; 1:153-173.
4. Rabert DK, Koch BD, Ilnicka M, et al. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPH3/SCN 10A. Pain 1998; 78:107-114.
5. Catterall WA, Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels, Physiol Rev. 1992; 72:s15-s18.
6. Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons, Nature, 1996; 379:257-262.
7. Gold MS, Reichling DB, Shuster MI, Levine JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. Proc. Natl Acad Sci. USA, 1996; 93:1108-1112.
8. Khasar SG, Gold MS, Levine JD, A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat, Neuroscience letters, 1998; 256:17-20.
9. Novakovic SD, Tzoumakas E, McGivern JG, et al. Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions, J. Neuroscience, 1998; 18:2174-2187.
10. Omana-zapata I, Khabbaz MA, Hunter JC, et al. Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons, Pain, 1997; 72:41-49.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: formulación

El compuesto farmacéutico formulado usado en el estudio clínico del ejemplo 2 es tetrodotoxina para inyección. La formulación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Formulación de tetrodotoxina.

Tetrodotoxina	15 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético - acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua para inyección, añadir hasta	1000 ml

El cálculo de la dosificación de la formulación de TTX para inyección se basa en los resultados de estudios de farmacología y farmacodinámica preclínicos. El cálculo de la dosificación farmacéutica clínica se basa en la dosificación eficaz en animales. En general, se calcula como 1/5 de la dosificación animal eficaz. Se usan 50, 60 y 70 kg como pesos corporales humanos, respectivamente.

La DI_{50} (mitad de la dosificación de inhibición) analgésica de TTX en la prueba de torsión inducida por ácido acético en ratones es de 2,80 µg/kg (por vía intramuscular, IM). En consecuencia, la dosificación clínica recomendada para seres humanos es de:

$$2,80 \mu\text{g/kg} \times (1/5) \times 50 (60, 70) \text{ kg} = 28,0 (33,6, 39,2) \mu\text{g}$$

La dosificación eficaz de TTX en la prueba de inflamación inducida por formalina en ratas es de 2,5 µg/mg (IM) ($P < 0,01$). En consecuencia, la dosificación clínica recomendada para seres humanos es de:

$$2,50 \mu\text{g/kg} \times (1/5) \times 50 (60, 70) \text{ kg} = 25,0 (30,0, 35,0) \mu\text{g}$$

También es posible calcular la dosificación clínica inicial en base al valor de DL_{50} . Considerando los resultados de estudios farmacodinámicos, la dosificación clínica se puede calcular como 1/50 de la DL_{50} , se usan 50, 60, y 70 kg como pesos corporales humanos, respectivamente.

En base a los resultados de los estudios farmacológicos y referencias relacionadas, la dosificación de TTX para inyección usada en el estudio clínico del ejemplo 2 es de 30 µg en 2 ml.

Ejemplo 2: estudio clínico

Se llevó a cabo un estudio clínico del 21 de septiembre al 10 de octubre de 1999 para examinar el efecto analgésico de inyección de tetrodotoxina (TTX pureza del 89 %, marca comercial TETRODIN, lote n.º 990122, Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd., Guangxi, China) en 11 personas que tenían dolor crónico por cáncer avanzado.

1.1 Objetos del estudio: Once pacientes con cáncer terminal que participaron de manera voluntaria en este estudio. Las tomografías axiales computerizadas (TAC) y el examen patológico confirmaron que todos los pacientes tenían cáncer. Todos tenían dolor moderado o grave de acuerdo con los criterios aprobados por la OMS en "evaluación del dolor".

Entre los 11 pacientes, 6 eran hombres, 5 eran mujeres. El más mayor tenía 76 años, y el más joven 26. Cinco tenían cáncer de hígado en estadio terminal. Un paciente tenía leiomiomasarcoma (sarcoma del músculo liso) acompañado de cáncer de hígado postoperatorio. Dos tuvieron recidiva postoperatoria de cáncer de estómago. Uno tuvo recidiva postoperatoria de carcinoma del esófago. Uno tuvo recidiva postoperatoria de cáncer rectal. Uno tuvo carcinoma de colon acompañado de cáncer de hígado. Todos los pacientes se unieron a este ensayo clínico de forma voluntaria.

1.2 Fármaco y dosificación: Inyección de tetrodotoxina i.m., 30 µg /2 ml. A todos los pacientes se les inyectaron por vía intramuscular 30 µg de tetrodotoxina cada vez, dos veces al día (una cada 12 horas). Esto se aplicó durante 3 días (un total de 180 µg de tetrodotoxina).

1.3 Criterios de evaluación: Después del procedimiento de evaluación clínica como se describe a continuación, se determinó el efecto analgésico de tetrodotoxina en 11 personas. Este estudio no tuvo un grupo de control de diseño; fue un ensayo abierto en el que tanto los pacientes como los médicos sabían qué fármaco se estaba usando.

Clasificación de la intensidad del dolor y procedimiento de registro:

El protocolo requirió que no se tomara ningún otro fármaco analgésico durante 24 horas antes de participar en el estudio. Ni que tampoco se tomara ningún otro fármaco analgésico durante el periodo de 3 días del uso de tetrodotoxina. Se evaluó el dolor usando la escala de intensidad numérica de la intensidad del dolor, que se describe a continuación. Inicialmente se evaluó el dolor antes de la inyección inicial de tetrodotoxina. Después de cada administración de tetrodotoxina (a las 8:00 a.m. y 8:00 p.m. cada día), un momento del equipo de investigación observó y registró la intensidad del dolor de cada paciente en los siguientes 14 intervalos de tiempo: 5 min, 10 min,

15 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h 7 h, 8 h y 12 h.

2.1 Registro del procedimiento de intensidad del dolor:

5 Para esta prueba, se usó el procedimiento recomendado por la OMS de la escala numérica de la intensidad del dolor 0-10 para calcular y registrar la intensidad del dolor de las personas en esta prueba. En resumen, los pacientes se autoevalúan su dolor en una escala numérica de 0 a 10 como se muestra a continuación y después lo informarían a un ayudante de la investigación.

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

0 = sin dolor; 1-4 = dolor leve; 5-6 = dolor moderado; 7-10 = dolor grave

Determinación del efecto analgésico

10 **3.1 Diferencia en la intensidad del dolor (DID):** La DID se calcula tomando el número de intensidad del dolor antes de la administración, y restando el número de intensidad del dolor en cada punto temporal después de la administración.

3.2 Alivio del dolor: Después de calcular la intensidad de dolor del paciente en cada intervalo de tiempo, el investigador evalúa el alivio del dolor y asigna un valor de una de las siguientes cinco elecciones.

0: sin alivio

I: alivio leve (el dolor cede aproximadamente un 25 %)

15 II: alivio moderado (el dolor cede aproximadamente un 50 %)

III: alivio significativo (el dolor cede aproximadamente un 75 %)

IV: alivio completo (el dolor desaparece completamente)

20 **3.3 Evaluación de la "calidad de vida"** : El dolor afecta a la vida normal de cada paciente y a la capacidad de continuar con su rutina diaria. En general, esto se denomina su calidad de vida. Dependiendo de la gravedad del dolor que se está experimentando por cada individuo, puede provocar que los pacientes experimenten irritabilidad, depresión y falta de apetito. El investigador debe considerar cualquier cambio en la calidad de vida del paciente, en la evaluación del efecto analgésico de cualquier nuevo fármaco. La escala numérica en la línea a continuación expresa los números de referencia altos y bajos. Cabe destacar que esta evaluación de la "calidad de vida" es un tema subjetivo y que el médico investigador se basa en las descripciones del paciente sobre cualquier cambio (antes y después de la administración de tetrodotoxina) en su calidad de vida como el medio principal de entrada para realizar esta evaluación. Los temas que se cuestionan con respecto a la calidad de vida incluyen, la actividad diaria rutinaria, las emociones, la movilidad (capacidad para caminar), el trabajo normal (incluye tanto el trabajo fuera de casa como las tareas domésticas), el estado o patrón de sueño, las relaciones con otras personas, disfrutar de la vida.

30 Se evaluó la calidad de vida por los propios sujetos antes y cada 8 horas después de la administración.

La calidad de vida incluye el estado de ánimo, la capacidad para caminar, el trabajo normal (incluye tanto el trabajo fuera de casa como las tareas domésticas), y relaciones con otras personas, sueño, y disfrutar de la vida. La escala numérica en la línea a continuación expresó el grado de interferencia de la calidad de vida.

0: No interfiere

35 1-3: Interfiere levemente

4-7: Interfiere moderadamente

8-9: Interfiere gravemente

10: Interfiere completamente

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

No interfiere

El dolor interfiere completamente

4. Resultados

4.1 Efecto analgésico : Todos los sujetos experimentaron varios grados de alivio del dolor en 30 min. después de la primera administración de tetrodotoxina. Algunos de ellos informaron de un alivio del dolor destacable en 5 min. Después de 3 días de la administración dos veces al día de tetrodotoxina, la intensidad del dolor de todos los sujetos se redujo hasta 0 en todos menos en un paciente que registró un 1. Los resultados demuestran que todos los pacientes se aliviaron totalmente de su dolor durante entre 20-30 días después de la administración final de tetrodotoxina al 3º día. Ninguno de los pacientes mostró el más ligero signo de tener algún síntoma de adicción después de los tres días de administración de tetrodotoxina.

4.2 Efecto en la calidad de vida diaria: Los pacientes informaron que su "calidad de vida" se vio afectada negativamente, de forma moderada o bien grave por el dolor provocado por su cáncer y/o su tratamiento y medicación para el cáncer. Durante los tres días de tratamiento de tetrodotoxina y durante los siguientes 20-30 días, su calidad de vida mostró mejoras distintas y drásticas que se describieron, por ejemplo, como una interferencia grave que se redujo a interferencia moderada o leve. Después de los 3 días de administración de tetrodotoxina, la mayoría de los pacientes pudo volver a una vida normal. Algunos de ellos volvieron a jugar al juego popular mahjong (un tipo de juego de cartas chino) con personas sanas. Pudieron ir a la casa de baños a bañarse, una actividad que se había vuelto difícil de realizar debido al dolor y a la angustia provocada por el cáncer. Uno de ellos realizó un viaje largo desde Harbin hasta Beijing en tren.

4.3 Efectos secundarios: 10-20 min después de la administración, todos los pacientes sintieron entumecimiento o cosquilleo en sus labios, la punta de la lengua, extremos de los dedos de manos y pies. Estos síntomas duraron casi aproximadamente 30 min., después desaparecieron sin ningún tratamiento. Dos pacientes que tenían un largo historial de uso de dolantina experimentaron náuseas leves a moderadas acompañadas de vómitos leves después sólo de la primera inyección de tetrodotoxina. En la segunda inyección, estos síntomas no aparecieron. La presión sanguínea de algunos de los pacientes disminuyó 10-15 mm Hg, que volvió a lo normal 40-50 min después sin ningún tratamiento. Uno de los pacientes (sólo después de la primera inyección) mostró taquicardia con vómitos, esto también desapareció 10-15 minutos después, sin necesidad de ningún tratamiento.

5. Conclusiones

Lo siguiente se observa cuando se compara tetrodotoxina con otros fármacos analgésicos.

5.1 Se requiere una administración de tetrodotoxina menos frecuente. El paciente sólo necesita una inyección de 30 µg cada 12 horas durante hasta 3 días. Con estos pacientes, la administración de tetrodotoxina de tres días fue eficaz de inmediato en la reducción o eliminación de su dolor.

5.2 La duración corta del tratamiento de tetrodotoxina de sólo 3 días, en comparación con cualquier otro analgésico fuerte que se debe administrar de forma consistente y continua para que sea eficaz, demuestra que la tetrodotoxina tiene ventajas considerables sobre cualquier otro de los analgésicos usados actualmente.

5.3 Efecto rápido. La tetrodotoxina hace efecto 5-30 min después de la administración.

5.4 El efecto analgésico dura más. Después de 3 días de administración de tetrodotoxina dos veces al día, el efecto analgésico duró 20-30 días. Ningún paciente informó de reaparición del dolor en el periodo del cuarto al vigésimo día. En la mayoría de los casos el alivio del dolor fue eficaz para todo el periodo de monitorización de 30 días.

5.5 No se produjeron signos de adicción ni de abstinencia durante o después del tratamiento con tetrodotoxina. Todos los demás analgésicos narcóticos actuales son altamente y tienen efectos secundarios nocivos.

5.6 Efectos secundarios leves. Los sujetos sólo tuvieron efectos secundarios leves, tales como presión sanguínea baja, náuseas y vómitos. Todos los efectos secundarios desaparecieron sin ningún tratamiento en de 15 a 60 minutos.

5.7 La tetrodotoxina también produjo una desintoxicación evidente en los pacientes que tenían dependencia de dolantina.

5.8 La tetrodotoxina mejora la condición de los pacientes con cáncer durante su tratamiento. La tetrodotoxina no tiene ningún efecto directo sobre cualquiera de los cánceres en sí. Sin embargo, se observó que el estado general de salud y la actitud mental de los pacientes mejoró sustancialmente a medida que se veían aliviados del dolor de su cáncer.

Resultados de los casos individuales

Caso 1

El Sr. Gao es un varón de 44 años de edad. Desarrolló dolor abdominal y se le diagnosticó dolor del músculo liso en la pared abdominal posterior por lo que se sometió a un procedimiento quirúrgico. Un año después, volvió a tener dolor

en el abdomen y se le operó de nuevo. El examen patológico de la segunda operación reveló que había desarrollado un sarcoma de músculo liso (leiomiomasarcoma), después de descubrir que este sarcoma se había extendido a su hígado y que ahora requería y recibía tratamiento anti-cáncer (quimioterapia). Se le empezó a inyectar Dolantina, porque no podría resistir el dolor grave en su abdomen. Necesitó que se le inyectara Dolantina al menos 3 veces por día. Inicialmente, recibió Dolantina por inyección intramuscular, y finalmente necesitó el uso de inyección intravenosa para que la Dolantina hiciera efecto más rápido. Justo antes de que recibiera el tratamiento con tetrodotoxina, había recibido más de 100 inyecciones de Dolantina en el mes previo. Al principio, cuando dejó de usar Dolantina, experimentó síntomas de abstinencia similares a los de la morfina, tales como debilidad y dolor en todo el cuerpo, temblequeo al ponerse de pie y dificultad para andar. Recibió de forma voluntaria el tratamiento de tetrodotoxina. Su escala de intensidad del dolor era de 8 antes del uso de tetrodotoxina. 5 minutos después de la primera inyección de tetrodotoxina, su intensidad del dolor en la escala de 0 a 10 disminuyó hasta 0. Después de 3 días de tratamiento, era capaz de ir a la casa de baños para bañarse por sí solo. Fue a casa de un amigo a jugar al mahjong. Hasta la fecha de este informe, hace una vida normal y continua sintiéndose bien sin ningún dolor.

Caso 2

El Sr. Zhang es un varón de 26 años de edad. Sentía dolor en el área del hígado y se le diagnosticó cáncer de hígado avanzado. Su enfermedad avanzó hasta el punto de que no podía resistir el dolor abdominal grave y la distensión abdominal. Comenzó a usar Dolantina y otros calmantes para aliviar su dolor. Recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Antes de la primera administración de tetrodotoxina, su intensidad del dolor en la escala de 0 a 10 era de 8. Al segundo día de la inyección de tetrodotoxina, su intensidad del dolor se redujo hasta 0. Su calidad de vida también mejoró significativamente. Después de completar el tratamiento de 3 días, viajó en tren desde Harbin a Beijing para un tratamiento adicional de su cáncer.

Caso 3

La Sra. Xie es una mujer de 76 años de edad. Se le diagnosticó cáncer rectal y se sometió a intervención quirúrgica en 1996. En 1998, su cáncer rectal se extendió a su hígado. Su dolor se incrementó hasta el punto de que empezó a tener dificultades para tratar el dolor. Recibió de forma voluntaria el tratamiento de tetrodotoxina. Su escala de intensidad del dolor se redujo hasta 0 de 6, en los 20 minutos después de la primera inyección de tetrodotoxina. La puntuación de su calidad de vida también disminuyó hasta 6 de 10 después de la primera inyección de tetrodotoxina. Al final de los 3 días de tratamiento con tetrodotoxina, recuperó lo que ella consideraba su estilo de vida normal.

Caso 4

El Sr. Jin es un varón de 63 años de edad. Padecía de cáncer de hígado durante 8 años. En los últimos 6 meses, su dolor se había intensificado hasta el punto en que no podía aliviar su dolor mediante el uso de otros calmantes. Recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Su escala de intensidad del dolor disminuyó hasta 0 de 7 al segundo día del tratamiento de tetrodotoxina. Su calidad de vida también mejoró significativamente.

Caso 5

A la Sra. Duang, mujer de 46 años de edad, se le diagnosticó lumbago, después de lo cual los síntomas asociados al lumbago empeoraron gradualmente. Los calmantes fueron eficaces para controlar el dolor de su lumbago. Seis meses antes de esta prueba, comenzó a experimentar dolor en su pierna izquierda que se hizo cada vez más grave. Se le prescribieron calmantes progresivamente más fuertes, Tramadol, Pentazocina y Dolantina durante estos seis meses. Durante estos mismos seis meses, se le diagnosticó cáncer que inicialmente era de hígado, y había metastatizado a cáncer de hueso. El cáncer de hueso estaba situado en las vértebras L₃, L₄ y T₁₁ y quedaba de manifiesto por la presencia de lesiones osteolíticas. La Sra. Duang recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Inmediatamente antes de iniciar el tratamiento de tetrodotoxina, la intensidad del dolor en la escala de 0 a 10 era de 9. Diez minutos después de la primera inyección de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor disminuyó hasta 7, y 20 minutos después de la primera inyección, la intensidad de su dolor disminuyó hasta 2. A la finalización de los 3 días de tratamiento con tetrodotoxina su dolor se eliminó completamente.

Caso 6

La Sra. Li es una mujer de 72 años de edad que experimentó distensión abdominal y falta de apetito. Después de que un tratamiento inicial no hiciera efecto, se le realizó una exploración por ecografía del abdomen y se le diagnosticó que tenía cáncer de hígado. Parecía que su cáncer se alivió después del tratamiento por quimioterapia, pero su distensión abdominal y su dolor abdominal empeoraron. Al inicio del uso de prueba de tetrodotoxina, los calmantes que estaba usando no podían aliviar su dolor. Recibió de forma voluntaria el tratamiento de tetrodotoxina en un intento de reducir su dolor. Antes de la administración de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor en la escala de 0 a 10 era de 7. Diez minutos después de que recibiera su primera inyección de tetrodotoxina, su escala de intensidad del dolor se redujo hasta 0. Después de 3 días de tratamiento con tetrodotoxina, pudo continuar con su vida como si hubiera recuperado la normalidad.

Caso 7

5 El Sr. Li es un varón de 36 años de edad al que se le diagnosticó cáncer de hígado avanzado. El dolor en la región de su hígado se había incrementado hasta el punto de que su dolor no se veía aliviado por inyecciones intramusculares de Dolantina. Recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Antes de la administración de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor en la escala de 0 a 10 era de 7. Veinte minutos después de que recibiera su primera inyección de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor se redujo hasta 3. Después de la tercera inyección de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor se estabilizó en 0. Después de 3 días de tratamiento, su calidad de vida mejoró significativamente, logrando una interferencia de 0.

Caso 8

10 El Sr. Cheng es un varón de 60 años de edad. Se le diagnosticó adenocarcinoma mucinoso del estómago se sometió a una intervención quirúrgica para eliminar el cáncer. Tres meses después de la operación, se le dilató el abdomen y comenzó a experimentar dolor abdominal grave. Un TAC mostró que además el cáncer se había extendido ampliamente a sus pulmones, hígado, cavidad abdominal y ganglios linfáticos. Recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Antes de la primera administración de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor en la escala de 0 a 10 era de 8. Veinte minutos después de la inyección de tetrodotoxina su escala de intensidad del dolor se redujo hasta 0.
15 Después de 3 días de tratamiento, recuperó lo que él consideraba una vida normal.

Caso 9

20 El Sr. Shi es un varón de 59 años de edad. Se le diagnosticó carcinoma de esófago después de un año de dolor retroesternal consistente que finalmente se convirtió en disfagia. Esta era tan grave en el último mes que le estuvo provocando vómitos después de comer. Después de someterse a una intervención quirúrgica para eliminar el cáncer, su dolor era grave y no se aliviaba con las inyecciones regulares de Dolantina que se le prescribieron. Recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Antes de su primera administración de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor en la escala de 0 a 10 era de 8. Después de la segunda inyección de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor se redujo hasta 0. Después de los 3 días de tratamiento de tetrodotoxina, recuperó lo que él consideraba una vida normal.

Caso 10

25 La Sra. Liu es una mujer de 69 años de edad a la que, tres años después de una operación para eliminar su cáncer de estómago, se le descubrió que el ganglio linfático de la parte izquierda del cuello uterino estaba hinchada. Un examen patológico mostró que el cáncer de estómago se había extendido al ganglio linfático. Durante algún tiempo antes de que recibiera de forma voluntaria el tratamiento de tetrodotoxina, su dolor se había incrementado hasta el punto de que tenía dificultad para tratarlo. Antes de la primera administración de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor en la escala de 0 a 10 era de 9. Tres horas después de la primera inyección de tetrodotoxina, su escala de intensidad del dolor se redujo hasta 2, y después de 3 días de tratamiento con tetrodotoxina, su escala de intensidad del dolor se estabilizó en 0.
30

Caso 11

35 La Sra. Tan es una mujer de 52 años de edad que sufrió una recaída de su cáncer rectal un año después de que se hubiera sometido a una intervención quirúrgica. La parte de su perineo presentaba un absceso. El dolor en la región era extremo y estaba acompañado de cefaleas y mareos a veces tan graves que no podía ni hablar. Recibió voluntariamente el tratamiento de tetrodotoxina. Antes de la primera administración de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor en la escala de 0 a 10 era de 7. Una hora después de la primera inyección de tetrodotoxina, la intensidad de su dolor se redujo hasta 0. En la finalización de los 3 días de tratamiento con tetrodotoxina recuperó lo que ella consideraba una vida normal.
40

Los resultados para los casos típicos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen del dolor por cáncer tratado con tetrodotoxina

N.º	Nombre	Sexo	Edad	Progreso de la enfermedad	Tipo de dolor	Dosificación (µg)	Tasa de dolor antes del tratamiento	Tasa de dolor después del tratamiento	Efecto(s) secundario(s)
1	Gao HM	M	44	Sarcoma del músculo liso, extendido al hígado	Dolor local, dolor en todo el cuerpo	180	8	0	Entumecimiento, náuseas, vómitos
2	Zhang BL	M	26	Cáncer de hígado terminal	Dolor de cólico, dolor por hinchazón	180	6	0	Entumecimiento
3	Xie SHQ	F	76	Cáncer rectal, extendido al hígado	Dolor sordo, dolor local, dolor en todo el cuerpo	180	6	0	Entumecimiento
4	Jin DX	M	63	Cáncer de hígado	Dolor local, dolor sordo	180	7	0	Entumecimiento
5	Duan YQ	F	46	Cáncer de hígado, extendido al hueso	Dolor punzante	180	9	1	Entumecimiento
6	Li SHQ	F	72	Cáncer de hígado	Dolor de cólico, dolor por hinchazón	180	7	0	Entumecimiento
7	Li BF	M	36	Cáncer de hígado terminal	Dolor de cólico, dolor por hinchazón	180	7	0	Entumecimiento
8	Cheng B	M	60	Cáncer de estómago	Dolor local, dolor sordo	180	8	0	Entumecimiento, náuseas, vómitos
9	Shi CHF	M	59	Recidiva postoperatoria de carcinoma de esófago	Dolor local, dolor sordo	180	8	0	Entumecimiento
10	Liu SM	F	69	Cáncer de estómago, metástasis linfática	Dolor local, dolor sordo	180	9	0	Entumecimiento
11	Tan XCH	F	52	Recidiva postoperatoria de cáncer rectal	Dolor local, dolor sordo	180	7	0	Entumecimiento

Ejemplo 3 Efectos de TTX en la nocicepción en ratas y ratones**Materiales de prueba:**

TTX, polvo puro, lote n.º 960510, suministrado por Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant, Liaoning, China. Se diluyó con agua destilada hasta las concentraciones requeridas, y se ajustó el pH con ácido acético hasta 4-5.

5 Ácido acético glacial, analíticamente puro, planta química de Beijing 52952, lote n.º 910613.

Formalina al 40 %, pureza superior, planta química de Beijing n.º 3, lote n.º 950712.

Aspirina en polvo, pureza del 99 %, Xinhua Pharmaceutical Factory, lote n.º 9205292.

Clorhidrato de morfina, Qinhai Pharmaceutical Factory, lote n.º 960804.

Animales

10 Ratones Kunming, 18-22 g, suministrados por el Animal Centre of the Chinese Academy of Medical Sciences. Certificado de calidad n.º: Jing Dong Guan Zi (1994) 029.

Ratas Wistar, 180-240 g, la mitad de cada sexo, suministradas por el Experimental Animal Department, Beijing Medical University. Certificado de calidad n.º: Jing Dong Guan Zi (1994) 092.

3.1 Prueba de contorsión inducida por ácido acético en ratones

15 Los ratones se dividieron de forma aleatoria en grupos de prueba para TTX, grupos de control positivo (Aspirina y Meperidina) y grupo de control negativo (solución salina normal). Los ratones se sometieron a ayuno durante 12 horas antes de la prueba, y se dejó que bebieran agua a voluntad. Se les dio TTX por vía s.c. o i.m., y 40 minutos después, se les dio ácido acético al 0,6 % (0,1 ml/10 g) por vía i.p. como estímulo químico. Se observó la incidencia de contorsión en los ratones y se registró en los siguientes 15 minutos. A los ratones en el grupo de solución salina normal (NS), grupo de Aspirina y grupo de Meperidina se les trató del mismo modo. Se compararon las incidencias de contorsión en los grupos de TTX con el grupo de control, y se usó la siguiente fórmula para calcular la tasa de inhibición de TTX en la contorsión:

Tasa de inhibición (%) = (la incidencia de contorsión en el grupo de control - la del grupo de TTX) / la incidencia de contorsión en el grupo de control x 100 %

25 Se calculó la dosis de inhibición media, DI_{50} , usando el procedimiento Logit.

Véanse las tablas 4 y 5 para los resultados.

Como se muestra en las tablas 4 y 5, la potencia analgésica de TTX es similar en vías de administración diferentes. El efecto analgésico de TTX fue mucho más fuerte que el de Aspirina, y fue 670 veces más fuerte que el de Meperidina.

Tabla 4. Los valores de DI_{50} de TTX, aspirina y meperidina en la prueba de contorsión de ratones (vía s.c.)

Grupos	Número de animales sometidos a prueba (n)	Incidentes de contorsión (n)	Porcentaje de inhibición (%)	DI_{50} e intervalo de confianza del 95 %
NS	20	16,7		
TTX (μ g/kg)				
1,0	20	12,5	25,2	
2,5	20	8,9	46,7	2,68
5,0	20	6,9	58,7	(2,32~3,53)
10,0	20	2,8	82,2	μ g/kg
Aspirina (mg/kg)				
100	20	15,0	18,9	
200	20	9,96	46,2	198,8
300	20	5,66	69,4	(181,7~217,5)
400	20	2,7	85,4	mg/kg

(continuación)

Grupos	Número de animales sometidos a prueba (n)	Incidentes de contorsión (n)	Porcentaje de inhibición (%)	DI ₅₀ e intervalo de confianza del 95 %
Meperidina (mg/kg)				
1,0	20	14,2	23,2	1,8(1,6~2,1)
2,0	20	8,2	55,6	mg/kg
3,0	20	6,1	67,0	
4,0	20	3,1	83,2	
5,0	20	0,31	98,3	

Tabla 5 Los valores de DI₅₀ de TTX, aspirina en la prueba de contorsión de ratones (vía im)

Grupo	Número de animales	Promedio de incidentes de contorsión	Tasa de inhibición (%)	DI ₅₀ (intervalo de confianza del 95 %)
Control NS	20	28,2	-	
TTX (µg/kg)				
1,25	20	20,9	25,9	
2,50	20	15,7	43,9	
5,00	20	9,4	66,7	2,80 (2,37~3,26) µg/kg
10,00	20	3,2	88,7	
Aspirina (mg/kg)				
100	20	22,1	21,7	
200	20	14,3	49,3	
300	20	7,2	74,4	183,8 (164,9~202,4) mg/kg
400	20	2,7	90,6	

3.2 Prueba de inflamación inducida por formalina en ratas

- 5 Las ratas Wistar se dividieron de forma aleatoria en un grupo de prueba para TTX, grupo de control positivo (Morfina) y un grupo de control negativo (solución salina normal). Las ratas se sometieron a ayuno durante 12 horas antes de la prueba, entretanto se dejó que bebieran agua a voluntad. Se usó formalina al 2,5 % como estímulo de dolor. Se inyectó TTX por vía i.m. o por vía s.c. en las ratas en dosis diferentes y a continuación se guardaron en cajas de plástico transparente de 20 cm x 20 cm x 20 cm para su observación. Cuarenta minutos después, se inyectaron 0,06 ml de
- 10 formalina al 2,5 % por vía s.c. en la superficie plantar de la pata trasera derecha de las ratas. Se observaron las respuestas de dolor de las ratas, tales como lameduras/roeduras, espasmos, y levantamientos de la pata trasera derecha, y se registraron en los siguientes 5 minutos. Se calcularon las puntuaciones de las respuestas al dolor usando la siguiente fórmula:

- 15 Puntuación de respuesta al dolor = tiempo de lamedura/roedura (s) x 3 + apariciones de espasmos x 2/3 + tiempo de levantamiento (s).

Las ratas en el grupo de solución salina normal (NS) y en el grupo de morfina se trataron de forma similar. La tasa de inhibición de TTX en las respuestas al dolor se calculó por:

Tasa de inhibición (%) = (el promedio de las puntuaciones de respuesta al dolor del grupo de control - el del grupo de TTX) / el promedio de las puntuaciones de respuesta al dolor del grupo de control x 100 %.

- 20 La mediana de la dosis de inhibición, DI₅₀, se calcula por el procedimiento Logit.

Véanse las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Los valores de DI_{50} (s.c.) de TTX y Morfina en la prueba de Formalina en ratas

Grupo	Número de animales	Puntuaciones de respuestas al dolor	Tasa de inhibición (%)	DI_{50} (IC del 95 %)
Control NS	8	237,5		
TTX (μ g/kg)				
0,3	8	186,4	21,5	
0,6	8	132,9	44	
1,25	8	72,1	69,6	0,82(0,66~1,00)
2,5	8	67,3	71,7	μ g/kg
5,0	8	41,3	82,6	
Morfina (mg/kg)				
0,6	8	210,7	11,3	
1,25	8	190,7	19,7	
2,5	8	158,2	33,4	2,63(2,32~2,98)
5,0	8	46,1	80,6	mg/kg
10,0	8	13,1	94,2	

Tabla 7. Los valores de DI_{50} (i.m.) de TTX y Morfina en la prueba de Formalina en ratas

Grupos	Número de animales	Puntuaciones de respuestas al dolor	Tasa de inhibición (%)	DI_{50} (IC del 95 %)
NS	20	203,6		
TTX (μ g/kg)				
0,25	10	152,7	25,0	0,93
0,50	10	116,0	43,0	(0,56~1,56)
2,50	10	57,2	71,9	μ g/kg
5,0	10	48,5	76,2	
10,0	10	45,9	77,5	
Morfina (mg/kg)				
2,5	10	131,2	35,6	
3,5	10	51,6	74,6	2,74
5,0	10	30,1	85,2	(2,24~3,35)
6,5	10	22,7	88,9	mg/kg
8,0	10	5,2	91,0	

Como se muestra en las tablas 6 y 7, tanto TTX como morfina tuvieron efectos analgésicos significativos en la prueba de formalina, aunque el efecto analgésico de TTX fue de 3200-2900 veces más fuerte que con morfina por inyección subcutánea e intramuscular, respectivamente.

3.3 Pruebas de retirada de la cola en ratas

Se estudiaron los efectos analgésicos de TTX y morfina en el dolor termoinducido por la prueba de retirada de la cola en ratas. Las ratas se dividieron de forma aleatoria en 7 grupos, consistiendo cada uno de 8 ratas. Las ratas se sometieron a ayuno durante 12 horas antes de la prueba, pero se dejó que bebieran agua a voluntad. Se inmovilizó una rata en un algómetro de retirada de cola, y a continuación se le aplicó un voltaje eléctrico de carga de 12 V a una lámpara como estímulo térmico en el extremo de la cola de la rata, y se registró la latencia de retirada de la cola. Cuando una rata no respondía en un periodo de 5-8 segundos, se rechazaba. La prueba se realizó después de que se inyectara la TTX. Si el valor umbral del dolor se elevaba demasiado, de modo que la rata no retiraba su cola en los 20 segundos de exposición a la estimulación, se daría por finalizada la iluminación para evitar la formación de ampollas y

el daño en la piel. En dicho caso, se consideró que la latencia era de 20 segundos.

Los resultados mostraron que la TTX, a niveles de dosis de 1,25~5,0 µg/kg, produjo efectos de analgesia pronunciados en el dolor termoinducido en la prueba de la retirada de la cola en ratas, pero no a niveles de dosis inferiores de 0,3~0,6 µg/kg. Estos efectos fueron menos potentes que con morfina (véase la tabla 8).

5 Tabla 8. Efectos de analgesia de TTX y morfina en dolores termoinducidos en la prueba de retirada de cola en ratas

Grupo	Número de animales	Tiempo de latencia (minutos)
Control de solución salina normal	8	7,6 ± 3 8
TTX (µg/kg)		
0,3	8	8,3 ± 3 7*
0,6	8	10,3 ± 4 9*
1,25	8	13,9 ± 4 2**
2,5	8	17,0 ± 3 5***
5,0	8	17,3 ± 3 8***
Morfina (mg/kg)		
5,0	8	>20

$\bar{X} \pm D.E.$

*P>0,05

**P<0,05

***P<0,01, en comparación con el grupo de control de solución salina normal.

3.4 Estudio de la relación analgésica tiempo-efecto de TTX

10 Se examinó la relación analgésica tiempo-efecto de la TTX y la aspirina administrando TTX (por vía s.c. o i.m.) y aspirina (p.o.) a dosis de dos veces sus valores de DI_{50} , 6 µg/kg y 400 mg/kg, respectivamente, en pruebas de contorsión inducida por ácido acético en ratones. Los resultados indicaron que la dosificación de TTX por diferentes vías de administración (i.m. o s.c.) produjeron resultados similares. La aparición del efecto terapéutico de TTX fue a los 15 minutos, alcanzó un efecto máximo 1 hora después de la dosificación, y su efecto analgésico duró aproximadamente 5 horas. La aspirina inició su efecto terapéutico a los 20 minutos, alcanzó un efecto máximo 30 minutos después de la dosificación, y su efecto analgésico duró aproximadamente 2 horas (véanse las tablas 9, 10, 11, 12).

15 Tabla 9 La relación tiempo-efecto de TTX en la prueba de contorsión en ratones (s.c.)

Tiempo después de dosificación (minutos)								
	15	30	60	120	180	240	300	330
AWI ¹	9,9 ± 9,4	8,7±4,0	6,0 ± 5,5	16,9 ± 14,4	7,6 ± 11,7	18,5 ± 13,4	18,6 ± 11,1	22,8± 10,1
IR ²	64,9	69,1	78,7	40,1	72,5	34,0	34,0	19,1
valor P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	> 0,05
AWI Promedio de incidencia de contorsión. Comparado con el grupo NS, 28,2±12,4. n = 20								
IR Tasa de inhibición en %								

Tabla 10. La relación tiempo-efecto de aspirina en la prueba de contorsión en ratones (i.g.)

Tiempo después de dosificación (minutos)							
	10	20	30	40	70	100	130
AWI ¹	11,4 ± 9,9	10,9 ± 10,1	1,98 ± 0,2	4,8 ± 1,1	6,3 ± 1,4	11,6 ± 2,5	11,8 ± 9,5
IR ²	38,4	41,1	89,2	74,1	65,9	37,1	36,2
valor P	> 0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	> 0,05

Promedio de la incidencia de contorsión en el grupo NS, 18,5 ± 6,4, n=20

Tabla 11. La relación tiempo-efecto de TTX en la prueba de contorsión en ratones (i.m.)

Tiempo después de dosificación (minutos)								
	15	30	60	120	180	240	300	360
AWI ¹	10,4 ± 8,2	8,0 ± 5,3	5,4 ± 4,1	15,7 ± 7,1	8,8 ± 6,1	10,5 ± 5,8	15,7 ± 5,0	22,3 ± 9,8
IR ²	63,2	71,6	80,9	44,3	68,8	62,8	44,3	20,9
valor P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	> 0,05

Promedio de la incidencia de contorsión en el grupo NS, 28,2 ± 14,3, n=20

Tabla 12. La relación tiempo-efecto de aspirina en la prueba de contorsión en ratones (i.g.)

Tiempo después de dosificación (minutos)								
	10	20	30	45	60	90	120	150
AWI ¹	19,5 ± 11,7	17,7 ± 9,2	5,5 ± 1,2	8,2 ± 2,7	10,2 ± 3,6	14,4 ± 5,8	19,3 ± 3,1	22,8 ± 9,7
IR ²	30,8	37,2	80,6	70,9	63,8	49,0	31,6	19,3
valor P	> 0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	> 0,05

5 Promedio de la incidencia de contorsión en el grupo NS, 28,2 ± 14,3, n=20

Ejemplo 4: Estudio de dependencia física con TTX en ratones, ratas y monos

Se estudió el potencial de dependencia física de tetrodotoxina (TTX) en tres especies de animales y cuatro modelos animales. Se usaron ratones Kuiming, ratas Wistar y monos Guangxi (subespecie de mono Rhesus) en este estudio.

10 Peso corporal:

Ratas: 190-230 g/ca.

Ratones: 20-25 g/ca.

Monos: 3-6 kg/ca.

Género:

15 Ratas o ratones: la mitad machos, la mitad hembras.

Monos: cualquier sexo.

Número de animales por grupo:

Ratones: 10/sexo/grupo.

Rata: 5/sexo/grupo.

20 Mono: 3-6.

Volumen administrado por animal:

Ratones: 0,1 ml/por 10 g de peso corporal.

Rata: 0,2 ml/100 g.

Mono: 0,1 ml/kg.

25 Material:

Tetrodotoxina en polvo, lote n.º 950314, suministrado por Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant, Liaoning, China.

4.1 Prueba de salto provocado en ratones:

Los ratones se dividieron de forma aleatoria en dos grupos de TTX (5,5 µg/kg y 11,5 µg/kg), un grupo con morfina (dosificación constante de morfina 20 mg/kg) como control positivo, y un grupo con solución salina normal (volumen igual de NS) como control negativo. Todos los agentes se suministraron por vía subcutánea 3 veces al día y se dosificaron de forma constante durante 7 días, respectivamente. El día 8, se usaron 10 mg/kg de M₅₀₅₀, un agonista del receptor de morfina, para provocar la abstinencia dos horas después de la última administración, a continuación se registraron la incidencia de salto y la frecuencia de salto. Los resultados mostraron que los datos obtenidos para el grupo de morfina fueron significativamente diferentes de los obtenidos para el grupo de TTX y el grupo de control NS, pero no se observó una diferencia significativa entre el grupo TTX y el grupo de control NS. Esto indica que, a los niveles de dosis usados en este estudio, la TTX administrada por vía subcutánea a ratones durante 1 semana a una dosificación constante proporcionó el mismo resultado que con solución salina normal, ya que ninguna de ellas produjo signos de dependencia física en ratones (tabla 13).

Tabla 13: Comparación de resultados de salto en ratones administrados con TTX, morfina y NS

Grupo	Nº de ratones	Incidencia de salto	Frecuencia de salto
	(n)	(%)	(X±D.E.)
Morfina	20	90,0	19,7±16,3
NS	10	20,0*	0,80 ± 2,20*
TTX (dosificación alta)	20	10,0*#	0,70 ± 2,70*
TX (dosificación baja)	20	10,0*#	1,30 ± 3,90*

Nota:

* P<0,05 comparado con morfina

#P>0,05, comparado con solución salina normal.

4.2 Prueba de abstinencia provocada en ratas

Las ratas se dividieron de forma aleatoria en dos grupos de TTX, un grupo de morfina que se usó como control positivo, y un grupo de solución salina normal (volumen igual de NS) como control negativo. La pauta de dosificación es la siguiente: Las dosificaciones para el grupo de TTX comenzaron con 1,5 µg/kg y 3,0 µg/kg, respectivamente. Se escalaron progresivamente las dosificaciones hasta 9 y 12 µg/kg el día 7, respectivamente. Al grupo de morfina se le proporcionaron 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 mg/kg, escalando la dosis cada día. Se usó solución salina normal (volumen igual de NS) como control negativo. todas estas dosis se proporcionaron por vía subcutánea 3 veces al día. El día 8, se usaron 2 mg/kg de M₅₀₅₀ para provocar la abstinencia 2 horas después de la última administración, a continuación se monitorizaron las reacciones de abstinencia y de pérdida de peso corporal.

Los resultados mostraron que las puntuaciones para los síntomas de abstinencia y de pérdida de peso corporal para ambos grupos de dosis de TTX eran similares a las del grupo NS, pero eran notablemente inferiores a las puntuaciones observadas para el grupo de morfina. Se descubrió que la diferencia era muy significativa (p<0,01). Estos resultados indican que la TTX no produjo una respuesta de dependencia física en ratas cuando se les administró por vía subcutánea las dosis usadas en la prueba (tabla 14).

Tabla 14: Comparación de puntuaciones de abstinencia provocada en grupos tratados con TTX, morfina y NS.

Grupo	Puntuación de síntomas de abstinencia	Puntuación de pérdida de peso corporal
	(Media ± D.E.)	(Media ± D.E.)
Morfina	7,38 ± 1,16	10,00 ± 2,60
NS	0,40±1,20*	0,00±0,00*
TTX (dosificación alta)	0,30±0,90*#	0,00±0,00*#
TTX (dosificación baja)	0,20±0,60*#	0,00±0,00*#

Nota:

* P<0,01 comparado con morfina

P>0,05 comparado con solución salina normal

4.3 Prueba de abstinencia provocada en monos

Se asignaron los monos a un grupo de control positivo de morfina, un grupo de control negativo de solución salina normal (NS), y un grupo de TTX, y se dosificó cada grupo tres veces al día (a las 08:30, 14:30 y 20:30). Se creó un modelo de dependencia de morfina escalando progresivamente la dosificación. Se mantuvo la dosificación de morfina a 3 mg/kg durante tres días, después se escaló hasta 6 mg/kg durante tres días, 9 mg/kg durante cuatro días, y 12 mg/kg durante cuatro días, hasta que se alcanzó los 15 mg/kg en la semana 3 y se mantuvo a ese nivel hasta la marca de un mes. Se administró la TTX en dosificaciones de 1, 2 y 3 µg/kg durante una semana cada una. Cuando se incrementó la dosificación hasta 4 µg/kg en la semana 4, se produjo una reacción tóxica significativa (vómito), de modo que se disminuyó la dosificación de nuevo hasta 3 µg/kg. En todos los grupos, se administró la TTX durante un mes. Una hora después de que se administró la dosis final a las 8:30 a.m. el día 31, se les administró a los monos una inyección subcutánea de 1 mg/kg de naloxona, y a continuación se les observó de inmediato en la hora siguiente para determinar los síntomas de abstinencia y para determinar un cambio en porcentaje de peso corporal

El resultado indicó que las puntuaciones para el síntoma de abstinencia y los porcentajes de pérdida de peso corporal en los grupos de TTX y NS eran notablemente inferiores que los que se notaron en el grupo de morfina ($p < 0,01$), y que ambas puntuaciones de síntoma de abstinencia y los porcentajes de pérdida de peso corporal fueron muy similares entre el grupo de TTX y el grupo de NS. Esto mostró que el uso del antagonista de morfina naloxona para provocar la abstinencia en los monos con una administración a largo plazo de TTX no provocó síntomas de abstinencia similares a la morfina, es decir, la TTX no posee dichas características como causa de dependencia física a opiáceos (tabla 15).

Tabla 15. Resultados de la prueba de abstinencia provocada en monos tratados con TTX, morfina y NS (Media $\pm$ D.E.)

Grupo	n	Puntuación de síntomas de abstinencia	Pérdida de peso corporal (%)
Morfina	3	61,0 $\pm$ 2,6	6,6 $\pm$ 1,7
NS	3	2,6 $\pm$ 4,6*	0,7 $\pm$ 0,6*
TTX	6	2,6 $\pm$ 4,6*#	0,4 $\pm$ 0,8*#

Nota:

* $P < 0,01$ comparado con morfina

$P > 0,05$ comparado con solución salina normal

4.4 Prueba de abstinencia natural en monos

Los monos se asignaron a un grupo de control positivo de morfina, un grupo de control negativo de NS, y un grupo de TTX, y se les dosificó siguiendo las mismas etapas y procedimientos que en la prueba de abstinencia provocada. Después de 30 días, se continuó con las dosis altas de la prueba de abstinencia provocada hasta el día 90, tiempo en el que se detuvo la administración de morfina, TTX y NS. Los síntomas de abstinencia y los cambios en el peso corporal que se producen en cada grupo se monitorizaron a continuación durante la semana siguiente a la terminación del tratamiento, realizándose observaciones tres veces al día, y se registraron los hallazgos de acuerdo con las tablas de observación (véanse los anexos 1, 2 y 3).

Los resultados en las tablas 16 y 17 mostraron que no se observaron síntomas de abstinencia durante una semana después de que hubiera terminado la administración continua de TTX durante tres meses. En los tres días después de que se detuviera la administración, de forma ocasional algunos monos parecían excitados e inquietos en cierta medida, pero este comportamiento desapareció pronto. El peso corporal de los monos tratados con TTX no sólo no disminuyó, sino que por el contrario, se incrementó en comparación con los pesos anotados durante el periodo de administración. El grupo de control de morfina, por otra parte, manifestó síntomas de abstinencia obvios. Esto indica que la administración a largo plazo de TTX no produce ningún signo de dependencia física.

Tabla 16. Comparación de puntuaciones de síntomas de abstinencia durante el periodo de abstinencia natural (Media $\pm$ D.E.)

Grupo	n	N.º de días después de abstinencia						
		1	2	3	4	5	6	7
Morfina	4	34,8 $\pm$ 26,4	35,3 $\pm$ 20,5	28,3 $\pm$ 5,4	16,3 $\pm$ 7,5	15,3 $\pm$ 5,7	10,3 $\pm$ 0,5	10,5 $\pm$ 2,5
TTX	6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
NS	3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Tabla 17. Porcentaje de cambio en el peso corporal en cada grupo de monos durante el periodo de abstinencia natural (Media $\pm$ D.E.)

Grupo	n	N.º de días después de abstinencia							Media general
		1	2	3	4	5	6	7	
Morfina	4	-4,8 $\pm$ 0,4	-7,1 $\pm$ 2,5	-5,4 $\pm$ 3,4	-5,9 $\pm$ 2,0	-6,8 $\pm$ 2,4	-6,6 $\pm$ 2,4	-5,9 $\pm$ 1,4	-6,1 $\pm$ 0,8
NS	3	1,6 $\pm$ 2,9	2,4 $\pm$ 1,5	3,0 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 1,8	2,4 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 2,6	2,6 $\pm$ 0,5*
TTX	3	1,6 $\pm$ 1,4	2,9 $\pm$ 3,7	3,8 $\pm$ 2,9	3,1 $\pm$ 1,8	3,7 $\pm$ 2,7	3,5 $\pm$ 2,8	4,1 $\pm$ 1,6	3,2 $\pm$ 0,8*#
Nota: * P<0,01 comparado con morfina # P>0,05 comparado con los grupos NS									

Anexo 1:

Tabla de observación para los síntomas de abstinencia en la prueba de abstinencia provocada en ratas.

		Año		Mes	Día							
Rata n.º	Sexo	Fármaco de prueba	Peso corporal pre-abstinencia (g)									
		Síntomas	Puntuación	15'	30'	45'	60'	90'	120'			
Comportamientos		Sacudidas de perro mojado	(2)									
		Irritabilidad al tacto	Leve	(1)								
			Grave	(2)								
		Castaño de dientes	Intermitente	(0,5)								
Continuo	(1)											
Síntomas del sistema nervioso autónomo		Lagrimeo	(4)									
		Diarrea	Heces blandas	(4)								
			Heces no formadas	(8)								
Peso corporal post-abstinencia (g)		Leve	(1)									
		Grave	(2)									
Porcentaje de cambio de peso corporal												

Nota:
Puntuación total:

Anexo 2: Tabla de observación para síntomas de abstinencia en monos.

N.º	♀♂	Peso corporal (kg)	Tiempo de dosificación final	Mes	Día	Hora
Sintoma	\Tiempo			El día		
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30
				8:00	14:30	20:30

Anexo 3**Clasificación de síntomas de abstinencia de monos y procedimiento de puntuación.****I. Clasificación**

- 5 1. Leve: Miedo, bostezos, lagrimeo, temblequeo, rubor facial, sudoración, llanto, irritabilidad, apetito reducido, heces sueltas.
2. Moderado: Temblores, anorexia, piloerección, contracción muscular, cierre del abdomen, diarrea, y supinación anérgica.
3. Grave: Inquietud extrema, decúbito lateral con ojos cerrados, postura anormal, vómitos, palidez facial, y mioespasmos visibles.
- 10 4. Muy grave: Agotamiento (rostro inexpressivo, disnea, deshidratación), pérdida de peso corporal pronunciada, insuficiencia circulatoria, y muerte,

II. Puntuación (puntuación de clasificación de grados + puntuación de síntomas)

Leve: 5 puntos para la clasificación de grado, 3 puntos para cada síntoma, restándose 1 punto para una manifestación repetida del mismo síntoma dentro de un día dado.

- 15 Moderado: 10 puntos para la clasificación de grado, 4 puntos para cada síntoma, restándose 1 punto para una manifestación repetida del mismo síntoma dentro de un día dado.

Grave: 17 puntos para la clasificación de grado, 4 puntos para cada síntoma, restándose 1 punto para una manifestación repetida del mismo síntoma dentro de un día dado.

Muy grave: 32 puntos para la clasificación de grado, 20 puntos para agotamiento, 30 puntos para muerte.

20 III. Base de la puntuación

Cuando existe una diferencia en la graduación de un síntoma, la puntuación debe ser diferente. Además, la puntuación también debe variar dependiendo del número de síntomas dentro de la misma clasificación de grado, pero la puntuación resultante no debe ser mayor que la garantizada para la clasificación de grado.

- 25 La puntuación para tres síntomas de una clase de grado equivale a la puntuación para un síntoma de la clase de grado mayor inmediata. Por ejemplo, tres síntomas puntuados como de gravedad leve ($5 + (3 \times 3) = 1$ síntoma puntuado como de gravedad moderada ($10 + 4$).

Tres síntomas puntuados como de gravedad moderada ($10 + (4 \times 3) = 1$ síntoma puntuado como grave ($17 + 5$).

Si el animal parece agotado o muere, se ignora cualquier otro síntoma, de modo que la puntuación asignada es equivalente a la suma total de las puntuaciones para los síntomas leves, moderados y graves.

30 Ejemplo 5**Estudios farmacológicos generales de tetrodotoxina****Materiales de prueba:**

- 35 Tetrodotoxina en polvo, lote n.º 971208, suministrado por Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant Liaoning, China. Se disolvió el fármaco en solución salina normal a concentraciones apropiadas para inyección intraperitoneal (0,1 ml por 10 g de peso corporal).

Cafeína: Shanghai Second Chemical Reagents Co, lote n.º 950801.

Solución para inyección de Diazepam: People's Pharmaceuticals de Tianjing Amino Acid Co., lote n.º 970424.

Morfina: National Institute on Drug y Biological Product, lote n.º 1201-9612.

Pentobarbital de sodio: Beijing Tongxian Yuchai Fine Chemicals, lote n.º 950427.

40 Animales:

En el estudio se usaron ratones Kunming (de 17 g a 22 g), la mitad machos y la mitad hembras. Las diferencias de peso corporal entre animales en cada prueba no eran mayores de 5 g.

5.1 Efectos sobre el comportamiento general de los ratones

Los ratones se dividieron de forma aleatoria en 6 grupos de 10 ratones cada uno. A los animales se les inyectó por vía intraperitoneal TTX (2,5, 5, y 10 µg/kg), cafeína (10 mg/kg), Diazepam (5,0 mg/kg) o solución salina normal, respectivamente. Quince minutos después de la dosificación, se registraron los cambios en el comportamiento general, gesto, marcha, presencia de salivación excesiva y temblor muscular, y el cambio en el tamaño de las pupilas.

- 5 Los resultados de la prueba mostraron que después de administrar una única dosis de 2,5 µg/kg o 5,0 µg/kg de TTX, los ratones mostraron marcha y gestos normales, salivación no excesiva o amiotasia, y sin cambios en el tamaño de las pupilas. Sólo los ratones tratados con una única dosis de 10 µg/kg de TTX manifestaron generalmente cierre de ojos u movimientos físicos reducidos.

5.2 Efectos sobre la movilidad autónoma de los ratones

- 10 Los ratones se dividieron de forma aleatoria en 12 grupos de 12 ratones cada uno, y se asignaron a tres grupos de TTX en dosis de 2,5, 5,0, y 10 µg/kg, respectivamente, y dos grupos de control positivo, es decir, un grupo de 10 mg/kg de cafeína (estimulante del sistema nervioso central (SNC)), un grupo de diazepam (5mg/kg) (depresores del SNC), y un grupo de control sin tratamiento (solución salina normal). Se llevaron a cabo las pruebas en los grupos de TTX y los grupos de control, alternativamente. Quince minutos después de la administración, se colocaron los ratones (en grupos de 4) en una grabadora de movimiento locomotor general TDW-02 y se estabilizaron durante cinco minutos.
- 15 A continuación, durante los siguientes cinco minutos, se registraron los movimientos locomotores de los ratones y se compararon los resultados entre los grupos de TTX, los grupos de control positivo y el grupo de control sin tratamiento. Se determinó si estas diferencias eran o no significativas usando la prueba t.

- 20 Los resultados de la prueba mostraron que después de administrar una única dosis de 2,5 µg/kg o 5,0 µg/kg de TTX, los ratones mostraron marcha y gestos normales, salivación no excesiva o amiotasia, y sin cambios en el tamaño de las pupilas. Sólo los ratones tratados con una única dosis de 10 µg/kg de TTX manifestaron generalmente cierre de ojos u movimientos físicos reducidos. Por lo tanto, su movilidad autónoma era significativamente menor que la del grupo de control sin tratamiento ($P < 0,01$) pero no cuando se comparó con el grupo de control positivo (diazepam) ($P > 0,05$), lo que sugiere que la TTX a esta dosis (10 µg/kg) tiene efectos sedantes en cierta medida (tabla 18).

Tabla 18. Efectos de tetrodotoxina (TTX) sobre la movilidad autónoma de los ratones

Fármacos	Nivel de dosis	Número de animales	Número de movilidad autónoma ($\bar{X} \pm$
Solución salina normal	—	12	591 ± 111
Cafeína	10 mg/kg	12	111 ± 178 *** ●●
Diazepam	5,0 mg/kg	12	323 ± 203 *** ""
TTX	2,5 µg/kg	12	547 ± 99 "" ●●
TTX	5,0 µg/kg	12	540 ± 118 "" ●●
TTX	10 µg/kg	12	442 ± 98 ** ""

** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, comparado con solución salina normal. "" $P < 0,001$, comparado con cafeína.

●● $P < 0,001$, comparado con diazepam.

25

5.3 Efectos sobre el tiempo de sueño inducido por pentobarbital de sodio

Se realizó un estudio preliminar para descubrir un nivel de dosis para el que el pentobarbital de sodio inducía sueño en el 100 % de los animales. Esta dosis era de 40 mg/kg.

- 30 Los ratones se dividieron de forma aleatoria en 5 grupos de 10 ratones cada uno. Se asignaron a tres grupos de TTX en dosis de 2,5, 5,0, y 10 µg/kg, respectivamente, un grupo de control positivo (diazepam 2,5 mg/kg), y un grupo de control sin tratamiento (solución salina normal). Se les administraron inyecciones a los ratones de cada grupo por vía intraperitoneal, y a continuación se infectó con pentobarbital de sodio 40 mg/kg a los ratones de todos los grupos de 10 a 15 minutos antes de que se manifestaran los efectos máximos de TTX o diazepam. Se registró la latencia del reflejo de enderezamiento para determinar si el fármaco de prueba podía o no prolongar el tiempo de sueño inducido por pentobarbital de sodio en ratones. Se compararon las diferencias de las latencias entre los grupos de TTX y los grupos de control, y se usó la prueba t para determinar si estas diferencias eran o no significativas.
- 35

- Los resultados demostraron que, con respecto al efecto de prolongación del tiempo de sueño inducido por pentobarbital de sodio, los grupos de TTX 2,5 µg/kg, 5,0 µg/kg y 10 µg/kg no eran significativamente diferentes del grupo de control (solución salina normal) ($P > 0,05$), pero eran significativamente diferentes del grupo de control positivo (diazepam) ($P < 0,001$). Los resultados se muestran en la tabla 19.
- 40

Tabla 19. Efectos de tetrodotoxina (TTX) sobre el tiempo de sueño inducido por pentobarbital de sodio en ratones

Fármacos	Niveles de dosis	Número de animales	Tiempo de sueño
			($\bar{X} \pm D.E.$) min
Solución salina normal		10	33,3 $\pm$ 14,5****
diazepam	2,5 mg/kg	10	146,2 $\pm$ 53. "
TTX	2,5 μ g/kg	10	35,1 $\pm$ 26,2 "
TTX	5,0 μ g/kg	10	36,3 $\pm$ 18,7 "
TTX	10 μ g/kg	10	26,6 $\pm$ 22,5 "

****P<0,001, comparado con solución salina normal.

"P<0,001 comparado con diazepam.

5.4 Efectos sobre la relajación del músculo esquelético en ratones

Los ratones se dividieron de forma aleatoria en cinco grupos de diez ratones cada uno. Se asignaron a tres grupos de TTX en dosis de 2,5, 5,0, y 10 μ g/kg, respectivamente, un grupo de control positivo (diazepam 5 mg/kg), y un grupo de control sin tratamiento (solución salina normal). Se colocaron los ratones en una red metálica situada a 50 grados con respecto al nivel horizontal sobre la mesa y se dejó que se movieran libremente sobre la red. Los que no se cayeron de la red durante una hora se consideraron cualificados y se seleccionaron. A continuación, se les dieron inyecciones respectivas a los ratones de cada grupo; y se colocó de nuevo a los animales sobre la red y se dejó que se movieran libremente. Se observaron durante los siguientes 50 minutos, y los que se cayeron se volvieron a poner sobre la red. Se consideró que el fármaco inyectado era eficaz produciendo una relajación del músculo esquelético si un ratón se caía tres veces de forma consecutiva. Los resultados mostraron que, con respecto a la capacidad para producir una relajación del músculo esquelético, los grupos de TTX 2,5 μ g/kg, 5,0 μ g/kg y 10 μ g/kg no eran significativamente diferentes del grupo de control sin tratamiento (solución salina normal) (P>0,05), pero eran significativamente diferentes del grupo de control positivo (diazepam) (P<0,001). Los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Efectos de tetrodotoxina (TTX) sobre la relajación del músculo esquelético (procedimiento de escalada de red)

Fármacos	Niveles de dosis	Número de animales	Número de animales afectados positivamente
Solución salina		10	0
Diazepam	5 mg/kg	10	8 ***
TTX	2,5 μ g/kg	10	0 "
TTX	5,0 μ g/kg	10	0 "
TTX	10 μ g/kg	10	0 "

***P<0,001, comparado con solución salina normal.

"P<0,001, comparado con diazepam.

5.5 Efectos sobre los sistemas cardiovascular y respiratorio de perros anestesiados

En esta prueba, se usaron perros híbridos sanos, la mitad machos y la mitad hembras, de peso corporal 10-15 kg. Los perros se anestesiaron por pentobarbital de sodio por vía intravenosa a 30 mg/kg. A continuación, se colocaron en posición supina, y se expuso de forma quirúrgica la arteria femoral y se insertó un tubo para monitorizar la presión sanguínea de la arteria. La vena femoral de la otra pata trasera se expuso de forma quirúrgica para la transfusión de líquido nutricional. Se monitorizaron la frecuencia e intensidad respiratorias colocando un intercambiador de energía de unión nasal TR-612T en las narinas. Se monitorizó la función cardíaca con un electrocardiograma de dos derivaciones con electrodos de aguja. Se registraron de forma sincrónica todos los parámetros monitorizados con un grabador de múltiples derivaciones RM-6000.

Después de la operación quirúrgica, se estabilizó el sistema durante 30 minutos o más hasta que se estabilizaron todos los parámetros monitorizados, a continuación se registraron como los valores antes de la dosificación de la inyección de TTX. A los perros se les inyectaron por vía i.m. en las nalgas preparaciones de TTX o un volumen igual de solución salina normal para el grupo de control sin tratamiento, respectivamente. Se registraron los mismos parámetros 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosificación.

Los resultados mostraron que TTX a 1 μ g/kg, 2 μ g/kg, o 4 μ g/kg, por inyección intramuscular no afectó significativamente a la presión sanguínea, frecuencia cardíaca, electrocardiograma o frecuencia e intensidad

respiratorias ($P>0,05$).

Ejemplo 6 Estudios de seguridad de fármaco con TTX

Se usaron ratones Kunming y ratas Wistar en estos estudios.

5 Edad: 40 días para los ratones, y siete semanas para ratas. Sexo: la mitad de cada sexo para ambos. Peso corporal: 18 - 20 g para ratones; 130 -170 g para ratas. Volumen de dosificación: 0,1 ml/10 g para ratones; 0,2 ml/100 g para ratas.

Material: tetrodotoxina pura en polvo, fabricada por Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd.

6.1 Toxicidad aguda de TTX en ratones

10 Material de prueba: tetrodotoxina en polvo, lote n.º ML-003, suministrado por Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd.

15 Los ratones se sometieron a ayuno durante 12 horas, a continuación se asignaron de forma aleatoria a diferentes grupos de dosis en base a su peso corporal, 10/sexo/grupo. Después de que se inyectó TTX por diferentes vías (i.v., i.p., s.c.), se observaron de inmediato las reacciones de cada animal, y se continuó con la observación durante una semana después, registrándose las reacciones tóxicas y la distribución de muertes. Se realizó la autopsia de inmediato después de cualquier incidente de muerte y se registraron cambios patológicos. Se llevaron a cabo exámenes patológicos microscópicos en los animales que presentaron cualquier cambio observado durante los exámenes generales. Se calcularon los valores de DL_{50} con un intervalo de confianza del 95 % (IC) de acuerdo con el procedimiento Bliss.

20 Los resultados mostraron que cualquier reacción tóxica fue similar independientemente de las vías de administración. Los principales signos clínicos fueron debilitamiento de las patas traseras, postración, disnea, y muerte por insuficiencia cardíaca. En general, se produjo la muerte 1-15 min después de la dosificación por vía intravenosa, y 20-60 min por otras vías. Las muertes no fueron dependientes del sexo. Los ratones que sobrevivieron se recuperaron aproximadamente en una hora después de la dosificación. No se produjeron otras anomalías ni muertes en los animales supervivientes durante el periodo de observación de 7 días. No se encontraron anomalías durante la autopsia de animales muertos. La distribución de muertes y la determinación de los valores de DL_{50} se muestran en las tablas 21,22 y 23.

Tabla 21. Distribución de muerte y DL_{50} después de una única inyección i.v. de TTX en ratones.

Dosis ((μ g/kg)	Dosis logarítmica (x)	Número de animales	Número de muertes	Tasa de muerte	Unidad de probabilidad (y)	Valor de DL_{50} (IC del 95 %)
11,8	1,070	10	10	1,000	7,038	
10,0	1,000	10	7	0,700	5,493	8,3
8,5	0,929	10	5	0,500	5,000	
7,2	0,859	10	3	0,300	4,479	(7,5~9,2)
6,1	0,788	10	1	0,100	3,722	

Tabla 22. Distribución de muerte y DL_{50} después de una única inyección i.p. de TTX en ratones.

Dosis (μ g/kg)	Dosis logarítmica (x)	Número de animales	Número de muertes	Tasa de muerte	Unidad de probabilidad (y)	Valor de DL_{50} (IC del 95 %)
11,8	1,072	10	9	0,900	6,197	
10,0	1,000	10	8	0,800	5,827	9,0
8,5	0,929	10	4	0,400	4,474	
7,2	0,857	10	1	0,100	3,719	(8,2~9,8)
6,1	0,792	10	0	0,000	2,464	

Tabla 23. Distribución de muerte y DL₅₀ después de una única inyección s.c. de TTX en ratones.

Dosis (µg/kg)	Dosis logarítmica (x)	Número de animales	Número de muertes	Tasa de muerte	Unidad de probabilidad (y)	Valor de DL ₅₀ (IC del 95 %)
22,9	1,360	10	10	1,000	7,246	
19,5	1,290	10	8	0,800	5,835	16,2
16,5	1,217	10	5	0,500	5,000	
14,1	1,149	10	2	0,200	4,163	(14,7~17,8)
12,0	1,079	10	1	0,100	3,734	

6.2 Toxicidad aguda de TTX en ratas

Material de prueba: tetrodotoxina en polvo, lote n.º 000530, suministrado por Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd.

Las ratas Wistar se sometieron a ayuno durante 12 horas, a continuación se asignaron de forma aleatoria a diferentes grupos de dosis en base a su peso corporal, 5/sexo/grupo. El procedimiento de prueba fue el mismo que en el estudio de toxicidad aguda en ratones.

El resultado mostró que aproximadamente 10-20 minutos después de la inyección i.m., las ratas presentaron varios grados de debilitamiento en las patas traseras, respiración acelerada y postración. Los que presentaron reacciones fuertes mostraron disnea grave (respiración de Cheyne-Stokes) hasta que murieron por insuficiencia respiratoria, en general, 1 hora después de la inyección. Los animales supervivientes mostraron indicios de un estado inhibitorio y se recuperaron de forma gradual aproximadamente 1 hora después de la dosificación. Se continuó con la observación durante siete días y no se observaron otras anomalías ni incidentes de muerte. En general, no se encontró anomalía durante la autopsia de los animales muertos.

La distribución de muertes y la determinación de los valores DL₅₀ se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Distribución de muertes y DL₅₀ después de una única inyección i.m. de TTX en ratas.

Dosis (µg/kg)	Dosis logarítmica (x)	Número de animales	Número de muertes	Tasa de muerte	Unidad de probabilidad (y)	Valor de DL ₅₀ (IC del 95 %)
13,72	1,14	10	10	100	7,49	
12,35	1,09	10	8	80	5,82	11,11
11,11	1,05	10	5	50	5,00	
10,00	1,00	10	2	20	4,18	(10,5~11,7)
9,00	0,96	10	0	0	2,51	

6.3 Estudio de la toxicidad sub-aguda (28 días) de TTX en monos Rhesus

Animales:

20 monos Rhesus, diez de cada sexo, 3-4 años de edad, peso corporal: ♂ 6,3±0,5 kg; ♀ 8,4±0,4 kg.

Material de prueba:

Material de prueba: inyección de tetrodotoxina, 30 µg/2 ml/ampolla, lote n.º 931220, suministrado por Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd. Los monos se dividieron de forma aleatoria en 5 grupos. A tres grupos se les suministró TTX (1 µg/kg, 2,5 µg/kg o 6,25 µg/kg). A los otros dos grupos se les suministró solución salina normal (control sin tratamiento) y solución de ácido acético al 0,02 % (control con disolvente). Todos los fármacos de prueba se inyectaron una vez al día durante 28 días consecutivos. Después de la dosificación, se monitorizó el comportamiento general y se registró diariamente, se midieron semanalmente la ingesta de alimento y el peso corporal. 24 horas después de la última dosis, se tomaron muestras de sangre del corazón y se usaron para la determinación de 13 parámetros hematológicos y 15 parámetros bioquímicos de la sangre. 24 horas después de la última dosificación, se sacrificaron un mono macho y un mono hembra de cada grupo y se sometió a prueba la sangre para exámenes hematológicos, bioquímicos de sangre, y patológicos. Se observaron de forma continua los monos restantes de cada grupo durante cuatro semanas y después se sacrificaron para llevar a cabo los mismos exámenes anteriores para saber si se pudo

recuperar de cualquier reacción de toxicidad observada y si se pudo manifestar una reacción de toxicidad retardada.

Los resultados mostraron que los monos en el grupo de 6,25 µg/kg de TTX evidenciaron síntomas tóxicos después de cada dosificación. La principal reacción tóxica fue el vómito. Un mono de este grupo mostró hinchazón de los párpados, parálisis leve y un incremento anormal en los valores de ALT y ALP. Un mono en el grupo de 2,5 µg/kg de TTX presentó leves vómitos y la actividad de AChE disminuyó en un 41,2 %. No se presentaron anomalías relacionadas con el fármaco descubiertas en las observaciones de los parámetros fisiológicos generales, exámenes histopatológicos, hematológicos, bioquímicos de sangre y oftalmológicos en los grupos de 1,0 µg/kg de TTX, control sin tratamiento y control con disolvente. Se descubrió necrosis del músculo local en el sitio de inyección de la solución de ácido acético diluido durante la evaluación microscópica de monos sacrificados el día 28. Al final del periodo de recuperación (día 56), no se observó necrosis muscular. Bajo las condiciones de este estudio, el nivel de dosis no tóxica de TTX en monos Rhesus fue de 1,0 µg/kg.

Ejemplo 7: Estudio de toxicidad local en TTX

Material de prueba: inyección de tetrodotoxina, 30 µg/2 ml/ampolla, lote n.º 931220, suministrado por Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd.

7.1 Prueba de irritación intramuscular local en conejos

Se dividieron de forma aleatoria ocho conejos blancos New Zealand, machos, de 13-18 semanas de edad, de peso corporal 2,0-2,5 kg, en cuatro grupos como tetrodotoxina (0,56 µg/kg) en ácido acético, tetrodotoxina (0,56 µg/kg) en solución salina normal, control con ácido acético al 0,02 %, y control positivo con penicilina G-K.

Antes de la dosificación, se cortó el pelo del conejo alrededor del sitio de inyección 3 x 2 cm en el sitio de inyección. Se realizó la inyección en la parte del medio de los músculos cuádriceps los muslos izquierdo y derecho de un conejo, 1 ml de cada lado respectivamente. Inmediatamente después de la dosificación, se monitorizaron y se registraron los signos de pelo débil, apatía, anorexia, y dificultades de movilidad. A las 48 horas, los conejos se sacrificaron y se extirparon los músculos cuádriceps y se les realizó una incisión longitudinalmente para observar la reacción de estimulación local en los sitios de inyección y realizar exámenes patológicos. Las reacciones de estimulación se graduaron en base a los siguientes criterios de evaluación: 0, sin cambio obvio, 1, hiperemia ligera, en un área menor de 0,5 x 1,0 cm, 2, hiperemia media, en un área mayor de 0,5 x 1,0 cm, 3, hiperemia grave, además de degeneración del músculo, 4, necrosis manifestada con degeneración de color marrón, 5, necrosis masiva manifestada.

La prueba muestra que la tetrodotoxina a 0,56 µg/kg en ácido acético diluido, ácido acético diluido al 0,02 % (disolvente), y penicilina G-K a $1,54 \times 10^5$ unidades/kg (control positivo) produjo reacciones de estimulación pronunciadas en músculos locales de los conejos, mientras que con tetrodotoxina a 0,56 µg/kg en solución salina normal no. En base a estos resultados se puede concluir que el estímulo fue de ácido acético diluido al 0,02 % en lugar de la tetrodotoxina a la concentración probada (tabla 25).

Tabla 25. Grados de evaluación para los resultados de las pruebas de estimulación muscular local de conejos con tetrodotoxina

Grupos	Grados para la reacción de estimulación en músculos cuádriceps femorales de conejos					Suma de grados
	Lado izquierdo			Lado derecho		
	1*	2		1	2	
Tetrodotoxina en ácido acético diluido	4	4		4	4	16
Tetrodotoxina en solución salina normal	0	0		0	0	0
Ácido acético al 0,02 % (excipiente)	4	4		4	4	16
Penicilina G-K (control positivo)	4	4		4	4	16

* Número de conejos probados

7.2 Prueba de hipersensibilidad general en cobayas

Se asignaron de forma aleatoria veinticuatro cobayas Hartley, la mitad de cada sexo, de 8 ~ 12 semanas de edad, de 250 -300 g, a tres grupos como un grupo de tetrodotoxina 0,95 µg/kg, un grupo de seroalbúmina bovina al 10 % (control positivo) y un grupo de ácido acético diluido al 0,02 % (control con disolvente).

Procedimiento de sensibilización:

En el grupo de tetrodotoxina, a cada cobaya se le inyectó por vía intraperitoneal 0,5 ml de la dosis de sensibilización de tetrodotoxina preparada, una vez cada dos días para tres inyecciones consecutivas. Se usó el mismo procedimiento de dosificación en el grupo con disolvente y el grupo con seroalbúmina bovina al 10 % (control positivo). Después de esto, se dividieron los animales de cada grupo en dos subgrupos con cuatro animales por subgrupo.

Procedimiento de estimulación:

En cada grupo, a los animales del primer subgrupo se les inyectó por vía intravenosa 1,0 ml de la dosis de estimulación preparada en el lado externo de una pata trasera 14 días después de la dosis de sensibilización (i.p.). A los animales del segundo subgrupo se les administró la misma dosis por la misma vía el día 21 después de que se les administrara la dosis de sensibilización (i.p.). Los animales de experimentación se observaron de forma instantánea para determinar las indicaciones de reacciones de hipersensibilidad tales como rascado de nariz, estornudos, piloerección, convulsiones, disnea, incontinencia fecal y urinaria, choque y muerte, etc.. Los estándares de evaluación de los resultados de la prueba son los siguientes: (-) Sin reacción anormal, ($\pm$) torsión, piloerección, (+) rascado de nariz, piloerección, intranquilidad, estornudos, dificultad respiratoria, y cianosis leve, (++) piloerección, disnea manifiesta, cianosis, debilitamiento de las patas, y arrastramiento con el abdomen en el suelo, (+++) muerte.

Los resultados de la prueba indicaron que la tetrodotoxina a una dosis de 0,95 $\mu\text{g/kg}$ y ácido acético diluido al 0,02 % (excipiente) después de la estimulación no produjo reacciones de hipersensibilidad general pronunciada en cobayas, mientras que el control positivo, solución de suero bovino al 10 %, indujo reacciones de hipersensibilidad en varios grados, tales como rascado de nariz, piloerección, intranquilidad, estornudos, y muerte de una cobaya varios minutos después de la estimulación (tabla 26).

Los resultados de la prueba demostraron que la tetrodotoxina a un nivel de dosis de 0,95 $\mu\text{g/kg}$ no produjo reacciones de hipersensibilidad generales en cobayas; por tanto es seguro el uso de este fármaco en este nivel de dosis.

Tabla 26. Resultados de la prueba de hipersensibilidad general de tetrodotoxina en cobayas

Grupos	Reacciones de hipersensibilidad de animales			
	*+	+	++	+++
Tetrodotoxina	8/8	0/8	0/8	0/8
Ácido acético diluido al 0,02 % (disolvente)	8/8	0/8	0/8	0/8
Seroalbúmina bovina al 10 % (control positivo)	0/8	4/8	3/8	1/8

Nota: * (-) Sin reacción anormal

7.3 Pruebas de hemolización y estimulación vascular

15 conejos blancos New Zealand, 14-18 semanas de edad, 2,0-4,0 kg. Sin limitaciones de género.

Prueba de hemolización:

Se extrajeron siete mililitros de sangre de conejo para preparar una suspensión de glóbulos rojos (RBC) al 2 % en solución salina normal para su uso de experimento. Se usaron dos mililitros de solución acuosa de ácido acético al 0,02 % como control. Se colocaron siete tubos de ensayo en suspensión de RBC al 2 % y solución salina normal y en varias cantidades de la TTX. Se agitaron los tubos para mezclar las soluciones de forma uniforme, y se colocaron en una incubadora a 37°C, se observaron y se registraron a los 15 minutos la primera vez, y se repitió el registro posteriormente cada hora hasta cuatro horas.

El resultado mostró que la tetrodotoxina no indujo hemolización *in vitro*.

Prueba de estimulación vascular:

Se asignaron de forma aleatoria 15 conejos a tres grupos como un grupo de tetrodotoxina 1,0 $\mu\text{g/kg}$, un grupo de control de solución acuosa de ácido acético al 0,02 % (control con disolvente) y un grupo de control con solución salina.

A todos los grupos se les administró una inyección diaria por vía intravenosa durante 10 días consecutivos. 24 horas después de la dosificación, se sacrificaron tres animales de cada grupo, y se extrajeron los vasos sanguíneos de los sitios de inyección para llevar a cabo los exámenes patológicos. Los restantes se observaron durante dos semanas; después se sacrificaron, y se extrajeron los vasos sanguíneos de los sitios de inyección para llevar a cabo los exámenes patológicos en consecuencia.

Los resultados mostraron que durante el periodo de dosificación y después, no se observaron anomalías en los estados mentales, pesos corporales, temperaturas corporales, e ingesta de alimento de los animales tratados, lo que

indica que la tetrodotoxina (1,0 µg/kg) por inyección intravenosa diaria no produjo ninguna estimulación vascular pronunciada en conejos.

Ejemplo 8 Efecto teratogénico de tetrodotoxina en ratones por inyección intramuscular

Material de prueba:

- 5 Inyección de tetrodotoxina, 30 µg/2 ml/ampolla, lote n.º 931220, suministrado por Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd.

Animal:

ratones Shanghai, 250 hembras y 80 machos, 80-100 días, sanos, maduros sexualmente, nulíparas y nunca fertilizadas. Peso corporal: Hembras: 25 ~ 35 g. Machos: 30 ~ 40 g.

- 10 Los ratones se dividieron de forma aleatoria en tres grupos de TTX (2,5, 5,0 y 10,0 µg/kg), un grupo de control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg), un grupo de control con disolvente (ácido acético diluido al 0,02 %) y un grupo de control sin tratamiento (agua para inyección).

- 15 Se administró una inyección (i.m.) una vez al día a cada hembra desde el día 6 hasta el día 15 de gestación en todos los grupos salvo en el grupo de control positivo en el que se administró una única inyección a cada ratón hembra el día 11 de gestación. A los animales macho no se les dosificó.

- 20 Los resultados mostraron que durante el periodo de tratamiento las condiciones generales de las ratonas preñadas estaban bien. No se encontraron signos anormales en las ratonas preñadas después de la dosificación. No se encontró embriotoxicidad ni acción teratogénica en ratonas Shanghai tratadas con tetrodotoxina en niveles de dosis de 2,5, 5,0 y 10,0 µg/kg, igual a 1/8, 1/4 y 1/2 de la DL₅₀, respectivamente, una inyección (i.m.) diaria desde el día 6 hasta el día 15 de gestación. Tampoco se encontró malformación en las estructuras externas, viscerales ni esqueléticas de los animales tratados con ácido acético diluido al 0,02 % (control con disolvente) ni con agua para inyección. Sin embargo, la tasa teratogénica fue del 100 % cuando se administró una única inyección de ciclofosfamida (CP) a ratonas preñadas el día 11. Este estudio evidenció que la tetrodotoxina no presenta embriotoxicidad ni teratogenicidad en ratones Shanghai.

25 Ejemplo 9

9.1 Prueba de mutagenicidad en Salmonella (Prueba Ames)

Material de prueba: Tetrodotoxina en polvo, lote n.º 940701, suministrado por Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant Liaoning, China.

- 30 Se estudió el potencial de mutagenicidad de tetrodotoxina para cuatro cepas de Salmonella de prueba estándar usando el procedimiento de preincubación de la prueba de incorporación de placa. Los resultados indicaron que la tetrodotoxina a concentraciones de 0,01 a 100,0 (de la solubilidad máxima) µg/placa no indujo ningún incremento en las tasas de mutación de las cuatro cepas (TA97, TA98, TA100 y TA102) tanto en presencia como en ausencia de activación de S₉. Esto sugirió que la tetrodotoxina no era mutagénica para las cepas de Salmonella.

- 35 Los resultados de las pruebas de mutagenicidad en el fármaco de prueba, tetrodotoxina, y los controles positivos en la Salmonella se presentan en la tabla 27 y en la tabla 28.

Tabla 27. Resultados de la prueba de mutagenicidad en el control positivo en la Salmonella

Concentración (µg/placa)	Número de colonias de revertientes de Salmonella (por placa ± D.E.)				
	S ₉	TA97	TA98	TA100	TA102
0,0	-	138±18	36±5	130±11	270±45
	+	116±27	40±11	154±21	263±10
Dexona (50,0)	-	1567±315	604±86	562±50	858 ±79
DMSO	+	126±41	30±5	129±17	242±10
2-AF (40,0)	-	97±17	26±7	97±13	
	+	1293±366	1538±335	1795±303	
DAN (100,0)	-				379±99
	+				906±69

Tabla 28. Resultados de la prueba de mutagenicidad en tetrodotoxina en la Salmonella

Concentración (µg/placa)	Número de colonias de revertientes de Salmonella (por placa ± D.E.)				
	S ₉	TA97	TA98	TA100	TA102
0,0	-	138±18	36±5	130±11	270 ±45
Disolvente*	-	122±17	30±8	140±12	281 ±53
0,01	-	126±9	37±15	132±15	273 ±42
0,10	-	110±16	31±9	123±25	290 ±34
1,0	-	114±25	32±10	131 ±17	301 ±66
10,0	-	114±15	36±4	131 ±18	282 ±63
100,0	-	126±15	30±8	139±11	292 ±55
0,0	+	116±27	40±11	154±21	263±10
Disolvente*	+	106±19	38±13	147±15	277±28
0,01	+	142±12	46±11	142±18	280 ±25
0,10	+	114±24	44±19	139±17	266±30
1,0	+	110±24	42±13	130±17	299±51
10,0	+	108±20	43±8	149±14	276 ±33
100,0	+	119±37	44±8	127±16	273±28

* ácido acético diluido al 0,02.

Como se muestra en la tabla 29, el mutante directo de diagnóstico, Dexona, y los mutantes indirectos, 2-AF y DAN, provocaron un incremento significativo en el número de colonias revertientes de las cepas probadas, dos o más veces en comparación con los grupos de control negativo. Esto evidenció la fiabilidad del sistema de investigación seleccionado. La tetrodotoxina a concentraciones de 0,01 a 100 µg/placa no provocó ningún incremento significativo en el número de colonias revertientes de cuatro cepas probadas, en presencia o bien en ausencia de activación de S₉. Esto sugirió que la tetrodotoxina no es mutagénica para las cepas de Salmonella.

9.2 Prueba de anomalía cromosómica en células CHL

Material de prueba: Tetrodotoxina en polvo, lote n.º 940701, suministrado por Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant Liaoning, China.

Se expusieron células de pulmón de hámster chino (CHL) a tetrodotoxina a las concentraciones de 5,0, 10,0, y 20,0 µg/ml durante 24 o 48 horas en ausencia de activación de S₉ y durante 6 horas en presencia de activación de S₉. Los resultados sugirieron que la tetrodotoxina no incrementó significativamente la tasa de anomalía cromosómica en comparación con el control con disolvente.

Los resultados de prueba de la acción de la anomalía de tetrodotoxina en el cromosoma de células CHL en ausencia de activación metabólica se presentan en la tabla 29.

Tabla 29. Acción de anomalía de tetrodotoxina en el cromosoma de células CHL en ausencia de activación metabólica

Pruebas (µg/ml)		Tiempo de recogida de células (horas)	Número de células observadas (parte)	Tasa de anomalía cromosómica (%)
Control sin tratamiento		24	100	0
Control con disolvente		24	100	3
Tetrodotoxina	5,0	24	100	0
	10,0	24	100	0
	20,0	24	100	2
MMC	0,25	24	100	72**

(continuación)

Pruebas (µg/ml)		Tiempo de recogida de células (horas)	Número de células observadas (parte)	Tasa de anomalía cromosómica (%)
Control sin tratamiento		48	100	0
Control con disolvente		48	100	2
Tetrodotoxina	5,0	48	100	1
	10,0	48	100	2
	20,0	48	100	1
MMC	0,25	48	100	99**

** Por comparación con el grupo de control con disolvente , $P < 0,01$.

Como se muestra en la tabla 29, 24 horas y 48 horas después de la exposición, las tasas de anomalía cromosómica del grupo de control sin tratamiento fueron ambas del 0 %; las del grupo de control con disolvente del 3 % y 2 %, respectivamente; las de tetrodotoxina a concentraciones de 5,0 ~ 20,0 µg/ml, 0 ~ 2 %. Se encontraron anomalías estructurales en el cromosoma. Las tasas de anomalía del grupo de MMC de control positivo fueron del 72 % y 99 % 24 horas y 48 horas después, respectivamente ($P < 0,01$).

Los resultados observados de la acción de la anomalía de tetrodotoxina en el cromosoma de células CHL en presencia de activación metabólica se presentan en la tabla 30.

Tabla 30. Acción de anomalía de tetrodotoxina en el cromosoma de células CHL en presencia de activación metabólica

Pruebas (µg/ml)		Mezcla con S ₉ (ml)	Tiempo de recogida de células (horas)	Número de células observadas (parte)	Tasa de anomalía cromosómica (%)
Control sin tratamiento		-	24	100	2
Control con disolvente		-	24	100	1
Control con disolvente		0,5	24	100	1
Control con S ₉		0,5	24	100	1
Tetrodotoxina	5,0	0,5	24	100	0
	10,0	0,5	24	100	3
	20,0	0,5	24	100	0
CP	20,0	-	24	100	0
	20,0	0,5	24	100	50**
Control sin tratamiento		-	48	100	2
Control con disolvente		-	48	100	2
Control con disolvente		0,5	48	100	3
Control con S ₉		0,5	48	100	0
Tetrodotoxina	5,0	0,5	48	100	1
	10,0	0,5	48	100	1
	20,0	0,5	48	100	1
CP	20,0	-	48	100	3
	20,0	0,5	48	100	42**

**En comparación con el grupo de control de S₉, $P < 0,01$.

Como se muestra en la tabla 30, 24 horas y 48 horas de la exposición, las tasas de anomalía cromosómica del grupo de control sin tratamiento fueron ambas del 2 %; las de los grupos de control con disolvente, 1 %, 2 %, respectivamente; las del control con disolvente en presencia de S₉, 1 % y 3 %, respectivamente; las del control con S₉, 1 % y 3 % respectivamente. Para los grupos con tetrodotoxina, las tasas de anomalía cromosómica fueron entre el 0 % ~ 3 % a concentraciones de 5,0 ~ 20,0 µg/ml. Se encontraron anomalías estructurales en los cromosomas. Las tasas de anomalía cromosómica del grupo CP de control positivo fueron del 50 % y 42 % respectivamente (P<0,01), mientras que fueron del 0 % y 3 % respectivamente en ausencia de la activación metabólica.

Los resultados anteriores indicaron que en ausencia de activación metabólica las tasas de anomalía cromosómica del grupo de control sin tratamiento, el grupo de control con disolvente, los grupos con tetrodotoxina en el intervalo de concentración de 5,0-20,0 µg/ml estaban dentro del intervalo normal, mientras que las del grupo de MMC de control positivo manifestó incrementos significativos. En presencia de activación metabólica las tasas de anomalía cromosómica del grupo de control sin tratamiento, el grupo de control con disolvente, el grupo de control con disolvente más S₉, el grupo de control con S₉, los grupos con tetrodotoxina en el intervalo de concentración de 5,0-20,0 µg/ml también estaban en el intervalo normal, mientras que las del grupo CP de control positivo manifestaron incrementos significativos. De forma similar, las tasa de anomalía del grupo CP de control positivo estaban dentro del intervalo normal en ausencia de activación metabólica. Estos resultados evidenciaron la fiabilidad de este sistema de prueba. Por lo tanto, la tetrodotoxina en el intervalo de concentración de 5,0 ~ 20,0 µg/ml no indujo anomalías cromosómicas en células CHL.

9.3 Prueba de micronúcleos sobre tetrodotoxina en células de médula de ratón

Material de prueba: inyección de tetrodotoxina. 30 µg/2 ml/ampolla, lote n.º 931220, suministrado por Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd. En esta prueba se asignaron tres grupos de dosis, tetrodotoxina 10, 5 y 2,5 µg/kg. La vía de administración fue inyección intramuscular (inducción). Se asignaron dos grupos de control: uno fue un grupo de control con disolvente de ácido acético (0,02 %); y el otro, un grupo de control positivo de ciclofosfamida (CP, 60 mg/kg). También se asignó otro grupo de tetrodotoxina a 10 µg/kg a la muestra 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas y 72 horas después de la dosificación del fármaco, mientras que para todos los demás grupos, se prepararon especímenes 24 horas después de la primera dosificación, para examinar sus tasas de micronúcleos. Los resultados indicaron que después de la dosificación/inducción, la tasa de micronúcleos de tetrodotoxina a 10 µg/kg fue del 4,3 %, lo que fue significativamente diferente de la del grupo de control con disolvente (P<0,05), mientras que la tasa de micronúcleos del grupo de control positivo fue del 46,5 %, muy significativamente diferente de la del grupo de control con disolvente (P<0,01). La TTX a 5 y 2,5 µg/kg no provoca ningún cambio considerable.

Las tasas de micronúcleos de los ratones administrados con tetrodotoxina a 10 µg/kg 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, y 72 horas después de la dosificación se presentan en la tabla 31. Los resultados de todos los grupos estaban dentro del intervalo normal. En base a los resultados anteriores, el tiempo para sacrificar a los animales para preparar los especímenes se determinó 24 horas después de la primera dosificación.

Tabla 31. Tasas de micronúcleos de ratones dosificados con tetrodotoxina a 10 µg/kg en varios puntos temporales

Punto temporal (hora después de dosificación)	Número de eritrocitos policromáticos	Número de células con micronúcleos	Tasa de micronúcleos (%) ($\bar{X} \pm D.E.$)
12	6000	22	3,7 ± 2,2
24	6000	8	1,3 ± 1,0
36	6000	18	3,0 ± 1,1
48	6000	16	3,3 ± 1,3
72	6000	24	4,0 ± 2,5
Disolvente 24	6000	13	2,2 ± 0,8

Los resultados de los animales administrados con tetrodotoxina a 10,5 y 2,5 µg/kg se presentan en la tabla 32. The tasa de micronúcleos de tetrodotoxina a 10 µg/kg fue del 4,3 ‰, lo que era estadísticamente diferente de la del control con disolvente (P<0,05). Las tasas de micronúcleos de otros grupos estaban dentro del intervalo normal, mientras que las de control positivo eran significativamente diferentes de las del control con disolvente (P<0,01).

Tabla 32. Tasas de micronúcleos de los ratones en todos los grupos

Dosis (µg/kg)	Número de eritrocitos policromáticos	Número de células con micronúcleos	Tasa de micronúcleos (%) ($\bar{X} \pm D.E.$)
10	6000	26	4,3 ± 1,6*
5	6000	15	2,5 ± 1,5
2,5	6000	13	2,2 ± 1,3
Disolvente	6000	13	2,2 ± 0,8
CP (60 µg/kg)	6000	279	46,5 ± 12,8**

*Por comparación con el grupo con disolvente, $P < 0,05$

** Por comparación con el grupo con disolvente, $P < 0,01$

Bajo las condiciones de esta prueba, tales como el nivel de dosificación, la vía de administración y el plan de dosificación, los resultados indicaron que las tasas de micronúcleos inducidas por inyección intramuscular de tetrodotoxina a 10 µg/kg se incrementaron ligeramente y fueron estadísticamente diferentes de las del control con disolvente ($P < 0,05$). Las tasas de micronúcleos inducidas por tetrodotoxina a 2,5 y 5 µg/kg (im.) estaban dentro del intervalo normal, mientras que las inducidas por el control positivo eran muy significativamente diferentes de las del control con disolvente ($P < 0,01$). Estos resultados evidenciaron la fiabilidad de este sistema experimental.

Los resultados del experimento indicaron que la tetrodotoxina a un nivel de dosis alto, 10 µg/kg que es igual a 1/2 DL₅₀, tuvo algo de efecto sobre la tasa de micronúcleos del ratón, pero esto no tiene significación clínica debido a que esta dosis es mucho mayor que las de uso clínica. Para examinar adicionalmente dicho efecto de tetrodotoxina, se llevaron a cabo estudios complementarios (rogamos consulten el siguiente anexo).

Anexo:

Para examinar adicionalmente el efecto de tetrodotoxina sobre la tasa de micronúcleos de ratón, se llevó a cabo una prueba complementaria con los resultados presentados en las tablas 33 y 34.

Tabla 33. Efecto de la frecuencia de dosificación de tetrodotoxina sobre la tasa de micronúcleos*

Dosis de tetrodotoxina (µg/kg)	Vía de administración	Tasa de micronúcleos (% ± D.E.) Única inyección Dosificación inductiva**	
0	i.m.		2,2 ± 0,8
2,5	i.m.	1,3 ± 1,7	2,2 ± 1,3
5,0	i.m.	1,7 ± 2,1	4,0 ± 1,6
10,0	i.m.	1,8 ± 1,8	5,8 ± 2,4***

Número de animales: de 3 a 5 por grupo

**Dos inyecciones

*** $P < 0,05$ por comparación con el grupo de control con disolvente.

Tabla 34. Efecto de la vía de administración de tetrodotoxina sobre la tasa de micronúcleos

Dosis de tetrodotoxina (µg/kg)	Vía de administración	Tasa de micronúcleos (% ± D.E.)
7	i.m.	4,7 ± 3,5
7	i.p.	40 ± 1,7

Como se muestra en la tabla 33, la tasa de micronúcleos de tetrodotoxina a dosis alta (10 µg/kg) por dosificación individual fue del 5,8 ± 2,4 %, lo que fue ligeramente mayor que la normal; las tasas de micronúcleos de tetrodotoxina a 2,5, y 5 µg/kg estaban dentro del intervalo normal pero las de dosificación inductiva (dos inyecciones) fueron todas mayores que las de una única inyección. Se compararon dos vías de administración, i.m. e i.p., y los resultados en la tabla 34 indicaron que las tasas de micronúcleos de estas dos vías no eran significativamente diferentes.

En conclusión, en esta prueba se estudió el efecto de tetrodotoxina sobre la tasa de micronúcleos de células de la médula de ratones AMS. A niveles de dosificación que variaban desde 1/2 hasta 1/8 DL₅₀, la tetrodotoxina no indujo ningún incremento significativo en la tasa de micronúcleos excepto porque los resultados de tetrodotoxina a 1/2 DL₅₀ fueron ligeramente mayores de lo normal. La vía de administración tampoco produjo estadísticamente ninguna diferencia en las tasas de micronúcleos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende tetrodotoxina (TTX) en un vehículo farmacéutico para su uso en la producción de analgesia en un paciente que experimenta dolor por inyección subcutánea de 20 a 40 ug de tetrodotoxina por adulto hasta 4 veces por día durante un periodo de tratamiento de 3 días.
- 5 2. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que la composición produce analgesia de hasta 20 días después de un periodo de tratamiento.
3. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que la composición produce analgesia de más de 20 días después de un periodo de tratamiento.
- 10 4. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el dolor está provocado por estimulación mecánica, química o isquémica o inflamación.
5. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el dolor es dolor neuropático, dolor crónico o dolor del miembro fantasma.
6. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el dolor está provocado por cáncer.
- 15 7. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 6, en la que el dolor surge de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer rectal, leiomiomasarcoma, cáncer de hueso, cáncer de estómago, cáncer linfático, cáncer esofágico, cánceres de los órganos genitales, cáncer de próstata, cáncer del sistema digestivo, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer del sistema respiratorio, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer del sistema urinario, linfoma y cáncer cutáneo.