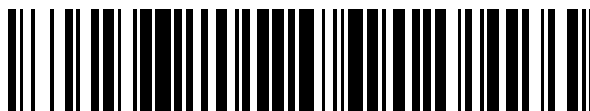


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 881**

51 Int. Cl.:

C07D 489/12 (2006.01)

A61K 31/4353 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009** **E 09760972 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2370443**

54 Título: **Dihidroetorfinas y su preparación**

30 Prioridad:

08.12.2008 GB 0822342

26.11.2009 GB 0920699

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

21.10.2015

73 Titular/es:

EURO-CELTIQUE S.A. (100.0%)
2, avenue Charles de Gaulle
1653 Luxembourg, LU

72 Inventor/es:

WHITELOCK, STEVE;
HARDING, DEBORAH PHYLLIS y
TURNER, CARL DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 548 881 T3

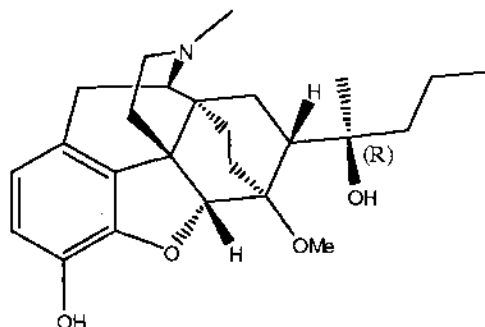
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Dihidroetorfinas y su preparación

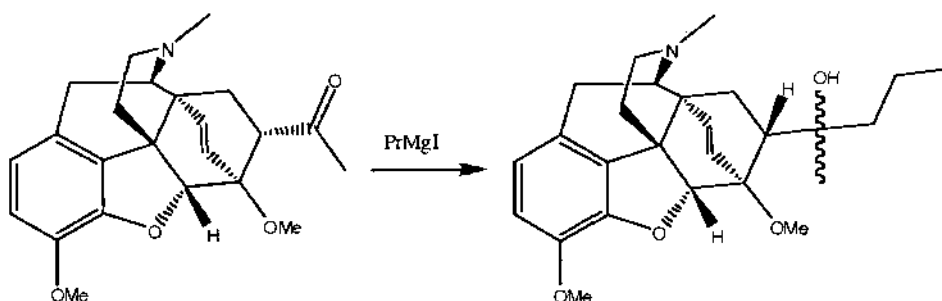
La presente invención se refiere a un procedimiento nuevo para fabricar (S)-dihidroetorfinas y a la (S)-dihidroetorfinas en sí.

- 5 La (R)-dihidroetorfinas (mostrada a continuación) es un potente analgésico.



- 10 Se usa principalmente en China, en forma sublingual, en dosis que van desde los 20 hasta los 180 µg. En comparación con otros analgésicos, se ha informado de que produce una analgesia intensa y efectos secundarios relativamente leves. También se desvela el uso de (R)-dihidroetorfinas en parches transdérmicos en el documento JP-10-231248. Sin embargo, hasta donde llega el conocimiento del solicitante, no existe ningún parche de este tipo disponible comercialmente.

- 15 La dihidroetorfinas es una variante de la etorfinas. La (R)-etorfinas es un opioide extremadamente potente usado para anestesiarse animales, por ejemplo, elefantes. Se desarrolló en la década de 1960 y las rutas de síntesis para su preparación son bien conocidas. En el ejemplo 12 del documento GB 925,723, por ejemplo, se desvela una síntesis de etorfinas en la que se añade un reactivo de Grignard (yoduro de propil magnesio) a un derivado de tebaína como se muestra a continuación:



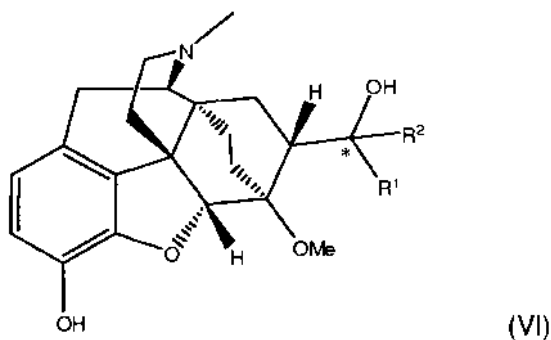
- 20 Los resultados dados en el ejemplo 12 indican que se produce el isómero α al triturar el producto de reacción en bruto con metanol y que se podría cristalizar el isómero β a partir de los licores metanólicos si se diluyen con agua y se decanta el líquido. Por lo tanto, el solicitante esperaba que la ruta de síntesis descrita en el documento GB 925.723 se pudiera aplicar a la dihidroetorfinas y que se pudieran obtener ambos diastereómeros (R) y (S). Sin embargo, se descubrió que no era el caso. En su lugar, la adición de haluro de propil magnesio al derivado de dihidrotebaína se produjo con una estereoselectividad inesperadamente alta y sólo se obtuvo el diastereómero (R).

- 25 En Park H. S. y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16(13), 3609-3613 se describe la síntesis de análogos de buprenorfinas en la que se añade reactivo de Grignard a la tebaína y después se desmetila el alcohol resultante.

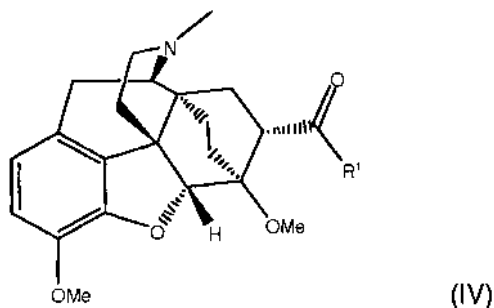
Hasta donde llega el conocimiento de los solicitantes, no se ha preparado nunca el isómero (S) de la dihidroetorfinas. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una ruta de síntesis alternativa para obtener (S)-dihidroetorfinas y, en especial, un procedimiento que proporcione (S)-dihidroetorfinas con un exceso diastereomérico elevado. Este isómero es necesario para confirmar la estereoquímica de los estereoisómeros conocidos.

- 30 El solicitante ha descubierto ahora un procedimiento que satisface estas necesidades. Además, el solicitante ha descubierto que el isómero (S) de dihidroetorfinas posee propiedades farmacológicas útiles y, en particular, efectos analgésicos.

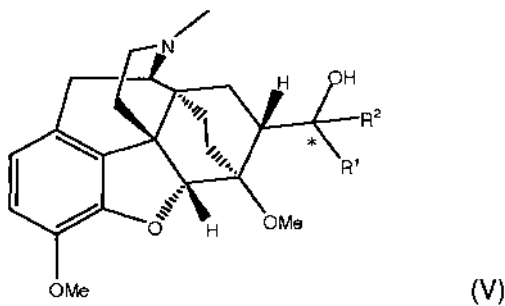
Por tanto, vista desde un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (VI), o una sal del mismo,



5 en la que R^1 y R^2 son independientemente alquilo C_{1-8} de cadena lineal y * representa un estereocentro (S), que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV)



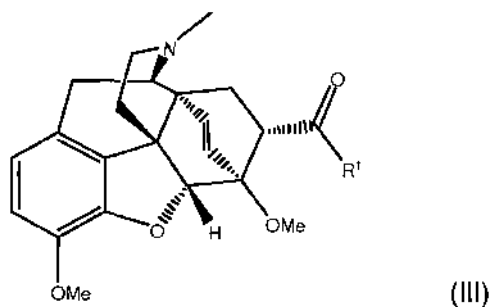
en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento; con un compuesto de fórmula $R^2M(X)p$, en la que R^2 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal, M es metal, X es haluro y p es 1 o 0 para producir un compuesto de fórmula (V)



10

en la que R^1 , R^2 y * son como se ha definido anteriormente en el presente documento.

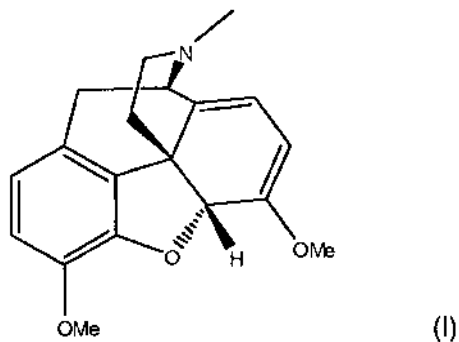
En otro procedimiento preferente de la presente invención, se prepara el compuesto de fórmula (IV) por reducción de un compuesto de fórmula (III)



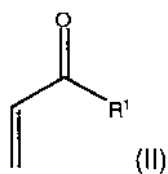
15

en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En otro procedimiento preferente más de la presente invención, se prepara el compuesto de fórmula (III) por reducción de un compuesto de fórmula (I)



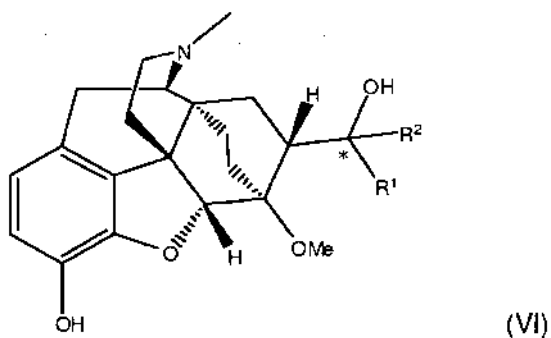
con un compuesto de fórmula (II)



5

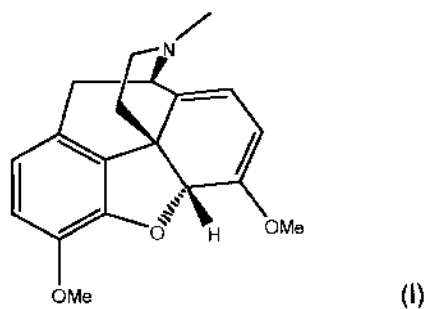
en la que R^1 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal.

La presente invención proporciona un procedimiento preferente para la preparación de un compuesto de fórmula (VI), o una sal del mismo,

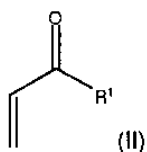


10 en la que R^1 y R^2 son independientemente alquilo C_{1-8} de cadena lineal y * representa un estereocentro (S), que comprende:

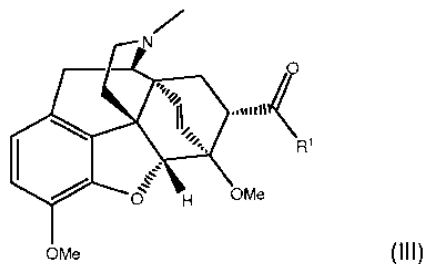
hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I)



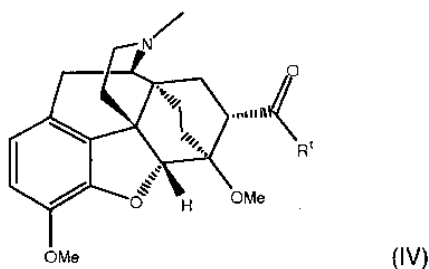
con un compuesto de fórmula (II)



en la que R¹ es alquilo C₁₋₈ de cadena lineal para dar un compuesto de fórmula (III)

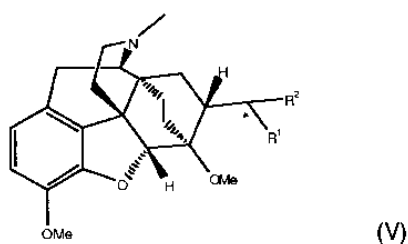


- 5 en la que R¹ es como se ha definido anteriormente en el presente documento.
reducir dicho compuesto de fórmula (III) para producir un compuesto de fórmula (IV).



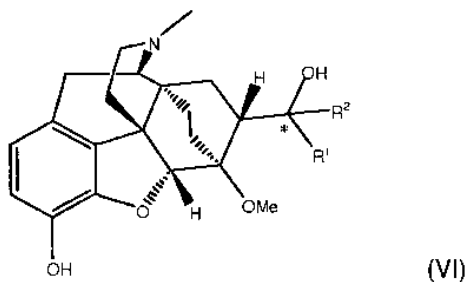
en la que R¹ es como se ha definido anteriormente en el presente documento

- 10 hacer reaccionar dicho compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula R²M(X)_p, en la que R² es alquilo C₁₋₈ de cadena lineal, M es metal, X es haluro y p es 1 o 0, para dar un compuesto de fórmula (V)



en la que R¹, R² y * son como se ha definido anteriormente en el presente documento,
e hidrolizar dicho compuesto de fórmula (V) para producir un compuesto de fórmula (VI).

Vista desde otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (VI), o una sal del mismo,



en la que R^1 y R^2 son independientemente alquilo C_{1-8} de cadena lineal y * representa un estereocentro (S).

Vista desde otro aspecto, la invención se refiere a composiciones, preferentemente composiciones farmacéuticas, que comprenden un compuesto novedoso como se describe anteriormente en el presente documento.

5 Vista desde otro aspecto, la invención se refiere a compuestos como se describe anteriormente en el presente documento para su uso en medicina (por ejemplo, como analgésicos).

Visto desde otro aspecto más, la invención se refiere al uso de un compuesto como se describe anteriormente en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se usa para hacer referencia a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal, cíclica o ramificada. Los grupos alquilo presentes en los compuestos (II)-(VI) son grupos alquilo de cadena lineal. Los grupos alquilo preferentes son de fórmula C_nH_{2n+1} , en la que n es de 1 a 8. Los grupos alquilo típicos incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo. Los grupos alquilo preferentes de los compuestos (II)-(VI) no están sustituidos.

El compuesto de fórmula (I) es tebaína y está disponible comercialmente, por ejemplo, de Tasmanian Alkaloids, Pty. De forma alternativa, se puede preparar el compuesto de fórmula (I) según procedimientos descritos en la literatura.

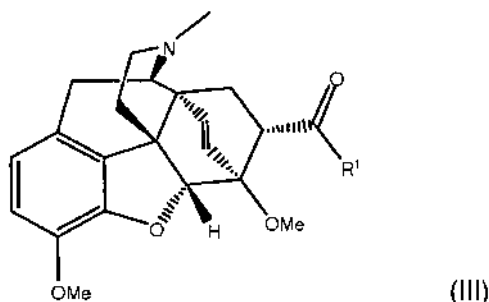
15 En un procedimiento preferente de la invención, R^1 del compuesto de fórmula (II) es preferentemente alquilo C_{2-7} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{3-5} de cadena lineal, especialmente, alquilo C_3 de cadena lineal (por ejemplo n-propilo). Un compuesto particularmente preferente de fórmula (II) es hexen-3-ona. Está disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich.

20 Se hace reaccionar el compuesto de fórmula (I) con un compuesto de fórmula (II) para producir un compuesto de fórmula (III). Típicamente, la reacción que sufren estos compuestos se denomina reacción de Diels-Alder. La reacción de Diels-Alder se puede llevar a cabo en condiciones convencionales conocidas en la técnica. La reacción de compuestos de fórmulas (I) y (II) se puede llevar a cabo, por ejemplo, en cualquier disolvente convencional. Son preferentes los disolventes con puntos de ebullición superiores a 60 °C (por ejemplo, metanol y etanol). El etanol es un disolvente particularmente preferente.

25 En una reacción típica entre compuestos de fórmulas (I) y (II), se calientan los compuestos a reflujo en exceso de disolvente, por ejemplo, durante 10-24 horas. Se puede hacer un seguimiento del procedimiento de la reacción usando, por ejemplo, CCF y/o RMN de 1H . En una reacción preferente se usan 1,2-15 equivalentes molares, más preferentemente 1,5-10 equivalentes molares o 2-8 equivalentes molares del compuesto de fórmula (II) en relación con el compuesto de fórmula (I). En una reacción particularmente preferente se usan 1,2-2 equivalentes molares, más preferentemente 1,3-1,8 equivalentes molares, por ejemplo, aproximadamente 1,5 equivalentes molares del compuesto de fórmula (II), en relación con el compuesto de fórmula (I).

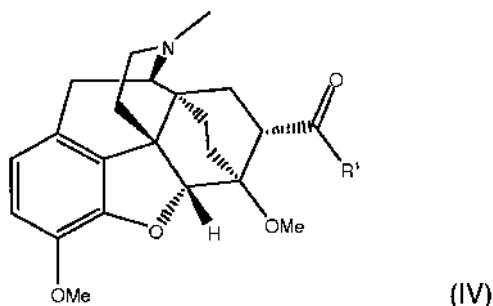
30 Después, se enfría la mezcla de reacción y se concentra. Se puede obtener el producto resultante, un compuesto de fórmula (III), por un procedimiento de tratamiento convencional y, opcionalmente, purificarlo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la purificación por cristalización en metanol o alcohol isopropílico. Más preferentemente, el compuesto de fórmula (III) cristaliza directamente en el disolvente de la reacción. Opcionalmente, se puede recrystallizar. Preferentemente, el rendimiento de la reacción es de al menos el 60 %, más preferentemente, de al menos el 65 %, por ejemplo, de al menos el 80 %. El rendimiento máximo es del 100 %. Preferentemente, la pureza del compuesto de fórmula (III) es de al menos el 95 %, más preferentemente, de al menos el 97 %, aún más preferentemente, de al menos el 99 %, por ejemplo, del 99,5 %. La pureza máxima es del 100 %. Preferentemente, la pureza se determina usando HPLC.

En un procedimiento preferente de la invención, el compuesto de fórmula (III) es de fórmula:



45 en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento, por ejemplo, R^1 es alquilo C_{2-7} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{3-5} de cadena lineal, especialmente, alquilo C_3 de cadena lineal (por ejemplo, n-propilo).

- Se puede reducir el compuesto de fórmula (III) por cualquier reacción de reducción conocida adecuada, pero, preferentemente, se reduce con una reacción de hidrogenación (por ejemplo, con H_2 en un recipiente Parr o por transferencia de hidrógeno). Por ejemplo, se puede hidrogenar el compuesto de fórmula (III) en un disolvente (por ejemplo, etanol) con un catalizador (por ejemplo, paladio sobre carbono) a una presión de hidrógeno (por ejemplo, hasta 50 psi de H_2). Preferentemente, el volumen de la reacción está en el intervalo de 5-80 l, más preferentemente, de 10-20 l, por ejemplo, aproximadamente 12 l. Preferentemente, la cantidad de catalizador empleada está en el intervalo del 10-60 % en peso, más preferentemente, del 30-55 % en peso, por ejemplo, aproximadamente el 50 % en peso. La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de 30-100 °C, preferentemente, a una temperatura de 40-60 °C, por ejemplo, a 50 °C o 65 °C.
- Al final de la reacción, se puede retirar por filtración cualquier catalizador (por ejemplo, paladio) usado en la misma. Después, se puede aislar el producto, un compuesto de fórmula (III), por un procedimiento de tratamiento convencional. Opcionalmente, el compuesto de fórmula (IV) se purifica. Por ejemplo, el lavado con un alcano C_{1-8} tal como heptano retira el etanol. Sin embargo, una ventaja de la reacción de hidrogenación es que se puede usar el compuesto de fórmula (IV) sin purificación por cromatografía y/o cristalización. Preferentemente, el rendimiento de la reacción es de al menos el 50 %, más preferentemente, de al menos el 65 %, aún más preferentemente, del 85 %, aún más preferentemente, de al menos el 90 %. El rendimiento máximo es del 100 %. Preferentemente, el compuesto de fórmula (IV) se obtiene con una pureza de al menos el 95 %, más preferentemente, de al menos el 99 %, por ejemplo, de al menos el 99,5 %. La pureza máxima es del 100 %. Preferentemente, la pureza se determina usando HPLC.
- En un procedimiento preferente de la invención, el compuesto de fórmula (IV) es de fórmula:



- en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento, por ejemplo, R^1 es alquilo C_{2-7} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{3-5} de cadena lineal, especialmente, alquilo C_3 de cadena lineal (por ejemplo, n-propilo)
- Se hace reaccionar el compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$ en la que R^2 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal, M es metal (por ejemplo, un metal alcalino o alcalinotérreo), X es haluro y p es 1 o 0, para producir un compuesto de fórmula (V). En compuestos preferentes de fórmula $R^2M(X)_p$, R^2 es alquilo C_{1-3} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{1-2} , por ejemplo, metilo.
- En otros compuestos preferentes de fórmula $R^2M(X)_p$, M es magnesio o litio, preferentemente, magnesio. Cuando M es Mg, preferentemente, p es 1. Cuando M es litio, preferentemente, p es 0. Cuando está presente, preferentemente, X es Cl, Br o I. El haluro de metil magnesio, en especial el bromuro de metil magnesio y el yoduro de metil magnesio, es un compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$ preferente, en especial el bromuro de metil magnesio.
- Típicamente, la reacción del compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$ se denomina reacción de adición nucleófila. Cuando M es Mg y X es haluro, con frecuencia la reacción se denomina adición de Grignard. La reacción de adición se puede llevar a cabo en cualquier disolvente convencional. Son preferentes los disolventes no acuosos (por ejemplo, los disolventes anhidros). Un ejemplo de disolvente preferente es el éter, por ejemplo, MTBE, THF o éter dietílico. Son preferentes MTBE o el éter dietílico. El éter dietílico es un disolvente particularmente preferente. El THF es particularmente preferente cuando se usa un compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$ en el que M es Mg, X es Cl y p es 2.
- Preferentemente, la reacción de adición se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 20 a 60 °C, más preferentemente, de 30 a 45 °C, por ejemplo, a aproximadamente 35 °C. Preferentemente, se usa un exceso del compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$. En particular se usan 1,2-4 equivalentes, más preferentemente, 1,5-3 equivalentes de un compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$ en relación con el compuesto de fórmula (IV).
- El compuesto de fórmula (V) se puede aislar por técnicas convencionales. Opcionalmente, se puede triturar, por ejemplo, con metanol. Adicionalmente, o de forma alternativa, se puede purificar el compuesto de fórmula (V) por cromatografía en columna. El compuesto de fórmula (V) también se puede cristalizar. Preferentemente, el compuesto de fórmula (V) se cristaliza con metanol. Preferentemente, el rendimiento de la reacción es de al menos el 20 %, más preferentemente, de al menos el 30 %, por ejemplo, del 20-60 %, aún más preferentemente, de al

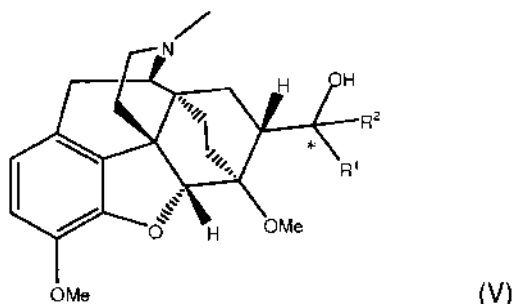
menos el 65 %. El rendimiento máximo es del 100 %. Preferentemente, la pureza del compuesto de fórmula (V) es de al menos el 95 %, aún más preferentemente, de al menos el 99 %, por ejemplo, de al menos el 99,5 %. La pureza máxima es del 100 %. Preferentemente, la pureza se determina usando HPLC.

5 La reacción de adición genera un estereocentro nuevo en el compuesto de fórmula (V) en el carbono 19. La configuración de este estereocentro depende, al menos en parte, de la naturaleza de R^1 y R^2 .

En los procedimientos de la invención, se genera un estereocentro (S) en el carbono 19. En procedimientos particularmente preferentes, se genera un estereocentro (S) en el carbono 19 en un exceso diastereomérico de al menos el 85 %, más preferentemente, de al menos el 90 %, por ejemplo, de al menos el 95 % o de al menos el 99 %. Por tanto, en un procedimiento preferente se proporciona un compuesto de fórmula (V) en ausencia, o
10 ausencia sustancial, de isómero (R). Preferentemente, se proporciona el compuesto de fórmula (V) con menos del 1 % en peso, aún más preferentemente con menos del 0,5 % en peso, de isómero (R).

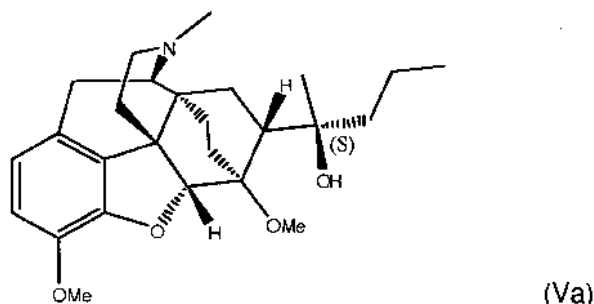
En un procedimiento de la invención particularmente preferente, R^1 es alquilo C_{3-6} de cadena lineal (por ejemplo, propilo), R^2 es alquilo C_{1-2} (por ejemplo, metilo) y se genera un estereocentro (S) en la reacción de adición en el carbono 19 en un exceso diastereomérico de al menos el 85 %, más preferentemente, de al menos el 90 %, por
15 ejemplo, de al menos el 95 % o de la menos el 99 %.

Por tanto, en un procedimiento preferente de la invención, el compuesto de fórmula (V) es de fórmula:



en la que R^1 y R^2 son como se describe anteriormente en el presente documento, por ejemplo R^1 es alquilo C_{2-7} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{3-5} de cadena lineal, en especial, alquilo C_3 de cadena lineal (por
20 ejemplo, n-propilo), R^2 es alquilo C_{1-3} de cadena lineal, más preferentemente alquilo C_{1-2} , por ejemplo, metilo, y el (*) representa un estereocentro (S).

En un procedimiento particularmente preferente de la invención, el compuesto de fórmula (V) es:



Como se menciona anteriormente, opcionalmente, se puede cristalizar el compuesto de fórmula (V). En un
25 procedimiento preferente de la invención, se cristaliza el compuesto de fórmula (V). Se puede usar cualquier disolvente convencional para el procedimiento de cristalización, por ejemplo, alcoholes C_{1-4} , agua, acetona, acetonitrilo, DCM y MTBE. Son disolventes de cristalización preferentes el metanol, el etanol, el agua y las mezclas de los mismos, en especial etanol/agua y el etanol. En un procedimiento de cristalización típico, se disuelve una cantidad del compuesto de fórmula (V) obtenido a partir de la reacción de adición en el disolvente elegido,
30 preferentemente en una cantidad mínima del mismo, y se deja reposar la solución, por ejemplo, durante 3-4 días. Preferentemente, la cristalización se lleva a cabo a de -5 a 5 °C, por ejemplo, a 0-4 °C.

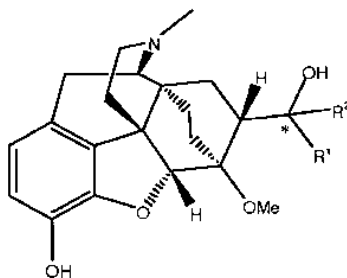
Preferentemente, se hidroliza el compuesto de fórmula (V) con un hidróxido de metal alcalino para formar un compuesto de fórmula (VI). Un hidróxido de metal alcalino preferente es KOH. Preferentemente, en la reacción de hidrólisis se usa un exceso de hidróxido de metal alcalino, por ejemplo, un exceso de 10-40 equivalentes en relación
35 con el compuesto de fórmula (V). La reacción se puede llevar a cabo en cualquier disolvente convencional. El dietilenglicol es un disolvente preferente.

Preferentemente, la reacción de hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 150-220 °C, por ejemplo, a aproximadamente 180-200 °C. Se puede hacer un seguimiento del progreso de la reacción por técnicas convencionales, por ejemplo, CFF, pero, típicamente, durará 10-20 horas, por ejemplo, 12-18 horas. Una vez completada la reacción, se puede aislar el compuesto de fórmula (VI) con técnicas convencionales. Se puede triturar el compuesto de fórmula (VI). Preferentemente, el rendimiento de la reacción es de al menos el 40 %, más preferentemente, de al menos el 45 %, aún más preferentemente, del 85 %, aún más preferentemente, de al menos el 90 %. El rendimiento máximo es del 100 %. Preferentemente, la pureza del compuesto de fórmula (VI) es de al menos el 90 %, aún más preferentemente, de al menos el 95 %. La pureza máxima es del 100 %. Preferentemente, la pureza se determina usando HPLC.

- 10 El compuesto de fórmula (VI) también se puede cristalizar. Los disolventes preferentes para su uso en la cristalización son AcCN y MTBE. Más preferentemente, el compuesto de fórmula (VI) se cristaliza en un alcohol C₁₋₄ y/o agua, por ejemplo, etanol y/o etanol/agua.

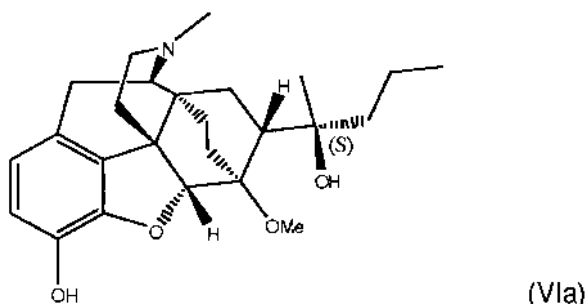
- 15 En una reacción de hidrólisis preferente, se mantiene la estereoquímica de cada uno de los estereocentros presentes en el compuesto de fórmula (V). Preferentemente, el compuesto de fórmula (VI), por ejemplo 19-S-dihidroetorfina, se proporciona en ausencia o en ausencia sustancial del isómero (R). Preferentemente, hay menos del 1 % en peso, más preferentemente, menos del 0,5 % en peso, aún más preferentemente, menos del 0,01 % en peso de isómero (R) presente.

Por tanto, en un procedimiento preferente, el compuesto de fórmula (VI) es:



- 20 en la que R¹ y R² son como se describe anteriormente en el presente documento, por ejemplo R¹ es alquilo C₂₋₇ de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C₃₋₅ de cadena lineal, en especial, alquilo C₃ de cadena lineal (por ejemplo, n-propilo), R² es alquilo C₁₋₃ de cadena lineal, más preferentemente alquilo C₁₋₂, por ejemplo, metilo, y el (*) representa un estereocentro (S). Preferentemente, el compuesto de fórmula (VI) tiene una pureza de al menos el 99 %, por ejemplo, determinada por HPLC.

- 25 En un procedimiento particularmente preferente, el compuesto de fórmula (VI) es:



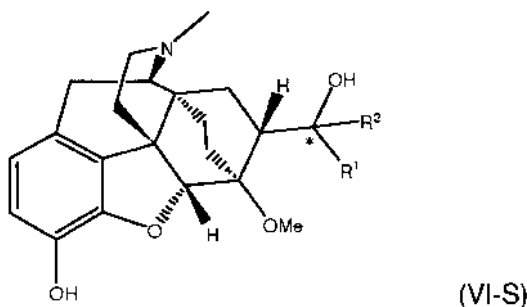
- 30 Los compuestos (V) y (VI) descritos anteriormente en el presente documento se pueden convertir en sus sales por técnicas bien conocidas en la técnica. Las sales preferentes son las sales farmacéuticamente aceptables. Un derivado que aparece en ocasiones en cantidades pequeñas (por ejemplo, <5 % en peso) es el compuesto 6-hidroxi. Se produce si la reacción de hidrólisis hidroliza adicionalmente el grupo 6-metoxi. Se puede aislar el derivado 6-hidroxi por recristalización.

- 35 Las sales preferentes son las que mantienen la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de la presente invención y se forman a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos adecuados. Son preferentes las sales de adición de ácido. Los ejemplos representativos de sales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido yodhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido sulfámico, el ácido fosfórico y el ácido nítrico, y los derivados de ácidos orgánicos tales como el ácido p-toluenosulfónico, el ácido salicílico, el ácido metanosulfónico, el ácido oxálico, el ácido succínico, el ácido cítrico, el ácido málico, el ácido láctico, el ácido fumárico, el ácido trifluoroacético y similares. La modificación de un compuesto a una sal es una técnica bien conocida por los químicos para obtener una mejor estabilidad física y química, higroscopicidad, fluidez y

solubilidad de los compuestos.

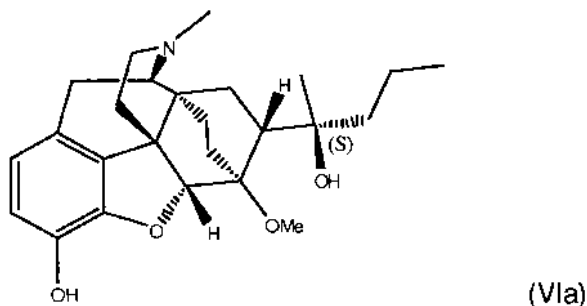
Los compuestos preferentes de la invención son los compuestos de fórmula (VI) como se describe anteriormente en el presente documento, en la que, preferentemente, R^1 es alquilo C_{2-7} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{3-5} de cadena lineal, en especial, alquilo C_3 de cadena lineal (por ejemplo, n-propilo). En compuestos preferentes de fórmula (VI), R^2 es alquilo C_{1-3} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{1-2} , por ejemplo, metilo. En compuestos (VI) de la invención, el estereocentro del carbono 19 es (S).

Un compuesto de fórmula (VI) preferente es un compuesto de fórmula:



en la que R^1 y R^2 son como se describe anteriormente en el presente documento, por ejemplo R^1 es alquilo C_{2-7} de cadena lineal, más preferentemente, alquilo C_{3-5} de cadena lineal, en especial, alquilo C_3 de cadena lineal (por ejemplo, n-propilo), R^2 es alquilo C_{1-3} de cadena lineal, más preferentemente alquilo C_{1-2} , y el (*) representa un estereocentro (S).

Un compuesto de fórmula (VI) particularmente preferente es un compuesto de fórmula:



Los compuestos de la presente invención tienen usos diversos. Por ejemplo, los compuestos (VI-S) se pueden usar para confirmar la quiralidad (R) de los productos de dihidroetorfina conocidos. El uso de los compuestos de la invención de este modo se ilustra en los ejemplos que se presentan más adelante en el presente documento. Los compuestos (III) y (IV) también son útiles en la preparación de (R)-dihidroetorfina, que se sabe que tiene propiedades farmacéuticas útiles.

Además, los compuestos de fórmulas (VI-S) se pueden incorporar en composiciones, preferentemente en composiciones farmacéuticas. Por tanto, la presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención como se describe anteriormente en el presente documento (por ejemplo, compuestos de fórmulas (VI-S)) y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la invención, por ejemplo, compuestos de fórmula (VI-S) pueden estar presentes solos o en combinación con otro principio activo en una composición.

Las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, de la invención pueden adoptar cualquier forma convencional. Preferentemente, no obstante, las composiciones de la invención se preparan en una forma de dosificación adecuada para administración transdérmica. Otras composiciones preferentes de la invención se preparan en una forma de dosificación adecuada para administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa.

Con administración "transdérmica" se quiere decir la administración de los compuestos descritos anteriormente en el presente documento en la superficie de la piel de un individuo para que el agente pase a través del tejido epitelial hacia el torrente circulatorio del individuo. Se pretende que el término "transdérmico" incluya la administración transmucosa, es decir, la administración del compuesto en la superficie mucosa (por ejemplo, sublingual, yugal, vaginal, rectal) de un individuo para que pase a través del tejido mucoso hacia el torrente circulatorio del individuo.

Las formas de dosificación transdérmicas de la invención incluyen, pero sin limitación, pastillas bucales, pulverizadores, aerosoles, cremas, lociones, pomadas, geles, soluciones, emulsiones, suspensiones u otras formas conocidas por el experto en la técnica. Las formas de dosificación adecuadas para tratar los tejidos mucosos del interior de la cavidad bucal se pueden formular como colutorios o como geles bucales. Además, las formas de dosificación transdérmicas incluyen parches "de tipo depósito" o "de tipo matriz", que se pueden aplicar en la piel y llevar durante un período de tiempo específico para permitir la penetración de una cantidad deseada de principios activos.

Los excipientes adecuados (por ejemplo, vehículos y diluyentes) y otros materiales que se pueden usar para proporcionar formas de dosificación transdérmicas englobadas por la presente invención son bien conocidos por los expertos en las técnicas farmacéuticas y dependen del tejido en particular en el que se va a aplicar una composición farmacéutica o forma farmacéutica dada. Teniendo en cuenta ese hecho, los excipientes típicos incluyen, pero sin limitación, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral y mezclas de los mismos para formar lociones, tinturas, cremas, emulsiones, geles o pomadas, que son no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. Si se desea, también se pueden añadir hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación. Los ejemplos de agentes adicionales de este tipo son bien conocidos en la técnica.

En función del tejido específico que se va a tratar, se pueden usar componentes adicionales antes de, junto con o después del tratamiento con los compuestos de la invención. Por ejemplo, se pueden usar potenciadores de la penetración para favorecer la administración del compuesto al tejido. Los potenciadores de la penetración adecuados incluyen, pero sin limitación: acetona; diversos alcoholes, tales como etanol, oleilo y tetrahidrofurilo; sulfóxidos de alquilo, tales como sulfóxido de dimetilo; dimetilacetamida; dimetilformamida; polietilenglicol; pirrolidonas, tales como polivinilpirrolidona; calidades de Kollidon (povidona, polividona); urea; y diversos ésteres de azúcares solubles o insolubles en agua, tales como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monoestearato de sorbitano).

También se puede ajustar el pH de una composición farmacéutica o forma de dosificación, o del tejido al que se aplica la composición farmacéutica o forma de dosificación, para mejorar la administración de uno o más principios activos. Del mismo modo, se puede ajustar la polaridad de un vehículo disolvente, su fuerza iónica o su tonicidad para mejorar la administración. También se pueden añadir compuestos tales como estearatos a las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación para modificar de forma ventajosa la hidrofilia o la lipofilia de uno o más principios activos para mejorar la administración. A este respecto, los estearatos pueden servir como vehículo lipídico para la formulación, como agente emulsionante o tensioactivo y como agente de potenciación de la administración o de potenciación de la penetración. Se pueden usar diferentes sales, hidratos o solvatos de los principios activos para ajustar más las propiedades de la composición resultante.

Se pueden preparar geles orales para administración sublingual de los compuestos de la invención (por ejemplo, compuestos de fórmulas (VI-S)) al mezclar el compuesto con uno o más excipientes adecuados, incluidos agentes aromatizantes. Se pueden preparar supositorios para administración rectal de los compuestos de la invención (por ejemplo, compuestos de fórmulas (VI-S)) al mezclar el compuesto con un excipiente adecuado, tal como manteca de cacao, salicilatos y polietilenglicoles. Las formulaciones para administración vaginal pueden estar en forma de un óvulo vaginal, tampón, crema, gel, pasta, espuma o fórmula en pulverizador que contiene, además del principio activo, vehículos adecuados que se conocen en la técnica.

Para administración tópica, la composición farmacéutica que comprende los compuestos de la invención puede estar en forma de cremas, pomadas, linimentos, lociones, emulsiones, suspensiones, geles, soluciones, pastas, polvos, pulverizadores y gotas adecuados para la administración en la piel, los ojos o la nariz. La administración tópica puede implicar también la administración transdérmica por medios tales como los parches transdérmicos. La administración en esta forma es particularmente preferente.

Con administración intravenosa se quiere decir la administración de los compuestos descritos anteriormente en el presente documento en forma de un líquido directamente en una vena. Las formas de dosificación adecuadas para administración intravenosa incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones y suspensiones.

Por tanto, la invención proporciona un compuesto como se ha definido anteriormente en el presente documento y, en especial, compuestos de fórmula (VIS), para su uso como analgésico, en el que dicho compuesto se administrar por vía intravenosa.

Típicamente, las composiciones para administración intravenosa comprenden tampón acuoso isotónico estéril. En caso necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Los ingredientes se pueden suministrar por separado o mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, se pueden suministrar los ingredientes por separado como un polvo liofilizado o un concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, por ejemplo, una ampolla o un sobre en el que se indica la cantidad de principio activo, y como una ampolla de agua estéril o tampón para mezclar antes de la administración. De forma alternativa, se puede suministrar la composición en forma de premezcla.

Los compuestos de la invención (por ejemplo, compuestos de fórmulas (VI-S)) se pueden usar en medicina, por ejemplo, para proporcionar analgesia. Las dosis de compuestos necesarias dependerán, por ejemplo, del sujeto que se va a tratar, la intensidad del dolor que se va a tratar, el compuesto usado, el modo de administración, etc., pero las determinarán con facilidad los expertos en la técnica.

- 5 Sorprendentemente, también se ha descubierto que en pruebas ordinarias de náuseas y vómitos en hurones, ni R-DHE ni S-DHE inducían náuseas o vómitos en intervalos de dosis similares a las usadas en las pruebas descritas a continuación.

Los compuestos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de dolor nociceptivo y neuropático.

- 10 Se describirá ahora la invención con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y figuras, en los que los compuestos (R) descritos se incluyen por referencia:

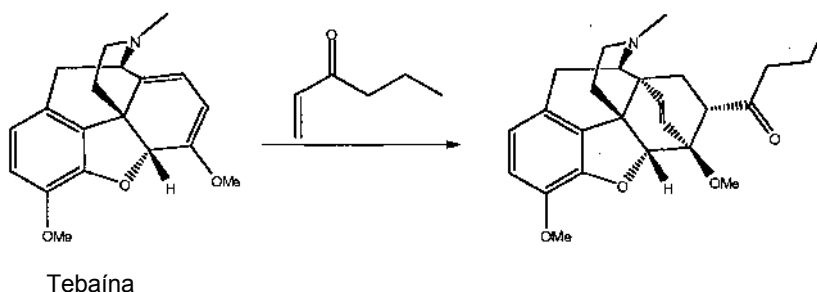
la figura 1 muestra los espectros de RMN de ^1H para (R) y (S)-19 propildihidrotevinol
 las figuras 2 y 3 muestran la estructura de rayos X de (R)-19 propildihidrotevinol
 las figuras 4 y 5 muestran la estructura de rayos X de (S)-19 propildihidrotevinol
 las figuras 6 y 7 muestran la estructura de rayos X de (R)-dihidroetorfina
 15 las figuras 8 y 9 muestran la estructura de rayos X de (S)-dihidroetorfina
 la figura 10 muestra la estereoquímica de todos los carbonos quirales presentes en (R) y (S)-dihidroetorfina
 las figuras 11 a 13 muestran curvas del curso temporal tras la administración intravenosa de DHE (R) o (S) o de una sustancia de comparación o referencia
 las figuras 14 a 17 muestran curvas de respuesta a la dosis tras la administración intravenosa de DHE (R) o (S) o de una sustancia de comparación o referencia
 20 las figuras 18 a 23 muestran los efectos de la administración intravenosa de DHE (R) o (S) o de una sustancia de referencia o comparación en el modelo de dolor neuropático de ligadura del nervio espinal

Ejemplos

Preparación de (S)-dihidroetorfina

- 25 Fase 1 - Reacción de Diels-Alder

Esquema de reacción



Procedimiento

- 30 Se trató la tebaína con hexen-3-ona en un disolvente como se especifica en la tabla siguiente y se calentó a reflujo. Después de una cantidad de tiempo apropiada (una noche), se enfrió la reacción y se evaporó la mezcla. Se disolvió el aceite resultante en acetato de isopropilo (IPAc) y se lavó con una solución de ácido clorhídrico 1 M. Se combinaron las capas ácidas y se lavaron con IPAc, después se basificaron con solución de bicarbonato de sodio y, por último, se extrajeron en diclorometano (DCM). Se evaporó la capa de DCM para dar un sólido amarillo.

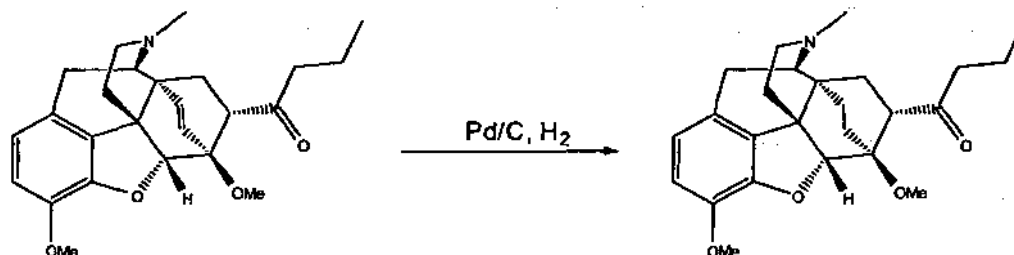
Tabla 1 - Resumen de los experimentos, fase 1

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
500 mg	Benceno (20 vols.) Hexen-3-ona (2,0 eq mol)	Reflujo	El reflujo durante la noche dio una terminación del 40 %
4,5 g	Metanol (10 vols.) Hexen-3-ona (2,0 eq mol)	Reflujo	Terminación del 68 % por RMN
4,5 g	Etanol (10 vols.) Hexen-3-ona (7,5 eq mol)	Reflujo	Terminación de > 95 % por RMN. Rendimiento del 70 % aislado

- 35 Al usar etanol como disolvente, el rendimiento de producto aislado final fue del 70 % como un sólido amarillo claro, después del procesamiento, y la calidad determinada por RMN de ^1H parecía muy buena.

Fase 2 - Hidrogenación

Esquema de reacción



Procedimiento

- 5 Se hidrogenó el intermedio de 19-propiltevinona (4,1 g) de la fase 1 en etanol (60 ml) con paladio sobre carbono (1 g; al 10 %) con una presión de hidrógeno de hasta 50 psi. Se mantuvo la temperatura del recipiente a ~50 °C y se mantuvo la presión a 50 psi hasta que dejó de observarse incorporación de hidrógeno. Se filtró el catalizador y se retiró el disolvente por destilación a vacío. El rendimiento aislado fue del 91 % en total, lo que dio 3,8 g de producto

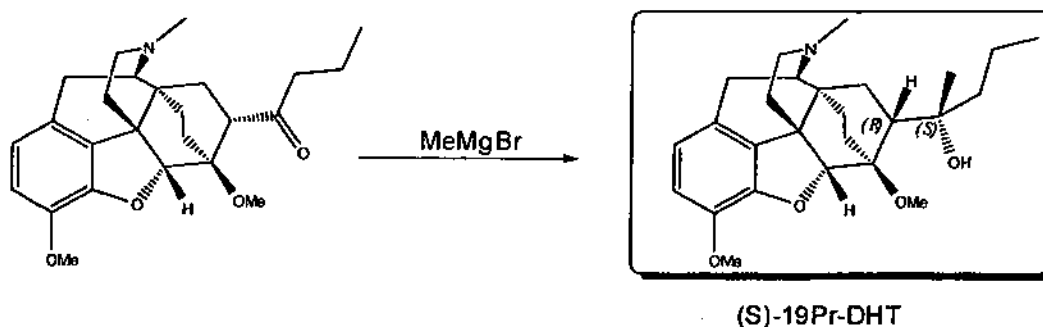
Tabla 2 - Resumen de los experimentos, fase 2

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
4,1 g	Etanol (60 ml) 1 g Pd/C (al 10 %)	50 °C	Rendimiento del 91 % aislado
	hidrógeno (50 psi)		

10

Fase 3 - Adición de Grignard

Esquema de reacción



Procedimiento

- 15 Se disolvió 19-propildihidrotevinona (producto de la fase 2) en éter dietílico (35 vols.). A esta solución se le añadió bromuro de metilmagnesio (92,6 eq mol) durante 5 minutos a 20-25 °C (exotermia pequeña). Después, se calentó la mezcla resultante hasta una temperatura interna de ~40 °C durante ~2 horas, antes de enfriarla y desactivarla con solución de cloruro de amonio. Se extrajo la mezcla con 2-metil THF y se evaporaron las capas orgánica a vacío para dar un aceite viscoso.

20

Tabla 3 - Resumen de los experimentos, fase 3

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
0,13 g	Éter 2-dietílico (25 vols.) MeMgBr 3 M (1,5 eq)	40 °C	Buena calidad del material producido
0,79 g	Éter 2-dietílico (25 vols.) MeMgBr 3 M (1,5 eq)	35 °C	Agitación durante la noche. Pureza del 93 % después del procesamiento. Se trituró el producto en bruto en metanol para dar 0,32 g de material puro y 0,5 g de residuos impuros.
22 g	Éter 2-dietílico (35 vols.) MeMgBr 3 M (2,6 eq)	35 °C	2,6 g en bruto (~90 % de pureza) aislados. Se trituraron en metanol para dar 1,6 g de material puro.

El único producto de la adición de Grignard es el enantiómero (S). No se detectó enantiómero (R).

Fase 4 - Cristalización de (R) y (S)-19-propildihidrotevinol

Para preparar un cristal individual de alta calidad para cristalografía por rayos X, se llevaron a cabo varios experimentos en muchos disolventes para determinar el mejor sistema de disolventes para sembrar un cristal individual de 19-propildihidrotevinol. Los experimentos se resumen en la tabla 4 que figura a continuación. Se preparó el enantiómero R con un procedimiento alternativo.

En general, el procedimiento de cristalización usado fue como sigue: se disolvió una pequeña cantidad de 19-propildihidrotevinol sólido (obtenido en la fase 3) en una cantidad de disolvente justo por encima del mínimo. Se dejó reposar la solución durante un máximo de 3-4 días y se retiró el disolvente por filtración o decantación para aislar cristales individuales.

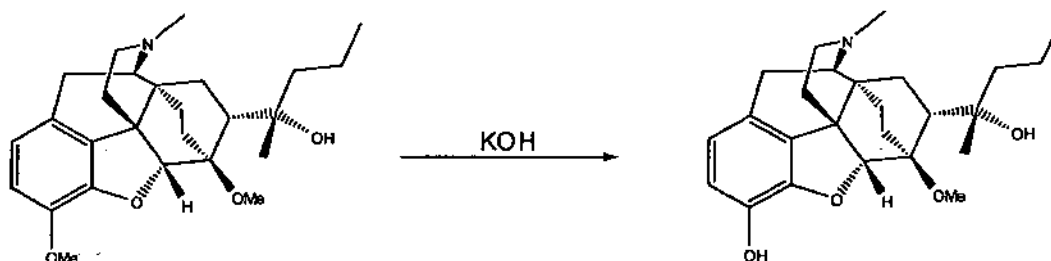
Tabla 4 - Resumen de recrystalizaciones

Disolvente	Codisolvente	Diastereoisómero	Temperatura	Cristales	Comentarios
MTBE	Ninguno	(S)	TA	Sí	Alta calidad - enviado para rayos X
AcCN	Ninguno	(S)	TA	Sí	Alta calidad
DCM	Ninguno	(R)	Disolución en caliente	Sí	Alta calidad - enviado para rayos X
Acetona	Ninguno	(R)	Disolución en caliente	Sí	Alta calidad - enviado para rayos X
Etanol	Ninguno	(R)	Disolución en caliente	Sí	Alta calidad - enviado para rayos X

Los espectros de RMN de ^1H de cada uno de los diastereómeros se muestran en la figura 1.

Fase 5 - Hidrólisis de (S)-19-propildihidrotevinol

Esquema de reacción



Procedimiento

Se disolvió (S)-19-propildihidrotevinol (de la fase 3) en dietilenglicol (17 vols.) y se trató con hidróxido de potasio (~20 eq) y se calentó hasta ~195 °C 12-18 horas. Después de este tiempo, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se desactivó con agua (40 vols.). Se acidificó la solución resultante hasta pH 9-10 con cloruro de amonio sólido y se extrajo la mezcla con DCM (3 x 50 vols.). Se evaporaron los extractos orgánicos combinados a vacío hasta un aceite en bruto (pureza aprox. del 40 %). Se aumentó la pureza con repetidas trituraciones en metanol hasta que se formó un sólido amarillo y se aisló con una pureza adecuada (>95 %).

Se recrystalizó el producto en varios disolventes y se obtuvieron los cristales en acetonitrilo. Se usaron para estudios cristalográficos con rayos X.

Se obtuvo el enantiómero R con una reacción análoga.

Estudios cristalográficos con rayos X

Todos los experimentos de cristalografía con rayos X se llevaron a cabo en un difractor de cristal individual Oxford Xcalibur o un difractor Nonius Kappa. En ambas máquinas se emplearon fuentes de rayos X de molibdeno K-alfa y detectores CCD.

(R) y (S) 19-propildihidrotevinol

Se enviaron varios lotes de 19-propildihidrotevinol tanto (R) como (S) para cristalografía de rayos X.

Las estructuras de rayos X se muestran en las figuras 2-5.

Las figuras 2 y 3 muestran la estructura de rayos X de (R)-19-propildihidrotevinol. Con los rayos X se puede observar claramente que tiene configuración (R) en el carbono 19. Esto se puede asignar con respecto al éter metílico quiral, que mantiene la configuración (R) del material de partida de tebaína.

- 5 Adicionalmente, en la figura 3, donde se muestran los átomos de hidrógeno, se puede observar que el hidrógeno de la posición 7 está en la misma cara que el hidrógeno de la posición 5 (al lado del anillo de furano), lo que da una configuración (R).

De esta manera, ahora ya se han asignado todos los carbonos quirales y se representan en la figura 10.

Tabla 6 - Otra información sobre el (R)-19-propildihidrotevinol

Propiedad	Valor
Entorno de simetría de la celda	Monoclínica
Nombre de la simetría espacial del grupo	H-M P2(1)
Pos. equiv. de simetría del bucle como xyz	$x, y, z' \rightarrow -x, y+1/2, -z'$
Longitud de la celda a	11,0464 (6)
Longitud de la celda b	12,4554 (7)
Longitud de la celda c	16,2271 (7)
Ángulo de la celda alfa	90,00
Ángulo de la celda beta	98,481 (5)
Ángulo de la celda gamma	90,00
Volumen de la celda	2208,2 (2)

10

Las figuras 4 y 5 muestran la estructura de rayos X de (S)-19-propildihidrotevinol.

En la figura 4 se puede observar claramente que tiene la estereoquímica opuesta de la configuración (S) en el carbono 19 a la del cristal mostrado en la figura 3. Esto se puede asignar con respecto al éter metílico quiral, que mantiene la configuración (R) del material de partida de tebaína.

- 15 De nuevo, el hidrógeno del carbono 7 (se muestra en la figura 5) muestra que la configuración en este carbono también es (R), como en el primer diastereoisómero.

Por lo tanto, ahora se puede concluir con seguridad que la única diferencia entre los 2 compuestos por cristalografía de rayos X es la estereconfiguración del carbono 19.

Tabla 7 - Otra información sobre el (S) 19-propildihidrotevinol

Propiedad	Valor
Entorno de simetría de la celda	Monoclínica
Nombre de la simetría espacial del grupo	H-M P2(1)
Pos. equiv. de simetría del bucle como xyz	$x, y, z' \rightarrow -x, y+1/2, -z'$
Longitud de la celda a	13,8650 (3)
Longitud de la celda b	10,8560 (2)
Longitud de la celda c	15,4030 (4)
Ángulo de la celda alfa	90,00
Ángulo de la celda beta	99,7500 (8)
Ángulo de la celda gamma	90,00
Volumen de la celda	2284,95 (9)

20

(R) y (S)-dihidroetorfina

Las estructuras de rayos X se muestran en las figuras 6-9.

Las figuras 6 y 7 muestran la estructura de rayos X de (R)-dihidroetorfina. En estas figuras se puede ver claramente

que tiene la configuración (R) en el carbono 19. Esto se puede asignar con respecto al éter metílico quiral, que mantiene la configuración (R) del material de partida, la tebaína.

Tabla 8 - Otra información sobre la (R)-dihidroetorfina

Propiedad	Valor
Nombre de la simetría espacial del grupo	2 cn" cn" P
Pos. equiv. de simetría del bucle como xyz	'x, y, z', '-x, 1/2+y, -z'
Longitud de la celda a	16,3405 (7)
Longitud de la celda b	35,605 (2)
Longitud de la celda c	7,5209 (3)
Ángulo de la celda alfa	90,00
Ángulo de la celda beta	90,00
Ángulo de la celda gamma	90,00
Volumen de la celda	4375,69

- 5 Las figuras 8 y 9 muestran la estructura de rayos X de (S)-dihidroetorfina. En estas figuras se puede ver claramente que tiene la configuración (S) en el carbono 19. Esto se puede asignar con respecto al éter metílico quiral, que mantiene la configuración (R) del material de partida, la tebaína.

Adicionalmente, el hidrógeno del carbono 7 (mostrado en la figura 9) muestra que la configuración en este carbono también es (R), como en el primer diastereoisómero.

- 10 Por lo tanto, se puede concluir que la única diferencia entre los 2 compuestos por cristalografía de rayos X es la estereconfiguración del carbono 19.

Tabla 9 - Otra información sobre la (S)-dihidroetorfina

Propiedad	Valor
Nombre de la simetría espacial del grupo	H-M P2(1)
Pos. equiv. de simetría del bucle como xyz	'x, y, z', Eje de rotación (orden 2): '-x, -y, z' Eje de torsión (orden 2): '1/2-x, 1/2+y, -z' Eje de torsión (orden 2): '1/2++x, 1/2-y, -z'
Longitud de la celda a	7,2310 (3)
Longitud de la celda b	14,0795 (6)
Longitud de la celda c	10,6984 (5)
Ángulo de la celda alfa	90,00
Ángulo de la celda beta	96,226 (4)
Ángulo de la celda gamma	90,00
Volumen de la celda	1082,77

OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

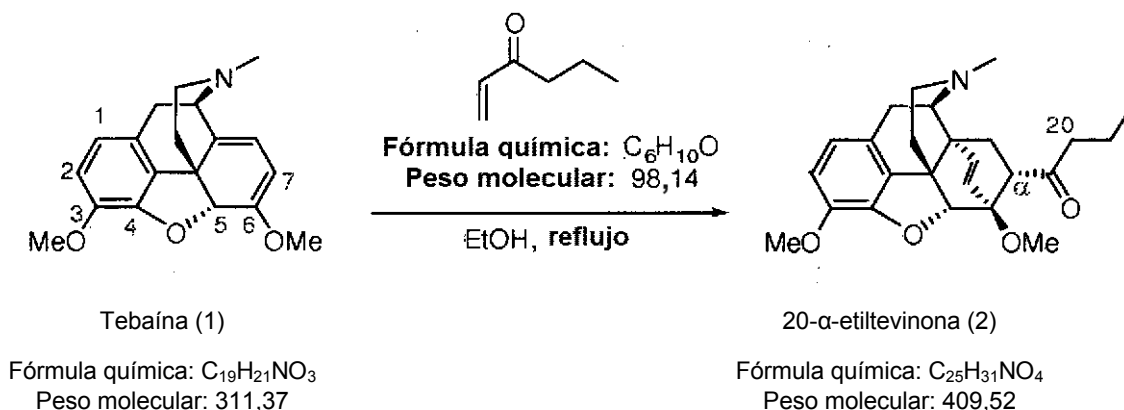
- 15 Se usaron los siguientes procedimientos y equipos:

El procedimiento 38XB y UFC-LC-MUN-1 son procedimientos de HPLC en gradiente en fase inversa que emplean una columna C18 Xbridge y una fase móvil que consiste en acetonitrilo y acetato de amonio 0,01 M a pH 9,2.

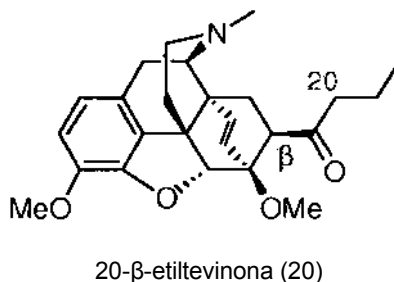
- 20 La RMN se llevó a cabo con un espectrómetro Bruker Avance de 400 MHz y la EM se llevó a cabo con un espectrómetro de ZMD Micromass

La CL se llevó a cabo con un sistema de HPLC Agilent 1100

Fase 1: Reacción de Diels-Alder



El procedimiento inicial empleado fue el descrito anteriormente. Se identificó el contaminante principal como el isómero 7 β mostrado a continuación.



Posteriormente, se descubrió que tanto la pureza como la recuperación de 20- α -etilvinona se podían mejorar al reducir la carga de 1-hexen-3-ona de 2,8 equivalentes a 1,8 equivalentes, Tabla 10. Se logró una mejora adicional al usar 1,5 equivalentes de 1-hexen-3-ona (añadidos en 2 partes de 1,4 eq y 0,1 eq) y, tras la finalización de la reacción, al retirar 0,5 volúmenes de disolvente por destilación. Después de enfriar la solución resultante precipitó el producto como un sólido (envejecido durante 1 h) y se filtró.

Procedimiento: En un matraz de 1 l (de 3 bocas) equipado con un agitador superior y un condensador a reflujo se cargó lo siguiente: tebaína (0,32 M, 100 g, 1 eq), EtOH (250 ml) y 1-hexen-3-ona (al 90 %, 0,45 M, 58 ml, 1,4 eq). Se calentó la mezcla a reflujo durante 13 h y se analizó por RMN de 1H y se descubrió que contenía material de partida (~4,5 % molar). Se añadieron 0,1 eq adicionales de 1-hexen-3-ona y se calentó la mezcla durante otras 2 h, antes de agitar durante la noche a temperatura ambiente. El análisis mostró material de partida (~2,8 % molar). Se transfirió el material a un matraz de fondo redondo (500 ml) (matraz lavado con 200 ml EtOH). Se retiró el EtOH (~65 ml) a vacío a 50 °C y se agitó el sólido precipitado resultante a 5 °C durante 1 h antes de filtrarlo. Se lavó el sólido con EtOH helado (4x20 ml) y se extendió para secarlo sobre un filtro durante ~1,5 h. Sólido blanco (105,4 g, al 80 %).

Tabla 10

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
10 g	1 eq de tebaína 2,8 eq de 1-hexen-3-ona 2,5 vols. de EtOH	Reflujo (temp. del baño a 94 °C)	Rendimiento del 69 %, 9,03 g, contiene el 6 % de isómero 7 β - pureza del 92 %
2 g	1 eq de tebaína 1,8 eq de 1-hexen-3-ona 2,5 vols. de EtOH	Reflujo (temp. del baño a 94 °C)	Rendimiento del 55 %, 1,44 g. El material se precipitó al enfriar – Pureza >99,5 %
100 g	1 eq de tebaína 1,5 eq de 1-hexen-3-ona 2,5 vols. de EtOH	Reflujo (temp. del baño a 101 °C)	Rendimiento del 80 %, 105,4 g. Material precipitado. Pureza >99,5 %

Procedimientos analíticos y comprobaciones durante el procedimiento (IPC)

Durante el trabajo en el laboratorio se usó RMN de ^1H (400 MHz) para las IPC más el procedimiento de HPLC 38XB. La reacción se consideró finalizada cuando quedaba <5 % molar de material de partida según la RMN de ^1H en base a las señales a δ 5,05 ppm y 5,3 ppm (CDCl_3). Para confirmar la pureza y para el procedimiento de CL-EM se usó UFC-LC-MUN-1 en el laboratorio de analítica.

CCF (MeOH al 5 %/DCM al 95 %) Tinción con yodoplatinato: R_f = 0,25 Tebaína, R_f = 0,66 (7 α)-20-etiltevinona.

Resumen analítico

Aspecto TR/TRR	HPLC (%a/a)		
	7 α 20-etiltevinona 10,69 / 1,0	Tebaína 5,82 / 0,54	7 β 20-etiltevinona 11,67 / 1,09
Sólido blanco	> 99,5	ninguna	ninguna

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz); δ = 0,80 (3H, t), 1,4 (1 H, m), 1,6 (3H, sext.), 1,9 (1 H, d), 2,0 (1 H, a), 2,4-2,6 (8H, m), 2,9 (2H, a), 3,35 (2H, d), 3,6 (3H, s), 3,85 (3H,s), 4,6 (1 H,s), 5,6 (1 H, d), 6,0 (1 H, d), 6,55 (1 H, d), 6,7 (1 H, d) RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz); δ = 13,71, 16,89, 22,49, 30,25, 43,26, 43,51, 45,57, 45,72, 47,40, 49,94, 53,78, 56,68, 60,06, 81,52, 95,84, 113,61, 119,36, 125,89, 134,07, 135,53, 141,87, 148,07

EM; $[\text{M}+\text{H}]^+=410,3$ CL; pureza >99,5 %

CCF; 5:95; MeOH:DCM; rf de una sola mancha = 0,66

Ventajas del procedimiento optimizado

Aumento del rendimiento al 80 %

Se ha reducido la cantidad de 1-hexen-3-ona a 1,5 equivalentes sin que disminuyan la conversión o el rendimiento.

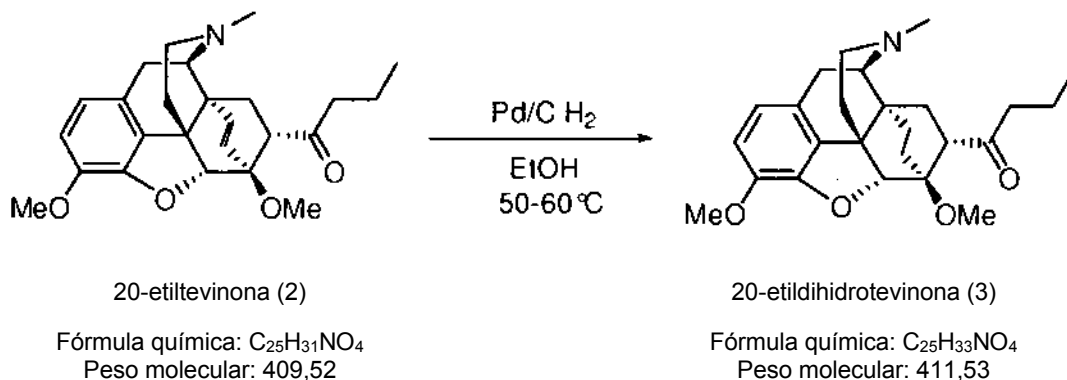
La disminución de los equivalentes de 1-hexen-3-ona permite un aislamiento mejorado (cristalización directa en el disolvente de reacción), lo que da un material de pureza muy alta.

La eficacia en volumen es muy alta (máximo ~4 volúmenes en total).

Mejora de la pureza hasta el >99 % (por HPLC).

La IPC muestra la finalización a >97 % de conversión por RMN de ^1H (<3 % de tebaína).

Fase 2 Hidrogenación



Los resultados del trabajo de desarrollo de la fase de hidrogenación se esquematizan en la tabla 11 siguiente. La reacción se ha "sometido a tensión", tanto en términos de carga de catalizador como de temperatura de reacción. Además, al reducir el volumen de reacción de 17 vols. a 12 vols., se han mejorado la calidad del producto y el aislamiento del producto.

Resulta interesante el hecho de que tanto el material de partida como el producto son térmicamente estables hasta ~80 °C durante 1-2 horas, lo que permite una temperatura de reacción más elevada y aumenta la solubilidad tanto del material de partida como del producto durante la reacción. Se descubrió que, en este caso, la solubilidad era esencial para una buena reactividad y se emplearon temperaturas más elevadas durante el aumento de la escala para lograr completar la reacción.

En la reacción final de aumento de la escala, la temperatura aumentó por encima del intervalo "normal" durante el calentamiento inicial del recipiente de reacción y se observó una reacción rápida (incorporación de hidrógeno). Al reducir la temperatura hasta 55 °C, la reacción disminuyó significativamente y no se completó la reacción hasta que se añadió más catalizador y se aumentó la temperatura hasta ~65 °C.

Se simplificó el aislamiento del producto al calentar la mezcla de reacción a 77 °C, dejar que se alcanzara la temperatura de subreflujo y retirar después por filtración el catalizador de la mezcla de reacción. Inicialmente, se redujo el volumen de la solución resultante por destilación, si bien se descubrió que la solución se podía enfriar en

un baño de hielo y se aislaba material de gran pureza por filtración del sólido cristalizado con buen rendimiento (72 %).

- Procedimiento: Se cargó 20-etiltevinona (0,244 M, 100 g) en un recipiente de hidrogenación Parr de 2 l. Se preparó una suspensión espesa de Pd/C al 10 % (al 50 % húmedo, 10 g) en EtOH (200 ml) y se cargó en el recipiente de hidrogenación. Se cargó EtOH (1 l) en el recipiente, se cerró el recipiente y se hizo inerte con argón (x4). Se llenó de nuevo con hidrógeno a 50 psi (x2) y, por último, se dejó a 50 psi. Se fijó la temperatura a 35 °C. La temperatura interna llegó a un máximo de 82 °C y se dejó enfriar de nuevo hasta temperatura ambiente durante la noche (exotermia en el recipiente). Se llenó de nuevo el recipiente con H₂, se tomó una muestra y se analizó por CL y se observó que no se había completado. Se calentó el recipiente hasta una temperatura interna de 55-65 °C y se realizó un seguimiento del progreso de la reacción por CL (la presión de hidrógeno se mantuvo a 50 psi durante el procedimiento por recargas periódicas). Después de 24 h se realizó una carga adicional de catalizador (5 g) y continuó la reacción. Después de 16 h adicionales, se completó la reacción, según la CL y la RMN de ¹H. Se elevó la temperatura interna hasta 68 °C y se transfirió la mezcla a vacío a un matraz de fondo redondo de 3 l. Se purgó el recipiente Parr con EtOH caliente (200 ml) y se transfirió el lavado al matraz de fondo redondo. Se calentó la mezcla a 77 °C antes de filtrarla (en papel GF/F). Se lavó el lecho de catalizador con EtOH caliente (1x 300 ml) y se dejó enfriar el filtrado hasta temperatura ambiente. Se enfrió el filtrado en un baño de agua helada durante 50 min antes de filtrarlo. Se lavó el sólido recogido con EtOH helado (1x 100 ml), heptano (1x 300 ml) y se extendió para secarlo durante 1,5 h. Sólido blanco (72 g, 72 %).

Tabla 11

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
4,5 g	1 eq de 20-etiltevinona, Pd/C (al 50 % húmedo, 2,71 g), 14 vols. de EtOH, 25 psi de H ₂	Temp. del recipiente 55 °C	Después de 16 h, se retiró 1 g de muestra (0,7 % de MP restante). Se continuó la reacción hasta su finalización. Rendimiento del 90 %, 3,4 g
0,680 g	1 eq de 20-etiltevinona, Pd/C (al 50 % húmedo, 0,034 g), 70 vols. de EtOH, 50 psi de H ₂	Temp. del recipiente 55 °C	Rendimiento del 85 %, 0,580 g
2,32 g	1 eq de 20-etiltevinona (547-089-1), Pd/C (al 50 % húmedo, 0,232 g), 17 vols. de EtOH, 50 psi de H ₂	Temp. del recipiente 55 °C	Después de 16 h se completó la reacción. Se filtró la reacción, se concentró a ~1/3 de volumen y se recogió el precipitado. Rendimiento del 64 %, 1,494 g
0,6 g	1 eq de 20-etiltevinona (547-090-1), Pd/C (al 50 % húmedo, 0,60 g), 17 vols. de EtOH, 50 psi de H ₂	Temp. del recipiente 55 °C	La reacción se completó después de 16 h. No se completó el procesamiento.
100 g	1 eq de 20-etiltevinona, Pd/C (al 50 % húmedo, 15 g), 12 vols. de EtOH, 50 psi de H ₂	Temp. máxima del recipiente 82 °C Temp. óptima ~60 °C	El producto cristalizó en la mezcla de reacción después de retirar el catalizador. Rendimiento del 72 %, pureza >99 %

20

Procedimientos analíticos y comprobaciones durante el procedimiento

Durante el trabajo en el laboratorio se usó RMN de ¹H (400 MHz) para las IPC más el procedimiento de HPLC 38XB. El seguimiento del progreso de la reacción se realizó por un análisis de CL: la reacción llevada a cabo en la escala de 100 g el 96 % de 20-etildihidrotevinona y no mostró 20-etiltevinona.

- 25 Para confirmar la pureza y para el procedimiento de trabajo de CL-EM se usó en el laboratorio de analítica el producto de la reacción a escala de 100 g.

Resultados analíticos

Aspecto	HPLC (a/a%)	Comentarios
Sólido blanco	> 99	Sin 20-etiltevinona restante. No se detectaron otras impurezas.

Análisis

- 30 RMN de ¹H (CDCl₃; 400 MHz); δ = 0,75 (1H, t, t), 0,9 (1H, t), 1,35 (1H, t, d), 1,5-1,75 (7H, m), 2,1 (1 H, t, d), 2,3 (5H, m), 2,5 (2H, c), 2,6-2,7 (3H, m), 3,0 (1 H, c, t), 3,1 (1 H, d), 3,5 (3H, s), 3,9 (3H, s), 4,5 (1 H, d), 6,6 (1 H, d), 6,7 (1 H, d).
- RMN de ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz); δ = 13,73, 16,99, 17,31, 21,98, 28,67, 30,70, 35,17, 35,66, 43,51, 45,24, 45,78,

48,28, 48,91, 52,26, 56,76, 61,35, 94,96, 114,01, 119,16, 128,71, 132,47, 141,76, 146,80

CL; >99 %

Disolvente residual (por RMN de ^1H); no se observó etanol residual

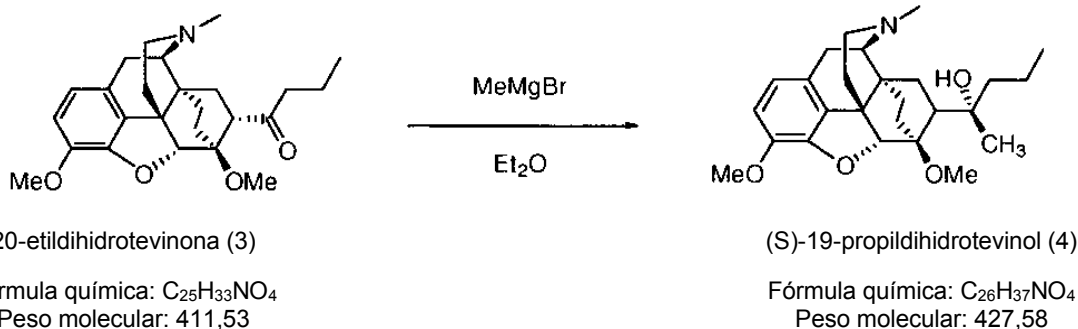
Ventajas del procedimiento optimizado

- 5 La reducción del volumen de reacción de 17 vols. a 12 vols. permite la cristalización directo del producto.

Producto aislado con un rendimiento del 72 % con una pureza >99 %.

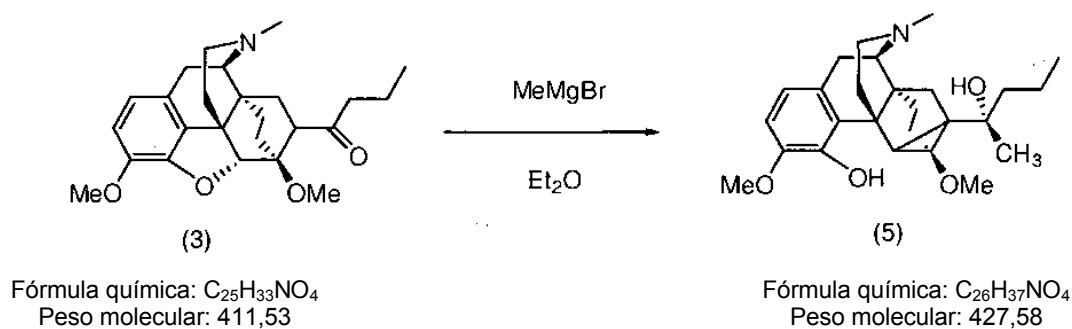
Una temperatura de aproximadamente 65 °C parece óptima para la solubilidad y la reactividad. El secado del sólido sobre el lecho de filtro y el lavado con heptano retira los restos de etanol hasta una concentración aceptable apta para la siguiente fase.

10 Fases 3 y 4: Grignard y cristalización

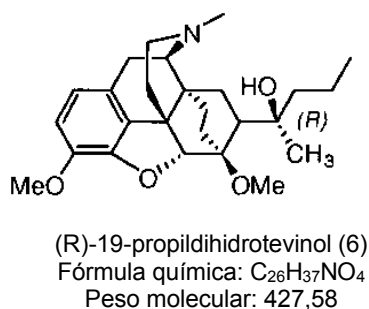


Los resultados del trabajo se resumen en la tabla 12, a continuación. Se estudiaron diferentes disolventes etéreos, de los que el éster dietílico dio el material de mejor calidad, si bien se observó que la diferencia entre el éter dietílico y MTBE era relativamente pequeña.

- 15 En general, el material en bruto obtenido de la reacción de Grignard contenía dos impurezas principales (~10 % de cada una, CL-EM). Ambas impurezas tienen la misma masa ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 428,4$) que el producto. Una de las dos impurezas se ha asignado provisionalmente como el isómero constitutivo, que resulta de la reacción de cierre del anillo y apertura del anillo del exceso de reactivo de Grignard sobre la 20-etildihidrotevinona.



- 20 Se cree que la segunda impureza, que tiene un tiempo de retención similar (CL-EM) al del producto, es el diastereoisómero (R)-19-propildihidrotevinol.



Ambas impurezas se retiran de forma eficaz por recristalización en metanol.

Se estudió el papel de la temperatura de reacción con éter dietílico y se descubrió que los perfiles de la reacción, tanto en términos de progreso de la reacción como de impurezas (análisis por CL), eran comparables a temperatura ambiente y a temperatura de reflujo.

- 5 Por tanto, se cree que las diferencias observadas en la pureza observada en las reacciones surgen de los diferentes procedimientos de purificación (recristalización con un baño de aceite y un condensador a reflujo con agitador magnético, o trituración por rotación en un evaporador rotatorio con metanol).

También se utilizó yoduro de metilmagnesio y dio resultados comparables a los del bromuro.

- 10 Procedimiento: Se disolvió 20-etildihidrotevinona (0,073 M, 30 g) (solución turbia) en éter dietílico anhidro (1050 ml; 35 vols). Se añadió gota a gota bromuro de metilmagnesio (0,189 M, 63 ml) durante 1 h manteniendo la temperatura interna por debajo de 28 °C. Se calentó la suspensión blanca resultante a reflujo durante 5 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante la noche. Se retiró una alícuota (~0,3 ml) y se desactivó con NH₄Cl sat. (~1,0 ml) y se analizó por CL (la capa superior de la alícuota se diluyó con MeCN (~1 ml)). Se continuó la reacción hasta que la concentración de material de partida fue inferior al 5 %. Se desactivó la
- 15 reacción por la adición de NH₄Cl sat. (138 ml) a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura interna por debajo de 30 °C. Se separaron las fases de la mezcla, se extrajo la fase acuosa con éter dietílico (1x 200 ml) y se secó la fase orgánica combinada (MgSO₄). Se concentró la solución a vacío para proporcionar un aceite viscoso (33,4 g). Se añadió MeOH (100 ml) y se calentó la mezcla hasta una temperatura de baño de 60 °C, antes de enfriarla hasta temperatura ambiente. Se filtró el sólido, se lavó con MeOH helado (3x 25 ml), de lavó con heptano
- 20 (1x 25 ml) y se extendió para secarlo. Sólido blanco (21 g, 68 %)

Tabla 12

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
10g	1 eq de 20-EtDHT, 1,2 eq de MeMgBr 6,1 vols. de 2-MeTHF	60 °C	Se purificó el material en bruto por cromatografía en columna para proporcionar dos fracciones principales: 180 mg de producto impuro más un material no identificado (140 mg)
0,5 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgBr 35 vols. de Et ₂ O	reflujo	0,44 g de goma oleosa que parece apta según la RMN de ¹ H. La trituración en MeOH proporcionó dos muestras: 160 mg (al 96 %) y 150 mg (al 90 %)
0,6 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgI 35 vols. de Et ₂ O	reflujo	0,45 g de goma oleosa. Pureza = 77 % (por CL). La trituración proporcionó 110 mg con una pureza del 94,1 %.
30,0 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgBr 35 vols. de Et ₂ O	reflujo	<2 % del MP y 81 % de producto. Después del procesamiento y la recristalización en MeOH: rendimiento del 68 %, 21 g, pureza >99 %.
1 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgBr 35 vols. de TBME	adición rápida; después, calentamiento a 45 °C / 4h	Después del procesamiento y la trituración con MeOH: rendimiento del 54 %, 0,56 g, pureza >96 %
1 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgBr 35 vols. de CPME	adición rápida; después, calentamiento a 45 °C / 4h	Después del procesamiento y la trituración con MeOH: rendimiento del 52 %, 0,54 g, pureza >95,7 %
10 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgBr 35 vols. de TBME	adición rápida; después	Al finalizar la adición de MeMgBr: 1,2 % de 20-EtDHT, 85 % de producto (HPLC). Después del calentamiento, el procesamiento y la trituración con MeOH: rendimiento del 75 %, 7,79 g, pureza >96,4 %

(continuación)

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
		calentamiento a 35 °C/4h	
1 g	1 eq de 20-EtDHT, 2,6 eq de MeMgBr 35 vols. de Et ₂ O	adición rápida, sin calentamiento, agitación 4 h	Al finalizar la adición de MeMgBr: 0,3 % de 20-EtDHT, 84 % de producto (HPLC). Después del procesamiento y la trituración con MeOH: rendimiento del 58 %, 0,60 g, pureza >94,8 %

Procedimientos analíticos y comprobaciones durante el procedimiento

- 5 Durante el trabajo en el laboratorio se usó RMN de ¹H (400 MHz) más el procedimiento de HPLC 38XB. El seguimiento de la reacción se realizó por análisis de CL de una alícuota de la reacción desactivada (NH₄Cl sat.): <2,0 % de 20-etildihidrotevinol y 71 % de (S)-19-propildihidrotevinol.

Para confirmar la pureza y para el trabajo de CL-EM se usó en el laboratorio de analítica el procedimiento UFC-LC-MUN-1.

Resultados analíticos

Aspecto	HPLC (a/a%)	Comentarios
Sólido blanco	94,1	En MeMgl
Sólido blanco	> 99	El material en bruto tenía una pureza global del 81 % y contenía <2 % de material de partida

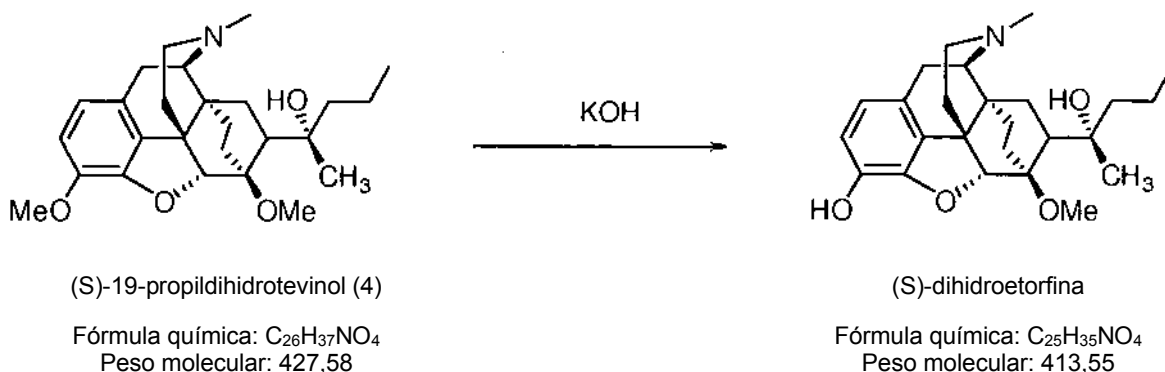
- 10 RMN de ¹H (CDCl₃; 400 MHz); δ = 0,75 (1 H, m), 0,85 (3H, t), 0,95-1,1 (6H, m), 1,3 (1 H, m), 1,5-1,7 (7H, m), 1,8 (1H, t), 2,0 (1H, t, d), 2,1-2,4 (6H, m), 2,6 (1H, d), 2,7 (1H, t, d), 3,0 (1H, d), 3,5 (3H, s), 3,8 (3H, s), 4,3 (1 H, s), 4,7 (1 H, s), 6,5 (1H, d), 6,7 (1 H, d)
- 15 RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz); δ = 15,12, 16,96, 18,04, 21,91, 25,55, 29,88, 31,99, 35,53, 36,05, 38,97, 43,53, 45,17, 46,19, 49,09, 50,77, 52,72, 56,93, 61,32, 80,34, 97,05, 114,21, 119,06, 128,84, 132,48, 141,63, 146,97
CL; >99 %

Ventajas del procedimiento optimizado

La reacción funciona en una variedad de disolventes etéreos, aunque parece que el éter dietílico da el producto en bruto más limpio.

- 20 Después de la recristalización en metanol se obtiene un material de pureza excelente.

Fase 5: hidrólisis



La reacción se desarrolló sin cambios significativos (tabla 13). La recristalización se llevó a cabo en una mezcla de etanol y agua y después en etanol.

- 25 Procedimiento: Se añadió (S)-DHE (10 g) a EtOH (60 ml) y se calentó a reflujo hasta que se disolvió. El agua (32 ml) formó una solución turbia que se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante ~2 h. Se recogió el sólido blanco por filtración. (4,26 g, recuperación del 42 % en peso). Pureza del 98 %. Rendimiento total en % en peso = 45 %

Tabla 13

Escala	Condiciones	Temp. °C	Comentarios
15g	(S)-19 propildihidrotevinol (1 eq), KOH (20,85 eq), dietilenglicol (16,6 vols.)	185	Se calentó la reacción a 185 °C durante ~18 h con un condensador de aire. Rendimiento en bruto del 107 %, pureza >95 %

Procedimientos analíticos y comprobaciones durante el procedimiento

5 Durante el trabajo en el laboratorio se usó RMN de ^1H (400 MHz) más el procedimiento de HPLC 38XB. Se realizó el seguimiento de la reacción por un análisis de CL y se desactivó cuando no quedaba (S)-19-propildihidrotevinol. La reacción se completó al 92 %.

Para confirmar la pureza y para el trabajo de CL-EM se usó en el laboratorio de analítica el procedimiento UFC-LC-MUN-1.

Resultados analíticos

Aspecto	HPLC (a/a%)
Sólido color canela	95,0

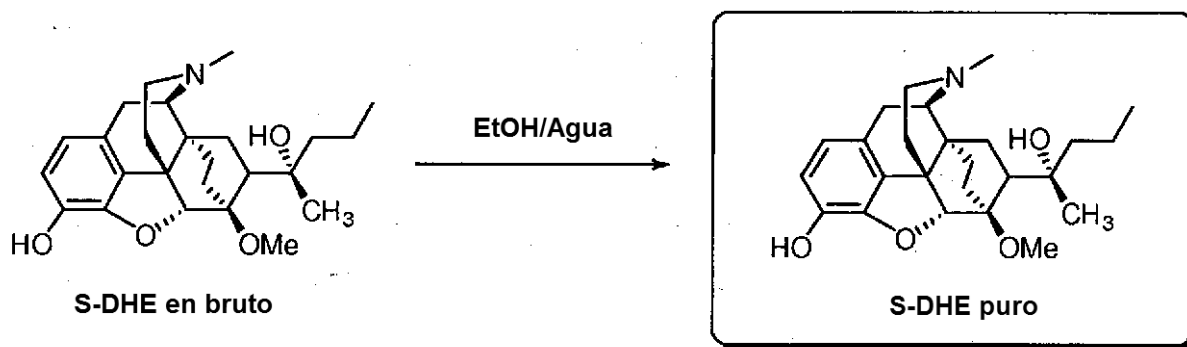
10 RMN de ^1H NMR (CDCl_3 ; 400 MHz); δ = 0,7 (1H, m), 0,8 (3H, t), 1,0-1,1 (5H, m), 1,3 (1H, m), 1,5-1,8 (6H, m), 1,85 (1H, t), 1,95 (1H, t, d), 2,1-2,3 (5H, m), 2,6 (1H, d), 2,7 (1H, t), 3,0 (1H, d), 3,5 (3H, s), 4,3 (1H, s), 4,8 (1H, s), 6,0 (1H, a), 6,4 (1H, d), 6,7 (1H, d)
 15 RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz); δ = 15,10, 16,95, 18,00, 21,99, 25,37, 29,82, 31,96, 35,43, 36,15, 38,93, 43,51, 45,22, 46,50, 49,04, 52,72, 61,33, 80,42, 97,38, 116,61, 119,46, 127,92, 132,07, 137,56, 145,67
 CL; 98,8 %
 CL quiral; 99,44 % (S)-DHE, 0,554 (R)-DHE

Ventajas del procedimiento optimizado

Se obtuvo una mejora significativa de la pureza del material en bruto obtenido en la reacción hasta el 95 %.

20 Retirada de la trituración en metanol - material recristalizado en etanol/agua y etanol.

Fase 6: recristalización



25 Un aumento del contenido en agua hasta el ~35 % (volumen total 9,2 vols.) dio lugar a la formación de un sólido blanco. Recristalizaciones adicionales en etanol y mezclas de etanol y agua mejoraron la pureza del material (tabla 14).

Procedimiento:

(1) Se añadió (S)-DHE (3,0 g) a EtOH (10 ml) y se calentó la suspensión a reflujo, lo que produjo una solución naranja. Se dejó enfriar la solución hasta temperatura ambiente durante 16 h. Se recogió el sólido blanco resultante por filtración (2,1 g, 70 % en peso). Pureza >99 %.

30 (2) Se añadió (S)-DHE (1,8 g) a EtOH (7 ml) y se calentó la mezcla a reflujo hasta la disolución. Se añadió agua (2 ml) y se dejó enfriar la solución turbia hasta temperatura ambiente durante 2 h. Se recogió el sólido blanco resultante por filtración (1,29 g, 72 % en peso).

Tabla 14

Escala	Condiciones	Temp. (°C)	Comentarios
10 g	9,2 vols. de EtOH/agua ~65/35	reflujo	Se calentó el material en EtOH, después se añadió agua. Sólido blanco, recuperación del 42 % en peso, pureza del 98 %
3,0 g	3,3 vols. (EtOH)	reflujo	Sólido blanco, recuperación del 70 % en peso, pureza >99 %
1,8 g	4,5 vols. (20 % agua/80 % de EtOH)	reflujo	Se añadió agua a reflujo, después se dejó enfriar. Recuperación del 72 % en peso, >99 %

Procedimientos analíticos y comprobaciones durante el procedimiento

Durante el trabajo en el laboratorio se usó RMN de ^1H (400 MHz) más el procedimiento de HPLC 38XB.

- 5 Para confirmar la pureza y para el trabajo de CL-EM se usó en el laboratorio de analítica el procedimiento UFC-LC-MUN-1. Para confirmar la pureza quiral se usó en el laboratorio de analítica procedimiento UFC-LC-MUN-2.

Resultados analíticos

Aspecto	HPLC (a/a%)	% de pureza quiral (HPLC)
Sólido blanco	>99 %	99,98

La recristalización en etanol/agua o etanol produce material de buena pureza general y <0,0 2% de (R)-DHE.

10 USO DE DIHIDROETORFINA (R) Y (S) EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

Efectos de (R) y (S)-dihidroetorfina en la prueba de nocicepción de sacudida de la cola en ratas

El modelo de prueba es bien conocido en la técnica y se describe en J. Pharmacol Exp Ther, 1941, 72, 74-79 (D'Amour y col., A method for determining loss of pain sensation)).

- 15 El objetivo de este estudio era evaluar los posibles efectos analgésicos de los isómeros R y S de la dihidroetorfina (R-DHE y S-DHE) a dosis de 0,1, 0,3 y 0,5 $\mu\text{g/kg}$ (R-DHE) y 3, 10 y 30 $\mu\text{g/kg}$ (S-DHE) en una prueba de sacudida de la cola diseñada para detectar efectos sobre la nocicepción en ratas. Se usó clorhidrato de morfina como sustancia de referencia y citrato de fentanilo como sustancia de comparación.

SUSTANCIAS DE PRUEBA y MATERIALES

Sustancias de prueba, sustancia de referencia y vehículo

- 20 Sustancia de prueba: dihidroetorfina (R-DHE, líquido incoloro, usada como base libre) y dihidroetorfina (S-DHE, líquida; usada como base libre)
 Vehículo para la sustancia de prueba: tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para irrigación, en proporción 0,03:0,10:0,86:90,01 (g:g:ml))
 [ácido cítrico monohidratado (polvo blanco, Sigma, Reino Unido), citrato de sodio (Sigma, Reino Unido), cloruro de sodio (sólido blanco; Merck), agua estéril para irrigación (líquido transparente; Baxter Healthcare, Reino Unido)]
 25 Sustancia de referencia: clorhidrato de morfina (polvo blanco; Macfarlan Smith, Edimburgo, Reino Unido)
 Sustancia de comparación: citrato de fentanilo (polvo blanco; Sigma, Reino Unido)

Conservación de las sustancias de prueba, de referencia y de comparación

- 30 Las sustancias de prueba se conservaron a temperatura ambiente, al abrigo de la luz, y las sustancias de referencia y de comparación se conservaron a temperatura ambiente.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y CONCENTRACIONES DE DOSIS

- 35 La vía de administración de las formas isómeras R y S de DHE y el vehículo fue la intravenosa. Una posible vía de administración en seres humanos es la intravenosa. Las dosis de R-DHE fueron de 0,1, 0,3 y 0,5 $\mu\text{g/kg}$. Las dosis de S-DHE fueron de 3, 10 y 30 $\mu\text{g/kg}$.

La dosis de morfina fue de 5 mg/kg. La vía de administración de la morfina fue la intravenosa.

Las dosis de fentanilo fueron de 0,5, 2 y 6 $\mu\text{g/kg}$. La vía de administración del fentanilo fue la intravenosa.

ANIMALES

	Especie:	Rata
	Raza:	Sprague-Dawley
	Sexo:	Macho
5	Número de animales:	Se asignaron 111 animales al estudio; los 9 animales restantes fueron devueltos al grupo de reserva
	Intervalo de edad:	9 a 11 semanas (en base al peso corporal promedio)
	Intervalo de peso:	198 a 258 g
10	Aclimatación:	6 días después de su llegada, antes de comenzar la investigación del estudio
	Proveedor:	Harlan UK Ltd

Identificación y aleatorización de los animales

A cada animal se le asignó aleatoriamente un número de identificación único que aparecía en las hojas de datos y en las tarjetas de las jaulas. Los animales se identificaron con una marca indeleble en la cola.

Salud y bienestar de los animales

- 15 Todos los estudios se realizaron según lo dispuesto por la ley británica sobre procedimientos científicos en animales (Animals (Scientific Procedures) Act) de 1986, las directrices del ministerio del interior británico sobre la aplicación de la ley y todos los códigos de prácticas aplicables para el cuidado y el alojamiento de animales de laboratorio. El procedimiento adoptado en este estudio se incluye en el número de procedimiento 213N, que tiene un límite de intensidad moderado.

20 Alojamiento y entorno

- Se alojaron los animales en grupos de un máximo de 5 en jaulas de fondo plano con serrín. Durante la aclimatación, se limpiaron las salas y las jaulas a intervalos regulares para mantener la higiene. Las salas se iluminaron con luces fluorescentes programadas para dar un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (encendido a las 07.00, apagado a las 19.00), como se recomienda en la Home Office Animals (Scientific Procedures) Act de 1986. Las salas tenían aire acondicionado y se midieron la temperatura del aire y la humedad relativa. Durante el período de aclimatación se mantuvo la temperatura ambiente (intervalo de 19 °C a 22 °C) y el grado de humedad permaneció en el intervalo del 22 % al 44 %. En el procedimiento se mantuvo la temperatura ambiente (intervalo de 20 °C a 21 °C) y el grado de humedad permaneció en el intervalo del 22 % al 26 %.

Dieta y agua

- 30 Se les ofreció una dieta de RM1(E) SQC (Special Diets Services, Witham, Reino Unido) y agua corriente a voluntad. Todos los lotes de pienso se suministraron con un certificado de análisis adjunto en el que se detallan la composición nutricional y las concentraciones de contaminantes especificadas (por ejemplo, metales pesados, aflatoxina e insecticidas). El agua se sometió a análisis periódicos para detectar impurezas y contaminantes. Los criterios de concentraciones aceptables de contaminantes en el pienso y el agua suministrada estaban dentro de las especificaciones analíticas indicadas por el fabricante del pienso y el servicio de análisis del agua, respectivamente.

Estado de salud

Se sometió a los animales a una exploración a su llegada y antes del estudio; todos estaban sanos y se consideraron apto para uso experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL

40 Formulación de las sustancias de prueba, de referencia y de comparación

- Se preparó el tampón citrato pesando con precisión las cantidades apropiadas de cada componente y disolviéndolas en agua estéril para irrigación. Cuando los componentes se disolvieron por completo, se midieron la osmolalidad y el pH de la solución. Se consideró que el vehículo era aceptable, ya que el pH era de 5,01, que estaba dentro del intervalo de pH 4,8 a 5,2, y la osmolalidad era de 296 mOsmol/kg, en el intervalo de 280 a 300 mOsmol/kg.
- 45 Después, se sometió el vehículo a filtración térmica a través de un Millex GV Stericup en condiciones asépticas y se conservó a entre 2 °C y 8 °C antes de su uso.

- Las sustancias de prueba, DHE (isómeros R y S), se formularon para su dosificación como soluciones en tampón citrato. Las concentraciones deseadas (0,02, 0,06 y 0,10 µg/ml para el R-DHE y 0,6, 2 y 6 µg/ml para el S-DHE) para la dosificación se lograron por dilución seriada de las soluciones madre apropiadas que se proporcionaron a una concentración aproximada de 20 µg/ml. Se pasaron las soluciones madre por una unidad de filtro estéril Durapore Millex GV de 0,22 µm a viales de vidrio y todas las diluciones posteriores con el tampón citrato estéril se realizaron mediante manipulación estéril. Se prepararon formulaciones dentro del período de estabilidad conocido para (R) DHE y se conservaron refrigeradas a aproximadamente 4 °C hasta que se necesitaron para la dosificación.

La sustancia de referencia, clorhidrato de morfina, se formuló para su dosificación disolviendo una cantidad conocida en tampón citrato para dar una solución de 1 mg/ml. Se aplicó un factor de corrección de 1,32 para permitir la expresión de la dosis de morfina en términos de base libre. Las soluciones se prepararon en el momento y se protegieron de la luz.

- 5 La sustancia de comparación, citrato de fentanilo, se formuló para su dosificación disolviendo una cantidad conocida en tampón citrato para dar una solución madre con una concentración de 0,36 mg/ml. Después, se sometió esta solución madre a dilución seriada con tampón citrato para dar las concentraciones finales de 0,1, 0,4 y 1,2 µg/ml. Se aplicó un factor de corrección de 1,57 para permitir la expresión de la dosis de fentanilo en términos de base libre. Las soluciones se prepararon en el momento y se protegieron de la luz.

10 Tamaño de los grupos, dosis y números de identificación

Se establecieron 11 grupos de tratamiento con un máximo de 10 ratas por grupo. A cada grupo de tratamiento se le dio una letra (A a K). Se asignó a las ratas aleatoriamente a los grupos de tratamiento el día antes de la dosificación en base a los valores basales de la prueba de sacudida de la cola antes de la dosis (véase a continuación).

D	Vehículo	5 ml/kg
F	R-DHE	0,1 µg/kg
E	R-DHE	0,3 µg/kg
K	R-DHE	0,5 µg/kg
I	S-DHE	3 µg/kg
H	S-DHE	10 µg/kg
G	S-DHE	30 µg/kg
J	Fentanilo	0,5 µg/kg
C	Fentanilo	2 µg/kg
B	Fentanilo	6 µg/kg
A	Morfina	5 mg/kg

- 15 El vehículo era tampón citrato. A los animales se les administró por vía intravenosa en la vena de la cola un volumen de dosis de 5 ml/kg con una jeringuilla de polipropileno con una aguja Becton Dickinson del calibre 25 (0,5 x 16 mm). El volumen total de 5 ml/kg se administró a una velocidad lo más constante posible durante un intervalo de 2 min ± 10 s. Se registró la hora de inicio y final de las emboladas lentas. Se registró el momento de la dosificación en los datos en bruto.

20 Enmascaramiento del tratamiento

Se codificaron las soluciones de dosificación (A a K) para que el observador no conociera la identidad de los grupos de tratamiento.

Pesos corporales

- 25 Se pesó a los animales antes de las pruebas y se registraron los pesos corporales el mismo día de la administración de las sustancias.

Procedimiento

1. Aclimatación

En una ocasión antes de las pruebas de comportamiento, se sometió a cada animal a una manipulación rutinaria y a la aclimatación al entorno de las pruebas de comportamiento.

30 2. Pruebas de comportamiento basales

Se pasó a las ratas a la sala de procedimientos 1 días antes del experimento. Después, se las alojó, se les administraron las sustancias y se las sometió a observación en la sala de procedimientos. La prueba de sacudida de la cola (véase a continuación) se realizó en todas las ratas en 3 ocasiones independientes antes de la dosificación, para establecer los valores basales. Se tomaron como lectura final de la prueba los valores basales antes de la dosis (los datos de la primera y la segunda prueba no se incluyeron, pero se clasificaron como parte de la aclimatación).

- 35 Prueba de sacudida de la cola: Se sujetó a cada rata ligeramente sobre la superficie del aparato de sacudida de la cola (Ugo Basile, Italia), para que la cola se situara directamente sobre la fuente de infrarrojos. Después, se aplicó la fuente de infrarrojos a una zona pequeña de la superficie ventral de la cola. La activación de la fuente de infrarrojos

activó simultáneamente un temporizador, que registró automáticamente el tiempo transcurrido hasta el desvío (retirada o sacudida) de la cola. Se anotó la latencia de sacudida de la cola para cada animal. La intensidad de los infrarrojos se fijó en IR50 y la duración máxima de la exposición a la fuente IR fue de 10 s. A los animales que no mostraron respuesta se les asignó una latencia de retirada de 10 s.

5 3. Asignación a los grupos y criterios de exclusión

Se asignó a las ratas aleatoriamente a los grupos de tratamiento (A a K) el día antes de la dosificación en base a los valores basales de la prueba de sacudida de la cola antes de la dosis.

4. Dosificación y pruebas de comportamiento

10 En este estudio no se sometió a los animales a ayuno. Las pruebas de sacudida de la cola se realizaron aproximadamente 5, 10, 20, 30, 60 y 120 min después de la dosis (con respecto al comienzo de la dosificación), para estudiar el efecto del tratamiento.

5. Sacrificio

Los animales no asignados a un grupo de tratamiento fueron sacrificados por dislocación cervical al final del estudio. El resto fueron devueltos al grupo de reserva al concluir el período de pruebas final.

15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron comparaciones estadísticas entre los grupos de DHE (isómeros R y S), morfina y fentanilo y el grupo de vehículo con procedimientos estadísticos paramétricos o no paramétricos. La elección de procedimientos estadísticos paramétricos (análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional, prueba de la t de Dunnett) o no paramétricos (estadística de Kruskal-Wallis, prueba de Dunn y prueba de la U de Mann-Whitney) se basó en si los grupos que se iban a comparar cumplían el criterio de homogeneidad de la varianza (evaluado por la prueba de las medias de Levene o la prueba de la F). Se supuso la significación estadística cuando $P < 0,05$.

25 Además, se convirtieron todos los datos a MEP % (máximo efecto posible), definido como $100 \times (\text{prueba} - \text{control}) / (\text{corte} - \text{control})$ donde "control" era la observación del grupo de control, "prueba" era la observación después de la dosis y "corte" era la duración máxima del estímulo permitida (10 s para la sacudida de la cola). Se generaron curvas de respuesta a la dosis para cada isómero de DHE (isómeros R y S) y fentanilo para los 4 primeros puntos temporales de observación y se calculó la DE_{50} (50 % del MEP). El análisis se realizó en la curva de respuesta a la dosis sigmoide $\log_{10}$ (dosis $\times 10^3$), con una regresión no lineal (línea de mejor ajuste). Como los datos posteriores a la dosis habían vuelto a los valores basales en los puntos temporales de 60 y 120 min, no fue necesario hacer cálculos en estos datos.

30 RESULTADOS

Los datos de la media del grupo $\pm$ ee para la latencia de retirada de la cola se resumen en la tabla 15. Se compararon los valores de DE_{50} calculados para R-DHE, S-DHE y fentanilo para estimar sus potencias relativas (tabla 11). En las figuras 11 a 13 se presentan gráficas del curso temporal y en las figuras 14 a 17 se presentan los datos y las curvas de respuesta a la dosis DE_{50} (dosis de MEP del 50 %).

35 Tabla 15: efectos de la dihidroetorfina (isómeros R y S), el fentanilo y la morfina sobre la latencia de retirada de la cola en ratas

Tratamiento	Predosis	5	Latencia de sacudida de la cola (s) en tiempo (min)				120
			10	20	30	60	
Vehículo 5 ml/kg i.v.	4,2 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,6	5,0 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,6 (9)
DHE (isómero R) 0,1 μ g/kg i.v.	4,2 $\pm$ 0,3	7,9 $\pm$ 0,7*	6,1 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,3
DHE (isómero R) 0,3 μ g/kg i.v.	4,2 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,5**	7,7 $\pm$ 0,7 ^s	7,6 $\pm$ 0,8	6,1 $\pm$ 0,9	5,2 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,6
DHE (isómero R) 0,5 μ g/kg i.v.	4,4 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,6**	9,7 $\pm$ 0,3 ^{\$\$\$}	8,8 $\pm$ 0,5 ^{\$\$}	8,2 $\pm$ 0,8 ^s	3,6 $\pm$ 0,4**	4,8 $\pm$ 0,6 (8)

(continuación)

Tratamiento	Predosis	5	Latencia de sacudida de la cola (s) en tiempo (min) después de la dosis				120
			10	20	30	60	
DHE (isómero S) 3 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	8,3 ± 0,8	7,0 ± 0,9	7,0 ± 0,7	5,7 ± 0,5	5,8 ± 0,6	4,9 ± 0,4 (9)
DHE (isómero S) 10 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	9,7 ± 0,3 ^{\$\$}	9,3 ± 0,3 ^{\$\$}	7,3 ± 0,8	5,8 ± 0,5	4,0 ± 0,4*	3,9 ± 0,4
DHE (isómero S) 30 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	10,0 ± 0,0 ^{\$\$\$}	9,2 ± 0,8 ^{\$\$}	9,1 ± 0,6 ^{\$\$\$}	8,3 ± 0,7**	4,9 ± 0,3	3,5 ± 0,5 (8)
Fentanilo 0,5 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	5,8 ± 0,6	5,3 ± 0,6	5,2 ± 0,6	4,6 ± 0,4	4,8 ± 0,4	4,6 ± 0,4 (9)
Fentanilo 2 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	9,0 ± 0,7 ^{\$\$}	9,1 ± 0,4 ^{\$\$\$}	7,5 ± 0,9	7,1 ± 0,7	4,9 ± 0,7	4,2 ± 0,8
Fentanilo 6 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	10,0 ± 0,0 ^{\$\$\$}	8,4 ± 0,7 ^{\$\$}	8,1 ± 0,7 ^{\$}	6,5 ± 1,0	6,0 ± 1,0	6,3 ± 0,7
Morfina 5 µg/kg i.v.	4,2 ± 0,3	10,0 ± 0,0 ^{###}	10,0 ± 0,0 ^{###}	10,0 ± 0,0 ^{###}	10,0 ± 0,0 ^{###}	8,7 ± 0,9 [#]	6,2 ± 0,9 (8)

El vehículo fue tampón citrato [ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para irrigación, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:ml)]

Los datos se expresan como la media ± EEM.

N = 10 animales por grupo, a menos que se indique lo contrario entre paréntesis.

*P<0,05 y **P<0,01 en comparación con el vehículo (ANOVA y prueba de la t de Dunnett).

^{\$}P<0,05, ^{\$\$}P<0,01 y ^{\$\$\$}P<0,001 en comparación con el vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).

[#]P<0,05 y ^{###}P<0,001 en comparación con el vehículo (prueba de la U de Mann-Whitney).

Efectos de la dihidroetorfina (R-DHE) sobre la latencia de retirada de la cola (figura 11)

- La administración intravenosa de R-DHE a una dosis de 0,1 µg/kg provocó un aumento significativo de la latencia de sacudida de la cola 5 min después de la dosis (7,9 ± 0,7 s; P <0,05; ANOVA y prueba de la t de Dunnett) en comparación con los datos del grupo de vehículo (5,2 ± 0,6 s). La administración intravenosa de R-DHE a 0,3 µg/kg provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5 y 10 min después de la dosis (9,2 ± 0,5 s; P <0,01; ANOVA y prueba de la t de Dunnett; 7,7 ± 0,7 s; P < 0,05; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn, respectivamente) en comparación con los datos del grupo de vehículo (5,2 ± 0,6 y 5,0 ± 0,2 s, respectivamente) pero no mostró efectos en otros puntos temporales. La administración intravenosa de R-DHE a una dosis de 0,5 µg/kg provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5, 10, 20 y 30 min después de la dosis (9,4 ± 0,6 s; P <0,01; ANOVA y prueba de la t de Dunnett; 9,7 ± 0,3 s; P <0,001; 8,8 ± 0,5 s P <0,01; 8,2 ± 0,8 s; P < 0,05; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn, respectivamente) en comparación con los datos del grupo de vehículo (5,2 ± 0,6, 5,0 ± 0,2, 5,1 ± 0,2 y 4,9 ± 0,4 s, respectivamente). Se observó una disminución significativa de la latencia de sacudida de la cola 60 min después de la dosis en el grupo de 0,5 mg/kg que no se considera farmacológicamente relevante. No se observaron efectos 120 min después de la dosis. Estos datos indican un comienzo inmediato de la analgesia, con efectos máximos aproximadamente 5 y 10 min después de la dosis y vuelta a los valores basales (comparables con los del control con vehículo) en el punto temporal de 60 min después de la dosis.

- La DE₅₀ de R-DHE estimada, es decir el MEP del 50 %, fue de 0,08, 0,23, 0,25 y 0,42 µg/kg 5, 10, 20 y 30 min después de la dosis, respectivamente. No se observó respuesta a la dosis en los puntos temporales de 60 y 120 min después de la dosis.

Efectos de la dihidroetorfina (S-DHE) sobre la latencia de retirada de la cola (figura 12)

- La administración intravenosa de S-DHE a una dosis de 3 µg/kg no afectó significativamente a la latencia de retirada de la cola en ningún punto temporal probado en comparación con los datos del grupo de vehículo. La administración intravenosa de S-DHE a 10 µg/kg provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5 y 10 min después de la dosis (9,7 ± 0,3 y 9,3 ± 0,3 s, respectivamente; ambas P <0,01; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los datos del grupo de vehículo (5,2 ± 0,6 y 5,0 ± 0,2 s, respectivamente). Se observó una disminución significativa de la latencia de retirada de la cola 60 min después de la dosis que no se considera farmacológicamente relevante. La administración intravenosa de S-DHE a una dosis de 30 µg/kg provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5, 10, 20 y 30 min después de la dosis (10,0 ± 0,0 s; P <0,001; 9,2 ± 0,8 s; P <0,01; 9,1 ± 0,6 s; P <0,001; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn y 8,3 ± 0,7 s; P <0,01; ANOVA y prueba de la t de Dunnett, respectivamente) en comparación con los datos del grupo de vehículo (5,2 ± 0,6, 5,0 ± 0,2, 5,1 ± 0,2 y 4,9 ± 0,4 s, respectivamente). Estos datos indican un comienzo inmediato de la analgesia,

con efectos máximos en el punto temporal de 5 min después de la dosis y vuelta a los valores basales (comparables con los del control con vehículo) en el punto temporal de 60 min después de la dosis.

La DE_{50} de DHE (isómero S) estimada, es decir el MEP del 50 %, fue de 2,17, 3,80, 7,52 y 20,95 $\mu\text{g/kg}$ 5, 10, 20 y 30 min después de la dosis, respectivamente. No se observó respuesta a la dosis en los puntos temporales de 60 y 120 min después de la dosis.

Efectos del fentanilo sobre la latencia de retirada de la cola (figura 13)

La administración intravenosa de fentanilo a una dosis de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ no afectó significativamente a la latencia de retirada de la cola en ningún punto temporal probado en comparación con los datos del grupo de vehículo. La administración intravenosa de fentanilo a 2 $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5 y 10 min después de la dosis ($9,0 \pm 0,7$; $P < 0,01$ y $9,1 \pm 0,4$ s; $P < 0,001$, respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para ambas) en comparación con los datos del grupo de vehículo ($5,2 \pm 0,6$ y $5,0 \pm 0,2$ s, respectivamente). La administración intravenosa de fentanilo a una dosis de 6 $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5, 10, 20 y 30 min después de la dosis ($10,0 \pm 0,0$ s; $P < 0,001$; $8,4 \pm 0,7$ s; $P < 0,01$; $8,1 \pm 0,7$ s; $P < 0,05$, respectivamente; todo con prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los datos del grupo de vehículo ($5,2 \pm 0,6$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$ y $5,1 \pm 0,2$ s, respectivamente). Estos datos indican un comienzo inmediato de la analgesia, con efectos máximos en el punto temporal de 5 min y vuelta a los valores basales (comparables con los del control con vehículo) en el punto temporal de 60 min después de la dosis.

La DE_{50} de fentanilo estimada, es decir el MEP del 50 %, fue de 1,14, 1,25, 3,11 y 9,68 $\mu\text{g/kg}$ 5, 10, 20 y 30 min después de la dosis, respectivamente. No se observó respuesta a la dosis en los puntos temporales de 60 y 120 min después de la dosis.

Efectos comparativos de R-DHE, S-DHE y fentanilo

Se compararon los valores de DE_{50} calculados para R-DHE, S-DHE y fentanilo para estimar sus potencias relativas (tabla 16). Los datos sugieren que durante los primeros 30 min, después de una sola administración intravenosa de cada compuesto en ratas macho, la R-DHE mostró una potencia analgésica que es de 5 a 23 veces la del fentanilo, la S-DHE presentó una potencia analgésica de 0,3 a 0,5 veces la del fentanilo, y la R-DHE tiene una potencia analgésica que es de 17 a 50 veces la de la S-DHE.

Tabla 16: Valores de DE_{50} y proporciones comparativas de R-DHE, S-DHE y fentanilo

Tiempo después de la dosis (min)	DE_{50} R-DHE ($\mu\text{g/kg}$)	DE_{50} S-DHE ($\mu\text{g/kg}$)	DE_{50} fentanilo ($\mu\text{g/kg}$)	Proporción de DE_{50} de fentanilo/R-DHE	Proporción de DE_{50} de fentanilo/S-DHE	Proporción de ED_{50} de fentanilo/S-DHE/R-DHE
5	0,08	2,17	1,14	14	0,5	28
10	0,23	3,80	1,24	5	0,3	17
20	0,25	7,52	3,11	12	0,4	30
30	0,42	20,95	9,68	23	0,5	50

Efectos de la morfina sobre la latencia de retirada de la cola

La administración intravenosa de morfina (5 mg/kg) provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la cola 5, 10, 20, 30 ($10,0 \pm 0,0$ s; $P < 0,001$; prueba de la U de Mann-Whitney, para los 4 puntos temporales) y 60 min después de la dosis ($8,7 \pm 0,9$ s; $P < 0,05$; prueba de la U de Mann-Whitney) en comparación con los datos del grupo de vehículo ($5,2 \pm 0,6$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$, $4,9 \pm 0,4$ y $5,6 \pm 0,4$ s, respectivamente).

CONCLUSIÓN

Una sola administración intravenosa de R-DHE a dosis de 0,1, 0,3 y 0,5 $\mu\text{g/kg}$ y de S-DHE a dosis de 10 y 30 $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento dependiente de la dosis significativo de la latencia de retirada de la cola en ratas macho hasta 30 min después de la dosis. La administración intravenosa de fentanilo a dosis de 2 y 6 $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento dependiente de la dosis significativo de la latencia de retirada de la cola hasta 30 min después de la dosis.

Se compararon los valores de DE_{50} calculados para R-DHE, S-DHE y fentanilo para estimar sus potencias relativas (tabla 16). Los datos sugieren que durante los primeros 30 min, después de una sola administración intravenosa de cada compuesto en ratas macho, la R-DHE mostró una potencia analgésica que es de 5 a 23 veces la del fentanilo, la S-DHE presentó una potencia analgésica de 0,3 a 0,5 veces la del fentanilo, y la R-DHE tiene una potencia analgésica que es de 17 a 50 veces la de la S-DHE.

La duración de la actividad analgésica opioide de R-DHE y S-DHE tras la administración intravenosa subraya el posible beneficio y el potencial terapéutico de estos compuestos en el tratamiento del dolor agudo.

Los efectos observados después de la administración de morfina concuerdan con su actividad farmacológica conocida y, por tanto, este sistema de prueba permitía detectar efectos nociceptores.

Efectos de (R) y (S)-dihidroetorfina en el modelo de dolor neuropático de ligadura del nervio espinal

5 EL modelo de prueba usado es bien conocido en la técnica y se describe en Pain 1992; 50: 355-363 (Kim SH, Chung JM., An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat).

10 Se estudiaron los posibles efectos analgésicos de la dihidroetorfina después de una sola dosis intravenosa de 0,1, 0,3 y 0,5 µg/kg (isómero R) y una sola dosis intravenosa de 3, 10 y 30 µg/kg (isómero S) en el modelo de dolor neuropático de ligadura del nervio espinal. Se indujo una mononeuropatía periférica en el miembro trasero izquierdo de las ratas por ligadura estrecha de los nervios espinales L5 y L6. Se realizó un seguimiento del desarrollo de la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica con pruebas de comportamiento establecidas (prueba de Von Frey y prueba planta de Hargreaves, respectivamente). Se usó morfina como sustancia de referencia y se usó pregabalina como sustancia de comparación.

SUSTANCIAS DE PRUEBA y MATERIALES

Sustancias de prueba, sustancia de referencia, sustancia de comparación y vehículos

15 Sustancias de prueba: dihidroetorfina (isómero R) y dihidroetorfina (isómero S) Vehículo para las sustancias de prueba y de referencia: tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua estéril, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:g:ml)); [ácido cítrico monohidratado (polvo blanco; Sigma, Reino Unido), citrato de sodio (Sigma, Reino Unido), cloruro de sodio (sólido blanco; Merck), agua estéril (líquido transparente; Baxter Healthcare, Reino Unido)]

20 Sustancia de referencia: clorhidrato de morfina (polvo blanco; Macfarlan Smith, Edimburgo, Reino Unido)
Sustancia de comparación: pregabalina (nombre comercial Lyrica®; cápsulas blancas; fabricado por Pfizer y suministrado por Lindsay & Gilmour Chemist, Juniper Green, Edimburgo)
Vehículo para la sustancia de comparación: carboximetilcelulosa al 1 % p/v (CMC, polvo; Sigma, Reino Unido)

Conservación de las sustancias de prueba, de referencia y de comparación

Las sustancias de prueba se conservaron a temperatura ambiente, al abrigo de la luz, y las sustancias de referencia y de comparación se conservaron a temperatura ambiente.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y CONCENTRACIONES DE DOSIS

30 La vía de administración de las formas isómeras R y S de la dihidroetorfina y el vehículo (citrato de sodio) fue la intravenosa. Es una posible vía de administración en seres humanos. Las dosis de R-DHE fueron de 0,1, 0,3 y 0,5 µg/kg y las dosis de S-DHE fueron de 3, 10 y 30 µg/kg.

La vía de administración de la morfina fue la intravenosa. La dosis de morfina fue de 5 mg/kg.

35 La vía de administración de la sustancia de comparación pregabalina fue la oral. En la fase 2 del estudio, la dosis de pregabalina fue de 30 mg/kg. Para la fase 3, las concentraciones de dosis de la sustancia de comparación, pregabalina, fueron de 30, 50 y 100 mg/kg.

ANIMALES

Especie:	Rata
Raza:	Sprague-Dawley
Sexo:	Macho
Número de animales:	se prepararon quirúrgicamente 75 animales.
Intervalo de edad:	6 a 7 semanas (para la intervención quirúrgica); 8 a 9 semanas (fase 1 de dosificación); 9 a 10 semanas (fase 2 de dosificación); 11 a 12 semanas (fase 3 de dosificación).
Intervalo de peso:	139 a 183 g (para la intervención quirúrgica); 190 a 257 g (fase 1 de dosificación); 9 a 10 g (fase 2 de dosificación); 243 a 341 g (fase 3 de dosificación).
Aclimatación:	3 días después de su llegada, antes de comenzar las pruebas de comportamiento
Proveedor:	Harlan UK Ltd

Identificación y aleatorización de los animales

A cada animal se le asignó aleatoriamente un número de identificación único que aparecía en las hojas de datos y en las tarjetas de las jaulas. Los animales se identificaron con una marca indeleble en la cola.

Salud y bienestar de los animales

- 5 Todos los estudios se realizaron según lo dispuesto por la ley británica sobre procedimientos científicos en animales (Animals (Scientific Procedures) Act) de 1986, las directrices del ministerio del interior británico sobre la aplicación de la ley y todos los códigos de prácticas aplicables para el cuidado y el alojamiento de animales de laboratorio.

Alojamiento y entorno

- 10 Se alojaron los animales en grupos de un máximo de 5 en jaulas de fondo plano con serrín. Durante la aclimatación, se limpiaron las salas y las jaulas a intervalos regulares para mantener la higiene. Las salas se iluminaron con luces fluorescentes programadas para dar un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (encendido a las 07.00, apagado a las 19.00), como se recomienda en la Home Office Animals (Scientific Procedures) Act de 1986. Las salas tenían aire acondicionado y se midieron la temperatura del aire y la humedad relativa. Durante el período de aclimatación se mantuvo la temperatura ambiente (intervalo de 20 °C a 22 °C) y el grado de humedad permaneció en el intervalo del 46 % al 59 %. En el procedimiento se mantuvo la temperatura ambiente (intervalo de 19 °C a 22 °C) y el grado de humedad permaneció en el intervalo del 26 % al 43 %.

Dieta y agua

- 20 Se les ofreció una dieta ampliada para roedores RM1(E) SQC (Special Diets Services, Witham, Reino Unido) y agua corriente a voluntad. Todos los lotes de pienso se suministraron con un certificado de análisis (CA) adjunto en el que se detallan la composición nutricional y las concentraciones de contaminantes especificadas (por ejemplo, metales pesados, aflatoxina e insecticidas). El agua se sometió a análisis periódicos para detectar impurezas y contaminantes. Los criterios de concentraciones aceptables de contaminantes en el pienso y el agua suministrada estaban dentro de las especificaciones analíticas indicadas por el fabricante del pienso y el servicio de análisis del agua, respectivamente.

Estado de salud

25 Se sometió a los animales a una exploración a su llegada y antes del estudio; todos estaban sanos y se consideraron apto para uso experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Formulación de las sustancias de prueba, de referencia y de comparación

- 30 Se preparó el tampón citrato pesando con precisión las cantidades apropiadas de cada componente y disolviéndolas en agua estéril para inyectables. Cuando los componentes se disolvieron por completo, se midieron la osmolalidad y el pH de la solución. Se consideró que el vehículo era aceptable, ya que el pH era de 5,03, que estaba dentro del intervalo de 4,8 a 5,2, y la osmolalidad era de 295 mOsmol/kg, en el intervalo de 280 a 300 mOsmol/kg. Después, se sometió el vehículo a filtración térmica a través de un Millex GV Stericup (filtro de 0,22 µm) en condiciones asépticas y se conservó a entre 2 °C y 8 °C antes de su uso.

- 40 Las sustancias de prueba, dihidroetorfina (isómeros R y S), se formularon para su dosificación como soluciones en tampón citrato. Las concentraciones deseadas (0,02, 0,06 y 0,10 µg/ml para el isómero R y 0,6, 2 y 6 µg/ml para el isómero S) para la dosificación se lograron por dilución seriada de las soluciones madre apropiadas que se proporcionaron a una concentración aproximada de 20 µg/ml. Se anotó la concentración real de las soluciones madre en los datos en bruto. Antes de las diluciones seriadas, se pasaron las soluciones madre por una unidad de filtro estéril Durapore Millex GV de 0,22 µm a viales de vidrio y todas las diluciones posteriores con el tampón citrato estéril se realizaron mediante manipulación estéril. No se aplicó ningún factor de corrección y las formulaciones se prepararon como bases libres. Las formulaciones se prepararon con antelación a las fechas de dosificación del estudio y se usaron (1-2 días después de la preparación) durante la estabilidad conocida para R-DHE, que era de 11 días. La S-DHE se usó 1-2 días después de la preparación. Las soluciones de dosificación de dihidroetorfina (isómeros R y S) se conservaron refrigeradas a aproximadamente 4 °C, hasta que se necesitaron para su administración.

- 50 La sustancia de referencia, clorhidrato de morfina, se formuló para su dosificación disolviendo una cantidad conocida en tampón citrato para dar una solución de 1 mg/ml. Se aplicó un factor de corrección de 1,32 para permitir la expresión de la dosis de morfina en términos de base libre. Las soluciones se prepararon en el momento y se protegieron de la luz.

Para su dosificación, la sustancia de comparación, pregabalina, se formuló mediante la suspensión de una cantidad conocida en CMC al 1 % p/v para dar una suspensión de 3 mg/ml para la fase 2 y se prepararon suspensiones de 3, 5 y 10 mg/ml para la fase 3. No fue necesario aplicar un factor de corrección, por lo que la pregabalina se administró

como base libre. Las suspensiones se prepararon en el momento y se protegieron de la luz.

Tamaño de los grupos, dosis y números de identificación

5 Se establecieron 5 grupos de tratamiento con un máximo de 10 ratas por grupo. A cada grupo de tratamiento se le dio una letra (fase 1: A a E, fase 2: F a J y fase 3: K a O). Se asignó a las ratas aleatoriamente a los grupos de tratamiento el día antes de la dosificación en base a los valores basales de la prueba de hiperalgesia térmica antes de la dosis (véase a continuación).

Fase 1:

C	Vehículo	5 ml/kg, i.v.
B	R-DHE	0,1 µg/kg, i.v.
A	R-DHE	0,3 µg/kg, i.v.
E	R-DHE	0,5 µg/kg, i.v.
D	Morfina	5 mg/kg, i.v.

Fase 2:

I	Vehículo	5 ml/kg, i.v.
F	S-DHE	3 µg/kg, i.v.
G	S-DHE	10 µg/kg, i.v.
J	S-DHE	30 µg/kg, i.v.
H	Pregabalina	30 mg/kg, vía oral

Fase 3:

N	Vehículo	10 ml/kg, vía oral
M	Pregabalina	30 mg/kg, vía oral
L	Pregabalina	50 mg/kg, vía oral
K	Pregabalina	100 mg/kg, vía oral
O	Morfina	5 mg/kg, i.v.

10 El vehículo intravenoso, tampón citrato, se usó para las fases 1 y 2 y el vehículo oral, CMC al 1 % p/v, se usó para la fase 3. A los animales asignados a los grupos de tratamiento intravenoso se les administró en una vena de la cola un volumen de dosis de 5 ml/kg con una jeringuilla de polipropileno con una aguja Becton Dickinson del calibre 25 (0,5 x 16 mm). El volumen intravenoso total de 5 ml/kg se administró a una velocidad lo más constante posible durante un intervalo de 2 min ± 10 s. Se registró la hora de inicio y final de las emboladas intravenosas lentas. A los animales asignados a grupos de tratamiento oral se les administró por sonda nasogástrica un volumen de dosis de 10 ml/kg. Se registró el momento de la dosificación en los datos en bruto.

Enmascaramiento del tratamiento

20 Se codificaron las soluciones de dosificación (fase 1: A a E, fase 2: F a J y fase 3: K a O) para que los observadores no conocieran la identidad de los grupos de tratamiento. Dado que la sustancia de comparación de la fase 2 del estudio se administró por una vía de dosis diferente, este grupo no estaba enmascarado para la persona encargada de la dosificación y se codificó como H. Asimismo, como el control de morfina de la fase 3 se administró por vía intravenosa, y se trataba de una vía diferente de la de los grupos de vehículo y de sustancia de comparación (dosificación oral), el grupo de morfina no estaba enmascarado y, por lo tanto, se codificó como O.

Pesos corporales

25 Se pesó a los animales antes de la intervención quirúrgica, el día 1 después de la operación (PO) y todos los días de dosificación antes de la administración de las sustancias, y se registraron los pesos corporales.

Observaciones diarias

30 Se realizaron observaciones generales en todos los animales a diario desde el día 0 PO en adelante, prestando especial atención al estado de las patas traseras izquierda y derecha del animal.

Procedimiento

1 Aclimatación

35 Antes de las pruebas de comportamiento, se sometió a los animales a una manipulación rutinaria y a la aclimatación al entorno de las pruebas de comportamiento.

2 Pruebas de comportamiento basales

Se pasó a las ratas a la sala de procedimientos 1 días antes del experimento. Después, se las alojó, se les administraron las sustancias y se las sometió a observación en la sala de procedimientos. Las pruebas de comportamiento (véase a continuación) se realizaron en todas las ratas en 2 ocasiones independientes antes de la intervención quirúrgica, para establecer los valores basales. Se tomaron valores basales previos a la intervención quirúrgica como datos del día final (segundo) de prueba (los datos del primer día de prueba se clasificaron como parte de la aclimatación). La secuencia de pruebas fue: alodinia mecánica seguida de hiperalgesia térmica, con un período mínimo de 5 min de reposo entre las pruebas. Alodinia mecánica (prueba de Von Frey): Se colocó a cada animal en una jaula de malla metálica y se aplicaron una serie de filamentos de Von Frey en la superficie planta de la pata trasera desde abajo. Los filamentos se aplicaron en orden creciente (partiendo de la fuerza más débil) y se evaluó el umbral de retirada para las patas traseras izquierda y derecha. Se aplicó cada filamento sobre la mitad de la superficie plantar del pie hasta el punto en que comenzó a doblarse; se repitió esto de aproximadamente 8 a 10 veces por filamento a una frecuencia de aproximadamente 1 Hz. Se definió el umbral de retirada como la menor fuerza de dos o más filamentos de Von Frey consecutivos que desencadena una respuesta de reflejo de retirada (es decir, una breve sacudida de la pata).

Hiperalgesia térmica (prueba plantar de Hargreaves): se colocó a cada rata en una cámara de plástico transparente con base de vidrio y se dejó que se aclimatara durante un período breve al entorno antes de la prueba (aproximadamente 1 min). Después, se estimuló a los animales con una fuente de calor por radiación infrarroja (IR) dirigida a la superficie plantar de la pata trasera desde abajo y se calculó la latencia de retirada para ambas patas traseras, izquierda y derecha. La intensidad de los infrarrojos se fijó en IR50 (configuración diseñada para proporcionar una lectura de flujo de calor de 250 mW·cm²) y la duración máxima de la exposición a la fuente IR fue de 18 s. A los animales que no mostraron respuesta se les asignó una latencia de retirada de 18 s.

3 Procedimiento quirúrgico

Se preparó a los animales quirúrgicamente durante 3 días. Cada rata recibió la anestesia necesaria con isoflurano en oxígeno del 1 % al 3 %. Se colocó a cada rata en decúbito prono y se rasuró y esterilizó la superficie circundante al lugar de la incisión para fines quirúrgicos. En condiciones asépticas, se separaron los músculos paraespinales izquierdos de las prolongaciones espinosas en los niveles L4 S2. Después, se retiró la prolongación transversal L6 con unas pinzas de osteotomía pequeñas de los nervios espinales L4 L6 identificados. Se aislaron los nervios espinales izquierdos L5 y L6 y se practicó una ligadura estrecha con hilo de seda de 6-0 (visualizado con 40 aumentos). Se cerraron las capas de músculo y piel suprayacentes con el material de sutura apropiado y, una vez completado, se suspendió la anestesia. Al recuperarse de la anestesia, las ratas volvieron con sus compañeros de jaula, inicialmente sobre un lecho forrado con gases durante la noche para reducir el riesgo de infección y posteriormente sobre un lecho de serrín, una vez recuperadas por completo. Se dejó que los animales se recuperaran durante un mínimo de 4 días antes de comenzar de nuevo las pruebas de comportamiento.

4 Pruebas de desarrollo

Después de la intervención quirúrgica, se realizaron pruebas de comportamiento dos veces antes del día de dosificación para realizar un seguimiento del desarrollo de alodinia/hiperalgesia. También se incluyeron días de prueba adicionales discrecionales para garantizar que, antes de cada fase de dosificación, había desarrollado alodinia/hiperalgesia un número suficiente de animales.

5 Asignación a los grupos y criterios de exclusión

Se asignó a los animales aleatoriamente a los grupos de tratamiento el día antes de la dosificación en base a los valores basales de la prueba de hiperalgesia térmica antes de la dosis. Sólo se incluyó en el estudio a los animales que habían desarrollado tanto alodinia mecánica como hiperalgesia térmica. Se consideró que los animales habían desarrollado alodinia mecánica si el umbral de retirada de la pata izquierda con los filamentos de Von Frey era ≤ 5 g de fuerza (lo que corresponde a un monofilamento de número 4,56 o menos).

Se consideró que los animales habían desarrollado hiperalgesia térmica si la latencia de retirada de la pata izquierda por el dispositivo plantar térmico mostraba una diferencia ≥ 30 % con respecto al valor de la pata izquierda antes de la intervención quirúrgica antes de la dosificación.

6 Dosificación y pruebas de comportamiento

En este estudio no se sometió a los animales a ayuno. Cada día de dosificación, cada uno de los animales asignados recibió una sola dosis intravenosa de sustancia de prueba, sustancia de referencia o vehículo; o una dosis oral de sustancia de comparación o vehículo. En el estudio hubo 3 fases. La dosificación de cada fase se repartió en 2 días y en cada día de dosificación se dosificó a animales de un mínimo de 3 grupos de tratamiento. Al finalizar cada fase, se dejó a los animales en un período de reposo mínimo de 1 semana antes de comenzar la siguiente fase del estudio.

En las fases 1 y 2 del estudio, después de la dosificación (aproximadamente 5 min desde el comienzo de la dosificación) y aproximadamente 25, 50 y 120 min después de la dosis, se evaluó la alodinia mecánica de las patas traseras izquierda y derecha de cada rata con la prueba de Von Frey. Aproximadamente 15, 35, 60 y 130 min después de la dosis, se evaluó hiperalgesia térmica de las patas traseras izquierda y derecha de cada rata con la prueba plantar de Hargreaves, para estudiar el efecto del tratamiento. Todos los puntos temporales son con respecto al comienzo de la dosificación.

En la fase 3 del estudio, aproximadamente 60, 120, 180 y 240 min después de la dosis, se evaluó la alodinia mecánica de las extremidades traseras izquierda y derecha de cada rata con la prueba de Von Frey. Aproximadamente 70, 130, 190 y 250 min después de la dosis, se evaluó hiperalgesia térmica de las patas extremidades izquierda y derecha de cada rata con la prueba plantar de Hargreaves, para estudiar el efecto del tratamiento.

7 Sacrificios

Todos los animales del estudio fueron sacrificados por dislocación cervical una vez concluido el período de pruebas final.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron comparaciones estadísticas entre grupos de tratamiento con procedimientos estadísticos paramétricos (por ejemplo, análisis de la varianza unidireccional, prueba de la t de Dunnett, prueba de la t de Student) o no paramétricos (por ejemplo, estadística de Kruskal-Wallis, prueba de Dunn, prueba de la U de Mann-Whitney). La elección de pruebas paramétricas o no paramétricas se basó en si los grupos que se iban a comparar cumplían el criterio de homogeneidad de la varianza (evaluado por la prueba de las medias de Levene o la prueba de la F). Los datos de Von Frey se sometieron a transformación logarítmica ($\log_{10}$ de (fuerza en gramos $\times 10\,000$)) antes del análisis. En la fase 2 el estudio, se administró como sustancia de comparación la pregabalina por una vía de dosis diferente y se compararon los datos de la pregabalina con los valores de antes de la dosis con una prueba de la t de Student pareada. En la fase 3 el estudio, se administró como sustancia de referencia morfina por una vía de dosis diferente a la del vehículo y la sustancia de prueba y se compararon los datos de la morfina con los valores de antes de la dosis con una prueba de la t de Student pareada. Para todas las pruebas, se supuso la significación estadística cuando $P < 0,05$. La significación estadística para la prueba de von Frey, a pesar de haberse realizado en los datos con transformación logarítmica, se expresó con respecto a la fuerza en gramos de la sección de resultados con fines ilustrativos. En los datos en bruto se dan detalles completos del análisis.

RESULTADOS

Los datos de la media del grupo $\pm$ eem para los umbrales de retirada y la latencia de retirada se resumen en las tablas 17 a 22.

Desarrollo de estados de dolor neuropático

Se estudiaron dos componentes diferentes del dolor neuropático con pruebas de comportamiento establecidas, a saber, los filamentos de Von Frey para determinar la presencia de alodinia mecánica, y la prueba plantar de Hargreaves para determinar la presencia de hiperalgesia térmica. La mayoría de los animales sometidos a una ligadura del nervio espinal presentaron un aumento considerable de la sensibilidad de la pata trasera en las dos pruebas de comportamiento en los días posteriores a la lesión, lo que indica el desarrollo de una mononeuropatía periférica. La pata trasera derecha no mostró aumento de la sensibilidad después de la intervención quirúrgica. En cada fase del estudio, se consideró que todos los animales dosificados presentaban neuropatía en la pata trasera izquierda según la evaluación con las pruebas de comportamiento establecidas el día anterior a la dosificación.

Efectos de R-DHE sobre las respuestas de las pruebas de comportamiento (fase 1)

Alodinia mecánica: en la fase 1, la administración intravenosa de R-DHE a 0,1 y 0,3 $\mu\text{g/kg}$ no produjo cambios significativos en los umbrales de retirada de la pata izquierda o derecha con los filamentos de Von Frey. Sin embargo, la administración intravenosa de R-DHE a 0,5 $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento significativo del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 5 min después de la dosis ($21,97 \pm 2,30$ g; $P \leq 0,01$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del grupo de vehículo de $5,43 \pm 2,58$ g, y también aproximadamente 25 min después de la dosis ($13,12 \pm 3,41$ g; $P < 0,05$; ANOVA y prueba de la t de Dunnett) en comparación con los valores del grupo de vehículo de $2,25 \pm 0,75$ g (tabla 17, figura 18).

Hiperalgesia térmica: La administración intravenosa de R-DHE no consiguió tener un efecto significativo sobre las latencias de retirada de la pata izquierda en comparación con el vehículo. La administración intravenosa de R-DHE a una dosis de 0,3 $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la pata derecha aproximadamente 35 min después de la dosis ($14,5 \pm 0,7$ s; $P < 0,05$; ANOVA y prueba de la t de Dunnett) en comparación con los valores del vehículo ($10,3 \pm 0,9$ s); sin embargo, esto es fisiológicamente irrelevante, ya que el umbral de retirada de la pata derecha fue similar a los valores previos a la dosis para la pata derecha ($14,3 \pm 0,6$ s) (tabla 18, figura 19).

Efectos de S-DHE sobre las respuestas de las pruebas de comportamiento (fase 2)

Alodinia mecánica: en la fase 2, la administración intravenosa de S-DHE a 3 y 10 µg/kg no produjo cambios significativos en los umbrales de retirada de la pata izquierda o derecha con los filamentos de Von Frey. Sin embargo, la administración intravenosa de S-DHE a 30 µg/kg provocó un aumento significativo del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 5 min después de la dosis ($24,56 \pm 0,33$ g; $P \leq 0,001$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del grupo de vehículo de $6,11 \pm 2,39$ g, y también aproximadamente 25 min después de la dosis ($21,92 \pm 1,70$ g; $P < 0,001$; prueba de Kruskal Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del grupo de vehículo de $1,66 \pm 0,47$ g (tabla 19, figura 20).

Hiperalgesia térmica: la administración intravenosa de S-DHE no consiguió tener un efecto significativo sobre las latencias de retirada de las patas izquierda y derecha a dosis de 3 y 10 µg/kg en comparación con los valores del grupo de vehículo. La administración intravenosa de S-DHE a una dosis de 30 µg/kg, sin embargo, sí produjo un aumento significativo de las latencias de retirada de la pata aproximadamente 15 min después de la dosis tanto en la pata trasera izquierda ($17,6 \pm 0,4$ s; $P < 0,01$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) como derecha ($17,5 \pm 0,4$ s; $P < 0,01$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores de vehículo de $10,3 \pm 0,8$ s y $13,4 \pm 0,8$ s, respectivamente. EL aumento de la latencia de la pata derecha puede ser indicativo de los efectos centrales de la dihidroetorfina (isómero S) a la concentración de dosis de 30 µg/kg (tabla 20, figura 21).

Efectos de la morfina sobre las respuestas de las pruebas de comportamiento (fases 1 y 3)

En la fase 1, se comparó la referencia de morfina con el vehículo, ya que ambos se administraron por vía oral. En la fase 3, se comparó la referencia de morfina con la situación antes de la dosis, ya que no era pertinente compararla con un vehículo oral.

Alodinia mecánica: tras la administración intravenosa de morfina a 5 mg/kg (fase 1), el umbral de retirada de la pata trasera izquierda aumento significativamente aproximadamente 25 min después de la dosis ($19,23 \pm 2,73$ g; $P < 0,001$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral) y aproximadamente 50 min después de la dosis ($21,55 \pm 2,40$ g; $P < 0,001$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral) en comparación con los valores del vehículo de $2,25 \pm 0,75$ y $2,11 \pm 0,82$ g. Se observó una disminución significativa en los datos de la pata derecha antes de la dosis ($16,37 \pm 2,20$ g; $P < 0,05$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral) en comparación con los valores del vehículo ($22,26 \pm 1,52$ g). Esto no se pudo evitar, ya que la asignación a los grupos de tratamiento se basó en los valores previos a la dosis de la prueba de hiperalgesia térmica (tabla 17, figura 18). No se observaron otros efectos significativos en la pata trasera derecha.

En la fase 3, la administración intravenosa de morfina (5 mg/kg) aumentó significativamente los umbrales de retirada de la pata izquierda aproximadamente 60 min ($21,32 \pm 2,56$ g; $P < 0,001$; prueba de la t de Student pareada bilateral), 120 min ($11,08 \pm 2,85$ g; $P < 0,01$; prueba de la t de Student pareada bilateral) y aproximadamente 180 min después de la dosis ($3,68 \pm 0,97$ g; $P < 0,05$; prueba de la t de Student pareada bilateral) en comparación con los valores previos a la dosis $1,46 \pm 0,37$ g (tabla 21, figura 22).

Hiperalgesia térmica: en la fase 1, la administración intravenosa de morfina a 5 mg/kg provocó un aumento significativo de las latencias de retirada de la pata izquierda en todos los puntos temporales probados y en la pata derecha aproximadamente 15, 35 y 60 min después de la dosis. Aproximadamente 15 min después de la dosis; (izquierda; $12,0 \pm 1,5$ s; $P < 0,05$; prueba de la U de Mann-Whitney), (derecha; $17,5 \pm 0,5$ s; $P < 0,001$; prueba de la U de Mann-Whitney), 35 min después de la dosis (izquierda; $16,4 \pm 0,9$ s; $P < 0,001$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral), (derecha; $16,8 \pm 0,7$ s; $P < 0,001$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral) y aproximadamente 60 min después de la dosis en ambas patas (izquierda; $12,8 \pm 1,3$ s; $P < 0,01$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral), (derecha; $16,3 \pm 1,1$ s; $P < 0,05$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral) y aproximadamente 130 min después de la dosis en la pata izquierda ($10,6 \pm 0,9$ s; $P < 0,05$; prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral) en comparación con los valores del vehículo ($7,5 \pm 0,5$, $12,8 \pm 1,1$, $7,0 \pm 1,2$, $10,3 \pm 0,9$, $7,6 \pm 0,9$, $12,4 \pm 1,4$ y $7,4 \pm 0,9$ s, respectivamente) (tabla 18, figura 19).

En la fase 3 del estudio, la administración intravenosa de morfina provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la pata izquierda aproximadamente 70 min después de la dosis ($11,8 \pm 1,2$ s; $P < 0,01$; prueba de la t de Student pareada bilateral), aproximadamente 190 min después de la dosis ($8,0 \pm 0,8$ s; $P < 0,05$; prueba de la t de Student pareada bilateral) y aproximadamente 250 min después de la dosis ($10,6 \pm 1,4$ s; $P < 0,05$; prueba de la t de Student pareada bilateral) en comparación con los valores previos a la dosis $6,0 \pm 0,5$ s (tabla 22, figura 23).

Efectos de la pregabalina sobre las respuestas de las pruebas de comportamiento (fases 2 y 3)

La pregabalina se comparó con los valores previos a la dosis en la fase 2, pero se comparó con el vehículo en la fase 3 del estudio. En la fase 2 del estudio, se administró la pregabalina por una vía diferente (oral) a la del vehículo (iv), por lo que la comparación con el vehículo no era apropiada. En la fase 3 del estudio, se comparó la respuesta a la dosis con pregabalina usando 3 concentraciones de dosis con el vehículo, en lugar de los valores previos a la dosis.

Alodinia mecánica: en la fase 2, la administración oral de pregabalina (30 mg/kg) provocó un aumento significativo del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 50 min después de la dosis ($10,35 \pm 2,51$ g; $P < 0,001$; prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral) y aproximadamente 120 min después de la dosis ($13,90 \pm 3,00$ g; $P < 0,001$; prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral) en comparación con los valores anteriores a la dosis de $1,09 \pm 0,35$ g (tabla 19, figura 20).

En la fase 3, la pregabalina administrada por vía oral a una dosis de 30 mg/kg provocó un aumento significativo del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 120 min después de la dosis ($17,06 \pm 2,88$ g; $P < 0,01$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) y aproximadamente 180 min después de la dosis ($13,86 \pm 3,21$ g; $P < 0,01$; ANOVA y prueba de Dunnett) en comparación con los valores del vehículo de $5,00 \pm 2,34$ g y $2,57 \pm 0,92$ g, respectivamente. La administración oral de pregabalina a una dosis de 50 mg/kg provocó un aumento significativo de los umbrales de retirada de ambas patas, izquierda y derecha, aproximadamente 180 min después de la dosis (pata izquierda: $15,20 \pm 3,31$ g; $P < 0,01$; ANOVA y prueba de Dunnett y pata derecha: $24,20 \pm 0,39$ g; $P < 0,05$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del vehículo de $2,57 \pm 0,92$ g y $16,57 \pm 1,75$ g, respectivamente, y del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 240 min después de la dosis ($12,05 \pm 3,41$ g; $P < 0,05$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del vehículo ($1,48 \pm 0,30$ g). La administración oral de pregabalina a una dosis de 100 mg/kg provocó un aumento significativo del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 120 min después de la dosis ($23,29 \pm 1,19$ g; $P < 0,01$; ANOVA y prueba de Dunnett), de las patas izquierda y derecha aproximadamente 180 min después de la dosis (pata izquierda: $19,77 \pm 2,70$ g; $P < 0,01$; ANOVA y prueba de Dunnett y pata derecha: $23,70 \pm 1,04$ g; $P < 0,01$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del vehículo de $2,57 \pm 0,92$ g y $16,57 \pm 1,75$ g, respectivamente, y del umbral de retirada de la pata izquierda aproximadamente 240 min después de la dosis ($15,91 \pm 2,86$ g; $P < 0,001$; prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn) en comparación con los valores del vehículo ($1,48 \pm 0,30$ g). El aumento de los umbrales de retirada de la pata derecha tras la administración de pregabalina a 50 y 100 mg/kg, fue indicativo de los efectos centrales de la pregabalina a estas concentraciones de dosis. Esto concuerda con el hecho de que los animales presentaban un aumento dependiente de la dosis del grado de los síntomas clínicos de sedación. (Tabla 21, figura 22).

Hiperalgnesia térmica: En la fase 2, la administración oral de pregabalina (30 mg/kg) provocó un aumento significativo de la latencia de retirada de la pata izquierda aproximadamente 15, 35, 60 y 130 min después de la dosis ($8,3 \pm 0,7$ s $P < 0,05$; $8,6 \pm 1,0$ s $P < 0,05$; $8,8 \pm 1,0$ s $P < 0,05$; $9,6 \pm 0,8$ s $P < 0,001$; en todos, prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral) en comparación con el valor previo a la dosis de $6,2 \pm 0,5$ s. Estos aumentos significativos no se consideraron farmacológicamente relevantes, ya que se observaron aumentos similares en los valores de las latencias de retirada en el grupo de control con vehículo (administración iv) en la fase 2 (aproximadamente 15, 35, 60 y 130 min después de la dosis ($10,3 \pm 0,8$ s $P < 0,01$; $8,1 \pm 0,5$ s $P < 0,05$; $9,3 \pm 0,7$ s $P < 0,001$; $9,8 \pm 1,0$ s $P < 0,01$; para todos, prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral) en comparación con el valor previo a la dosis de $6,2 \pm 0,5$ s); y en la fase 3 del estudio, la administración oral de pregabalina no consiguió tener un efecto significativo en las latencias de retirada de las patas izquierda y derecha a ninguna de las dosis probadas (30, 50 y 100 mg/kg) ni en ninguno de los puntos temporales posteriores a la dosis (60, 120, 180 y 240 min), en comparación con el control de vehículo (tabla 20, figura 21 y tabla 22, figura 23).

CONCLUSIÓN

Se indujo una mononeuropatía periférica en el miembro trasero izquierdo de las ratas por ligadura estrecha de los nervios espinales L5 y L6. Se realizó un seguimiento del desarrollo de la alodinia mecánica y la hiperalgnesia térmica con pruebas de comportamiento establecidas (prueba de Von Frey y prueba planta de Hargreaves, respectivamente). Se evaluaron la latencia y el umbral de respuesta de las patas traseras tanto izquierda (afectada) como derecha (no afectada). En cada fase del estudio, se consideró que todos los animales dosificados presentaban neuropatía en la pata trasera izquierda según la evaluación con las pruebas de comportamiento establecidas el día anterior a la dosificación.

La administración intravenosa de R-DHE a $0,5$ $\mu\text{g/kg}$ provocó un aumento del umbral de retirada (alodinia mecánica) hasta 25 min después de la dosis, con efectos máximos aproximadamente 5 min después de la dosis. No se observaron efecto de R-DHE a $0,5$ $\mu\text{g/kg}$ sobre la latencia de retirada (hiperalgnesia térmica) en ninguno de los puntos temporales probados. Tampoco se observaron efectos sobre la alodinia mecánica o la hiperalgnesia térmica a la dosis inferiores de $0,1$ y $0,3$ $\mu\text{g/kg}$ de R-DHE.

La administración intravenosa de S-DHE a una dosis de 30 $\mu\text{g/kg}$ provocó efectos analgésicos significativos tanto en el umbral de retirada (alodinia mecánica), con efectos máximos aproximadamente de 5 a 25 min después de la dosis, como en la latencia de retirada (hiperalgnesia térmica), con un efecto máximo aproximadamente 15 min después de la dosis. No se observaron efectos sobre la alodinia mecánica o la hiperalgnesia térmica a 3 y 10 $\mu\text{g/kg}$ de S-DHE.

La administración intravenosa de los compuestos opioideos, R-DHE y S-DHE, mostró actividad analgésica tanto en la prueba de alodinia mecánica como en la de hiperalgnesia térmica en ratas. Esto subraya el potencial terapéutico de estos compuestos en el tratamiento del dolor neuropático.

Después de la administración de pregabalina (en la fase 3) a dosis de hasta 100 mg/kg, se observó un aumento dependiente de la dosis del umbral de retirada, con efectos máximos entre aproximadamente 180 y 240 min después de la dosis. No se observaron efectos de la pregabalina en la prueba de la hiperalgesia térmica. Los efectos observados después de la administración de la pregabalina concuerdan con su actividad farmacológica conocida (en base a los datos de la literatura), con efectos significativos sobre la alodinia mecánica, pero con un efecto limitado sobre la hiperalgesia térmica.

5

10

Los efectos observados después de la administración intravenosa de morfina concuerdan con su actividad farmacológica conocida, con efectos significativos sobre la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica. Por lo tanto, este sistema de prueba permitió detectar efectos nociceptores tanto en la prueba de la alodinia mecánica como en la de la hiperalgesia térmica en ratas.

Tabla 17. efectos de R-DHE intravenosa sobre los umbrales de retirada de la pata izquierda (I) y derecha (D) por estimulación con monofilamentos de Von Frey en ratas

(Fase 1) (a) Datos en bruto												
Umbral de retirada (g) en tiempo (min) después de la dosis												
Tratamiento	Antes de la dosis		Fase 1									
			5		25		50		120			
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo ^a 5 ml/kg, i.v.	0,95 ± 0,09 (9)	22,26 ± 1,52 (9)	5,43 ± 2,58 (9)	22,26 ± 1,52 (9)	2,25 ± 0,75 (9)	23,25 ± 1,16 (9)	2,11 ± 0,82 (9)	22,26 ± 1,52 (9)	1,09 ± 0,23 (9)	23,25 ± 1,16 (9)		
Dihidroetorfina (R) 0,1 µg/kg, i.v.	1,37 ± 0,31	21,07 ± 1,99	53,5 ± 0,79	23,30 ± 1,00	6,55 ± 3,04	19,81 ± 1,97	135 ± 0,32	1811 ± 252	1,07 ± 0,16	18,05 ± 1,94		
Dihidroetorfina (R) 0,3 µg/kg, i.v.	1,27 ± 0,33	17,45 ± 2,01	11,13 ± 3,54	22,20 ± 1,30	2,41 ± 0,59	22,37 ± 1,36	1,14 ± 0,31	1855 ± 225	0,95 ± 0,10	18,25 ± 1,54		
Dihidroetorfina (R) 0,5 µg/kg, i.v.	1,05 ± 0,18	16,32 ± 1,99	21,97 ± 2,30	24,36 ± 0,34	13,12 ± 3,41	24,36 ± 0,34	6,17 ± 2,33	21,84 ± 1,77	1,80 ± 0,88	20,41 ± 1,63		
Morfina 5 mg/kg, i.v.	1,69 ± 0,53	16,37 ± 2,20	13,38 ± 3,14	23,50 ± 1,02	19,23 ± 2,73	23,50 ± 1,02	21,55 ± 2,40	2456 ± 0,33	9,37 ± 3,60	2346 ± 106		
Los datos se expresan como la media ± EEM.												
n = 10 animales por grupo, a menos que se indique entre paréntesis.												
El análisis estadístico se realizó únicamente en datos log.												
^a Vehículo = tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para inyectables, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:gm:ml)).												
(b) Datos log												
Umbral de retirada (Log 10 (fuerza (g) x 10.000)) en tiempo (min) después de la dosis												
Tratamiento	Antes de la dosis		Fase 1									
			5		25		50		120			
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo ^a 5 ml/kg, i.v.	3,96 ± 0,04 (9)	5,34 ± 0,03 (9)	4,48 ± 0,16 (9) ^s	5,34 ± 0,03 (9)	4,21 ± 0,12 (9)	5,36 ± 0,03 (9)	4,12 ± 0,14 (9)	5,34 ± 0,03 (9)	3,96 ± 0,08 (9)	5,36 ± 0,03 (9)		
Dihidroetorfina (R) 0,1 µg/kg, i.v.	4,06 ± 0,08	530 ± 0,05	4,55 ± 0,10	5,36 ± 0,02	4,42 ± 0,19	527 ± 0,05	4,05 ± 0,08	5,21 ± 0,07	3,99 ± 0,06	5,23 ± 0,05		
Dihidroetorfina (R) 0,3 µg/kg, i.v.	401 ± 0,09	521 ± 0,05	471 ± 0,20	534 ± 0,03	426 ± 0,10	534 ± 0,03	3,97 ± 0,08	5,23 ± 0,06	3,95 ± 0,05	5,25 ± 0,04		

(continuación)

(b) Datos log												
Umbral de retirada (Log 10 (fuerza (g) x 10.000)) en tiempo (min) después de la dosis												
Tratamiento	Antes de la dosis		Fase 1									
			5			25			50			120
	I	D	I	D	I	I	D	I	I	D	I	D
Dihidroetorfina (R) 0,5 µg/kg, i.v.	396 ±007	5,18 ± 0,05	5,26 ± 10,12 ^{##}	5,39 ± 0,01	4,89 ± 0,17 [†]	539 ±001	4,50 ± 0,17	5,32 ± 0,05	4,03 ± 0,12	5,30 ± 0,03		
Morfina 5 mg/kg, i.v.	4,08 ± 0,11	5,17 ± 0,06	4,93 ± 0,16	5,37 ±002	5,20 ± 0,11 ^{***}	537 ±002	526 ± 0,11 ^{***}	5,39 ± 0,00	4,49 ± 0,23	5,36 ± 0,02		
Los datos se expresan como la media ± EEM. n = 10 animales por grupo, a menos que se indique entre paréntesis. [†]Vehículo = tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para inyectables, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:g:ml)). *P <0,05 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral). ***P <0,001 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral). ^{##}P <0,01 en comparación con los datos de grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn). [†]<0,05 en comparación con los datos del grupo de vehículo (ANOVA y prueba de Dunnett). ^{\$}<0,05 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).												

Tabla 18: efectos de R-DHE intravenosa sobre la latencia de retirada de la pata izquierda (I) y derecha (D) por estimulación térmica plantar en ratas (fase 1)

	Latencia de retirada (s) en tiempo (min) después de la dosis									
	Predosis		Fase 1							
			15		35		60		130	
Tratamiento	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo [†] 5 ml/kg, i.v.	6,4 ± 0,5 (9)	13,9 ± 1,2 (9)	7,5 ± 0,5 (9)	12,8 ± 1,1 (9)	7,0 ± 1,2 (9)	10,3 ± 0,9 (9)	7,6 ± 0,9 (9)	12,4 ± 1,4 (9)	7,4 ± 0,9 (9)	14,1 ± 1,3 (9)
Dihidroetorfina (R) 0,1 µg/kg, i.v.	6,4 ± 0,5	13,5 ± 1,0	6,9 ± 1,0	13,2 ± 1,0	7,4 ± 0,5	12,6 ± 1,1	7,7 ± 1,0	12,9 ± 1,2	8,1 ± 0,6	14,3 ± 0,8
Dihidroetorfina (R) 0,3 µg/kg, i.v.	6,3 ± 0,6	14,3 ± 0,6	9,4 ± 0,8	15,1 ± 0,9	9,9 ± 1,1	14,5 ± 0,7 [‡]	8,3 ± 0,8	14,6 ± 0,9	7,7 ± 0,8	14,2 ± 0,9
Dihidroetorfina (R) 0,5 µg/kg, i.v.	6,4 ± 0,4	14,1 ± 0,9	9,6 ± 1,2	15,9 ± 1,2	9,2 ± 1,2	13,1 ± 1,2	8,4 ± 0,6	13,3 ± 1,2	8,0 ± 1,1	10,9 ± 1,0
Morfina 5 mg/kg, i.v.	6,4 ± 0,4	15,4 ± 1,0	12,0 ± 1,5 [§]	17,5 ± 0,5 ^{\$\$\$}	16,4 ± 0,9	16,8 ± 0,7	12,8 ± 1,3	16,3 ± 1,1	10,6 ± 0,9	13,8 ± 1,1

Los datos se expresan como la media ± EEM.

n = 10 animales por grupo, a menos que se indique entre paréntesis.

[†]Vehículo = tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para inyectables, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:ml)).

[§]P <0,05 en comparación con los datos de grupo de vehículo (prueba de la U de Mann-Whitney).

^{\$\$\$}P <0,001 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la U de Mann-Whitney).

*P <0,05 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral).

**P <0,01 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral).

***P <0,001 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral).

[#]P <0,05 en comparación con los datos del grupo de vehículo (ANOVA y prueba de Dunnett).

Tabla 19: efectos de S-DHE intravenosa sobre los umbrales de retirada de la pata izquierda (I) y derecha (D) por estimulación con monofilamentos de Von Frey en ratas

2) (a) Datos en bruto													
Umbral de retirada (g) en tiempo (min) después de la dosis													
		Fase 2											
		Antes de la dosis				5		25		50		120	
Tratamiento		I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo [†] 5 ml/kg, i.v.		1,37 ± 0,31	21,03 ± 1,84	6,11 ± 2,39	23,46 ± 1,06	1,66 ± 0,47	21,67 ± 1,61	1,11 ± 0,15	20,94 ± 1,90	1,35 ± 0,28	19,55 ± 1,69		
Dihidroetorfina (S) 3 µg/kg, i.v.		094 ±011	17,27 ± 2,12	8,69 ± 2,98	2110 ±146	828 ±248	1,915 ±155	0,99 ± 0,12	21,27 ± 1,53	119 ±020	19,84 ± 1,94		
Dihidroetorfina (S) 10 µg/kg, i.v.		1,19 ± 0,31	20,94 ± 1,90	12,15 ± 2,99	23,46 ± 1,06	309 ±135	22,57 ± 1,39	1,48 ± 0,42	23,46 ± 1,06	083 ±010	21,51 ± 1,55		
Dihidroetorfina (S) 30 µg/kg, i.v.		084 ±010	18,78 ± 1,89	2456 ±033	24,56 ± 0,33	21,92 ± 1,70	2456 ±033	7,34 ± 2,47	23,67 ± 1,07	1,20 ± 0,34	20,83 ± 1,99		
Pregabalina 30 mg/kg, vía oral		1,09 ± 0,35	19,63 ± 2,21	283 ± 0,62	2042 ±214	3,27 ± 0,97	19,39 ± 1,61	1035 ±251	2134 ±149	13,90 ± 3,00	23,26 ± 1,04		
Los datos se expresan como la media ± EEM. n = 10 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó únicamente en datos log. [†] Vehículo = tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para inyectables, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:g:ml)).													
(b) Datos log													
Umbral de retirada (Log 10 (fuerza (g) x 10.000)) en tiempo (min) después de la dosis													
		Fase 2											
		Antes de la dosis				5		25		50		120	
Tratamiento		I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo [†] 5 ml/kg, i.v.		407 ±007	5,30 ± 0,05	4,50 ±0,16\$	536 ±002	4,11 ± 0,10	532 ±004	4,01 ± 0,06	5,30 ± 0,05	4,08 ± 0,06	5,28 ± 0,04		
Dihidroetorfina (S) 3 µg/kg, i.v.		395 ±005	5,20 ± 0,06	4,60 ± 0,20	5,31 ± 0,03	469 ±017	5,27 ± 0,04	3,96 ± 0,06	5,32 ± 0,03	4,02 ± 0,07	5,27 ± 0,05		
Dihidroetorfina (S) 10 µg/kg, i.v.		3,99 ± 0,08	5,30 ± 0,05	4,90 ± 0,16	5,36 ± 0,02	4,26 ± 0,13	5,34 ± 0,03	405 ±010	5,36 ± 0,02	3,89 ± 0,05	5,32 ± 0,03		

(continuación)

(b) Datos log		Umbral de retirada (Log 10 (fuerza (g) x 10.000)) en tiempo (min) después de la dosis						
		Fase 2						
		Antes de la dosis		5		25	50	120
Dihidroetorfina (S) 30 µg/kg, i.v.		3,90 ± 0,05	5,25 ± 0,05	5,39 ± 0,00 ^{###}	5,39 ± 0,00	5,32 ± 0,04 ^{###}	5,39 ± 0,00	5,37 ± 0,02
Pregabalina 30 mg/kg, vía oral		3,92 ± 0,09	5,24 ± 0,06	4,31 ± 0,13	5,28 ± 0,06	4,35 ± 0,13	5,27 ± 0,04	5,32 ± 0,03
								503 ± 0,11 ^{***}
								5,29 ± 0,05
								5,36 ± 0,02

Los datos se expresan como la media ± EEM.
n = 10 animales por grupo.
^tVehículo = tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para inyectables, en proporción 0,03:0,10:0,86:99,01 (g:g:ml)).
P <0,001 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).
^{###}P <0,001 en comparación con los datos de grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).
^{\$}P <0,05 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).

Tabla 20: efectos de S-DHE intravenosa sobre la latencia de retirada de la pata izquierda (I) y derecha (D) por estimulación térmica plantar en ratas (fase 2)

Tratamiento	Latencia de retirada (s) en tiempo (min) después de la dosis									
	Antes de la dosis		Fase 2							
			15		35		60		130	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo [†] 5 ml/kg, i.v.	6,2 ± 0,5	148 ± 0,6	10,3 ± 0,88 ^{\$\$}	13,4 ± 0,8	8,1 ± 0,5 ^{\$}	11,7 ± 0,7 ^{\$}	9,3 ± 0,7 ^{\$\$\$}	12,1 ± 0,6 ^{\$}	9,8 ± 1,0 ^{\$\$}	13,1 ± 1,0
Dihidroetorfina (S) 3 µg/kg, i.v.	6,2 ± 0,6	12,6 ± 0,7	9,8 ± 0,9	15,0 ± 0,7	10,0 ± 0,7	12,1 ± 0,9	9,1 ± 0,9	13,5 ± 0,8	10,4 ± 1,3	14,3 ± 0,8
Dihidroetorfina (S) 10 µg/kg, i.v.	6,2 ± 0,6	13,8 ± 0,8	10,4 ± 1,3	14,3 ± 0,9	10,8 ± 1,1	12,5 ± 0,9	11,3 ± 1,1	12,7 ± 0,6	11,3 ± 1,6	13,0 ± 0,8
Dihidroetorfina (S) 30 µg/kg, i.v.	6,2 ± 0,5	13,5 ± 0,9	17,6 ± 0,4 ^{##}	17,5 ± 0,4 ^{##}	10,1 ± 1,4	11,8 ± 1,1	8,3 ± 1,0	14,3 ± 1,1	8,7 ± 0,9	14,2 ± 1,3
Pregabalina 30 µg/kg, vía oral	6,2 ± 0,5	13,4 ± 0,9	8,3 ± 0,7	13,4 ± 0,6	8,6 ± 1,0	11,9 ± 0,8	8,8 ± 1,0	12,9 ± 0,6	9,6 ± 0,8	13,4 ± 0,9

Los datos se expresan como la media ± EEM.
n = 10 animales por grupo.
[†]Vehículo = tampón citrato (ácido cítrico monohidratado:citrato de sodio:cloruro de sodio:agua para inyectables, en proporción 0,03:0,10:0,86:99:01 (g:g:g:ml)).
^{##}P <0,01 en comparación con los datos de grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).
^{*}P <0,05 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).
^{***}P <0,001 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).
^{\$}P <0,05, ^{\$\$}P <0,01 y ^{\$\$\$}P <0,001 con comparación con el vehículo (prueba de la t de Student pareada bilateral).

Tabla 21: efectos de la pregabalina oral y la morfina intravenosa sobre los umbrales de retirada de la pata izquierda (I) y derecha (D) por estimulación con monofilamentos de Von Frey en ratas neuropáticas

(Fase 3) (a) Datos en bruto										
Tratamiento	Umbral de retirada (g) en tiempo (min) después de la dosis									
	Antes de la dosis		Fase 3							
			60		120		180		240	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo [†] 10 ml/kg, vía oral	1,87 ± 0,38	22,53 ± 1,97	4,95 ± 0,95	20,30 ± 1,99	5,00 ± 2,34	18,36 ± 2,34	2,57 ± 0,92	16,57 ± 1,75	1,48 ± 0,30	20,54 ± 1,93
Pregabalina 30 mg/kg, vía oral	2,59 ± 0,63	23,25 ± 1,41	10,53 ± 3,25	23,26 ± 1,04	17,06 ± 2,88	23,02 ± 1,01	13,86 ± 3,21	22,74 ± 0,97	802 ± 2,65	23,99 ± 0,38
Pregabalina 50 mg/kg, vía oral	2,02 ± 0,35	20,61 ± 2,00	18,48 ± 3,27	22,57 ± 1,39	13,69 ± 3,68	21,67 ± 1,61	15,20 ± 3,31	24,20 ± 0,39	12,05 ± 3,41	22,74 ± 0,97

(continuación)

(Fase 3) (a) Datos en bruto										
	Umbral de retirada (g) en tiempo (min) después de la dosis									
	Antes de la dosis		Fase 3							
			60		120		180		240	
Pregabalina 100 mg/kg, vía oral	1,31 ± 0,18	21,67 ± 1,93	15,53 ± 2,78	22,24 ± 182	23,29 ± 1,19	24,28 ± 0,37	19,77 ± 2,70	2370 ± 1,04	15,91 ± 2,86	23,18 ± 1,00
Morfina 5 mg/kg, i.v.	1,46 ± 0,37 (9)	21,26 ± 2,11 (9)	21,32 ± 2,56 (9)	24,02 ± 0,34 (9)	11,08 ± 2,85 (9)	20,04 ± 1,81 (9)	3,68 ± 0,97 (9)	19,57 ± 1,75 (9)	129 ± 0,20 (9)	18,71 ± 1,81 (9)
Los datos se expresan como la media ± EEM. n = 10 animales por grupo, a menos que se indique entre paréntesis. El análisis estadístico se realizó únicamente en datos log. †Vehículo = carboximetilcelulosa al 1 %.										
(b) Datos log										
	Umbral de retirada (Log 10 (fuerza (g) x 10.000)) en tiempo (min) después de la dosis									
	Antes de la dosis		Fase 3							
			60		120		180		240	
Tratamiento	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo[†] 10 ml/kg, vía oral	4,20 ± 0,08	5,33 ± 0,05	4,57 ± 0,13 ^{§§}	5,28 ± 0,05	4,43 ± 0,15	5,22 ± 0,07	4,23 ± 0,12	5,20 ± 0,05	4,11 ± 0,07	5,29 ± 0,05
Pregabalina 30 mg/kg, vía oral	4,29 ± 0,11	5,35 ± 0,03	4,70 ± 0,20	5,36 ± 0,02	5,1 ± 0,11 ^{##}	5,36 ± 0,02	4,95 ± 0,16 ^{**}	5,35 ± 0,02	4,68 ± 0,16	5,38 ± 0,01
Pregabalina 50 mg/kg, vía oral	4,25 ± 0,07	5,29 ± 0,05	5,10 ± 0,16	5,34 ± 0,03	4,85 ± 0,19	5,32 ± 0,04 5,32 ± 0,04	5,00 ± 0,15	5,38 ± 0,01 [#]	4,83 ± 0,18 [#]	5,35 ± 0,02
Pregabalina 100 mg/kg, vía oral	4,07 ± 0,06	5,31 ± 0,05	5,08 ± 0,12	5,33 ± 0,05	5,36 ± 0,03 ^{**}	5,38 ± 0,01	5,23 ± 0,09 ^{**}	5,37 ± 0,02 ^{###}	5,11 ± 0,10 ^{###}	5,36 ± 0,02
Morfina 5 mg/kg, i.v.	4,08 ± 0,09 (9)	5,30 ± 0,05 (9)	5,22 ± 0,15 ⁺⁺⁺ (9)	5,38 ± 0,01 (9)	4,89 ± 0,14 ⁺⁺ (9)	5,29 ± 0,04 (9)	4,45 ± 0,11 + (9)	5,28 ± 0,04 (9)	4,07 ± 0,07 (9)	5,26 ± 0,04 (9)
Los datos se expresan como la media ± EEM. n = 10 animales por grupo, a menos que se indique entre paréntesis. †Vehículo = carboximetilcelulosa al 1 %. *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral). #P < 0,05, ##P < 0,01 y ###P < 0,001 en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn). **P < 0,01 en comparación con los datos del grupo de vehículo (ANOVA y prueba de Dunnett). §§P < 0,01 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).										

Tabla 22 Efectos de la pregabalina oral y la morfina intravenosa sobre la latencia de retirada de la pata izquierda (I) y derecha (D) por estimulación térmica plantar en ratas neuropáticas (fase 3)

Tratamiento	Latencia de retirada (s) en tiempo (min) después de la dosis									
	Antes de la dosis		Fase 3							
			70		130		190		250	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Vehículo[†] 10 ml/kg, vía oral	6,5 ± 0,5	12,4 ± 0,8	9,2 ± 1,0	12,2 ± 0,5	9,0 ± 1,0	10,7 ± 0,7	9,3 ± 1,2	12,2 ± 1,0	9,5 ± 0,8 ^{\$\$}	11,4 ± 0,6
Pregabalina 30 mg/kg, vía oral	6,5 ± 0,5	13,1 ± 0,6	9,9 ± 0,8	13,4 ± 1,0	9,3 ± 0,8	13,7 ± 10,9	8,3 ± 1,1	12,2 ± 0,4	10,9 ± 0,8	14,0 ± 0,8
Pregabalina 50 mg/kg, vía oral	6,5 ± 0,6	11,4 ± 0,8	10,6 ± 0,6	12,9 ± 0,9	9,7 ± 1,1	13,6 ± 1,1	11,2 ± 1,1	12,7 ± 0,5	9,0 ± 0,7	11,9 ± 0,7
Pregabalina 100 mg/kg, vía oral	6,6 ± 0,7	11,6 ± 0,5	11,5 ± 0,8	12,6 ± 0,9	9,9 ± 0,9	13,4 ± 1,3	7,6 ± 0,5	13,7 ± 0,7	9,7 ± 0,8	13,7 ± 1,1
Morfina 5 mg/kg, i.v.	6,0 ± 0,5 (9)	11,8 ± 0,6 (9)	11,8 ± 1,2 ⁺⁺ (9)	14,0 ± 1,2 (9)	7,3 ± 0,9 (9)	13,1 ± 1,0 (9)	8,0 ± 0,8 ⁺ (9)	14,3 ± 1,0 (9)	10,6 ± 1,4 ⁺ (9)	14,1 ± 0,9 (9)

Los datos se expresan como la media ± EEM.

n = 10 animales por grupo, a menos que se indique entre paréntesis

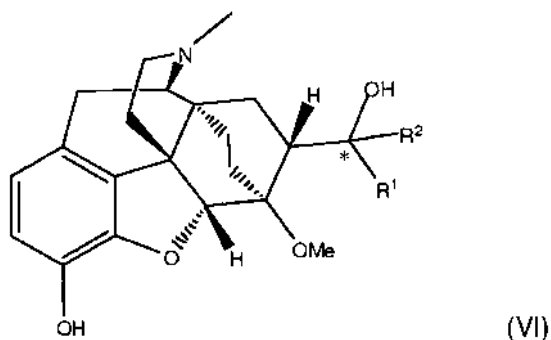
[†]Vehículo = carboximetilcelulosa al 1 %.

⁺P <0,05 y ⁺⁺P <0,01 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral).

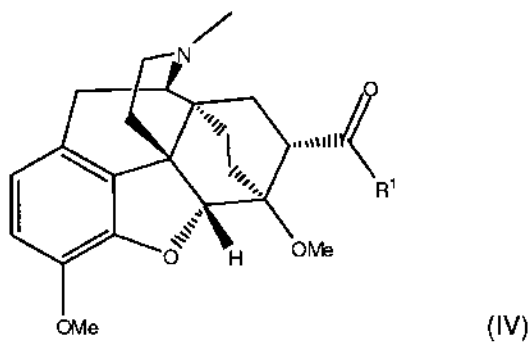
^{\$\$}P <0,01 en comparación con los datos anteriores a la dosis (prueba de la t de Student pareada bilateral)

REIVINDICACIONES

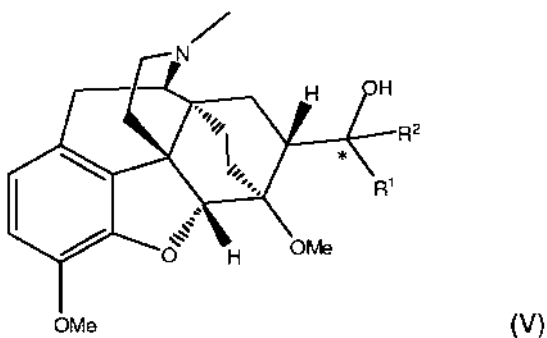
1. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (VI), o una sal del mismo,



5 en la que R^1 y R^2 son independientemente alquilo C_{1-8} de cadena lineal y * representa un estereocentro (S), que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV)

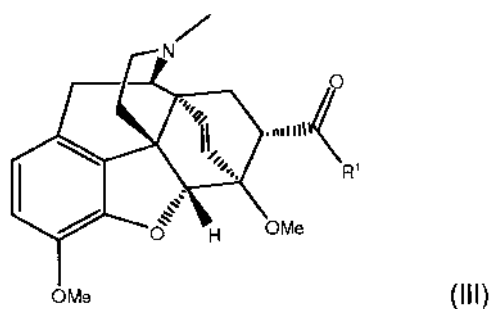


en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento, con un compuesto de fórmula $R^2M(X)p$, en la que R^2 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal, M es metal, X es haluro y p es 1 o 0, para producir un compuesto de fórmula (V)



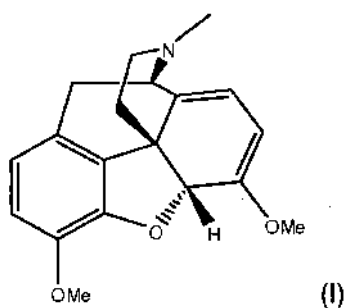
10 en la que R^1 , R^2 y * son como se han definido anteriormente en el presente documento, e hidrolizar dicho compuesto de fórmula (V), para dar un compuesto de fórmula (VI).

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (IV) se prepara por reducción de un compuesto de fórmula (III)



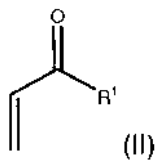
en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho compuesto de fórmula (III) se prepara por reacción de un compuesto de fórmula (I)



5

con un compuesto de fórmula (II)

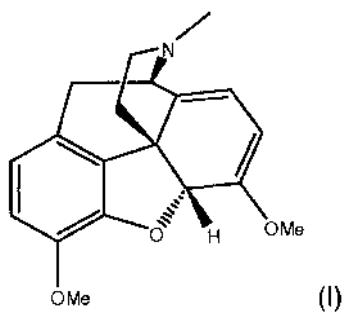


en la que R^1 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal.

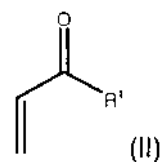
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

10

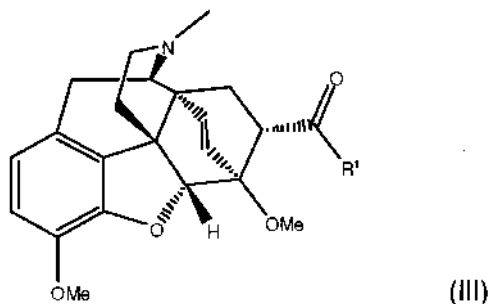
hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I)



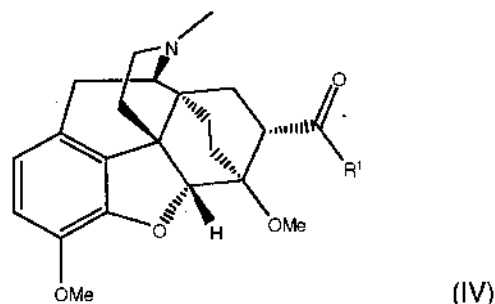
con un compuesto de fórmula (II)



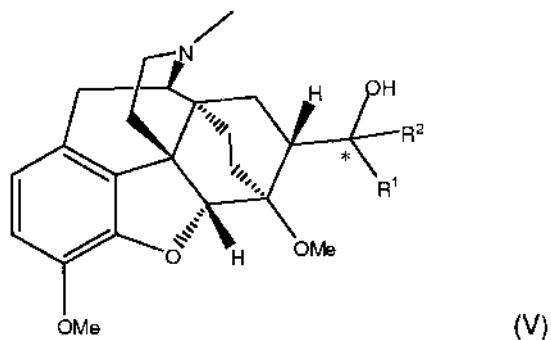
en la que R^1 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal, para dar un compuesto de fórmula (III)



en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento, reducir dicho compuesto de fórmula (III) para producir un compuesto de fórmula (IV).



5 en la que R^1 es como se ha definido anteriormente en el presente documento, hacer reaccionar dicho compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula $R^2M(X)_p$, en la que R^2 es alquilo C_{1-8} de cadena lineal, M es metal, X es haluro y p es 1 o 0, para dar un compuesto de fórmula (V)



10 en la que R^1 , R^2 y * son como se han definido anteriormente en el presente documento, e hidrolizar dicho compuesto de fórmula (V) para dar un compuesto de fórmula (VI).

5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que M es magnesio o litio.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que $R^2M(X)_p$ es R^2MgCl , R^2MgBr , R^2MgI o R^2Li .

15 7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de cristalizar dicho compuesto de fórmula (VI).

8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R^1 es alquilo C_{3-5} .

9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que R^1 es n-propilo.

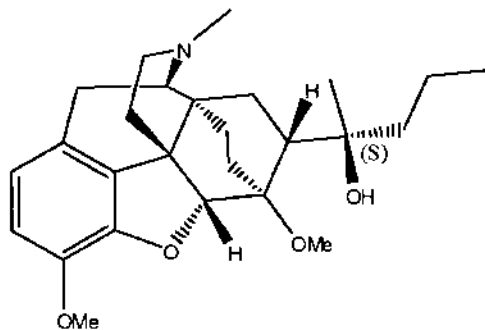
10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R^2 es alquilo C_{1-2} .

11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R^2 es metilo.

20 12. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el compuesto de

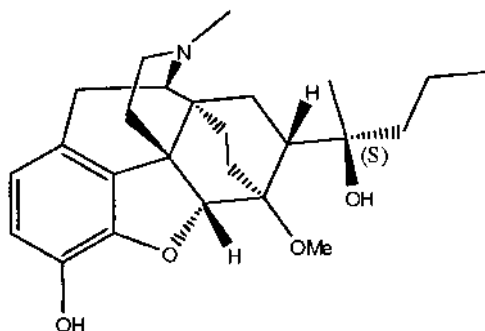
fórmula (V) se produce en un exceso diastereomérico de al menos el 90 %.

13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el compuesto de fórmula (V) es:



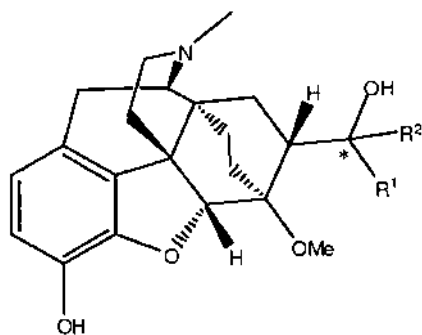
(V-a).

5 14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el compuesto de fórmula (VI) es:



(VI-a).

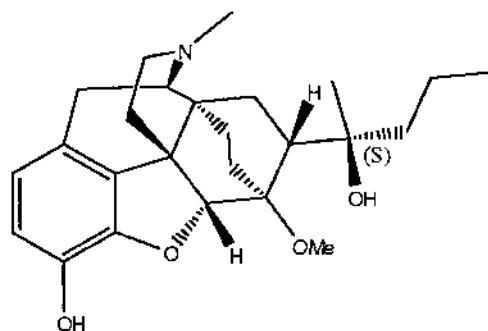
15. Un compuesto de fórmula (VI), o una sal del mismo,



(VI)

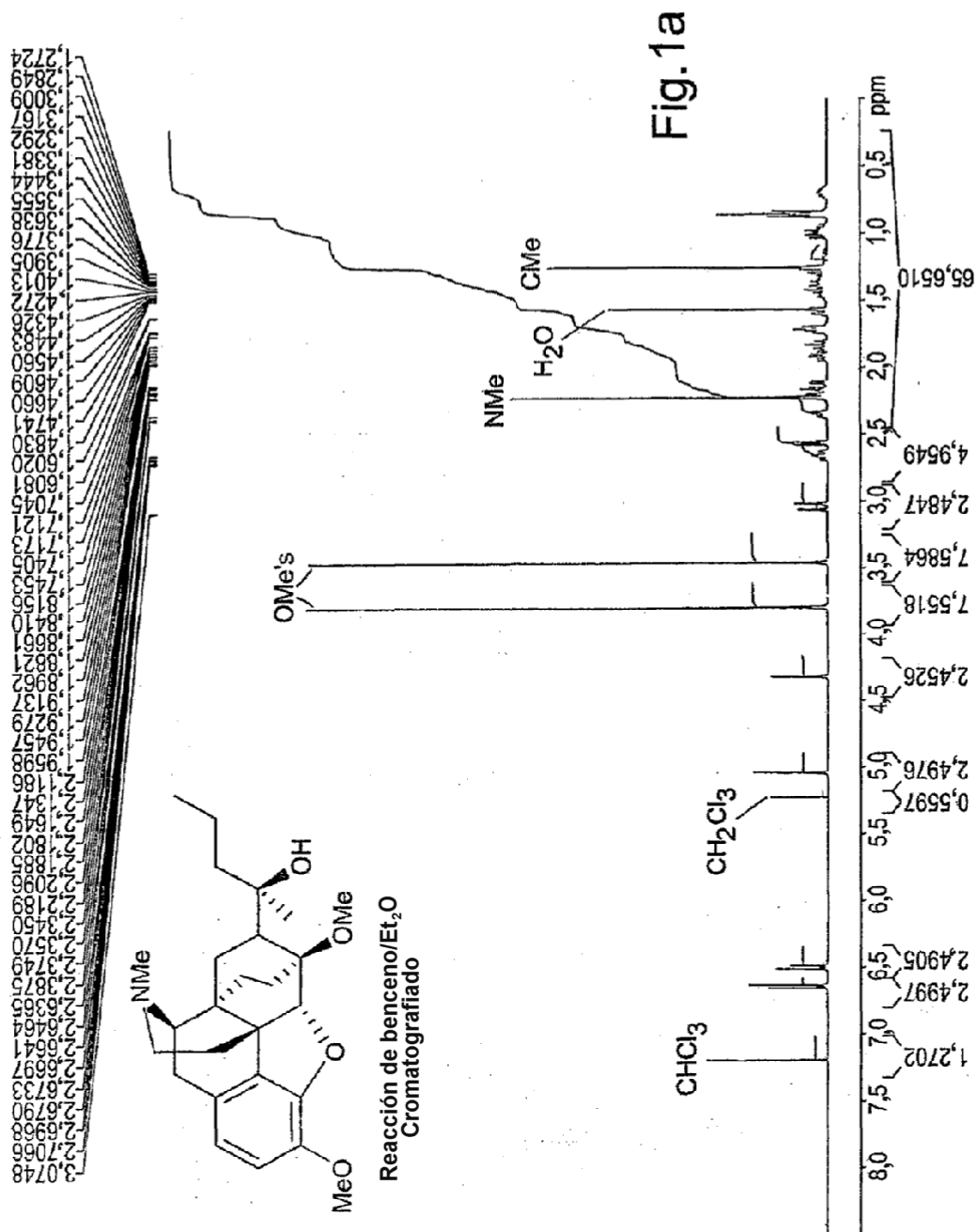
10 en la que R^1 y R^2 son independientemente alquilo C_{1-8} de cadena lineal y * representa un estereocentro (S).

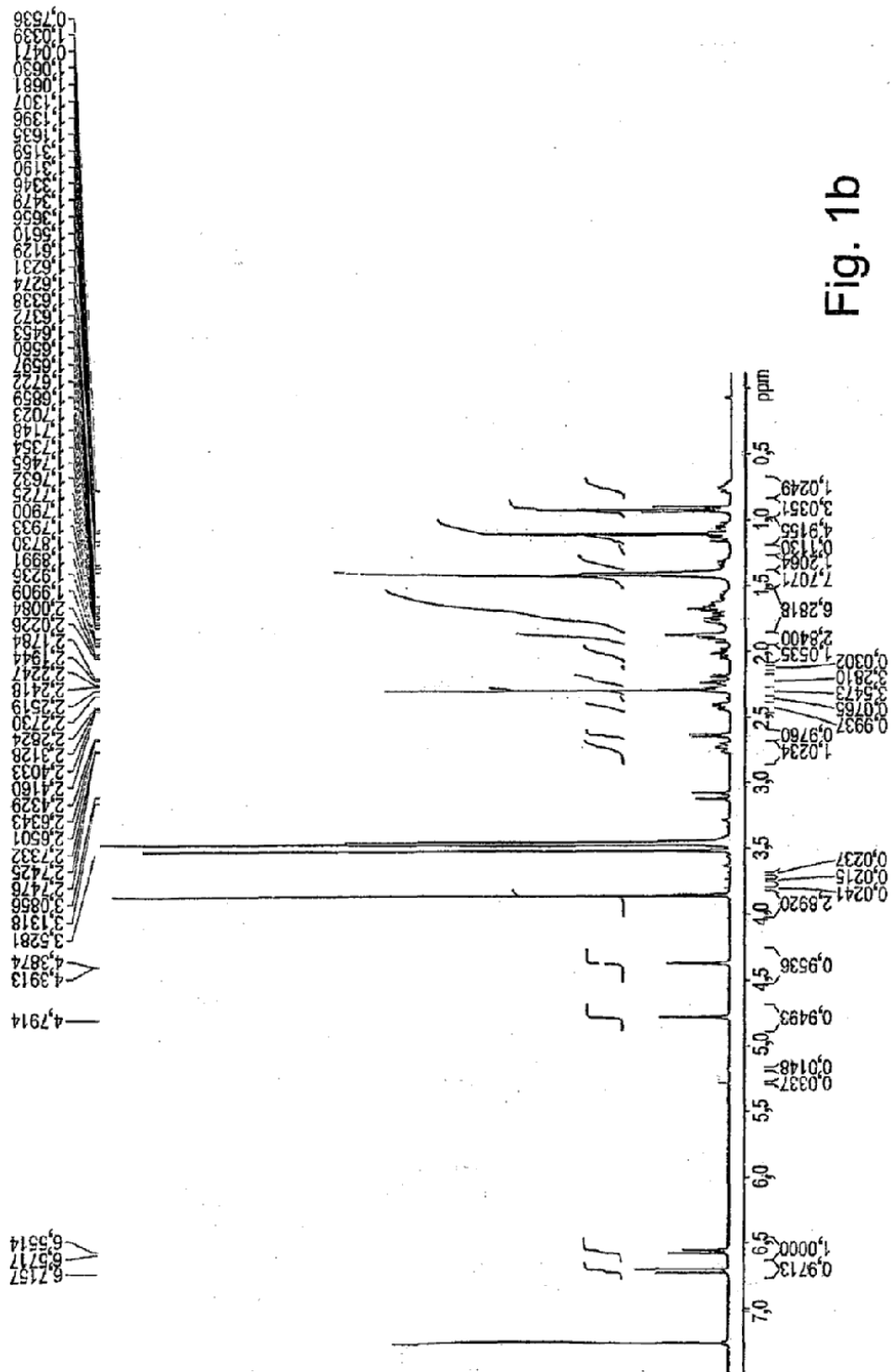
16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 de fórmula (VIa), o una sal del mismo,

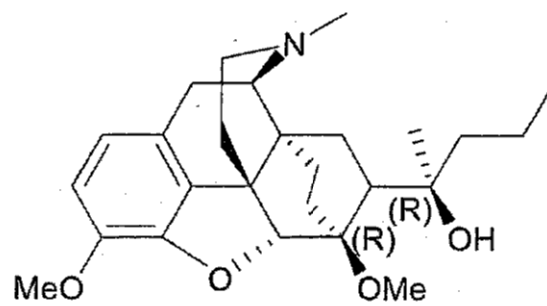
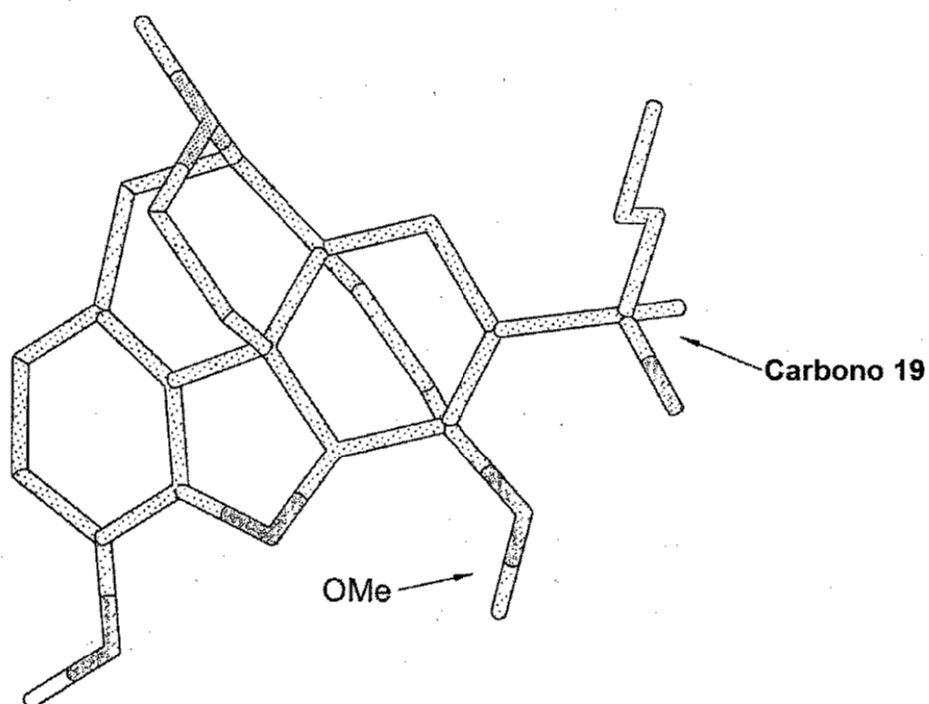


(VIa).

17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16 en forma de base libre.
18. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16 como una sal farmacéuticamente aceptable.
- 5 19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 18 como una sal de ácido clorhídrico.
20. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19.
21. Una composición de acuerdo con la reivindicación 20 en una forma de dosificación adecuada para administración transdérmica.
- 10 22. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 para su uso en medicina.
23. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 para su uso como analgésico.
24. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor.

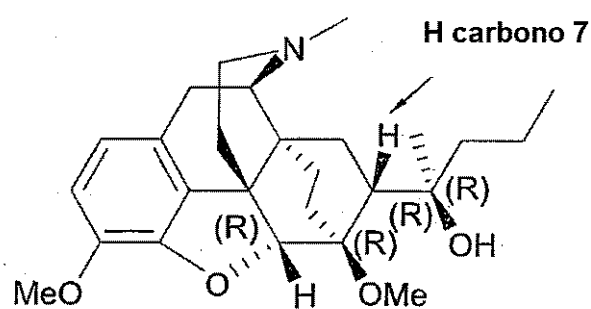
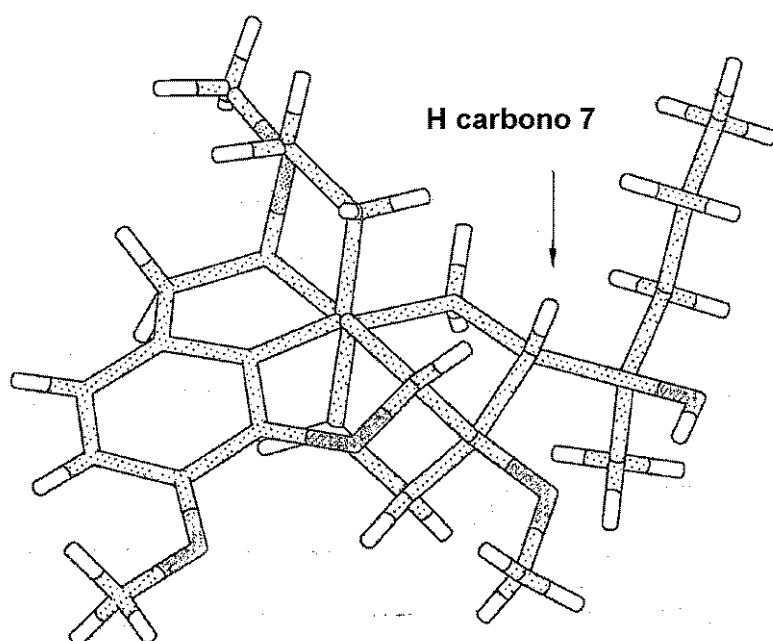






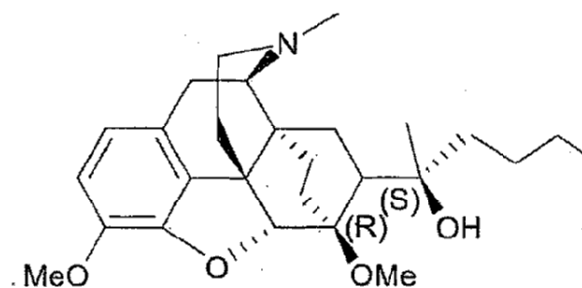
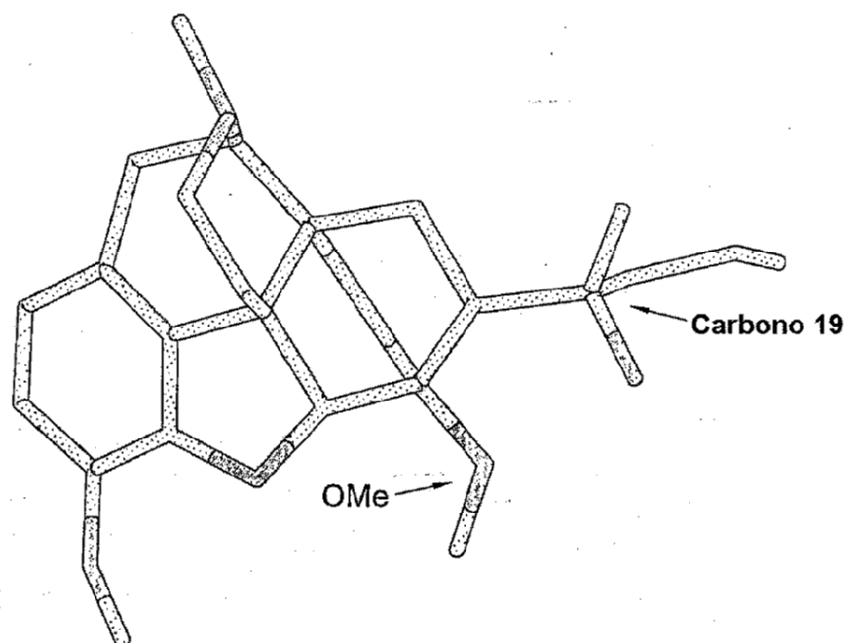
(R)-19-Pr-DHT

Fig. 2



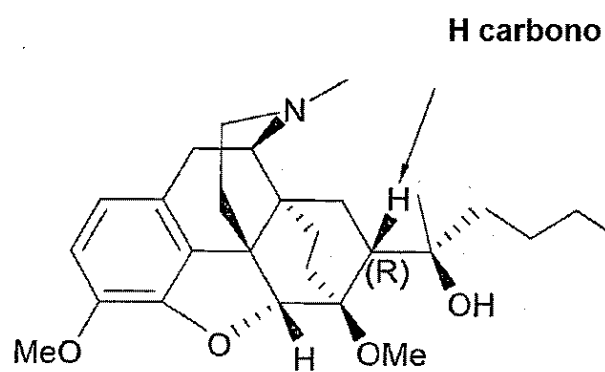
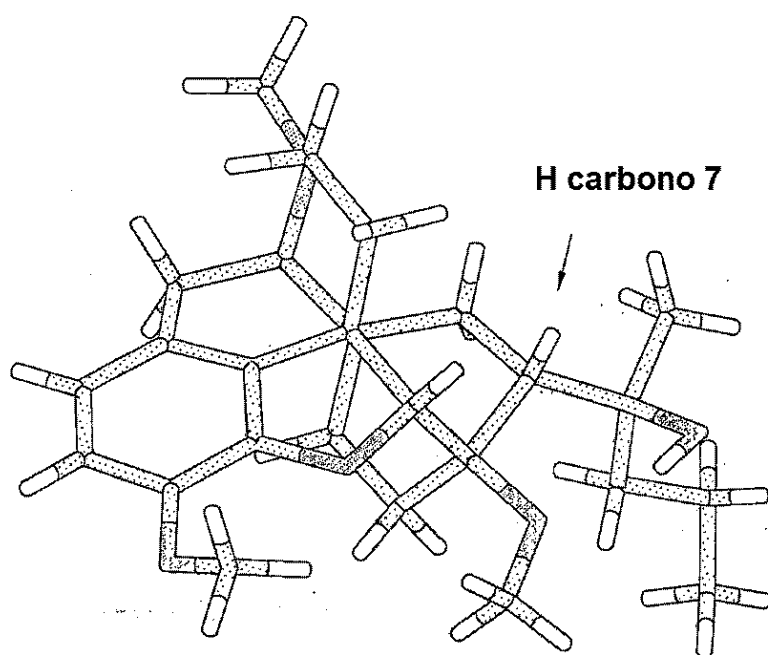
(R)-19-Pr-DHT

Fig. 3



(S)-19-Pr-DHT

Fig. 4



(S)-19-Pr-DHT

Fig. 5

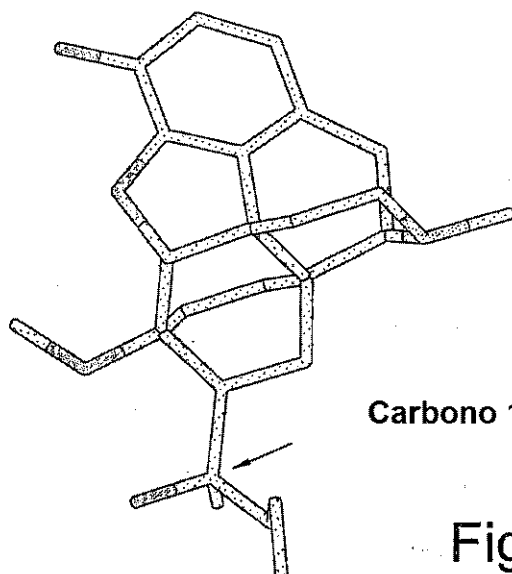


Fig. 6

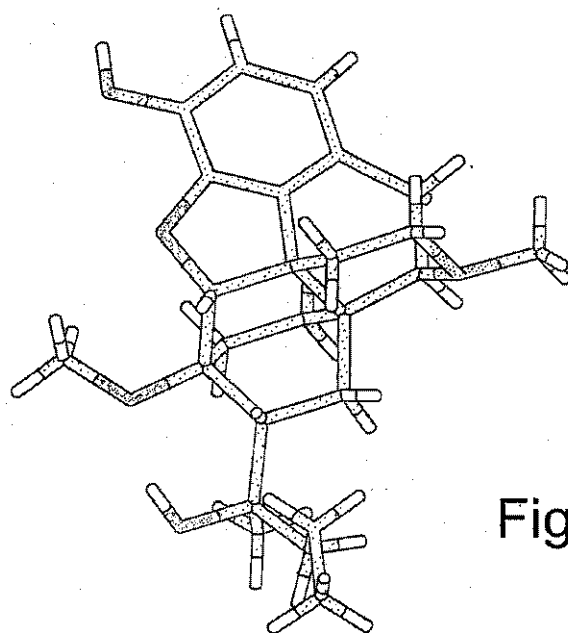


Fig. 7

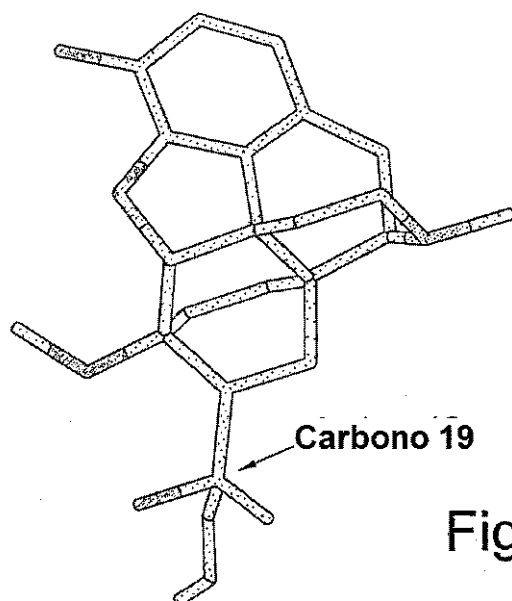


Fig. 8

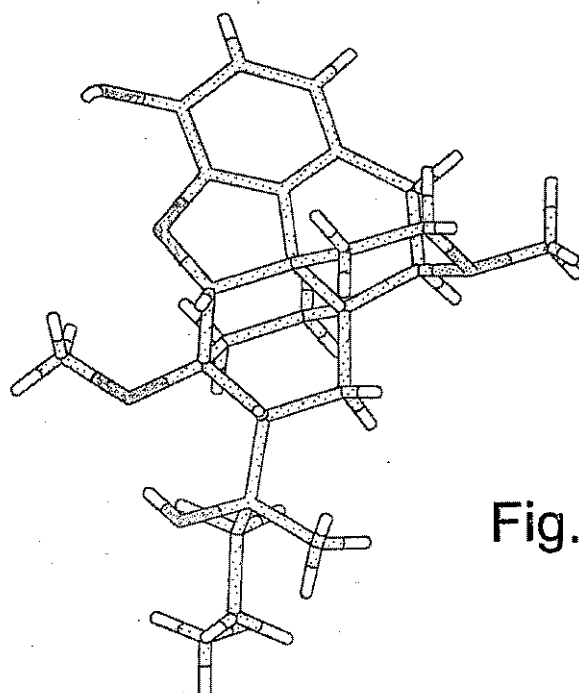


Fig. 9

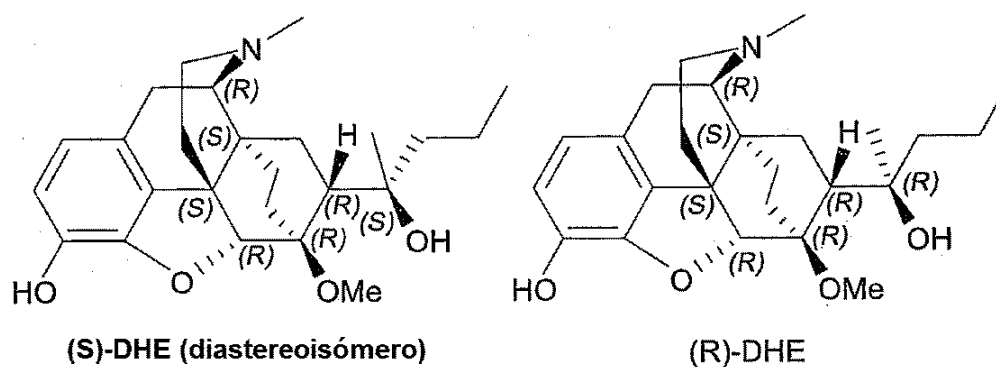
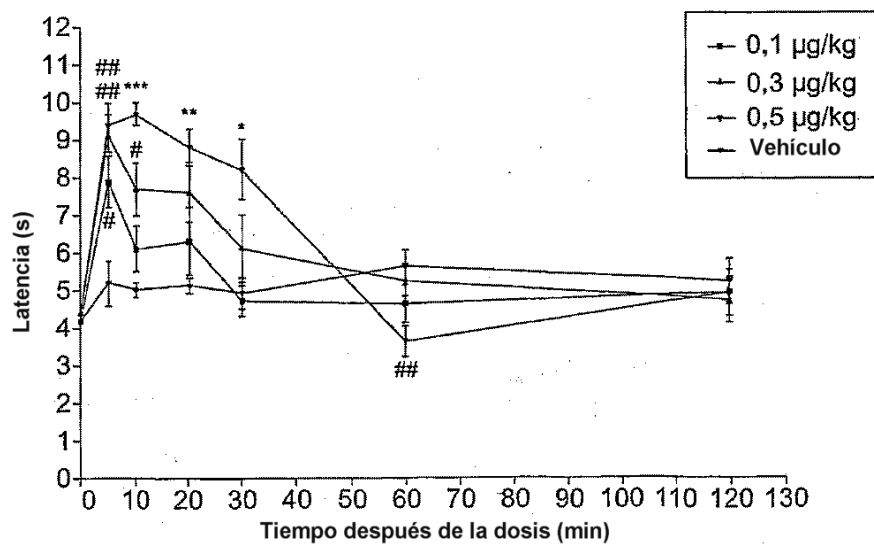


Fig. 10



P<0,05, ## P<0,01 en comparación con el vehículo (ANOVA y prueba de la t de Dunnet).

* P<0,05, ** P<0,01 y *** P<0,001 en comparación con el vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).

Fig. 11

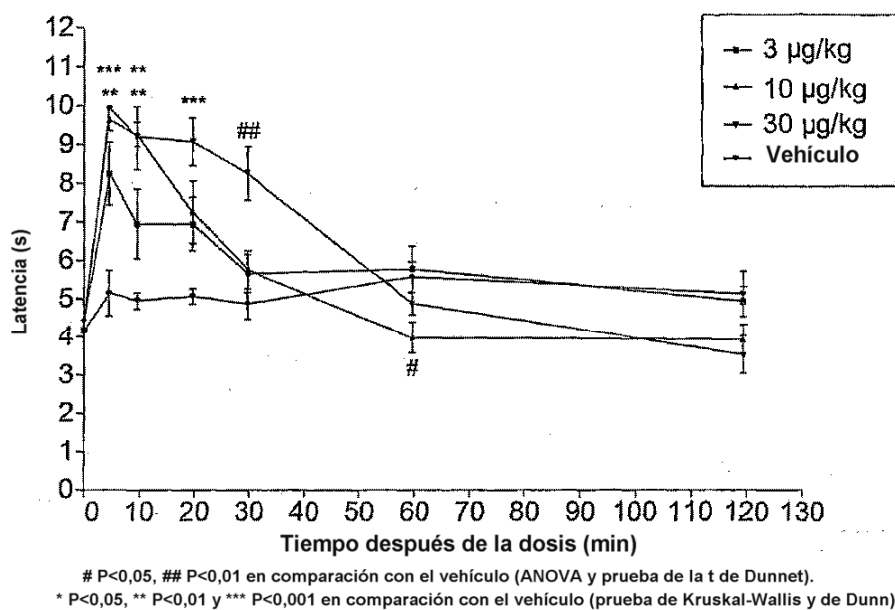


Fig. 12

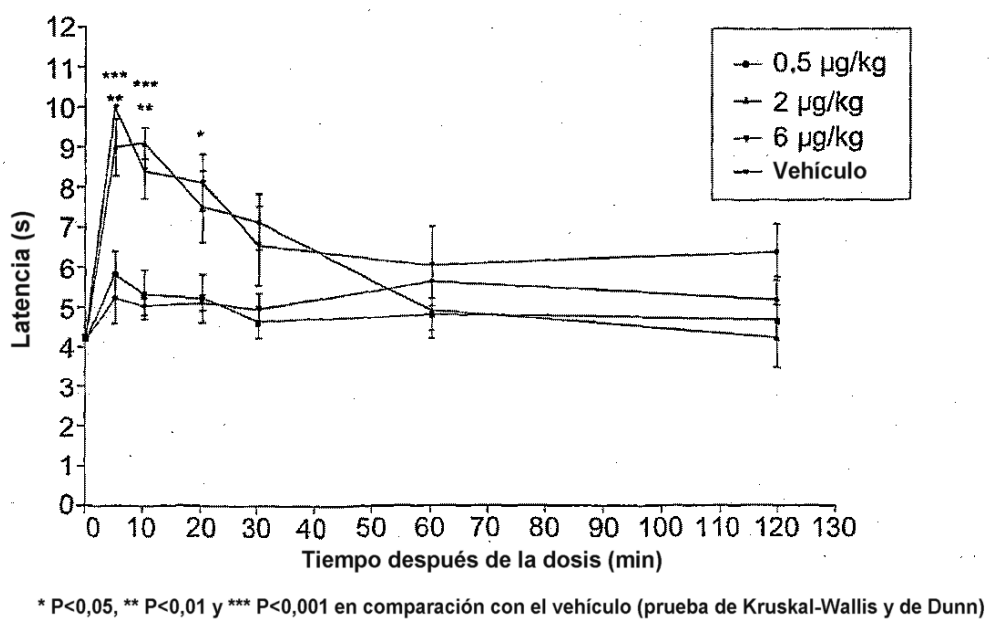
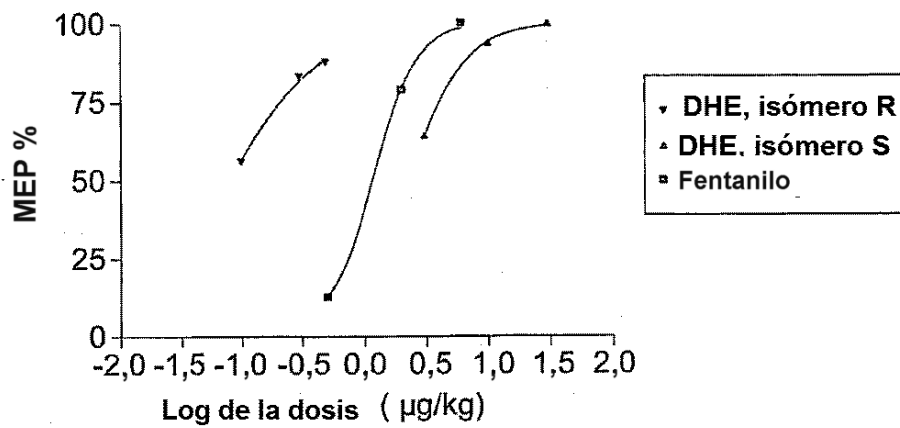
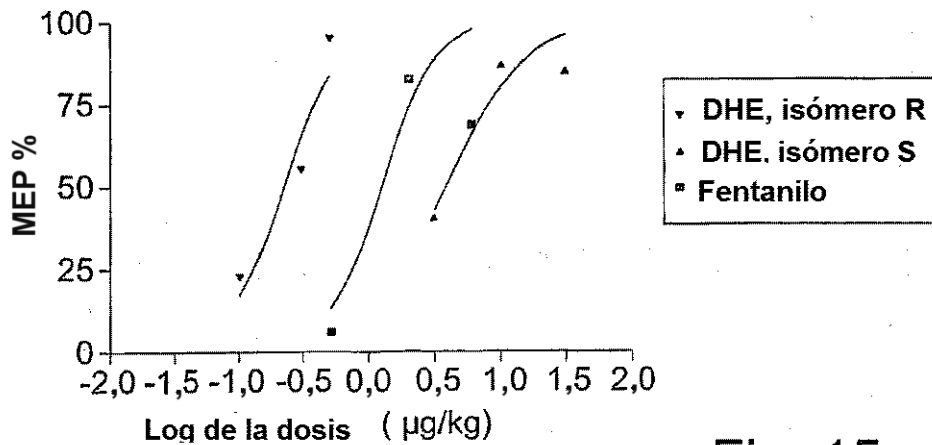


Fig. 13



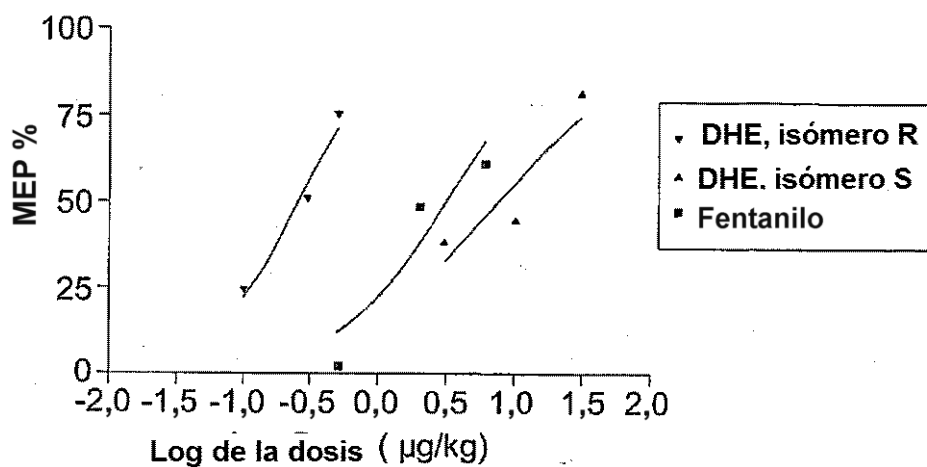
DE50 de DHE, isómero R = 0,07914 µg/kg
 DE50 de DHE, isómero S = 2,1615 µg/kg
 DE50 de fentanilo = 1,135 µg/kg

Fig. 14



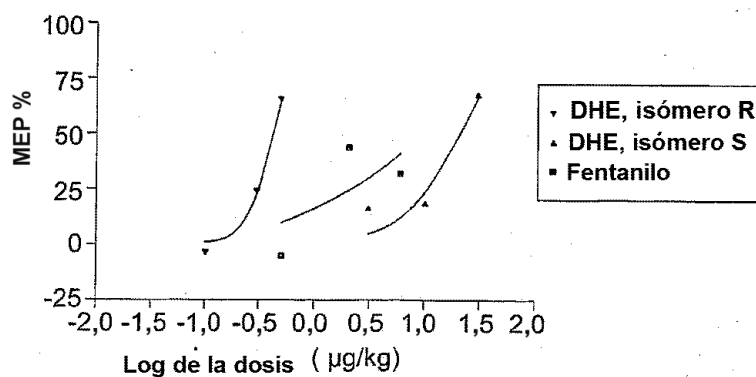
DE50 de DHE, isómero R = 0,2253 µg/kg
 DE50 de DHE, isómero S = 3,795 µg/kg
 DE50 de fentanilo = 1,239 µg/kg

Fig. 15



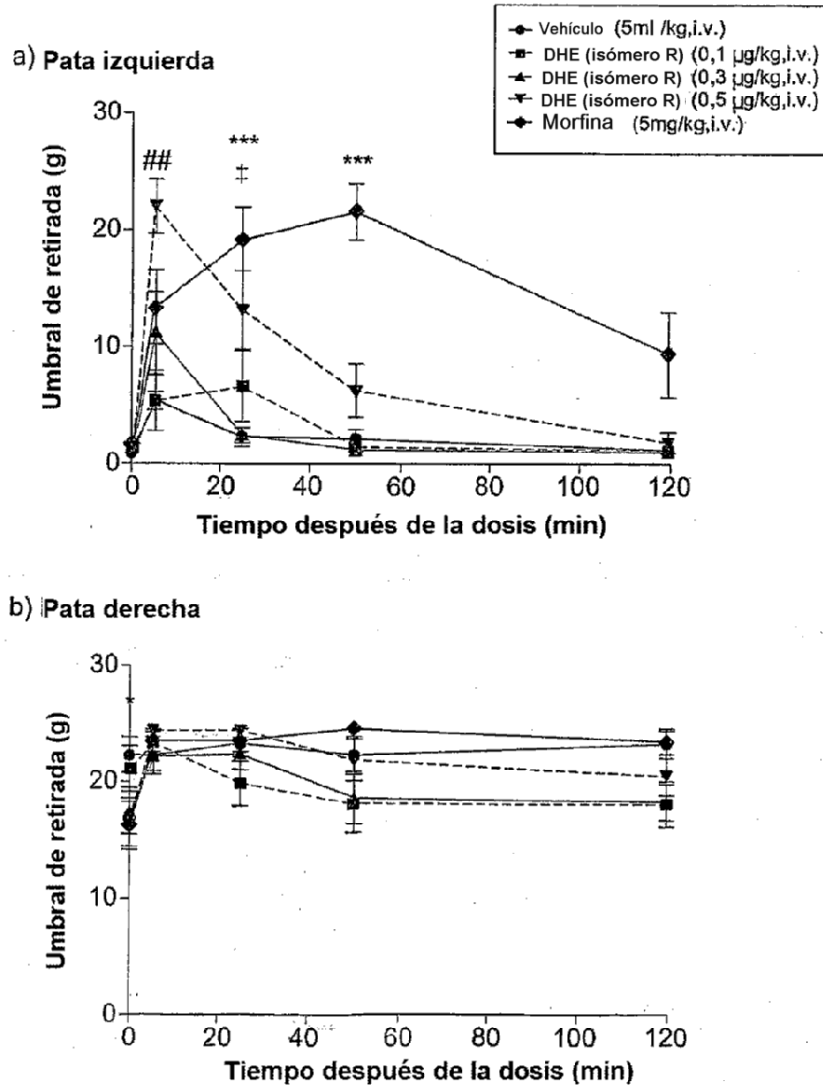
DE50 de DHE, isómero R = 0,2532 µg/kg
 DE50 de DHE, isómero S = 7,516 µg/kg
 DE50 de fentanilo = 3,111 µg/kg

Fig. 16



DE50 de DHE, isómero R = 0,4222 µg/kg
 DE50 de DHE, isómero S = 20,95 µg/kg
 DE50 de fentanilo = 9,681 µg/kg

Fig. 17

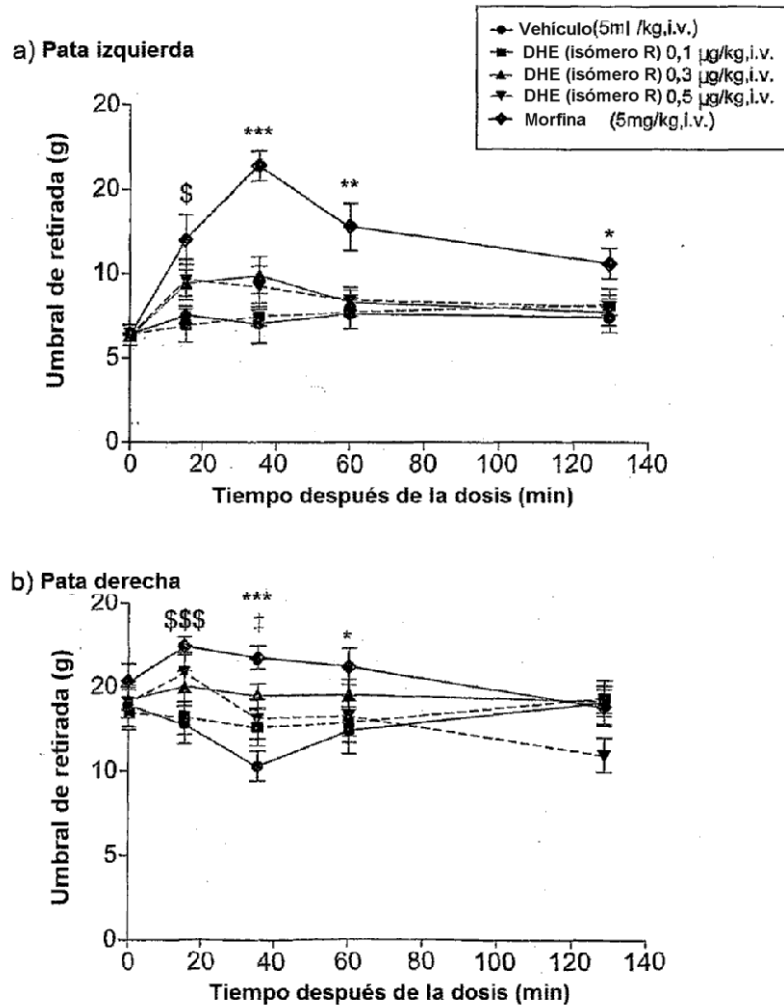


$P < 0,01$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn)

± $P < 0,05$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (ANOVA y prueba de la t de Dunnett).

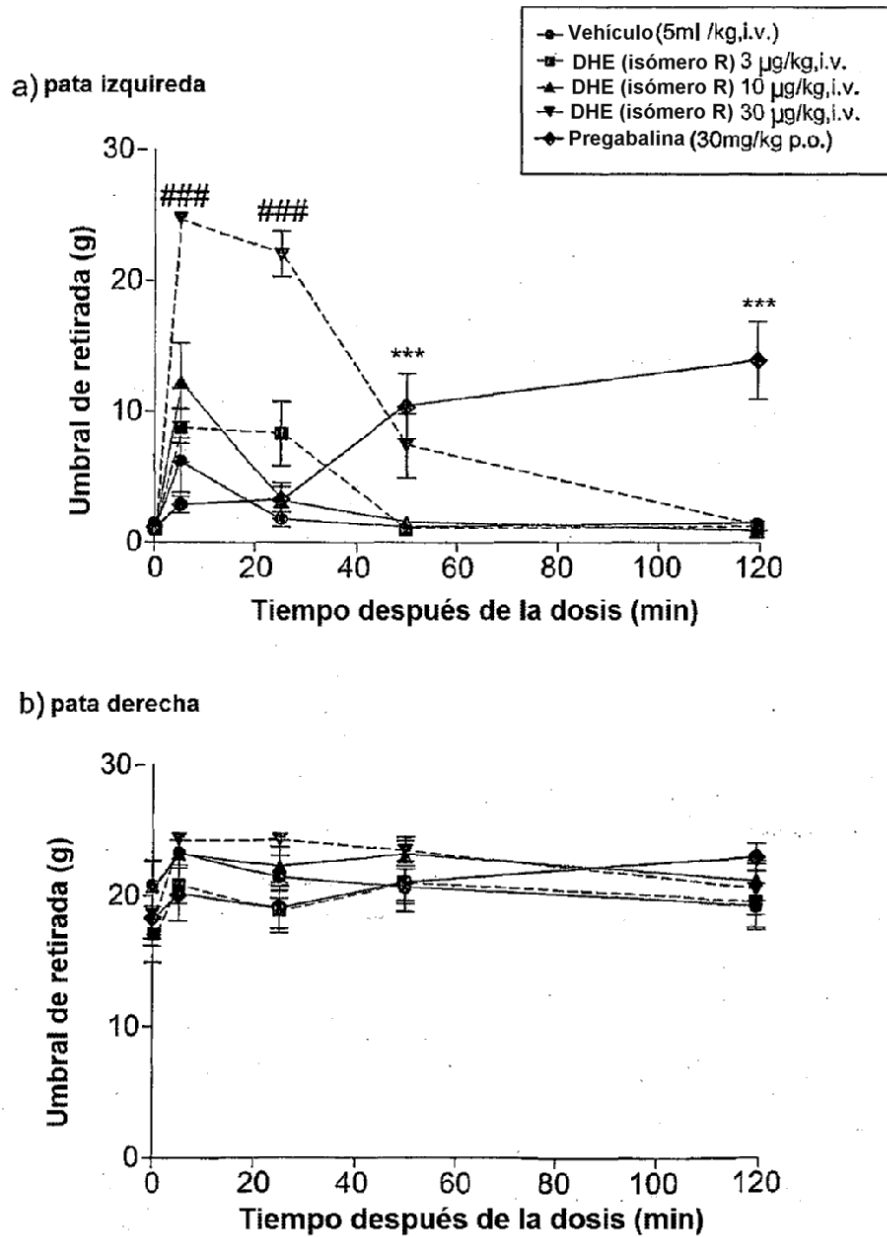
* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral).

Fig. 18



\$ $P < 0,05$, \$\$\$ $P < 0,001$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la U de Mann-Whitney).
 En comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral).
 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral).
 ‡ $P < 0,05$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (ANOVA y prueba de la t de Dunnett).

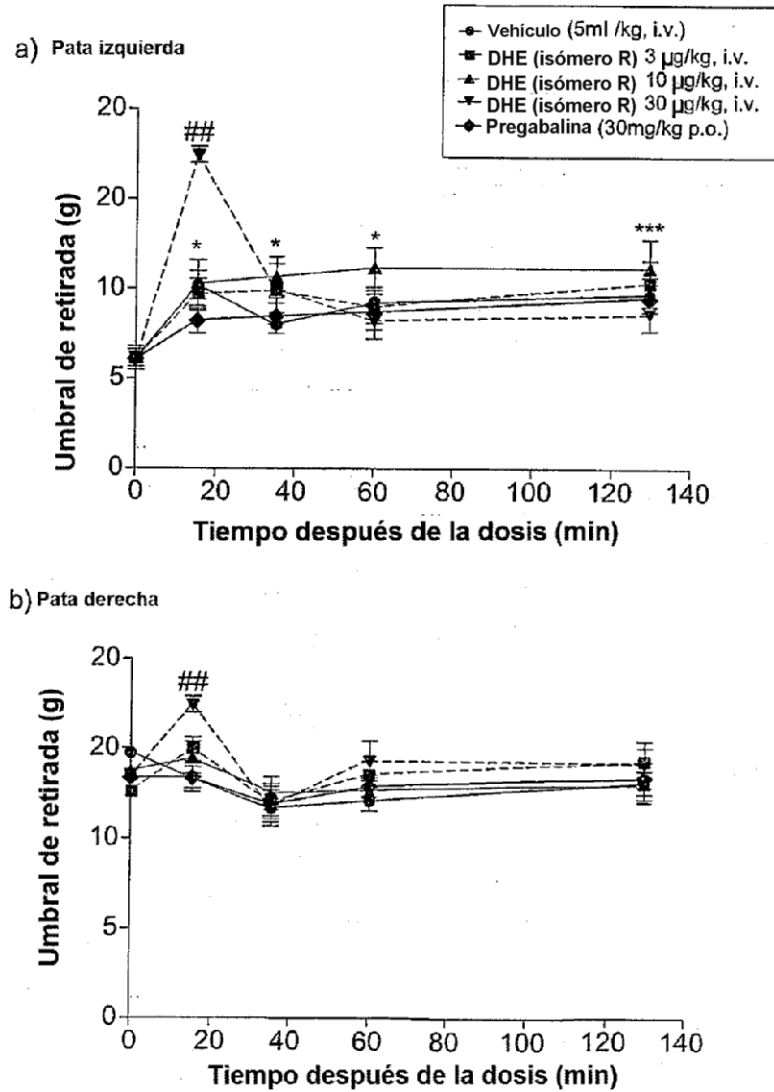
Fig. 19



*** $P < 0,001$ en comparación con los datos previos a la dosis (prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral).

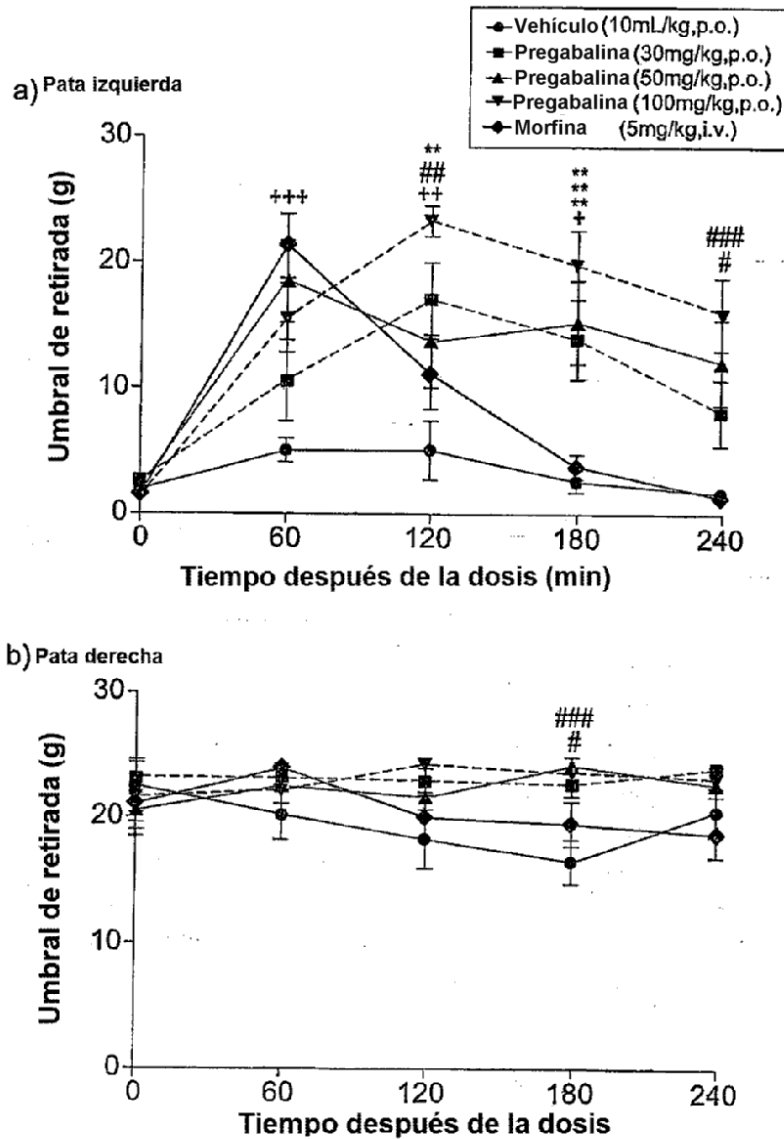
$P < 0,01$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).

Fig. 20



$P < 0,01$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).
 * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ en comparación con los datos previos a la dosis (prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral).

Fig. 21

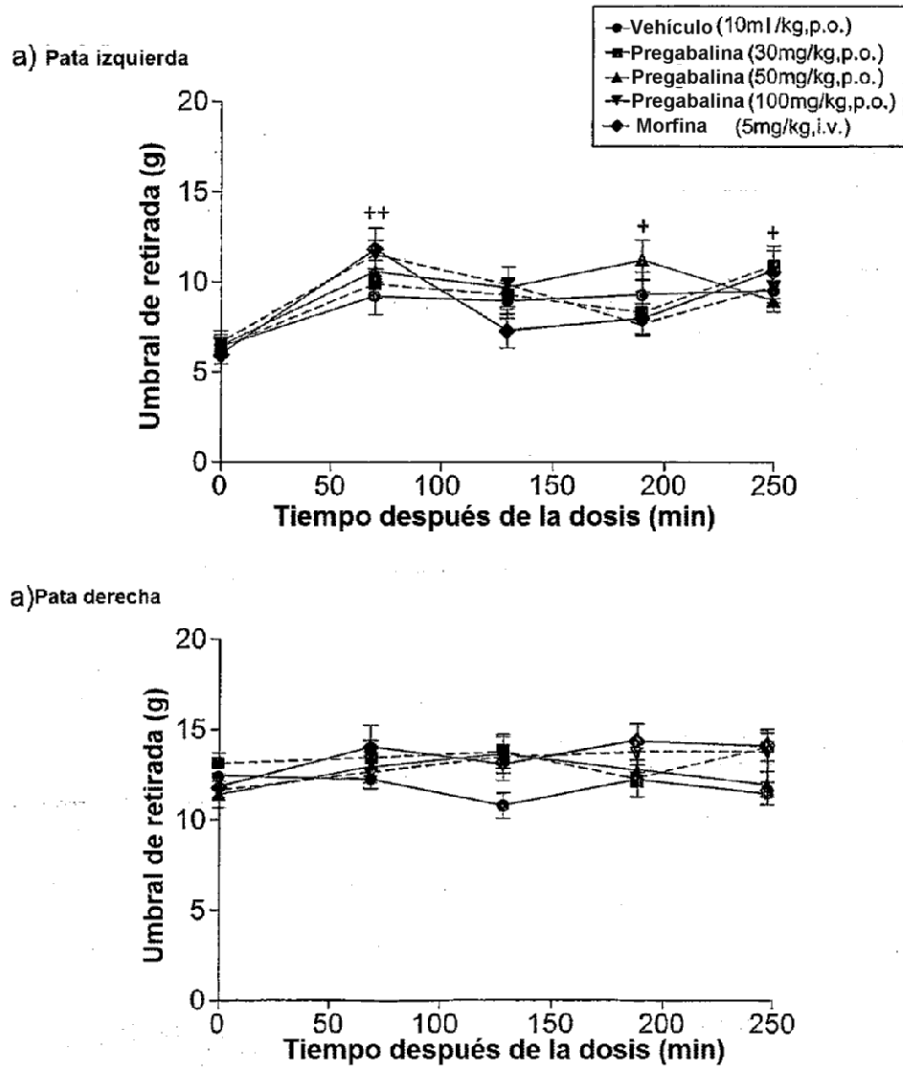


+ $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$ y +++ $P < 0,001$ en comparación con los datos previos a la dosis (prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral).

$P < 0,05$, ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn).

** $P < 0,01$ en comparación con los datos del grupo de vehículo (ANOVA y prueba de Dunnett).

Fig. 22



+ $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$ en comparación con los datos previos a la dosis (prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral).

Fig. 23