

Acción analgésica de la T.R.H. Contribución al estudio de su mecanismo de acción.

Daniel Palop Palop

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ACCION ANALGESICA DE LA TRH. CONTRIBUCION AL
ESTUDIO DE SU MECANISMO DE ACCION.

Tesis que presenta D. Daniel Palop y Palop,
Licenciado en Medicina y Cirugía, para optar
al grado de Doctor.

Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Junio de 1982.

Departamento de Farmacología

TELEFS. { 253 42 54
254 22 73

JAVIER FORN DALMAU, Profesor Agregado de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICO: Que Don Daniel Palop Palop, Licenciado en Medicina y Cirugía y Profesor Encargado de Curso de Farmacología, ha realizado los trabajos de su Tesis Doctoral "Acción analgésica de la TRH. Contribución al estudio de su mecanismo de acción" bajo mi dirección. La Tesis está terminada y revisada, pudiendo ser leída por el doctorando tan pronto como se autorice su presentación.

Y para que así conste, firmo la presente en Barcelona a dos de Junio de mil novecientos ochenta y dos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J Forn'.



A mis padres, quienes con su sacrificio contribuyeron decisivamente a que yo alcanzara el grado de Licenciado.

A mi esposa e hijos, cuya paciencia y abnegación han hecho posible que yo realizara esta Tesis.

AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor Dr. D. Francisco García-Valdecasas y Santamaría bajo cuya dirección me inicié en la Farmacología.

Al Profesor Dr. D. Javier Forn Dalmau cuyo estímulo y constante ayuda han permitido que yo realizara esta Tesis.

Al Profesor Dr. D. Eduardo Cuenca Fernández quien despertó en mí la vocación de farmacólogo y que con su inquietud científica abrió el camino en la investigación de la acción analgésica de la TRH.

Al Profesor Dr. D. Leocadio Rodríguez Alvarez, mi más profundo agradecimiento por los consejos recibidos y la colaboración prestada que de forma decisiva han contribuido a la confección de esta Tesis.

A Doña Pilar Escartín Tomás entrañable compañera por su contribución en parte del trabajo experimental.

A D. José Anglada Cabré colaborador en parte del trabajo experimental.

Al Dr. D. Arturo Bladé Font mi reconocimiento por su labor al sintetizar los péptidos estudiados en esta Tesis.

Al Dr. D. José M^a Samsó Díes por sus valiosos consejos

A Doña Leonor Plá por su colaboración en el trabajo de órgano aislado.

A los Drs. Sostres Ferrer y Esperalba su colaboración.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología mi reconocimiento.

Al Sr. Jordi Ferrer por la realización de las gráficas.

Al Sr. José Lago Mingarro que desinteresadamente ha mecanografiado esta Tesis.

Finalmente deseo expresar mi gratitud a los Laboratorio Frumtost-Prem por todas las facilidades que me han dado para estudiar con detalle la TRH, fruto de su Investigación.

I N D I C E



	Página
INTRODUCCION	1
ESTRUCTURA QUIMICA DE LA TRH	3
DISTRIBUCION DE LA TRH	4
BIOSINTESIS DE LA TRH	11
DEGRADACION Y METABOLISMO DE LA TRH	12
ESTUDIOS TOXICOLOGICOS	17
ACCIONES	19
INDICACIONES	51
ACCION ANALGESICA	55
OBJETIVO DE ESTA TESIS	60
MATERIAL Y METODOS	61
RESULTADOS	78
DISCUSION DE RESULTADOS	161
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFIA	177

La T R H se aisló y caracterizó en 1.969, a partir de extractos hipotalámicos ovinos y porcinos. Resultó ser un tripéptido, el piro glutamil histidil prolinamida, al que por su capacidad liberadora de la hormona tireotropa a partir del lóbulo anterior de la hipófisis de los mamíferos, se denominó T R H.

En el año 1.971 se descubrió que el mencionado tripéptido era también capaz de liberar prolactina, aunque persisten las dudas sobre la importancia fisiológica de esta acción.

Los estudios realizados sobre distribución de la T R H, han demostrado, que el péptido está ampliamente distribuido, ocupando no solo el hipotálamo, sino también el sistema nervioso central extrahipotálamico y en diversas especies animales se ha localizado la T R H más allá de los confines del sistema nervioso central.

Estos estudios se han ido acompañando, en el transcurso de los años, de la descripción de múltiples acciones farmacológicas sobre el S N C y otros sistemas y algunas de ellas han adquirido tanta importancia como sus acciones endocrinas. Ello ha inducido a numerosos autores a sugerir que la T R H podría desempeñar un papel de neurotransmisoror en el S N C, demostrándose que en determinadas áreas del S N C, actúa como un neurotransmisor ortodoxo y que en otras modula los efectos de las monoaminas neurotransmisoras.

Los estudios realizados sobre la distribución filogenética de la T R H han incrementado la importancia de las acciones extraendocrinológicas de la misma, ya que se ha localizado material inmunoreactivo similar a la T R H en el cerebro de animales que carecen de T S H, como la larva de lamprea y en animales que carecen de hipófisis como el amfioxus.

Ello induce a pensar que la función reguladora de la secreción de hormona tireotropa que ejerce la T R H en los mamíferos, proporciona un ejemplo de organismos que adquieren una nueva función a partir

Basado en estos datos, Jackson (1982) opina que el papel primitivo de la T R H en el tejido nervioso implica una función neuronal y que solo tardamente en la evolución, se forma la hipófisis, adquiriendo entonces la T R H la función de liberar T S H.

Con la disponibilidad del tripéptido sintético en forma pura, la T R H se ha convertido en una formidable arma para la investigación y en un inestimable medio de diagnóstico en los trastornos del eje hipotalámico hipofisotiroideo.

A pesar de la reconocida importancia de sus acciones centra--les las posibles indicaciones derivadas de las mismas, están siendo am--pliamente debatidas en los momentos actuales.

La T R H fue la primera hormona hipotalámica que se caracterizó químicamente.

Su naturaleza tripéptidica se dilucidó en los laboratorios de Guillemin (Burgus y cols. 1969) y de Schally (Boler y cols. 1969).

Químicamente es la L-piroglutamil- L-histidil L-prolinamida y su estructura se representa en la figura 15.

Es un péptido de bajo peso molecular : 362,40. Muy soluble en agua. Esta estructura, posee exactamente la misma actividad biológica - de la T R H endógena aislada a partir de fragmentos de tejido hipotalámico de ganado porcino, ovino y bovino, así como de seres humanos.

La estructura química citada admite pocas modificaciones en su molécula sin que pierda actividad. Ello hace que en comparación con la - LH - RH y la somatoestatina, se disponga de relativamente pocos análogos de la T R H con actividad biológica. Si bien algunos de sus derivados tienen mayor actividad biológica.

En la siguiente tabla recopilamos algunos de estos derivados:

<u>P R O D U C T O</u>	<u>% ACTIVIDAD</u>		<u>REFERENCIAS</u>
	<u>T R H</u>	<u>S N C</u>	
T R H	100	100	
3-N-Metil-His-2-TRH	800	100	Rivier y cols. 1972
Homo (Piro) Glu-His-Tio -Pro-NH ₂	100	1.500	Hirschamam 1.977
Piro-2-Amino Adifil- Histidil-Tiazolidina-4 Carboxamida: MK : 771	100	10-20	Porter y Cols. 1977 Yarbrough 1978 Yarbrough y Lotti 1978
Piro-Histidil-Dimetil prolina-Amida	100	10-200	Metcalf y Dettmar 1981

1-2 DISTRIBUCION DE LA T R H

Debemos precisar que expondremos este capítulo, intentando explicar el posible significado de la localización, más que la exhaustiva precisión anatómica de la misma.

Asimismo, antes de entrar en el tema precisaremos que a nivel del S N C tanto hipotalámico como extrahipotalámico, la T R H se localiza a nivel de los sinaptosomas como han demostrado los estudios de Barnea y Cols. (1975), Bennet y Cols. (1975) y Winokour y Cols. (1977) y que dichos sinaptosomas, en presencia de altas concentraciones de potasio, se despolarizan liberando T R H Bennet y cols. (1975), Warberg y cols. (1977), Schaffer y cols. (1977).

Distinguiremos en esta distribución tres grandes apartados:

HIPOTALAMO

PRESENCIA DE LA T R H EN EL SNC. Que comprende: HIPOFISIS

RESTO DEL SNC

- - -

PRESENCIA DE LA T R H FUERA DE LOS CONFINES DEL SNC.

Distinguiremos:

SISTEMA GASTROINTESTINAL

Líquido cefalorraquídeo

LIQUIDOS ORGANICOS

Circulación sistémica

Orina

OTROS TEJIDOS

- - -

DISTRIBUCION FILOGENETICA.

PRESENCIA DE LA T R H EN EL S N C

-HIPOTALAMO.- Se ha encontrado T R H inmunorreactiva en el hipotálamo y eminencia media peduncular de todas las especies de mamíferos estudiadas, incluyendo al hombre (Jackson y Reichlin 1979).

En el hipotálamo del hombre normal se localiza T R H en el tallo pituitario, núcleo posterior e hipotálamo anterior en orden decreciente (Koch y Okon 1979).

En la rata, mediante técnicas de inmunofluorescencia se han demostrado cuerpos celulares conteniendo T R H en una extensa región del hipotálamo que comprende el núcleo preóptico supraquiasmático y el área periparaventricular, es decir la clásica área tireotropa del hipotálamo; se piensa que las terminales nerviosas teñidas para la T R H en la eminencia media hipotalámica, derivan presumiblemente de aquellos cuerpos celulares (Johanson y Hokfelt 1980).

La importancia de la llamada área tireotropa se aprecia gracias a los trabajos realizados por Jackson y Reichlin (1977 a), quienes observaron que la ablación de dicha zona origina hipotiroidismo en la rata acompañado de una deplección en el contenido total de T R H hipotalámica, de casi un 70 % .

Ello indica que la función normal de la hipófisis tireotropa depende de la integridad de esta región hipotalámica y de la subsecuente entrega de niveles normales de la T R H desde el hipotálamo a la hipófisis. Tras lesiones hipotalámicas persisten aún niveles apreciables de T R H y ello explica que la depresión de la línea de base de la función tiroidea tras este procedimiento nunca sea tan importante como tras la hipofisectomía.

- HIPOFISIS.- Se encuentra tanto en el lóbulo posterior como en el anterior de la hipófisis.

La concentración de T R H en la hipófisis posterior de la rata únicamente es sobrepasada por la del hipotálamo (Jackson y Reichlin 1979). Los mismos autores (1977 a) observaron que lesiones hipotalámicas originaban una deplección casi total del contenido de T R H en el lóbulo posterior, lo que apoyaría la presencia descrita por (Hokfelt y Cols. 1975 a) de un nuevo sistema hipotálamo-hipofisario.

La función de la T R H en la regulación de la neurohipófisis se apoya en que la T R H influye en la secreción de vasopresina en seres humanos. (Sowers y Cols. 1976).

También, merced a los trabajos de Jackson y Reichlin (1977 a) y de Childs y Cols. (1978), se han localizado niveles importantes de T R H en el lóbulo anterior de la hipófisis de rata. Aunque lo más probable es que la misma derive del hipotálamo, se ha postulado su origen hipofisario.

-RESTO DEL S N C.- La T R H, se encuentra ampliamente distribuida, en el cerebro extrahipotalámico de los mamíferos. Si bien sus concentraciones son inferiores a las hipotalámicas, debido a la mayor proporción del mismo, representa un 70% del contenido total T R H en el S N C. (Jackson y Reichlin 1979) En la rata dichos autores observan muchas de terminaciones nerviosas conteniendo T R H en algún núcleo motor del tronco cerebral y alrededor de las motoneuronas de la médula espinal.

(Hokfelt y Cols. 1980), muestran que un péptido semejante a la T R H y otro péptido semejante a la sustancia P, se encuentran juntos en los cuerpos celulares de neuronas serotoninérgicas localizadas en la médula oblongata inferior. El tratamiento con neurotoxinas serotoninérgicas específicas, origina la disminución de las terminaciones nerviosas T R H y serotonina-inmunorreactivas en el asta anterior de la médula espinal, lo que sugiere la coexistencia de neuropéptido y monoamina en la misma terminación nerviosa.

Aunque la coexistencia de T R H - SEROTONINA - SUSTANCIA P, va en contra del concepto clásico "una neurona, un neurotransmisor", podría con el tiempo generalizarse para otros péptidos y otros neurotransmisores.

En el ser humano, la T R H está presente en el cerebro extrahipotalámico del feto humano. El cerebelo contiene cantidades detectables desde la novena semana de la gestación (Winters y Cols. 1974).

En muestras cerebrales extrahipotalámicas, obtenidas de seres humanos normales fallecidos en accidentes de tráfico, se observan concentraciones apreciables de T R H en el tálamo y corteza cerebral (Koch y Okon 1979).

En el mono, se encuentran receptores con alta afinidad para la unión de la T R H en el sistema límbico, cortex cerebral y cerebro, (Ogawa y Cols. 1981).

Si bien la presencia de T R H en cantidades importantes en el sistema nervioso extrahipotalámico de la rata, la han debatido autores como Youngblood y Cols. (1978), otros grupos de investigadores como Jackson (1980 a); Kello Kumpu y Cols (1980); Spindle y Wurtman (1980) y Kreider y Cols. (1979), han demostrado de forma indudable que la T R H extrahipotalámica es el auténtico tripéptido.

Además, se piensa que la T R H puede sintetizarse en el cerebro extrahipotalámico porque la destrucción del hipotálamo no modifica la T R H cerebral extrahipotalámica Jackson y Reichlin (1977 a).

Los trabajos de Brownstein y Cols. (1975), apoyan aún más la importancia de la T R H extrahipotalámica, demostrando que el aislamiento quirúrgico del hipotálamo origina una reducción marcada de la T R H hipotalámica, lo que induce a pensar, que la misma, depende de las conexiones nerviosas extrahipotalámicas, o que incluso deriva de la T R H extrahipotalámica.

PRESENCIA DE T R H FUERA DE LOS CONFINES DEL S N C

-SISTEMA GASTROINTESTINAL.- Se ha descrito la presencia de T R H en el páncreas y tracto gastrointestinal de la rata.

En el páncreas, se encontró a nivel de los islotes de Langerhans.

En estudios ontogénicos realizados, se demuestra, que al principio de la vida neonatal el páncreas contiene mayores cantidades de T R H que el hipotálamo (Engler y Cols. 1981), y conforme avanza la edad, des -

cienden los niveles pancreáticos al mismo tiempo que aumentan los niveles hipotalámicos y cerebrales.

El tratamiento con estreptozocina que destruye las células Beta desciende de modo marcado los niveles de T R H, mientras que aumenta los de somatoestatina (Martino y Cols 1978). Se ha postulado por los mismos autores que la T R H se opondría a la acción de la somatoestatina en el control de la secreción de dichos islotes.

Morley(1977), mostró que la T R H se localizaba en el tracto gastrointestinal de rata y observó que era más abundante en el fundus del estómago, ileon, ciego y colon.

También confirmó la presencia de elevadas concentraciones de T R H en el páncreas.

Hasta el presente, no se ha demostrado de modo fehaciente la existencia de T R H en el sistema gastrointestinal del hombre.

La coexistencia de T R H en el sistema nervios central y en el páncreas y tracto gastrointestinal, es semejante a la observada con otros péptidos neuronales, sugiriéndose que la T R H forma parte de un difuso sistema neuroendocrino y que fuera del S N C se localiza en células "neuroendocrinas programadas" que derivan del epiblasto embrionario (o uno de sus principales derivados) que ha emigrado al endodermo durante el de sarrollo embrionario. (Pearse y Takor 1979).

-LIQUIDOS ORGANICOS.- La presencia de T R H auténtica en el líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales es dudosa, bien porque no se ha caracterizado completamente la naturaleza del material estudiado o porque estos resultados no han sido confirmados por otros autores. Se ha detectado material inmunorreactivo semejante a la T R H en el L C R de personas normales (Oliver y Cols. 1974).

Se ha señalado por Kirkegaard y Cols. (1979) un aumento de dicho material en pacientes con depresión, lo cual apoyaría la idea de un metabolismo alterado de la T R H en el S N C en la enfermedad depresiva.

Es difícil la medición de T R H en la circulación sistémica habida cuenta de su rápida degradación por enzimas proteolíticos y su presencia en la sangre humana es objeto de controversias (Jackson y Reichlin 1979).

Sin embargo en ratas recién nacidas se encuentran elevados niveles de T R H plasmática (Engler y Cols. 1981) junto a una baja actividad degradante enzimática. (Neary y Cols. 1978 a) Para Engler y Cols. (1981) dicha T R H parece originarse en estructuras extraneuronales como páncreas y tracto gastrointestinal ya que la encefalectomía practicada a dichas ratas no afecta las concentraciones de T R H. Neary y Cols. (1978 b) informan que la sangre del cordón umbilical humano presenta una baja actividad degradante de la T R H.

Tanto en la orina humana como en la de rata se ha detectado la presencia de material semejante a la T R H (Jackson y Reichlin 1979).

En la orina humana Bhandaru y Emerson (1980) muestran la presencia de altas cantidades de material inmunorreactivo semejante a la T R H ácida.

-OTROS TEJIDOS.- También se ha descrito la presencia de material semejante a la T R H en el sistema reproductor de la ratona o incluyendo próstata, testículos, epidídimo y vesículas seminales (Pekary y Cols. 1980), aunque su papel en la función gonadal no se ha dilucidado.

En los seres humanos se ha localizado material semejante a la T R H en la placenta (Shambaugh y Cols. 1979) y también en el líquido amniótico a partir de las 32 semanas de la gestación (Morley y Cols. 1979 a)

Se desconoce también la función de la T R H en la placenta.

DISTRIBUCION FILOGENETICA.— Jackson (1982) opina que el papel jugado por la T R H en anfibios y peces no está claro. En dichas especies la T R H, a pesar de encontrarse en hipotálamo y cerebro a mayor concentración, que en los mamíferos, es incapaz de activar la función tiroidea.

Jackson y Reichlin (1977 b) demuestran que junto a la serotonina se encuentra en concentraciones muy elevadas en la piel de la rana. Este tejido es derivado de, o programado por, el primitivo neuroectodermo, que es también una fuente rica de otros péptidos estructuralmente relacionados con péptidos neurales, localizados en el cerebro y en el intestino de los mamíferos (Jackson 1979).

Jackson (1982), opina que el hallazgo de T R H en la totalidad del cerebro de la larva de lamprea (que carece de T S H) y al final de la cabeza del anfioxus (que carece de hipófisis), es muy sugestivo, de que la función reguladora de la T S H que ejerce la T R H en los mamíferos, sea un ejemplo de organismos que adquieren una nueva función a partir de una estructura química preexistente. Por lo que especula que el papel primitivo de la T R H en el tejido neuronal implicaría una función nerviosa y que solo tardíamente en la evolución, se formaría la hipófisis, tomando la T R H el papel de hormona liberadora de la secreción de T S H.

1 - 3 BIOSISTENSIS DE LA T R H

Mckelvy y Cols. (1975) demuestran la biosíntesis de la T R H en cultivos de órganos como el hipotálamo de cobayo.

Al principio se habló de una síntesis enzimática no ribosémica, extremo este que no ha podido ser confirmado (Jackson y Reichlin 1979). Utilizando el cerebro de rana, que según los trabajos de Jackson y Reichlin (1979) contiene altas concentraciones de T R H, Rupnow y Cols. (1979) han descrito una macromolécula que bajo tratamiento químico y enzimático produce T R H.

Estos autores proponen que la T R H es un producto postrasla-cional, derivado de un precursor macromolecular, que presumiblemente surge por síntesis ribosémica. Son necesarios mas estudios para apoyar esta hipótesis

- - - -

La degradación de la T R H ha sido estudiada por numerosos autores. (Redding y Schalli 1969, Bassiri y Utiger 1972) entre otros. Distinguiremos:

- CAMBIOS DEPENDIENTES DE LA EDAD.- Se observó también que dependiendo de la edad existían cambios en la secreción de hormonas tiroideas en la rata (Dohler y Cols. 1977) y en el hombre (Stubbe y Cols. 1978). Además Bauer (1976) y White y Cols. (1976) mostraron que la actividad en las enzimas séricas degradantes eran sensibles a los niveles de hormonas tiroideas en la rata.

Partiendo de estos datos, White y Cols. (1980), estudian los cambios en la degradación de la T R H, dependientes de la edad, en el suero humano y en el de la rata. Este estudio lo realizaron "in vitro" con una técnica de radioinmuno-ensayo. Los resultados muestran que en la rata no existe inactivación enzimática hasta la edad de 15 días, -- aumentando luego progresiva y proporcionalmente con la edad, alcanzando su máximo en animales adultos.

Para el suero humano obtienen resultados semejantes, si bien precisan que aun cuando las peptidasas metabolizantes de la T R H están presentes en cualquier momento de la vida postnatal, su actividad es inferior en recién nacidos y niños pequeños, luego su actividad aumenta lentamente con un incremento muy rápido inmediatamente antes de la pubertad. Estos autores llegan a la conclusión que la degradación sérica de la T R H puede ser un factor importante en la regulación del eje hipotalámico hipofiso-tiroideo.

CAMBIOS DEPENDIENTES DE LA ESPECIE ANIMAL.- En un interesante estudio, realizado también "in vitro" a partir del suero obtenido de -- distintas especies animales, Brewster y Waltham (1981), clasifican las especies animales, según la vida media plasmática de la T R H. Como se observa en la siguiente tabla.

INFERIOR A 20'	20 - 50'	50 - 200'	200 - 400'	400'
Cerdo	Gato	Mono Rhesus	Ratón	Perro
	Rata	Conejo	Hamster	
	Hombre	Cabra	Cobayo	
			Burro	

Comprobaron que los metabolitos más importantes en el suero fueron los aminoácidos constituyentes de la T R H.

El trabajo tiene tres consecuencias fundamentales:

- 1º) Debe escogerse un modelo experimental correcto para extrapolar los resultados obtenidos a la especie humana.
- 2º) Debe estimularse la búsqueda de análogos de la T R H que sean más resistentes a la inactivación enzimática y que presenten menos variabilidad que la T R H a la degradación biológica en las diversas especies animales.
- 3º) Confirma la corta vida media de la TRH en la especie humana (In vivo es de 4-6'), lo cual es un inconveniente para sus posibles indicaciones terapéuticas.

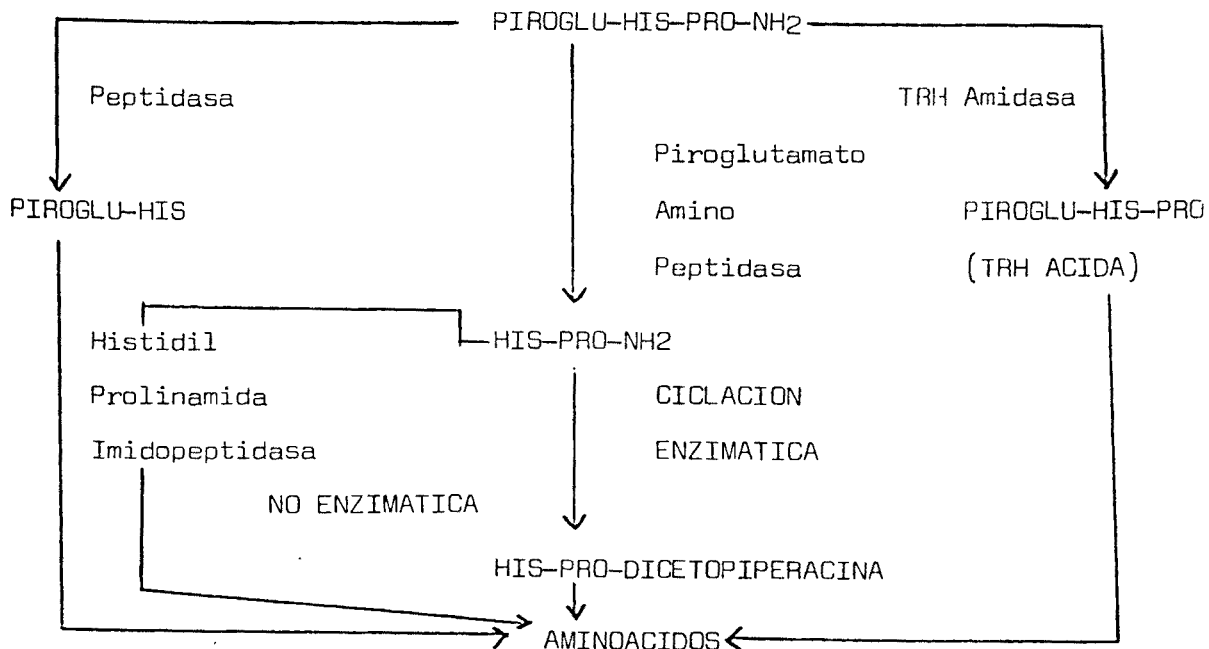
1 - 5 METABOLISMO DE LA T R H

Hasta los estudios de Peterkofsky y Battaini (1980), Matsui y Cols. (1979) y Yanagisana y Cols. (1980) se había pensado que la degradación de la T R H originaba fragmentos biológicamente inertes, ya que los primeros estudios, indicaron que era transformada por una desamidasa específica del suero y del cerebro en un producto desamidado: Piroglutamil-Histidil-Prolina, también llamada T R H ácida. También por acción de una peptidasa no específica, se obtenían alguno de los aminoácidos constituyentes. Todos estos productos eran incapaces de controlar la secreción de hormonas hipofisarias como demostraron Vale y Cols. en 1973 y Reichlin y Cols. en 1976.

Prasad y Peterkofski (1976), variaron de forma radical estos conceptos al descubrir que los extractos hipotalámicos de hamster, contenían un enzima, piroglutamato amino peptidasa, que transforma la TRH en un dipéptido, la histidil-prolinamida, el cual, rápidamente se cicla transformándose en histidil prolina dicetopiperacina, que sería el metabolito activo de la T R H.

Este hecho, se vió apoyado por los estudios realizados por -- Taylor y Dixon (1978), quienes purificaron parcialmente dicho enzima del suero de rata, separándolo de otros enzimas séricos que degradan la TRH.

Se podría esquematizar el metabolismo de la T R H como sigue:



Los enzimas implicados en el metabolismo de la TRH presentan interesantes propiedades, puestas de manifiesto por Prasad y Peterkofsky (1976).:

- 1º) La TSH inhibe la actividad de la TRH amidasa, pero no la actividad de la piroglutamatoaminopeptidasa.
- 2º) La hidrocortisona inhibe actividad de la piroglutamatoaminopeptidasa, pero no inhibe a la TRH amidasa.
- 3º) La TSH, entre otras muchas hormonas polipeptídicas, es capaz de inhibir la actividad de la histidil prolinamida imidopeptidasa.

De estos resultados sacaríamos dos consecuencias fundamentales:

a) La TSH además de su aceptado control por retroalimentación de las hormonas tiroideas podría conseguir que la TRH se metabolizara preferencialmente a histidil prolina dicetopiperacina, al bloquear la degradación de TRH a TRH ácida y de histidil prolinamida a histidina y prolinamida. Es decir que la hipófisis puede retroalimentar al hipotálamo y regular su propia función.

b) La hidrocortisona al inhibir la piroglutamato-amino-peptidasa podría bloquear la formación de histidil prolina dicetopiperacina.

El principal metabolito de la TRH es la Histidil-Prolina-Dicetopiperacina; cuya estructura química se aprecia en la figura 16.

Los trabajos de Prasad y Peterkofsky (1976) demostraron que era el metabolito activo de la TRH.

Se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro de rata a mayores concentraciones que la TRH. (Yanagisawa y Cols. 1980), en tanto que la TRH ácida se encuentra en bajas concentraciones (Emerson y Cols. 1980).

Se han demostrado receptores de membrana para la TRH (Vale y Cols. 1977), pero en los momentos actuales no se conocen receptores de membrana para la histidil prolina diceto-piperacina.

Este metadolito presenta ciertas peculiaridades:

- 1º) Para el antagonismo de la narcosis paretanol y aumento de GMPC. cerebeloso, producidas por la T R H, (Breese y Cols. 1974 a y Mailman y Cols. 1979), la histidil prolinadicetopiperacina tendría mucha mayor potencia que la T R H (Prasad y Cols. 1977 y Yagisawa y Cols. 1979). Es decir que en estos casos la T R H sería como una prohormona de su metabolito.
- 2º) La histidil prolina dicetopiperacina presenta acciones distintas a la T R H, es capaz de inducir hipotermia en la rata (Prasad y Cols. 1978) y de inhibir la secreción de prolactina (Bauer y Cols 1978 y Enjalbert y Cols. 1979), contrariamente a la T R H que induce hipertermia (Brown y Cols. 1977 b) y liberación de prolactina (Vale y Cols. 1977).
- 3º) Frente a otras conocidas acciones de la T R H, como el antagonismo de la narcosis inducida por pentobarbital, la histidil prolina dicetopiperacina carece de efecto (Peterkofsky y Battaini 1980).

1 - 6 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS DE LA T R H

Los primeros estudios realizados por Piva y Steiner (1972), mostraron que la T R H era muy poco tóxica, ya que su DL 50 por vía endovenosa en la rata era de 2.500 mgs./Kg.

Los mismos autores realizaron un estudio toxicológico a corto plazo (11 días) administrando la T R H por vía endovenosa a grupos de 10 ratas (5 machos y 5 hembras), a las dosis de 1,20 y 100 mgs./Kg./día. Sus resultados muestran una carencia de mortalidad y un ligero descenso del peso corporal. En el estudio Histológico aprecian un ligero aumento de la altura epitelial y disminución del coloide en el tiroides, de los animales que recibieron las dosis más elevadas.

Nosotros (Palop y Cols. 1977; Escartin y Cols. 1977) realizamos un ensayo toxicológico de la T R H a largo plazo (6 meses), administrando el tripéptido en el agua de bebida a grupos de 20 ratas (10 machos y 10 hembras) a las dosis de 1,20 y 200 mgs./Kg./día.

Observamos una carencia de mortalidad para todas las dosis ensayadas, un descenso del peso corporal en los animales machos de las dosis más elevadas y una hipocolesterolemia.

El hallazgo más significativo encontrado fué la hipertrofia mamaria acompañada de secreción láctea en las ratas hembras que recibieron 20 y 200 mgs/Kg./día de T R H. En el estudio histológico de este órgano, no se observaron alteraciones a la dosis de 1 mgs./Kg./día y apareció una displasia mamaria a la dosis de 20 y 200 mgs./Kg./día que pareció ser dosis dependiente en cuanto a la frecuencia de presentación de las lesiones.

En su día, se observó una alteración al efecto liberador de la prolactina ejercido por la T R H.

Se observó también una hiper celularidad o hiperplasia en hipófisis, tiroides y suprarrenales a la dosis de 20 y 200 mgs/Kg. que explicaron el aumento de peso encontrado en dichos órganos.

No se observó modificación histológica alguna en el resto de órganos estudiados: bazo, corazón, hígado, riñón, pulmón, páncreas, estómago, intestino delgado, timo, ovarios, útero y testículos.

Estos resultados confirman la baja toxicidad del tripéptido, ya que la mínima dosis ensayada, 1 mg./Kg./día, que supera en alto grado a la máxima dosis parenteral utilizada en seres humanos, no mostró modificación alguna en los parámetros estudiados.

1 - 7 ACCIONES DE LA T R H1 - 7 -1.- EFECTOS ENDOCRINOS

-LIBERACION DE LA TSH.- En numerosos estudios realizados por (Schally y Cols. 1973; Vale y Cols. 1977; Hall y Gomez Pam 1976; Schally y Arimura 1978), la T R H ha mostrado su capacidad de estimular la liberación de TSH en mamíferos como el ratón, la rata, la nutria, la oveja, la cabra, la vaca, las aves y en seres humanos.

La T R H estimula también la síntesis de TSH.

La estimulación de la liberación de TSH la realiza tras unirse a receptores de alta afinidad de la TSH, activación de la adenilciclase y generación subsiguiente de AMP cíclico (Herschman 1974).

La secreción de TSH es primariamente regulada por el efecto supresor por retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas a nivel de la TSH siendo la T R H el punto decisivo de esta interacción (Reichlin y Cols. 1978).

La Dopamina (Scanlon y Cols. 1979) y la Somatoestatina (Tanjasiri y Cols. 1976) pueden funcionar como factores fisiológicos inhibidores de la TSH reduciendo el grado de liberación de la misma inducido por la T R H.

La secreción de TSH y su respuesta a la T R H la modulan también los niveles de esteroides sexuales, cortisol, y h. del crecimiento en la circulación periférica.

Cuando se administra T R H, a dosis de 200-500 ugs, por vía endovenosa a personas normales el máximo incremento en los niveles séricos de TSH ocurre entre los 15 y 30 minutos (Hershman 1974; Sawin y Hershman 1976). Esta respuesta TSH origina un incremento en la Triyodotironina 90-150 minutos después de la administración de TRH. Los incrementos en los niveles de tiroxina son menos notorios y más tardios en su aparición.

La dosis mínima de T R H requerida para producir una respuesta TSH es de 15 úgs. y se obtiene un incremento dosis dependiente hasta llegar a 400 úgs. pasados dichos niveles no se consigue mayor incremento (Snyder y Utiger 1972).

Por vía oral la T R H podría ser eficaz, requiriendo dosis 20-40 veces superiores (ello refleja o bien una dificultad en su absorción digestiva, o una destrucción sufrida en el tracto gastrointestinal o en el hígado).

Entre personas normales, las mujeres presentan una mayor respuesta TSH, que los hombres, y en los hombres, pero no en las mujeres, es fisiológico hallar un descenso en la respuesta TSH conforme avanza la edad. (Snyder y Utiger 1972; Burger y Patel 1977). Como veremos en indicaciones este test es de inapreciable valor en el diagnóstico de alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo.

-LIBERACION DE PROLACTINA.- La T R H puede liberar prolactina en ratas, ovejas y seres humanos (Jacobs y Cols. 1971; Tashjian y Cols. 1971; Bowers y Cols. 1971 y Debeljuk y Cols. 1973).

Sin embargo parece no jugar un papel importante en la regulación de la secreción de prolactina (Gautvik y Cols. 1974; Harris y Cols. 1978). La administración endovenosa de 500 úgs. de T R H origina una liberación de prolactina, con un aumento máximo a los 15 - 30' de la administración (Alcanzándose valores de dos o más veces superiores a los normales).

Para la evaluación de las hiperprolactinemias el test de la TRH ha sido de menos ayuda de lo que en un principio se había anticipado.

-MODIFICACION DE LA SECRECION DE HORMONA DEL CRECIMIENTO.- En personas normales la T R H previene la normal inducción por el sueño del aumento de h. de crecimiento (Chihara y Cols. 1977); además previene en las ratas normales la estimulación de la liberación de H. del crecimiento inducida por el pentobarbital (Brown y Vale 1975 a) tras la administración intracerebroventricular.

En personas normales la T R H no estimula la liberación de H del crecimiento pero si que lo hace en el 50% de los pacientes con acromegalía (Jackson 1980 b)

En enfermedades hepáticas, insuficiencia renal, anorexia nerviosa y en depresiones la T R H puede estimular la liberación de H del crecimiento (Morley 1979; Maeda y Cols. 1.975).

Estos hechos sugieren que la T R H tiene un efecto predominante sobre el SNC para inhibir la secreción de hormona de crecimiento en la hipófisis, sin embargo, cuando las vías aminérgicas o peptidérgicas centrales, o ambas, están alteradas, el normalmente débil — efecto estimulador sobre la adenohipófisis se pone de manifiesto (Jackson 1982).

1 - 7 - 2.- ACCIONES CENTRALES DE LA T R H

La localización de la T R H en el SNC extrahipotalámico sugiere un papel fisiológico para este péptido endógeno sobre todo en el área motora del SNC. Por los estudios farmacológicos realizados, diversos autores (Yarbrough 1.979, Jackson y Reichlin — 1.979) opinan que independientemente de sus defectos endocrinos la T R H podría actuar como un neurotransmisor.

En un trabajo reciente, Kalivas y Horita (1.980) demuestran que la T R H a concentración de picomoles, aplicada en determinadas zonas del cerebro de rata antagoniza la narcosis inducida por el pentobarbital. Lo interesante de este trabajo es que se demuestra que en la respuesta analéptica y en la respuesta termogénica participan lugares distintos del SNC presentando una exquisita sensibilidad a la T R H aplicada en dichas zonas. Este dato apoya el papel postulado para la T R H como neuromodulador.

De las condiciones exigidas sustancia endógena para ser considerada como un neurotransmisor (Cooper y Cols 1.978) la T R H cumple con casi todas ellas, como vemos a continuación.

- 1º) Se ha localizado T R H en las terminaciones nerviosas (Hokfelt y Cols 1.975 a)
- 2º) Se libera bajo estímulo despolarizante a partir de preparaciones sinaptosómicas hipotalámicas (Maeda y Fruhman 1.980).
- 3º) Se han identificado receptores con alta afinidad para la T R H en el cerebro extrahipotalámico (Ogawa y Cols 1.981). Ahora bien la distribución de estos receptores no es completamente paralela con los niveles de T R H extrahipotalámica.
- 4º) Aplicada por microiontoforesis la T R H induce en algunas regiones del cerebro de rata un aumento prolongado en la excitabilidad, lo que sugiere que en dichas zonas la T R H modularía la acción de otras sustancias transmisoras (Renaud y Cols 1979). Sin embargo aplicada en otras regiones del cerebro de rata el efecto conseguido es de corta duración, lo que puede reflejar --

efectos directos sinápticos (Renaud y Cols 1.979).

- 5º) Aunque no se ha observado recaptación de la T R H en la terminación nerviosa (Parker y Cols 1.977) se han identificado los enzimas - que metabolizan a la T R H en el SNC.
- 6º) Se ha descrito síntesis de T R H en el tejido neuronal de vertebrados. Todo lo anterior va a favor de que la T R H en algunas -- áreas del SNC actúa como un neurotransmisor ortodoxo mientras que en otras zonas modula los efectos de la monoaminas neurotransmisoras (Cooper y Cols 1.978).

Como corresponde a la importancia de su papel en el SNC la -- T R H está dotada de un gran número de acciones centrales, que dividiremos en los siguientes apartados:

ACCIONES ELECTROFISIOLÓGICAS

ACCIONES COMPORTAMENTALES PROPIAS

ACCIONES BIOQUÍMICAS

INTERACCIONES COMPORTAMENTALES CON OTROS FARMACOS

COMPARACION DE LA T R H CON AMFETAMINA

ACCIONES ELECTROFISIOLÓGICAS

=====

Estas acciones corroboran la importancia de la acción central de la T R H. Trabajos realizados por Renaud y Martin (1975) y Renaud y Cols. (1975) mostraron que aplicando T R H por iontoforesis sobre neuronas del SNC, se inhibía la frecuencia de descarga en más del 70 % de las células examinadas, en el cortex cerebral, hipotálamo ventromedial, columna nuclear dorsal y cortex cerebeloso. Este efecto se acompañó con un incremento del 30 % en la amplitud de la espiga (punta).

En estudios más recientes los mismos autores (Renaud y Martin 1976) mostraron que un análogo de la T R H, conteniendo los dextroisómeros de los tres aminoácidos constituyentes de la misma, era inactivo en esta prueba. En cambio, la 3-METIL-HISTIDIL-TRH (dotado de potente acción endocrinológica y central) posee una acción depresora sobre la frecuencia de descarga de las neuronas, mucho más potente que la T R H.

Estudiando las acciones excitatorias de la acetilcolina sobre la actividad espontánea de las neuronas cerebrocorticales, Yarbrough y Singh (1978) demostraron que la aplicación intravenosa de T R H potenciaba el efecto excitatorio de la Acetilcolina.

Se han estudiado en el gato, King (1975), los cambios inducidos en los parámetros sueño-insomnio, tras la inyección intraventricular de la T R H a dosis de 200 ugs. Se observaron aumentos en el tiempo de latencia para dormir y en el tiempo que el animal permanecía despierto y en el registro electroencefalográfico se inhibieron las ondas lentas y el sueño MOR (sueño con movimientos oculares rápidos).

En apoyo de la hipótesis de que la T R H es un excitante fisiológico los trabajos de White y Beale (1975) en el conejo curarizado, demostraron que la administración intracerebral de 200 ugs. de T R H es seguida de una activación electroencefalográfica que dura más de 30 minutos.

ACCIONES COMPORTAMENTALES PROPIAS

=====

-EXCITACION GENERALIZADA.- En el estudio toxicológico realizado por Piva y Steiner (1972) ya se advirtió que la administración de 100 mgs. de T R H por vía endovenosa durante 11 días originaba: Temblor, pilo erección, erección de la cola y movimientos masticatorios con las patas delanteras.

Estudios posteriores realizados por Schenkel-Hulliger y Cols. (1974), demostraron que la mayor parte de estos efectos ocurrían administrando la T R H a dosis más bajas.

Los trabajos de Prange y Cols. (1974) demostraron que incluso en ratas anestesiadas con pentobarbital la administración de T R H originaba lacrimación, temblor y erección de la cola (fenómeno de Straub).

Los mismos autores demuestran que se trata de una acción central ya que persiste en ratas hipofisectomizadas y tiroideotomizados.

Sin embargo la administración de T R H a monos no origina alteración en la actividad motora, disminuyendo la exploración ambiental y los comportamientos dominantes, aumentando la mansedumbre de los animales (Crowley y Hydingen 1976).

-REGULACION DE LA TEMPERATURA CORPORAL.- La T R H en algunas especies origina hipertermia y en otras origina hipotermia. El papel -- termoregulador se aprecia también en su capacidad de antagonizar la hipotermia originada por numerosos fármacos y sustancias endógenas.

Considerando esta acción en el conejo, nos encontramos con -- dos trabajos contradictorios. Por un lado Horita y Carino (1975) administrando T R H por vía intracerebroventricular (1-200 ugs.) o intraperitoneal (1-10 mgs./Kg.) observan una hipertermia asociada con excitación e hiperactividad.

Por el contrario los trabajos de White y Beale (1975) no observan hipertermia tras la administración intracisternal de 200 ugs. de TRH, a conejos curarizados.

Si consideramos esta acción en el gato los trabajos de Metcalf (1974) mostraron que la administración intracerebroventricular de T R H origina una hipotermia dosis dependiente, destacándose que dosis de 3 Nanogramos de T R H descienden la temperatura corporal 0,5°C.

Este efecto es confirmado por Myers y Cols. (1977), demostrando su independencia del eje hipofisotiroideo, pues la TSH y la triyodotironina carecen de acción y además la acción aparece si se inyecta en el mesencéfalo pero no en el hipotálamo. Además esta hipotermia es independiente del sistema noradrenérgico pues no es modificada por la administración -- previa de Alfa-Metiltirosina ni de fentolamina.

En la rata mantenida a temperatura ambiente la T R H origina -- hipertermia (Brown y Cols. 1977 b).

En el ratón normotérmico, la administración de T R H por vía en dovenosa a dosis de 0,1-10 mgs./Kg. no aumenta la temperatura corporal (Metcalf y Dettmar 1981).

Los trabajos de Prasad y Cols. (1978) se ocupan ampliamente del efecto termorregulador de la T R H y han tratado de elucidar el papel de la histidil-prolina diceto-piperacina en esta acción. Dichos autores demuestran que la inyección intracerebroventricular de este metabolito origina una hipotermia dosis dependiente en ratas mantenidas a 4°C y a 21°C pero no a 31°C. La T R H se opone a este efecto hipotermizante lo que -- apoya el concepto de que el tripéptido modula el efecto hipotérmico de -- la histidil-prolina-dicetopiperacina.

--INDUCCION DE UN CUADRO SIMILAR AL SINDROME DE ABSTINENCIA -- MORFINICA EN LA RATA.-- Este cuadro fué descrito por Wei y Cols. (1975 y 1976), quienes observaron que la inyección de T R H en la sustancia gris periacueductal que rodea el 4º ventrículo, en hipotálamo medio y en el -- área preóptica originaba en la rata sacudidas que recuerdan las de "un perro saliendo del agua", temblor de las patas e intensos escalofríos. Estos autores establecieron la hipótesis de que la T R H activaría los circuitos neuronales que conducen al ahorro de calor. Esta hipótesis es demos --

trada por Kalivas y Horita (1980) que demuestran que la neurogénesis es similar, a la del antagonismo de la hipotermia en ratas narcotizadas con pentobarbital.

Los primeros autores citados, comprobaron una correlación positiva entre el contenido regional de T R H y el grado de respuesta a la inyeción de T R H; demostrando además, que las áreas del cerebro donde la aplicación de naloxona precipita el síndrome de abstinencia en ratas morfímanas, son paralelas a las áreas cerebrales que mejor responden a la aplicación de T R H.

Sorprendentemente para esta acción, los mismos autores no observan disociación entre los efectos endocrinos y centrales de la hormona.

Otros autores estudiaron esta acción de la T R H (Martín y Cols. 1.977) y observaron que la inducción de este síndrome es bloqueado por la administración de morfina, clorpromacina y apomorfina.

Estos mismos autores constataron que la T R H aumenta las sacudidas que recuerdan las " de un perro saliendo del agua " que aparecen en el síndrome de abstinencia morfínica sin alterar la unión estereoespecífica de la morfina en el cerebro de rata " in vivo " o " in vitro ".

Recientemente se ha demostrado que la T R H ácida, metabolito de la T R H que se consideraba desprovisto de toda actividad biológica, es equipotente con la T R H en la inducción de este síndrome (Boschi y Cols. 1.980).

INHIBICION DE LA AGRESIVIDAD INDUCIDA POR AISLAMIENTO EN EL RATON. (MALIK 1.976). La T R H es extraordinariamente eficaz ya que la DE 50 es de 0,04 mg. Kg. por vía intraperitoneal apareciendo los efectos a los 30 minutos y durando unas 3 horas.

El mismo autor demuestra que la triyodotironina, los aminoácidos constituyentes de la T R H y la d-amfetamina carecían de efecto.

AUMENTO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y DISMINUCION EN EL CONSUMO DE ALIMENTOS. Estas acciones descritas por Barlow y Cols. (1975) dan a la T R H un perfil similar a la amfetamina. Con independencia de las

tablas que se verán al final de las acciones centrales, puede destacarse ya, que el pretratamiento con 6-Hidroxi-dopamina intracerebral (que destruye las vías catecolaminérgicas centrales), antagoniza el efecto anorexígeno de la amfetamina, aumentando en cambio el de la T R H.

Los mismos autores muestran que el MIF, la T R H y los aminoácidos constituyentes de la T R H no originan estas acciones. Podemos por ello deducir que:

- 1º) Estas acciones son independientes del eje hipofiso-tiroideo.
- 2º) No son atributo inespecífico de los péptidos de bajo peso molecular.

CAPACIDAD PARA ACTUAR COMO ESTIMULO DISCRIMINATIVO EN APRENDIZAJE CONDICIONADO. (JONES Y COLS. 1.978). Demuestran que en pruebas repetidas las ratas pueden distinguir entre T R H, amfetamina y suero fisiológico.

El máximo efecto de la T R H se observa de 5 a 15 minutos -- después de la inyección intraperitoneal de 20 mgs.Kg. y que desaparece al cabo de 1 hora.

ACCIONES BIOQUIMICAS
=====

Se ha tratado de elucidar el mecanismo de acción de la T R H sobre el SNC, examinando los efectos de la T R H sobre los niveles endógenos de diversas aminas biógenas.

Los estudios de Hine y Cols. (1.973) demostraron que la administración intraperitoneal de 10 mgs.Kg. de T R H en el perro originaba un cuadro de activación simpática generalizada similar al obtenido con amfetamina. Sin embargo no observaban modificación en los niveles cerebrales de Dopamina, Noradrenalina y Serotonina, ni en sus metabolitos más importantes, ácido homovainílico, ácido vainillilmandélico y - ácido 5-hidroxiindolacético.

Sin embargo, en ratas tratadas con T R H, los mismos autores observan un aumento significativo en la concentración cerebral de 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol (Mopog) que es un importante metabolito de la Noradrenalina en el sistema nervioso central.

A mayor abundamiento debemos destacar los interesantes estudios realizados por Keller y Cols. (1974). Dichos autores, confirman -- que en la rata no se modifican los niveles totales de Noradrenalina, Dopamina y Serotonina.

Estos autores confirman también el aumento de 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol, no solo en el cerebro total sino también en las diversas regiones estudiadas. Demuestran además que esta acción ocurre en ratas tiroidectomizadas.

Debido a que dicho metabolito se elimina por un mecanismo de transporte similar al de otros metabolitos que no se modificaron, se pensó en la posibilidad que el aumento cerebral de 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol, se debiera a un incremento en la liberación de Noradrenalina y su consecuente catabolismo. Esta posibilidad la demostraron los mismos autores, ya que tratando con T R H a las ratas una hora antes de la inyección intraventricular de 14 C.-tirosina aumentaba la acumulación de

14 C.-Noradrenalina formada en el cerebro total, sin modificarse 14 C.-Dopamina. Estos resultados, indican que tras el tratamiento con T R H, hay un incremento en las síntesis de Noradrenalina cerebral para compensar el aumento en la liberación, ya que el nivel endógeno de Noradrenalina no se modifica.

A conclusiones similares llegan los trabajos realizados por Constantidinis y Cols. (1.974), Reigle y Cols. (1.974) y Horst y Spirt (1.974).

Horst y Spirt (1.974) opinan que en los cambios observados podían explicar los efectos antidepresivos de la T R H ya que en el Test Pargilina-Dopa los efectos de la T R H son aditivos con los de la Imipramina lo que sugiere que actúan por mecanismos distintos.

Cuenca (1.976), señala la importancia de estos resultados como apoyo de la hipótesis catelominalérgica de la depresión.

Sin embargo, los trabajos de Nemeroff y Cols. (1.977 a), no confirman estos resultados. Dichos autores administrando la T R H de forma aguda o crónica (5-9 días) no observan modificación alguna en la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa cerebral. También observan que el incremento en la actividad de dicho enzima inducido por Reserpina no se modifica con la T R H.

Los autores señalan que aún mostrando claramente que no se induce una nueva síntesis enzimática, existiría la posibilidad de que el tratamiento con T R H indujera una activación alostérica transitoria de la biosíntesis enzimática.

Los mismos autores, coincidiendo con los trabajos precedentes, no observan modificaciones en los niveles totales de las tres aminas estudiadas.

Cuenca y Cols. (1.975) demostraron que la T R H aumentaba la respuesta del conducto deferente aislado de rata a la Nodrenalina.

Las relaciones aminas biógenas T R H se complican aún más tras

los trabajos de Battaini y Peterkofsky (1.980), quienes demuestran que en los sinaptosomas obtenidos del estriado de rata, la T R H no modifica la recaptación de Dopamina, pero su metabolito, la Histidil-prolina dicetopiperacina, sí.

Los mismos autores, estudian el mecanismo, de esta inhibición demostrando que es similar a la ouabaina bloqueando la actividad de la bomba de sodio (la Dopamina es cotransportada al interior de los sinaptosomas con el sodio).

Estudiando los efectos de la T R H y la Histidil-prolina - dicetopiperacina sobre la ATP asa sódico-potásica de los sinaptosomas, demuestran que la T R H carece de efecto y en cambio el dipéptido, a concentraciones similares a las necesarias para inhibir la recaptación de Dopamina, inhibe la actividad enzimática.

El lugar de unión de la Histidil-prolina-dicetopiperacina a la ATP asa sódico potásico es distinto al de la ouabaina, y los mismos autores demuestran que se une en el mismo sitio del vanadato en la superficie interna de la membrana plasmática.

Esta actividad del matabolito de la T R H, a diferencia de su precursor no es sorprendente pues como hemos apuntado anteriormente, para ciertas acciones la T R H se comporta como prohormona del mismo (ANTAGONISMO DEL ETANOL), pero en otras ocasiones presenta acciones distintas.

Se han estudiado los efectos de la T R H sobre la Acetilcolina, mostrando que carece de efecto en ratas normales, pero en cambio, en ratas tratadas con Pentobarbital, la T R H es capaz de antagonizar los incrementos regionales de Acetilcolina inducidos por el Pentobarbital. (Schmidt 1.977).

Esto, parece indicar que la T R H puede estimular neuronas colinérgicas cuando su actividad se ha deprimido con drogas sedantes, pudiéndose relacionar esta acción bioquímica con el efecto analéptico de la T R H. En apoyo de esta hipótesis los trabajos de Kalivas y Horita (1.980) demuestran la exquisita sensibilidad del sistema septo-

hipocámpico (controlado por el sistema colinérgico) a la acción analéptica de la T R H en ratas tratadas con Pentobarbital.

Se estudió el efecto de la T R H sobre la Adenilciclase y se observó que la T R H no aumentaba su actividad (Green y Cols. 1976).

Sin embargo Mailman y Cols. (1.978) observan que la T R H aumenta los niveles basales de G.M.P. c. cerebeloso, antagonizando la reducción de G.M.P. c. inducida por etanol en ratas normales e hipofisectomizadas.

En los momentos actuales autores como Dodson y Johnson (1979) y Redos y Cols. (1976 a) opinan que el etanol origina un descenso de G.M.P. c. en el cerebelo, sin encontrar modificaciones en los niveles de A.M.P. c. (Redos y Cols. 1.976 b).

Los últimos autores, (1.976 a) demuestran que cuando disminuye la concentración de etanol en sangre, los niveles de G.M.P. c. cerebeloso retornan a los valores normales, y, cuando las ratas se tratan crónicamente con etanol, la deplección de G.M.P.c.cerebelosa es inferior lo que se asocia con la aparición de tolerancia al alcohol.

Recientemente se ha demostrado que el metabolito de la T R H, la Histidil-prolina dicetopiperacina antagoniza el sueño inducido por etanol, en ratas y también el descenso de los niveles de G.M.P.c. cerebeloso (Yanagisawa y Cols. 1.979), si bien con un patrón algo distinto a la T R H. Así la T R H induce un aumento precoz a los 5 minutos, seguido de un descenso gradual a partir de los veinte; en tanto que para la Histidil-prolina dicetopiperacina el aumento precoz se sigue de un brusco descenso antes de los veinte minutos, a partir del cual, se origina otro incremento en los niveles de G.M.P.c. que dura aproximadamente una hora.

Estos hechos, apoyan el concepto sostenido por dichos autores de que los efectos de la T R H sobre los niveles de G.M.P.c. y sobre el sueño inducido por etanol, implican la conversión metabólica de T R H en Histidil-prolina dicetopiperacina.

El haloperidol no bloquea el aumento de G.M.P.c. cerebeloso inducido por T R H pero sí el inducido por apomorfina (Mailman y Cols. 1.979), y consecuentemente afirman que el aumento en los niveles de — G.M.P.c. cerebeloso inducido por la T R H, no está relacionado con la activación de receptores dopaminérgicos.

MODIFICACION DEL EFECTO DE OTROS FARMACOS (INTERACCIONES)

-POTENCIACION DE LOS EFECTOS ESTIMULANTES DE LA L-DOPA EN RATAS Y RATONES TRATADOS CON PARGILINA.- Plotnikoff y Cols. (1972) fueron los primeros en describir esta acción farmacológica con la T R H. Demostraron sin ninguna duda, que la T R H potenciaba los efectos de la L - Dopa (100 mgs./Kg. vía intra-peritoneal) en ratas y ratones pretratados con Pargilina (40 mgs./Kg. vía oral).

La T R H conservaba esta acción si se administraba a animales hipofisectomizados y tiroidectomizados (Plotnikoff y Cols. 1972 y 1974).

Huidobro - Toro y Cols. (1974), confirmaron que la T R H administrada por vía intracerebroventricular era activa y además que el MIF (Prolil - Leucil - Glicinamida) y la Angitensina II eran también eficaces.

En un trabajo posterior, Plotnikoff y Cols.(1975), mostraron:

- 1º) Que no aparecía tolerancia a este efecto de la T R H, al observar que la administración durante 5 días de T R H no modificaba la respuesta.
- 2º) Potenciaba los efectos de la imipramina.
- 3º) La acción se conservaba en animales suprarrenalectomizados, timectomizados, nefrectomizados, esplenectomizados, paratiroidectomizados, castrados y pinealectomizados. (Sin embargo en los 3 últimos casos se redujo la potencia de la T R H.

La actividad de la T R H en esta prueba fué la base de su utilización en clínica como antidepresivo.

Posteriormente Berensen y Cols. (1976) han señalado la poca especificidad de esta prueba, mostrando que numerosos péptidos como; Sustancia P, Hormona tireotropa, Somatoestatina, MIF, LH -RH, encefalinas, y Endorfina; y también numerosos fármacos no antidepresivos como el clor deacepóxido y la Atropina pueden dar una respuesta positiva en esta prueba.

-POTENCIACION DE LOS EFECTOS CENTRALES DE LA SEROTONINA.- La demostraron Green y Grahame - Smith (1974).

Se administró T R H a ratas que recibían tranilcipromina (IMAO que impide la destrucción de serotonina) y L-Triplófano (Precursor de la serotonina).:

Los mismos autores descartaron la participación del eje hipofisotiroideo en esta acción.

El efecto se presentaba sin que se modificaran los niveles de serotonina cerebral, ni los de triptófano, por lo que se sugirió que la T R H alteraría la sensibilidad del receptor serotoninérgico postsináptico.

Los mismos autores destacan que la T R H aumenta la hiperactividad inducida por la 5 - Metoxi - N - N - Dimetiltriptamina, que es un agonista de los receptores serotoninérgicos centrales.

Huidobro - Toro y Cols. (1974) utilizando la pargilina como IMAO y el 5 hidroxitriplófano como precursor de la serotonina, confirman este efecto en el ratón, administrando la T R H por vía intracerebroventricular e intraperitoneal. Dichos autores demuestran que este test es más específico que el anterior, ya que ni el MIF ni la angiotensina II son activos.

-ACCION ANALEPTICA.- Es una de las acciones más importantes de la T R H y diversos autores lo han señalado como un analéptico endógeno. (Metcalf y Dettmar 1981).

La T R H, tanto administrada periférica como centralmente antagoniza la sedación e hipotermia inducida por un gran número de depresores centrales como : Barbitúricos, hidrato de cloral, reserpina, clorpromacina, diazepam y etanol, (Bissette y Cols. 1976 a y 1978; Breese y Cols. 1974 a y b, y 1975; Brown y Vale, 1975b; Cott y Cols. 1976; Green y Cols. 1976; Kraemer y Cols 1976; Prange y Cols. 1974, 1975 a y b).

El antagonismo frente al pentobarbital, ha sido estudiado con gran detalle por Prange y Cols. (1975 b), demostrando que la T R H antagoniza la sedación e hipotermia inducida por el pentobarbital durante el día; en cambio si la administración de T R H es por la noche unicamente se antagoniza la hipotermia. Además la T R H es capaz de antagonizar la hipotermia inducida por el pentobarbital independientemente de la temperatura a que se sometieran los animales.

Otros autores como Brown y Vale (1.975 b), confirman igualmente el antagonismo frente al pentobarbital, mostrando que la administración endovenosa de T R H, aumenta la DL 50 (Disminuye la mortalidad) -- del pentobarbital en un 25%, tanto en ratas intactas como hipofisectomizadas.

Peterkofsky y Battaini, (1.980) observan que la histidil-prolina dicetopiperacina no antagoniza la acción depresora del pentobarbital, es decir que en este caso la T R H no actuaría como prohormona de su metabolito.

El antagonismo de la T R H frente al etanol fue descrito por Breese y Cols. (1.974 a). Posteriormente Prasad y Cols. (1.977) demostraron que la histidil-prolina dicetopiperacina era 50 veces más potente que la T R H en esta acción.

Debido a que la amfetamina es también un potente antagonista de algunos depresores, al final de este capítulo se reflejarán en una tabla las analogías y diferencias existentes entre ambos compuestos.

Es imposible en los momentos actuales establecer un mecanismo de acción unitario que explique este efecto de la T R H. Sin embargo disponemos de una serie de datos importantes que pasamos a enumerar a continuación:

- 1º) La T R H no modifica el metabolismo del etanol (Cott y Cols. 1.976).
- 2º) La T R H no modifica el metabolismo del pentobarbital (Breese y Cols. 1.975, Green y Cols. 1.976, Kraemer y Cols. 1.976).

- 3º) Esta acción es independiente de sus efectos endocrinos Cott y Cols. (1.976). Dichos autores trabajando con análogos estructurales de la T R H observaron que algunos de ellos que eran incapaces de liberar TSH, tenían mayor potencia analéptica que la T R H.
- 4º) Este efecto no es mediado por el AMP cíclico (Cott y Cols. 1.976).
- 5º) Es independiente del sistema noradrenérgico (Cott y Cols. 1.976). Dichos autores demostraron que al administrar noradrenalina o amfetamina por vía intracerebral no se potenciaba el efecto analéptico de la T R H; por otro lado la administración de bloqueantes adrenérgicos como la fentolamina o el propanolol no reducía dicho efecto.
- 6º) La histidil-prolina dicetopiperacina (metabolito activo de la T R H) podría ser la responsable del efecto analéptico de la T R H frente al etanol; sin embargo es ineficaz frente al pentobarbital (Peterkofsky y Battaini 1.980).
- 7º) Se trató de implicar al sistema gabaérgico en esta acción (Cott y Engel, 1.977). Dichos autores señalaron que los fármacos que remedaban las acciones del GABA como el baclofen, ácido α hidroxibutírico y ácido aminooxiacético, antagonizaban los efectos analépticos de la T R H sobre el etanol.
- Este trabajo es duramente criticado por Yarbrough (1.979), quién señala que el muscinol, selectivo y potente agonista gabaérgico de acción central es totalmente incapaz de antagonizar el efecto analéptico de la T R H.
- 8º) El sistema colinérgico podría implicarse en esta acción. Cott y Cols. (1.976), demostraron que la atropina metilnitrato, -- que pasa en muy poca proporción la barrera hematoencefálica, administrada por vía intraperitoneal no modificaba la respuesta, en cambio al administrarla por vía intracerebroventricular

antagonizaba de modo significativo el efecto analéptico de la T R H. Las conclusiones de este trabajo son obvias:

- A) El efecto de la T R H es central.
- B) Requiere la integridad del sistema colinérgico en el SNC.

Los trabajos de Kalivas y Horita (1.980), apoyan decisivamente la importancia del sistema colinérgico en la acción analéptica de la T R H.

- POTENCIACION DE LA ACCION ANTICONVULSIVA DEL FENOBARBITAL

El máximo inconveniente en la utilización clínica del fenobarbital cuando se utiliza en el Gran Mal epiléptico, es la sedación.

Como se ha visto en la acción analéptica, la T R H antagoniza la sedación inducida por pentobarbital.

Nemeroff y Cols. (1.975), observaron que la T R H y un tetrapéptido análogo, carentes ambos de acción anticonvulsiva en el electroshock practicado en ratones, al asociarlos con el fenobarbital potenciaban de modo manifiesto el efecto anticonvulsivo del mismo.

El electroshock se considera como el modelo experimental de elección para la valoración de fármacos activos en el Gran Mal epiléptico (Swinyard 1.972).

En el mismo trabajo se demuestra que tanto el MIF, como la TSH y la Triyodotoronina carecían de eficacia. Se pueden extraer de todo ello las siguientes consecuencias:

- a) Esta acción no es atributo de los péptidos de bajo peso molecular.
- b) Esta potenciación es independiente de la activación del eje hipofiso tiroideo.
- c) La T R H podría utilizarse en clínica asociada al fenobarbital frente al Gran Mal epiléptico, ya que antagonizaría la sedación al tiempo que potenciaría su acción anticonvulsiva.

—ANTAGONISMO DE LA LIBERACION DE HORMONA DE CRECIMIENTO
INDUCIDA EN LA RATA POR PENTOBARBITAL Y MORFINA.

El conocido antagonismo de la T R H frente a la sedación inducida por el pentobarbital, fue la base para que Collu y Cols (1.975) estudiaran esta acción. El efecto aparece tanto en ratas intactas como tiroidectomizadas, pero la triyodotironina es también activa. Los mismos autores observan que el propranolol antagoniza el efecto de la T R H pero no modifica la acción de la triyodotironina.

Brown y Vale (1.975 b), muestran que la T R H, su análogo metilado y la somatoestatina inhiben la liberación de h. de crecimiento inducida "in vivo" por la morfina y el pentobarbital, demostrando que los efectos de la morfina y el pentobarbital son centrales pues carecen de efecto en preparaciones hipofisarias.

Estos autores, contrariamente a lo que habían demostrado Prange y Cols.(1.975 a), referente a la disociación de efecto analéptico y liberación de TSH, demuestran que análogos de la T R H con poca actividad estimulante de la liberación de TSH, son incapaces de inhibir la liberación de h. de crecimiento inducida por el pentobarbital.

Además: contrariamente a la T R H, estos últimos análogos no inducen la vibración rápida de la cola, cuando se administran a ratas tratadas con morfina.

— ANTAGONISMO DE LA LIBERACION DE PROLACTINA INDUCIDA POR
PENTOBARBITAL

La T R H, como hemos descrito en sus acciones endocrinas, origina liberación de prolactina, es capaz, como demostraron Tache y Cols. (1.977), de inhibir la secreción de prolactina inducida por el pentobarbital. El efecto es evidente al administrarla por vía periférica y central.

Los mismos autores demuestran que la Triyodotironina no es activa y que el propranolol no antagoniza esta acción de la T R H.

Sin embargo algunos análogos desprovistos de actividad liberadora de TSH son activos en este test.

- ANTAGONISMO DE LA T R H FRENTE A LOS OPIACEOS

Se observó por Horita y Cols. (1.976), que la T R H antagonizaba la hipotermia y depresión respiratoria inducida por la morfina en el conejo, sin modificar la analgesia.

Posteriormente Holaday y Cols. (1.978), demostraron que la T R H antagonizaba la hipotermia y catalepsia inducida por Beta-Endorfina en la rata. Como en el trabajo anterior, la analgesia inducida — por Beta-endorfina no se modificó tras el tratamiento con T R H. Esta acción de la T R H era independiente del eje hipofisotiroideo, pues — aparecía en ratas hipofisectomizadas.

Los mismos autores, a partir de estos datos, sugieren que — la T R H sería un antagonista fisiológico de los opiáceos, no modificando dichos receptores, sino que a través de mecanismos fisiológicos distintos, se opondría a algunas acciones de los opiáceos.

Este antagonismo no es único en farmacología, ya que la norepinefrina es un antagonista fisiológico de la histamina, y su eficacia en el tratamiento del shock anafiláctico es muy superior a los fármacos que actúan competitivamente a nivel de los receptores histamínicos.

Esta acción de la T R H adquiere una importancia relevante por cuanto se ha demostrado que durante el shock se liberan Beta-endorfinas a partir de la hipófisis.

A partir de este dato se planteó la posible eficacia de la naloxona en el tratamiento de shock, y previamente a su utilización clínica (Tiengo, 1.980; Peters y Cols. 1.981), se demostró su eficacia en el shock experimental endotóxico (Holaday y Faden 1.978); hemorrágico (Faden y Holaday 1.979), y medular espinal (Faden y Col. 1.981 a). La eficacia de la naloxona es indiscutible, pero como antagoniza la acción analgésica de la Beta-Endorfina, podría intensificar el dolor pre-

sente en dichos trastornos.

Este hecho estimuló la utilización de la T R H en el shock experimental ya que no modificaba la analgesia inducida por Beta-Endorfina. Se valoró la acción de la T R H en el shock experimental endotóxico y hemorrágico en la rata (Holaday y Cols. 1.981). La dosis utilizada de T R H es de 2 mgs/Kg. por vía endovenosa. Los resultados son comparables a los obtenidos con naloxona pero, en el efecto de la T R H participaría también su acción vascular directa aumentando la presión arterial en animales normotensos.

En un estudio realizado por el mismo grupo de investigadores (Faden y Cols 1.981b), se demuestra también la eficacia de la T R H en el shock inducido por lesión medular en el gato. Lo trascendente de este trabajo es que se realiza comparativamente con un control positivo; la dexametasona, por dos motivos:

- a) La dexametasona puede inhibir también la liberación hipofisaria de Beta-Endorfina (Holaday y Faden 1.978).
- b) Aunque controvertidamente, la Dexametasona es ampliamente utilizada en clínica en pacientes con lesión medular (Yashow — 1.978).

Los resultados demuestran una eficacia notablemente superior de la T R H sobre la dexametasona.

La naloxona se ha utilizado clínicamente en el shock séptico (Tiengo 1.980) y se obtienen buenos resultados con dosis de 0,4 mg. (6 ugs./Kg.) hecho que demuestra que el ser humano es aún más sensible — que los animales a esta medicación.

Teniendo en cuenta que en las experiencias animales, tanto la T R H como la naloxona, se han utilizado a dosis similares, extrapolando al hombre resultaría que una dosificación tan baja como 0,5 mg. de T R H podrían obtenerse resultados satisfactorios.

La dosis de 0,5 mg. de T R H es ampliamente utilizada para el

diagnóstico endocrinológico de afecciones del eje hipotálamo-hipofisotiroideo, mostrándose carente de efectos secundarios.

Evidentemente, los datos hasta ahora obtenidos en experimentación animal, son los suficientemente sugestivos para utilizar terapéuticamente la T R H en pacientes con lesión espinal.

- ANTAGONISMO FRENTE A LA CLORPROMACINA

Esta acción fue estudiada por Kruse (1.975). La T R H a dosis inferiores a 5 mgs./Kg. por vía intraperitoneal, antagoniza la sedación relajación muscular e hipotermia inducidas por la clorpromacina.

La acción descrita es central ya que se presenta en animales hipofisectomizados y troiectomizados.

El mismo autor señaló que la potencia de la T R H era 20 veces superior en el ratón que en la rata. A la luz de nuestros conocimientos actuales ello podría estar relacionado con la menor degradación plasmática que exhibe la T R H en el ratón. (Brewter y Waltham 1.980).

El antagonismo frente a la clorpromacina, es también atributo de la amfetamina, sin embargo en conejos pretratados con clorpromacina la T R H origina un comportamiento y un patrón electroencefalográfico característicos de excitación, y esto la diferencia claramente de la anfetamina que se muestra inactiva (Kruse 1.975).

- ANTAGONISMO FRENTE A LA NEUROTENSINA

La neurotensina es un tridecapéptido, que se aisló a partir del hipotálamo bovino. (Carraway y Leeman 1.973). Por técnicas de radioinmuno ensayo se ha estudiado su distribución en la rata, comprobándose que únicamente el 30% del contenido cerebral de neurotensina, se localiza en el hipotálamo, el resto en el SNC extrahipotalámico. (Carraway y Leenan 1.976 a).

Como en el caso de la T R H también se localiza en el tracto gastrointestinal. (Carraway y Leenan 1.976 b).

La neurotensina al igual que la T R H, inhibe la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina en el perro (Anderson y Cols. 1.976). Cuando la neurotensina se inyecta por vía intracerebroventricular origina una marcada hipotermia en varias especies animales (Bissette y Cols. 1.976 b; Lipton y Cols. 1.976; Nemeroff y Cols. 1.977 b). Se ha demostrado que la inyección intracerebral de la — T R H invierte parcialmente esta hipotermia (Nemeroff y Cols. 1.980). El mismo autor señala que los altos niveles de TSH presentes en ratas tiroidectomizadas, disminuyen rápidamente tras la administración intracerebral de neurotensina.

La neurotensina potencia significativamente la narcosis inducida por etanol, y la T R H también antagoniza esta acción (Luttlinger y Cols. 1.980). La T R H antagoniza significativamente la relajación muscular inducida por neurotensina (Osbaahr y Cols. 1.979).

En fecha más reciente Osbaahr y Cols. (1.981) demuestran que la neurotensina por vía intracerebralventricular es un potente analgésico.

La analgesia inducida por la neurotensina no se antagoniza por naloxona y en cambio dichos autores señalan que la T R H tanto — por vía intracerebral como intraperitoneal antagoniza esta acción.

Dichos autores utilizan dos métodos térmicos (Placa caliente e inmersión de la cola) y un método químico (Ac. Acético al 0,6%). Destacamos aquí que frente al estímulo químico la T R H es ineficaz a dosis de 10 y 25 nanogramos por vía intracerebroventricular. En la página 648 de dicho trabajo los autores destacan que la T R H a dosis de — ugs. por vía intracerebroventricular inhibe las contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético.

- ANTAGONISMO DE LA HIPOTERMIA INDUCIDA POR OTRAS DROGAS

La T R H como se ha visto anteriormente antagoniza la hipotermia inducida por numerosos psicodpresores.

La T R H, es en realidad un antagonista potente del efecto

hipotermizante inducido por otros muchos fármacos y ello refleja el papel que ejerce dicha hormona en la termorregulación.

Como vemos a continuación la T R H es eficaz frente a las siguientes drogas:

- 1º) Antagoniza la hipotermia inducida por bombesina en ratas expuestas a 4º C. (Brown y Cols. 1.977 a y b).
- 2º) Antagoniza la hipotermia inducida en el ratón por el Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Bhargava 1.980). Este autor demuestra que la T R H actúa tanto tras su administración central como periférica y en cambio la histidilprolinadicetopiperacina es únicamente eficaz tras su administración intracerebroventricular.
- 3º) Antagoniza la hipotermia inducida por oxotremorina (Borsy y Cols. 1.974 y Simon y Cols. 1.975).

- INDUCCION DE SALTOS EN EL RATON, ASOCIADA CON APOMORFINA

Esta acción es de aparición reciente en la literatura (Ushijima y Cols. 1.982).

Aparece tras la inyección intraperitoneal de T R H a dosis de 20 mgs/Kg. y con una dosis intraperitoneal de apomorfinas de 0,25 mg./Kg.

Previamente dichos autores demuestran que ninguno de estos fármacos es capaz, per se, a estas dosis de originar este comportamiento.

La apomorfinas a las bajas dosis utilizadas activaría preferentemente los autoreceptores dopaminérgicos presinápticos originando una inhibición en la liberación de dopamina.

El haloperidol, junto con su propiedad de bloquear receptores dopaminérgicos postsinápticos, es posible que antagonice los autoreceptores dopaminérgicos presinápticos, estimulados por las bajas dosis de apomorfinas utilizadas, y por ello antagoniza el salto inducido por T R H y apomorfinas.

La fisoestigmina y la fentolamina antagonizan el salto inducido por T R H y apomorfina, y la atropina y la clonidina lo incrementan.

Los autores llegan a la conclusión que en la aparición de este fenómeno están implicados mecanismos de inhibición colinérgica y depaminérgica, y de activación noradrenérgica.

COMPARACION ENTRE LAS ACCIONES DE T R H Y ANFETAMINA

Como hemos visto el perfil farmacológico de la T R H recuerda en ocasiones al de la anfetamina, sin embargo existen entre ambos fármacos diferencias sustanciales. A continuación esquemáticamente, se muestran analogías y diferencias entre ellos. Cuadro I: Analogías: TRH: Anfetamina.

<u>E F E C T O</u>	<u>T R H</u>	<u>ANFETAMINA</u>	<u>REFERENCIAS</u>
-Antagonismo de los efectos del Pentobarbital	+	+	Prange y Cols. (1975 ^a) Breese y Cols. (1975) ^b)
-Aumento de la actividad locomotora	+	+	Breese y Cols. (1975) Barlow y Cols. (1975) Vogel y Cols. (1978 b)
-Actividad anorexígena	+	+	Barlow y Cols. (1975) Vijayan y Mccann (1977)
-Capacidad para actuar como estímulo discriminativo	+	+	Jones y Cols. (1975)
-Antagonismo de la relajación muscular inducida en el ratón por la clorpromazina	+	+	Kruse (1975) Simón y Cols. (1975)
-Hipertermia	+	+	Carino y Cols. (1976)
-Excitación generalizada	+	+	Hiney y Cols. (1973) Prange y Cols. (1974)
-Potenciación de la L-DOPA	+	+	Plotnikoff y Cols. (1972) " " (1975)
-Potenciación de la acción anticonvulsiva del Fenobarbital.	+	+	Nemeroff y Cols. (1975) Stille (1953)

CUADRO 2 DIFERENCIAS T R H - ANFETAMINA

<u>E F E C T O</u>	<u>T R H</u>	<u>ANFETAMINA</u>	<u>REFERENCIAS</u>
-Inducción de comportamiento estereotipado	-	+	Vogel y Cols. (1978b)
-Antagonismo de la sedación inducida por etanol	+	-	Breese y Cols. (1974a)
-El pretratamiento con 6-Hidroxidopamina antagoniza las acciones	-	+	Vogel y Cols. (1978 b)
-Inhibición de la agresividad inducida por aislamiento en el ratón	+	-	Malic (1976)
-Actividad anticonflictiva	+	-	Vogel y Cols. (1978 a)
-Inversión de la hipotermia inducida por oxotremorina	+	-	Borsy y Cols. (1974) Simon y Cols. (1975)
-El pretratamiento con atropina bloquea el efecto analéptico	+	-	Cott y Cols. (1976)

1-7-3.- ACCIONES DE LA T R H FUERA DEL SNC

SISTEMA GASTRO INTESTINAL. La T R H al igual que otros péptidos, descubiertos primitivamente en el SNC puede también localizarse -- más allá de los confines del SNC y como se ha descrito en el apartado correspondiente se demostró su existencia en el sistema gastrointestinal de la rata (Morley y Cols. 1.977). Este hecho estimuló la búsqueda de nuevas acciones del péptido en el sistema gastrointestinal.

Los trabajos de Smith y Cols. (1976) demostraron que la administración intracerebroventricular de T R H en el conejo estimulaba la motilidad del colon. Esta respuesta se inhibía totalmente con atropina, por lo que se formuló la mediación del parasimpático en esta acción.

Muchos autores posteriormente se han ocupado del tema y lo que debemos destacar de las acciones gastrointestinales de la T R H es la amplia variabilidad en la respuesta obtenida, dependiendo en gran parte de la especie animal considerada como vemos a continuación: En el perro la administración parenteral de T R H inhibe la secreción -- gástrica estimulada por pentagastrina (Morley y Cols. 1979 b). En el gato la T R H no modifica la secreción gástrica basal ni la estimulada por histamina y pentagastrina, pero en cambio inhibe la secreción ácida y de pepsina estimulada por insulina (Gascoigne y Cols. 1980). En la rata el efecto es distinto ya que la administración intracerebroventricular de T R H origina una estimulación de la secreción ácida -- del estómago vago dependiente; sin embargo, la administración endovenosa de 100 ugs./Kg. carece de efecto. (Tache y Cols. 1.980).

Utilizando la misma especie animal, pero ligando el píloro, Morley y Cols. (1.981) demuestran que la administración de T R H por vía intracerebroventricular origina un aumento de la secreción ácida gástrica dosis dependiente. Dichos autores comprueban que ni la T R H ácida, ni la Histidil prolinadictopiperacina, son activas. Finalmente en el mismo trabajo observan que la Beta-Endorfina inhibe la secreción gástrica basal y la inducida por T R H, y que la naloxona antagoniza este efecto inhibitorio.

En el hombre los trabajos de Dolva y Cols. (1.979) se han ocupado de esta acción. Dichos autores demuestran que la administración de T R H por vía endovenosa, a dosis variables (8-40-200 y 1.000 ugs/hora), a voluntarios sanos, origina de forma dosis dependiente un descenso significativo en el volumen total de jugo gástrico y en la producción de ácido; sin embargo, únicamente las dosis más elevadas disminuirían significativamente la producción de pepsina.

Los mismos autores comprueban que este efecto es independiente de sus acciones endocrinas.

Partiendo de estos resultados los mismos autores establecen un paralelismo entre la T R H y la somatoestatina, destacando que:

1º) Tanto la T R H (Morley y Cols. 1.977) como la somatoestatina (Hökfelt y Cols. 1.975 b) se localizan en el tracto gastrointestinal de algunas especies animales.

2º) Ambos péptidos inhiben o retrasan la absorción de glucosa y xilosa en el intestino humano (Dolva y Cols. 1.978) (Wahren y Felig 1.976).

3º) La somatoestatina al igual que la T R H, inhibe el volumen de jugo gástrico, ácido y de pepsina en el hombre (Arnold y Creutzfeld 1.975).

En el síndrome de Zollinger-Ellison la T R H es un potente inhibidor de la secreción ácida del estómago (Hutton y Cols. 1.981).

Como resumen de estos efectos gastrointestinales, puede especularse que si es posible que la T R H juegue un papel de transmisor en el SNC, dicho tripéptido podría asumir la misma función más allá de los estrictos confines del SNC (Dolva y Cols. 1.979).

SISTEMA CARDIOVASCULAR.- Participando mecanismos centrales, posiblemente suprabulbares, la T R H origina un aumento en la presión arterial.

Este efecto se ha demostrado tras administración central en conejos (Beale y Cols. 1.977); gatos y perros (Delbarre y Cols. 1.978).

Este último autor observa la persistencia de la acción en animales hipofisectomizados y tiroidectomizados.

Esta acción de la T R H adquiere tras los trabajos de Holaday y Cols. (1.981) y de Faden y Cols. (1.981), especial trascendencia, por la eficacia demostrada de la T R H en el shock experimental, y su posible utilización clínica en dicha patología.

1-8 INDICACIONES DE LA T R H

Trataremos el tema con la mayor brevedad posible, ya que las derivadas de sus acciones endocrinas se apartan del objetivo de esta tesis y las resultantes de sus acciones centrales son ampliamente debatidas.

ENDOCRINAS.— Por su capacidad liberadora de T S H se utiliza en el diagnóstico de trastornos que afectan al eje hipotalámico-hipofiso-tiroideo. Dividiremos a estos trastornos en primarios (tiroideo), secundarios (hipófisis) y terciarios (hipótalamo).

En el hipotiroidismo primario, raramente se requiere el uso de T R H como ayuda diagnóstica, a pesar de que observaríamos una hiper-respuesta sobre unos niveles de TSH anormalmente elevados.

Sin embargo la T R H es de gran utilidad tanto en el hipertiroidismo difuso como en el nodular, en este último caso puede ayudar al diagnóstico precoz, ya que es posible encontrar una baja respuesta TSH en pacientes que clínica y bioquímicamente se comporten como eutiroides.

En hipotiroidismos secundarios lo típico es una baja respuesta TSH.

En hipotiroidismos terciarios lo corriente es una hiperrespuesta, característicamente retrasada.

Sin embargo es frecuente que coexistan anomalías que socavan la utilidad de este test para discernir trastornos hipotalámicos e hipofisarios.

Es interesante recalcar que trastornos no endocrinos como la insuficiencia renal, inanición y depresión pueden originar un descenso de la respuesta TSH.

Se ha estudiado este fenómeno con mayor detalle en la depresión pensándose que esta baja respuesta TSH sería indicativa de una depresión endógena (Gold y Cols. 1.978) y que estaría correlacionada con una buena respuesta a la terapéutica electroconvulsiva (Furlong y Cols. 1.976).

Estos pacientes al recuperarse de la depresión retornarían a la normalidad en la respuesta TSH.

La causa de este fenómeno es desconocida y entre las hipótesis más aceptadas está la de Prange y Cols. (1.979), quienes observan altos niveles circulantes de cortisol en la depresión, quien por retroalimentación negativa a nivel de hipófisis e incluso hipotálamo frenaría la respuesta TSH.

Esta hipótesis, coincide con datos preexistentes que muestran una baja respuesta TSH en pacientes con enfermedad de Cushing no tratada, o en pacientes sometidos a una terapéutica a largo plazo con gluco-corticoides (Otsuky y Cols. 1.973).

Por su efecto de estimular la secreción de prolactina es menos útil de lo anticipado, en la evaluación de las hiperprolactinemias. Sin embargo en pacientes con prolactinomas se encuentra una baja respuesta (Kleinberg y Cols. 1.977).

En las hiperprolactinemias por otras causas, se puede encontrar una baja respuesta, si bien con menos frecuencia que en los prolactinomas (Biller y Cols. 1.980)

Debemos recordar aquí que aunque la T R H no modifica la secreción de hormona de crecimiento en individuos normales, si que lo hace en un 50% de los pacientes con acromegalia. Este fenómeno, no sirve únicamente de ayuda diagnóstica, sino que puede tener trascendencia en la terapéutica. Los pacientes con acromegalia que exhibían una respuesta positiva a la T R H, pueden suprimir la secreción de hormona del crecimiento después de un estímulo dopaminérgico. Por consiguiente podemos suponer que estos pacientes se beneficiarían del tratamiento con bromocriptina (Jackson 1.980 b).

CENTRALES.- Se administró T R H, a 10 mujeres normales en un ensayo cruzado a doble ciego con suero fisiológico (Wilson y Cols. 1.973). La vía de administración fue la endovenosa y la dosis de T R H de 0,5 mg. Los sujetos tratados con T R H presentaron relajación

ligera euforia y una sensación como de aumento de energía.

Se ha evaluado la eficacia terapéutica de la T R H en las siguientes situaciones clínicas.

DEPRESION.- Los primeros ensayos de Prange y Cols. (1972) y de Prange y Wilson (1972) revelaron que 10 mujeres con depresión unipolar que recibieron T R H por vía endovenosa (0,6 mg.), presentaron un beneficio rápido, breve y parcial. Al cabo de una semana presentaban -- recaídas.

Desde entonces diversos grupos de investigadores han intentado discernir si la T R H puede ser un medicamento eficaz en la depre -- sión, con resultados generalmente decepcionantes (Nemeroff y Cols. 1978 ; Prange y Cols. 1978 a, b y c).

SINDROME DE ABSTINENCIA ALCOHOLICA.- Autores como Weingold y Cols. (1968) y Tyndel (1974), demostraron que con frecuencia la depre -- sión va unida al alcoholismo.

Los trabajos más significativos han sido realizados por Loo -- sen y Cols. (1976) que estudian el efecto de la T R H en 33 pacientes -- afectos de este síndrome que muestran una depresión secundaria. Adminis -- tran 0,5 mg. de T R H por vía endovenosa. El estudio es cruzado, a do -- ble ciego, y se compara con dos placebos, uno inactivo (suero fisiológi -- co), y otro positivo (Ac Nicotínico). La terapéutica con T R H presenta diferencias significativas en aquellos pacientes que muestran un factor I de la escala de Hamilton. Al cabo de una semana de observación los 3 grupos han mejorado y no se aprecian diferencias significativas.

En tres casos de Predelirium tremens, Huey y Cols. (1975) no observan beneficios, al administrar T R H.

ESQUIZOFRENIA.- Podemos encontrarnos con:

a) Ausencia de efecto: Los trabajos de Clark y Cols. (1975) y Linds -- trom y Cols. (1977), comprendiendo 22 pacientes, muestran este resulta -- do.

b) Efecto beneficioso: Abarca a 212 pacientes en los estudios realizados por Inanaga y Cols (1975 y 1978) y Campbell (1975). Los autores destacan que la T R H es eficaz cuando los síntomas predominantes son la reducción de la espontaneidad, la abulia, la apatía y el abandono social originando entonces un aumento de la motivación y de la relación social.

c) Efecto desfavorable: Son descritos por Bigelow y Cols. (1975) y Davis y Cols. (1975) en trabajos realizados sobre 12 pacientes debe destacarse que o bien se trataban de esquizofrénicos resistentes a otras medicaciones o bien eran paranoicos.

Podríamos resumir lo anterior suponiendo que todos los esquizofrénicos, con excepción de los paranoicos, con o sin neurolepticos, podrían beneficiarse del tratamiento con T R H; y los resultados más espectaculares se obtendrán cuando la sintomatología predominantes sea la apatía, la abulia y el abandono social.

Debido a que la T R H, puede tener una actividad prodopaminérgica (Goujet y Cols. 1975), estos resultados apoyan la hipótesis dopaminérgica formulada por Snyder (1973) para las esquizofrenias no paranoicas.

PSICOSIS CICLICAS.- La T R H no originaría beneficios (Drayson 1974).

ENFERMEDAD DE PARKINSON.- Todos los trabajos realizados reconocen unánimemente que la T R H no modifica el estado neurológico, si bien aumenta la sensación de bienestar y el optimismo de estos pacientes. (Chase y Cols. 1974; Lakke y Cols. 1974 y Mc Caul y Cols. 1974).

SINDROME HIPERCINETICO EN NIÑOS.- Se administró T R H a 2 niños que previamente no habían respondido a la medicación con metilfenidato observándose mejoría en su comportamiento (Tiway y Cols. 1975).

IMPOTENCIA SEXUAL EN VARONES.- Se probó en 12 pacientes administrando T R H por vía oral, no mostrando ser superior al placebo (Benkert 1975).

2 ACCION ANALGESICA DE LA T R H

=====

Relativamente pocos grupos de investigadores se han ocupado del estudio de esta acción de la T R H a pesar de existir una serie - de datos sugestivos que enumeramos a continuación:

- 1º) La T R H Está dotada de acciones centrales, independientes de sus acciones endocrinas. Cada día existen más evidencias de su posible papel como neurotransmisor o neuromodulador.
- 2º) La estructura química de la T R H es la de un tripéptido. En el año 1.973 los estudios de Pert y Snyder demostraron la existencia de receptores opiáceos localizados en los - sinaptosomas del cerebro de los mamíferos. Posteriormente se demostró que los ligandos específicos de dichos receptores poseían también estructura peptídica (Hughes, 1.975; - Terenius y Walhstrom, 1.975; Teschemacher y Cols. 1.975; - Pasternak y Cols. 1.975).

Se sabe que los opiáceos exógenos actúan como agonistas sobre receptores opiáceos estereoespecíficos y saturables. Estos receptores se encuentran en mayor concentración en el sistema límbico (cortex frontal y temporal, amígdala e hipocampo), tálamo, estriado, hipotálamo, cerebro medio y médula espinal (Snyder y Cols. 1.974; Simon y Hiller 1.978).

Estos mismos receptores son los lugares de unión de algunos ligandos específicos endógenos.

Los trabajos de Hughes y Cols. (1.975) a partir de cerebros de cerdo, lograron la identificación de dos pentapéptidos. La Metionina-Encefalina (H-tir-gli-gli-fen-met.OH) y la leucina-encefalina (H-tir-gli-gli-fen-leu-OH). Demostraron, que ambos péptidos tenían una - potente actividad agonista sobre los receptores opiáceos. sobre todo en el conducto deferente aislado de ratón y menos en el ileon aislado de cobayo, originando una inhibición dosis dependiente de las concentraciones provocadas eléctricamente. Además demostraron que la naloxo-

na antagonizaba esta inhibición.

Los mismos investigadores observaron que la secuencia de aminoácidos de la metionina encefalina es idéntica a los residuos 61—65 de la Beta-Lipotropina, Proteína de 91 aminoácidos aislada de la hipófisis de diversas especies animales y también del hombre. (Li y Cols. 1.965; Cseh y Cols. 1.972).

Los trabajos de Cox y Cols. (1.975), mostraron a partir de la hipófisis de diversas especies animales, la existencia de otros péptidos con actividad opiácea, mayores y distintos químicamente a las encefalinas.

Posteriormente los trabajos de Guillemin y Cols. (1.976) establecieron la estructura química de los mismos distinguiendo:

- La Gamma-Endorfina : su secuencia de aminoácidos corresponde a los residuos 61-77 de la Beta-Lipotropina.
- La Alfa-Endorfina : su secuencia de aminoácidos corresponde a los residuos 61-76 de la Beta-Lipotropina.
- La Beta-Endorfina : su secuencia de aminoácidos corresponde a los residuos 61-91 de la Beta-Lipotropina.

La Beta-Endorfina es el más potente de los opiáceos endógenos aislados hasta ahora.

Se ha estudiado la distribución de las encefalinas encontrándose en áreas del SNC presumiblemente relacionadas con la percepción del dolor (Lámina I y II de la médula espinal, núcleo espinal del trigémino en el tronco cerebral, sustancia gris periacueductal, sustancia gris periventricular y rafe nuclear dorsal) y con la regulación de funciones neuroendocrinas (eminencia media).

También se han localizado más allá de los confines del SNC en plexos nerviosos y glándulas exocrinas del estómago e intestino.

Recordando la distribución de la T R H, podemos señalar su analogía con la distribución de las encefalinas, ya que al igual que ellas se encuentra localizada en el SNC hipotalámico y extrahipotalámico, y también en el sistema gastrointestinal.

La distribución de la Beta-Endorfina es algo distinta ya que se localiza fundamentalmente en la parte media y distal de la hipófisis e hipotálamo. Sin embargo alguna de las neuronas que contienen Beta-Endorfinas constan de axones ascendentes y descendentes y alguno de ellos tiene terminales en la sustancia gris central, área que parece jugar un gran papel en la modulación del dolor y donde también hay altas concentraciones de encefalinas (Snyder 1.978, Terenius 1.978).

Las encefalinas y las Beta-Endorfinas parecen pertenecer a dos sistemas anatómicos y funcionalmente distintos, con función de neurotransmisores, moduladores de la transmisión o neurohormonas.

La Beta-Endorfina por su localización en hipotálamo y en hipófisis y por su mayor duración de acción es considerada como una probable neurohormona.

Las encefalinas por su amplia distribución, su rápida destrucción, su localización en los sináptomas, su liberación tras la despolarización, es muy posible que actúen como neurotransmisores o moduladores de la función sináptica.

La Beta-Endorfina es producida por división de una proteína sintetizada en el hipotálamo que es también la prohormona para la ACTH y la Beta-Lipotropina.

Los efectos de estos opiáceos endógenos, cuando se inyectan convenientemente en los animales y en el hombre son similares a los obtenidos con morfina, demostrándose la aparición de tolerancia cruzada entre ellos y los opiáceos exógenos (Snyder 1.978; Terenius 1.978).

3º) La T R H induce cuando se administra en la rata una erección de cola de modo similar a la morfina.

4º) La administración intracerebroventricular de T R H en la rata origina unas sacudidas semejantes a las de un "perro sacudiendo del agua", similares a las que aparecen en el síndrome de abstinencia a la morfina en la rata (Wei y Cols. 1.975, 1.976).

5º) Existen interacciones de la T R H con los opiáceos que pasamos a resumir a continuación:

- a) La T R H inhibe la liberación de h. de crecimiento inducida en la rata "in vivo" por la morfina.
- b) La administración de morfina bloquea las sacudidas como de un "perro saliendo del agua" inducidas por la T R H y la administración de T R H aumenta las sacudidas, similares a las anteriores que aparecen en las ratas sometidas a deprivación morfinica (Martin y Cols. 1.977).
- c) La T R H administrada por vía intracerebroventricular en el conejo antagonizaba la depresión respiratoria e hipotermia inducidas por la morfina, pero no modificaba la acción analgésica (Horita y Cols. 1.976).
- d) La administración de T R H a ratas dependientes a la morfina, que habían desarrollado tolerancia para la acción analgésica y para la hipotermia, evitaba la aparición de tolerancia para la acción analgésica de la morfina sin modificar la tolerancia para la acción hipotermizante. (Bhargava 1.981).
- e) Los autores que se han ocupado del antagonismo T R H - opiáceos, demostraron que dicho antagonismo aparecía sin modificación alguna de los receptores opiáceos y existe también un acuerdo unánime en que la T R H no antagoniza la acción analgésica de la morfina.

Esta ausencia de antagonismo sobre el efecto analgésico de la morfina, creó la perentoria necesidad de comprobar si la T R H "per se" poseía acción analgésica.

Los trabajos de Martin y Cols. (1.977) muestran que la T R H carece de acción analgésica, valorada con el método de retirada de la cola en el ratón cuando se administra por vía intraperitoneal a las dosis de 1-10-25 mgs/Kg.

Los estudios realizados por Holaday y Cols. (1978), realizados en la rata, demuestran que la T R H administrada por vía intracerebroventricular a la dosis de 20 ugs., carece de efecto analgésico, valorado también por el método de la retirada de la cola.

Ambos trabajos, si bien utilizan diferentes especies animales, y distinta vía de administración, presentan en común el método utilizado para valorar la analgesia, donde el dolor es inducido por la aplicación de un estímulo térmico.

En contra de estos resultados, Cuenca y Cols. (1978) demostraron que la T R H presentaba acción analgésica, utilizando un método en el que el agente nociógeno es de naturaleza química, concretamente el bromuro de Acetil-colina. La prueba se realizó en ratones de sexo hembra y la T R H se administró por vía endovenosa, mostrándose que a partir de 12,5 mgs.Kg. se inhibía significativamente la aparición de contorsiones inducidas por la administración intraperitoneal de bromuro de Acetilcolina a la dosis de 3,2 mgs.Kg.

3 - OBJETIVO DE ESTA TESIS.- Como consecuencia del estudio de los trabajos anteriores en que no todos los autores estaban de acuerdo en la acción analgésica de la T R H y teniendo en cuenta que no se habían empleado toda la gama de posibilidades para el estudio de la acción analgésica que permitieran admitir o rechazar dicha acción, nosotros, interesados por el tema desde hace algún tiempo (Escartin y Cols. 1.979 a; Palop y Cols. 1.979) decidimos realizar experiencias con el fin de:

- 1º) Constatar, o poner de manifiesto la acción analgésica de la T R H, empleando distintos métodos para inducir el dolor en el animal de experimentación, tomando como referencia la acción de la morfina.
- 2º) Estudiar la posible relación de la acción analgésica de la T R H con los receptores opiáceos.
- 3º) Dilucidar si la acción analgésica de la T R H es debida a su metabolito: histidil prolinadacetopiperacina.
- 4º) Demostrar que la acción analgésica de la T R H es una acción central, independiente de sus acciones endocrinas.
- 5º) Emplear distintos fármacos que modifican el contenido de aminas biógenas en el sistema nervioso central para observar su influencia sobre la acción analgésica y poder aportar hechos para aclarar o al menos contribuir al estudio de los mecanismos bioquímicos implicados en la acción analgésica de la T R H.

4 - MATERIAL Y METODOS

ANIMAL DE EXPERIMENTACION :

- Ratas albinas Sprague-Dawley, de 125 a 150 gs. de peso, de ambos sexos, mantenidas hasta el momento de la experiencia en condiciones de temperatura y humedad constante y alimentadas con una dieta standard del mercado tipo rata - ratón cría y agua ad libitum.

- Ratones Swiss, machos y hembras, de peso comprendido entre 20 y 25 gs. y entre 25 - 30 gs., mantenidos hasta el momento de la experiencia en condiciones de temperatura y humedad constante y alimentadas con una dieta standard del mercado tipo rata - ratón - cría y agua ad libitum.

- Cobayos de sexo macho, de la cepa "Tricolor pelo corto" de peso comprendido entre 600 - 700 gs.

VIAS DE ADMINISTRACION

VIA INTRACEREBROVENTRICULAR

Previa ligera anestesia etérea se practica una pequeña incisión en la piel que permite localizar el Bregma, lo que permite fijar las coordenadas del punto de administración que corresponden en la rata a $X = 2 \text{ mm}$ y $Y = 1,5 \text{ mm}$ $Z = 3,5 \text{ mm}$. Dicho punto está en la rata a 2 mm. a la derecha de la sutura sagital y 1,5 mm. por detrás de la sutura frontoparietal.

Una vez localizado el punto de la administración perforamos el hueso craneal mediante una broca fina que facilita la penetración de la aguja de administración.

La administración se realiza mediante una microgeringa HAMMILTON 701 N. de 10 u l con aguja de diámetro adecuado (calibre 26 s, diámetro exterior 0,47 mm.) provista de un tope, situado a 3,5 mm. - del extremo (correspondiente a la coordenada z).

Siguiendo esta metodología la administración de los productos se realiza en el ventrículo lateral derecho.

Al finalizar las experiencias se confirmó la correcta administración mediante la inyección de 10 ul de azul de Evans al 1%, por el mismo orificio observando la distribución del colorante previa fijación de los cerebros. El azul de Evans no difunde y permite observar una coloración azulada en ventrículo lateral, 3 er. ventrículo, Acueducto y 4º ventrículo.

Vía endovenosa.- Se realizó en la vena dorsal de la cola, - manteniendo sujetos a los animales en un cepo de Makrolon. Se utilizaron jeringas estériles de polipropileno de 1 cc de cono luer, y agujas estériles tipo luer (16/15).

Vía subcutánea.- Se realizó en el dorso de los animales en la parte superior del cuello algo por detrás de las orejas. Cuando se administraron dos productos por esta vía la segunda administración se realizó en el dorso de los animales cerca de la base de la cola. Las agujas y jeringas utilizadas fueron idénticas a las anteriores.

Vía intraperitoneal.- Se realizó en la mitad inferior derecha del abdomen, con el mismo tipo de jeringa y aguja descrita anteriormente.

Volumen de administración.- El volumen de administración en la vía intracerebroventricular fue de 10 ul. Para el resto de vías — utilizadas fue de 10 ml/Kg. en el ratón y de 2 ml./Kg. en la rata.

Sustancias o reactivos utilizados.-

- T R H-Prem. (Procedente del departamento de síntesis de Laboratorios Frumtost-Prem Ref. F-52 G-59-1
- Acetil-L-Histidil-L-prolinamida (Procedente del departamento de síntesis del Laboratorio Frumtost-Prem Ref. 33-164-2
- Benzoil-L-Histidil-L-Prolinamida Clorhidrato (Procedente del departamento de síntesis del Laboratorio Frumtost-Prem Ref. 33-182-3
- Histidil-Prolina Diceto Piperacina (Procedente del departamento de síntesis del Laboratorio Frumtost-Prem Ref. 38-39-2
- Morfina Clorhidrato (Procedente de la Jefatura Provincial de Sanidad)
- Naloxona (Endo)

- Eter etílico (Panreac)
- Acido-Acético (Panreac)
- Fenilbenzoquinona (Sigma P-8251)
- Metilnitrato de Atropina (Sigma A-0382)
- Sulfato de Atropina (Sigma A-0257)
- Sulfato de Eserina (Sigma E-8625)
- Clorhidrato de Apomorfina (Sigma A-4393)
- 5-Hidroxi L-Trptofano (Sigma H-3753)
- Oxotremorina (Aldrich : 11,305-0)
- Reserpina - Inyectable (Serpasol : Ciba-Geigy)
- Cloruro sódico (Merk AG Darmstadt)
- Cloruro potásico (Merck AG Darmstadt)
- Cloruro calcicoanhidro (Merck AG Darmstadt)
- Fosfato monopotásico (Merck AG Darmstadt)
- Sulfato Magnesico Hidratado (Merck AG Darmstadt)
- Bicarbonato sódico (Merck AG Darmstadt)
- Glucosa Anhidra (Panreac)

M E T O D O S

1º) ESTUDIOS EN ORGANO AISLADO

2º) ESTUDIOS IN VIVO

1º) ESTUDIOS EN ORGANO AISLADO.— Los cobayos se sacrificaron mediante fuerte golpe en la región occipital y posteriormente desangrados cortando las principales arterias del cuello. Se abrió el abdomen con incisión en la línea media separando al ileon del resto del intestino; de forma sistemática se descartaron los 20 cms. distales del ileon.

Una vez separado el ileon se introdujo en una solución de Krebs bicarbonatada con la siguiente composición:

- Cl Na : 118 mM.
- Clk : 4'69 mM.

- Cl₂ Ca : 2'47 mM.
- Po 4 H₂k : 1'16 mM.
- SO₄ Mg₂ 7 H₂O : 1'18 mM.
- CO₃ HNa : 25 mM.
- Glucosa (C₆ H₁₂ O₆) : 9 mM.

Se ha utilizado la preparación de músculo longitudinal, plexo-mientérico de ileon de cobayo, que denominaremos "tira" de ileon.

La disección de la tira se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Patón y Zar (1968) y Kosterlitz y Cols. (1970. A una porción de ileon de unos 8 cm. de longitud se le introduce una varilla de vidrio de unos 7 mm. de diámetro, tratando de que la línea de desgarró mesentérica producida al separar el ileon del resto del intestino en la cavidad abdominal quede en línea recta. Con una torunda de algodón impregnada con líquido nutricio, se va separando de forma suave el músculo longitudinal a todo lo largo de la unión de desgarró mesentérica y una porción circular en la parte superior del segmento del ileon.

Cogiendo con unas pinzas esta porción superior se separó la — tira suavemente; ésta contiene la totalidad del músculo longitudinal y — la mayor parte del plexo mientérico que está fuertemente adherido en las fibras longitudinales.

Esta preparación se colocó en un baño de órgano aislado de 7,5 ml. de volumen que contenía solución bicarbonatada de Krebs a 37°C.

El líquido nutricio fue aireado permanentemente con carbógeno (95 % O₂ - 5 % CO₂.) con lo que se mantuvo el p H. de la solución en -- 7,4.

La tensión inicial se estableció en 400 mgs.

El órgano permaneció en estas condiciones durante 30 minutos pasados los cuales se estimuló eléctricamente por medio de dos electrodos — circulares de platino situados en la parte superior e inferior del baño;—

los estímulos eléctricos consistían en impulsos rectangulares de 1 m seg. de duración, aplicados a un voltaje suficiente para producir la máxima — contracción del músculo (40 v.). La frecuencia de estimulación se mantuvo constante en 0,1 ciclos por segundo (HZ).

Los estímulos eran producidos por un estimulador eléctrico Letica Li 12100 conectado a su vez a un amplificador. Las contracciones del — músculo liso se registraron por medio de un transductor de tensión isométrico modelo Letica acoplado a un polígrafo Letica modelo BIO-RECORDER — 2000.

El peso medio de las tiras utilizadas fué de 36,1 mgrs.

Una vez la tira de ileon está colocada en el baño se deja en re — poso unos 25 minutos lavando cada 10 minutos. Pasado este tiempo se estí — mula y cuando las contracciones son constantes (aproximadamente a los 10 minutos), inyectamos 0,1 ml. de los productos a valorar en el baño deján — dolos en contacto con el órgano unos dos minutos, tiempo suficiente para que si son activos den la máxima inhibición. Para sacarlos del baño reali — zamos tres lavados por rebosamiento cada dos minutos recuperándose las — contracciones y alcanzando la altura original. (En el caso de actividad — de los productos se puede obtener una recuperación más rápida de la altu — ra de las contracciones inyectando Naloxona).

La concentración de morfina utilizada ha sido la de 5×10^{-8} M. y las concentraciones ensayadas de T R H han sido: $1,75 \times 10^{-8}$, $1,75 \times 10^{-7}$, — $1,75 \times 10^{-6}$ y $1,75 \times 10^{-5}$ M.

La concentración de Naloxona utilizada ha sido la de 5×10^{-8} M.

Los volúmenes inyectados han sido de 0,1 cc. para los productos ensayados. La preparación músculo longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobaya ha demostrado ser uno de los mejores métodos para la determi — nación de la actividad opiácea "in vitro". La potencia analgésica de los — agonistas opiáceos se mide por su eficacia en inhibir las contracciones — del músculo liso intestinal. La morfina y otros opiáceos actúan sobre —

los receptores "mu" del plexo mientérico del ileon de cobaya disminuyendo la salida de Acetilcolina. Esta inhibición es proporcional a la dosis utilizada y es antagonizada de forma reversible por la naloxona.

Se calcula el tanto por ciento de inhibición, considerando que el 100 % de inhibición nos anularía la contracción anterior a la dosis - del opiáceo. El efecto del opiáceo es directamente proporcional al logaritmo de la concentración que hay en el baño.

2º) ESTUDIOS IN VIVO

METODO DE PRESION EN LA COLA.- La técnica fué originariamente descrita por Green y Young (1951).

El animal utilizado es la rata Sprague - Dawley de 125 - 150 grs. de peso. El estímulo doloroso consiste en la compresión mecánica - de la cola de la rata. Debe realizarse en la porción más distal de la - cola, que es la zona más sensible a este estímulo doloroso.

Es importante utilizar animales jóvenes, pues las máximas variaciones en los umbrales de sensibilidad obtenidos cuando se realiza - la prueba en animales en diversos estadios de crecimiento, corresponde al período de la vida coincidente con el máximo desarrollo de la cola. Ello se debe a que al aumentar el diámetro de la cola disminuye la presión ejercida por unidad de área.

La causa del dolor en este método es la deformación de las es tructuras más profundas de la cola.

La repetida exposición de los animales al estímulo doloroso, - no modifica el umbral doloroso, lo cual permite la valoración de agentes analgésicos a lo largo del tiempo en los mismos animales.

Nosotros hemos utilizado en este método el analgesímetro UGO-BASILE. El aparato consta de un dispositivo que ejerce automáticamente una presión creciente de forma uniforme en función del tiempo. La presión aplicada se indica por un cursor, que se desplaza a lo largo de -- una graduación. Las piezas aplicadas sobre la cola del animal tienen la

forma de un cono provisto de un vértice redondeado y apoyo plano, y son de teflón, que es un material biológicamente inerte y que además presenta un coeficiente de rozamiento muy débil, lo que permite una retirada brusca de la cola de la rata sin ocasionar heridas.

Para la realización de la prueba se colocan los animales en un cepo de makrolón.

El operador dispone de un pedal para la puesta en marcha del aparato y deja de accionarlo cuando observa una reacción de for^ucejeo en los animales. En dicho momento lee directamente en la esca^ula el valor de la presión ejercida y ello corresponde al umbral de sensibilidad dolorosa.

Después de cada medición, la corredera o cursor que lleva el peso es conducida de nuevo al punto de partida elevándola y deslizándola sobre la guía.

En nuestras condiciones experimentales, el tope máximo de presión aplicado cuando se encontró actividad analgésica fue de 400 pondios.

Con este método se ha determinado la acción analgésica de los siguientes productos administrados por vía intracerebroventricular, y disueltos en suero fisiológico.

- 1º) MORFINA : Dosis de 0,05-0,1 - 1-5 y 10 ugs/rata
- 2º) T R H : Dosis de 0,1-1-10-50-100 y 200 ugs/rata
- 3º) HISTIDIL PROLINA DICETOPIPERACINA : Dosis de 100 ugs/rata
- 4º) ACETIL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA : Dosis de 100 ugs/rata
- 5º) BENZOL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA CLORHIDRATO : Dosis de 100 ugs/rata.

Se incluye un lote de animales a los que se les administra suero fisiológico con el fin de determinar si se modifica el umbral doloroso por la ligera anestesia etérea necesaria para la administrac^ución intracerebroventricular.

Hemos trabajado con lotes de 10 animales.

En nuestras condiciones experimentales determinamos el umbral de dolor de cada animal a los 45,30 y 15 minutos antes y a los 5,15 ; 30,45 y 60 minutos después de la administración de los productos ensayados. Cuando estudiamos el antagonismo por la naloxona, la administramos por vía subcutánea a la dosis de 2 mgs./2 ml./Kg., 10 minutos antes de la inyección intracerebroventricular de la T R H o de la Morfina.

Para determinar el efecto analgésico se calcula para cada animal del valor del área bajo la curva mediante la aplicación de la siguiente fórmula :

$$\text{AREA} = 2,5 (U_{-15} + U_{+5}) + 5 (U_{+5} + U_{+15}) + 7,5 (U_{+15} + U_{+60}) + 15 (U_{+30} + U_{+45}) = \text{Kilopondios/minuto.}$$

Donde U corresponde al umbral doloroso obtenido en el tiempo indicado en el subíndice.

Una vez establecida dicha área podemos obtener el área de protección en porcentaje con respecto al área máxima que se obtiene con una dosis de 5 ugs. de morfina, mediante la aplicación de la siguiente fórmula :

$$\text{PROTECCION} = \frac{\text{A. Producto} - \text{A. Control}}{\text{A. Morfina} - \text{A. Control}} \times 100$$

Se calcula la media, desviación standard y error standard del efecto obtenido para cada dosis de los productos ensayados así como para los controles. Se determina si existen diferencias estadísticamente significativas para el efecto obtenido entre los lotes problema y el control mediante el cálculo de la t de Student estableciendo los distintos niveles de significación en cada caso.

Para la T R H y para la morfina se calcula la DA 50, determinándola gráficamente y representando el efecto frente a logaritmo de la dosis. Cuando se estudia el antagonismo por naloxona se determina la significación estadística entre el tanto por ciento del área de

protección obtenida por una dosis de producto en presencia o en ausencia de naloxona siguiendo el criterio estadístico antes mencionado.

Con la histidil prolina dicetopiperacina y los dos dipéptidos análogos de la T R H antes mencionados lo único que pretendemos - es comprobar si a la dosis indicada presentan acción analgésica. Calculamos el área de protección, su porcentaje con respecto a la área - máxima obtenida con morfina y la significación estadística mediante - el cálculo de la t de Student con respecto al control y a la propia - T R H.

METODO DE LA PLACA CALIENTE.- El estímulo doloroso en esta prueba es de naturaleza térmica.

Este método fue descrito por Eddy y Leimbach (1.953).

Corrientemente la placa es mantenida a una temperatura de - 56 grados, sin embargo diversos autores (Osbaahr y Cols. 1.981) señalan que si la temperatura de la placa es de 52º C. es posible la repetición de la prueba en los mismos animales a distintos tiempos sin ocasionarles daño. Nosotro hemos adoptado esta modificación.

Hemos empleado como animal de experimentación ratón albino Swiss hembra de peso comprendido entre 25 y 30 grs.

La placa utilizada por nosotros (LETICA) consiste en un bloque de aluminio compacto, material con una inercia térmica alta. El - tamaño de la placa es de 11 cms. de anchura, 50 cms. de longitud y 11 cms. de altura.

Está separada en dos partes, lo que permite trabajar con dos animales al mismo tiempo.

La placa se conecta mediante dos tubos a un termostato de inmersión "termotronic", que en el extremo del motor lleva acoplado el - conjunto de bomba impelente, lo que hace que dicho termostato sea también útil como termostato de circulación.

La circulación continua de agua entre la placa y el termostato mantiene la temperatura de la placa con una gran precisión.

Para conseguir la temperatura del agua adecuada se afloja el tornillo de bloqueo del imán rotativo girando hacia la derecha o hacia la izquierda hasta que el indicador de lectura señale en la escala la temperatura seleccionada.

A continuación se acciona el interruptor de la bomba y el interruptor de calefacción, y al mismo tiempo se encenderán los pilotos de señalización. Se desplaza el botón de regulación fina "variowat" hasta su máximo (punto 11).

Una vez que el baño alcanza la temperatura de trabajo se corrige la inercia térmica desplazando el "variowat" hasta el punto 9, - obteniéndose precisiones muy altas de la temperatura.

Establecimos un tiempo límite de permanencia en la placa de 30 segundos. Hemos considerado como válidas tres respuestas posibles al dolor:

- 1º) Elevación de alguna de sus patas. En nuestras condiciones experimentales, con gran frecuencia (Superior a un 80%) esta fue la primera respuesta al dolor.
- 2º) Lamida de alguna de sus patas. Esta respuesta también se obtuvo con gran frecuencia pero en general era posterior a la primera.
- 3º) Salto fuera de la placa. En nuestras condiciones experimentales la encontramos raramente. Ello podría estar relacionado con la temperatura a que hemos trabajado y también características de la placa.

Por este método se valora la acción analgésica de la T R H y de la morfina.

Trabajamos con 30 animales, divididos en tres grupos de 10 a los que se administró:

- 1º) Suero fisiológico subcutáneo (10 ml./Kg.)
- 2º) T R H 10 mgs./Kg. por vía subcutánea
- 3º) Morfina 10 mgs./Kg. por vía subcutánea.

Los ratones se colocan en la placa inmediatamente antes de la prueba (tiempo 0) y posteriormente a los 20, 40 y 60' después de la administración. Una vez colocados los animales en la placa se cronometra el tiempo transcurrido hasta que aparece una de las respuestas al dolor y se anota dicho tiempo.

En general los animales control permanecen menos tiempo en la placa conforme se va repitiendo la prueba. Se considera que existe actividad analgésica cuando aparezca un incremento significativo en el tiempo de respuesta con respecto a los animales control para cada uno de los tiempos (El tiempo de respuesta de un lote problema en el tiempo 20 debe compararse con el tiempo de respuesta del lote control a ese mismo tiempo).

Asimismo debe existir una uniformidad en la respuesta obtenida en el tiempo 0 para todos los lotes estudiados.

El estudio estadístico se realiza partiendo de la media y error standard obtenidos mediante el cálculo de la t de Student estableciendo los niveles de significación entre los lotes problemas y el control. Por el mismo método, y siguiendo los mismos criterios de valoración estudiamos la influencia del sulfato de atropina administrado por vía subcutánea a la dosis de 10 mgs/Kg., 10 minutos antes de la colocación de los animales en la placa, sobre el efecto analgésico de 10 mgs./Kg. de morfina administrados por vía subcutánea.

METODO DEL ACIDO ACETICO.— La introducción del ácido acético para la valoración de analgésicos se debe a los trabajos de Koster y Cols. (1.959).

El método se basa en el principio de que la inyección de sustancias ligeramente irritantes en la cavidad peritoneal de las ratas o ratones induce un síndrome caracterizado por la aparición de repetidos

estiramientos, retorcimientos o contorsiones de la musculatura abdominal acompañados de estiramiento de las patas posteriores. Nosotros llamaremos a la respuesta obtenida contorsión abdominal.

Se ha intentado inducir un cuadro similar al descrito utilizando otros ácidos, pero han sido descartados, bien por obtenerse curvas dosis respuesta irregulares (Ac. Clorhídrico Ac. Láctico); bien por inducir respuestas bajas y a mayor concentración convulsiones (Ac. Cítrico).

El ácido acético induce de modo satisfactorio estas contorsiones y el número total de las mismas es directamente proporcional a la concentración del Acético utilizado. En nuestras condiciones experimentales utilizamos la concentración del 1%. El animal utilizado ha sido el ratón albino Swiss de sexo hembra y de un peso comprendido entre 25 y 30 gramos.

Se preparó el ácido acético aspirando con una pipeta de 1 cc. llevando esta cantidad a un matraz aforado de 100 cc. y añadiendo agua bidestilada agitando convenientemente hasta enrasar el matraz.

El matraz conteniendo dicha solución permaneció cerrado y antes de cada inyección se agitó y se colocó una parte alícuota en un cristizador, administrándose a los animales 10 ml./Kg. por vía intraperitoneal.

Se utilizaron lotes de 5 animales, que tras la inyección del agente irritante se colocaron individualmente en jaulas de makrolon, desprovistas de viruta, anotándose las contorsiones abdominales realizadas por cada uno de ellos entre el minuto 5 y el minuto 20 que siguen a la administración intraperitoneal del ácido acético, calculándose la media, desviación y error standard. El efecto analgésico de una sustancia o varias administradas conjuntamente se determina por la inhibición de las contorsiones abdominales realizadas comparativamente con las obtenidas en los animales utilizados como control.

Se calcula el porcentaje de inhibición mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{Media contorsiones tratados}}{\text{Media contorsiones control}} \times 100$$

Este porcentaje nos permitirá obtener la recta de regresión - representando efecto frente a logaritmo de la dosis mediante el método de los mínimos cuadrados.

Igualmente el cálculo de la media y error standard nos permitirá mediante el cálculo de la t de Student determinar los niveles de significación en cada caso.

Se han utilizado 10 animales como mínimo para cada tratamiento.

Por este método hemos valorado:

- 1º) Acción analgésica de la TRH administrada por vía subcutánea 10 minutos antes del ácido acético, a la dosis de 1,25; 2,5; 5 y 10 mgs./Kg. obteniéndose la correspondiente recta de regresión.
- 2º) Acción analgésica de la morfina administrada subcutáneamente 15 minutos antes del ácido acético a la dosis de 0,16; 0,32; 0,64; 1 y 1,28 mgs./Kg. Obteniéndose la correspondiente recta de regresión.
- 3º) Influencia de la reserpina administrada por vía intraperitoneal, a la dosis de 2,5 mgs/Kg. dada veinte horas antes del ac. acético sobre el efecto analgésico de la morfina, a las dosis de — 0,321 y 1 mgs./Kg y de la T R H a la dosis de 2,5 y 10 mgs./Kg. administradas en las mismas condiciones que en los apartados 1º y 2º.
- 4º) Influencia de la apomorfina administrada por vía subcutánea a la dosis de 0,25 mgs/Kg., 15 minutos antes, del ácido acético

sobre la acción analgésica de la morfina, a la dosis de 1 mgs./Kg. administrada del modo reseñado y sobre la acción analgésica de la T R H.

La T R H se administró en este caso a las dosis de 1,25; 2,5; 5 y 10 mgs./Kg. en las condiciones señaladas en el 1º apartado, - obteniéndose la correspondiente recta de regresión.

METODO DE LA FENILBENZOQUINONA.- El agente inductor del dolor es como en el caso anterior de naturaleza química.

Este método se introdujo en la valoración de analgésicos gracias a los trabajos realizados por Hendershot y Forsaith (1959).

En el método original se valoraban las contorsiones abdominales realizadas en los veinte minutos siguientes a la inyección de la fenilbenzoquinona.

Hemos utilizado para esta prueba ratones albinos Swiss de sexo hembra y de un peso comprendido entre 20 y 24 gramos. Asimismo hemos adoptado la modificación del método original realizada por Linee y Gouret (1972), que en esencia consiste en valorar las contorsiones abdominales - realizadas desde el minuto 5 hasta el minuto 10 tras la administración de la fenilbenzoquinona. En dicho período de tiempo los animales realizan el máximo de contorsiones.

Esta modificación presenta así una ventaja en cuanto a rapidez de realización de la prueba sobre el método originalmente descrito por Hendershat y Forshait.

La metodología seguida para la preparación del agente inductor del dolor la exponemos a continuación:

- 1º) Se pesan 20 mgs. de fenilbenzoquinona.
- 2º) Previamente 100 cc. de agua bidestilada en matraz aforado se mantienen en un baño termostático a 40 °C.
- 3º) A un matraz topacio de 100 cc. le incorporamos un imán de agitación magnética y le abocamos los 20 mgs. de fenilbenzoquinona.

Añadimos 5 cc. de alcohol etílico absoluto que disuelven completamente a la fenilbenzoquinona, ayudado por agitación magnética durante 3 minutos.

4º) Añadimos progresivamente el agua bidestilada a 40º C. a intervalos regulares, y continuamos agitando, hasta enrasar el matraz topacio. La solución así preparada está a una concentración del 0,02 %.

5º) La temperatura del baño se desciende a 37º C. y durante toda la duración de la prueba la solución hidroalcohólica de fenilbenzoquinona es mantenida allí. Dos minutos antes de la administración de la fenilbenzoquinona sacamos el matraz del baño, agitando durante dos minutos en el agitador magnético.

6º) Tras la agitación se coloca una parte alícuota en un cristallizador y se cargan las jeringas previamente preparadas hasta un volumen de 0,2 cc.

7º) Se han utilizado lotes de cuatro animales, a los que independientemente del peso, se les administra por vía intraperitoneal 0,2 cc. de la solución hidroalcohólica de fenilbenzoquinona al 0,02%. Después de la administración los animales son colocados en jaulas individuales de makrolon desprovistas de viruta procediéndose a la anotación de las contorsiones abdominales realizadas entre el minuto 5 y el minuto 10.

El efecto analgésico de una sustancia o varias administradas conjuntamente se determina por la inhibición de las contorsiones abdominales realizadas comparativamente con las obtenidas en los animales utilizados como control.

El porcentaje de inhibición se calcula del modo ya expuesto en el método anterior y nos permitirá obtener las correspondientes rectas de regresión.

Los niveles de significación se obtienen de modo análogo al expuesto en el método del ácido acético.

Se han utilizado 8 animales como mínimo para cada tratamiento.

Por este método hemos valorado :

- 1º) Acción analgésica de la T R H administrada por vía endovenosa, 15 minutos antes de la fenilbenzoquinona a las dosis de 0,25, 1, 2,5, 5 y 10 mgs./Kg. obteniéndose la correspondiente recta de regresión.
- 2º) Acción analgésica de la T R H administrada por vía subcutánea, 20 minutos antes del agente inductor del dolor, a las dosis de 1,25, 2,5, 5 y 10 mgs./Kg. calculándose la recta de regresión.
- 3º) Acción analgésica de la morfina administrada por vía subcutánea 25 minutos antes de la fenilbenzoquinona a las dosis de 0,16, 0,32, 0,64 y 1,28 mgs./Kg. calculándose la recta de regresión.
- 4º) Influencia de diversos fármacos sobre la acción analgésica de la T R H y de la morfina, administradas por vía subcutánea, 20 y 25 minutos antes de la fenilbenzoquinona respectivamente. Distinguiremos:
 - a) Influencia del 5-Hidroxitriptófano, a la dosis de 25 mgs./Kg., por vía intraperitoneal 22 minutos antes de la fenilbenzoquinona sobre la acción analgésica de la T R H (2,5 mgs./Kg.) y de la morfina (0,321 mgs./Kg.).
 - b) Influencia del 5-Hidroxitriptófano, a la dosis de 25 mgs./Kg. administrado por vía subcutánea, 22 minutos antes del agente inductor del dolor sobre la acción analgésica de la T R H a las dosis de 0,312, 0,625, 1,25 y 2,5 mgs./Kg. obteniéndose la correspondiente recta de regresión.
 - c) Influencia del sulfato de eserina a la dosis de 0,1 mgs./Kg. administrado por vía subcutánea, 25 minutos antes de la fenilbenzoquinona, sobre la acción analgésica de la T R H (2,5 mgs./Kg.) y de la morfina (0,321 mgs./Kg.).

- d) Influencia de la oxotremorina a la dosis de 0,01 mgs./Kg. administrada por vía subcutánea 30 minutos antes de la fenilbenzoquinona sobre la acción analgésica de 10 mgs./Kg. de T R H, y de 0,321 mgs./Kg. de morfina.
- e) Influencia de la oxotremorina, a la dosis de 0,01 mgs./Kg. administrada por vía subcutánea 30 minutos antes de la fenilbenzoquinona sobre la acción analgésica de la T R H, a las dosis de 1,25, 2,5, 5 y 10 mgs./Kg. obteniéndose la correspondiente recta de regresión.
- f) Influencia del metilnitrato de atropina a la dosis de 2,5 mgs./Kg. administrado subcutáneamente 30 minutos antes de la fenilbenzoquinona sobre la acción analgésica de 2,5 mgs./Kg. de T R H.
- g) Influencia del sulfato de atropina administrado por vía subcutánea a las dosis de 0,625, 1,25, 2,5 y 5 mgs./Kg. 30 minutos antes de la fenilbenzoquinona, sobre la acción analgésica de 2,5 mgs./Kg. de T R H.
- h) Influencia del sulfato de atropina, a la dosis de 5 y 10 mgs./Kg. administrado por vía subcutánea 30 minutos antes de la fenilbenzoquinona, sobre la acción analgésica de la morfina a las dosis de 0,32 y 0,64 mgs./Kg.
- i) Influencia del sulfato de atropina a la dosis de 1,25 mgs./Kg. administrado por vía subcutánea, 30 minutos antes de la fenilbenzoquinona sobre la acción analgésica de la T R H a las dosis de 0,156, 0,312, 0,625, 1,25 y 2,5 mgs./Kg., obteniéndose la correspondiente recta de regresión.

5) RESULTADOS

5-1 ACCION ANALGESICA DE LA T R H

5-1-1 : METODO DE PRESION EN LA COLA

La T R H administrada por vía intracerebroventricular presenta actividad analgésica. Como observamos en la tabla I y en la figura 1 el efecto analgésico de la T R H es dosis dependiente. El porcentaje del área de protección obtenido se incrementa de modo dosis dependiente, pasando de un 12 % para la dosis de 0,1 ug/rata a un 67,70 % para la dosis de 200 ug/rata.

A la dosis de 0,1 ug la diferencia es muy significativa con respecto al control ($p < 0,01$). Para el resto de las dosis ensayadas se obtienen unas diferencias altamente significativas con respecto al control ($p < 0,001$).

Se constata también que el máximo efecto analgésico con la T R H aparece a los 5 minutos de la administración. Se aprecia que a los 5 minutos con dosis de 100 y 200 ug/rata los animales soporten el máximo de presión aplicado en esta prueba. El efecto analgésico obtenido con la T R H declina de forma rápida a lo largo del tiempo.

En la tabla II y en la figura 2 se aprecia el efecto obtenido cuando se administra morfina por vía intracerebroventricular. Esta acción analgésica es también dosis dependiente y el porcentaje del área de protección pasa de un 11,28 % para la dosis de 0,05 ug a un 100 % para la dosis de 5 ug/rata.

Los niveles de significación con respecto al control, pasan de ser significativos ($p < 0,05$) a la dosis de 0,05 ug, a altamente significativos ($p < 0,001$) para el resto de las dosis ensayadas.

Al igual que la T R H, el máximo efecto analgésico se obtiene a los 5 minutos de la administración, pero la declinación del efecto es más lenta y a las dosis de 5 y 10 ug/rata la máxima presión aplicada (400 pondios) se soporta durante todo el tiempo.

TABLA I ACTIVIDAD ANALGESICA DE LA TRH (I.C.V.) METODO DE PRESION EN T. COLA

Producto	Dosis ug/10ul/rata	MEDIA DE PRESIONES (PONDIOS) SOPORTADAS PARA						AREA KILOPONDIOS/ MINUTO	AREA PROTECCION %	DA 50 ug/rata
		-15'	+5'	+15'	+30'	+45'	30'			
salino	10 ul.	130,0	201,8	166,0	155,6	149,2	41,5	0,0 ± 1,39	0,0 ± 9,9	---
	0,1	150,0	241,1	176,7	167,0	1	138,0	1,0 ± 1,12	12,00 ± 7,98 (++)	
	1	144,0	302,0	225,0	182,0		156,0	2,13 ± 1,07	15,25 ± 7,68 (+++)	
	10	149,0	394,3	285,0	236,0	196,0	178,0	5,13 ± 2,86	36,73 ± 20,47 (+++)	
T.R.H.	50	143,0	371,1	322,0	300,0	234,0	219,0	7,30 ± 2,34	52,21 ± 16,71 (+++)	
	100	141,0	400,0	329,0	279,0	262,0	223,5	7,55 ± 2,83	54,05 ± 20,24 (+++)	
	200	122,0	400,0	385,0	317,0	270,0	180,0	9,46 ± 2,80	67,70 ± 20,04 (+++)	

+++ p < 0'001
 ++ p < 0'01
 + p < 0'05

Fig. 1

ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H. (i.c.v.) EN EL METODO DE PRESSION EN LA COLA

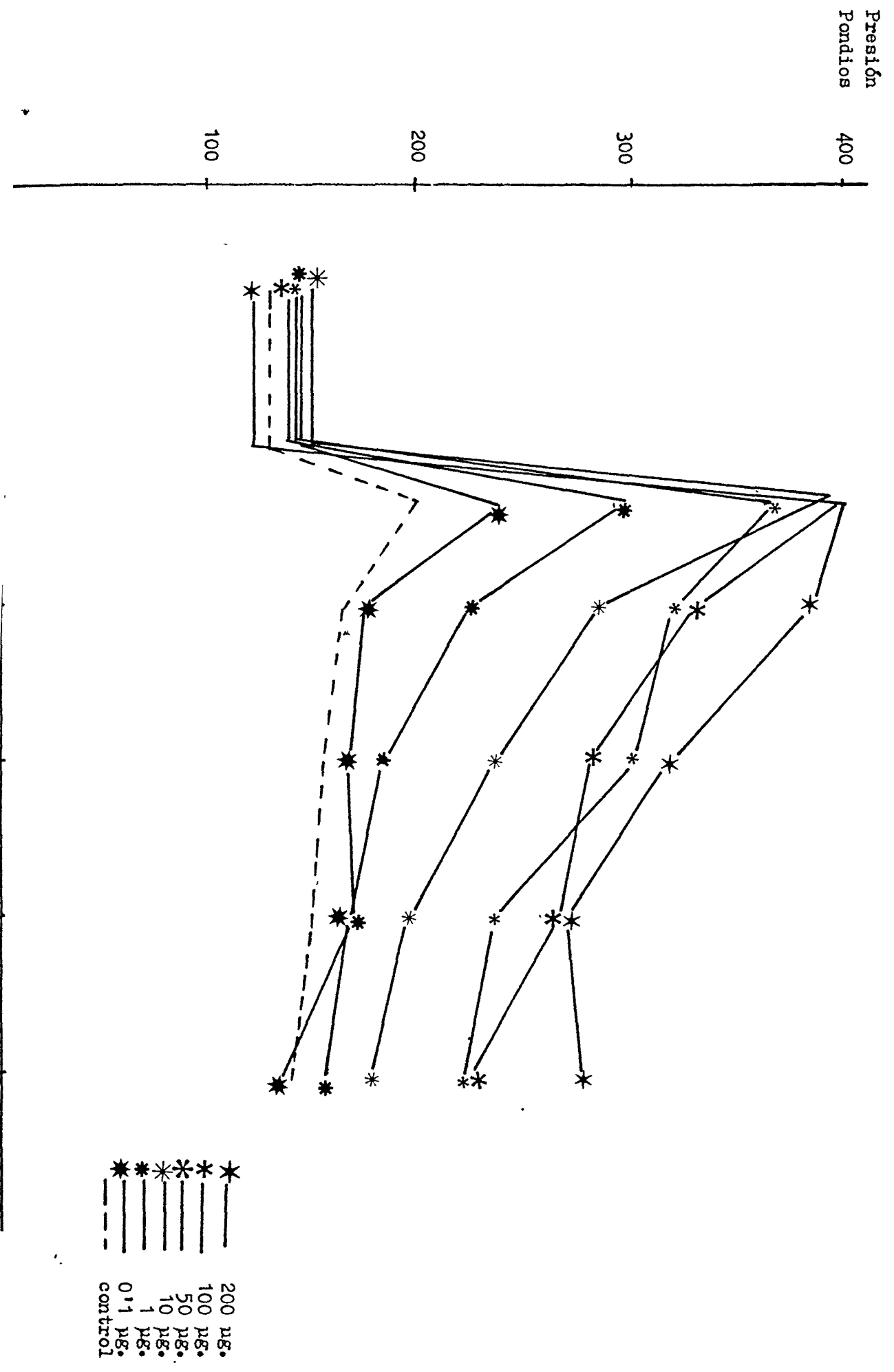


TABLA II ACTIVIDAD ANALGESICA DE LA MORFINA (I.C.V.) METODO DE PRESION EN LA COLA

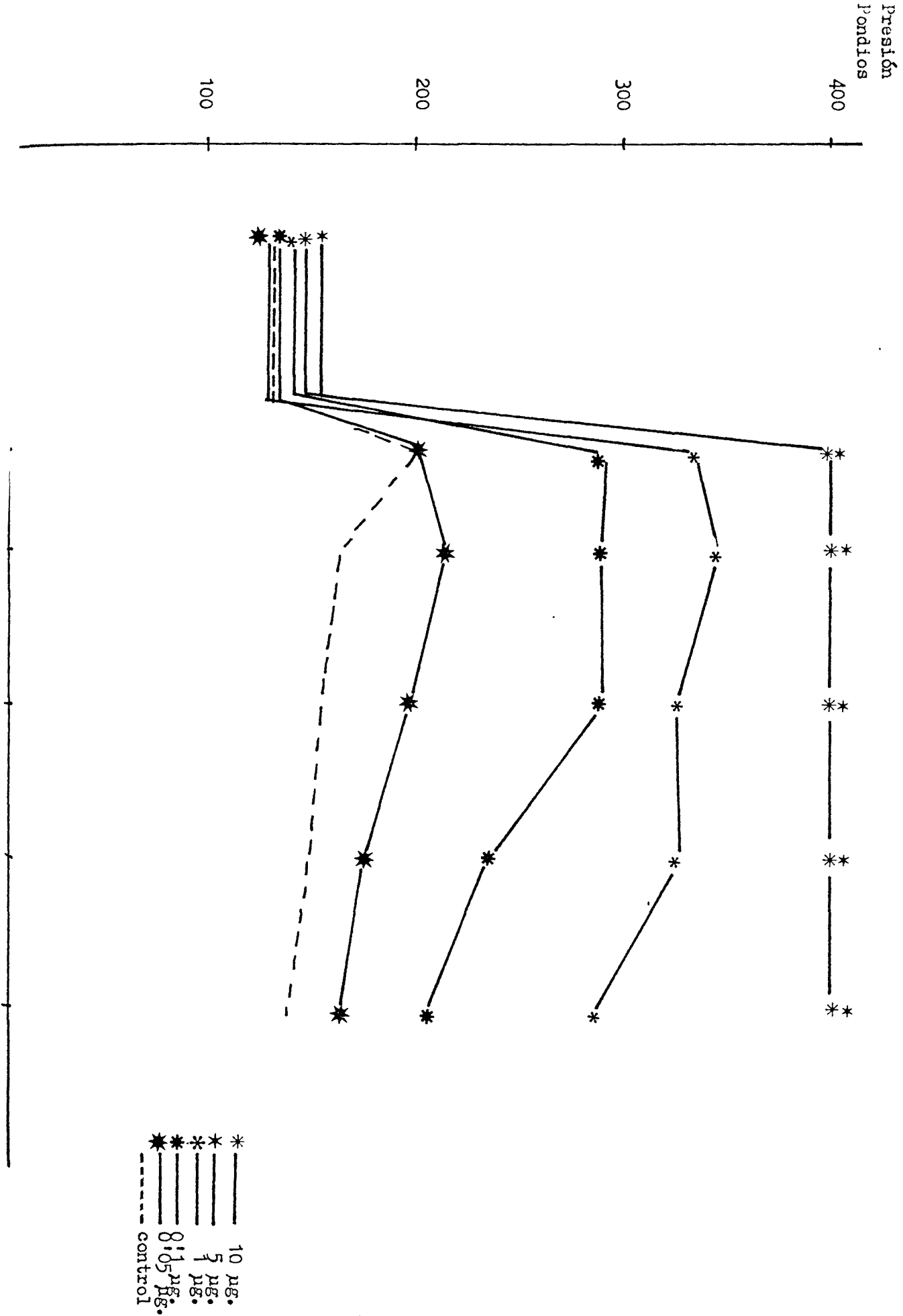
Producto	Dosis ug/10 ul/rata	MEDIA DE PRESIONES (PONDIOS) SOPORTADAS PARA CADA TIEMPO						AREA KILOPONDIOS/ MINUTO	AREA PROTECCION %	DA ₅₀ ug/rata
		- 15'	+ 5'	+ 15'	+ 30'	+ 45'	+ 60'			
Suero Salino	1.0 ul	130,0	201,8	166,0	155,6	149,2	141,5	0,0 ± 1,39	0,0 ± 9,9	---
	0,05	134,0	202,0	216,0	197,0	176,0	164,0	1,58 ± 1,51	11,28 ± 10,82 (+)	
	0,1	142,0	293,0	292,0	289,0	236,0	206,0	6,50 ± 1,86	46,49 ± 13,27 (+++)	
MORFINA	1	129,0	336,6	345,5	324,0	328,8	286,0	9,85 ± 2,35	70,46 ± 16,78 (+++)	0,26 (0,1-0,7)
	5	155	400,0	400,0	400,0	400,0	400,0	13,99 ± 0,04	100,13 ± 0,27 (+++)	
	10	147,5	400,0	400,0	400,0	400,0	400,0	13,98 ± 0,02	100,00 ± 0,14 (+++)	

+++ p < 0,001

++ p < 0,01

+ p < 0,05

ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA (i. c. v.) EN EL METODO DE PRESSION EN LA COIA



En la figura 3, comparamos el porcentaje de área de protección frente a distinta dosis de T R H y morfina. Podemos apreciar como la morfina tiene mayor potencia y alcanza a la dosis de 5 ug el 100% de protección. La T R H alcanza como máximo el valor de 67,70% a la dosis de 200 ug.

En la figura 4, se representan las rectas de regresión obtenidas para las T R H y la morfina poniendo en ordenadas el porcentaje de área de inhibición y en abcisas el logaritmo de la dosis.

Para la T R H, la ecuación de la recta obtenida es:

$$E = 14,97 + 21,29 \times \log \text{ dosis (ug/rata)}.$$

El coeficiente de correlación obtenido es $r = 0,99$ y la correlación lineal es altamente significativa ($p < 0,001$ entre efecto y logaritmo de la dosis).

Para la morfina la ecuación de la recta obtenida es:

$$E = 72,90 + 39,48 \times \log \text{ dosis (ug/rata)}.$$

El coeficiente de correlación es : $r = 0,97$ y la correlación obtenida es significativa ($p < 0,05$) entre efecto y logaritmo de la dosis .

Podemos observar como la ordenada en el origen es más elevada en el caso de la morfina y también que la recta que representa a la morfina está mas desplazada hacia la izquierda lo que indica una mayor potencia. Por interpolación de ambas rectas se determina la dosis analgésica 50 (DA₅₀) para ambos productos quedando establecida en:

- MORFINA : DA₅₀ = 0,26 ug/rata
- T R H : DA₅₀ = 44,2 ug(rata

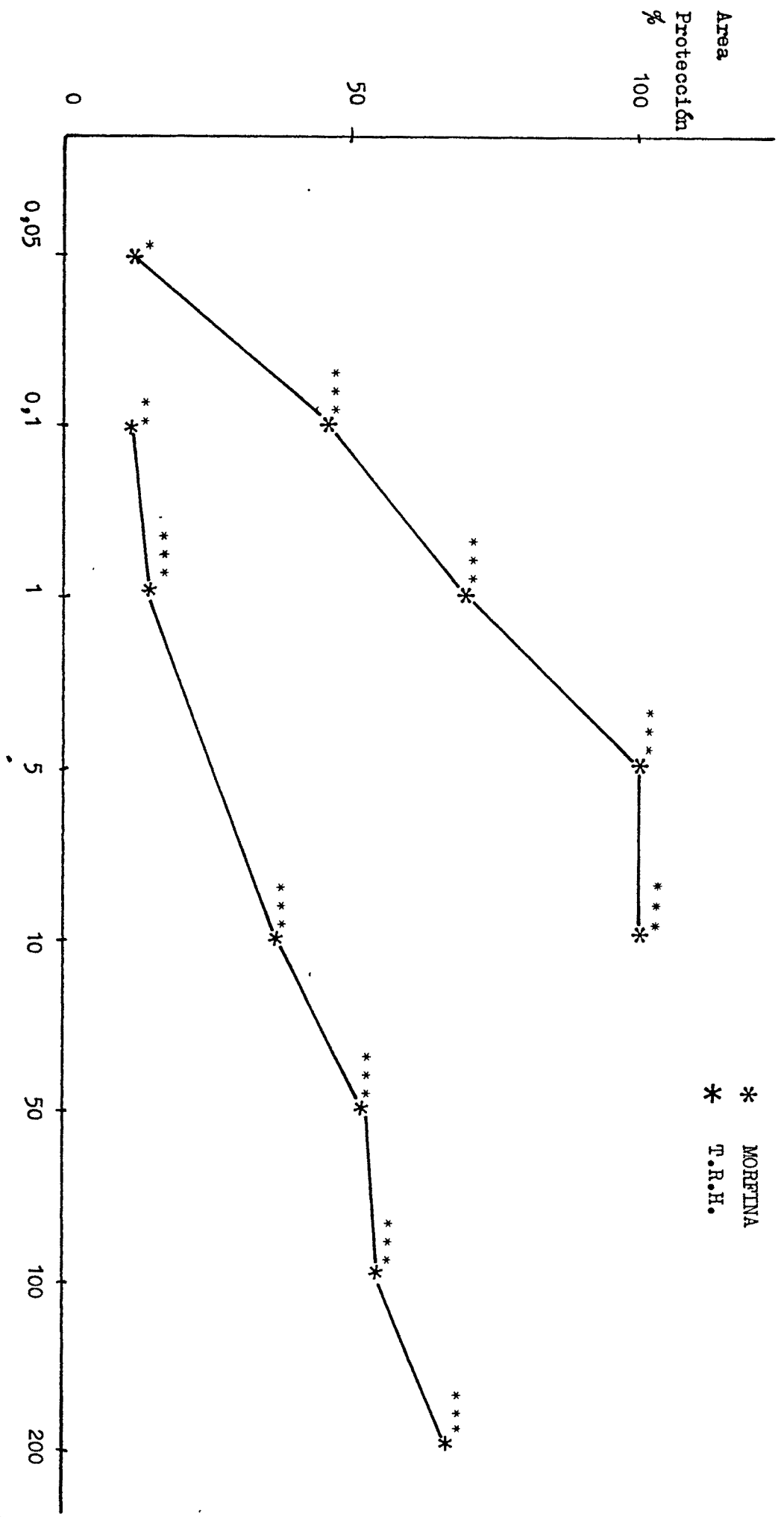
Las dosis analgésicas 50 reseñadas, corresponden a la acción analgésica valorada a lo largo de los 60 minutos que dura la prueba.

En la tabla III se observa el efecto analgésico en forma de porcentaje de animales que soportan una presión en la cola igual o superior a 300 pondios, valorado a los 5 minutos de la administración de la T R H.

Las dosis de T R H son de 0,1, 0,5, 1,0 y 10 ug/rata. Existe una

Fig. 3

PORCENTAJE DE AREA DE PROTECCION OBTENIDA CON LA T.R.H. Y MORFINA EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA



Dosis: µg/rata

FIG. 4

EFFECTO ANALGESICO DE T.R.H. Y DE LA MORFINA VALORADO EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA

A: MORFINA E: $72'90 + 39'49 \times \log \text{Dosis } (\mu\text{g}/\text{rata})$
B: T.R.H. E: $14'97 + 21'59 \times \log \text{Dosis } (\mu\text{g}/\text{rata})$

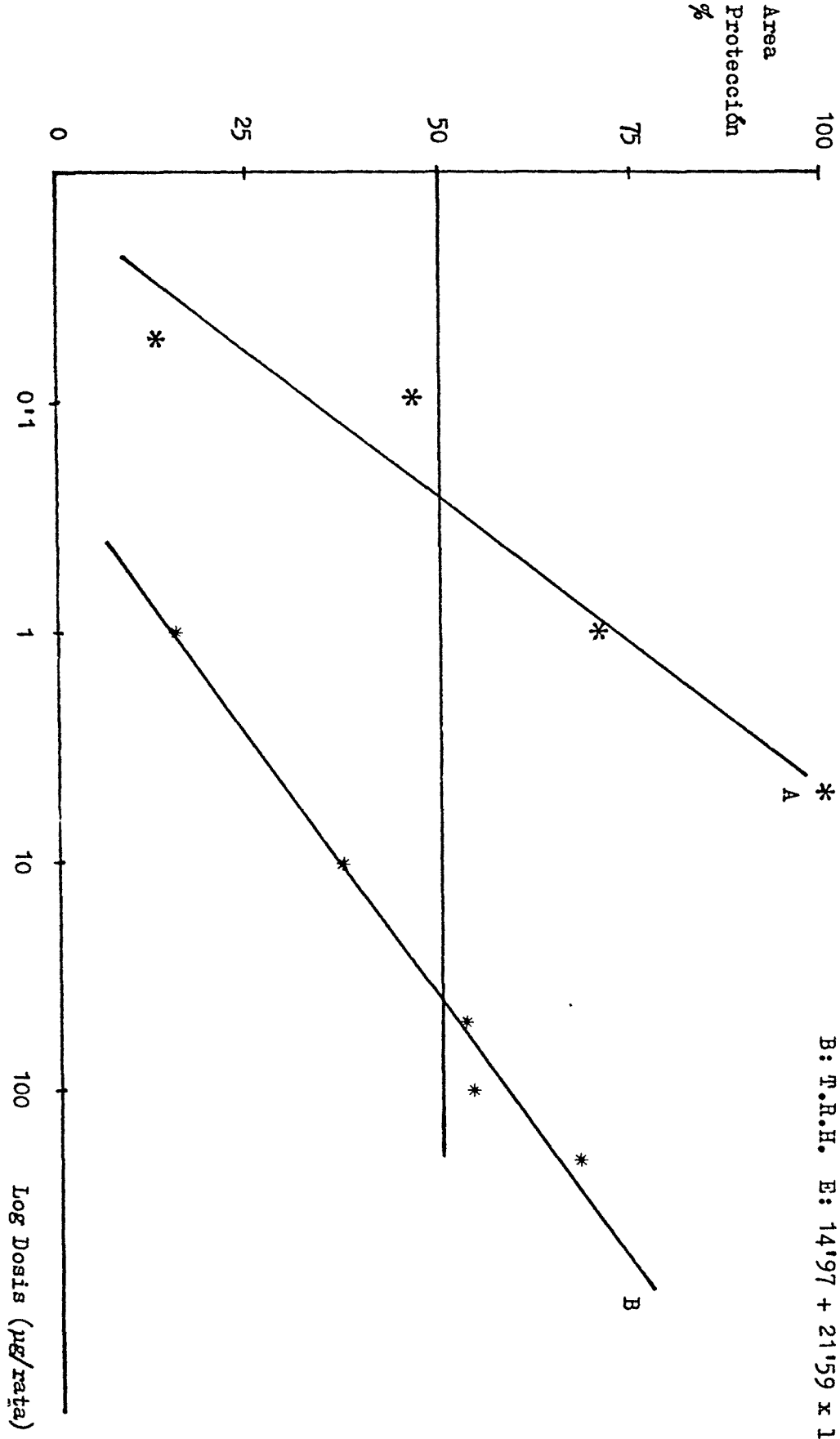


TABLA III ACTIVIDAD ANALGESICA DE LA T.R.H. (I.C.V.) VALORADA 5 MINUTOS DESPUES DE LA ADMINISTRACION EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA.

TRATAMIENTO	DOSIS ug/rata	EFECTO ANALGESICO		D.A. 50 ug/rata
		%	PROBITS	
T. R.H.	10	90	6,2816	0,51
	1	70	5,5244	
	0,5	50	5,0000	
	0,1	20	4,1584	

relación dosis efecto pasando de una protección del 20% a la dosis de 0,1 a un 90% para la dosis de 10 ug/rata.

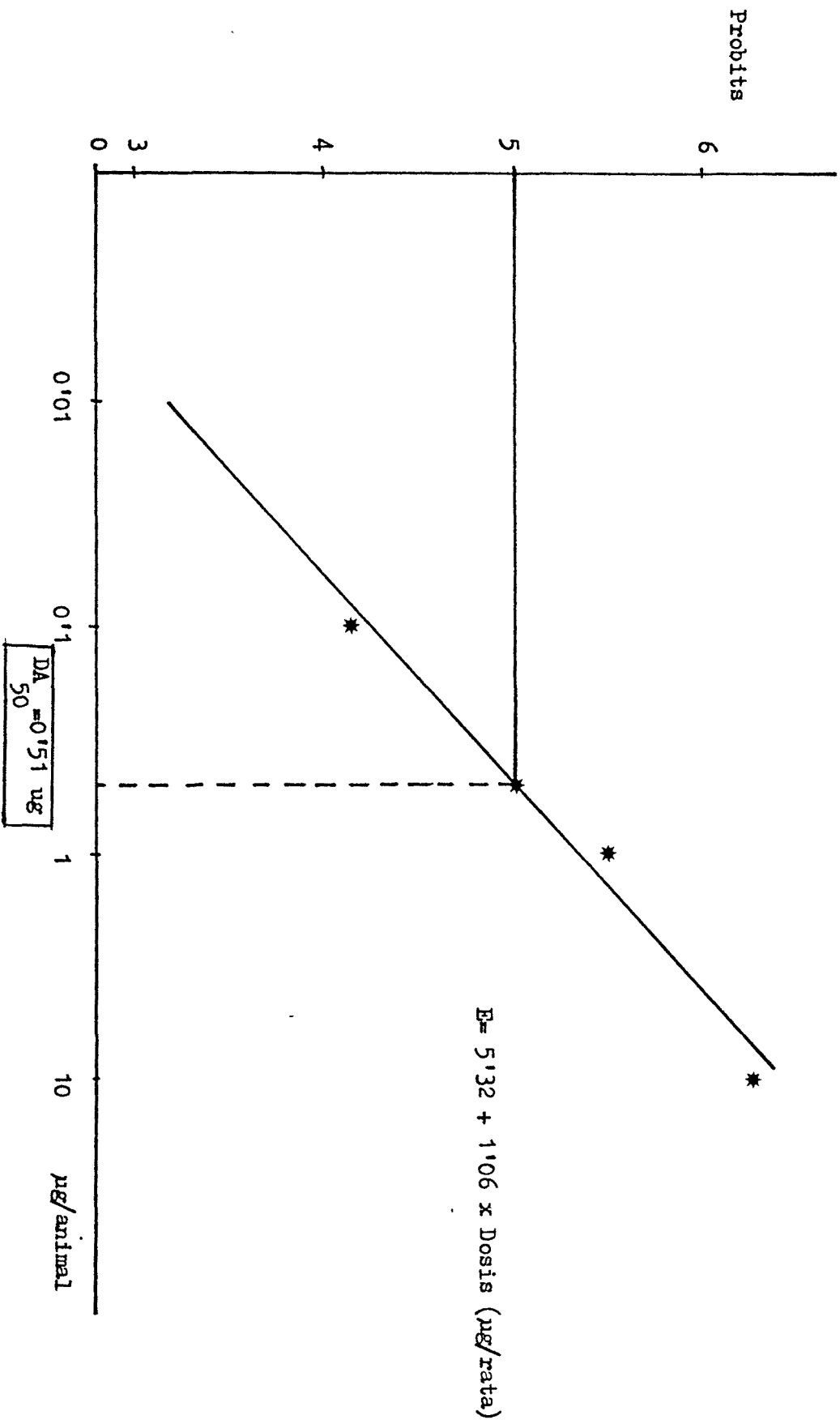
En la figura 5 representamos en ordenadas probits correspondientes a tanto por ciento de efecto y en abscisas dosis en ug/rata. Se obtiene de esta forma, la correspondiente recta de regresión con la siguiente ecuación:

$$E = 5,32 + 1,06 \times \text{dosis}$$

El coeficiente de correlación de la recta es: $r = 0,99$ y la correlación obtenida es altamente significativa ($p < 0,001$).

Por interpolación obtenemos la DA₅₀ de la T R H cuando el efecto se valora a los 5 minutos de la administración quedando establecida en: 0,51 ug/rata que correspondería aproximadamente a 4 ug/kg.

Fig. 5 ACTIVIDAD ANALGESICA T.R.H. (I.C.V.) DETERMINADA A LOS 5 MINUTOS DE LA ADMINISTRACION, EN EL METODO DE PRESION EN LA COILA



5-1-2 : METODO DE LA PLACA CALIENTE

La T R H administrada por vía subcutánea a la dosis de 10 mg/Kg carece de efecto analgésico.

Como observamos en la tabla IV y en la figura 6, la media del tiempo de respuesta al dolor (en segundos) obtenida a los 20, 40 y 60 minutos de la administración no difiere significativamente del control.

Por el contrario, la morfina incrementa de forma notoria dicha media alcanzando su máximo ($29 \pm 0,63$ segundos) a los 40 minutos de la administración del producto. Las diferencias con los animales control son altamente significativas ($p < 0,001$) a todos los tiempos ensayados.

TABLA IV ACTIVIDAD ANALGESICA DEL T.R.H. Y DE LA MORFINA VALORADA EN EL METODO DE LA PLACA CALIENTE.

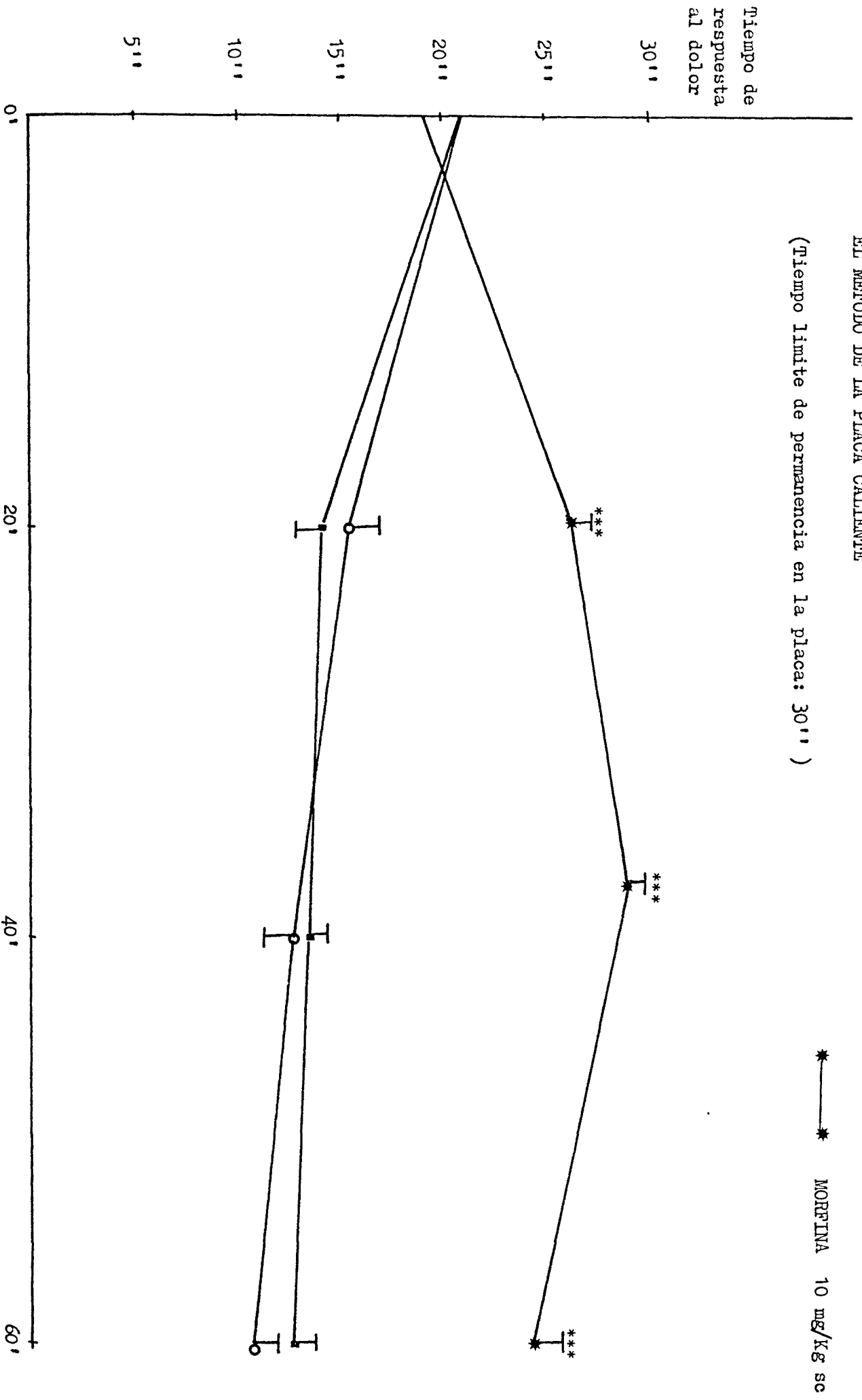
	MEDIA Y ERROR ESTANDAR DEL TIEMPO DE RESPUESTA AL DOLOR EN SEGUNDOS			
	TIEMPO 0	TIEMPO 20	TIEMPO 40	TIEMPO 60
T R A T A M I E N T O				
S. FISIOLOGICO 10ml/kg.	21 \bar{f} 1,09	15,4 \bar{f} 1,43	12,8 \bar{f} 1,46	10,6 \bar{f} 0,82
T.R.H. 10 mg/kg.	21,1 \bar{f} 0,92	14,3 \bar{f} 1,17	13,3 \bar{f} 0,89	12,3 \bar{f} 0,72
NIVEL DE SIGNIFICACION CON RESPECTO AL CONTROL	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
MORFINA 10 mg/kg.	19,3 \bar{f} 1,12	26,4 \bar{f} 0,97	29 \bar{f} 0,63	24,4 \bar{f} 1,6
NIVEL DE SIGNIFICACION CON RESPECTO AL CONTROL.	N.S.	+++	+++	+++

+++ P < 0,001
 ++ P < 0,01
 + P < 0,05

Fig. 6

ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA EN EL METODO DE LA PLACA CALIENTE

(Tiempo limite de permanencia en la placa: 30'')



5-1-3 : METODO DEL ACIDO ACETICO

La T R H administrada por vía subcutánea tiene acción analgésica. En la figura 7 se representa el efecto obtenido (en ordenadas) frente al logaritmo de la dosis en mg/Kg (abscisas).

Con las dosis de 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/Kg de T R H se obtiene la correspondiente recta de regresión que tiene la ecuación siguiente:

$$E = 15 + 56 \times \log \text{ dosis (mg/Kg)}$$

El coeficiente de correlación de dicha recta es de: $r = 0,98995$ y la correlación lineal es significativa ($p < 0,02$) entre efecto y logaritmo de la dosis.

Por interpolación la DA₅₀ de T R H por vía subcutánea en este método es de 4,22 mg/Kg.

Operando de forma análoga, con las dosis de morfina ensayadas: 0,16, 0,32, 0,64, 1,0 y 1,28 mg/Kg se obtiene la recta de regresión correspondiente con la siguiente ecuación:

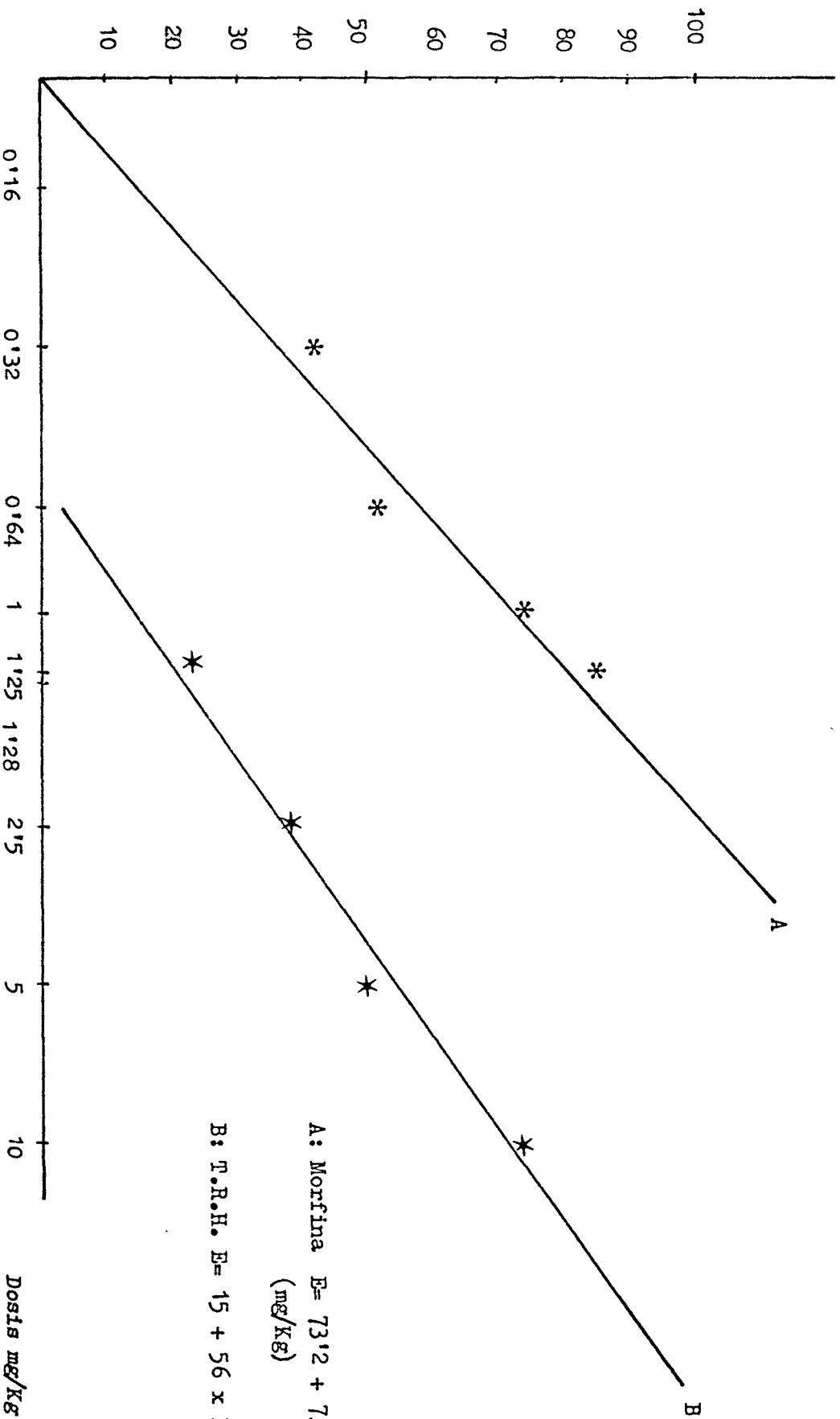
$$E = 73,2 + 73,1 \times \log \text{ dosis (mg/Kg)}$$

El coeficiente de correlación de dicha recta es de : $r = 0,986$ y la correlación lineal es muy significativa ($p < 0,01$).

La DA₅₀ de la morfina en este método es de 0,48 mg/Kg.

Comparando ambas rectas se observa una mayor ordenada en el origen y una mayor pendiente en el caso de la morfina.

Fig. 7 EFECTO ANALGESICO DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA
(Metodo del Ac. Acetico)



A: Morfina $E = 73.2 + 73.1 \times \log do$
(mg/kg)

B: T.R.H. $E = 15 + 56 \times \log dosis$ (m

5-1-4 : METODO DE LA FENILBENZOQUINONA

La T R H presenta actividad analgésica valorada en este método.

Se ha determinado la acción analgésica administrando el peptido por vía subcutánea y endovenosa tal como se aprecia en la figura 8 donde se representa el efecto obtenido frente al logaritmo de la dosis.

La recta de regresión obtenida para la T R H por vía endovenosa tiene la siguiente ecuación:

$$E = 51,22 + 43,55 \times \log \text{ dosis (mg/Kg)}$$

Su coeficiente de correlación es de: $r = 0,993$ existiendo una correlación lineal altamente significativa ($p < 0,001$) entre efecto y logaritmo de la dosis.

Por interpolación la DA₅₀ obtenida para la T R H por vía endovenosa es de 0,94 mg/Kg.

La recta de regresión obtenida cuando se administra la T R H por vía subcutánea tiene la siguiente ecuación:

$$E = 20,5 + 70,7 \times \log \text{ dosis (mg/Kg)}$$

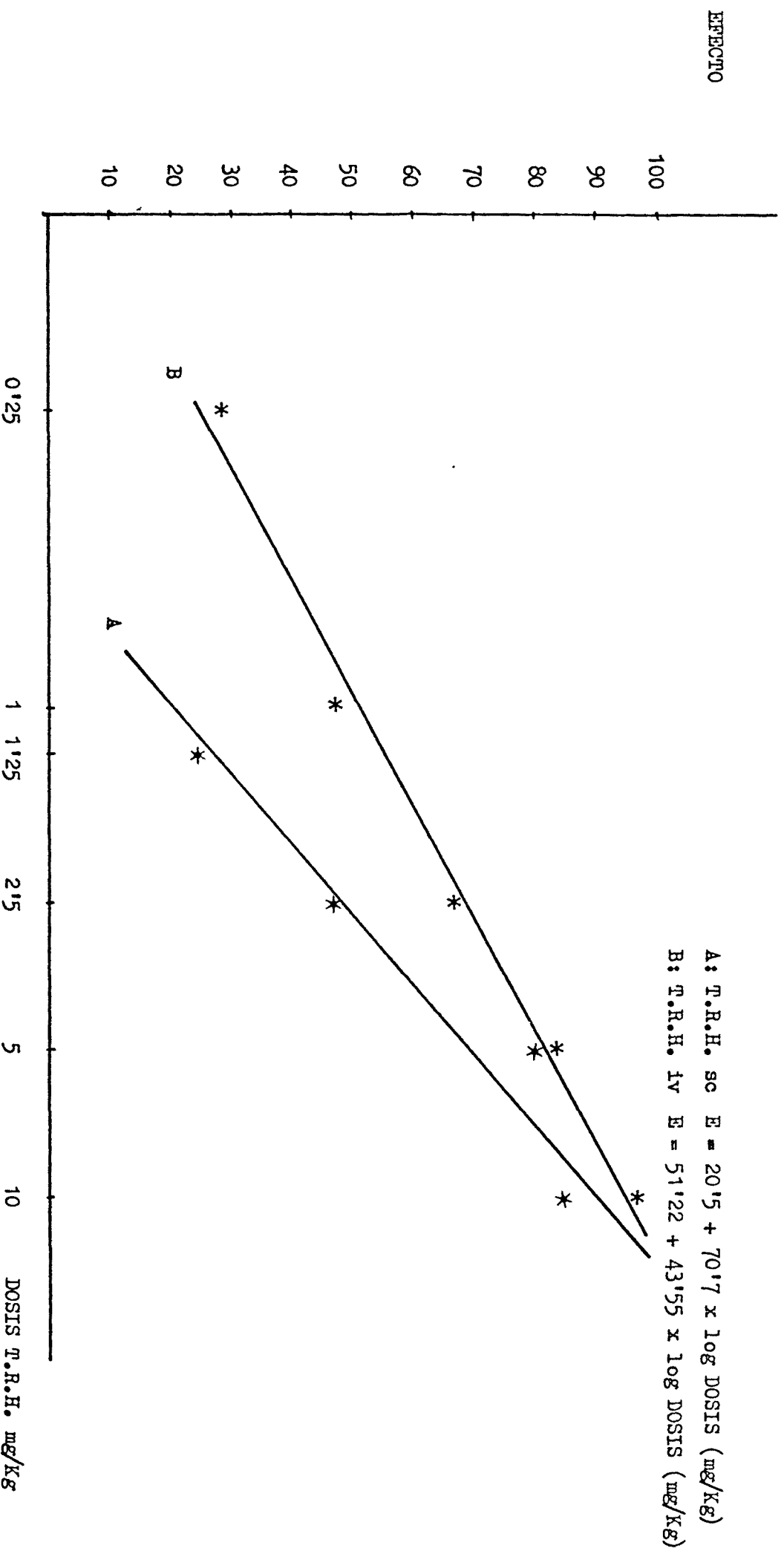
El coeficiente de correlación es de: $r = 0,968$ con una correlación lineal significativa ($p < 0,05$) entre efecto y logaritmo de la dosis.

Por interpolación la DA₅₀ sería en este caso de 2,61 mg/Kg.

Estudiando ambas rectas de modo comparativo se observa una ordenada en el origen más elevada cuando la administración es por vía endovenosa.

Fig. 8

EFEECTO ANALGESICO DE LA T.R.H. POR VIA ENDOVENOSA Y SUBCUTANEA
(Metodo de la Fenil Benzquinona)



En la figura 9 se compara la recta de regresión obtenida por la T R H cuando se administra por vía subcutánea con la obtenida con la morfina administrada por la misma vía.

La recta de regresión para la morfina presenta la siguiente ecuación:

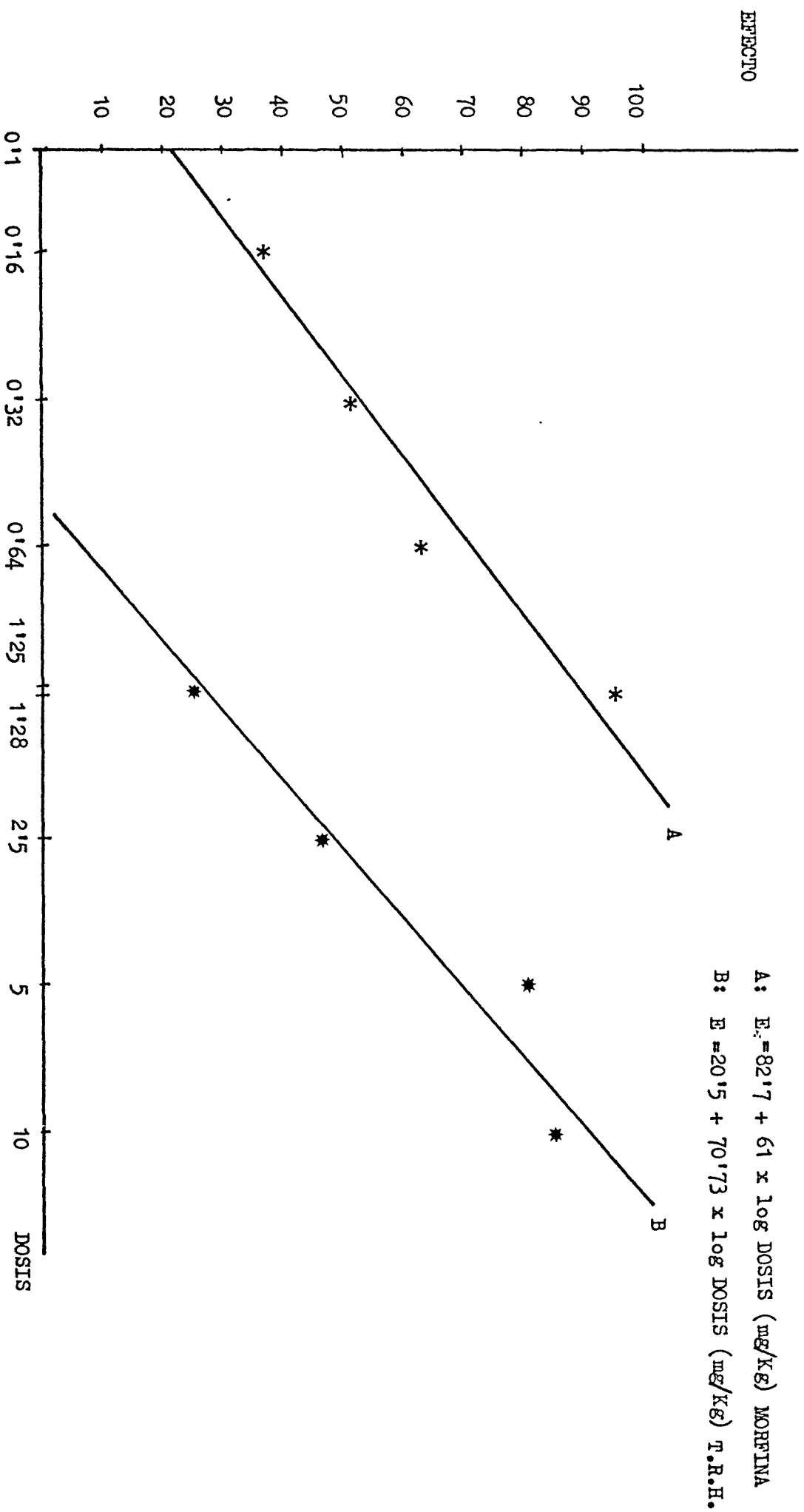
$$E = 82,7 + 61 \times \log \text{ dosis (mg/Kg)}$$

Su coeficiente de correlación es de : $r = 0,969$ con una correlación lineal significativa ($p < 0,05$) entre efecto y logaritmo de la dosis.

Por interpolación la DA₅₀ de la morfina valorada en el método de la fenilbenzoquinona sería de 0,29 mg/Kg.

Si comparamos las rectas de regresión obtenidas con la T R H y con la morfina observamos como en este último caso, el valor de la ordenada en el origen es muy superior.

Fig. 9
 EFECTO ANALGESICO DE LA T.R.H. Y MORFINA POR VIA SUBCUTANEA
 (Metodo de la Fenil Benzquinona)



5-2 POSIBLE INTERACCION DE LA T R H CON RECEPTORES OPIACEOS.

5-2-1 : INFLUENCIA DE LA NALOXONA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H Y DE LA MORFINA.

En la tabla V se aprecia como la naloxona no modifica la accion analgésica de la T R H valorada en el método de presión en la cola.

La T R H a la dosis de 100 ug/rata nos da un área de protección de 15,65 kilopondios/minuto que no difiere significativamente de la obtenida en ausencia de la naloxona (17,25 kilopondios/minuto).

Por el contrario el efecto analgésico obtenido con 5 ug/rata de morfina se reduce de modo impresionante por la naloxona, obteniéndose un área de protección de 13,34 kilopondios/minuto con una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) con la obtenida por la morfina, a esta misma dosis, en ausencia de la naloxona (23,38 kilopondios/minutos.

En la tabla VI se expresa el efecto de la naloxona sobre el porcentaje del área de protección obtenido con la T R H y con la morfina en presencia y en ausencia de la naloxona.

En el caso de la T R H dicho porcentaje no difiere significativamente, obteniéndose valores de 48,91 en ausencia de naloxona y de 46,45 en presencia de naloxona.

En el caso de la morfina la reducción del porcentaje del área de protección en presencia de naloxona es muy acentuada, pasando de un 100% a un 28,22% con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$).

TABLA V INFLUENCIA DE LA NALOXONA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA Y DE LA T.R.H.
VALORADAS EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA.

PRODUCTO	DOSIS ug /rata	MEDIA DE PRESIONES SOPORTADAS PARA CADA TIEMPO										AREA KILOPON- DIOS/MIN
		-45'	-30'	-15'	+ 5'	+ 15'	+ 30'	+ 45'	+ 60'			
SUERO SALINO	--	166,00	164,00	158,00	174,00	166,00	144,00	137,50	146,00		9,09	
MORFINA	5	176,00	166,00	152,00	242,00	234,00	230,00	224,00	188,00		13,34	
T.R.H.	100	168,00	154,00	153,00	365,00	310,00	257,00	210,00	220,00		15,65	

TABLA VI INFLUENCIA DE LA NALOXONA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA Y DE LA T.R.H.:
VALORADAS EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA.

PRODUCTO	DOSIS ug/rata	AREA DE PROTECCION %		SIGNIFICACION ESTADISTICA
		SIN NALOXONA	CON NALOXONA	
MORFINA	5	100,13 ± 0,28	28,22 ± 11,59	+++
T.R.H.	100	48,91 ± 18,93	46,45 ± 17,75	N.S.

+++++ P < 0,001
 +++ P < 0,01
 + P < 0,05

En la figura 10 expresamos en un diagrama de barras los resultados expuestos en la tabla VI.

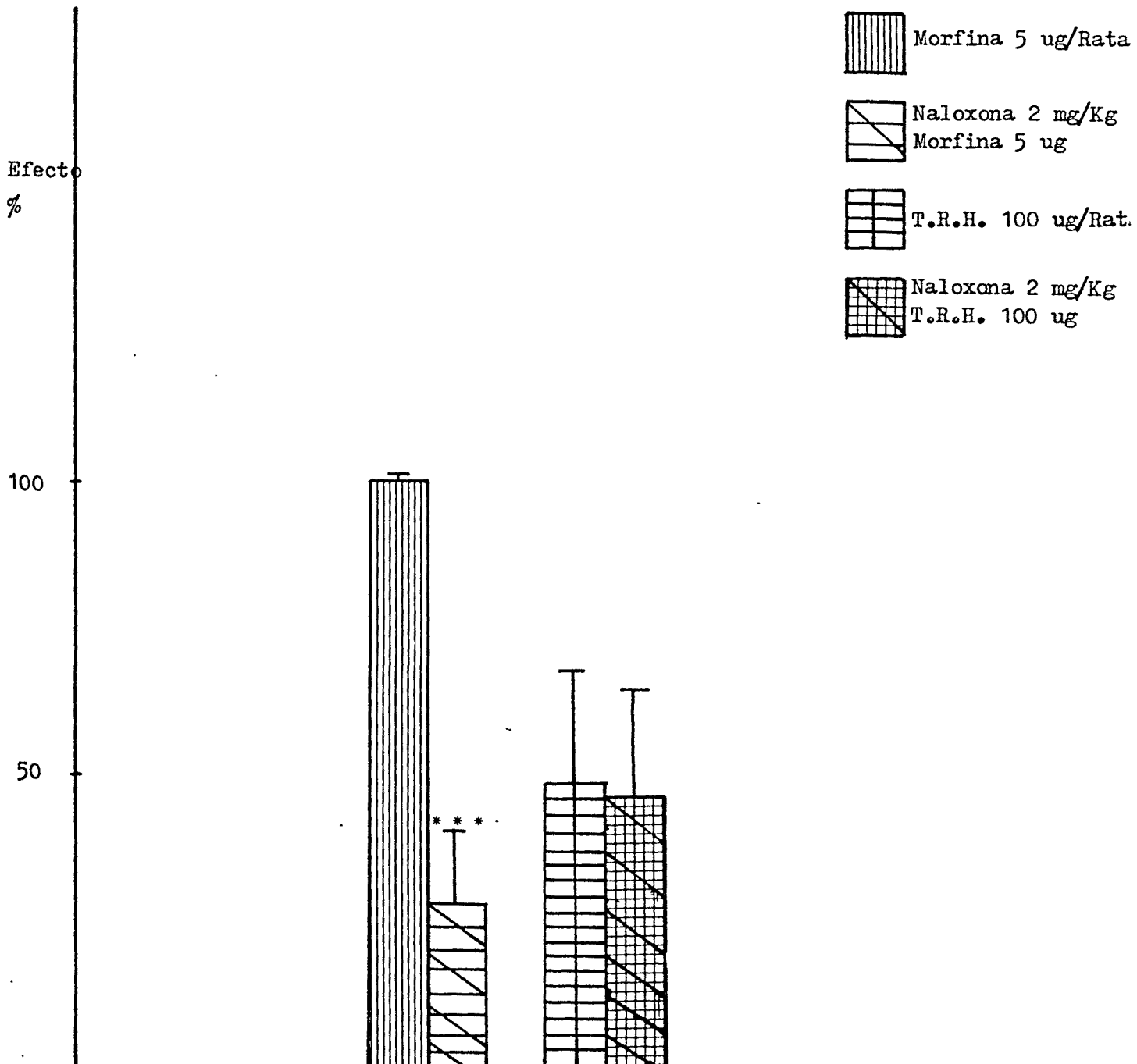
5-2-2 : ACCION EN LA PREPARACION DE MUSCULO LONGITUDINAL - PLEXO
MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO.

Tal como observamos en la figura 11 la T R H , a ninguna de las concentraciones ensayadas(Desde $1,75 \times 10^{-8}$ M a $1,75 \times 10^{-5}$ M) inhibe las contracciones obtenidas.

En la figura 12, se observa el efecto obtenido con la morfina a concentraciones de 5×10^{-8} M . Se aprecia una reducción marcada en las contracciones, que corresponde a un 43,48 % y también observamos como la naloxona, a concentraciones de 5×10^{-8} M antagoniza esta inhibición.

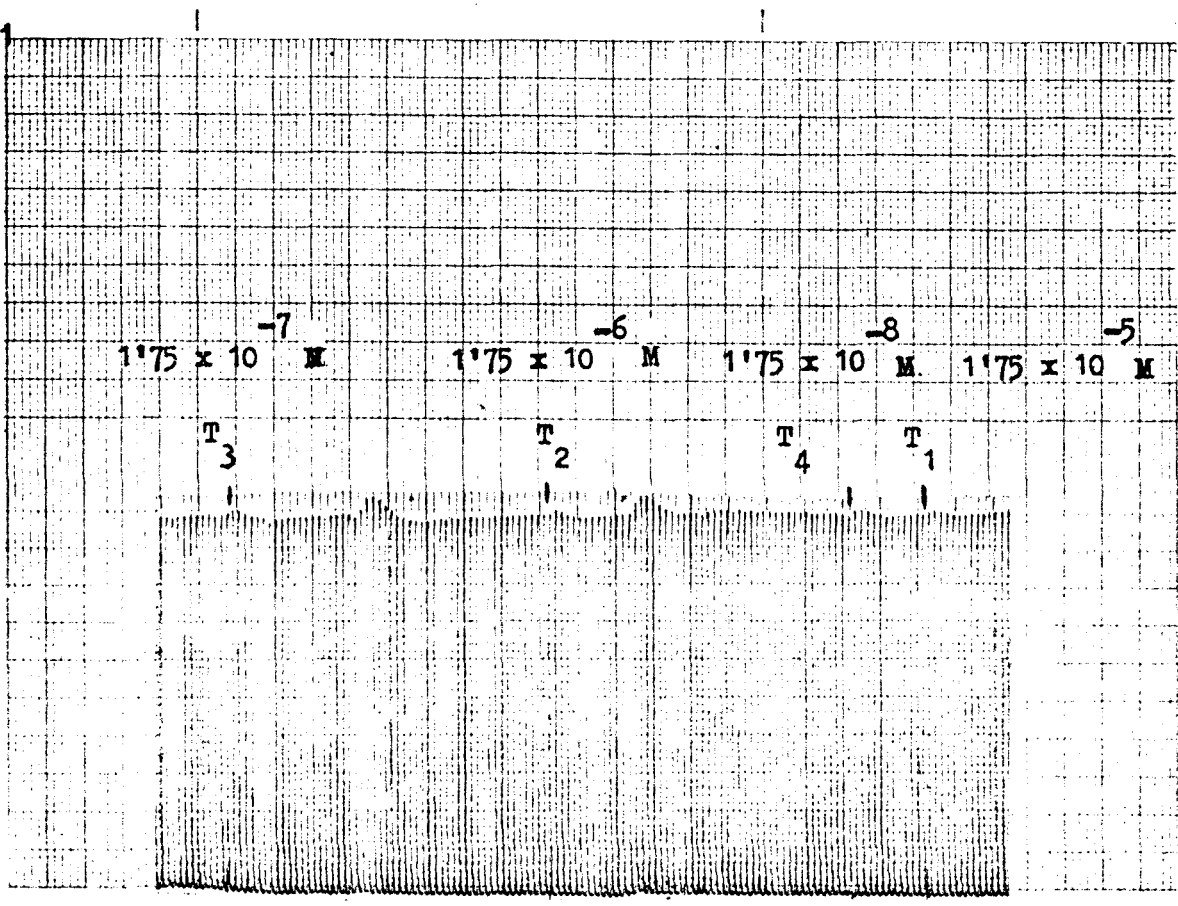
ig. 10

INFLUENCIA DE LA NALOXONA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA Y DE LA T.R.H.



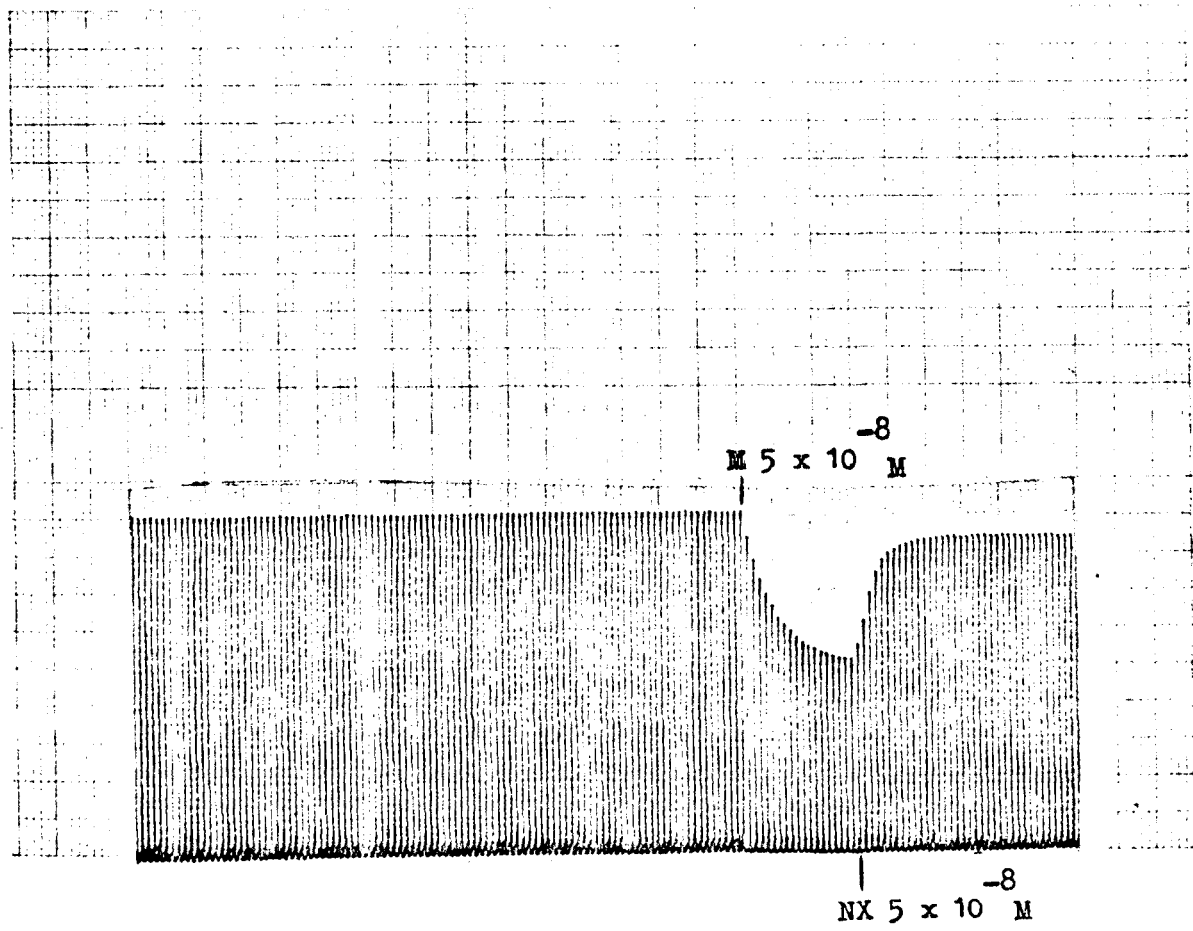
ACCION DE LA T.R.H. EN LA PREPARACION MUSCULO LONGITUDINAL-PLEXO-
MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO ESTIMULADO ELECTRICAMENTE

ig. 11



ACCION DE LA MORFINA EN LA PREPARACION MUSCULO LONGITUDINAL-PREXO-
MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO ESTIMULADO ELECTRICAMENTE. ANTAGONISMO
POR LA NALOXONA

ig. 12



5-3 ACCION ANALGESICA DE LA HISTIDILPROLINA DICETOPIPERACINA.

La histidilprolina dicetopiperacina carece de acción analgésica valorada en el método de presión en la cola.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla VII. El área de protección obtenida cuando se administra 100 ug/rata de histidilprolina dicetopiperacina es de 10,63 kilopondios/minuto que no difiere prácticamente de la obtenida con la administración de suero fisiológico (9,93 kilopondios/minuto) y que es muy distinta de la obtenida con 100 ug/rata de T R H (16,94 kilopondios/minuto).Expresando estos resultados en porcentajes del área de protección la histidilprolina dicetopiperacina obtiene un 5,2% , que no difiere estadísticamente del control y la T R H un 52,1% , con una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) con respecto al control.

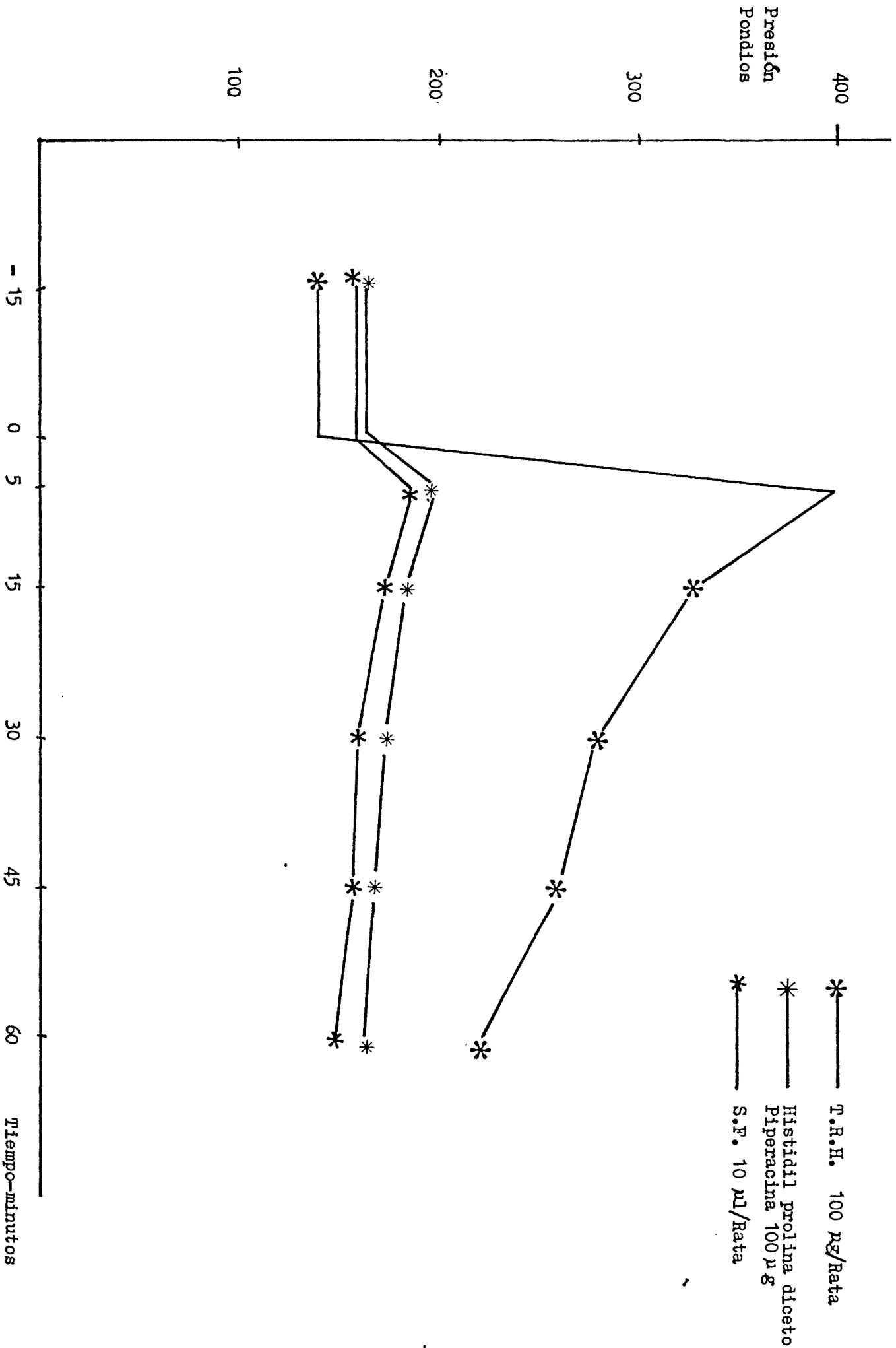
En la figura 13, representando en ordenadas la media de presiones soportadas en pondios y en abscisas el tiempo en minutos, expresamos gráficamente los resultados expuestos en la tabla VII. Podemos apreciar como la histidilprolina dicetopiperacina es muy similar al control y la notable diferencia existente entre ambos y la T R H.

TABLA VII EFECTO DE LA TRH Y DE LA HISTIDIL PROLINA DICETO PIPERACINA (I.C.V.) EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA

TRATAMIENTOS.	D O S I S	MEDIA DE PRESIONES SOPORTADAS PARA CADA TIEMPO						AREA DE PROTECCION KILOPON-DIOS/MIN.	AREA PROTECC. %	NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO AL CONTROL.
		- 15	+ 5	+ 15	+ 30	+ 45	+ 60			
S. FISIO-LOGICO	10 ul	160,00	187,14	174,24	161,42	160,00	150,00	9,93	0	
HIS-PRO DICETOPI-PERACINA	100	164,20	200,00	185,70	174,28	168,57	167,14	10,63	5,2	N.S.
T. R. H.	100	141,00	400,00	329,00	279,00	262,00	223,75	16,94	52,1	+++

+++ p < 0,001
 ++ p < 0,01
 + p < 0,05

EFFECTOS DE LA T.R.H. Y DE LA HISTIDIL PROLINA DICETO PIPERACINA EN EL METODO DE PRESSION EN LA COIA



5-4 ACCION ANALGESICA DE LA 'ACETIL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA Y DEL CLORHIDRATO DE BENZOIL-L-HISTIDIL -L-PROLINAMIDA.

Los dos análogos de la T R H estudiados presentan actividad analgésica cuando se valoran en el método de presión en la cola.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla VIII. Como en el caso de la T R H el efecto máximo se produce a los 5 minutos de la administración intracerebro ventricular de los péptidos y el efecto declina con rapidez a lo largo del tiempo. El efecto obtenido con ambos análogos es algo inferior al obtenido con la T R H como vemos a continuación:

a) Con la acetil -l-histidil-l-prolinamida obtenemos un área de protección de 15,47 kilopondios/minuto que expresado en porcentaje representa el 41,18%. Este porcentaje comparado con el control es altamente significativo ($p < 0,001$), no difiriendo estadísticamente del porcentaje obtenido con la T R H (52,1%).

b) Con el clorhidrato de benzoil-l-histidil-l-prolinamida, obtenemos un área de protección de 14,47 kilopondios/minuto que expresado en porcentaje representa el 35,98%. Este porcentaje es altamente significativo ($p < 0,001$) comparado con el control y significativo ($p < 0,05$) cuando se compara con la T R H.

En la figura 14 se expresan gráficamente los resultados obtenidos en la tabla VIII.

En las figuras 15 y 16 representamos gráficamente las estructuras químicas de ambos análogos, de la T R H, de la histidilprolina dicetopiperacina y de la morfina.

TABLA VIII EFECTO DE LA T.R.H. ACETIL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA Y CLORHIDRATO DE BENZOIL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA (I.C.V.) EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA.

TRATAMIENTO	DOSIS	MEDIA DE PRESIONES SOPORTADAS PARA CADA TIEMPO						AREA PROTECCION KILOPONDIOS/MIN. ± ERROR ESTANDAR	AREA PROTECCION %
		- 15	+ 5	+ 15	+ 30	+ 45	+ 60		
S. FISIOLOGI- GO.	10 uL	160,00	187,14	174,24	161,42	160	150	9,93 ± 0,88	0
T.R.H.	100 ug	141,00	400,00	329,00	279,00	262,00	237,75	16,94 ± 0,89	52,1 (+++)
ACETIL-L- HISTIDIL-L- PROLINAMIDA	100 ug	152,14	350,71	309,28	234,28	230,71	215,00	15,47 ± 0,70	41,18 (+++)
BENZOIL-L- HISTIDIL-L- PROLINAMIDA CLORHIDRATO	100 ug	153,00	320,00	297,00	229,00	215,56	196,00	14,77 ± 0,49	35,98 (+++)

NIVEL DE SIGNI-
 FICACION RESPEC-
 TO AL CONTROL

{

 +++ p < 0,001

 ++ p < 0,01

 + p < 0,05

NIVEL DE SIGNI-
 FICACION RESPEC-
 TO AL TRH

{

 ~~~~p 0,001
   
 ~~~~p 0,01

 ~~~~p 0,05

Fig. 14

EFECTOS DE LA T.R.H. Y DE DOS DIPEPTIDOS ANALOGOS EN EL METODO DE PRESION EN LA COLA

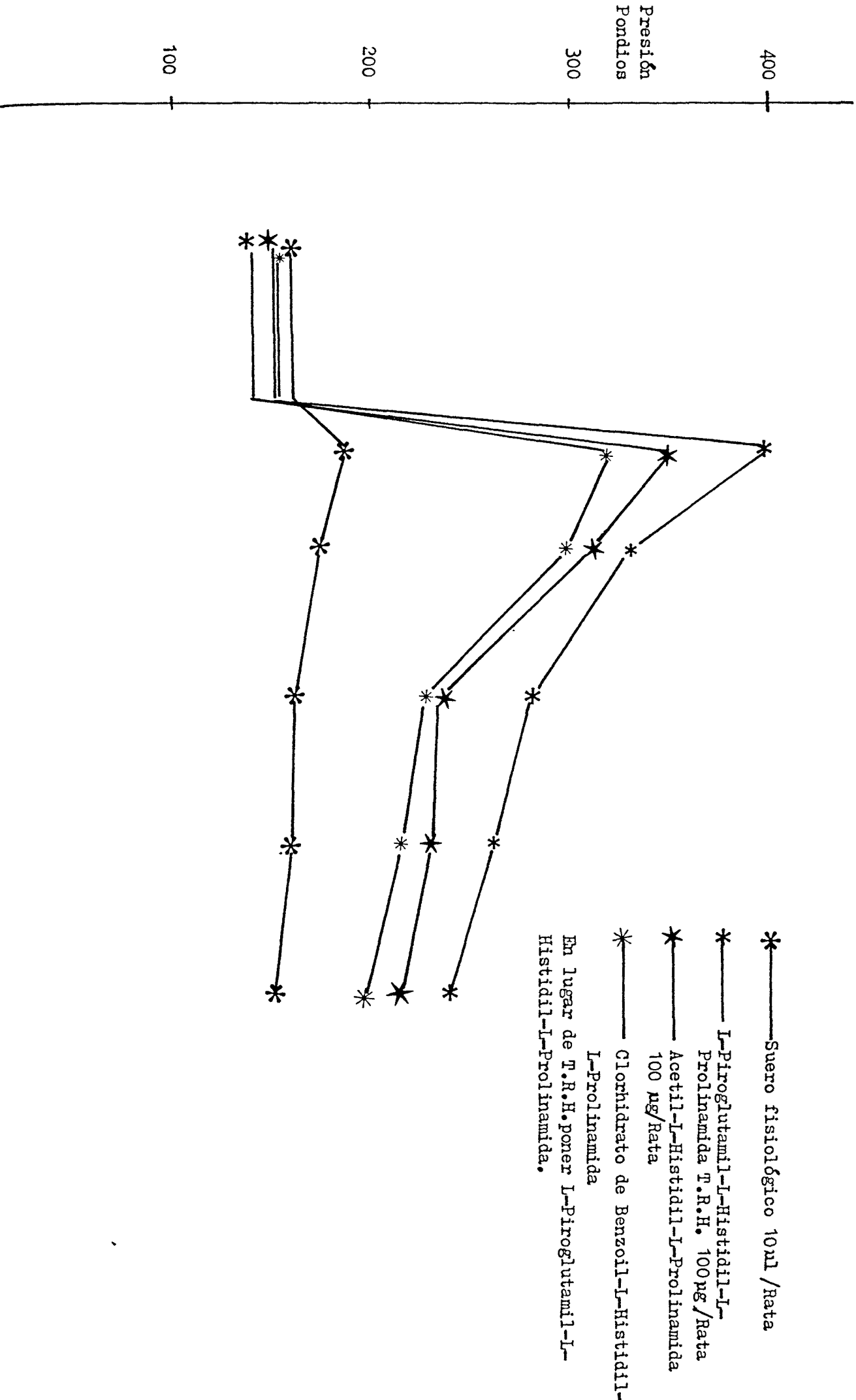
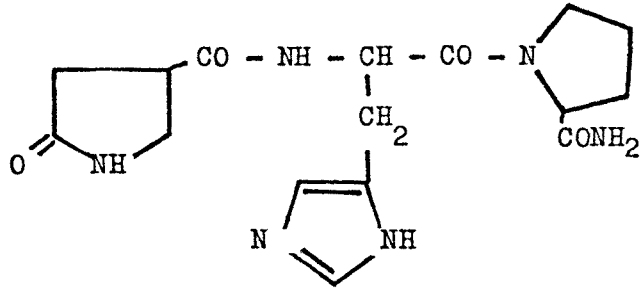
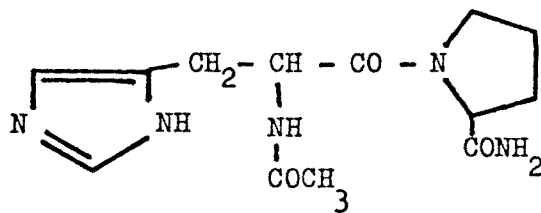


Fig. 15

T.R.H.



ACEFIL- L- HISTIDIL- L- PROLINAMIDA



BENZOIL - L - HISTIDIL - L - PROLIDAMIDA Clorhidrato

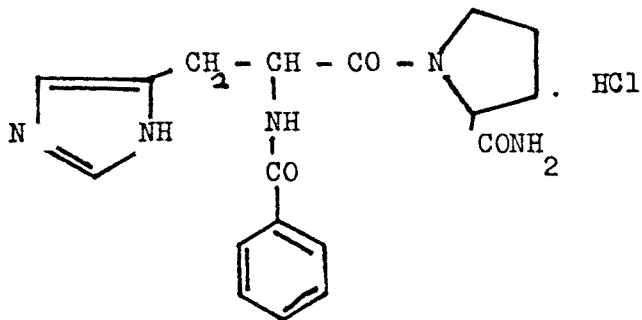
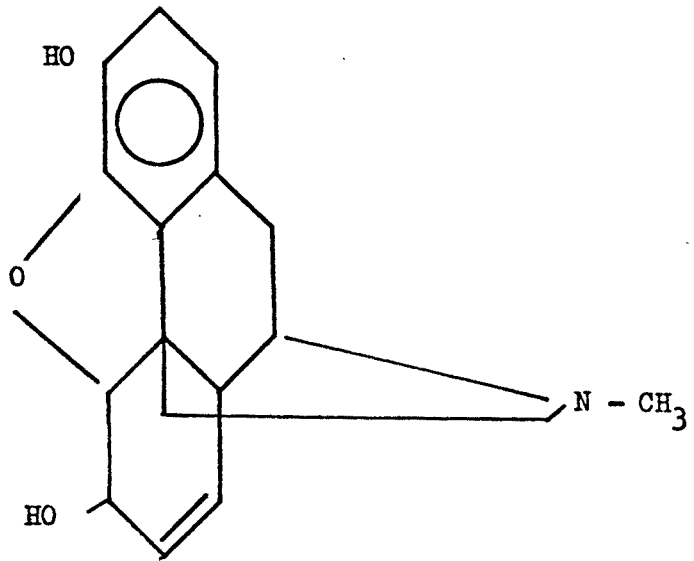
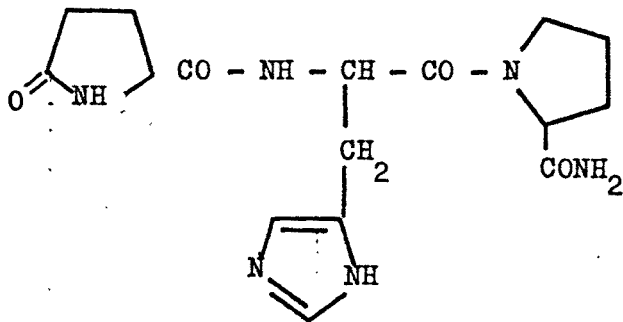


Fig. 16

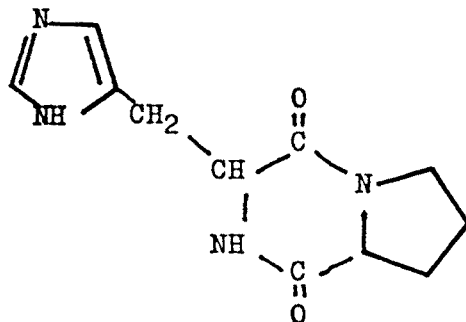
MORFINA:



T.R.H.



HISTIDILPROLINA DICETOPIPERACINA



5-5 INFLUENCIA DE FARMACOS QUE MODIFICAN EL CONTENIDO DE AMINAS  
BIOGENAS EN EL S.N.C. SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H  
Y DE LA MORFINA.

5-5-1 : RESERPINA.

- a) Cuando se emplea la T R H y morfina a dosis de 2,5 y 0,321 mg/kg. encontramos los resultados de la tabla IX que se pueden resumir de la forma siguiente:
- 1º) El pretratamiento con reserpina no modifica la media de contorsiones realizadas, comparativamente con el control.
- 2º) La media de contorsiones realizadas por los animales que recibieron suero fisiológico y 0,321 mg/Kg de morfina fue de 19,4, que es muy significativa ( $p < 0,01$ ) comparada con el control. Los animales pretratados con reserpina y administrados con la misma dosis de morfina presentan un aumento en la media de contorsiones realizadas que es de 29,5, sin que se aprecien diferencias significativas con los animales control.
- 3º) No se observan diferencias significativas en el efecto analgésico de la T R H en presencia o en ausencia de reserpina, siendo las medias obtenidas de 19,25 y 19,6 respectivamente.
- b) Cuando se emplean la T R H y morfina a dosis de 10 y 1 mg/Kg respectivamente los resultados obtenidos se muestran en la tabla X y en la figura 17 y los podemos resumir a continuación:

TABLA IX INFLUENCIA DE LA RESERPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA  
DE LA TRH Y DE LA MORFINA

| PARAMETRO                                       | C O N T R O L | RESERPINA<br>SUERO FISIOLO<br>GICO | SUERO FISIOLO<br>GICO<br>TRH 2'5 mg/Kg | RESERPINA<br>TRH 2'5mg./Kg | SUERO FISIOLO<br>GICO<br>MORFINA<br>0'321 mg/Kg | RESERPINA<br>MORFINA<br>0'321mg/Kg. |
|-------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------|
| M E D I A                                       | 35,47         | 36,85                              | 19,6                                   | 19,25                      | 19,4                                            | 29,5                                |
| ERROR STANDARD                                  | 3,18          | 4,88                               | 2,76                                   | 3,22                       | 4,05                                            | 3,97                                |
| NIVEL DE SIGNIFI-<br>CACION RESPECTO<br>CONTROL |               | N.S.                               | +++                                    | ++                         | ++                                              | N.S.                                |
| NIVEL DE SIGNIFI-<br>CACION RESPECTO<br>PATRON  |               |                                    |                                        | N.S.                       |                                                 | N.S.                                |

+++ P < 0'001  
++ P < 0'01  
+ P < 0'05



- 1º) El pretratamiento con reserpina no modifica significativamente la media de contorsiones realizadas con respecto al control.
- 2º) A esta dosis, el lote tratado con morfina, presenta una media de contorsiones de 5,4, con una diferencia muy significativa (  $p < 0,01$  ) con respecto al control. El pretratamiento con reserpina eleva de forma marcada la media de contorsiones que pasa a ser de 27,8 , reduciendo el nivel de significación con respecto al control, a no significativo y existiendo entre ambos tipos de tratamiento una diferencia significativa (  $p < 0,05$  ).
- 3º) El pretratamiento con reserpina no modifica la media de contorsiones obtenida con 10 mg/Kg de T R H, que es de 9,8. En ausencia de reserpina dicha dosis nos da una media de 10,6. En ambos casos, el nivel de significación comparando la media de contorsiones realizadas con respecto al lote control es muy significativo (  $p < 0,01$  ).

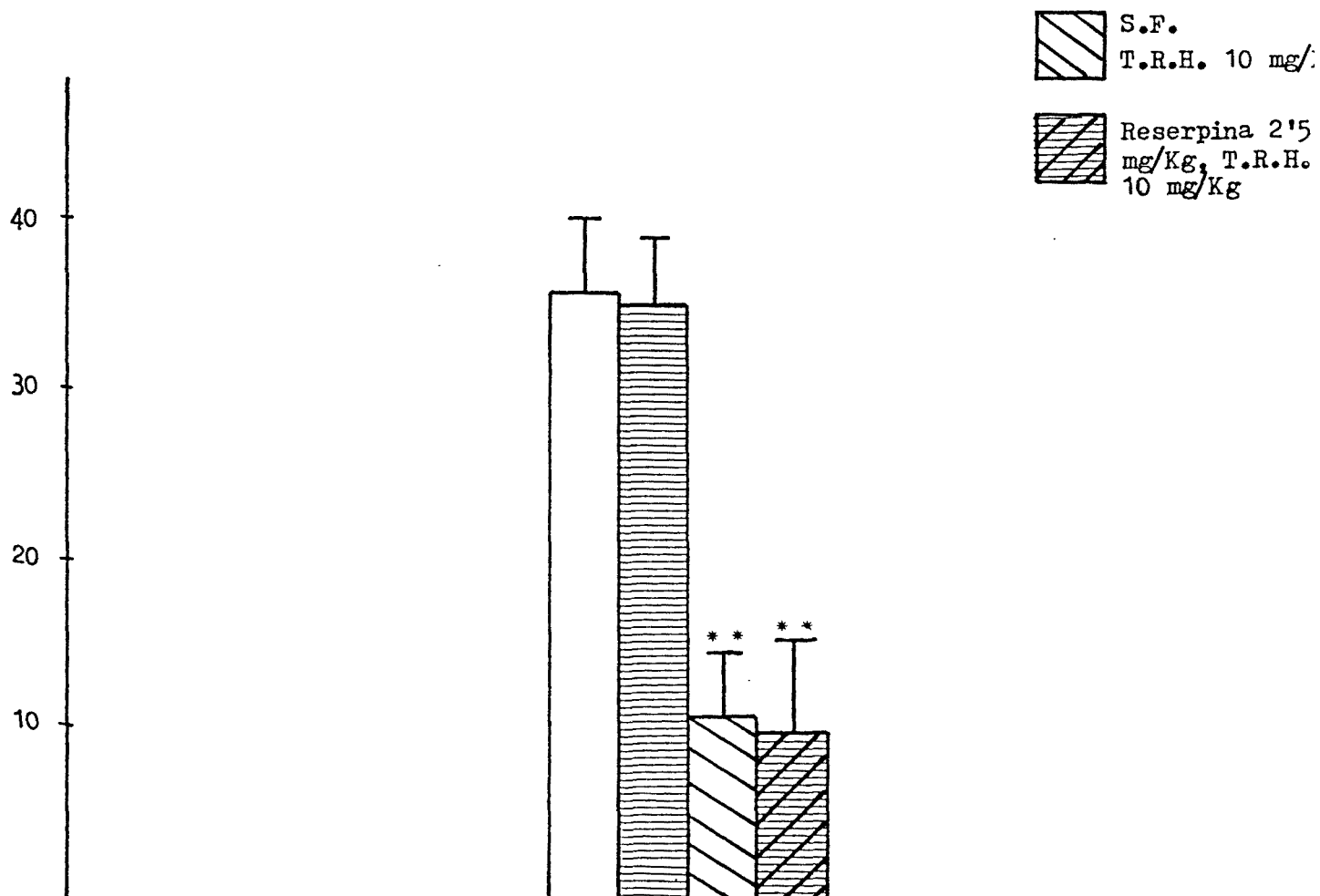
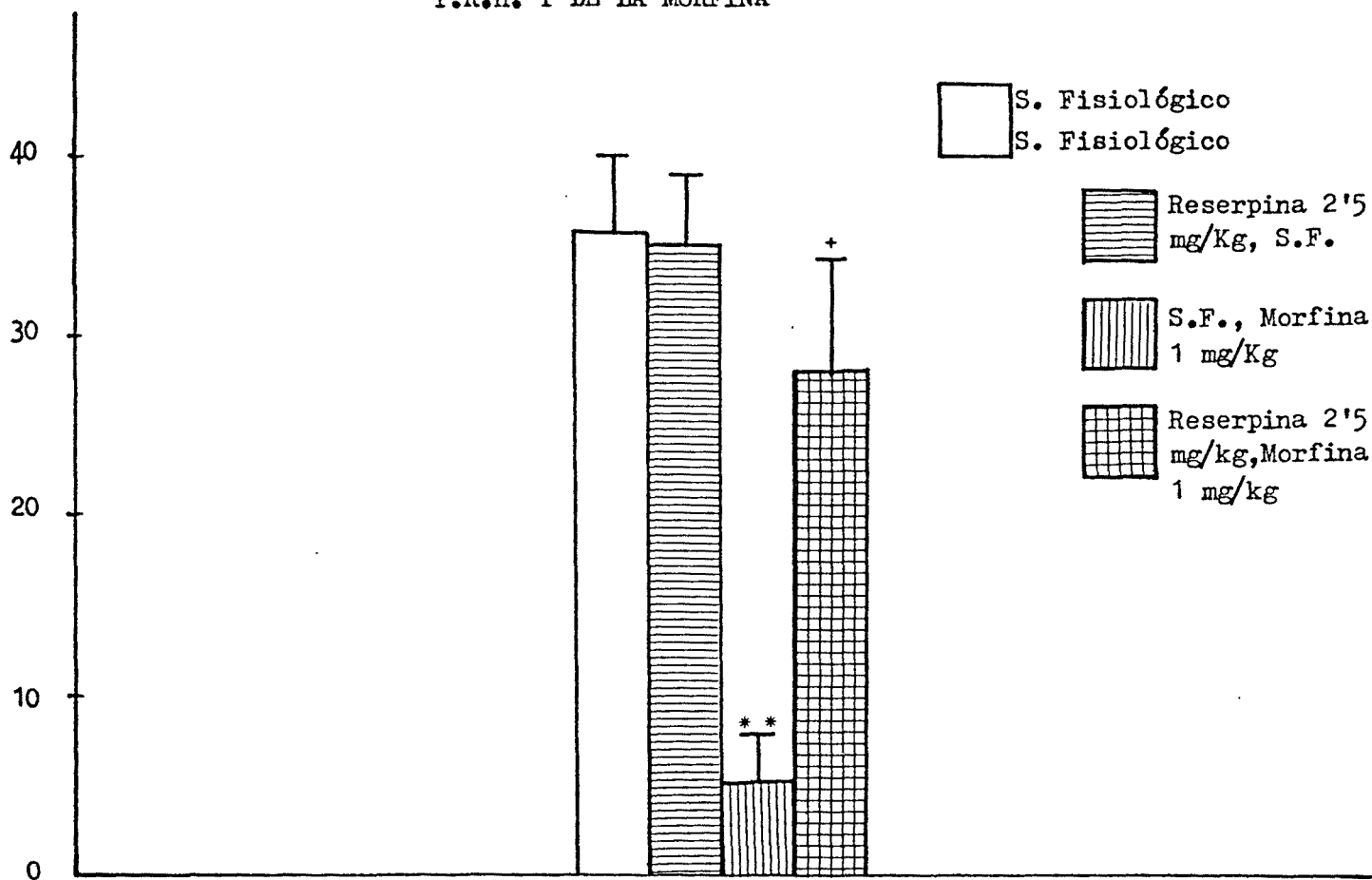
TABLA X INFLUENCIA DE LA RESERPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH Y DE LA MORFINA

| PARAMETRO                               | CONTROL | RESERPINA<br>SUERO FISIOLÓGICO | SUERO FISIOLÓGICO<br>TRH 10mg/Kg. | RESERPINA<br>TRH 10 mg./kg | SUERO FISIOLÓGICO<br>MORFINA 1mg/Kg | RESERPINA<br>MORFINA 1 mg./Kg. |
|-----------------------------------------|---------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| MEDIA                                   | 35,6    | 35,06                          | 10,6                              | 9,8                        | 5,4                                 | 27,8                           |
| ERROR STANDARD                          | 5,16    | 4,56                           | 3,35                              | 5,68                       | 2,48                                | 6,72                           |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                           | ++                                | ++                         | ++                                  | N.S.                           |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                                |                                   | N.S.                       |                                     | ^                              |

+++ p < 0'0001  
 ++ p < 0'01  
 + p < 0'05

^^^ p < 0'0001  
 ^^ p < 0'01  
 ^ p < 0'05

INFLUENCIA DE LA RESERPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA  
T.R.H. Y DE LA MORFINA



## 5-5-2 : APOMORFINA.

## 5-5-2-1 INFLUENCIA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H Y DE LA MORFINA.

Los resultados se aprecian en la tabla XI y en la figura 18 resumiéndolos a continuación:

- 1º) la apomorfin a la dosis ensayada ( 0,25 mg/Kg ) no modifica la media de contorsiones realizadas respecto al control.
- 2º) La respuesta obtenida con 1 mg/Kg de morfina expresada como media de contorsiones es de 10,4 con una diferencia altamente significativa (  $p < 0,001$  ) con respecto al control. El tratamiento con apomorfin eleva notablementè esta media que pasa a ser de 20,8, reduciendo su nivel de significación con respecto al control a muy significativo (  $p < 0,01$  ), apreciándose entre ambos tratamientos una diferencia significativa (  $p < 0,05$  ).
- 3º) La media de contorsiones realizadas con la dosis de 5 mg/Kg de T R H es de 20,37 con una diferencia muy significativa (  $p < 0,01$  ) respecto al control. El tratamiento con apomorfin y T R H disminuye considerablemente la media de contorsiones realizadas que pasa a ser de 8,8 aumentando la significación con respecto al control a niveles altamente significativos (  $p < 0,001$  ), apreciándose entre ambos tratamientos una diferencia significativa (  $p < 0,05$  ) .

## 5-5-2-2 INFLUENCIA DE LA APOMORFINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE DOSIS CRECIENTES DE T R H.

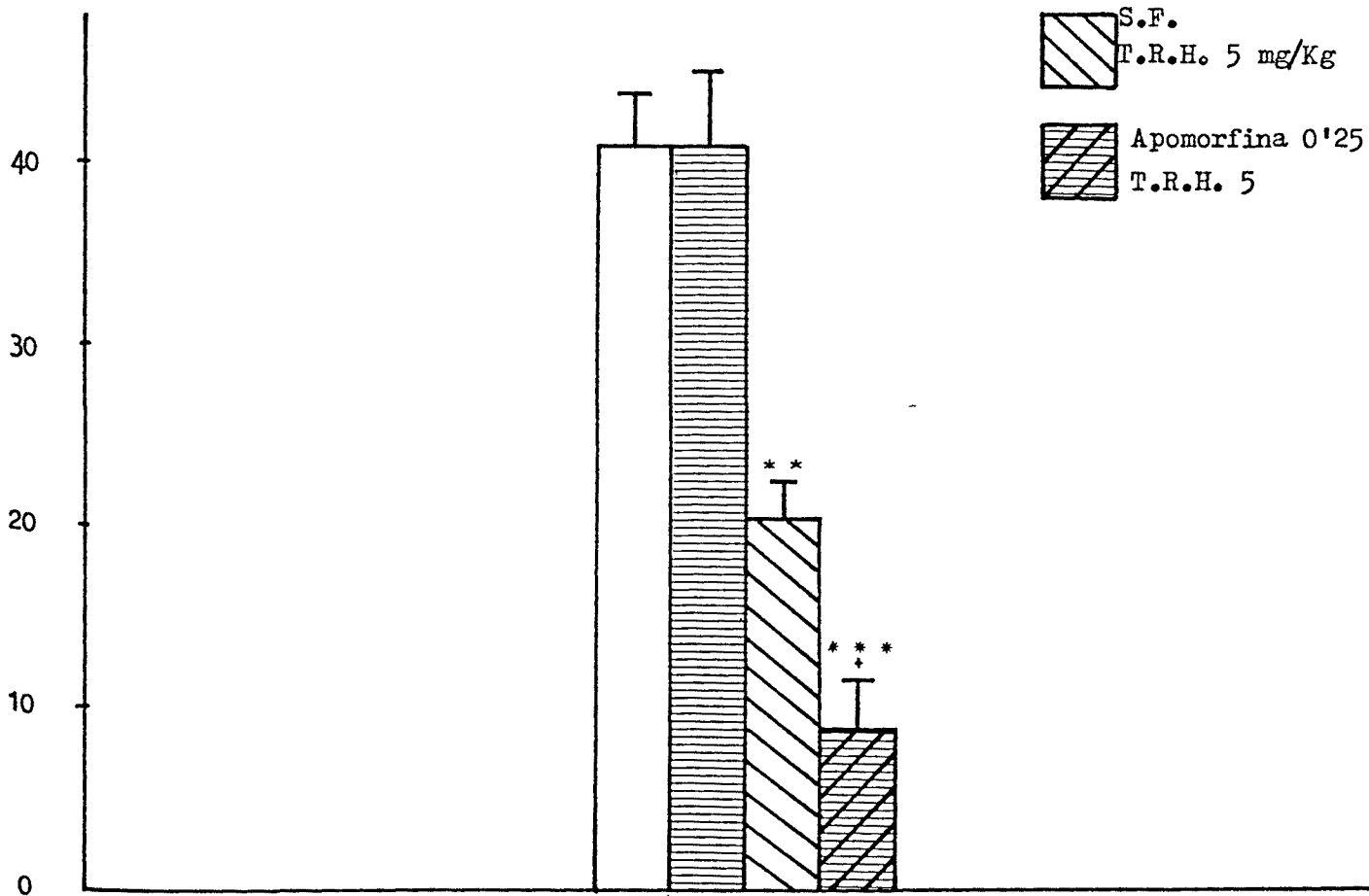
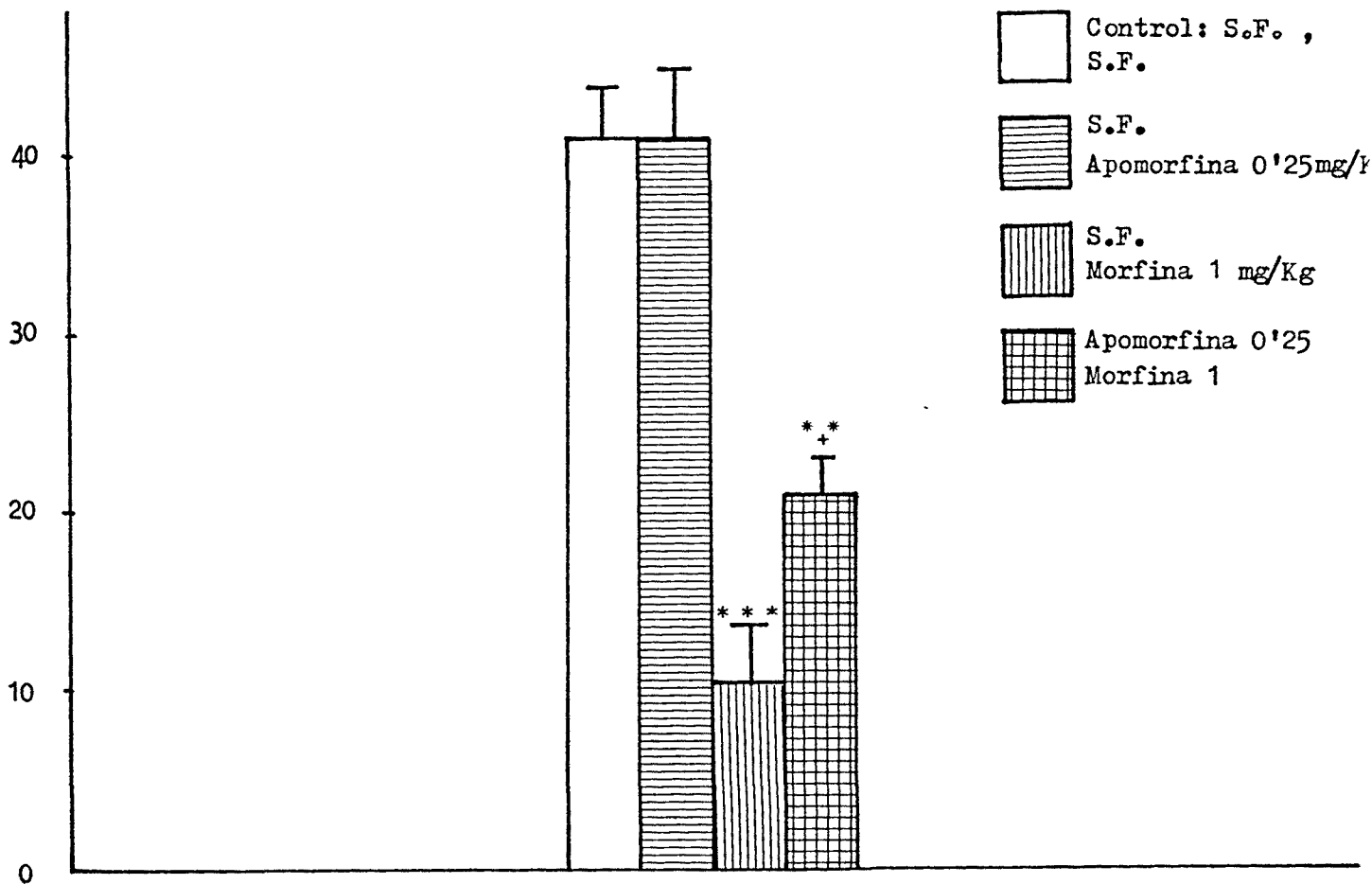
TABLA XI INFLUENCIA DE LA APOMORFINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH Y DE LA MORFINA

| PARAMETRO                                       | C O N T R O L | APOMORFINA<br>SUERO FISIO-<br>LOGICO | SUERO FISIO-<br>LOGICO<br>TRH 5 mg./Kg | APOMORFINA<br>TRH 5mg./Kg. | SUERO FISIOLO-<br>GICO<br>MORFINA 1mg/Kg | APOMORFINA<br>MORFINA 1 mg./Kg. |
|-------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|
| M E D I A                                       | 40,6          | 40,6                                 | 20,37                                  | 8,8                        | 10,4                                     | 20,8                            |
| ERROR STANDARD                                  | 2,99          | 3,53                                 | 2,28                                   | 2,98                       | 3,19                                     | 1,88                            |
| NIVEL DE SIGNIFI-<br>CACION RESPECTO<br>CONTROL |               | N.S.                                 | ++                                     | +++                        | +++                                      | ++                              |
| NIVEL DE SIGNIFI-<br>CACION RESPECTO<br>PATRON  |               |                                      |                                        | ^                          |                                          | ^                               |

+++ P < 0'001  
 ++ P < 0'01  
 + P < 0'05

^^^ P < 0'001  
 ^^ P < 0'01  
 ^ P < 0'05

INFLUENCIA DE DOSIS BAJAS DE APOMORFINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA



Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XII, apreciándose que el tratamiento con apomorfinina modifica la respuesta analgésica obtenida para todas las dosis de T R H : 1,25, 2,5, 5,0 y 10 mg/Kg., observando una notable disminución en la media de contorsiones.

Podemos destacar, que la T R H a dosis de 1,25 mg/Kg., en ausencia de apomorfinina, presenta una media de contorsiones de 31,8 que no difiere significativamente del control. En presencia de apomorfinina la media pasa a ser de 24,1 con una diferencia muy significativa (  $p < 0,01$  ) con respecto al control.

Considerando la dosis de 5 mg/Kg de T R H , observamos como la media de contorsiones realizadas en ausencia de apomorfinina es de 20,37, pasando a 8,8 cuando se administra apomorfinina; se observa entre ambos tratamientos una diferencia significativa (  $p < 0,05$  ).

Con los resultados expresados en la tabla XII se obtienen la rectas de regresión de la T R H en presencia y en ausencia de apomorfinina, tal como se aprecia en la figura 19, donde representamos el efecto obtenido frente al logaritmo de la dosis en mg/Kg la ecuación de la recta obtenida por la T R H en ausencia de apomorfinina ( recta A de la figura ) es de:

$$E = 15 + 56 \times \log \text{ Dosis ( mg/Kg )}$$

El coeficiente de correlación de la recta A es de:  $r = 0,98995$  con una correlación lineal significativa (  $p < 0,02$  ) entre efecto y logaritmo de la dosis.

La ecuación de la recta obtenida con la T R H en presencia de apomorfinina ( recta B de la figura ) es de :

TABLA ALL INFLUENCIA DE LA APOMORFINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH

| PARAMETRO                               | CONTROL | APOMORFINA<br>0'25mg/Kg<br>SUIERO FISIOLÓGICO | SUIERO FISIOLÓGICO<br>TRH<br>1'25mg/kg | APOMORFINA<br>0'25mg/Kg<br>TRH<br>1'25mg/Kg | SUIERO FISIOLÓGICO<br>TRH<br>2'5 mg/Kg | APOMORFINA<br>0'25 mg/Kg<br>TRH<br>2'5 mg/Kg | SUIERO FISIOLÓGICO<br>TRH<br>5mg/Kg. | APOMORFINA<br>0'25mg/Kg<br>TRH<br>5 mg./Kg. | SUIERO FISIOLÓGICO<br>TRH<br>10 mg/Kg | APOMORFINA<br>0'15mg/Kg<br>TRH<br>10mg./Kg. |
|-----------------------------------------|---------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| ME DIA DE<br>CONTORSIONES               | 40,6    | 40,6                                          | 31,8                                   | 24,1                                        | 25,3                                   | 17,-                                         | 20,37                                | 8,8                                         | 10,6                                  | 6                                           |
| ERROR<br>STANDARD                       | 2,99    | 3,53                                          | 3,68                                   | 3,48                                        | 3,82                                   | 2,93                                         | 2,28                                 | 2,98                                        | 3,19                                  | 2,49                                        |
| NIVEL SIGNIFICACION RESPECTO AL CONTROL |         | N.S.                                          | N.S.                                   | ++                                          | ++                                     | +++                                          | ++                                   | +++                                         | +++                                   | +++                                         |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO A TRH   |         |                                               |                                        | N.S.                                        |                                        | N.S.                                         |                                      | ^                                           |                                       | N.S.                                        |

+++ P < 0'001  
 ++ P < 0'01  
 + P < 0'05

^^^ P < 0'001  
 ^^ P < 0'01  
 ^ P < 0'05



$$E = 37,49 + 51,16 \times \log \text{ dosis ( mg/Kg )}.$$

Su coeficiente de correlación es de:  $r = 0,983$  con una correlación lineal significativa ( $p < 0,05$ ) entre efecto y logaritmo de la dosis.

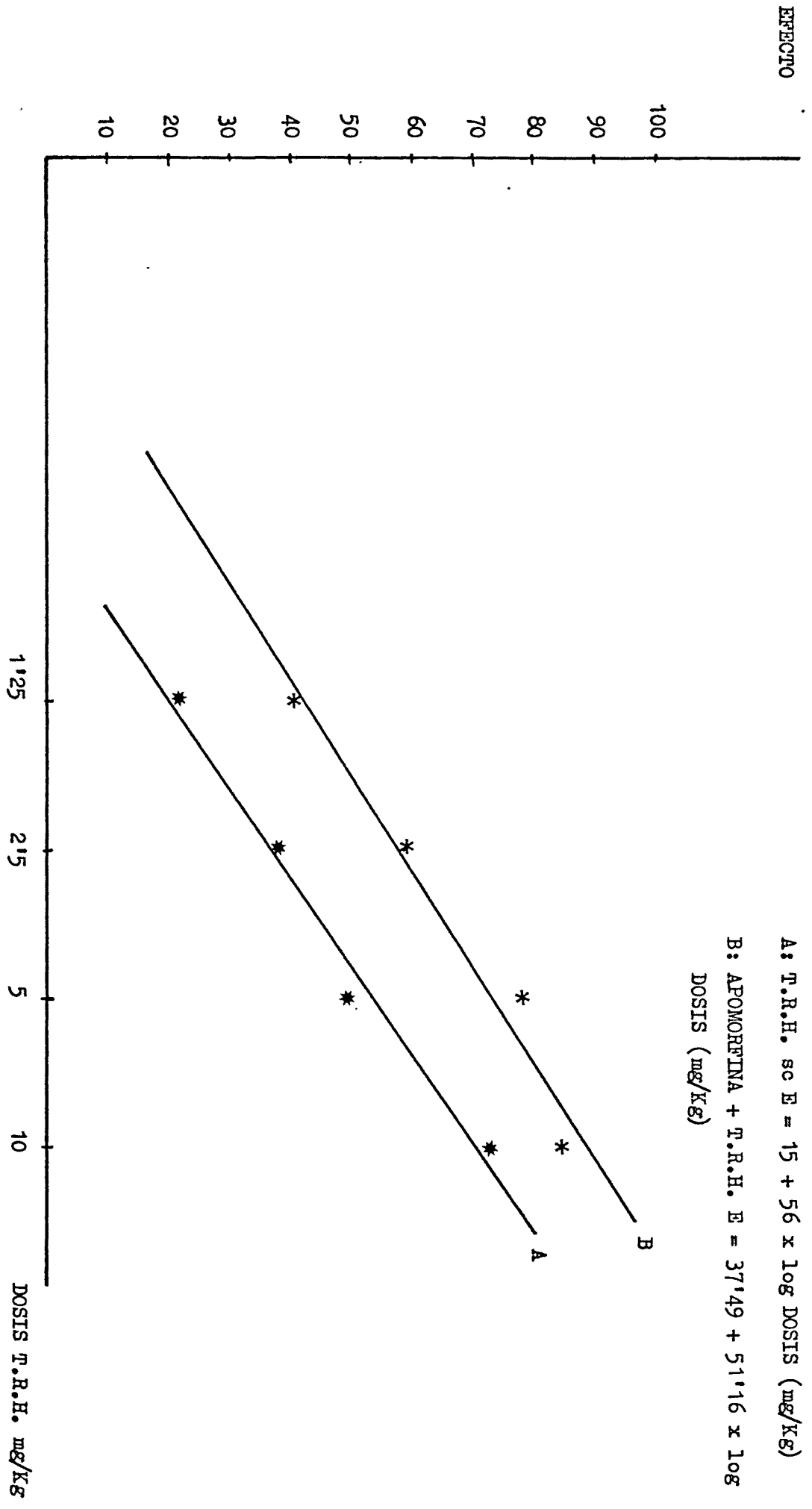
Como se aprecia en la figura 19 la recta B está desplazada hacia la izquierda y se ha incrementado el valor de la ordenada en el origen, lo que indica una potenciación del efecto.

Por interpolación de ambas rectas obtenemos la  $DA_{50}$  que es:

- recta A ( T R H sin apomorfinina ) :  $DA_{50} = 4,22 \text{ mg/Kg}$
- recta B ( T R H con apomorfinina ) :  $DA_{50} = 1,75 \text{ mg/kg}$

Fig. 19

INFLUENCIA DE LA APOMORFINA EN LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.  
(Metodo Ac. Acetico)



## 5-5-3 5-HIDROXITRIPTOFANO. (5-HTP )

## 5-5-3-1 INFLUENCIA DEL 5-HTP ADMINISTRADO POR VIA INTRAPERITONEAL SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H Y DE LA MORFINA.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XIII y en la figura 20 resumiéndolos a continuación:

- 1º) El tratamiento con 5-HTP no modifica la media de contorsiones realizadas significativamente con respecto al control. Sin embargo, apreciamos una reducción en la media de contorsiones realizadas, tanto en el lote control como en el de 5-HTP, nosotros atribuimos esta reducción a la administración intraperitoneal de suero fisiológico o de 5-HTP 22 minutos antes de la administración por la misma vía del agente inductor del dolor.
- 2º) La media de contorsiones realizadas por los animales que recibieron suero fisiológico y 0,321 mg/Kg de morfina fue de 6,75 que es inferior a la realizada por el control no difiriendo significativamente del mismo. El tratamiento con 5-HTP disminuye la media de contorsiones realizadas que pasa a ser de 1,37, adquiriendo un nivel de significación respecto al control, muy significativo ( $p < 0,01$ ), y un nivel significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al lote que recibió suero fisiológico y morfina.
- 3º) La media de contorsiones obtenida con dosis de T R H de 2,5 mg/Kg es de 8,58, inferior a la media del control, pero no difiriendo estadísticamente del mismo. El tratamiento con 5-HTP disminuye la media de contorsiones a 4 con una diferencia muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto al control.

TABLA XIII INFLUENCIA DEL 5 HIDROXITRIPTOFANO ADMINISTRADO POR VIA INTRAPERITONEAL SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH Y DE MORFINA

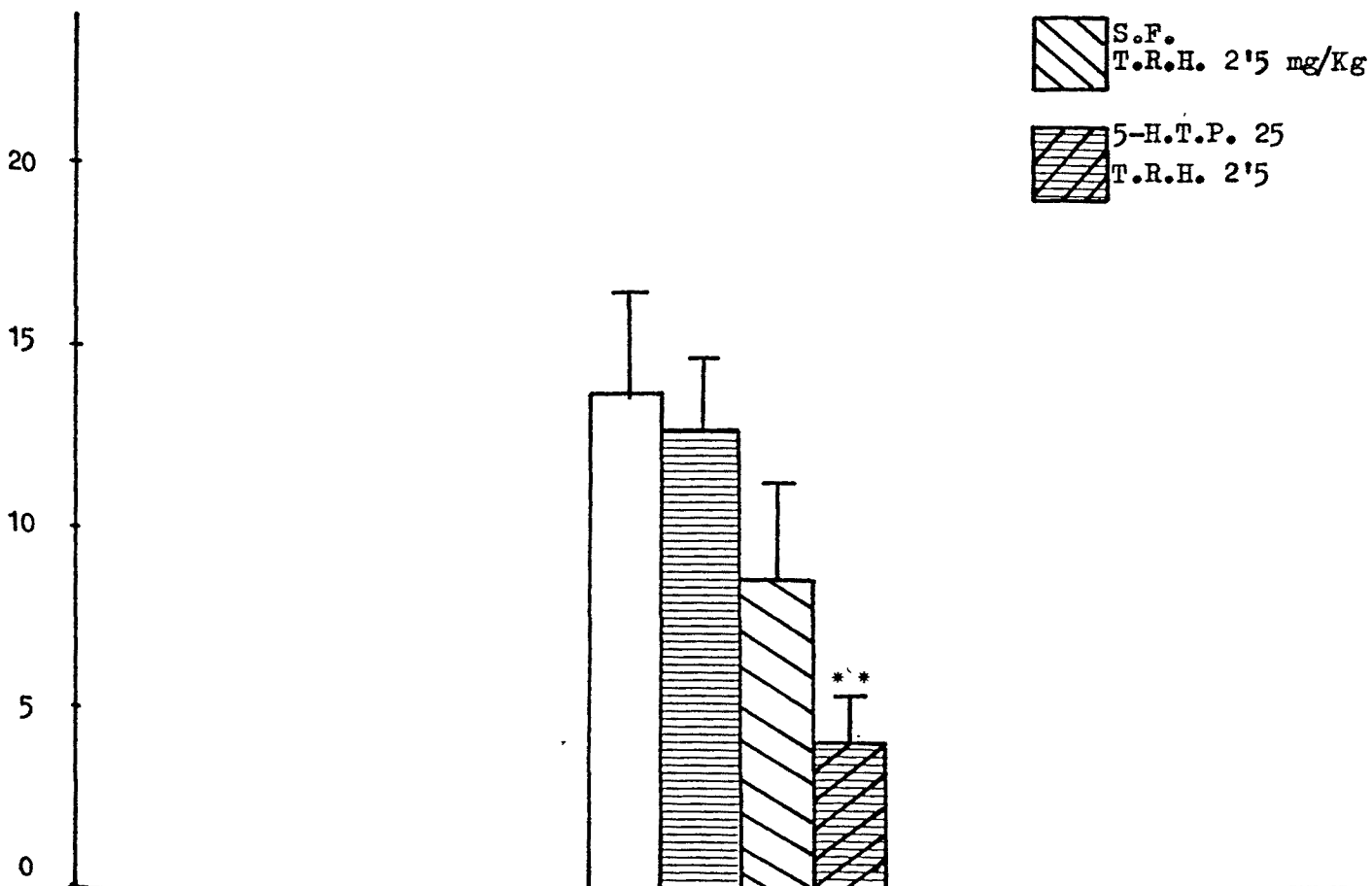
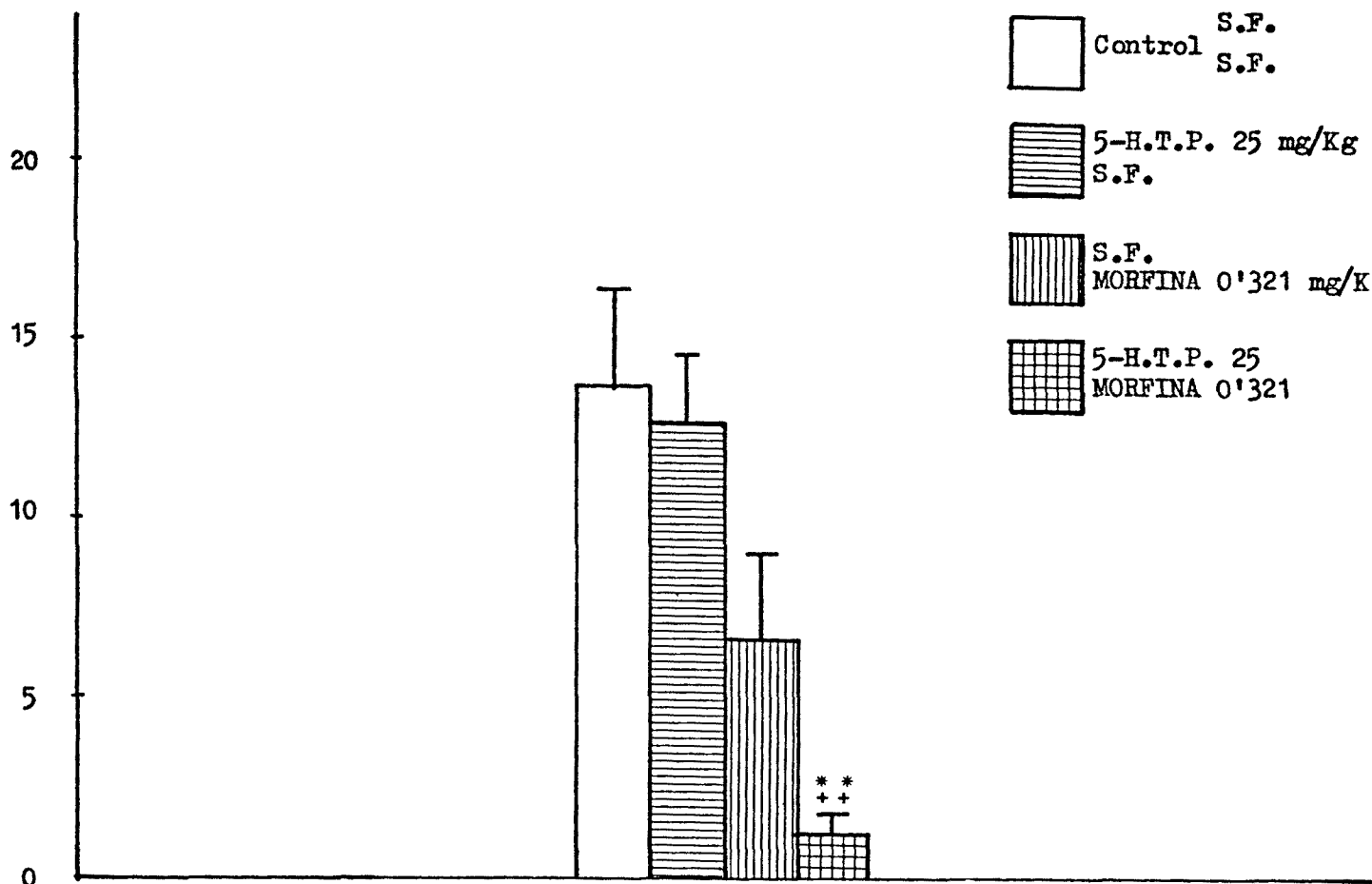
| PARAMETRO                               | CONTROL | 5 - HTP<br>SUERO FISIOLOGICO | SUERO FISIOLOGICO<br>TRH 2'5 mg/Kg | 5 - HTP<br>TRH 2'5 mg/Kg | MORFINA<br>0'321 mg/Kg.<br>SUERO FISIOLOGICO | MORFINA<br>5 - HTP |
|-----------------------------------------|---------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------|--------------------|
| MEDIA                                   | 13,75   | 12,75                        | 8,58                               | 4                        | 6,75                                         | 1,37               |
| ERROR STANDARD                          | 2,79    | 2,03                         | 2,79                               | 1,24                     | 2,46                                         | 0,46               |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                         | N.S.                               | ++                       | N.S.                                         | ++                 |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                              |                                    | N.S.                     |                                              | ^                  |

+++ p < 0'001  
 ++ p < 0'01  
 + p < 0'05

^^^ p < 0'001  
 ^^ p < 0'01  
 ^ p < 0'05

Fig. 20

INFLUENCIA DEL 5-HIDROXITRIPTOFANO SOBRE LA ACCION ANALGESICA  
DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA



5-5-3-2 INFLUENCIA DEL 5-HTP ADMINISTRADO POR VIA SUBCUTANEA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE DOSIS CRECIENTES DE T R H.

Se aprecian los resultados obtenidos en la tabla XIV y en la figura 21 resumiéndolos de la forma siguiente:

- 1º) La administración de 5-HTP no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control. Se observa como la media obtenida es superior comparándola con la media obtenida cuando la administración se realizaba por vía intraperitoneal.
  
- 2º) El tratamiento con 5-HTP modifica el efecto analgésico obtenido con todas las dosis ensayadas de T R H : 0,312, 0,625, 1,25 y 2,5 mg/Kg, disminuyendo la media de contorsiones y aumentando la significación con respecto al control a las dosis de 0,625 y 1,25 mg/Kg. Podemos destacar que ninguna de las dosis ensayadas aparecen diferencias significativas, cuando la comparación se realiza con el lote que recibió suero fisiológico y T R H.

Con los resultados de la tabla XIV se obtienen las rectas de regresión de la T R H en presencia y en ausencia de 5-HTP apareciendo representadas en la figura 21.

La ecuación de la recta A ( T R H en presencia de 5-HTP) es de :

$$E = 51,5 + 41,0 \times \log \text{ dosis ( mg/Kg)}$$

Su coeficiente de correlación es de :  $r = 0,9987$  y la correlación lineal entre efecto y logaritmo de la dosis es muy significativa (  $p < 0,01$  ).

TABLA XIV INFLUENCIA DEL 5-HIDROXITRIPTOFANO ADMINISTRADO POR VIA SUBCUTANEA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH

| PARAMETRO                               | S.FISIO-LOGICO | S.FISIO-LOGICO | S.FISIOLÓGICO TRH | S.FISIOLÓGICO TRH | S.FISIOLÓGICO TRH | S.FISIOLÓGICO TRH | S.FISIOLÓGICO TRH | S.FISIOLÓGICO TRH | S.FISIOLÓGICO TRH |      |
|-----------------------------------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| MEDIA                                   | 18,25          | 16,62          | 18,00             | 12,5              | 15,75             | 10,5              | 14,5              | 8,25              | 9,0               | 5,75 |
| ERROR STANDARD                          | 1,54           | 1,76           | 1,78              | 2,39              | 2,39              | 1,94              | 2,21              | 1,74              | 1,03              | 1,16 |
| NIVEL SIGNIFICACION RESPECTO AL CONTROL |                | N.S.           | N.S.              | N.S.              | N.S.              | +                 | N.S.              | ++                | +++               | +++  |
| NIVEL SIGNIFICACION RESPECTO A LA TRH   |                |                |                   | N.S.              |                   | N.S.              |                   | N.S.              |                   | N.S. |

+++ P < 0,001  
 ++ P < 0,01  
 + P < 0,05

La ecuación de la recta B ( T R H en ausencia de 5-HTP ) es de:

$$E = 17,9 + 65,8 \times \log \text{ dosis ( mg/Kg )}$$

Su coeficiente de correlación es de :  $r = 0,978$  con una correlacion lineal significativa (  $p < 0,05$  ) entre el efecto y el logaritmo de la dosis.

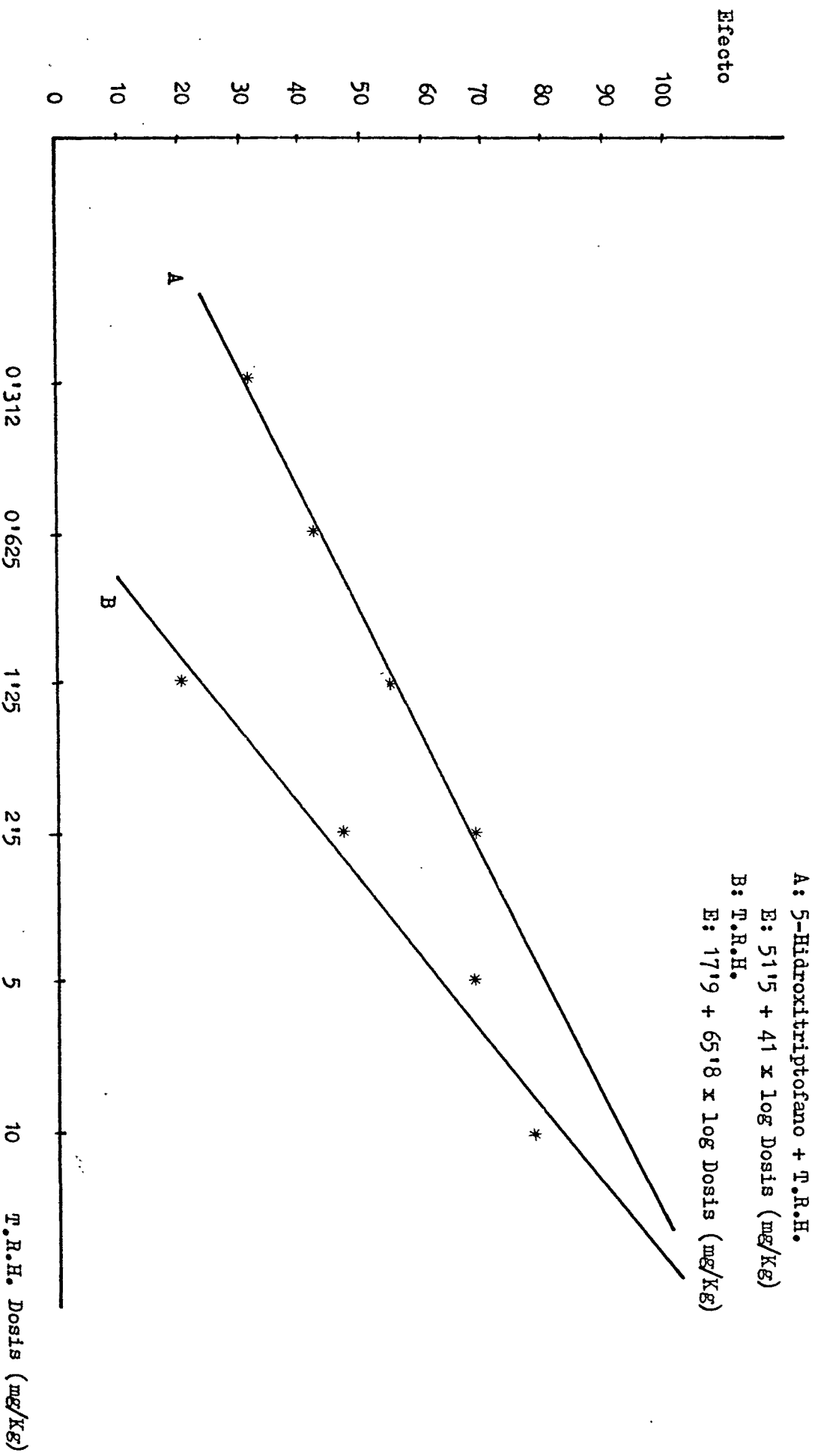
Estudiando ambas ecuaciones, se evidencia un aumento de la ordenada en el origen para la recta B, lo que apunta hacia una potenciación del efecto, debemos aclarar, que no existen diferencias significativas entre ninguno de los puntos ( correspondientes a la misma dosis ) de las rectas A y B. Por interpolación obtenemos la  $DA_{50}$  de ambas rectas:

- recta A ( T R H en presencia de 5-HTP ):  $DA_{50} = 0,92 \text{ mg/Kg}$
- recta B ( T R H en ausencia de 5-HTP ) :  $DA_{50} = 3,07 \text{ mg/Kg}$



Fig. 21

INFLUENCIA DEL 5-HIDROXITRIPTOFANO SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.  
(Agente inductor del dolor: Fenil Benzquinona)



Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XV y en la figura 22 y se pueden resumir de la forma siguiente:

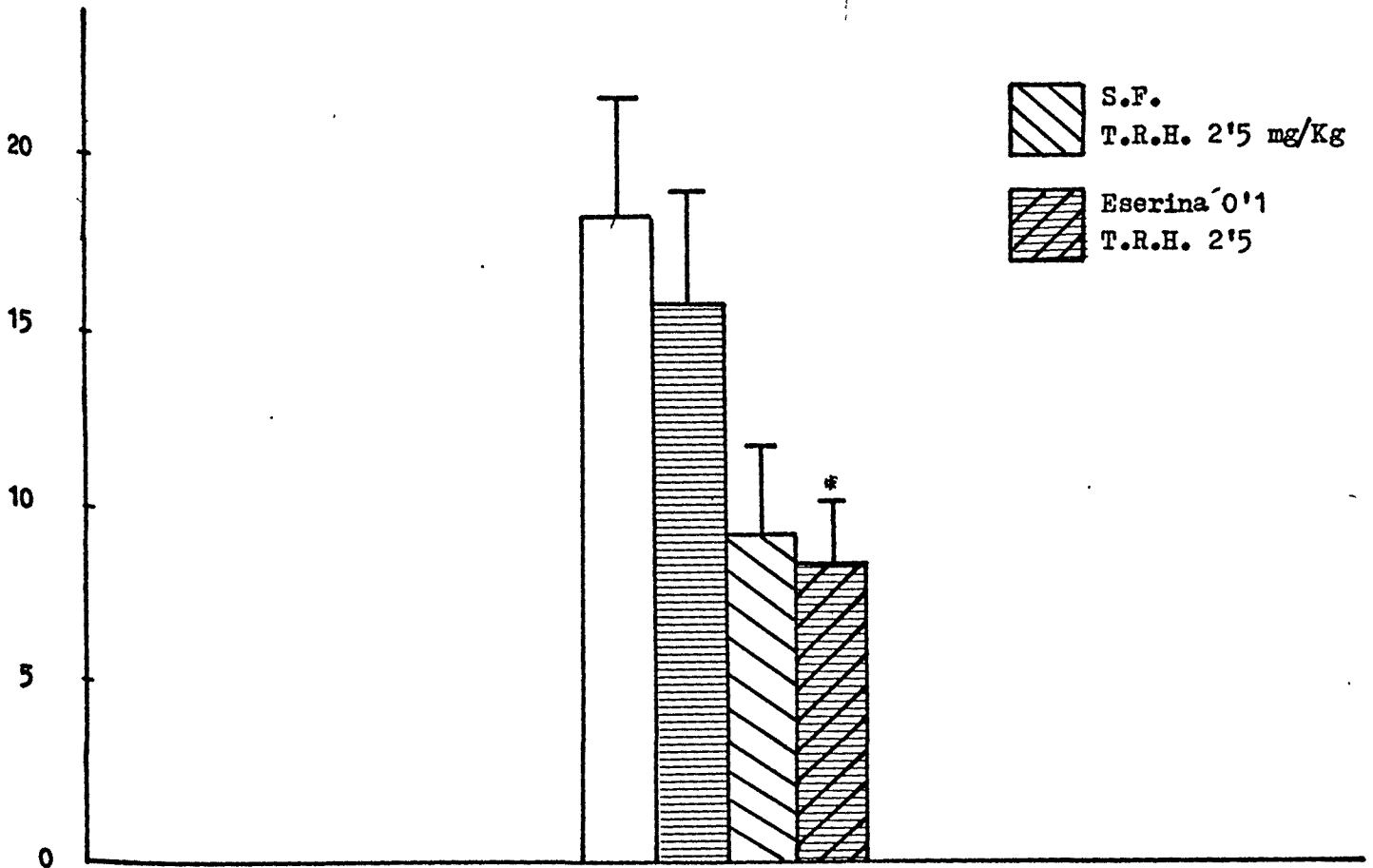
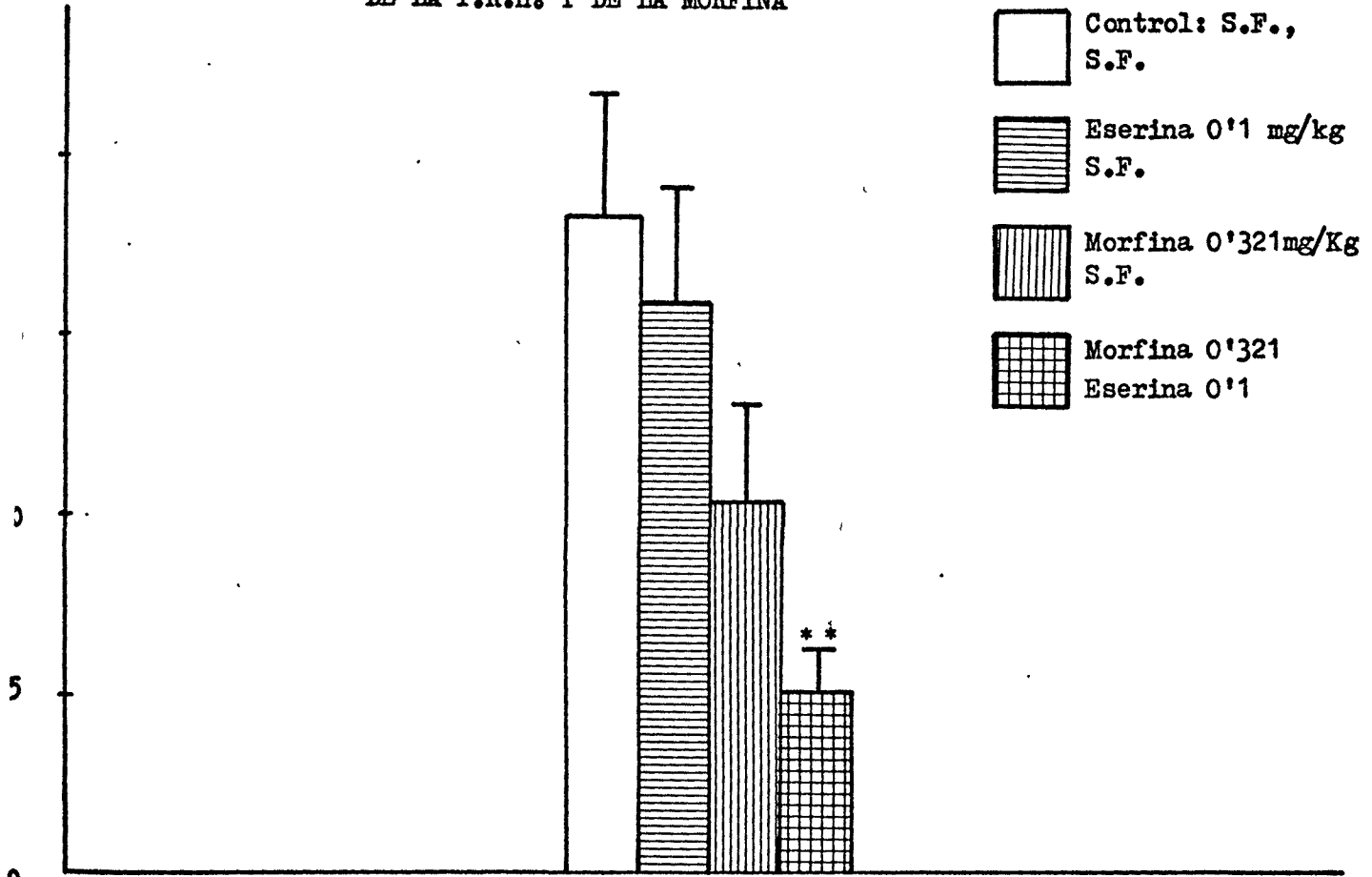
- 1º) El tratamiento con sulfato de eserina a la dosis de 0,1 mg/Kg. no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control.
  
- 2º) La media de contorsiones realizadas por los animales que recibieron suero fisiológico y 0,321 mg/Kg. de morfina fue de 10,37, no difiriendo estadísticamente del control. La adición de eserina a la misma dosis de morfina disminuye la media de contorsiones, que pasa a ser de 5, adquiriendo el nivel de muy significativo ( $p < 0,01$ ) con respecto al control, pero sin diferencias significativas cuando se compara con la morfina.
  
- 3º) No se observan diferencias en el efecto analgésico de la T R H en presencia o en ausencia de eserina, siendo la media de contorsiones de 8,37 y 9,25 respectivamente.

TABLA XV INFLUENCIA DE LA ESERINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH Y DE LA MORFINA

| PARAMETRO                               | CONTROL | ESERINA<br>SUERO FISIOLOGICO | SUERO FISIOLOGICO<br>TRH 2'5 mg/kg | ESERINA<br>TRH 2'5 mg/kg | MORFINA<br>0'321mg/Kg<br>SUERO FISIOLOGICO | MORFINA<br>0'321 mg./Kg<br>ESERINA |
|-----------------------------------------|---------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|
| MEDIA                                   | 18,25   | 15,75                        | 9,25                               | 8,37                     | 10,37                                      | 5                                  |
| ERROR STANDARD                          | 3,64    | 3,37                         | 2,42                               | 1,74                     | 2,78                                       | 1,19                               |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                         | N.S.                               | +                        | N.S.                                       | ++                                 |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                              |                                    | N.S.                     |                                            | N.S.                               |

+++ p < 0'001  
 ++ p < 0'01  
 + p < 0'05

INFLUENCIA DEL SULFATO DE ESERINA SOBRE ACCION ANALGESICA  
DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA



5-5-5-1 INFLUENCIA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H Y DE LA MORFINA.

Los resultados obtenidos se aprecian en la tabla XVI y en la figura 23, resumiéndolos a continuación:

- 1º) La oxotremorina a la dosis ensayada no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control.
- 2º) La media de contorsiones obtenida con la dosis de 0,321 mg/Kg. de morfina es de 7,25, con una diferencia muy significativa (  $p < 0,01$  ) con respecto al control. El tratamiento con oxotremorina disminuye la media de contorsiones que pasa a ser de 2,33, aumentando la significación con respecto al control a niveles altamente significativos (  $p < 0,001$  ). La comparación con respecto al lote que recibió suero fisiológico y morfina es muy significativa. (  $p < 0,01$  ).
- 3º) La media de contorsiones obtenida con la dosis de 10 mg/Kg. de T R H es de 3,91, con una diferencia altamente significativa (  $p < 0,001$  ) con respecto al control. El tratamiento con oxotremorina aumenta la media de contorsiones que pasa a ser de 10,16, disminuyendo la significación con respecto al control a niveles muy significativos (  $p < 0,01$  ).

La comparación con respecto al lote que recibió suero fisiológico y T R H es muy significativo (  $p < 0,01$  ).

5-5-5-2 INFLUENCIA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H.

Se expresan los resultados obtenidos en la tabla XVII y figura

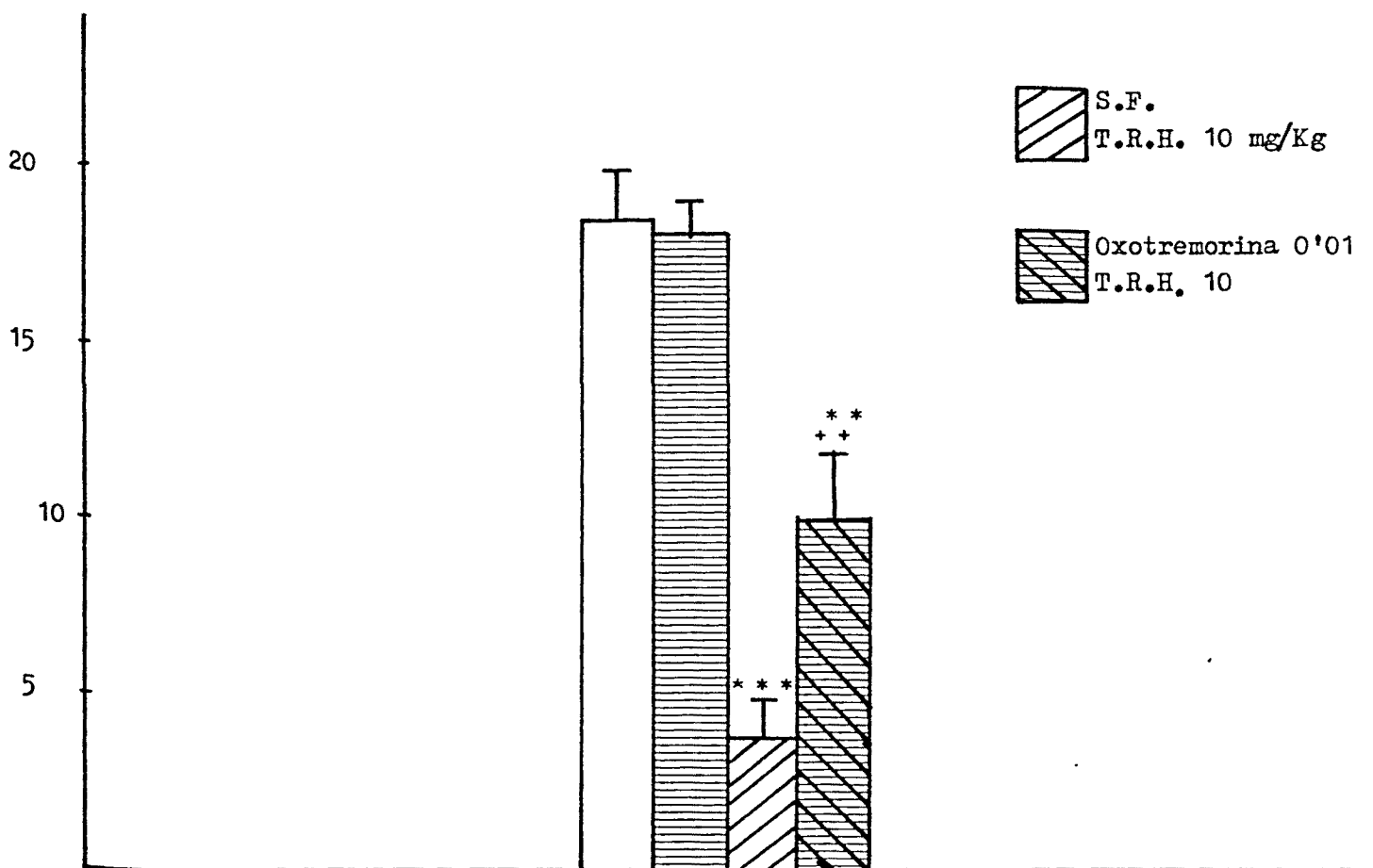
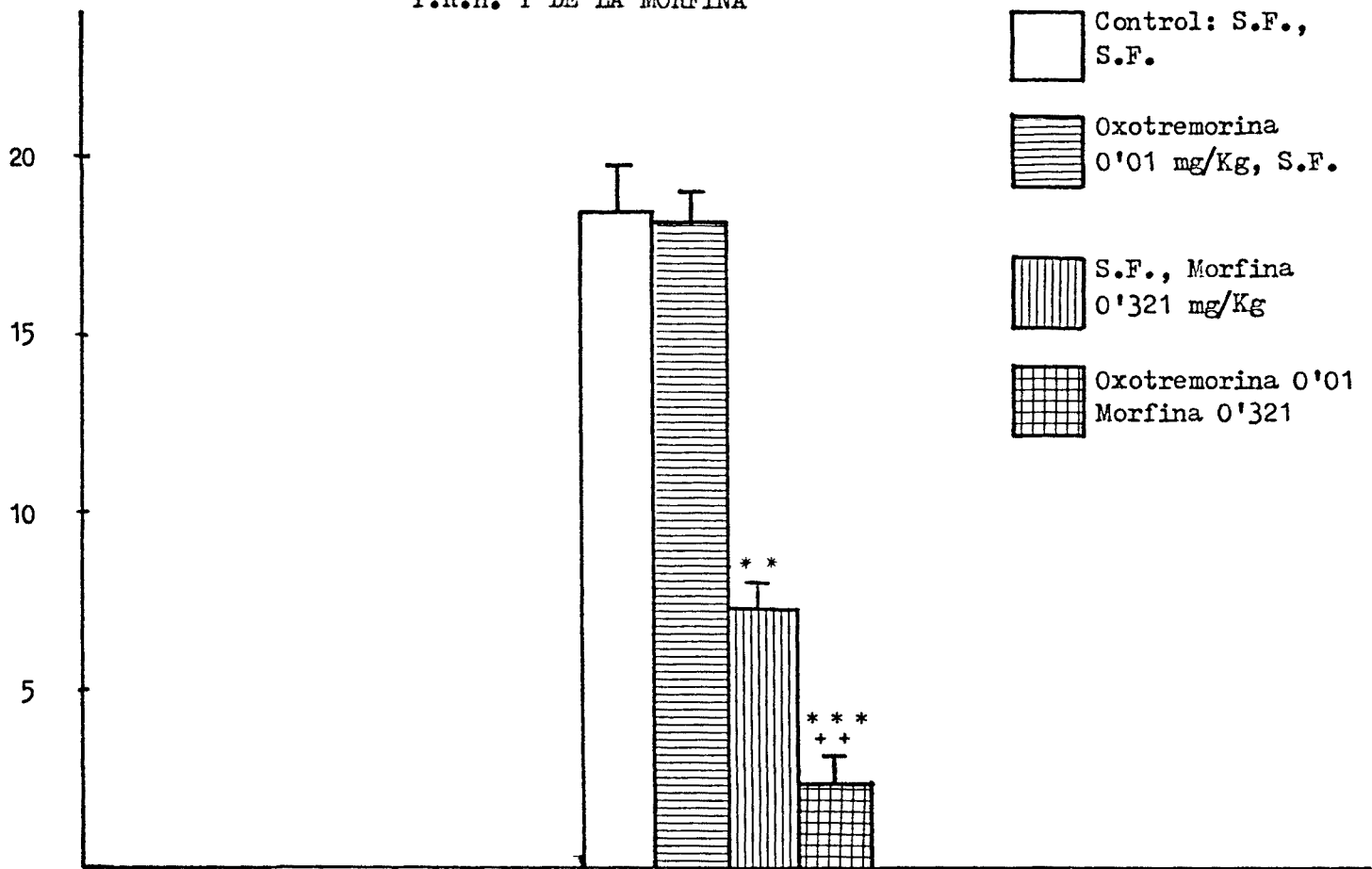
TABLA XVI INFLUENCIA DE LA OXOTREMORINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH Y DE LA MORFINA

| PARAMETRO                               | CONTROL | OXOTREMORINA<br>SUERO FISIOLOGICO | SUERO FISIOLOGICO<br>TRH 10 mg/Kg | OXOTREMORINA<br>TRH 10 mg/Kg | SUERO FISIOLOGICO<br>MORFINA<br>0.321 mg./kg | OXOTREMORINA<br>MORFINA<br>0.321 mg./kg. |
|-----------------------------------------|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| MEDIA                                   | 18,43   | 18,13                             | 3,91                              | 10,16                        | 7,25                                         | 2,33                                     |
| ERROR STANDARD                          | 1,56    | 0,98                              | 0,92                              | 1,96                         | 0,85                                         | 0,73                                     |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                              | +++                               | ++                           | ++                                           | +++                                      |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                                   |                                   | ^^                           |                                              | ^^                                       |

+++ p < 0'001  
 ++ p < 0'01  
 + p < 0'05

^^^ p < 0'001  
 ^^ p < 0'01  
 ^ p < 0'05

INFLUENCIA DE LA OXOTREMORINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA



24 observándose que el tratamiento con oxotremorina aumenta la media de contorsiones realizadas por todas las dosis ensayadas de T R H : 1,25, 2,5, 5,0 y 10 mg/Kg. disminuyendo su nivel de significación con respecto al control.

Considerando la dosis de 5 y 10 mg/Kg. de T R H dicho nivel pasa de altamente significativo (  $p < 0,001$  ) a significativo (  $p < 0,05$  ) y muy significativo (  $p < 0,01$  ) respectivamente. A la dosis de 2,5 mg/Kg de T R H disminuye la significación con respecto al control desde muy significativo (  $p < 0,01$  ) a no significativo.

Se observan diferencias en la significación con respecto a la T R H a las dosis de 2,5 (  $p < 0,05$  ) , 5 y 10 mg/Kg. (  $p < 0,01$  ).

Con los resultados de la tabla XVII se obtienen las rectas de regresión de la T R H en presencia y en ausencia de oxotremorina, tal como se aprecia en la figura 25 donde representamos el efecto obtenido frente al logaritmo de la dosis.

La ecuación de la recta obtenida con la T R H en ausencia de oxotremorina ( recta A de la figura ) es:

$$E = 17,9 + 65,8 \times \log \text{ dosis ( mg/Kg )}.$$

El coeficiente de correlación de la recta A es de:  $r = 0,978$  y la correlación lineal es significativa (  $p < 0,05$  ) entre efecto y logaritmo de la dosis.

La ecuación de la recta obtenida con la T R H en presencia de oxotremorina ( recta B de la figura ) es:

$$E = -3,67 + 50,13 \times \log \text{ dosis ( mg/Kg )}$$

El coeficiente de correlación de la recta B es de:  $r = 0,9846$



TABLA XVII INFLUENCIA DE LA OXOTREMORINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH

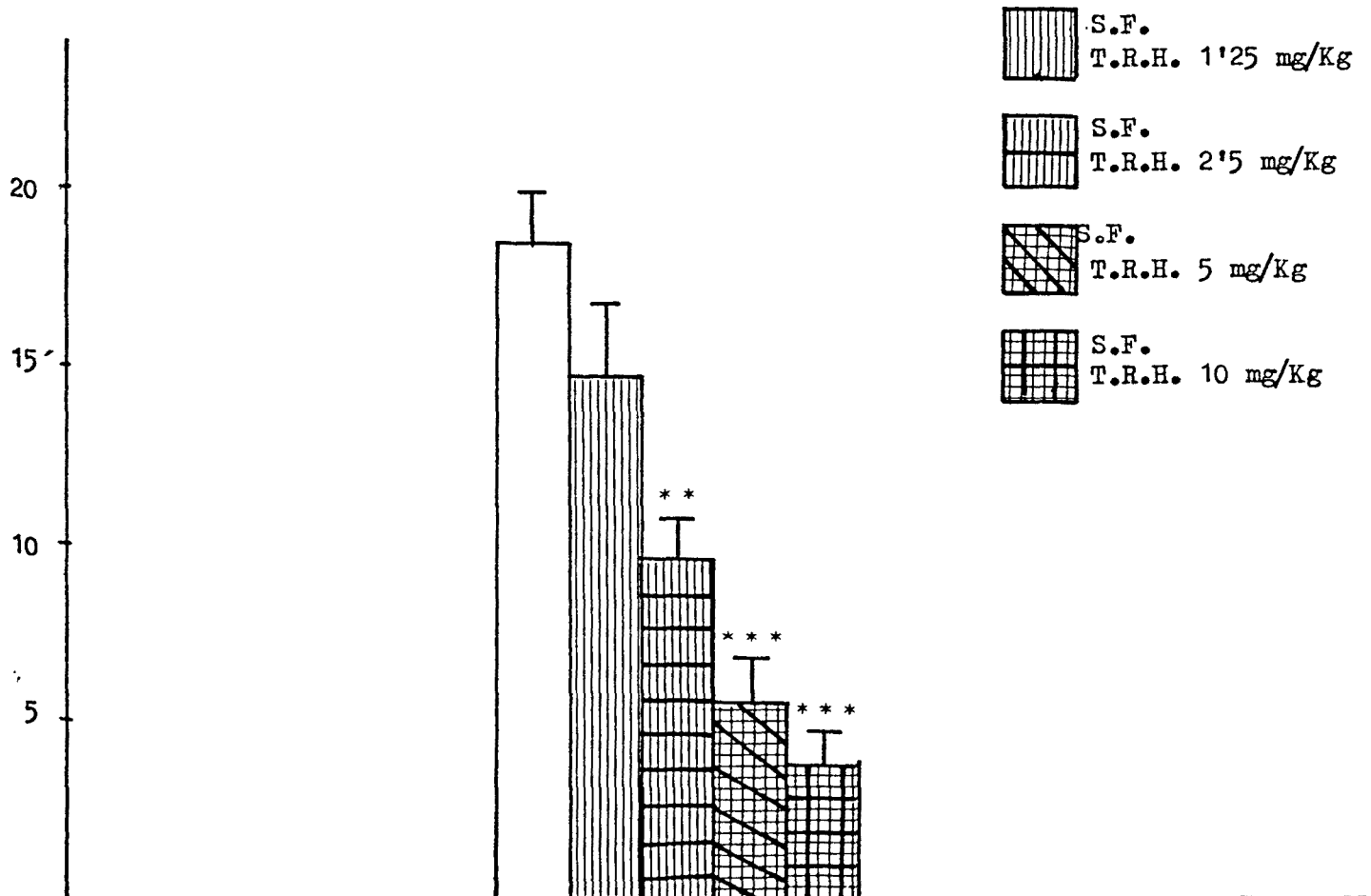
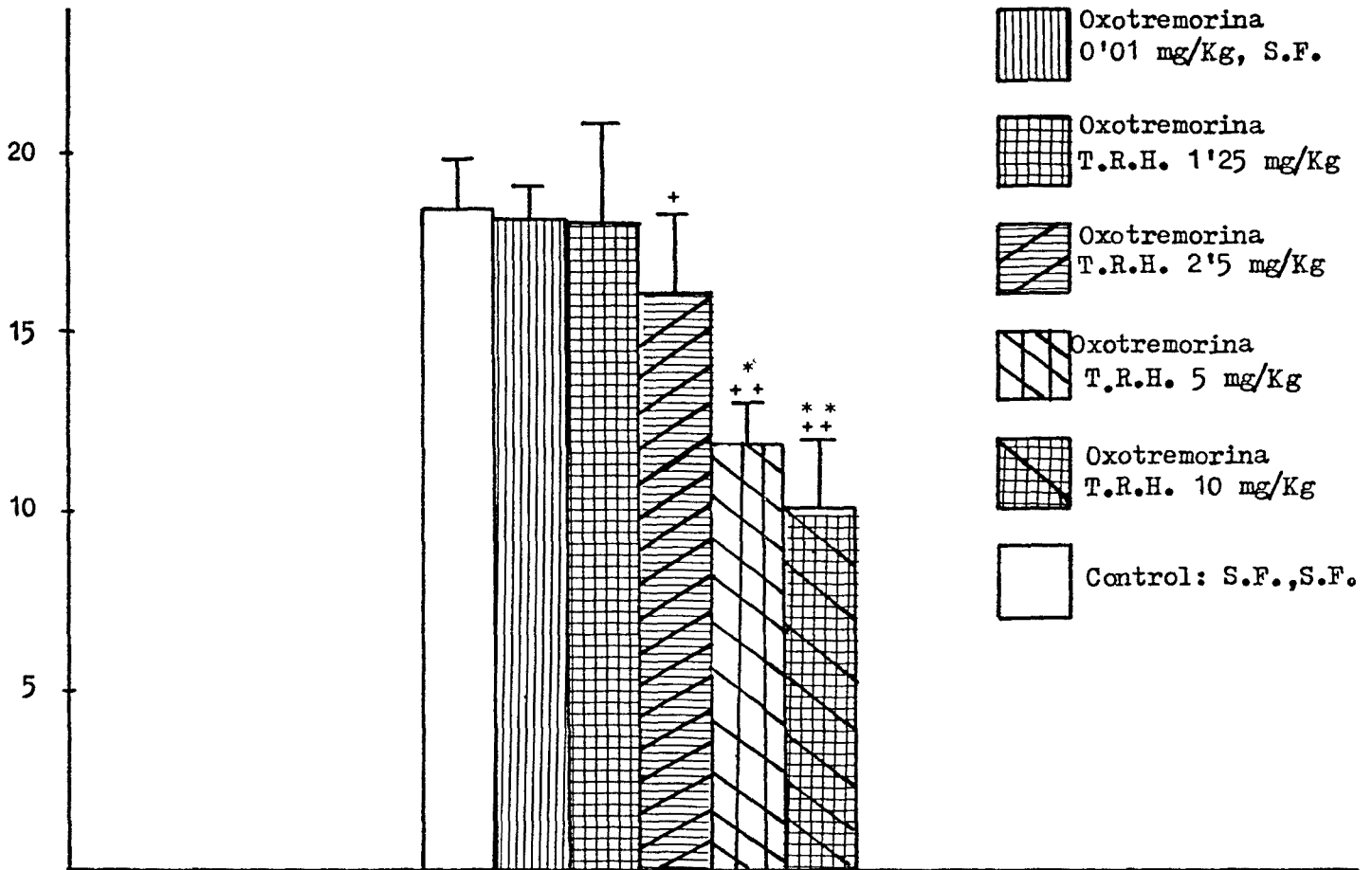
| PARAMETRO                                       | CONTROL | OXOTREMORINA<br>0.01mg/Kg<br>SUIOLOGICO | SUIERO FI-<br>SUIOLOGICO<br>TRH<br>10mg/Kg. | OXOTREMORINA<br>0.01mg/Kg<br>TRH<br>10 mg/Kg | SUIERO FI-<br>SUIOLOGICO<br>TRH<br>5 mg/Kg | OXOTREMORINA<br>0.01mg/Kg<br>TRH<br>5 mg/Kg | SUIERO FI-<br>SUIOLOGICO<br>TRH<br>2.5mg/Kg | OXOTREMORINA<br>0.01mg/Kg<br>TRH<br>2.5mg/Kg | SUIERO FI-<br>SUIOLOGICO<br>TRH<br>1.25mg/Kg | OXOTREMORINA<br>0.01mg/Kg<br>TRH<br>1.25mg/Kg |
|-------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| GRADIA DE<br>DINTORSIONES                       | 18,43   | 18,13                                   | 3,91                                        | 10,16                                        | 5,62                                       | 11,87                                       | 9,62                                        | 16,12                                        | 14,75                                        | 18                                            |
| ERROR<br>STANDARD                               | 1,56    | 0,98                                    | 0,92                                        | 1,96                                         | 1,39                                       | 1,14                                        | 1,21                                        | 2,45                                         | 2,06                                         | 2,86                                          |
| NIVEL DE SIGNIFI-<br>CACION RESPECTO<br>CONTROL |         | N.S.                                    | +++                                         | ++                                           | +++                                        | +                                           | ++                                          | N.S.                                         | N.S.                                         | N.S.                                          |
| NIVEL DE SIGNIFI-<br>CACION RESPECTO<br>TRH     |         |                                         |                                             | ^^                                           |                                            | ^^                                          |                                             | ^                                            |                                              | N.S.                                          |

+++ P < 0.001  
 ++ P < 0.01  
 + P < 0.05

^^^ P < 0.001  
 ^^ P < 0.01  
 ^ P < 0.05

INFLUENCIA DE LA OXOTREMORINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.

g. 24



y la correlación lineal es significativa (  $p < 0,02$  ) entre efecto y logaritmo de la dosis.

Se observa como el tratamiento con oxotremorina desciende de forma notable el valor de la ordenada en el origen (  $a = -3,67$  ) lo que indica un antagonismo del efecto.

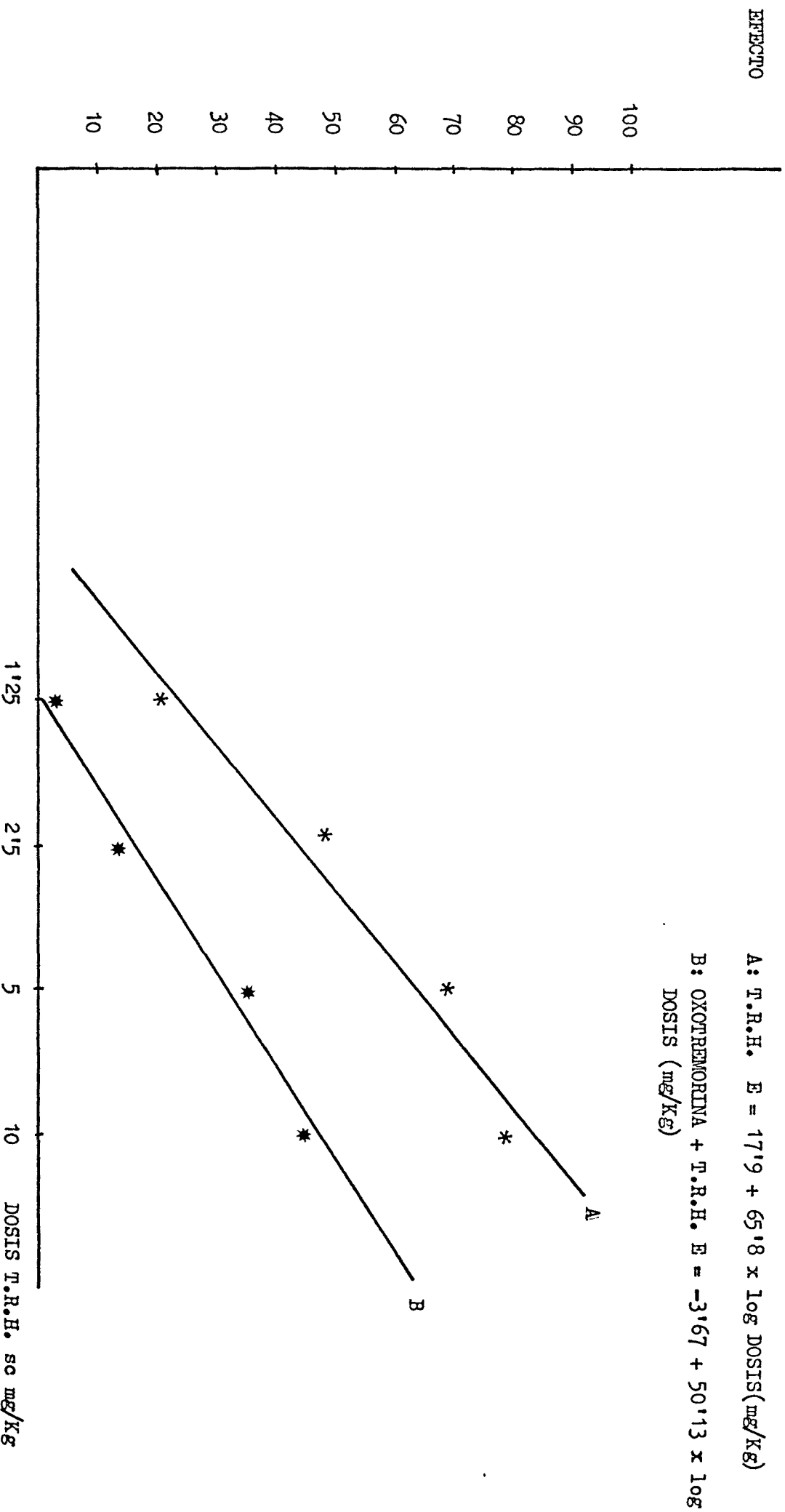
Los puntos correspondientes a las dosis de 2,5, 5,0 y 10 mg/Kg. en las rectas A y B difieren estadísticamente.

Por interpolación de ambas rectas obtenemos la  $DA_{50}$  que son:

- Recta A ( T R H sin oxotremorina ) :  $DA_{50} = 3,07$  mg/Kg.
- Recta B ( T R H con oxotremorina ) :  $DA_{50} = 11,76$  mg/Kg.

Fig. 25

INFLUENCIA DE LA OXOTREMORINA EN LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.  
(Metodo de la Fenil Benzquinona)



## 5-5-6 : ATROPINA

5-5-6-1 : INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA A LA DOSIS DE 5 mg/Kg.  
SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H Y DE LA MORFINA.

Los resultados obtenidos se aprecian en la tabla XVIII y en la figura 26, resumiéndolas a continuación.

1º) El sulfato de atropina no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control.

2º) La media de contorsiones obtenida con la dosis de 0,321 mg/Kg. de morfina es de 10,25, con una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

El tratamiento con sulfato de atropina no modifica la media de contorsiones obtenida y no existen diferencias significativas con respecto al lote que recibió suero fisiológico y morfina.

3º) La media de contorsiones obtenida con la dosis de 2,5 mg/Kg. de T R H es de 9,45, con una diferencia altamente significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto al control. El tratamiento con sulfato de atropina desciende de modo espectacular la media de contorsiones que pasa a ser de 1,25. Comparando este lote con el que recibió suero fisiológico y T R H se encuentra una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

5-5-6-2 : INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA A LA DOSIS DE 10 mg/Kg.  
SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA.

a) Método de la fenilbenzoquinina:

La dosis ensayada de morfina es en este caso de 0,64 mg/Kg

XVIII  
 TABLA INFLUENCIA DE LA ATROPINA SULFATO 5 mg./Kg. SOBRE LA ACCION  
 ANALGESICA DE LA TRH Y DE LA MORFINA

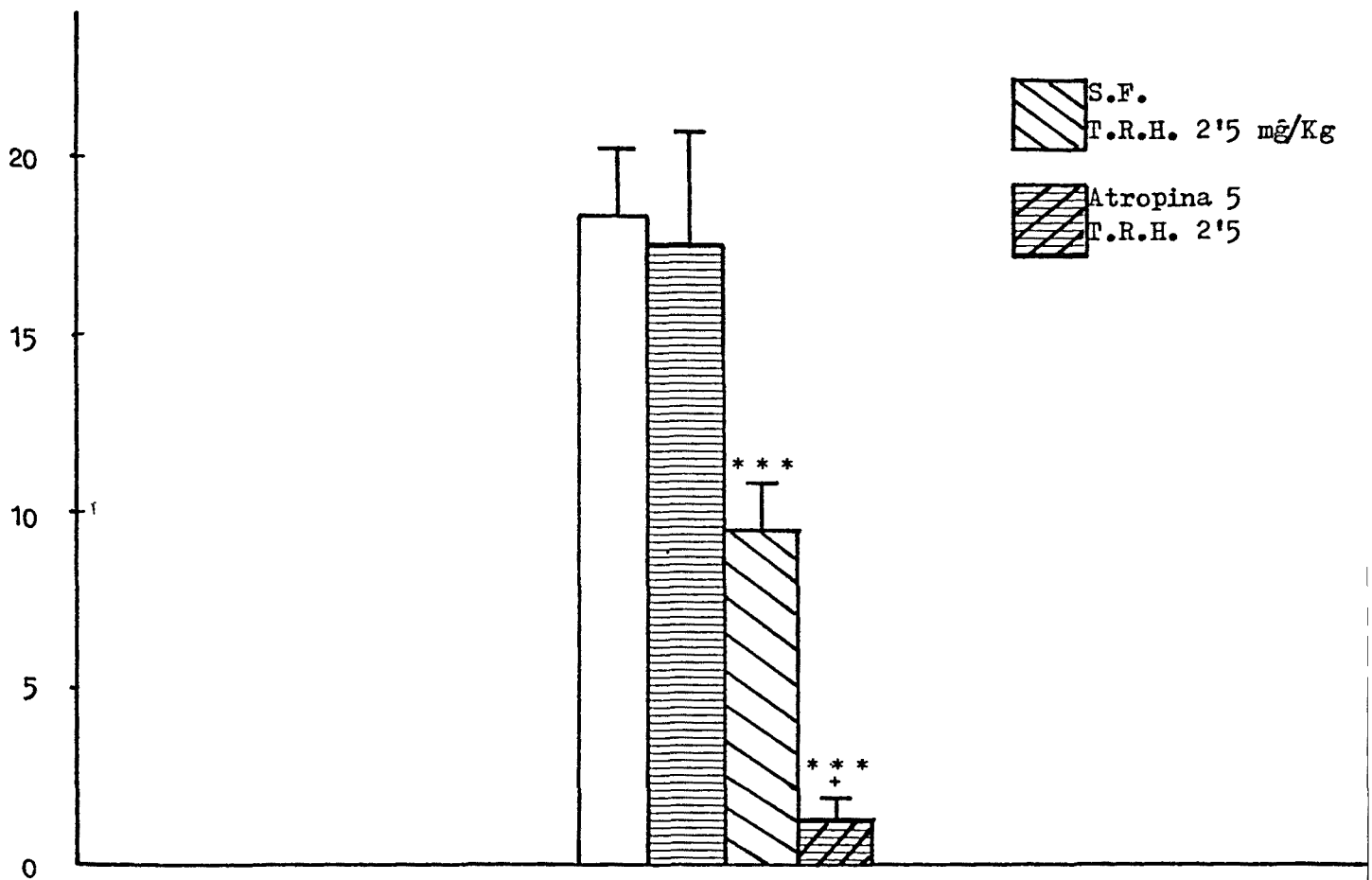
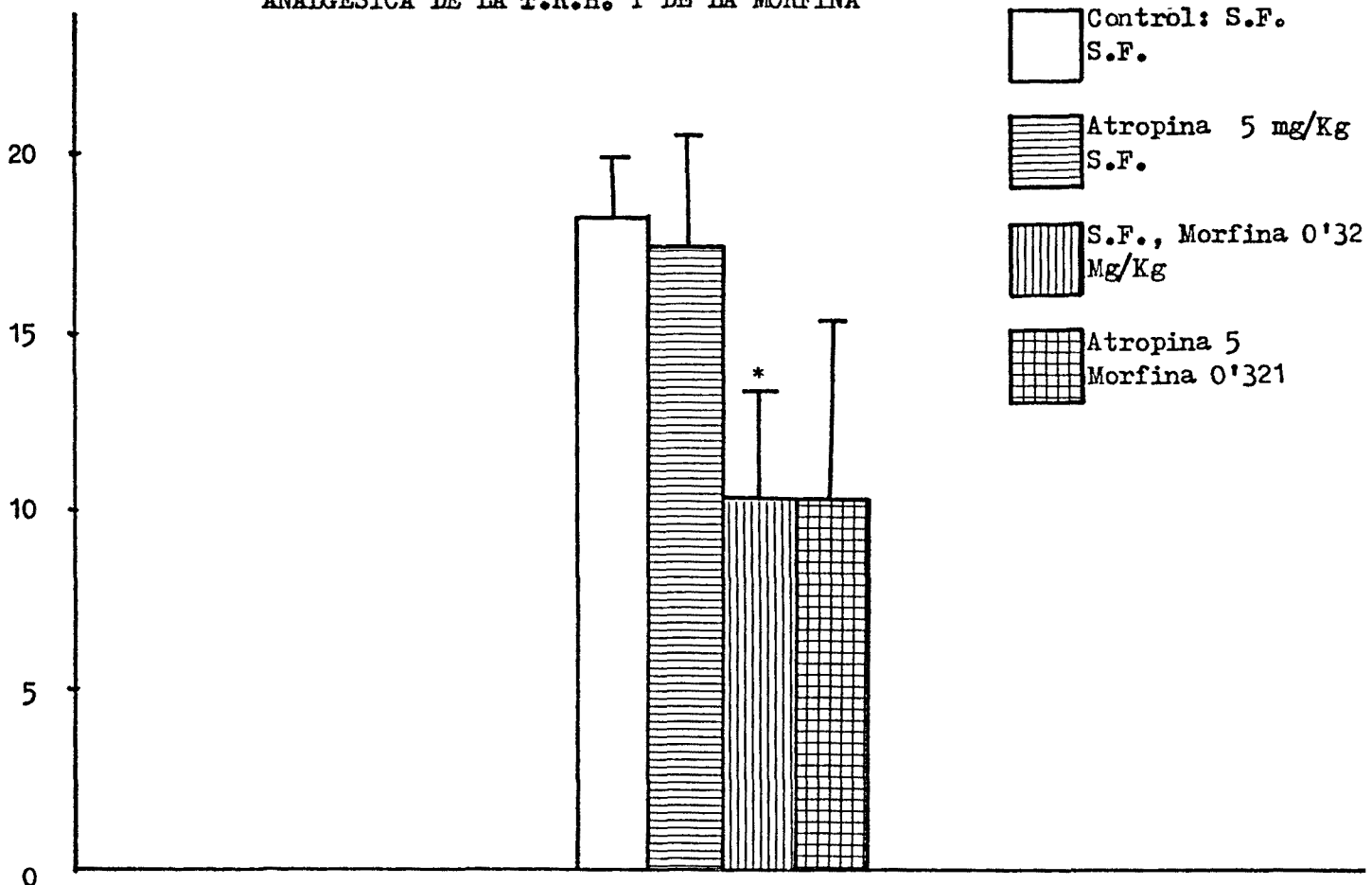
| PARAMETRO                               | CONTROL | ATROPINA<br>SUERO FISIOLOGICO | SUERO FISIOLOGICO<br>TRH 2'5 mg/Kg | ATROPINA<br>TRH 2'5 mg/Kg | MORFINA<br>SUERO FISIOLOGICO | MORFINA<br>ATROPINA |
|-----------------------------------------|---------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------|
| MEDIA                                   | 18,35   | 17,54                         | 9,45                               | 1,25                      | 10,25                        | 10,25               |
| ERROR STANDARD                          | 1,60    | 3,18                          | 1,32                               | 0,75                      | 2,92                         | 5,34                |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                          | +++                                | +++                       | +                            | N.S.                |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                               |                                    | ^                         |                              | N.S.                |

+++ P < 0'001  
 ++ P < 0'01  
 + P < 0'05

^^P < 0'001  
 ^^P < 0'01  
 ^P < 0'05

Fig. 26

INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H. Y DE LA MORFINA



Los resultados obtenidos se aprecian en la tabla XIX y en la figura 27 observándose que el sulfato de atropina no modifica de forma significativa la media de contorsiones obtenidas con la dosis de 0,64 mg/Kg. de morfina.

b) Método de la placa caliente:

La dosis de morfina es en este caso de 10 mg./Kg.

Los resultados obtenidos se aprecian en la tabla XX y en la figura 28, resumiéndolos a continuación.

- 1º) El tratamiento con sulfato de atropina no modifica de forma significativa la media del tiempo de respuesta al dolor, con respecto al control a ninguno de los tiempos ensayados.
- 2º) El tratamiento con suero fisiológico y morfina, aumenta notablemente la media del tiempo de respuesta al dolor, con unas diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) con respecto al control, a todos los tiempos ensayados.
- 3º) El tratamiento con sulfato de atropina y morfina, disminuye la media del tiempo de respuesta al dolor, observándose, que si bien a los 20 minutos dicha media es altamente significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto al control, a los 40 y 60 minutos disminuye a muy significativa ( $p < 0,01$ ).

Además a los 60 minutos se aprecia una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), cuando se compara con el lote que recibió suero fisiológico y morfina.



TABLA XIX INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA (10 mg./Kg.) SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA

| PARAMETRO                                       | CONTROL | ATROPINA<br>10 mg./Kg.<br>SUERO FISIOLÓGICO | SUERO FISIOLÓGICO<br>MORFINA<br>0.64 mg./Kg. | ATROPINA 10 mg/Kg.<br>MORFINA 0.64 mg/Kg. |
|-------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| MEDIA DE CONTORSIONES                           | 17,37   | 16,37                                       | 5,37                                         | 3,75                                      |
| ERROR STANDARD                                  | 1,80    | 1,60                                        | 1,22                                         | 0,75                                      |
| NIVEL DE SIGNIFICACION<br>RESPECTO AL CONTROL   |         | N.S.                                        | +++                                          | +++                                       |
| NIVEL DE SIGNIFICACION<br>RESPECTO A LA MORFINA |         |                                             |                                              | N.S.                                      |

+++ P < 0.001  
 ++ P < 0.01  
 + P < 0.05

Fig. 27

INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA

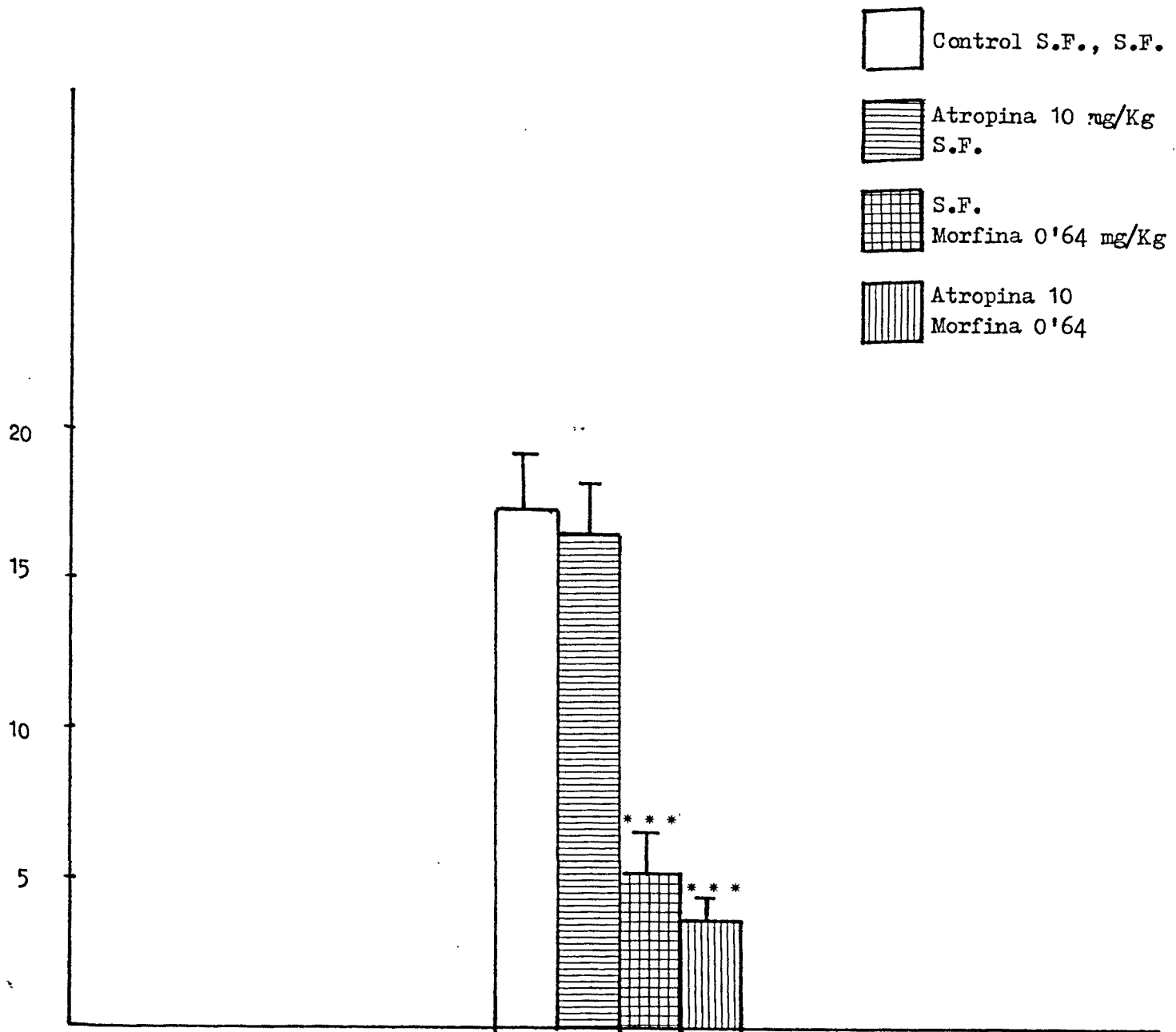
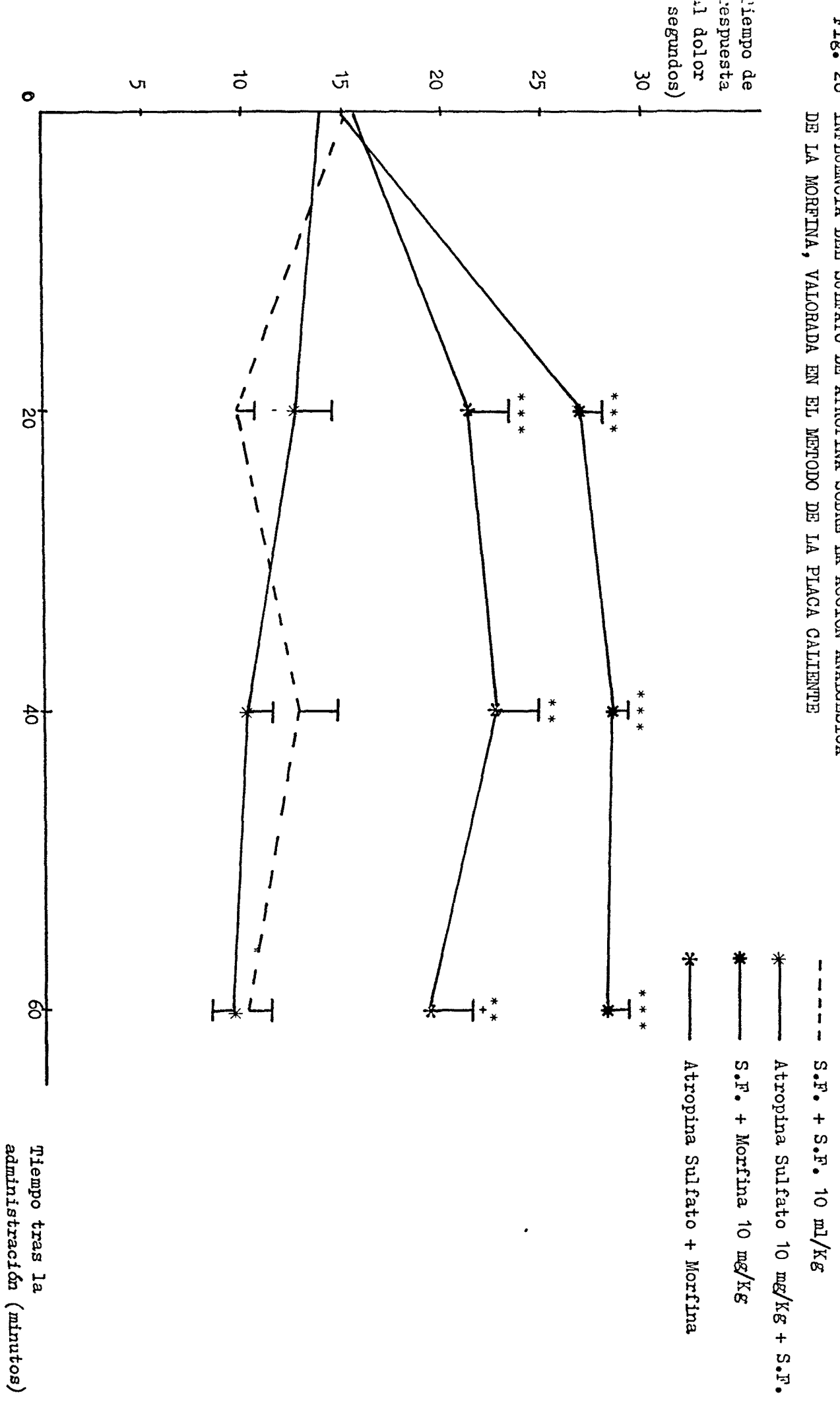


TABLA XX INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA VALORADA EN EL METODO DE LA PLACA CALIENTE.

| T R A T A M I E N T O                               | MEDIA Y ERROR ESTANDAR DEL TIEMPO DE RESPUESTA AL DOLOR EN SEGUNDOS |              |              |              |  |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--|
|                                                     | TIEMPO 0                                                            | TIEMPO 20'   | TIEMPO 40'   | TIEMPO 60'   |  |
| S. FISIOLÓGICO 10 ml/kg.<br>S. FISIOLÓGICO          | 15,28 ± 1,47                                                        | 9,85 ± 0,74  | 12,85 ± 1,89 | 10,28 ± 1,24 |  |
| ATROPINA SULFATO 10 mg/kg.<br>S. FISIOLÓGICO        | 13,85 ± 1,32                                                        | 12,71 ± 1,94 | 10,28 ± 1,34 | 9,57 ± 1,13  |  |
| NIVEL DE SIGNIFICACION CON RESPECTO AL CONTROL      | N.S.                                                                | N.S..        | N.S.         | N.S.         |  |
| S. FISIOLÓGICO<br>MORFINA 10 mg/kg.                 | 15,2 ± 1,82                                                         | 27,2 ± 1,24  | 28,6 ± 0,75  | 28,2 ± 1,32  |  |
| NIVEL DE SIGNIFICACION CON RESPECTO AL CONTROL      | N.S.                                                                | +++          | +++          | +++          |  |
| ATROPINA SULFATO 10 mg/kg.<br>MORFINA 10 mg/kg.     | 15,33 ± 1,31                                                        | 21,44 ± 2,11 | 22,77 ± 2,53 | 19,33 ± 2,35 |  |
| NIVEL DE SIGNIFICACION CON RESPECTO AL CONTROL      | N.S.                                                                | +++          | ++           | ++           |  |
| NIVEL DE SIGNIFICACION CON RESPECTO A S.F.+ MORFINA | N.S.                                                                | N.S.         | N.S.         | ^            |  |

+++ P < 0,001      ^^^ P < 0,001  
 ++ P < 0,01        ^^ P < 0,01  
 + P < 0,05         ^ P < 0,05

Fig. 28 INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA MORFINA, VALORADA EN EL METODO DE LA PLACA CALIENTE



Tiempo tras la administración (minutos)

5-5-6-3 : INFLUENCIA DEL METILNITRATO Y DEL SULFATO DE ATROPINA A LAS DOSIS DE 2,5 mg/Kg. SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H.

Los resultados obtenidos se aprecian en la figura 29, resumiéndolos a continuación:

- 1º) El tratamiento con atropina (metilnitrato y sulfato) no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control.
- 2º) La media de contorsiones obtenida con la dosis de 2,5 mg/Kg. de T R H es de 9,45 con una diferencia altamente significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto al control.

El tratamiento con sulfato de atropina disminuye de forma espectacular la media de contorsiones realizadas que pasa a ser de 0,25.

La comparación de este lote con el que recibió suero fisiológico y T R H nos da una diferencia muy significativa ( $p < 0,01$ ).

- 3º) El tratamiento con metilnitrato de atropina no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al lote que recibió suero fisiológico y T R H.

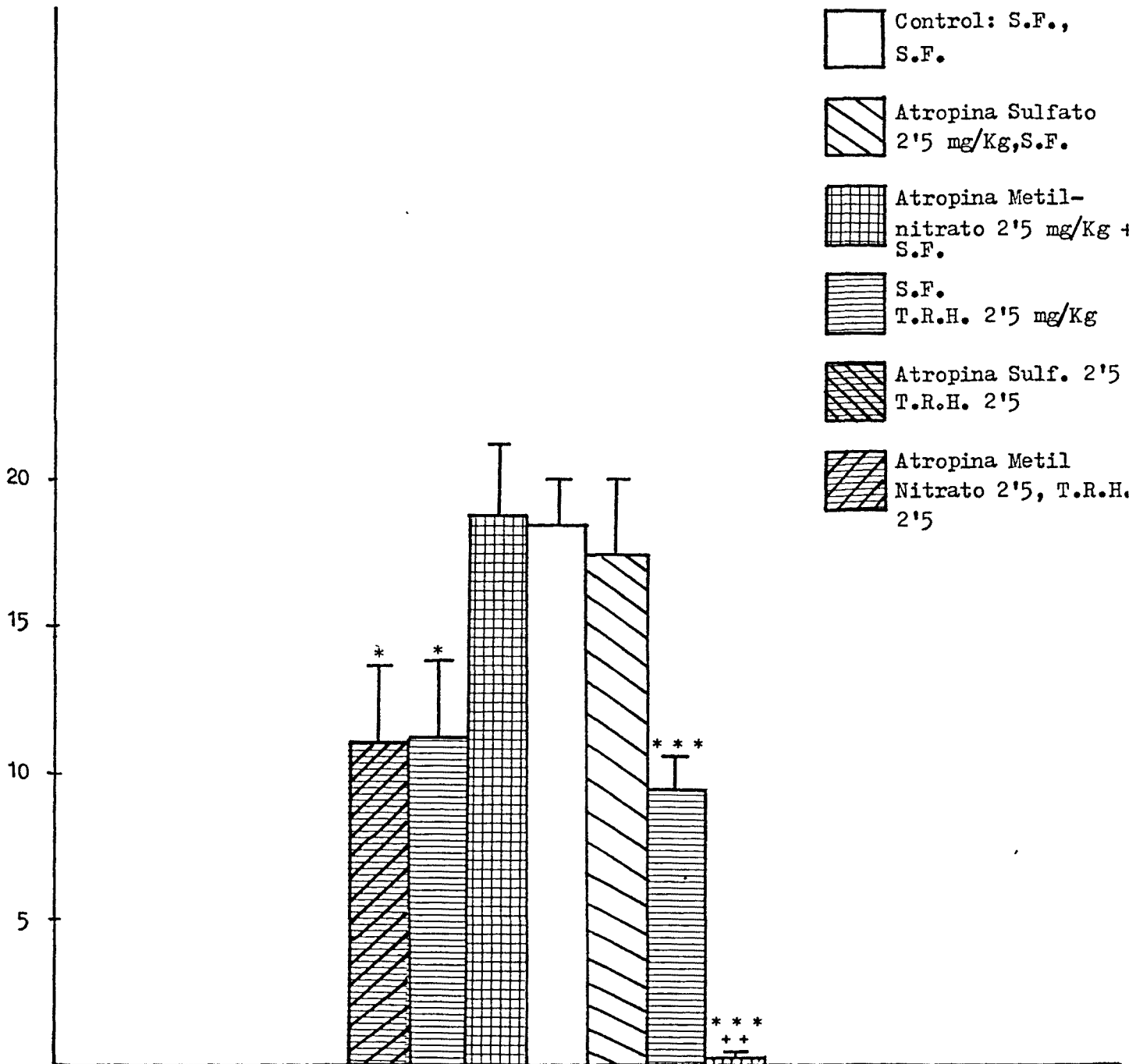
5-5-6-4 : INFLUENCIA DE DOSIS CRECIENTES DE SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H A DOSIS DE 2,5 mg/Kg.

Los resultados obtenidos se aprecian en la tabla XXI y en la figura 30, resumiéndolos a continuación:

- 1º) El sulfato de atropina, a las dosis de 0,625, 1,25, 2,5 y 5 mg/Kg., no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control.

Fig. 29

INFLUENCIA DEL SULFATO Y DEL METILNITRATO  
DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.



2º) De manera dosis dependiente el sulfato de atropina disminuye la media de contorsiones realizadas por la T R H , pasando a ser de 9,45 en ausencia de sulfato de atropina a 5,25, 2,75, 0,25 y 1,25 en presencia de las distintas dosis de sulfato de atropina ensayadas.

A partir de la dosis de 1,25 mg/Kg. de atropina se aprecian diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote que recibió suero fisiológico y T R H .

#### 5-5-6-5 INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA A LA DOSIS DE 1,5 mg/Kg. SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE DOSIS CRECIENTES DE T R H .

Los resultados obtenidos se aprecian en la tabla XXII y se resumen a continuación:

1º) El sulfato de atropina no modifica la media de contorsiones realizadas con respecto al control.

2º) Se observa una disminución franca de la media de contorsiones realizadas, por todas las dosis de T R H ensayadas cuando se asocian con el sulfato de atropina, aumentando el nivel de significación con respecto al control a las dosis de 0,625 y 1,25 mg/Kg. de T R H. La comparación con los lotes que recibieron suero fisiológico y T R H muestran diferencias significativas (  $p < 0,05$  ) a la dosis de 0,625 mg/Kg. y muy significativas (  $p < 0,01$  ) a la dosis de 2,5 mg/Kg. de T R H .

Con los resultados de la tabla XXII se obtienen las rectas de regresión de la T R H en presencia y en ausencia de sulfato de atropina tal como se aprecia en la figura 31 donde representamos el efecto obtenido frente al logaritmo de la dosis.

TABLA XXI INFLUENCIA DE DOSIS CRECIENTES DE ATROPINA SULFATO SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA TRH A DOSIS DE 2'5 mg./Kg.

| PARAMETRO                               | CONTROL | ATROPINA<br>0'625mg/Kg<br>S.FISIOLOGICO | ATROPINA<br>1'25mg/kg<br>S.FISIOLOGICO | ATROPINA<br>2'5mg./Kg<br>S.FISIOLOGICO | ATROPINA<br>5mg./Kg.<br>S.FISIOLOGICO | TRH<br>S.FISIOLOGICO | TRH<br>ATROPINA<br>0'625mg/Kg | TRH<br>ATROPINA<br>1'25mg/Kg | TRH<br>ATROPINA<br>2'5mg/Kg. | TRH<br>ATROPINA<br>5 mg./Kg. |
|-----------------------------------------|---------|-----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| MEDIA                                   | 18,35   | 14,-                                    | 14,75                                  | 17,38                                  | 17,54                                 | 9,45                 | 5,25                          | 2,75                         | 0,25                         | 1,25                         |
| ERROR<br>STANDARD                       | 1,60    | 4,74                                    | 4,61                                   | 2,60                                   | 3,18                                  | 1,32                 | 1,66                          | 1,-                          | 0,25                         | 0,75                         |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                                    | N.S.                                   | N.S.                                   | N.S.                                  | +++                  | +++                           | +++                          | +++                          | +++                          |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                                         |                                        |                                        |                                       |                      | N.S.                          | ^^                           | ^^                           | ^^                           |

+++ p < 0'001  
 ++ p < 0'01  
 + p < 0'05

^^ p < 0'001  
 ^^ p < 0'01  
 ^ p < 0'05



Fig. 30

INFLUENCIA DE DOSIS CRECIENTES DE SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.

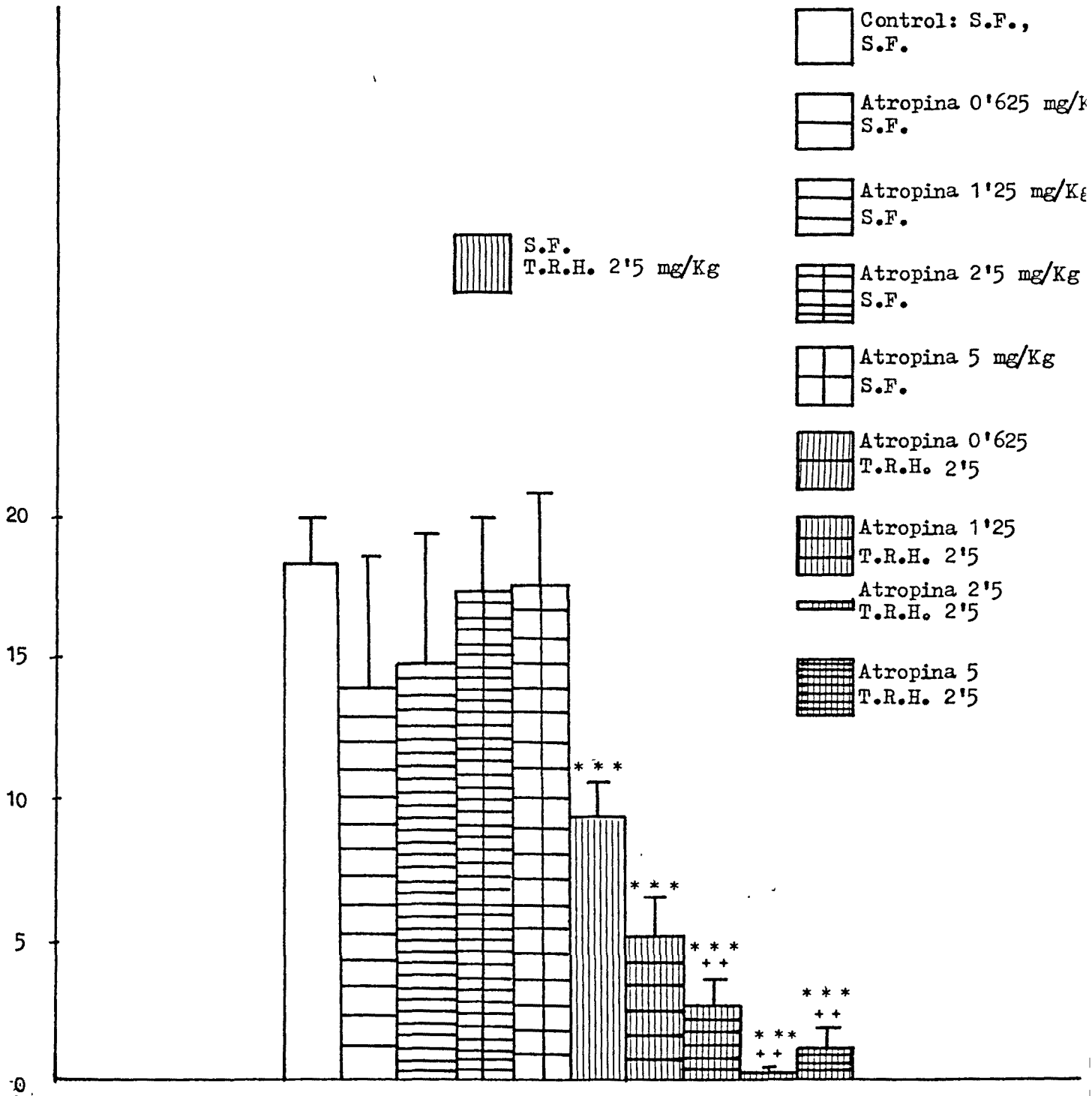


TABLA XXII INFLUENCIA DE LA ATROPINA SULFATO (1'5 mg./kg) SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE DOSIS CRECIENTES DE TRH

| PARAMETRO                               | CONTROL | ATROPINA S.FISIOLOGICO | ATROPINA TRH 0'151mg/k | S.FISIOLOGICO TRH 0'312mg/KO | ATROPINA TRH 0'312mg/k | S.FISIOLOGICO TRH 0'625mg/k | ATROPINA TRH 0'625mg/k | S.FISIOLGICO TRH 1'25mg/k | ATROPINA TRH 1'25mg/Kg | S.FISIOLOGICO TRH 2'5mg/kg | ATROPINA TRH 2'5mg/kg |
|-----------------------------------------|---------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|
| MEDIA                                   | 18'7    | 17'9                   | 14'5                   | 19'5                         | 11'75                  | 16'5                        | 4'5                    | 15'5                      | 6                      | 9'45                       | 2'75                  |
| ERROR STANDARD                          | 1'42    | 1'06                   | 4'28                   | 4'29                         | 3'425                  | 2'215                       | 3'57                   | 3'75                      | 3'675                  | 1'32                       | 1'00                  |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO CONTROL |         | N.S.                   | N.S.                   | N.S.                         | N.S.                   | N.S.                        | ++                     | N.S.                      | ++                     | +++                        | +++                   |
| NIVEL DE SIGNIFICACION RESPECTO PATRON  |         |                        |                        |                              |                        |                             | ^                      |                           | N.S.                   |                            | ^^                    |

+++ p < 0'001  
 ++ p < 0'01  
 + p < 0'05

^^^ p < 0'001  
 ^^ p < 0'01  
 ^ p < 0'05

La ecuación de la recta B de la figura ( T R H sin atropina ) es:

$$E = 17,9 + 65,8 \times \log \text{ dosis ( mg/Kg. )}$$

Su coeficiente de correlación es de  $r = 0,978$  con una correlación lineal significativa (  $p < 0,05$  ) entre efecto y logaritmo de la dosis.

La ecuación de la recta A de la figura ( T R H con sulfato de atropina ) es:

$$E = 68,3 + 51,99 \times \log \text{ dosis ( mg/ Kg. )}$$

Su coeficiente de correlación es de  $r = 0,925$  y la correlación lineal es significativa (  $p < 0,05$  ) entre efecto y logaritmo de la dosis.

Observamos como el tratamiento con sulfato de atropina aumenta espectacularmente el valor de la ordenada en el origen (  $a = 68,3$  ) lo que indica una potenciación del efecto.

Por interpolación de ambas rectas obtenemos la  $DA_{50}$  que son:

- Recta A :  $DA_{50} = 0,44 \text{ mg/Kg.}$

- Recta B :  $DA_{50} = 3,07 \text{ mg/Kg.}$

En la figura 32 se muestra las rectas de regresión obtenidas con la morfina y con la asociación de T R H con sulfato de tropina. Puede apreciarse en ella como la recta B ( T R H con atropina ) se aproxima a la recta A.

Se observan también las notables diferencias entre las rectas

Fig. 31

INFLUENCIA DEL SULFATO DE ATROPINA SOBRE LA ACCION ANALGESICA DE LA T.R.H.  
 (Agente inductor del dolor: Fenil Benzoquinona)

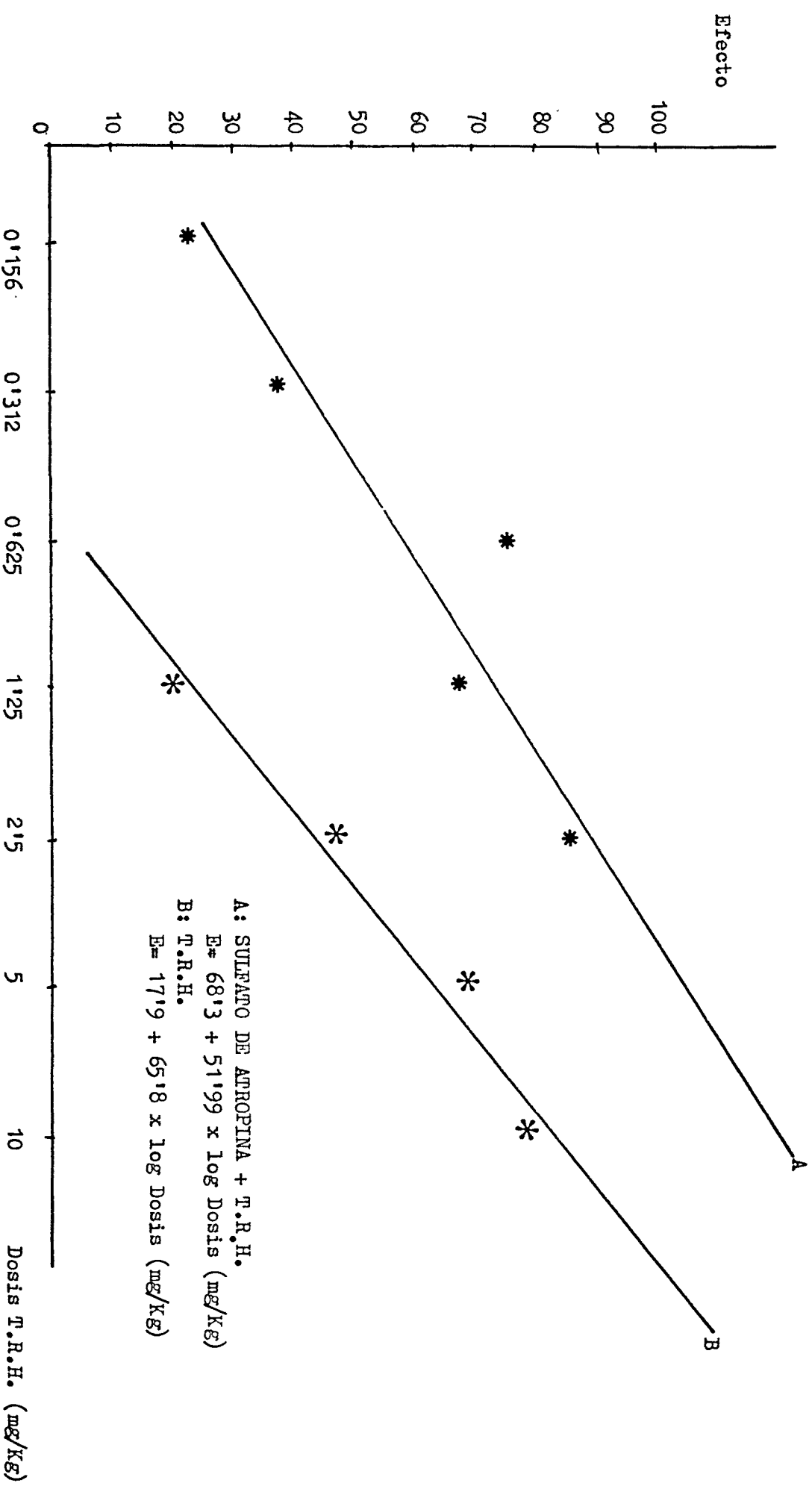
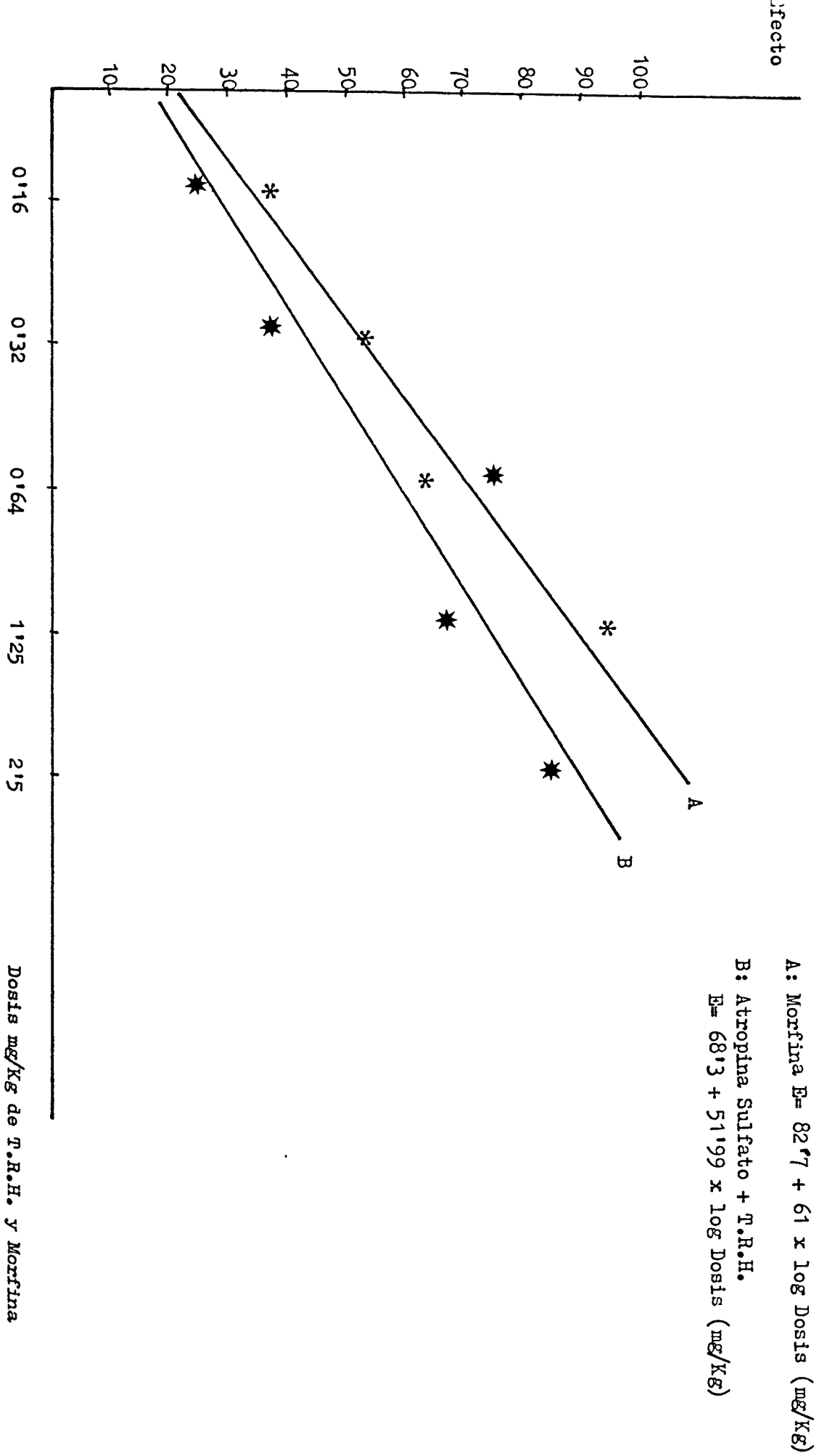


Fig. 32

EFFECTO ANALGESICO DE LA MORFINA Y DE LA ASOCIACION DE P.R.H. CON SULFATO DE ATROPINA



de regresión de esta figura y las que se representan en la figura 9.

5-5-7 : INFLUENCIA DEL SISTEMA COLINERGICO EN LA ACCION ANALGESICA  
DE LA T R H .

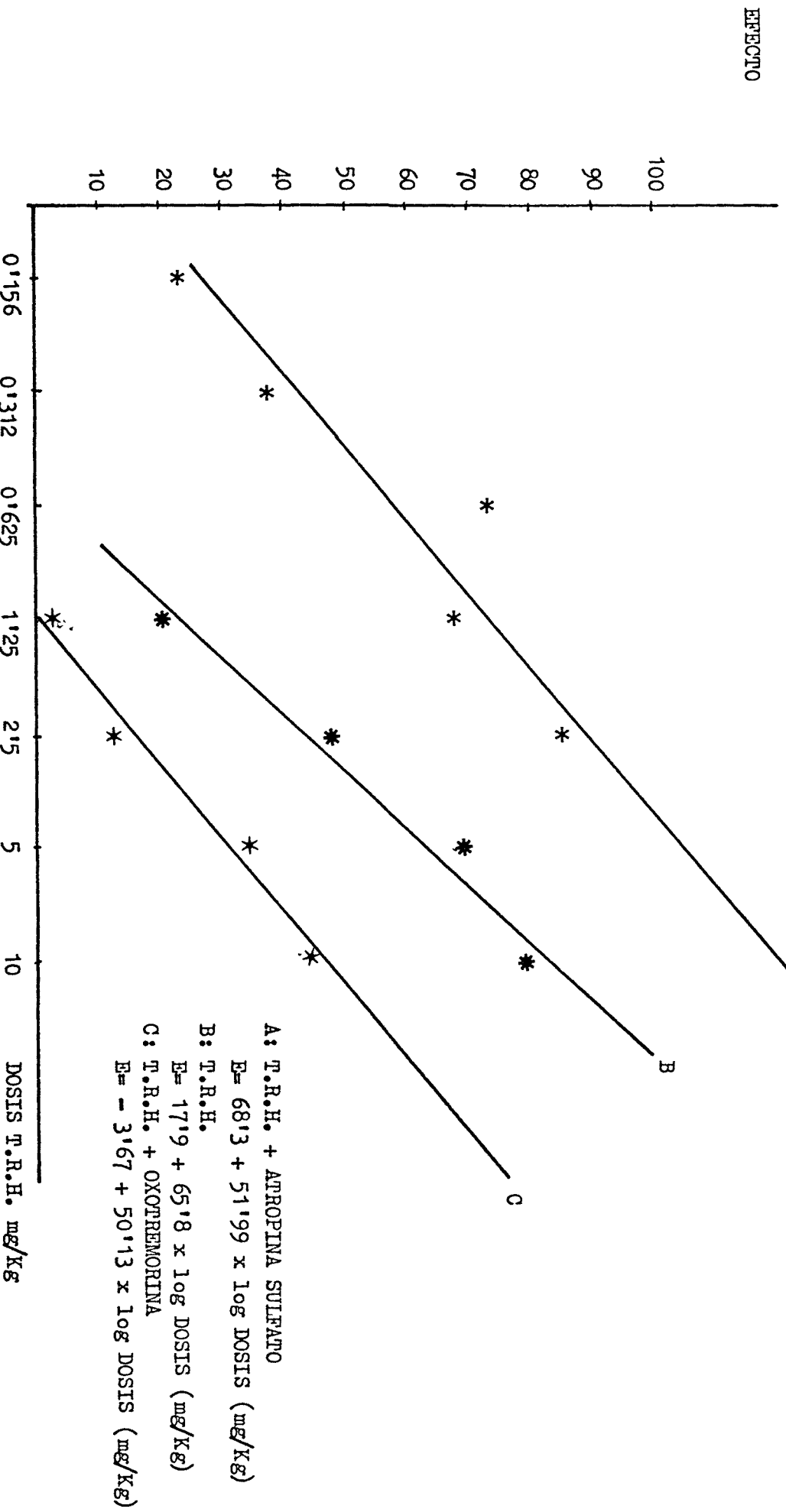
La figura 33 muestra las rectas de regresión obtenidas con la T R H, ( recta B ), con la T R H y sulfato de atropina ( recta A ) y con la T R H y oxotremorina ( recta C ), apreciándose la potenciación del efecto analgésico en la recta A, y el antagonismo del mismo en la recta C.

Las DA<sub>50</sub> obtenidas por interpolación de las tres rectas serían:

- 1º) DA<sub>50</sub> de la T R H : = 3,07 mg/Kg.
- 2º) DA<sub>50</sub> de la T R H con sulfato de atropina = 0,44 mg/Kg.
- 3º) DA<sub>50</sub> de la T R H con oxotremorina = 11,76 mg/Kg.

Fig. 33

INFLUENCIA DEL SIST. COLINERGICO EN LA ACCION ANALGESICA  
DE LA T.R.H. (Metodo de la Fenil Benzquinona)



## 6 .- DISCUSION DE LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H

6-1).- Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que la T R H presenta una indudable acción analgésica.

La actividad analgésica de la T R H está relacionada con el tipo de dolor, es decir con el método utilizado en la inducción del dolor y permite diferenciar el perfil analgésico obtenido del de la morfina. En efecto, la T R H muestra acción analgésica en el método mecánico y en los métodos químicos utilizados, pero carece de efecto cuando el agente inductor del dolor es de naturaleza térmica.

Por el contrario la morfina se muestra eficaz en los tres métodos ensayados.

La ausencia de actividad de la T R H en el método de la placa caliente corrobora los resultados obtenidos por nosotros (Escartin y Cols. 1.979 b), utilizando el método de la retirada de la cola, en la rata y administrando la T R H por vía intracerebroventricular.

Nuestros resultados coinciden con los trabajos de Cuenca y Cols. (1978), quién mostró la acción analgésica de la T R H utilizando el bromuro de acetilcolina y concuerdan también con los trabajos de Martin y Cols. (1.977) y Holaday y Cols. (1.978) quienes utilizando métodos de naturaleza térmica descartaron la acción analgésica de la T R H.

Se puede afirmar pues que la T R H es eficaz con cualquiera de los métodos químicos utilizados comunmente en la valoración de analgésicos.

Por otro lado demostramos la eficacia analgésica utilizando un método de presión (mecánico).

Los trabajos de Tyers (1.980) demuestran que únicamente los agonistas opiáceos sobre receptores u serían eficaces en —



los métodos térmicos. Esta eficacia va ligada también a la producción de hábito cuando dichos analgésicos son utilizados clínicamente.

En la sección 5-2 de los resultados hemos demostrado tanto "in vivo" como "in vitro" que la T R H es inactiva sobre los receptores opiáceos. u.

Tyers (1.980) demuestra que los fármacos opiáceos agonistas parciales como la pentazocina son ineficaces en los métodos térmicos y activos en los métodos de presión y en los métodos químicos, y no existen dudas sobre la eficacia analgésica de la pentazocina, cuando se utiliza en clínica.

6-2.- En nuestros resultados apreciamos una menor potencia analgésica de la T R H con respecto a la morfina en todos los métodos ensayados. Esta diferencia es notable cuando la administración es por vía subcutánea. Sin embargo considerando el método de presión, y valorando la acción analgésica de la T R H a los cinco minutos de su administración intracerebroventricular la  $DA_{50}$  obtenida (0,51 ug/rata) aproxima a la  $DA_{50}$  de la morfina valorada a lo largo de toda la prueba (0,26 ug/rata).

Si consideramos las  $DA_{50}$  obtenidas en los diferentes métodos ensayados y las comparamos con las dosis activas de la T R H en tres acciones universalmente aceptadas de la hormona, observamos que están dentro de dichos límites y en algunos casos por debajo. Como ejemplo los trabajos de Cott y Cols. — (1.976) muestran que la T R H reduce de forma significativa el sueño inducido por etanol con dosis del orden de 10 mg/Kg. por vía intraperitoneal. Con esta misma dosis y por vía subcutánea nosotros encontramos una protección analgésica superior al 80% en el método de la fenilbenzoquinona y del orden de un 75% en el método del ácido acético.

6-3.- Osbahr y Cols. (1.981) consideran que los métodos térmicos miden la primera respuesta al dolor (respuesta al estímulo nociógeno solo durante su aplicación) y esto no se asocia con una - extensa injuria tisular. Consideran también que el test del ácido acético es el mejor método para valorar las respuestas al dolor asociadas con injuria tisular.

Gracias a los trabajos de Holaday y Cols. (1.981) y de Faden y Cols. (1.981 b) el efecto anlgésico de la T R H adquiere singular trascendencia ya que además de no antagonizar la anlgesia inducida por la Beta-Endorfina liberada, la T R H " perse " -- tiene efecto analgésico.

6-4.- Podría pensarse que esta acción analgésica de la T R H fuera - una acción inespecífica, común a algunos otros tripéptidos del SNC. Los trabajos de Plotnikoff y Kastin (1.974) descartaron - la acción analgésica del MIF (Hormona inhibidora de la liberación de h. melanotropa : Prolil-Leucil-Glicinamida), tras su - administración oral en el ratón, en el método del ácido acético. En 1.978 Cuenca y Cols descartan la acción analgésica del MIF tras su administración endovenosa a dosis de 50 y 100 mg/Kg. en el ratón utilizando el método del bromuro de Acetilcolina.

Nosotros (Palop y Cols. 1.979) descartamos la acción analgésica del MIF, en la rata, administrándolo por vía ICV a la dosis de 100 ug/rata y utilizando el método de presión en la colla. En el mismo trabajo demostramos que un tripéptido sintético, obtenido con el 1<sup>er</sup> aminoácido de la T R H y los 2 aminoácidos terminales del : MIF, que correspondería a la L-piro-- glutamil-L-leucil-L-Glicinamida, administrando análogamente - al MIF carecía de acción analgésica.

6-5.- La acción analgésica que presentan los 2 dipéptidos análogos estructurales de la T R H que hemos estudiado es demostrativa de que el efecto anlgésico de la T R H es una acción central de la hormona independiente de sus conocidas acciones endocrininas.

En efecto, Guillemin y Cols. (1.974) observan que la presencia del piroglutámico es fundamental para que la T R H presente la acción liberadora de TSH. En la tabla siguiente procedente de dicho trabajo podemos apreciar lo anterior con más claridad.

| <u>PEPTIDO</u><br>=====                   | <u>ACTIVIDAD T R H</u><br><u>ESPECIFICA</u><br>( U/mg ) | <u>ACTIVIDAD RELATIVA %</u> |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------|
| - T R H                                   | 50.000                                                  | 100,00                      |
| - Ciclobutoil-his-<br>pro-NH <sub>2</sub> | 4                                                       | 0,01                        |
| - Ciclopentil-his-<br>pro-NH <sub>2</sub> | 8                                                       | 0,02                        |

Por el contrario y refiriéndonos a la acción analgésica, el piroglutámico tiene poca importancia, y sí la tiene en cambio la terminación histidil-prolinamida (Bladé Font y Cols. 1.980).

6-6.- La acción analgésica de la T R H no es mediada por la histidil-prolina dicetopiperacina.

La ausencia de efecto analgésico de este metabolito de la T R H no debe sorprendernos, ya que si bien para algunas acciones de la T R H como el antagonismo de la narcosis por etanol, la histidil-prolina dicetopiperacina tiene mayor potencia que la — T R H. (Prasad y Cols. 1.977; Yanagisawa y Cols. 1.979); el citado metabolito puede tener acciones distintas a la T R H como originar hipotermia en ratas (Prasad y Cols. 1.978) o inhibir la secreción de prolactina (Bauer y Cols. 1.978; Enjalbert y — Cols. 1.979); por último la histidil-prolina dicetopiperacina puede carecer de efecto frente a otras conocidas acciones de — la T R H como es el caso del antagonismo de la narcosis inducida por pentobarbital (Peterkofsky y Battaini 1.980).

6-7.- La distribución de la T R H en el sistema nervioso central extrahipotalámico puede hacer pensar que la T R H juega un papel cuya importancia queda por elucidar; pero que indudablemente — está relacionado con las vías del dolor.

En efecto los trabajos de Winokur y Utiger 1.974; Brownstein y Cols. 1.974; Wei y Cols 1.975 demuestran la existencia de elevadas concentraciones de T R H en cerebro anterior, tronco cerebral, diencéfalo posterior y anterior, área preóptica, septum (sobre todo en los núcleos dorsal y lateral) y área periacueductal del 4º ventrículo, zonas todas ellas relacionadas con la integración de la sensación dolorosa.

La disociación de la actividad encontrada (térmica y presión) debe recaer en las estructuras nerviosas donde ambas sensaciones están discriminadas, es decir vías medulares y bulbo-espinales:

6-8.-- Trabajos de electrofisiología realizados con la T R H por Renaud y Martin (1.975) y Renaud y Cols. (1.975) podrían explicar la acción analgésica encontrada. Dichos autores observaron que la aplicación de T R H por iontoforesis inhibía la frecuencia de descarga en más del 70% de las células examinadas. Entre dichas células estaban las de la columna nuclear dorsal muy relacionada con la integración del dolor.

Podríamos formular la hipótesis de que además de este efecto inhibitor la T R H podría de modo similar a la morfina ejercer un efecto de modulación excitatoria en las sinapsis de las vías ascendentes de la sensibilidad dolorosa que tienen un efecto inhibitor de la sensación dolorosa. Esta posibilidad sería más discriminativa sobre las vías de sensibilidad térmica o dolorosa y podría contribuir a explicar la disociación encontrada en la acción analgésica de la T R H.

## 7 .- DISCUSION DE LAS INTERACCIONES

Debe destacarse que ninguno de los fármacos utilizados para estudiar las posibles interacciones a las dosis utilizadas ha mostrado efecto inhibitor sobre las contorsiones abdominales realizadas.

Esta posibilidad se tuvo especialmente en cuenta cuando se valoró la interacción con fármacos parasimpaticomiméticos, que muestran actividad analgésica en el test de la fenilbenzoquinona y en el de la retirada de la cola como demostraron Howes y Cols. 1.969; - Ireson 1.970; Pleuvry y Tobias 1.971.

La ausencia de actividad analgésica de la Eserina y de la oxotremorina a las dosis ensayadas corroboran los trabajos de Harris y Cols. 1.969 y Dewey y Cols. 1.970.

### 7 -1.- Influencia de la reserpina.-

El antagonismo claro que ejerce el alcaloide sobre la acción analgésica de la morfina coinciden con los trabajos publicados en la literatura por Tagaki y Cols 1.964; Dewey y Cols. 1.970; Fennesy y Lee 1.970; Pleuvry y Tobias 1.971; Sparkes y Spencer 1.971 y - Alamo y Cols. 1.979, quienes utilizando distintos métodos de analgesia obtienen los mismos resultados.

Sparkes y Spencer(1.971) mostraron que la inyección intracerebroventricular de serotonina en la rata potencia el efecto antinociceptivo de la morfina e invierte el antagonismo de la reserpina sobre la acción analgésica de la morfina. Por el contrario la administración intracerebroventricular de noradrenalina carecía de efectos, por lo que concluyen que en el efecto antagónico de la reserpina sobre la morfina tiene mayor trascendencia el vaciamiento de los depósitos de serotonina, que los de noradrenalina. La reserpina, en nuestras condiciones experimentales no modifica la acción analgésica de la T R H.

Nuestros resultados no coinciden con los publicados en la litera-

tura por Alamo y Cols. 1.979. Debemos subrayar que si bien la dosis de reserpina utilizada, su vía de administración y el tiempo de latencia entre la administración de la reserpina y la del agente analgésico fueron iguales, existen diferencias en el método de analgesia utilizado y en las dosis de T R H ensayadas.

#### 7-2.- 5-Hidroxitriptófano (5-HTP)

El 5-HTP potencia de forma clara la acción analgésica de la morfina. Estos resultados coinciden con los publicados en la literatura por Takemori y Cols. 1.975 y Tulunay y Cols. 1.976, quienes -- utilizando la misma dosis de 5-HTP, la misma especie animal pero distinto método de analgesia (retirada de la cola) obtienen una potenciación manifiesta del efecto analgésico de la morfina.

El 5-HTP modifica la respuesta analgésica de la T R H, y si bien los resultados obtenidos por nosotros apuntan hacia una potenciación del efecto, debemos señalar que ninguno de los puntos obtenidos en la recta de regresión en ausencia de 5-HTP, difiere de forma significativa de los obtenidos en la recta de regresión en presencia de 5-HTP.

Los resultados anteriores demuestran que si bien el 5-HTP tiende a potenciar la acción analgésica de la T R H, esta potenciación no es tan evidente como en el caso de la morfina.

Si analizamos en conjunto estos resultados con los obtenidos con la reserpina, concluiríamos que la integridad del sistema serotoninérgico es más importante para la acción analgésica de la morfina que para la acción analgésica de la T R H.

Alamo y Cols. (1.981) mostraron que la paraclorofenilalanina (inhibidor de la síntesis de serotonina) antagoniza la acción analgésica de la T R H y que la administración de 5-HTP a la dosis de 100 mg/Kg. administrado cuatro horas antes que la T R H restaura parcialmente el efecto analgésico de la misma.

Alamo y Cols.(1.979) demostraron que la alfametiltirotocina antagonizaba la acción de la morfina, no modificando en cambio la acción

analgésica de la T R H, concluyendo que los mecanismos catecolaminérgicos tienen gran influencia en la acción analgésica de la morfina y no la tienen en el caso de la T R H.

Existe un acuerdo unánime de considerar la gran importancia que juegan las vías serotoninérgicas en la acción analgésica de la morfina. Sin embargo en trabajos publicados recientemente (Taber y Latranyi 1.981) se demuestra que la paraclorofenilalanina, es capaz de antagonizar la acción analgésica de los opiáceos agonistas (morfina), opiáceos agonistas parciales (pentazocina) y anti-inflamatorios no esteroideos (ácido acetil-salicílico) y en el mismo trabajo demuestran que el 5-HTP, a la dosis de 80 mg/Kg. re<sup>u</sup>instaura la acción analgésica de los fármacos citados en presencia de paraclorofenilalanina.

La explicación del fenómeno anterior, en el caso del ácido acetil-salicílico podría encontrarse en el trabajo publicado por Badawy (1.982) que demuestra que el salicilato sódico eleva los niveles de triptófano cerebral, bien por inhibir la actividad pirrolasa hepática bien por desplazamiento de la unión del triptófano a proteínas o bien interviniendo ambos mecanismos.

En sentido opuesto a los trabajos anteriores, autores como Sugrue (1.979), demuestran, utilizando distintos inhibidores específicos de la recaptación de serotonina, que si bien potencian la acción analgésica de la morfina son incapaces de modificar la acción analgésica de otros opiáceos como la metadona y la petidina. Dicho autor opina que ello es debido a que únicamente la morfina aumentaría el ritmo de síntesis de serotonina cerebral.

### 7-3.- APOMORFINA.-

La apomorfinina, a dosis bajas activa los autorreceptores dopaminérgicos presinápticos. originando una inhibición de la liberación de dopamina. La apomorfinina a dosis más elevadas (superiores a 2 mg/Kg.) estimula los receptores dopaminérgicos postsinápticos (Ushijima y Cols. 1.982).

Nosotros hemos ensayado la dosis de 0,25 mg/Kg. A esta dosis ejerce

un efecto distinto sobre los dos analgésicos valorados.

La analgesia morfinica es antagonizada claramente por la apomorfinina.

Los trabajos de Tulunay y Cols. 1.975; Takemori y Cols. 1.975 y Tulunay y Cols 1.976 demuestran que la apomorfinina a dosis de 10 mg/Kg (que estimula los receptores dopaminérgicos postsinápticos) inhibe la acción analgésica de la morfina valorada en el ratón en el método de la retirada de la cola. Los citados autores, señalan también que la apomorfinina a las altas dosis ensayadas tiene propiedades hiperalgésicas que al menos de forma parcial contribuyen a dicho antagonismo.

Los resultados obtenidos por nosotros, demuestran que la apomorfinina, a dosis que no inhiben las contorsiones realizadas, actuando sobre los autorreceptores presinápticos, antagoniza la acción de la morfina.

Con la T R H el efecto encontrado es de signo contrario. Se observa una clara potenciación del efecto analgésico.

Debido a la inhibición de las contorsiones, que ocasionan las dosis altas de apomorfinina, nos ha sido imposible valorar el efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos postsinápticos sobre la acción analgésica de la T R H.

Quedaría por estudiar el efecto del sulpiride, bloqueante selectivo de los autorreceptores dopaminérgicos presinápticos sobre la acción analgésica de la T R H.

#### 7-4.- SULFATO DE ESERINA.-

Si bien observamos una reducción en la media de contorsiones cuando la Eserina se asocia a la morfina, no hay diferencia estadísticamente significativa. Con la T R H no observamos una modificación en la media de contorsiones. Esto lo atribuimos a que debido a las propiedades analgésicas que presenta la eserina (Ireson, 1.970 Howes y Cols. 1.969. Pleuvry y Tobias, 1.971) tuvimos que escoger una dosis que no modificara las contorsiones inducidas por la fe--



nilbenzoquinona. De acuerdo con los trabajos de Dewey y Cols. (1.970), la dosis de 0,1 mg/Kg. no modifica estas contorsiones pero al mismo tiempo ha resultado insuficiente para valorar la interacción.

#### 7-5.- OXOTREMORINA.-

Autores como Ireson, 1.970, Howes y Cols. 1.969, Pleuvry y Tobias 1.971; mostraron que la oxotremorina posee actividad analgésica. La dosis utilizada no debía modificar la media de contorsiones y de acuerdo con los trabajos de Dewey y Cols (1.970) escogemos la dosis de 0,01 mg/Kg.

A esta dosis la oxotremorina potencia de forma clara la acción analgésica de la morfina y nuestros resultados coinciden plenamente con que el sistema colinérgico es un modulador positivo de la analgesia morfínica, (Takemori y Cols. 1.975, Howes y Cols. 1.969, Ireson 1.970). No coinciden con los trabajos de Dewey y Cols. — 1.970, los cuales utilizando la fenilbenzoquinona no encuentran — potenciación de la morfina. Nosotros atribuimos estas diferencias a la diferente metodología seguida utilizando el mismo agente inductor del dolor Dewey y Cols. administran la fenilbenzoquinona y observan las contorsiones durante 1 minuto, a los 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

Nosotros valoramos las contorsiones entre los 5 y 10 minutos que siguen a la administración de la fenilbenzoquinona. Existe un — acuerdo general en considerar que durante dicho período de tiempo los animales realizan el máximo de contorsiones abdominales, lo que permite una mejor valoración de los analgésicos estudiados.

Por el contrario, con la T R H, obtenemos un claro antagonismo demostrable por el desplazamiento obtenido en la recta de regresión modificándose notablemente la DA50 que alcanza el valor de 11,76 mg/Kg.

#### 7-6.- ATROPINA.-

Los trabajos de Takemori y Cols (1.975) y Tulunay y Cols (1.976) muestran que el sulfato de atropina, a la dosis de 10 mg/Kg. antagoniza el efecto analgésico de la morfina valorado en el ratón en el método de la retirada de la cola.

Los trabajos de Ireson (1.970) muestran que el sulfato de atropina a la dosis de 0,5 mg/Kg. no modifica la acción analgésica de la morfina valorada en el ratón por los métodos de la fenilbenzoquinona y del electroshock en la cola.

Nosotros, en nuestras condiciones experimentales observamos que en el método de la fenilbenzoquinona, el sulfato de atropina, a las dosis de 5 y 10 mg/Kg. no modifica la acción analgésica de la morfina a las dosis de 0,32 y 0,64 mg/Kg.

Utilizando el método de la placa caliente, dosis de 10 mg/Kg. de sulfato de atropina parecen antagonizar la acción analgésica de la morfina; debemos señalar que únicamente a los 60 minutos aparecen diferencias estadísticamente significativas cuando se compara con el lote de animales que recibió suero fisiológico y morfina.

Por el contrario, el sulfato de atropina potencia de forma extraordinaria la acción analgésica de la T R H, reduciéndose la  $DA_{50}$  (0,44 mg/Kg).

Demostramos también que el metilnitrato de atropina, base fuerte, que no pasa la barrera hematoencefálica no modifica la acción analgésica de la T R H. Ambos hechos demuestran claramente que deben bloquearse los receptores muscarínicos centrales (Kato y Agid 1.979) para potenciar la acción analgésica de la T R H.

#### 7 -7.- INFLUENCIA DEL SISTEMA COLINERGICO.-

La influencia ejercida por el sistema colinérgico en la acción analgésica de la T R H, nos permite afirmar que la acción analgésica de la T R H es independiente de los efectos analépticos del tripéptido, basados en los siguientes hechos:

- 1º) Los trabajos de Breese y Cols. (1.975) demuestran que en el ratón el sulfato de atropina antagoniza el efecto analéptico de la T R H sobre el pentobarbital.
- 2º) Los trabajos de Cott y Cols (1.976) demuestran que el metilnitrato de atropina, administrado a la rata por vía intracis-  
ternal antagoniza el efecto analéptico de la T R H sobre el -  
etanol.
- 3º) Yarbrough y Singh (1978) observaron que la T R H, administra-  
da por vía endovenosa aumenta las acciones excitadoras de la  
acetilcolina en neuronas corticales de rata.
- 4º) Los interesantes trabajos realizados por Schmidt en 1977 de -  
muestran en la rata, que la T R H no modifica los niveles de  
acetilcolina ni la recaptación de colina dependiente de la --  
alta afinidad para el sodio, en estriado, hipocampo, cortex y  
cerebro medio; en el mismo trabajo, confirman que el pentobar-  
bital, reduce la recaptación de colina en todas las regiones-  
consideradas, exceptuando el estriado y que además aumenta --  
los niveles de acetilcolina de forma muy significativa con --  
respecto al control en hipocampo y cortex. Dicho autor demues-  
tra que la T R H antagoniza el efecto reductor ejercido por -  
el pentobarbital sobre la recaptación de colina en todas las  
regiones consideradas con excepción del estriado, reduciendo  
también de forma significativa el incremento en los niveles  
de acetilcolina inducido por el pentobarbital, unicamente en  
el hipocampo.
- 5º) Malthe - Sorensen y Cols. (1978) muestran que la T R H admi -  
nistrada por vía intracerebroventricular aumenta el ritmo de  
síntesis de la acetilcolina en el cortex parietal.
- 6º) Kalivas y Horita (1980), microinyectando picomoles de T R H en  
diferentes zonas del cerebro de rata, observan que en el sep-  
tum concentraciones de T R H de 0,095 nM por rata antagonizan

significativamente la narcosis inducida por pentobarbital. El septum tiene proyecciones eferentes con el hipocampo y existen suficientes evidencias que apoyan el concepto de que la acetilcolina es el neurotransmisor utilizado en el sistema septo hipocámpico. Dichos autores concluyen que la exquisita sensibilidad mostrada por el septum a esta acción de la T R H, apoyan el concepto de que la T R H puede actuar como un neuromodulador central. Esto se apoya en la demostración llevada a cabo por Sfaeffler y Cols. en 1977, quienes demostraron que los sinaptosomas septales liberan de forma calcio dependiente T R H inmunorreactiva en presencia de altas concentraciones de potasio.

La extraordinaria influencia del sistema colinérgico sobre la acción analgésica de la T R H se realiza en sentido contrario a la ejercida sobre la acción analéptica. En efecto, la oxotremorina agonista de los receptores muscarínicos centrales antagoniza el efecto analgésico del tripéptido y el sulfato de atropina bloqueante de los receptores muscarínicos centrales potencia dicha acción.

Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la zona septo hipocámpica intervendría decisivamente en la acción analgésica de la T R H y que quizás el tripéptido endógeno considerado; que para muchos autores es un neurotransmisor o un neuromodulador de la transmisión, actuaría modulando de alguna forma la actividad de zonas del sistema nervioso central relacionadas con la integración del dolor.

La extraordinaria potenciación obtenida con el sulfato de atropina debería de alentar el ensayo clínico de dicha asociación en pacientes terminales con síndromes dolorosos. En caso de confirmarse esta potenciación en seres humanos, obtendríamos un claro beneficio para dichos enfermos, retrasando el uso de fármacos opiáceos a fases aún más avanzadas de su enfermedad.

7-8.- COMPARACION DE LAS ACCIONES ANALGESICAS DE LA MORFINA Y T R H

Finalmente podemos resumir en el siguiente cuadro las analogías y diferencias entre ambas sustancias.

ANALOGIAS Y DIFERENCIAS EN LA ACCION ANALGESICA DE LA T R H Y DE LA MORFINA.

|                                                                                      | <u>T R H</u> | <u>MORFINA</u>             |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------|
| ACTIVIDAD EN METODO TERMICO                                                          | -            | +                          |
| ACTIVIDAD EN METODO MECANICO                                                         | +            | +                          |
| ACTIVIDAD EN METODOS QUIMICOS                                                        | +            | +                          |
| ANTAGONISMO POR NALOXONA                                                             | -            | +                          |
| ACCION EN LA PREPARACION DE MUSCULO LONGITUDINAL-PLEXO MIENTERICO DE ILEON DE COBAYO | -            | +                          |
| PRETRATAMIENTO CON RESERPINA                                                         | ~            | ↓                          |
| TRITRATAMIENTO 5-HTP                                                                 | ↑            | ↑↑                         |
| PRETRATAMIENTO CON APOMORFINA                                                        | ↑            | ↓                          |
| PRETRATAMIENTO CON OXOTREMORINA                                                      | ↓            | ↑                          |
| PRETRATAMIENTO CON ATROPINA SULFATO ↑↑                                               |              | ↓ (solo en método térmico) |

Observaciones:

- + actividad
- no actividad
- ↑ Aumento de la acción analgésica
- ~ No modificación de la acción analgésica
- ↓ Descenso de la acción anlgésica.

C O N C L U S I O N E S

=====

- 1º) La T R H presenta acción analgésica, en los métodos de inducción del dolor mecánicos y químicos.
- 2º) Esta acción analgésica es independiente e los receptores opi<sup>d</sup>-áceos  $\mu$ .
- 3º) La acción analgésica que presentan los dos dipéptidos análogos de la T R H, demuestra que la acción analgésica es un efecto - central del tripéptido; independientemente de sus acciones endocrinas ya que carecen del piroglutámico.
- 4º) La histidil-prolina dicetopiperacina, metabolito activo para algunas acciones de la T R H carece de actividad analgésica. Por consiguiente la acción analgésica de la T R H es independiente de su transformación en histidil-prolina dicetopiperacina.
- 5º) La reserpina no modifica la acción analgésica de la T R H.
- 6º) El 5-HTP potencia la acción analgésica de la T R H, si bien con menor intensidad que en el caso de la morfina.
- 7º) El estímulo de los autorreceptores dopaminérgicos presinápticos potencia la acción analgésica de la T R H.
- 8º) El sistema colinérgico influye decisivamente en la acción — analgésica de la T R H.
- La estimulación colinérgica antagoniza la acción analgésica
  - El bloqueo de los receptores muscarínicos centrales potencia de modo extraordinario la acción analgésica de la T R H.

9º) La acción analgésica de la T R H no es consecuencia de la acción analéptica del tripéptido puesto que el sistema colinérgico actúa de manera contrapuesta sobre ambas acciones.