

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Efecto y especificidad de un derivado de la metionina-
encefalina (FK-33-824) sobre la secreción de las hormonas
hipofisarias**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jorge Martín Pérez

Madrid, 2015

Jorge Martín Pérez

TP
1983

038



x-53-044240-9

**EFFECTO Y ESPECIFICIDAD DE UN DERIVADO
DE LA METIONINA-ENCEFALINA (FK-33-824) SOBRE LA SECRECION
DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS**

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 38/83

© Jorge Martín Pérez
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-4108-1983

Jorge Martín Pérez

Efecto y especificidad de un derivado de la
Metionina – Encefalina (FK 33 - 824)
sobre la secreción de las hormonas hipofisarias.

Emilio del Pozo Gómez
Doctor en Medicina
Profesor Asociado,
Facultad de Medicina,
Universidad de Basilea, Suiza.

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica.

1981

"A María Teresa y Cecilia"

"A mis padres"

El presente trabajo ha sido realizado en el Dpto. de Terapéutica Experimental de la División de Investigaciones Biomédicas de los Laboratorios Sandoz S.A. (Basilea, Suiza), bajo la dirección del Profesor Emilio del Pozo y presentado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid por el Profesor Angel Martín Municio; a ambos va dirigido mi más sincero agradecimiento.

- I -

INDICE

I	INTRODUCCION:	1
	A. Descubrimiento de las encefalinas.	
	B. Determinación, localización y función.	
	C. Metabolismo.	
	D. Receptores opiáceos.	
	E. Relación estructura-actividad de análogos de encefalinas: caracterización del derivado FK 33-824.	
II	MOTIVO DE LA TESIS.	33
III	MATERIAL Y METODOS:	39
	A. Sustancias:	
	1. FK 33-824.	
	2. Naloxona.	
	3. Bromocriptina.	
	4. Tietilperazina.	
	5. Lisina-vasopresina.	

6. ACTH β^{1-24} .

7. LH-RH..

B. Metodología:

1. Estudios diurnos:

- a. Efecto del FK 33-824 y de la naloxona sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento.
- b. Estudio del efecto de la interacción entre vías de transmisión dopaminérgicas y encefalínérgicas sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento.
- c. Efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la hipersecreción patológica de prolactina.
- d. Estudio del efecto de la interacción entre LH-RH y FK 33-824 sobre la secreción de la hormona luteinizante.
- e. Efecto del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de la hormona luteinizante.
- f. Estudio de la acción inhibidora del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y cortisol.

2. Estudio durante el sueño nocturno: efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona

sobre la secreción de prolactina, hormona de crecimiento y hormona luteinizante.

C. Determinaciones hormonales por radioinmunoensayo:

1. Prolactina.
2. Hormona de crecimiento.
3. Hormona luteinizante.
4. Hormona adrenocorticotropa.
5. Cortisol.

IV RESULTADOS:

70

1. Estudios diurnos:

- a. Efecto del FK 33-824 y de la naloxona sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento.
- b. Estudio del efecto de la interacción entre vías de transmisión dopaminérgicas y encefalinérgicas sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento.
- c. Efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la hipersecreción patológica de prolactina.
- d. Estudio del efecto de la interacción entre LH-RH y FK 33-824 sobre la secreción de la hormona luteinizante.

- IV -

e. Efecto del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de la hormona luteinizante.

f. Estudio de la acción inhibidora del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y cortisol.

2. Estudio durante el sueño nocturno: efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la secreción de prolactina, hormona de crecimiento y hormona luteinizante.

3. Efectos secundarios de los fármacos empleados.

V DISCUSION:

94

A. Regulación de la secreción de prolactina y hormona de crecimiento por sustancias opiáceas.

B. Papel de los opiáceos en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante.

C. Regulación de la secreción de ACTH y cortisol por sustancias opiáceas.

VI CONCLUSIONES.

109

VII BIBLIOGRAFIA.

113

I

I INTRODUCCION

I A. Descubrimiento de las encefalinas

Trendelenburg, ya en 1957 (1), había observado que la morfina podía producir la inhibición de la respuesta nerviosa de determinados órganos periféricos, tales como el íleon. Este fenómeno ha sido analizado en la última década (2), comprobándose que la administración de morfina al cobaya previene la liberación de la acetilcolina. Dado que la capacidad de los agentes opiáceos de inhibir la liberación de este neurotransmisor en íleon de cobaya es exactamente paralela a la capacidad de producir analgesia en el hombre o en el animal de experimentación y que las drogas que bloquean los efectos de la morfina sobre el cerebro, tales como la nalorfina y la naloxona, bloquean también su acción sobre el íleon de cobaya (3, 4), se utilizó inicialmente este método como un ensayo biológico de los distintos derivados opiáceos.

Estos datos hicieron suponer que existían receptores para sustancias exógenas (agentes opiáceos). Dado que éstos se hallan codificados genéticamente, deberían existir ligandos endógenos que provocaran efectos similares a los descritos para la morfina y sus derivados. En 1975, Hughes y cols. (5, 6, 7) pudieron aislar e indentificar dos pentapéptidos a partir de cerebro porcino, observando que sus secuencias diferían solamente en el resto aminoacídico situado en posición carboxilo terminal (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH y H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH), por lo que los denominaron metionina-5-encefalina (Met-encefalina) y leucina-5-encefalina (Leu-encefalina) respectivamente (encefalina, del griego: "en

la cabeza"). Para comprobar su actividad opiácea desarrollaron un nuevo test biológico, ya que el plexo mientérico, aislado del íleon de cobaya, respondía a sustancias contaminantes presentes en las preparaciones de cerebro porcino. Este nuevo método se basaba en la capacidad que poseen la morfina y sus derivados de inhibir las contracciones inducidas eléctricamente sobre los vasos deferente del ratón, efecto que puede ser anulado por la naloxona, antagonista opiáceo (8).

De acuerdo con los resultados obtenidos por dichos autores (6), tanto la Met como la Leu-encefalina poseen una gran actividad como agonistas opiáceos, produciendo la inhibición de las contracciones inducidas eléctricamente en los vasos deferentes del ratón y en el plexo mientérico del ileón de cobaya. Estos efectos inhibitorios pueden ser antagonizados por la naloxona. La Met-encefalina mostró ser veinte veces más activa en vasos deferentes de ratón y equipotente a la normorfina (derivado sintético de la morfina) en íleon de cobaya. Mientras que la Leu-encefalina era dos y cinco veces menos potente, respectivamente, en dichos sistemas. Los resultados preliminares, obtenidos en estudios de desplazamiento de ^3H -naloxona del receptor estereoespecífico en homogenados de cerebro de cerdo libres de Na^+ , demostraron que la Met-encefalina es tres veces más potente que la morfina.

Es interesante destacar que la secuencia aminoácídica de la Met-encefalina se encuentra comprendida entre los residuos 61 y 65 de la β -lipotropina (β -LHP), polipéptido de 91 aminoácidos, aislado de glándulas hipofisarias ovinas (9), porcinas (10) y humanas (11), que posee actividad lipotrópica como la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la

hormona estimulante de los melanocitos (α y β -MSH) pero no opiácea.

Estos descubrimientos aumentaron el interés de diversos grupos por la posible existencia de otras sustancias endógenas con actividad opiácea. Así, en 1976, Li y Chung (12), durante el proceso de aislamiento de MSH de hipófisis de camello, detectaron un péptido de 31 aminoácidos, cuya secuencia se encuentra comprendida entre los restos 61 y 91 (C-terminal) de la β -LPH y que denominaron β -endorfi-
na, también conocida como "fragmento C". Meses más tarde, el mismo grupo describió el aislamiento y caracterización de un péptido similar en hipófisis humanas (13). Estos resultados fueron corroborados por Chrétien y cols. (14), al obtener el mismo producto de glándulas hipofisarias humanas y ovinas. Este péptido, que no posee prácticamente actividad hipolítica, es, sin embargo, tres veces más potente que la nomorfina en el ensayo de radiorreceptores (12) y, administrado por vía subcutánea al ratón, produce un efecto analgésico muy superior al de la morfina, aunque, al igual que ésta, causa dependencia física (15).

En ese mismo año, el grupo de Guillemin, en el Instituto Salk, consiguió aislar otros fragmentos de la β -LPH con actividad opiácea, la α -endorfina (61-76) y la γ -endorfina (61-77), a partir de preparaciones hipotalámicas y neurohipofisarias de cerdo (16). Sin embargo, estos péptidos no parecen ser sino artefactos producidos por la acción de enzimas sobre la β -LPH (17).

De los datos expuestos hasta el momento puede concluirse que la secuencia indispensable para poseer actividad opiácea es la de Tyr-Gly-Gly-Phe-X, donde X es un aminoácido hidrofóbico, tal como la

.. Met y Leu-encefalinas (figura 1ª).

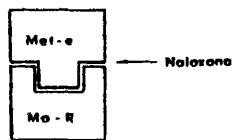
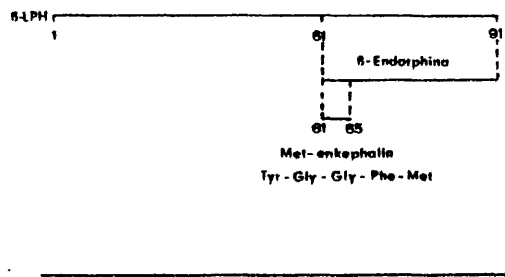


Figura Nº 1

I B. Determinación, distribución y función

Tras el aislamiento y caracterización de las encefalinas, el paso lógico en la investigación de estos péptidos opiáceos fue el desarrollo de métodos de determinación, tanto cualitativos (métodos inmunohistoquímicos y autorradiográficos) como cuantitativos (radioinmunoensayo), que han permitido el estudio de su distribución y, como consecuencia, el comienzo de estudios funcionales para tratar de comprender el papel fisiológico de estos opiáceos endógenos.

Yang y cols. (18) han estudiado la distribución de las Leu y Met-encefalinas en cerebro de rata por medio del radioinmunoensayo. Los anticuerpos para dichos péptidos se obtuvieron en conejo, ligándolos a hemocianina y polilisina, respectivamente. La reacción cruzada de estas inmunoglobulinas con el péptido homólogo fue aproximadamente del 10%. La distribución cerebral de ambas encefalinas es paralela, aunque la concentración de Met-encefalina es 8 veces superior a la de Leu-encefalina, salvo en cerebelo, donde la relación es de 3:1; las áreas que contienen mayor concentración de encefalinas son el núcleo estriado, hipotálamo y la médula espinal (18, 19).

Para eliminar los posibles errores debidos a la reacción cruzada de los anticuerpos con la encefalina homóloga a la específica para la que han sido obtenidos, los mismos autores examinaron la distribución de Met-encefalina en cerebro de rata por radioinmunoensayo, tras la separación de dichos péptidos por cromatografía líquida de alta presión, una vez que las encefalinas se extrajeron de las distintas estructuras

cerebrales por cromatografía de afinidad, utilizando el anticuerpo frente a Met-enkefalina (20). Los resultados muestran niveles altos en el núcleo estriado, siendo el globo pálido donde se halla la mayor concentración; en menor cuantía, la Met-enkefalina se distribuye también en las áreas hipotalámicas y núcleo supraóptico. Es importante destacar que la hipofisectomía no produce alteración alguna en las zonas examinadas (19, 20).

Sin embargo, Weber y cols. (21) observaron, mediante estudios histoquímicos en cortes de adenohipófisis de rata, la existencia de inmunorreactividad para Met-enkefalina en células productoras de hormona de crecimiento. Cuando las células adenohipofisarias se mantenían en cultivo por 10 días, la inmunorreactividad se localizaba en el mismo tipo de células, aunque con menor intensidad. Estos datos sugieren dos posibles explicaciones: a) las células somatotropas son responsables de la biosíntesis de Met-enkefalina, lo cual debe ser comprobado; b) esta enkefalina tiene un origen cerebral, pero se une de forma estable a un receptor intracelular, de manera similar a la de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH) en las células gonadotropas. Esta última hipótesis no contradice los resultados anteriormente expuestos.

También se estudiaron tras infusión de aminoácidos radioactivos ($^3\text{H-Gly}$ y $^3\text{H-Tyr}$) en el ventrículo lateral del cerebro, los centros que biosintetizan la enkefalina, siendo el núcleo estriado el que presenta mayor concentración de enkefalina tritiada. Este resultado confirma los datos previos sobre el alto contenido de neuronas encefalinérgicas en este área cerebral (22).

Simantov y cols. (23) han estudiado la distribución de estos péptidos opiáceos en el S.N.C. de la rata por métodos histoquímicos. Los anticuerpos utilizados se obtuvieron en conejo y cobaya, tras haber ligado las encefalinas a hemocianina y, aunque ambos presentan reacción cruzada, el correspondiente a Leu-encefalina en conejo posee una gran especificidad. Los resultados muestran que la inmunofluorescencia se halla ampliamente repartida a lo largo del cordón espinal, sugiriendo un papel analgésico (4, 33).

Al igual que por métodos radioinmunológicos, el globo pálido es el núcleo cerebral que presenta mayor reacción de fluorescencia. Las encefalinas también se encuentran distribuidas en el tallo cerebral (suelo del cuarto ventrículo y núcleo parabraquial), cerebro medio (sustancia gris que rodea el acueducto cerebral con algunas extensiones laterales en el tegumento del cerebro medio), tálamo (área dorsomedial, núcleo periventricular redondocelular, lámina interna medular y habénula medial), hipotálamo (porciones periventricular y ventral, infundíbulo); el núcleo central de la amígdala también presenta una considerable cantidad de encefalinas, así como los septos ventral y lateral. Estos datos ratifican los obtenidos por Elde y cols. (24) utilizando un anticuerpo frente a Leu-encefalina.

En muchas de las regiones descritas, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y por autorradiografía en cerebro de rata con ^3H -diprenorfina (potente antagonista opiáceo) y ^3H -etorfina (potente agonista opiáceo) (25), o en cerebro de simio con ^3H -dihidromorfina (agonista opiáceo) (25) muestran una íntima asociación. Es el caso, por

ejemplo, de la lámina dorsal del cordón espinal, tallo cerebral, núcleo del tracto solitario, núcleo comisular, parabraquial, habénula y globo pálido. Sin embargo, existen algunas discrepancias entre la localización de receptores opiáceos y encefalinas: a) los núcleos caudal y putamen, en los que se observa un alto contenido en receptores opiáceos, según métodos autorradiográficos y ensayo de radiorreceptores (26, 27), así como de encefalinas por radioinmunoensayo y ensayo de radiorreceptores (28) presentan una baja concentración de encefalinas (23) por inmunofluorescencia; b) el cortex cerebral posee considerables niveles de receptores opiáceos, detectados por ensayo de radiorreceptores (26, 27) así como por respuesta electrofisiológica a sustancias opiáceas y encefalinas (29). Sin embargo, se ha observado en esta zona una moderada concentración de encefalinas, por radioinmunoensayo y radiorreceptores (28), así como una respuesta muy débil por métodos histoquímicos (23); c) en el cordón espinal, se observó gran densidad de inmunofluorescencia en la materia gris y en el área que rodea el canal central (23) sin que se aprecien receptores opiáceos por métodos autorradiográficos (25); d) en amígdala, mientras que los resultados histoquímicos muestran una concentración de encefalinas en el núcleo central, los datos obtenidos por autorradiografía sugieren una distribución generalizada.

Las discrepancias entre la inmunofluorescencia para encefalinas y distribución de los receptores opiáceos, puede explicarse de varias formas. Una concentración de receptor desproporcionadamente alta respecto a la inmunofluorescencia puede ser debida a la localización presináptica

tica del mismo (25). En el caso contrario, la distribución puede ser inversa. Sin embargo, no hay que descartar el hecho de que las técnicas histoquímicas no son altamente precisas.

Dada la mayor dificultad en la obtención de muestras, los datos referidos al ser humano son bastante escasos. Gramsch y cols. (30) han determinado por medio de radioinmunoensayo la concentración de Met-enkefalina en 33 áreas cerebrales y en la glándula hipofisaria, utilizando muestras post-mortem humanas, habiendo obtenido anticuerpos muy específicos frente a Met-enkefalina-tiroglobina en conejo (19). Por lo que se refiere al cerebro, los niveles más altos de Met-enkefalina se encuentran en el globo pálido, núcleo caudal, sustancia negra y en el putamen. En menor concentración se localiza en el hipotálamo, núcleo periacueductal, sustancia gris, bulbo olfatorio, colículo superior y algunas áreas del tallo cerebral, siendo muy bajos los niveles en el núcleo amigdalario y en el tálamo. Tanto en el cortex cerebral como en el cerebelo no se detectaron concentraciones significativas. Estos datos confirman los previamente descritos por Childers y Snyder (31). Los autores estudiaron pacientes alcohólicos y drogadictos (opiáceo-dependientes), no observando variaciones importantes frente a los sujetos normales.

Como podemos observar, la distribución hallada por radioinmunoensayo y por métodos inmunohistoquímicos es similar, presentando las mismas discrepancias respecto a la concentración de receptores opiáceos y de Met-enkefalina en el cortex. La presencia de Met-enkefalina en la zona periacueductal del cerebro medio (30), así como en el líquido cerebroespinal (32), apoya la idea del papel analgésico de las encefali-

nas (4, 23).

Es importante destacar que la glándula hipofisaria humana presenta concentraciones muy superiores de Met-enkefalina a las encontradas en cerebro, siendo la parte anterior la que exhibe la máxima concentración; le siguen por orden de importancia el tallo hipofisario y la neurohipófisis (30). Este hecho confiere a la Met-enkefalina un posible papel como regulador de la secreción de esta glándula endocrina.

Como veremos más adelante, la Met-enkefalina endógena es muy inestable debido a la acción de proteasas específicas, así como por la oxidación espontánea del residuo C-terminal a metionina sulfóxido durante el proceso de almacenamiento, extracción y determinación de las muestras de plasma. Por ello Clement-Jones y cols. (34) desarrollaron un radioinmunoensayo para el análogo enkefalina metionina sulfóxido obteniendo en conejo anticuerpos frente a este antígeno, tras ligarlo a tiroglobulina bovina. La inmunoglobulina así obtenida no posee reacción cruzada con ninguno de los otros péptidos opiáceos. Por lo que respecta a las muestras, la extracción de las mismas se realizó en condiciones ácidas para minimizar la acción proteolítica y más tarde se oxidaron a metionina sulfóxido con peróxido de hidrógeno. Una vez obtenidas las condiciones idóneas de determinación, los autores estudiaron el posible ritmo nictemeral de la enkefalina en plasma humano, no observando variaciones entre muestras recogidas a las 9 a.m. y a media noche. Para determinar el origen de la Met-enkefalina circulante midieron muestras recogidas por cateterización en distintas zonas del cuerpo en pacientes con hirsutismo. Aunque a nivel venoso de Met-enkefalina entre

la yugular y la periferia no fueron distintos (aprox. 52 pg/ml), las muestras tomadas de la vena adrenal izquierda muestran una concentración de Met-enkefalina, afluyente de la adrenal, doble a la detectada anteriormente (116 pg/ml). Estos resultados sugieren que la enkefalina es segregada al plasma circulante por la glándula adrenal. Datos previos en rata, muestran niveles detectables por radioinmunoensayo (35) y estudios histológicos (36) en la zona medular de dicha glándula. Determinada la concentración por radioinmunoensayo en cortex y zona medular de glándulas adrenales humanas, se ha observado que esta última contiene 40 veces más enkefalina que la zona cortical (34).

Al igual que el sistema nervioso, el tracto gastrointestinal es conocido por ser uno de los centros receptores de las acciones de la morfina. El opio se utilizó durante siglos como remedio frente a la diarrea y la disentería sin conocerse su mecanismo de acción. Es sabido que la morfina causa constipación, reduce la motilidad estomacal, favorece la constricción del esfínter pilórico e inicialmente reduce la secreción de ácido clorhídrico. La denervación del estómago no altera dichos efectos, lo que indica que la morfina en este caso actúa de forma periférica. Por otra parte, esta droga produce una reducción de la secreción pancreática y biliar, y del peristaltismo de la vesícula biliar, incrementando el tono del esfínter de Oddi (37). Estos datos, junto con el hallazgo de péptidos opiáceos endógenos, llevaron a Polak y cols. (38) a estudiar por métodos inmunohistoquímicos la posible distribución de met-enkefalina en el tracto gastrointestinal humano usando un anticuerpo específico frente a dicho péptido. La zona que presenta mayor

actividad es la mucosa antral. Observaciones más precisas permitieron ver que la tinción con inmunoperoxidasa se localiza en las células secretoras de gastrina. Las fibras nerviosas del plexo mientérico de la vesícula biliar, las paredes del conducto cístico e intestino también presentan reacción con el anticuerpo frente a Met-encefalina. Estos resultados fueron corroborados por determinaciones radioinmunológicas del pentapéptido en extractos de dichas áreas.

La probable localización de Met-encefalina en las células productoras de gastrina de la mucosa antral puede ser la base para la interpretación de los efectos de los opiáceos sobre el estómago.

La amplia distribución de las encefalinas en el sistema nervioso y su paralelismo con la localización de los receptores opiáceos hace suponer que éstas, junto con las endorfinas, asumen el papel descrito hasta ahora para las sustancias opiáceas, dando lugar a investigaciones sobre sus posibles mecanismos de acción.

Los modelos más simples para dicho estudio, son los realizados en neuronas aisladas, aplicando las encefalinas por técnicas microiontoforéticas. Bradley y cols. (39) compararon los efectos de Met-encefalina y morfina en neuronas del tallo cerebral de la rata. Ambas producen una disminución de la actividad neuronal, siendo dicha acción bloqueada por la naloxona (antagonista opiáceo). Este mismo tipo de ensayo se realizó en los núcleos reticular gigantocelular y puente caudal de gatos, examinándose los efectos de Leu y Met-encefalinas frente a morfina (40). Las tres sustancias provocan un bloqueo parcial de los potenciales de acción de la mayoría de las neuronas estudiadas, tanto si dicha

actividad era espontánea, causada por ácido homocisteico o por estimulación dolorosa. La acción específica del ácido homocisteico sobre las membranas presinápticas sugiere que los efectos son producidos a nivel de membrana presináptica; en este caso la naloxona no bloquea la acción depresiva como sucede en la rata (39). Hill y cols. (29) observaron una disminución de la actividad de las neuronas en cortex cerebral, tálamo y médula caudal de ratas anestesiadas tras la aplicación de Met-enkefalina, tanto si los potenciales de acción se producían espontáneamente como si eran debidos a la administración de glutamato o de un estímulo doloroso. La naloxona bloquea, al menos parcialmente, la acción de la enkefalina. Estos efectos han sido descritos en núcleo estriado (41), núcleo caudal, sustancia gris periacueductal y formación reticular del mesencéfalo de rata (42, 43). Por el contrario en felinos la morfina y la Met-enkefalina producen la estimulación de las células de Renshaw del cordón espinal (44); siendo antagonizada dicha excitación por la naloxona.

Estos resultados sugieren que las encefalinas pueden ser neurotransmisores inhibidores en determinadas áreas cerebrales. De especial interés son los receptores específicos localizados en la región periacueductal de la sustancia gris, ya que estos juegan un papel importante en la acción analgésica de los opiáceos, tal como se ha comprobado por microinyección de morfina o análogos encefalinas (45, 46).

El mecanismo de acción de las sustancias opiáceas y encefalinas sobre la actividad neuronal no está claramente definido. El bloqueo de los potenciales de acción producidos por glutamato o ácido homocisteico

hacen pensar en una acción postsináptica (40, 41, 43). En este sentido, Zieglansberger y Bayerl (47) observan que los efectos depresivos de la actividad neuronal por microinyección de opiáceos en cordón espinal de gato, se producen sin hiperpolarización celular y sugieren que los opiáceos pueden actuar disminuyendo el influjo de iones sodio en la membrana postsináptica producido por el efecto estimulador de glutamato o acetilcolina.

Sin embargo, hay datos que abogan también por una acción presináptica de las encefalinas y, en general, de las sustancias opiáceas (48).

En íleon de cobaya, tanto la morfina como las encefalinas bloquean la liberación de acetilcolina producida por estimulación eléctrica (3, 4, 6). Esta acción ha sido también observada a nivel central, en córtex cerebral de rata in-vivo (49, 50). La naloxona antagonizó dichos efectos, aunque sólo de forma parcial cuando se utilizaron altas concentraciones de opiáceos (50). En experiencias in-vitro, se ha comprobado un efecto similar de las encefalinas sobre la liberación de noradrenalina en córtex cerebral de rata tras estimulación eléctrica o producida por una elevación de la concentración extracelular de potasio (52). En ambos casos la naloxona bloquea el efecto inhibitor de las encefalinas.

Dada la importancia de la transmisión dopaminérgica en el sistema negro-estriado y su elevado contenido en encefalinas, Pollard y cols. (53) estudiaron su posible interrelación. La degeneración específica de las terminaciones dopaminérgicas de la sustancia negra, por acción de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que produce una disminución del 80% en

la actividad de la enzima DOPA-decarboxilasa (cataliza la transformación de DOPA en dopamina), provoca igualmente una reducción del 30% en el número de receptores negro-estriatales para ^3H -Leu-enkefalina sin alterar la afinidad ligando-receptor. Estos resultados sugieren que una tercera parte de las neuronas dopaminérgicas son también encefalinérgicas en este sistema. Datos previos (54) muestran un efecto inhibitor de los opiáceos sobre la liberación de dopamina (DA) inducida por potasio en cortes de núcleo estriado de rata, indicando el posible papel inhibitor de las encefalinas sobre las terminaciones dopaminérgicas de este núcleo. Sin embargo, Moleman y Bruinvels (55), tras producir lesiones eléctricas unilaterales en la sustancia negra, observaron que la administración de morfina produce una disminución de DA en dicha zona sin alterar el lado contralateral del mismo núcleo, cuando se compara con ratas a las que se les inyectó solución salina. Los autores concluyen que la morfina provoca un aumento en la liberación de DA en el núcleo estriado, cuando la actividad de las neuronas negro-estriatales es inferior a la normal, considerando que dicha acción puede llevarse a cabo a través de receptores opiáceos presinápticos. Deyo y cols. (56) comprobaron que la morfina y la Leu-enkefalina aumentan el recambio dopaminérgico en el núcleo estriado, disminuyéndolo en córtex cerebral y eminencia media, lo que conlleva una disminución del tono dopaminérgico, sugiriendo que este puede ser el mecanismo por el cual las sustancias opiáceas favorecen la liberación de prolactina hipofisaria. La secreción de esta hormona se encuentra bajo el control inhibitor de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (57). En este sentido,

Gudelsky y Porter (58) observaron que tanto las encefalinas como la morfina reducen la concentración plasmática de DA en el tallo hipofisario, siendo éste un reflejo de la acción inhibidora de estas sustancias sobre la liberación de DA por las neuronas tuberoinfundibulares de la eminencia media. Estos efectos se producen a través de interacción con receptores opiáceos ya que son antagonizados por la naloxona (56, 58).

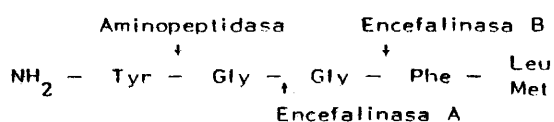
I C. Metabolismo

A partir de experiencias de incorporación de aminoácidos marcados existe evidencia de que la biosíntesis de encefalinas se produce a través de la síntesis ribosomal de un precursor peptídico de mayor peso molecular. Esto ha sido comprobado mediante la incorporación de ³H-tirosina a ambas encefalinas en plexo mientérico de íleon y en cortes de núcleo estriado de cobaya, observándose un aumento lineal del aminoácido tritiado en las encefalinas después de una o dos horas del comienzo del experimento (59, 60). La presencia desde el inicio del ensayo de puromicina o ciclohexamida bloquea por completo la biosíntesis; sin embargo, si estos inhibidores de la síntesis proteica se añaden al cabo de este período de tiempo, no afectan dicha síntesis, lo que hizo suponer que las encefalinas se originan en las neuronas a partir de un precursor. Esta hipótesis se ve apoyada por la obtención de péptidos mayores (5,000 - 100,000 daltons) en núcleo estriado de cobaya, rata y bóvidos (61), en cerebro de rata y de cerdo (62), en plexo mientérico de íleon de cobaya (63) y en médula adrenal bovina (64, 65); estos péptidos no poseen actividad opiácea por sí mismos, pero tras la digestión con tripsina se originan fragmentos que presentan dicha actividad. De médula adrenal bovina, se han purificado dos péptidos de 3 y 5,000 daltons; uno de ellos, contiene en su secuencia dos copias de Met-encefalina y el otro incluye en su estructura la de las dos encefalinas por lo que, presumiblemente, es un antecesor de ambas (66). Sin embargo, dado que todavía no se han establecido relaciones cinéticas

entre dichos péptidos y las encefalinas, no existen por el momento pruebas concluyentes que confirmen esta hipótesis.

En cuanto al catabolismo de estos pentapéptidos, parece claro que son degradados rápidamente en sangre y cerebro a metabolitos inactivos. Las encefalinas son prácticamente inoperantes cuando se administran de forma sistemática. Después de una dosis elevada de Met-encefalina por vía intravenosa sólo se observa una ligera analgesia durante 40-80 segundos (41). Una mayor analgesia se aprecia cuando las encefalinas se inyectan por vía intracerebral e intraventricular, aunque, una vez más, el efecto es muy corto; por vía cerebral es máximo a los 3 minutos e inapreciable después de los 5 minutos (41, 67). Este hecho contrasta notablemente con la dilatada acción de la morfina y de la B-endorfina (68).

La metionina y leucina encefalinas parecen actuar como neurotransmisores que interaccionan con receptores opiáceos. La mayoría de los neurotransmisores son inactivados después de la liberación sináptica por un proceso de recaptación o degradación enzimática. En el caso de las encefalinas no se ha observado el primer mecanismo; sin embargo, se han determinado en cerebro y plasma de rata y hombre tres actividades enzimáticas ligadas a membrana responsables de la rápida degradación de ambos pentapéptidos (69-74): 1) la aminopéptidasa que hidroliza el enlace peptídico $\text{NH}_2\text{-Tyr}^{\dagger}\text{-Gly}$, 2) la encefalinasa A que libera $\text{NH}_2\text{-Tyr-Gly-Gly-}$ y 3) la encefalinasa B que produce el fragmento $\text{NH}_2\text{-Tyr-Gly}$:



Incubando las encefalinas en presencia de muestras de plasma humano, de rata o de homogenados de cerebro de rata, Hambrook y cols. (69) comprobaron, mediante cromatografía de capa fina y subsiguiente análisis de aminoácidos de los productos obtenidos, que ambos pentapéptidos eran hidrolizados perdiendo el resto aminoacídico N-terminal (Tyr). Lane y cols. (70) observaron el mismo fenómeno en líquido cerebroespinal de rata.

Traficante y cols. (71) han purificado y caracterizado la enzima responsable partiendo de núcleo estriado de cerebro humano. El pH óptimo de esta aminopéptidasa es próximo al neutro (7.5), su peso molecular aparente es de 61,500 daltons y posee una $K_m = 64 \mu M$ respecto a la Met-encefalina. Es inhibida por agentes quelantes (O-fenilantrolina 85%, EDTA 20%); el ácido p-cloromercuribenzoico ($10^{-3} M$) que se une a grupos sulfhidrilos, inhibe su actividad en un 41% y el 2- β -mercaptoetanol ($10^{-3} M$) previene la oxidación de dicho radical, la aumenta en un 30%. Presenta un alto grado de especificidad por el enlace NH_2 -Tyr-Gly, ya que ligeras variaciones estructurales del substrato [Tyr-Gly-Gly-, Tyr-Gly, α -endorfina y (D-Ala²)-Met-encefalina] le hacen insensible a la enzima.

Por lo que se refiere a la encefalinasa A, durante mucho tiempo se pensó que era idéntica a la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) debido a que poseen la misma afinidad por varios péptidos, ambas son inhibidas por agentes quelantes y tienen además una distribución similar (72). Sin embargo, en ratones morfino-dependientes se observó un aumento de la actividad de la encefalinasa A que no fue

correspondido por la E.C.A. (73). El sodio, que inhibe a esta última, estimula por el contrario la E.C.A. (74). Durante el proceso de purificación de la encefalinasa A se comprobó la existencia de otra actividad enzimática distinta que ha sido denominada encefalinasa B.

Estas tres enzimas parecen ser las responsables de la degradación de las encefalinas y por tanto son parte importante del mecanismo de transmisión encefalinérgico.

1 D. Receptores opiáceos

Durante la última década se han ido acumulando datos que sugieren la existencia de más de un tipo de receptores opiáceos. Las primeras observaciones se basan en experiencias clínicas y neurofisiológicas realizadas en espina dorsal de perro, en las que se apreciaron curvas de dosis-respuesta bifásicas cuando la morfina era administrada en presencia de cantidades crecientes de nalorfina (antagonista parcial), postulándose que existían receptores distintos para estas dos drogas (75). Martín y cols. (76) demostraron la existencia de tres tipos de receptores opiáceos, para morfina, cetociclazocina y SKF-10047, dados los distintos efectos fisiológicos de dichos compuestos. Los receptores para estas sustancias fueron denominados μ , κ y α respectivamente. Estos datos fueron confirmados por bioensayos en íleon de cobaya y en vasos deferentes de ratón (77). Los receptores μ se encuentran predominantemente en íleon de cobaya, y median la acción de la morfina, mientras que los receptores κ son responsables de la acción de otra clase de narcóticos, cuyo prototipo es la cetozocina, ya que no sustituyen el efecto de la morfina en experiencias realizadas en monos morfino-dependientes. Estos receptores parecen estar distribuidos tanto en sistema nervioso central como periférico.

Lord y cols. (78), utilizando cuatro sistemas paralelos, íleon de cobaya, vasos deferentes de ratón y la inhibición de la unión al receptor en cerebro de cobaya de ^3H -naloxona o ^3H -naltrexona (antagonistas) y ^3H -leu-encefalina (agonista), por distintos derivados de morfina

y péptidos opiáceos (79), concluyen que en cerebro hay al menos dos tipos de receptores opiáceos: los μ , con los que interaccionan esencialmente la naloxona, naltrexona y morfina, y los receptores δ , que representan preferencialmente los lugares de unión para las encefalinas. Los receptores μ se encuentran en íleon de cobaya mientras que los δ se localizan fundamentalmente en los vasos deferentes de ratón, ya que en este último sistema los péptidos opiáceos son difícilmente antagonizados por naloxona, requiriéndose una concentración 10 veces superior a la utilizada para bloquear el efecto de la morfina. En el íleon de cobaya las encefalinas son menos potentes que en vasos deferentes, necesitándose menos naloxona que para antagonizar la morfina. Estos datos indican también que las encefalinas pueden interaccionar con los receptores μ , por los que poseen menor afinidad que por los δ . Este hecho ha sido corroborado por ensayos de radioreceptores en preparaciones de cerebro de cobaya (80), observándose que la capacidad máxima de unión de ambas encefalinas es de 6 pmol/g, frente a 4 pmol/g para dihidridomorfina. La amidación del carbono terminal en D-Ala²-Met-encefalina y D-Ala²-Leu-encefalina aumenta el número máximo de lugares de unión a 13-14 pmol/g, valor similar al observado para la etorfina, una de las drogas narcótico-analgésicas más potentes.

Por último, Wüster y cols. (81) han comprobado la existencia de un nuevo receptor opiáceo en vasos deferentes de rata (receptor E), que posee una alta selectividad por la β -endorfina. Este hecho ha sido corroborado por estudios de competición frente a este péptido opiáceo para inhibir la estimulación provocada eléctricamente sobre los vasos

deferentes de rata, observándose que tanto la morfina (receptor μ) como las Leu y Met-enkefalinas (receptor δ) son prácticamente inactivas frente a la acción de β -endorfina.

I E. Relación estructura-actividad de análogos de encefalinas: caracterización del derivado FK 33-824

Puesto que las encefalinas endógenas son muy sensibles a la acción degradativa de determinadas enzimas, se han realizado intensos estudios de transformación de la estructura de estos pentapéptidos para obtener derivados más estables. Entre los métodos para determinar la actividad de los análogos se han utilizado: ensayo in-vitro en vasos deferentes de ratón, íleon de cobaya, ensayo de radiorreceptores, así como pruebas de analgesia in vivo. Los datos obtenidos han revelado la importancia crítica que posee la longitud máxima de cinco restos aminoacídicos en la cadena. Así, el tripéptido Tyr-Gly-Gly, no posee actividad alguna (82, 67). Los tetrapéptidos, a los que les falta la metionina, la leucina, o una de las glicinas en posición 2 o 3 retienen tan sólo un 1% de la actividad del peptapéptido intacto (41, 83, 85, 82). El tetrapéptido resultante de la eliminación de metionina o leucina terminales mantiene una considerable capacidad de unión al receptor pero, sin embargo, posee muy poca actividad farmacológica (82, 84). La eliminación de la tirosina N-terminal provoca la inactivación total (69, 84), siendo éste uno de los mecanismos de degradación in vivo (69, 71). El aminoácido terminal es esencial, tanto para la unión al receptor como para mantener la actividad farmacológica de la encefalina (41, 69, 82, 84). La eliminación de los grupos amino o hidroxilo de la tirosina supone la inactivación del péptido (69, 82, 85). Igualmente, es necesaria la cadena aromática de la fenilalanina en posición 4 (82, 84), de

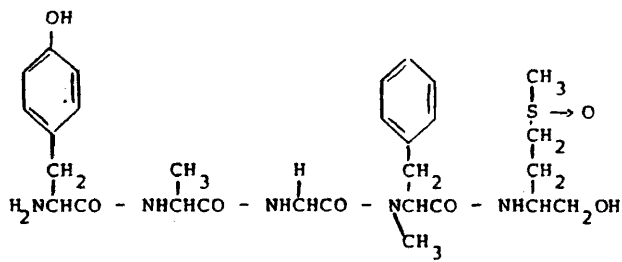
forma que su sustitución por tirosina, D-fenilalanina o ciclohexilos análogos implica la pérdida de actividad (82, 84). De estos datos se deduce que las posiciones relativas de los anillos aromáticos de tirosina y fenilalanina son críticas, ya que el acortamiento o la extensión de la distancia entre ambas, por eliminación de una glicina o la adición de una tercera, resulta en una pérdida de la capacidad de unión al receptor y de la actividad farmacológica (82, 84).

La sustitución de Gly² o Gly³ por L-alanina supone pérdida de actividad (84), mientras que la de Gly² por D-alanina² provoca un gran aumento de la misma (82, 84). Este hecho es debido a la protección del enlace peptídico Tyr¹-Gly². La sustitución de ambas glicinas por D-alanina es inefectiva, debido probablemente a la pérdida de la conformación espacial (82, 84). Al igual sucede con el cambio de Tyr¹ por D-Tyr¹ o Met⁵ por D-Met⁵ (86). Roemer y cols. (87) han estudiado las propiedades analgésicas de derivados de Met-enkefalina en ratón, así como las características de unión a receptores opiáceos en homogenados de cerebro de rata. Tras administrar los análogos por vía intracerebroventricular (I.C.V.) observaron un aumento de la actividad nociceptiva al sustituir el grupo carboxilo terminal por carbinol (Met⁵-ol), el residuo de glicina en posición 2 por D-Ala (D-Ala², Met⁵) y al combinar ambas modificaciones (D-Ala², Met⁵-ol). Este último derivado muestra una actividad prolongada, tanto por vía subcutánea como por vía intravenosa o I.C.V. Sin embargo, el análogo (D-Ala²-Met⁵) es solamente activo por la última. La oxidación del sulfuro a sulfóxido en el resto Met⁵ [D-Ala²-Met (O)⁵-O] y la N-metilación de la

fenilalanina definen un derivado de Met-enkefalina, el FK 33-824 [Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Met] (0)⁵-ol] figura 2ª, que produce analgesia inclusive por vía oral. El FK 33-824 es, basado en el cálculo molar de las concentraciones, aproximadamente 30,000 y 1,000 veces más activo que la Met-enkefalina y morfina, respectivamente, tras administración I.C.V. y 23 veces más potente que la β -endorfina. La duración de la acción analgésica de este derivado de Met-enkefalina depende no sólo de la especie, sino de la vía de administración (88). En ratón, usando un ensayo de resistencia al calor, el FK 33-824 fue dos veces más potente que la morfina cuando se inyectó subcutáneamente, pero 3-4 veces menos activo que la misma por vía oral. En rata, utilizando el ensayo de estimulación eléctrica, el FK 33-824 fue 7 veces más potente que la morfina inhibiendo la actividad motora y dos veces menos activo inhibiendo la vocalización. Administrado por vía rectal produce analgesia, mientras que la morfina, en dosis doble (100/Kg), es inactiva. En ratón, la naloxona, en dosis bajas, bloquea parcialmente la acción de ambos opiáceos.

En ratones morfino-dependientes, el efecto analgésico del FK 33-824 y de la morfina frente a la estimulación calorífica es muy reducido cuando se compara con el producido en animales no dependientes. Este hecho presupone una reacción cruzada entre ambas sustancias.

Los mismos autores observaron que el bloqueo del cuarto ventrículo cerebral en conejo provoca la abolición de la acción de dichas drogas administradas por vía I.C.V., mientras que el bloqueo del tercer ventrículo no afecta la actividad analgésica de ambas.



(Tyr - DAla - Gly - MePhe - Met(O)-ol)

Estructura del FK 33-824

Figura N° 2

La inyección de dosis elevadas de FK 33-824 en el cuarto ventrículo produce también aquinesia, caracterizada por una marcada rigidez muscular. En contraste, la morfina no posee dicho efecto, lo que indica la existencia de distintos sitios de acción para los dos compuestos. La rigidez muscular, causada por el FK 33-824, es similar a la producida por la β -endorfina (89). En rata, tras su administración I.C.V., este derivado de Met-enkefalina es 46 veces más potente que la β -endorfina para provocar aquinesia. A dosis bajas, la naloxona bloquea dicho efecto, mientras que se necesitan cantidades muy elevadas de apomorfina para revertir dicho efecto; sin embargo, dada la gran dosis utilizada es difícil indicar si existe o no interacción del FK 33-824 con las vías dopaminérgicas (90).

Hay otras similitudes entre las acciones farmacológicas de la β -endorfina y las de este péptido opiáceo. Ambas drogas causan un efecto analgésico de larga duración (87, 91), aunque como se indicaba antes, el FK 33-824 es más potente. Las dos sustancias causan dependencia física (87, 89, 15) y exhiben reacción cruzada con la morfina. Además, estos opiáceos producen una marcada estimulación de la secreción de prolactina y hormona de crecimiento en rata (92).

Como consecuencia de las transformaciones introducidas en la molécula de Met-enkefalina para la obtención del FK 33-824, también se ha alterado su afinidad por los distintos receptores opiáceos y por tanto sus propiedades farmacológicas. Estudiada la interacción con dichos receptores por ensayos de competición en preparaciones de cerebro de rata, Kwen-Jen y cols. (93) observaron que el FK 33-824 se une con

mayor afinidad al receptor marcado con ^3H -naloxona o ^3H -dihidromorfina que al receptor de encefalinas, determinado por la unión de ^{125}I -D-Ala², D-Leu⁵-encefalina. Por otra parte, cuando se utiliza este análogo tras incorporación de ^{125}I en la posición "para" del anillo de tirosina, se comprueba que el orden de potencias relativas en el desplazamiento de ^{125}I -FK 33-824 es: morfina > naloxona > [D-Ala², Leu⁵]-encefalina > [Met⁵]-encefalina > [Leu⁵]-encefalina, siendo similar el encontrado para ^3H -naloxona y ^3H -dihidromorfina.

La unión al receptor es esteroespecífica, ya que el ligando es desplazado por lervofonol mientras que se necesitan concentraciones muy superiores de dextrofan y es saturable con características semejantes a las apreciadas para ^3H -dihidromorfina. Kream y Zukin (94), observaron también saturación y esteroespecificidad en la unión del ^{125}I -FK 33-824 al receptor de cerebro de rata. Sin embargo, al representar los datos por el sistema de Scatchard, comprobaron la existencia de dos receptores por los que posee gran afinidad. Tras realizar estudios de competición con ^{125}I -FK 33-824, ^3H -naloxona, ^3H -dihidromorfina y ^3H -D-Ala²-encefalina como trazadores, llegaron a la conclusión de que este derivado de Met-encefalina reconoce de forma muy similar tanto los receptores μ como los δ .

Wüster y Herz (81) han estudiado la actividad de diferentes agentes opiáceos por tres bioensayos diferentes: íleon de cobaya (receptor μ), vasos deferentes de ratón (receptor δ) y vasos deferentes de rata (receptor ϵ). El FK 33-824 muestra las siguientes potencias relativas respecto a estos tres sistemas: 1/6.1/52.

De los datos expuestos puede deducirse que este análogo posee preferencia por los receptores μ , sensibles a naloxona, morfina y sus derivados aunque puede también interaccionar con los δ , característicos de las encefalinas.

La distribución de los receptores μ y δ en cerebro de rata (93) es tal que: 1) córtex y núcleo estriado, poseen cantidades similares de ambos; 2) en sistema límbico la proporción es de 1:2; y 3) en tálamo e hipotálamo existe una elevada concentración de receptor μ con respecto a los δ (4:1). Por último, hay que tener en cuenta la existencia de receptores ϵ en la hipófisis, con los que el FK 33-824 también puede interaccionar. Estos resultados sugieren una acción reguladora de la encefalina sobre la secreción de hormonas pituitarias bajo control hipotalámico (57).

2'

II MOTIVO DE LA TESIS DOCTORAL

II MOTIVO DE LA TESIS DOCTORAL

Dada la amplia distribución de receptores opiáceos y encefalinas en cerebro, hipotálamo e hipófisis (18-30), así como su acción sobre la transmisión neuronal (20, 39-56), puede calificarse a estos pentapéptidos como neuromoduladores o neurotransmisores putativos. Estos datos soportan el posible papel que juegan las encefalinas como reguladores del sistema endocrino. Para confirmar este hecho en el ser humano se ha investigado el efecto de un derivado muy estable de la Met-encefalina, el FK 33-824 (88-94), sobre la secreción de prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), luteotrofina (LH), adrenocorticotrofina (ACTH) y cortisol.

Para poder realizar un diseño correcto de los experimentos hay que tener en cuenta que, en principio y de forma general, pueden establecerse tres tipos de ritmos secretorios hormonales. El primero hace referencia a las variaciones de los niveles hormonales a lo largo de la vida; un ejemplo típico, serían las hormonas sexuales femeninas. En segundo lugar, también pueden apreciarse en muchos casos ritmos nictemerales; éste es entre otros, el perfil secretorio de la prolactina, que presenta un máximo alrededor de las 3 a.m. para disminuir lentamente en la mañana. Este tipo de ritmos es complejo, ya que en determinados casos está influenciado por los ciclos de luz-oscuridad y en otros, por los de sueño-vigilia, caso este último de la secreción de hormona de crecimiento. Por último, hay determinadas hormonas en cuyos perfiles secretorios se puede apreciar el denominado "ultrarritmo", es

decir que las variaciones diarias de sus niveles circulantes no son continuas, sino que se producen como una sucesión de cambios bruscos y rápidos, o pulsos. Este último tipo de perfil secretorio es el definido para la hormona luteinizante. No se puede terminar esta reseña de los ritmos secretorios sin hacer referencia a los cambios observados durante los ciclos reproductivos de las hembras, en los que, a todos los datos expuestos, hay que añadir las marcadas variaciones hormonales observadas a lo largo de los mismos (95, revisión general). Como es lógico suponer, todas las oscilaciones citadas se interrelacionan, hecho que debe ser considerado a la hora de establecer un protocolo de trabajo, y han de ser tenidas en cuenta para poder determinar el posible papel regulador que juegan, por ejemplo, las encefalinas sobre la secreción hormonal.

Considerando los datos citados, se establecieron dos tipos de experimentos: 1) diurnos, que comenzaron siempre a las 8 de la mañana y, 2) de sueño nocturno. Por lo que se refiere a las personas que tomaron parte en dichas pruebas, se mantuvo en todos los protocolos de investigación la homogeneidad de sexo para evitar interferencias inherentes a la fisiología.

Deyo y cols. (56), así como Gudelsky y Porter (58) han comprobado que en rata, tanto las encefalinas como la morfina reducen los niveles plasmáticos de dopamina (DA) en el tallo hipofisario. Enjalbert y cols. (96) observaron que la morfina bloquea el efecto inhibitor de la DA sobre la secreción de prolactina en cultivos adenohipofisarios de rata. En el ser humano, Totis y cols. (97) comprobaron que la morfina

produce un aumento de los niveles plasmáticos de PRL y GH y una disminución del cortisol.

Estos datos nos han llevado a estudiar el efecto del FK 33-824 y de la naloxona sobre la secreción de PRL y GH, así como la posible interacción entre vías de transmisión dopaminérgicas y encefalinérgicas, por estimulación y bloqueo de las primeras con bromocriptina (agonista dopaminérgico) y títetilperazina (derivado de la fenotiazina que actúa como antagonista dopaminérgico), tras la estimulación o el bloqueo de las vías encefalinérgicas con FK 33-824 y naloxona, respectivamente.

Para comprobar el posible papel fisiológico de los receptores opiáceos sensibles a naloxona en el control de la secreción de PRL y GH, se realizó un estudio de sueño (nocturno), situación en la que se produce la hipersecreción de PRL y GH. Durante el mismo se infundió naloxona, determinándose las variaciones con respecto al perfil basal de las concentraciones plasmáticas de dichas hormonas. En este mismo sentido, se estudiaron también varias pacientes con hiperprolactinemia tras administración aguda diurna de naloxona.

Por lo que se refiere a la acción del FK 33-824 sobre la secreción de LH, existen datos contradictorios. Stubbs y cols. (98), observaron que la administración aguda de este pentapéptido por vía intramuscular provoca la inhibición de la LH y de la hormona folículo-estimulante (FSH). Sin embargo, del Pozo y cols. (99), en condiciones similares, no apreciaron variaciones significativas en los niveles plasmáticos de ambas hormonas. Por otra parte, la morfina inhibe la elevación de la LH en la rata en proestro (100), sugiriendo un efecto sobre el

hipotálamo (101, 102). Esta inhibición fue antagonizada por la naloxona (103). Estos resultados hacen pensar en una función reguladora de los opiáceos sobre la secreción de la LH a través de un mecanismo supraselar. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un estudio de competición entre FK 33-824 y LH-RH. Por otra parte, dado que la secreción de LH es pulsátil (95), se ha investigado el efecto de ese derivado de la Met-enkefalina sobre el ritmo secretorio de dicha hormona, tras su infusión; en el caso de que la infusión de FK 33-824 inhibiese la pulsatividad de LH y a la vez produjera una elevación de la PRL, habría que estudiar si la inhibición no se debe a la hiperprolactinemia producida, como se ha comprobado en individuos normales tras la administración de la hormona liberadora de la tirotrófina (TRH) en la hiperprolactinemia patológica (104). Para ello habría que pretratar con bromocriptina para suprimir la hiperprolactinemia provocada bajo la infusión de FK 33-824.

Para terminar este apartado, se ha analizado la acción de los receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la secreción pulsátil de LH durante el sueño nocturno.

La última sección de esta tesis doctoral se refiere al efecto del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y cortisol. Los datos de que se dispone, muestran una acción inhibitoria de esta encefalina sobre dichas hormonas (98, 99), pero no permiten localizar su centro de acción, es decir, si ésta tiene lugar a nivel hipofisario o supraselar; además no se puede descartar un efecto concomitante sobre la glándula adrenal. Para caracterizar el mecanismo de acción del FK 33-824 sobre el eje

ACTH-adrenal, se propuso un estudio en sujetos normales usando la lisina-vasopresina (LVP) como agente liberador del ACTH (105). La arginina-vasopresina, péptido endógeno, posee propiedades liberadoras de ACTH (CRF, corticotropin releasing factor) (106, 107) y la LVP produce el mismo efecto que el péptido endógeno (107). En una segunda parte del experimento, se estimuló la producción de cortisol adrenal mediante la administración de ACTH β^{1-24} , análogo sintético de la ACTH endógena, que sólo contiene los 24 primeros aminoácidos, que son los indispensables para su acción.

Antes de pasar a desarrollar los protocolos establecidos, es necesario hacer una serie de consideraciones generales. Puesto que los estudios se realizaron en seres humanos, se han observado una serie de normas éticas y profesionales. Los diseños experimentales fueron sometidos a las críticas de una comisión científica, de los Laboratorios Sandoz, S.A. (Basilea, Suiza), lugar de la investigación y revisados por el Prof. U.C. Dubach de la Facultad de Medicina de la Universidad de Basilea. Los estudios fueron realizados de acuerdo con las normas establecidas en la declaración de Helsinki (Registro Federal 40:16056, 1975).

En todos los casos, las sustancias placebo y las distintas drogas se administraron de forma aleatoria, distanciándose dichas administraciones en, al menos, una semana. Cuando los estudios se realizaron en mujeres, se esperó hasta el mismo día del siguiente ciclo menstrual.

III MATERIAL Y METODOS

III A. Sustancias

III A.1. FK 33-824

Es un pentapéptido sintético, muy estable, derivado de la Met-enkefalina endógena (figura 2), producido por los Laboratorios Sandoz S.A. (Basilea, Suiza), que posee una gran afinidad por receptores opiáceos (86-94). El FK 33-824 se encuentra preparado en ampollas de 2 ml de una solución Manitol (52 mg/ml) en agua destilada. El contenido en péptido es de 1 mg/ml. La solución de manitol sólo es la empleada como placebo de la enkefalina.

III A.2. Naloxona

La Naloxona (Narcan[®], Winthrop S.A., Basilea, Suiza) es el clorhidrato de N-alilnoroximorfano. Este fármaco posee propiedades antagonistas de la morfina a través de una gran afinidad por receptores opiáceos (93, 94). La naloxona no produce dependencia, teniendo una acción muy rápida y de corta duración (108), no habiéndose descrito efectos secundarios. Todas estas características hacen que se utilice como un antídoto frente a agentes opiáceos (109). Esta sustancia viene envasada en ampollas de 1 ml que contienen 0.4 mg de principio activo.

III A.3. Bromocriptina

La bromocriptina (Parlodel[®], Sandoz S.A., Basilea, Suiza) es el mesilato de la 2-bromo- α -ergocriptina. Este fármaco es un potente

agonista de la dopamina, lo que le confiere una gran utilidad como agente inhibidor de la prolactina (57). En este trabajo se han empleado tabletas que contienen 1 mg de producto activo.

III A.4. Tietilperazina

La tietilperazina (Torecan[®], Sandoz S.A., Basilea, Suiza) es un derivado de la fenotiazina, antagonista de la dopamina (57). Este producto viene envasado en ampollas que contienen 6.5 mg.

III A.5. Lisina-vasopresina (LVP)

Es un nonapéptido sintético (Vasopresina[®], Sandoz S.A., Basilea, Suiza), derivado de la arginina-vasopresina (péptido endógeno) en el que la arginina en posición 8 ha sido sustituida por lisina. La LVP viene envasada en ampollas de 1 ml, que contienen 5 UI (unidades internacionales).

III A.6. ACTH β^{1-24}

Es un derivado sintético (Sinacten[®], Ciba Geigy S.A., Basilea, Suiza) de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Contiene solamente los primeros 24 aminoácidos de la secuencia total de 39 de la hormona endógena, ya que los restantes no son necesarios para su actividad biológica. El sinacten se presenta en ampollas de 1 ml que contienen 0.25 mg de ACTH α^{1-24} .

III A.7. LH-RH

Es un undecapéptido de síntesis (LH-RH[®] Roche, Basilea, Suiza), similar al péptido endógeno hipotalámico, liberador de la hormona luteinizante. El contenido de la solución acuosa de ampollas de 2 ml es 100 mg.

III B. Metodología

III B.1. Estudios diurnos:

III B.1.a. Efecto del FK 33-824 y de la naloxona sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento

En el estudio participaron catorce varones normales, cuya medida de edad era de 30 años. Tras doce horas de ayuno se les colocó un catéter en la vena cubital (8 de la mañana). Los voluntarios permanecieron acostados durante el experimento, no permitiéndoles ingerir alimento. Con una distribución aleatoria, cada uno de ellos fue sometido, con una semana de intervalo, a los siguientes tratamientos: a) inyección intravenosa (i.v.) 10 ml e intramuscular (i.m.) 0.5 ml de suero salino; b) 4 mg de naloxona por vía i.v. y 0.5 ml de suero salino por vía i.m.; c) administración de 10 ml de suero salino (i.v.) seguida de 0.5 mg de FK 33-824 (i.m.); y, d) inyección de 4 mg de naloxona (i.v.) y 0.5 mg de FK 33-824 (i.m.).

El momento de la administración (i.m.) del suero salino o de la encefalina fue considerado como tiempo cero minutos (9 de la mañana). La inyección de naloxona precedió en 5 min. a la de FK 33-824.

Se realizaron tomas de sangre (6 ml por toma) por medio del catéter a -15, 0, 15, 30, 45, 60, 120 y 180 min. (ver esquema 1^o), se centrifugaron ($1.500 \times g$ a $4^{\circ}C$ durante 15 min.), separándose a continuación el plasma que se mantuvo congelado a $-20^{\circ}C$ hasta el momento de la determinación radioinmunológica de PRL y GH.

La evaluación estadística de los resultados se efectuó por integra-

Esquema n° 1

Efecto del FK-33-824 y Naloxona sobre la secreción de PRL y GH

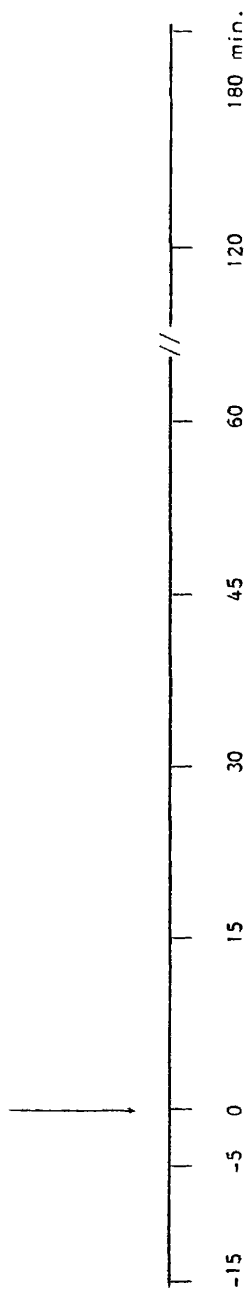
a) suero salino (i.m.)

b) suero salino (i.m.)

c) FK 33-824 (0.5 mg, i.m.)

d) FK 33-824 (0.5 mg, i.m.)

n = 14



ción del área bajo los perfiles hormonales, comparándose los valores obtenidos para los distintos tratamientos por medio del test de Wilcoxon.

III B.1.b. Estudio del efecto de la interacción entre vías de transmisión dopaminérgicas y encefalinérgicas sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento

Para evaluar esta interacción en el ser humano ocho varones normales se sometieron, con al menos una semana de intervalo, a los siguientes tratamientos en un orden aleatorio: a) control basal; b) administración oral 1 mg de bromocriptina tres veces el día precedente, tomando la última dosis a las 7 de la mañana, 2 horas antes de la inyección por vía i.m. de 0.5 mg de FK 33-824 (tiempo "cero"). A las 8 se canuló a los voluntarios en la vena cubital, después de lo cual permanecieron acostados hasta el final de la prueba. Se tomaron muestras de sangre (6 ml por toma) en tubos heparinizados a -5, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min. (esquema 2º).

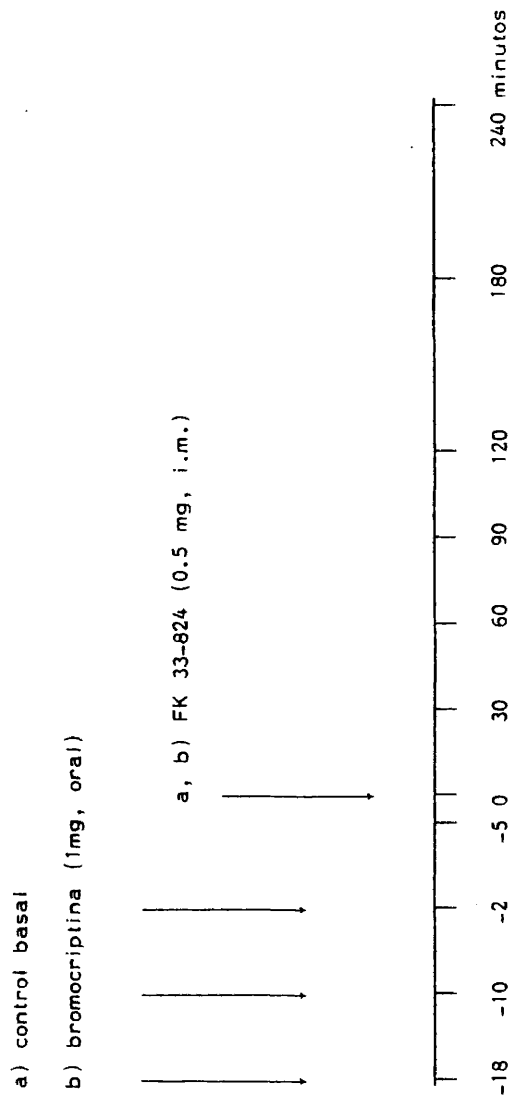
En una segunda parte de este proyecto estos ocho individuos, siguiendo las directrices ya expuestas, recibieron: a) 0.5 mg de FK 33-824 por vía i.m.; b) se repitió el protocolo anterior (a), 5 min. después de la administración por vía i.v. de 4 mg de naloxona; c) inyección i.v. de 3.25 mg de tetilperazina; d) el mismo tratamiento anterior (c) precedido en 5 min. de una inyección i.v. de 4 mg de naloxona. La administración de FK 33-824 y de tetilperazina marcaron el tiempo "cero" de la prueba. Se tomaron muestras de sangre a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min. (ver esquema 3º).

Los plasmas se obtuvieron tras centrifugación de las muestras y se conservaron a -20°C hasta el momento de la determinación radioinmunológica de PRL o GH.

Esquema nº 2

Interacción entre vías dopaminérgicas y opiáceas sobre la secreción de PRL y GH

n= 8



Esquema n° 3

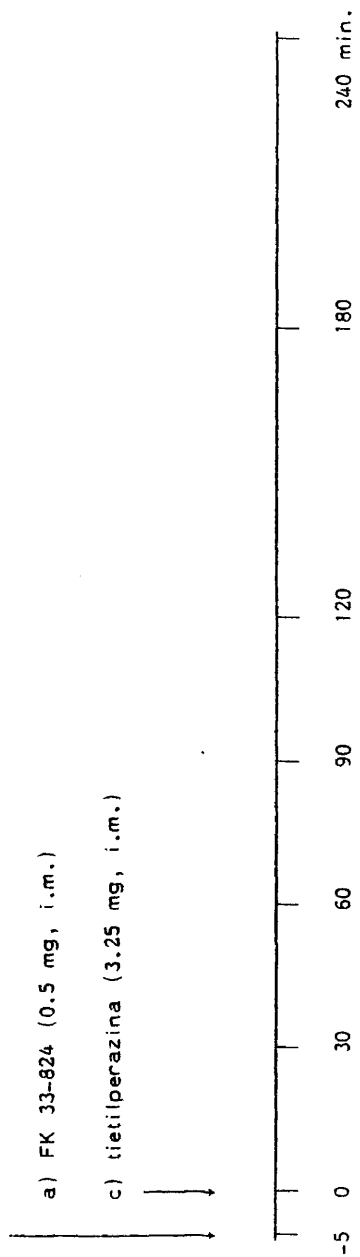
Interacción entre vías dopaminérgicas y opiáceas sobre la secreción de PRL

n= 8

b, d) naloxona (4 mg, i.v.)

a) FK 33-824 (0.5 mg, i.m.)

c) tietilperazina (3.25 mg, i.m.)



Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de un test de Student para pares, usando los valores acumulativos basales y los derivados de la integración de las áreas descritas por los perfiles hormonales.

III B.1.c. Efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la hipersecreción patológica de prolactina

A cuatro enfermas con hiperprolactinemia, dos de ellas afectadas de un tumor hipofisario productor de prolactina se les administró por vía i.v. 4 mg de naloxona a cero minutos, tomándose muestras de sangre a -15, 0, 15, 30, 45 y 60 min., determinándose a continuación las concentraciones plasmáticas de PRL.

III B.1.d. Estudio del efecto de la interacción entre LH-RH y FK 33-824 sobre la secreción de hormona luteinizante

Ocho individuos normales tomaron parte en este estudio. Tras recogerse dos muestras basales a -15 y 0 min., se inyectaron por vía i.m. 200 mg de LH-RH en condiciones basales o, tras la administración i.m. de 0.5 mg de FK 33-824, con una semana de intervalo, haciéndose tomas de sangre (6 ml) a 15, 30 y 60 min. después de la inyección del opiáceo. Los plasmas que se obtuvieron tras la centrifugación de las muestras, se guardaron a -20°C hasta la determinación radioinmunológica de las concentraciones de LH (esquema nº 4).

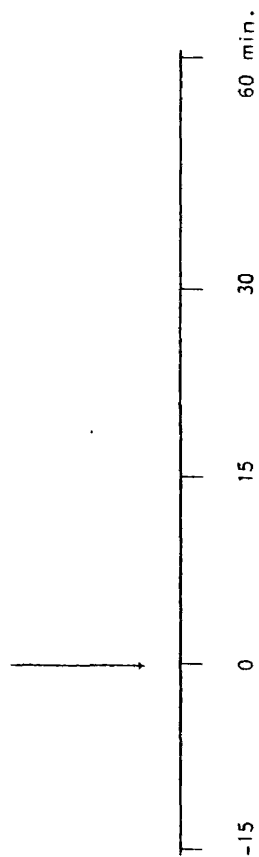
Esquema nº 4

Estudio de la interacción entre LH-RH y FK 33-824 sobre la secreción de LH

n = 8

a) LH-RH (200 µg, i.m.)

b) FK 33-824 (0.5 mg, i.m.) + LH-RH (200 µg, i.m.)



III B.1.e. Efecto del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de la hormona luteinizante

En este estudio tomaron parte ocho mujeres, que se encontraban en perfecto estado de salud, no habiendo recibido en las cuatro semanas precedentes al mismo ninguna medicación. Dichas personas estaban en edad reproductiva (20-40 años; 50-80 Kg de peso). Los diversos experimentos que compusieron el estudio se realizaron durante la fase folicular de ciclo menstrual (uno por ciclo) con una distribución aleatoria: a) control basal; b) infusión de FK 33-824 (0.01 mg / Kg / h x 4 horas); y, c) se repitió el apartado anterior (b), infundiendo simultáneamente naloxona (1 mg / h x 4 horas) (n=6) (esquema nº 5).

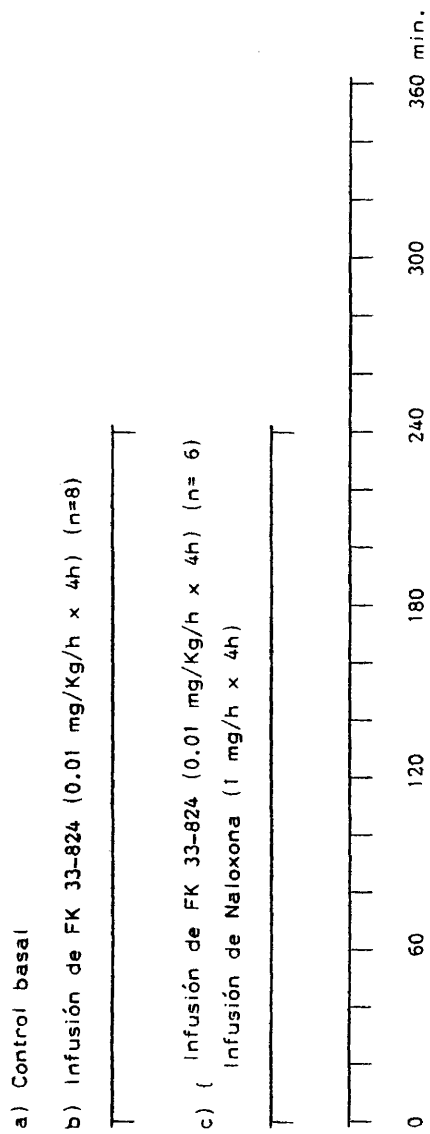
En otro ensayo, se investigó si el efecto del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de LH, era mediado por la hiperprolactinemia producida por este péptido opiáceo. Para ello, se repitió la infusión en siete personas pretratadas con bromocriptina (3 x 1 mg / día) (esquema nº 6).

Puesto que en esta fase del ciclo menstrual se produce un pico pulsátil completo cada 2.5 - 3 horas, se tomaron muestras de sangre cada 20 min. durante 6 horas, determinándose por radioinmunoensayo las concentraciones plasmáticas de LH y PRL.

Para estimar las variaciones de la secreción de base de LH, se calculó la línea de regresión de los puntos que forman las bases de los picos secretorios, integrándose a continuación las áreas comprendidas entre los perfiles hormonales y las líneas de regresión. Las diferencias se estimaron estadísticamente por medio de un test de Student para pares, tomando como parámetro el valor de la tangente de la línea de

Esquema nº 5

Efecto del FK 33-824 sobre la secreción de LH



Efecto del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de LH

n = 7

Pretratamiento con bromocriptina (3 x 1 mg / día)

Infusión de FK 33-824 (0.01 mg / Kg / h x 4h)



regresión formada por los valores de base.

III B.1.f. Estudio de la acción inhibidora del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y cortisol

Para tratar de elucidar el mecanismo de acción del FK 33-824 sobre el eje ACTH-adrenal, se ha realizado el presente estudio que puede dividirse en dos apartados. El primero consiste en una prueba de estimulación directa sobre la hipófisis, utilizando la lisina-vasopresina (LVP) como agente estimulador de la liberación de ACTH. Este péptido es un análogo sintético de la arginina-vasopresina, péptido endógeno, que ha demostrado poseer propiedades como factor liberador de ACTH (C.R.F.) (106, 107). Por otra parte, Brownell y cols. (110) han demostrado que la administración de FK 33-824 disminuye a límites indetectables los niveles en orina de la vasopresina endógena, de forma que la exógena administrada es la responsable del efecto estimulador sobre ACTH. En una segunda fase del experimento se ha realizado adicionalmente una prueba directa de estimulación adrenal administrando un análogo sintético de ACTH, ACTH β^{1-24} (Sinacten[®]).

Krieger y Zimmermann (105), han comprobado que la inyección por vía i.v. o i.m. de 5 U.I. de LVP produce, en individuos normales, un aumento de los niveles plasmáticos de ACTH y cortisol al cabo de 15 y 30 min. Por otra parte, se ha observado que la inyección por vía i.m. de 0.5 mg de FK 33-824 produce una disminución continua de las tasas circulantes de cortisol entre 30 y 180 min. tras la administración de la encefalina.

Teniendo en cuenta estos datos se han llevado a cabo los siguientes estudios en ocho varones normales con edad media de 28 años. Después de 12 horas de ayuno, se les colocó un catéter en la vena cubital a las 8 de la mañana, permaneciendo acostados y sin ingerir alimentos durante el desarrollo de las pruebas a las que fueron sometidos con al menos una semana de intervalo, recibiendo con una distribución aleatoria: a) una inyección por vía i.m. de 0.5 ml de suero salino a tiempo cero (8 de la mañana), seguida a los 60 min. de la administración i.m. de 5 U.I. de L.V.P.; b) se repitió el mismo protocolo sustituyendo el suero salino por 0.5 mg de Fk 33-824; y, c) una inyección de 0.25 mg de ACTH β^{1-24} por vía i.m. 60 min. después de la administración i.m. de 0.5 ml de suero salino a tiempo cero, o (d) de 0.5 mg de FK 33-824. Estos dos últimos apartados se realizaron en seis de los ocho voluntarios citados. Se recogieron muestras de sangre a 0, 30, 60, 75, 90, 120, 180 y 240 min., extrayéndose los plasmas por centrifugación, conservándose a -20°C hasta la determinación radioinmunológica de las concentraciones de ACTH y cortisol (esquemas nº 7 y 8).

III B.2. Estudio durante el sueño nocturno: Efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la secreción de prolactina, hormona de crecimiento y hormona luteinizante

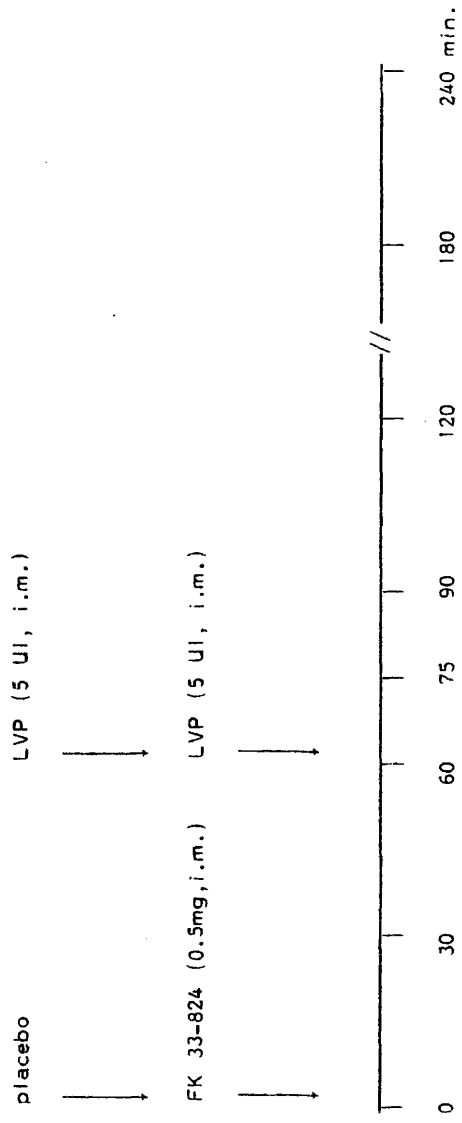
En este experimento tomaron parte diez voluntarios masculinos normales cuyas edades oscilaban entre los 22 y 32 años. El estudio

Esquema nº 7

Estudio de la acción inhibitoria del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y Cortisol

Test hipofisario

n = 8

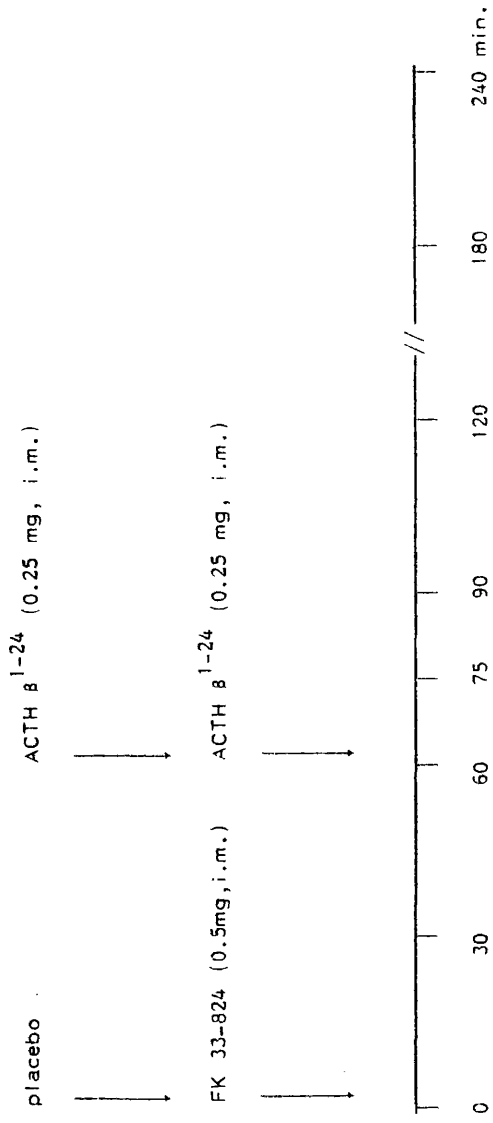


Esquema nº 8

Estudio de la acción inhibidora del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y Cortisol

Test adrenal

n = 8



comprendió tres ensayos, separados por intervalos de una semana: a) una noche de adaptación; b) un control basal bajo infusión de suero salino; y, c) una noche con infusión naloxona. La droga y el suero salino fueron inyectados en orden aleatorio por vía intravenosa a una velocidad correspondiente a 0.8 mg/h x 4h de naloxona y el período de investigación se extendió a 6 horas.

Durante los tres períodos citados se tomaron registros encefalográficos occipitales y precentrales por medio de un electrógrafo Elema-Schönander, y se clasificaron los distintos períodos de sueño de acuerdo con las normas establecidas por Rechtschaffen y Kales (111).

La iniciación del estado 2º del sueño fue considerado como el punto de partida para la toma de muestras de sangre (4ml por toma) a intervalos de 20 min., por medio de un catéter colocado en la vena cubital de los voluntarios y conectado con una sala contigua desde donde se controló el experimento. Los plasmas fueron separados por centrifugación y conservados a -20°C hasta la determinación radioinmunitológica de PRL, GH y LH.

Se utilizó un programa de computadora (DORMA) para calcular la duración de los distintos estadios del sueño en los tres períodos de 2 horas en que fue dividido el tiempo total examinado (6 horas). La evaluación estadística de las diferencias observadas en los perfiles hormonales entre la infusión salina y la de naloxona se realizó por medio de un test de Student, usando como parametro el área integrada bajo las curvas descritas por las variaciones hormonales (PRL y GH). En el caso de la LH se consideró el área comprendida en los picos de la

- 59 -

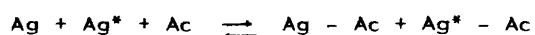
secreción pulsátil por encima de la línea de regresión calculada para las bases de dichos picos.

III C. Determinaciones hormonales por radioinmunoensayo

El método utilizado para la determinación de las concentraciones hormonales de las muestras recogidas fue el radioinmunoensayo. Este método se basa en la reacción de un antígeno (hormona) marcado radioisotópicamente (Ag^*) con el anticuerpo correspondiente:



Si a una cantidad constante de antígeno marcado (Ag^*) y de anticuerpo (Ac) se añade un antígeno no marcado (Ag), se produce una competición de ambos antígenos por el anticuerpo desplazando este último al trazador (Ag^*):



Realizando una curva de talonamiento con concentraciones crecientes de Ag , de la serie estándar o del suero problema se irá produciendo una disminución progresiva de Ag^*-Ac , de manera que puede establecerse una relación entre la concentración de Ag en la mezcla de reacción y la cantidad de complejo Ag^*-Ac formado, determinado por el conteo del radioisótopo. La especificidad de los anticuerpos usados en este estudio y la dilución óptima para el ensayo se mencionan en los apartados correspondientes.

III C.1. Prolactina

El método utilizado fue el descrito por Hwang y cols. (112). Es un

radioinmunoensayo homólogo, en el que el anticuerpo frente a h-PRL se obtuvo en conejo, utilizándose a una dilución 1:20.000, concentración a la cual une un 50% del trazador (^{125}I -hPRL, 10.000 cpm), no presentando reacción cruzada con otras hormonas. La separación del complejo antígeno-anticuerpo de la hormona libre, se realizó por inmunoprecipitación tras la adición de un suero anti-conejo obtenido en carnero (SAR) a una dilución 1:20, concentración a la cual une un 90% del complejo. Estos reactivos, junto con la hormona purificada, que sirve como trazador tras la yodinización, así como de patrón para la curva de talonamiento, fueron donados por el Prof. H.Friesen del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Manitoba (Canadá).

El desarrollo experimental se llevó a cabo por duplicado, de acuerdo con el esquema nº 9. El método posee una sensibilidad capaz de detectar 0.2 ng/ml de h-PRL. Las variaciones intra- e inter-ensayo no excedieron en ningún caso 10 y 20%, respectivamente.

III C.2. Hormona de crecimiento

El método empleado ha sido desarrollado en los Laboratorios Sandoz S.A. (Basilea, Suiza) por P. Marbach y R. Haller (113), utilizando como patrón y trazador un preparado de h-GH muy purificado de los Laboratorios Kabi (Estocolmo, Suecia). El primer anticuerpo frente a h-GH se obtuvo en conejo y se utilizó a una dilución 1:7000, condición en la que une un 50% del trazador empleado (^{125}I -hGH, 10.000 cpm), sin presentar reacción cruzada con otras hormonas.

La separación del complejo hormona-anticuerpo de la hormona libre

Esquema nº 9

Radioinmunoensayo de h-PRL

Reactivos:

- Tampón: PBS 50 mM pH7.6, 0.5% BSA
- Patrón: h-PRL (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.5, 25, 50 y 100 ng/ml)
- 1º Anticuerpo: Anti-h-PRL, dilución 1:20.000
- Trazador: 125 I-h-PRL (10.000 cpm)
- 2º Anticuerpo: Suero anti-conejo (SAR), dilución 1:20

Procedimiento:

Incubaciones a 4º C

Tubos	Reactivos	Tampón	Patrón	Muestras	125 I-h-PRL	Incubaciones a 4º C	
						72h	24h
Actividad total	—	—	—	—	50	—	—
Uniones no específicas	150	—	—	—	50	—	50
Uniones totales	50	—	—	—	50	100	50
Patrones 1º - 10º	—	—	50	—	50	100	50
Muestras	—	—	—	50	50	100	50

(volumenes expresados en microlitros)

Tras la última incubación, se centrifugan los tubos a 2.000 x g durante 25 min. a 4º C, se aspira el sobrenadante y se cuentan los precipitados 1 min. (contador Wallac 1270 Rack-gamma).

se hizo por inmunoprecipitación tras la adición de un segundo anticuerpo, obtenido frente a suero de conejo en asno (DSAR), que a una dilución 1:20 une un 90% del complejo antígeno-anticuerpo.

El desarrollo experimental se llevó a cabo por duplicado de acuerdo con el esquema nº 10. El método posee una sensibilidad capaz de detectar 0.2 ng/ml de h-GH. Las variaciones intra- e inter-ensayo fueron 8 y 15%, respectivamente.

III C.3. Hormona luteinizante

Este radioinmunoensayo fue realizado con reactivos preparados por el Instituto Nacional de Radioelementos (Fleurus, Bélgica). Es un sistema homólogo en el que el anticuerpo frente a la hormona se obtuvo en conejo y, en las condiciones empleadas, une un 30% del trazador (^{125}I -hLH). La separación del complejo hormona-anticuerpo de la hormona libre se efectuó por inmunoprecipitación tras la adición de un segundo anticuerpo, obtenido en carnero (frente a suero de conejo) y unido a celulosa. En la disolución utilizada el 2º Ac unió la casi totalidad del complejo h-LH-1ºAc.

Las determinaciones se hicieron por duplicado siguiendo el esquema de trabajo nº 11. La sensibilidad del método es de 1.1 mUI (MRC 68/40)/ml. Las variaciones intra- e inter-ensayo fueron de 5 y 8%, respectivamente.

III C.4. Hormona adrenocorticotropa

El método para la determinación radioinmunológica de esta hormona

Radioinmunoensayo de h-GH

Reactivos:

- Tampón: PBS 50 mM pH7.6, 0.5% BSA
- Patrón: h-GH (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.5, 25, 50 y 100 ng/ml)
- 1ª Anticuerpo: Anti-h-GH, dilución 1:7.000
- Trazador: ^{125}I -h-GH (10.000 cpm)
- 2ª Anticuerpo: Suero anti-conejo (DSAR), dilución 1:20

Procedimiento:

Incubaciones a 4° C

Tubos	Reactivos	24h					24h		24h	
		Tampón	Patrón	Muestras	1ª Ac	^{125}I -hGH	2ª Ac	2ª Ac		
Actividad total	—	—	—	—	—	50	—	—	—	
Uniones no específicas	150	—	—	—	—	50	—	50	50	
Uniones totales	50	—	—	—	50	50	—	50	50	
Patrones 1ª - 10ª	—	50	—	—	50	50	—	50	50	
Muestras	—	—	50	—	50	50	—	50	50	

(volúmenes expresados en microlitros)

Tras la última incubación, se centrifugan los tubos a 2.000 x g durante 25 min. a 4° C, se aspira el sobrenadante y se cuentan los precipitados 1 min. (contador Wallac 1270 Rack-gamma).

Radioinmunoensayo de hormona luteinizante humana (h-LH)

Reactivos:

- Tampón: Fosfato 50 mM pH 7.5
- Patrón: h-LH 2.1,4,2,8,4,21,42,84,210 mUI (MRC 68/40)/ml.
- 1º Anticuerpo: Anti-h-LH
- Trazador: 125 I-h-LH (10.000 cpm)
- 2º Anticuerpo: Suero anti-conejo (SAR)-celulosa

Procedimiento:

Tubos	Reactivos	Tampón	Patrón	Muestras	125 I-h-PRL	Incubaciones a 25°C	
						18h	1h*
Actividad total	—	—	—	—	100	—	—
Uniones no específicas	200	—	—	—	100	—	100
Uniones totales	100	—	—	—	100	100	100
Patrones 1º - 7º	100	100	100	—	100	100	100
Muestras	100	—	—	100	100	100	100

* con agitación. Los volúmenes están expresados en microlitros.

Al final de la incubación se añade a los tubos 3 ml de tampón, se centrifugan a 2.500 x g durante 10 min. a 4°C, se aspira el sobrenadante y se cuentan los precipitados durante 1 min. (contador Wallac 1270 Rack-gamma).

ha sido desarrollado por el Prof. J. Girard y cols. (114). Es un radioinmunoensayo homólogo, en el que el anticuerpo frente a la ACTH humana se obtuvo en conejo, utilizándose a una dilución 1:240.000, concentración a la cual une un 50% del trazador (^{125}I -ACTH, 1000 cpm) y no presenta reacción cruzada con otras hormonas. La separación del complejo antígeno-anticuerpo de la hormona libre se realizó por absorción en charcoal-dextrano (1.0% charcoal Norit A, 0.1% dextrano T70 en tampón Barbitol 60 mM pH 8.6), condiciones en las que une un 80% del ligando libre. La ACTH utilizada como patrón y trazador (tras incorporación de ^{125}I por el método de la cloramina T) es un análogo sintético de ACTH β^{1-24} (Ciba Geigy, Basilea, Suiza).

El desarrollo experimental se llevó a cabo por triplicado en el laboratorio del Prof. J. Girard (Hospital Infantil de la Universidad de Basilea, Suiza), de acuerdo con el esquema nº 12. El método posee una sensibilidad de 17 pg/ml. Las variaciones intra e inter-ensayo fueron 6.8% y 15.2%, respectivamente.

III C.5. Cortisol

Al igual que el radioinmunoensayo de ACTH, éste también ha sido desarrollado por el Prof. J. Girard y cols. (114). El ensayo se realizó en un medio tamponado con Glicina (50 mM pH 3.0), condición en la que la unión a la proteína transportadora queda inhibida, pero no la reacción con el anticuerpo que a una dilución de 1/200.000 une el 80% del trazador (2000 cpm, ^{125}I -Cortisol, New England Nuclear). Inmediatamente antes de comenzar el experimento se prepara una solución que

Radioinmunoensayo de hormona adrenocorticotropa (ACTH)

Reactivos:

- Tampón: 60 mM Barbital pH 8.6, 0.25% GGH, 0.5% β-mercaptoetanol, 1% Trisitol.
- Patrón: ACTH β¹⁻²⁴ (3.000, 1.500, 750, 375, 188, 94, 47, 23.5, 12 pg / ml).
- Anticuerpo: Anti-ACTH β¹⁻²⁴ (1:240.000).
- Trazador: ¹²⁵I-ACTH β¹⁻²⁴ (1.000 cpm).
- Adsorbente: Charcoal-Dextrano (1%, 0.1% respectivamente en tampón).

Procedimiento:

72h Incubaciones a 4°C 5 min.

Tubos	Reactivos	Tampón	Patrón	Muestras	¹²⁵ I-ACTH	1ª Ac	Adsor- bente
Actividad total	—	—	—	—	50	—	—
Uniones no específicas	—	1050	—	—	50	—	200
Uniones totales	—	150	—	—	50	900	200
Patrones 1ª - 9ª	—	—	150	—	50	900	200
Muestras	—	—	—	150	50	900	200

(Los volúmenes están expresados en microlitros).

Tras la adición del charcoal-dextrano, los tubos se centrifugaron a 3.000 x g, 5 min. a 4°C, contándose a continuación los precipitados 5 min. (contador Wallac 1270 Rack-gamma).

contiene el trazador junto con el anticuerpo y γ -globulina humana:

- 2.0 ml 125 I-Cortisol (N.E.N. 1.3 μ Ci/25 ml)
- 100 μ l 16% γ -globulina humana
- 10 μ l Anticuerpo (1/100)
- 16 ml de tampón

de la cual, se añade 200 μ l a cada tubo. La separación del complejo antígeno-anticuerpo de la hormona libre, se realizó por absorción a charcoal-dextrano (0.3% y 0.03% respectivamente en tampón Glicina/HCl 50 mM pH 3.0). El desarrollo experimental se llevó a cabo en el laboratorio del Prof. J. Girard de acuerdo con el esquema nº 13. El método posee una sensibilidad capaz de detectar 40 pg/ml. Las variaciones intra e inter-ensayo fueron 3.2% y 9.8% respectivamente.

En todos los radioinmunoensayos los valores obtenidos en el teletipo tras el conteo de los tubos en el contador γ , fueron analizados en un computador Hewlett-Packard 21005 por medio de tres programas (115): el primero, llamado RIA, permite calcular la curva de calibración en términos de cpm/concentración; el programa WERTE que aparece inmediatamente después de finalizar el RIA, determina la concentración de las muestras por interpolación en la curva estándar de los valores de cpm obtenidos en el contador; por último puede utilizarse el tercero, TEST, incluido a continuación de los anteriores en la banda magnética, si se desea realizar evaluaciones estadísticas de los resultados.

Radioinmunoensayo de cortisol

Reactivos:

- Tampón: 50 mM Glicina / HCl pH 3.0.
- Patrón: Plasma control (1.6 µg / ml) (2.000, 1.000, 500, 250, 125, 60, 30, 15 pg / ml).
- Anticuerpo: Anti-Cortisol en conejo (1:200.000).
- Trazador: ¹²⁵I-Cortisol (2.000 cpm).
- Adsorbente: Charcoal-Dextrano (0.3%, 0.03% respectivamente en tampón).

Procedimiento:

Incubaciones

Tubos	Reactivos	18 h a 25°C			10 min. a 4°C	
		Tampón	Patrón	Muestras	Ac. ¹²⁵ I-Cortisol	Adsorbente
Actividad total	—	—	—	—	200	—
Uniones totales	50	—	200	—	200	500
Patrones 1 ^a - 8 ^a	—	50	—	—	200	500
Muestras	—	—	50	—	200	500

(volumenes expresados en microlitros)

Terminada la incubación con el adsorbente, los tubos se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min. a 4°C, decantándose a continuación los sobrenadantes y contando los precipitados 2 min. (contador Wallac 1270 Rack-gamma).

70

IV RESULTADOS

IV 1. Estudios diurnos

IV 1.a. Efecto del FK 33-824 y de la naloxona sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento

Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la figura 3ª, donde se hallan representados los perfiles de GH y PRL (media \pm E.S.M., n= 14). Como puede apreciarse en la parte superior, la administración de naloxona (4mg, i.v.) no ejerce ningún efecto sobre la secreción de ambas hormonas, ya que los valores obtenidos son prácticamente superponibles a los observados tras infusión salina (control). La administración de FK 33-824 (0.5mg, i.m.) provoca una elevación significativa ($p < 0.001$), con respecto a los controles, de GH y PRL (parte inferior de la figura). En la respuesta a la encefalina existen diferencias entre las dos. La GH aumenta rápidamente, teniendo su máximo a los 60 min. y volviendo a los niveles basales a las 2 horas, mientras que la elevación de PRL es más lenta, con un máximo a los 90 min., no regresando a los valores anteriores al tratamiento hasta 4 horas después de la inyección de FK 33-824. La administración previa de naloxona bloquea por completo el efecto que sobre dichas hormonas posee esta encefalina, obteniéndose unos perfiles de respuesta similares a los observados mediante la inyección de suero salino.

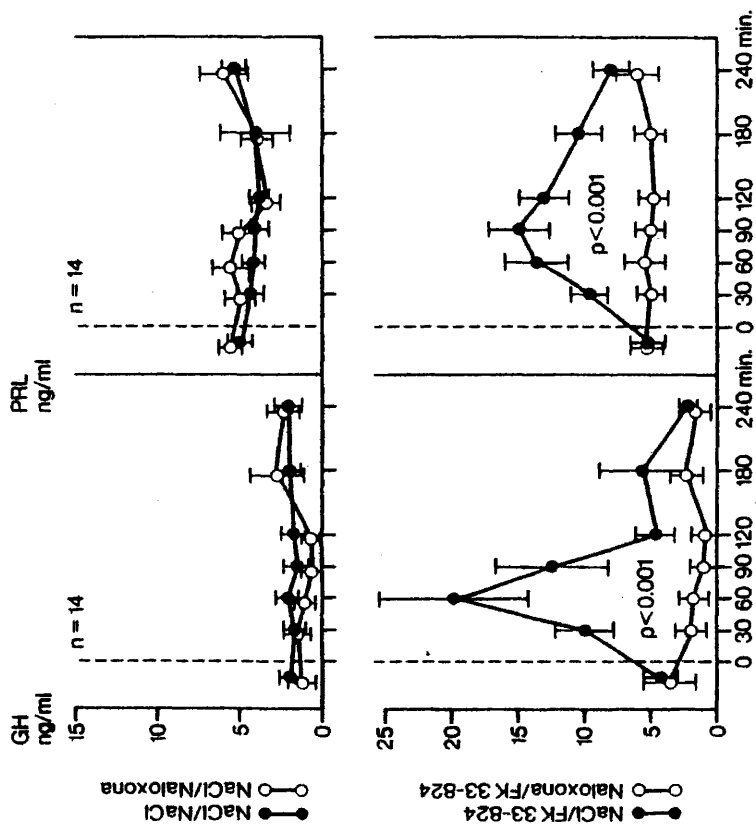


Figura 3ª

Efecto del suero salino, FK 33-824 y naloxona sobre PRL y GH en 14 varones normales. La significación estadística de las diferencias entre los distintos tratamientos, se determinó por un test de Wilcoxon, considerando los valores de las áreas integradas bajo los perfiles hormonales (media \pm E.S.M.).

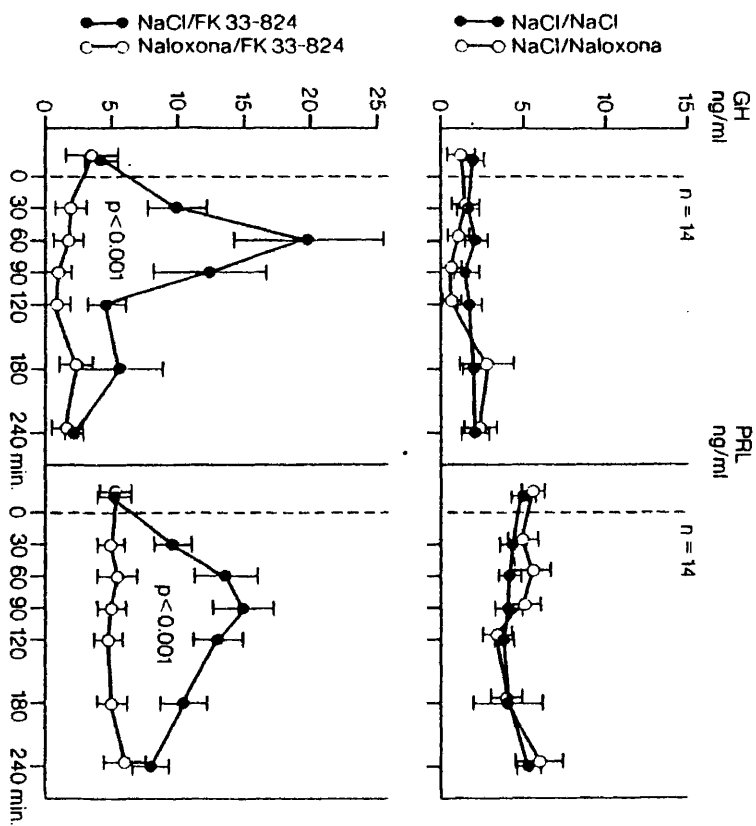


Figura 3ª

Efecto del suero salino, FK 33-824 y naloxona sobre PRL y GH en 14 varones normales. La significación estadística de las diferencias entre los distintos tratamientos, se determinó por un test de Student para pares, considerando los valores de las áreas integradas bajo los perfiles hormonales (media \pm E.S.M.).

IV 1.b. Estudio del efecto de la interacción entre vías de transmisión dopaminérgicas y encefalinérgicas sobre la secreción de prolactina y hormona de crecimiento

En primer lugar se estudió el efecto de la estimulación de ambas vías de transmisión sobre la secreción de PRL y GH. Los resultados aparecen representados en la figura 4ª (media \pm E.S.M., n= 8). La parte superior de la misma, referida a PRL, muestra que el FK 33-824 (0.5mg, i.m.) provoca un aumento significativo de la misma ($p<0.05$), respecto al control. El pretratamiento con bromocriptina (3 x 1 mg/día por vía oral) reduce significativamente ($p<0.01$) los valores de PRL respecto a los basales y bloquea el efecto estimulador de la encefalina. Por lo que se refiere a la GH (parte inferior de la figura), la inyección de FK 33-824 induce una elevación significativa de la misma ($p<0.05$) respecto al control. El pico hormonal no fue modificado por el tratamiento previo con bromocriptina; sin embargo, el declive de los niveles plasmáticos de la hormona fue menos pronunciado, observándose diferencias significativas ($p<0.05$) a los 120 min. respecto a los valores determinados tras la administración de la encefalina sola.

A continuación se analizó el efecto que produce el bloqueo de ambas vías de neurotransmisión sobre la secreción de prolactina.

En la figura 5ª se resumen los resultados obtenidos (media \pm E.S.M., n= 8). La parte superior muestra la hiperprolactinemia, ya apreciada en los estudios precedentes, consecuencia de la inyección de FK 33-824 (0.5mg, i.m.) y la abolición de dicha hipersecreción cuando los individuos son pretratados con naloxona (4mg, i.v.).

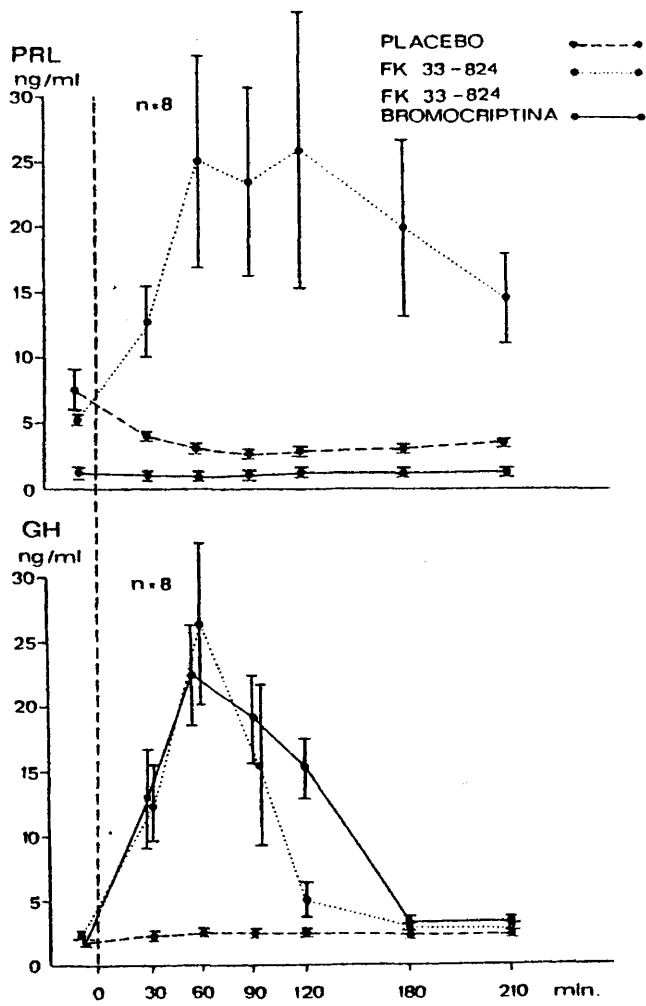


Figura 4ª

Efecto del FK 33-824 solo y previo tratamiento con bromocriptina sobre PRL y GH, figuras superior e inferior, respectivamente. La significación estadística de las diferencias entre los distintos tratamientos se determinó por un test de Student para pares, considerando las áreas integradas bajo los perfiles hormonales (media \pm E.S.M.).

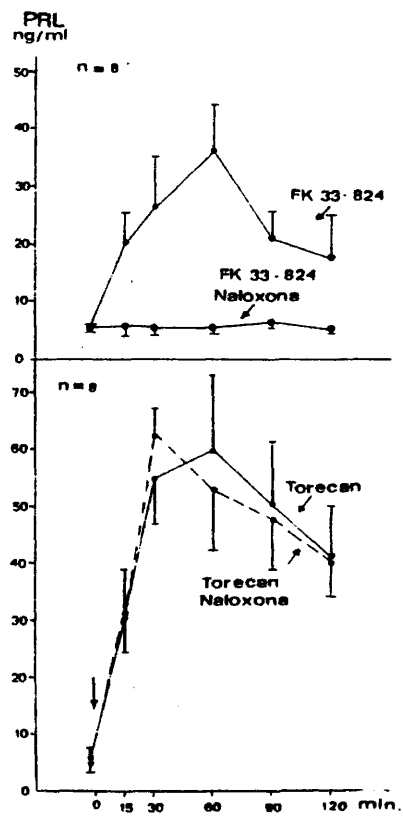


Figura 5*

Efecto del FK 33-824 solo y previo tratamiento con naloxona (panel superior) y, del Torecan (Tietilperazina) solo y junto con naloxona sobre la secreción de PRL (media \pm E.S.M.).

Como puede verse en la parte inferior, el tratamiento con un antagonista dopaminérgico, Torecan[®] (Tietilperazina, 3.25mg, i.v.), produce una rápida elevación de los niveles circulantes de PRL, que tiene su máximo a los 60 min., manteniéndose muy por encima de los valores normales (5 - 20 ng/ml) al cabo de los 120 min. de la administración de la droga. El pretratamiento con naloxona (4mg, i.v.), antagonista opiáceo, no modifica sustancialmente la respuesta de PRL, aunque el máximo se obtiene a los 30 min. del comienzo del ensayo. En este caso no se estudió la respuesta de la GH, ya que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos con tietilperazina en individuos normales no afecta la secreción de esta hormona (57).

IV 1.c. Efecto del bloqueo de receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la hipersecreción patológica de prolactina

Puesto que la elevación producida por el FK 33-824 en la secreción de PRL, fue bloqueada por la naloxona, se estudió la acción de este antagonista opiáceo sobre la hipersecreción patológica de esta hormona. En la tabla I se recogen los resultados de la administración de naloxona (4mg, i.v.). Las dos primeras pacientes padecían un tumor hipofisario productor de PRL, identificado por tomografía axial computerizada. Las dos últimas presentaban una hipersecreción de la hormona desconociéndose el origen primario de la misma. En ninguno de los casos, el bloqueo de los receptores opiáceos con naloxona consiguió disminuir la hiperprolactinemia.

Pacientes	0	15	30	45	60
A. P.	35.5	64.5	63.0	44.7	35.6
D. S.	150	147	133	138	140
R. G.	22	32	25	19	23
J. V.	43.1	33.5	34.2	44.3	34.5

Tabla I

Valores de PRL (ng/ml), tras el tratamiento con naloxona, de cuatro pacientes con hiperprolactinemia. Las dos primeras presentan un tumor hipofisario productor de PRL, en las dos últimas la causa primera de la hipersecreción es desconocida.

IV 1.d. Estudio de la interacción entre LH-RH y FK 33-824 sobre la secreción de LH

En la figura 6ª se recogen los resultados obtenidos en este ensayo (media \pm E.S.M., n= 8). La respuesta típica de LH a la estimulación producida por 200 μ g i.v. de LH-RH (línea punteada), que alcanza el máximo a los 30 min. después de la administración de la hormona hipotalámica, no fue modificada sustancialmente por el tratamiento previo con FK 33-824 (0.5mg, i.m.); a estas dosis, la encefalina provoca un aumento en los niveles plasmáticos de GH y PRL.

IV 1.e. Efecto del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de la hormona luteinizante

En primer término se calculó la línea de regresión formada por las bases de los picos de secreción pulsátil para las experiencias control y tras la infusión de FK 33-824 (0.01 mg/Kg/h x 4h). Los resultados se recogen en la figura 7ª. Estudiadas las pendientes de las líneas de regresión por un test de Student para pares, no se apreciaron diferencias significativas.

Comparando los perfiles de secreción hormonal entre el control tras la infusión de la encefalina, se observa que el FK 33-824 inhibe los pulsos de LH. La administración simultánea de naloxona (1mg/h, n= 6) antagoniza este efecto, apreciándose una tendencia hacia una mayor amplitud de los picos con respecto a los observados tras infusión salina (figura 8ª). La integración de las áreas comprendidas entre las líneas de base calculadas (líneas de regresión) y los perfiles descritos por la hormona aparecen recogidos en la tabla II. Se determinó la significación

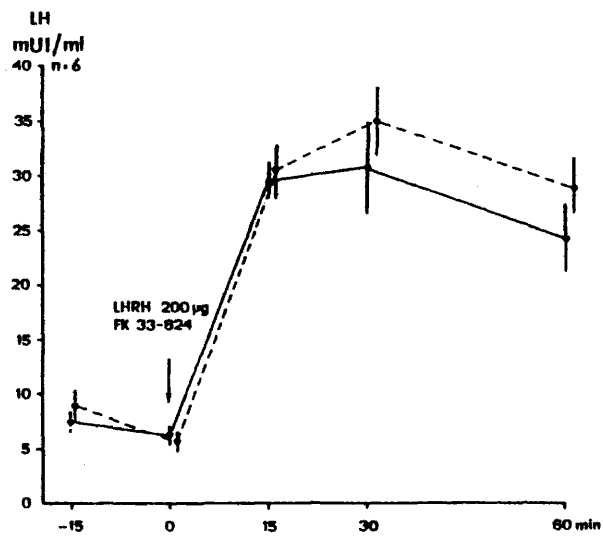
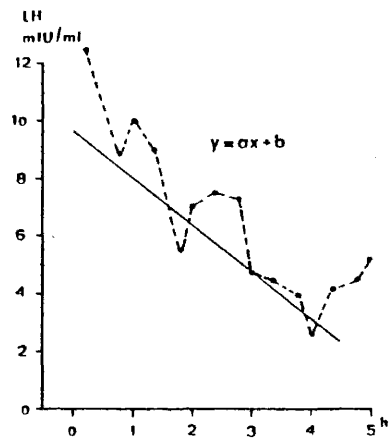


Figura 6ª

Efecto del LH-RH solo (línea punteada) y tras la administración de FK 33-824 (línea continua) sobre la secreción de LH (media \pm E.S.M.).



BASAL	FK 33-824
- 0.64	- 2.08
- 0.10	+ 0.02
- 0.25	+ 0.27
+ 1.23	- 0.06
- 0.06	+ 0.40
- 0.40	- 1.10
- 0.10	- 0.10
- 0.60	- 0.70

) n.s.

Figura 7^a

Cálculo de las líneas de regresión sobre las bases de los picos de secreción pulsátil en el control basal y tras la infusión de FK 33-824. La significación estadística de las diferencias entre ambos, se determinó por un test de Student para pares.

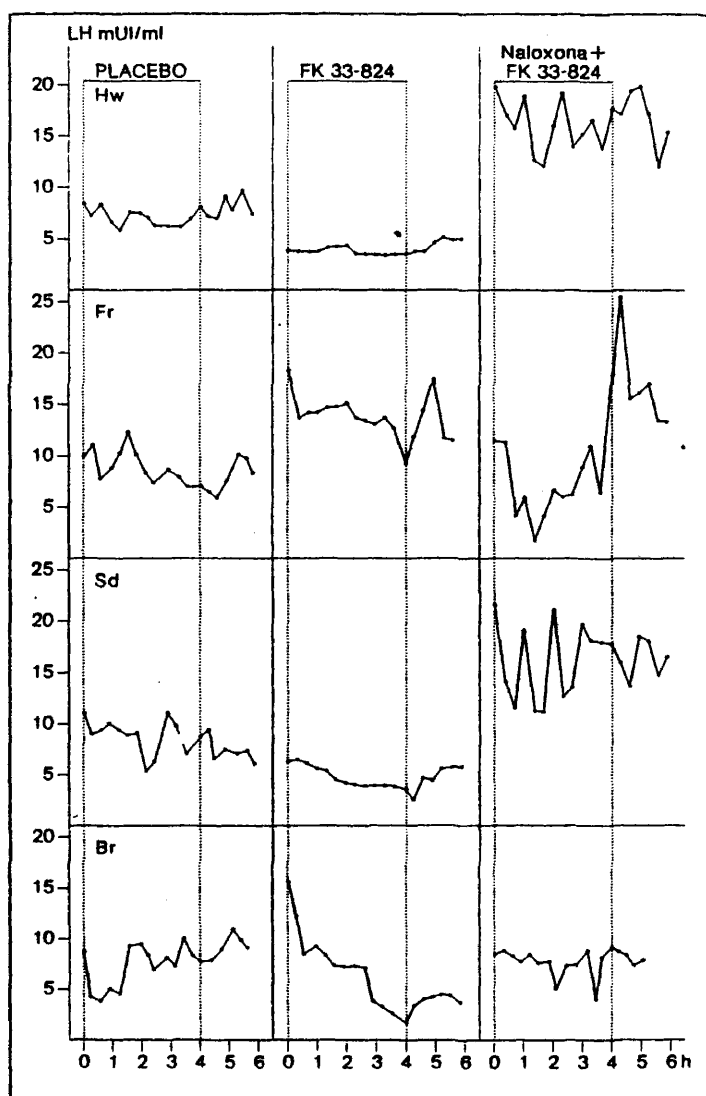


Figura 8ª

Perfiles pulsátiles de LH en la fase folicular de cuatro de las mujeres estudiadas bajo infusiones de: suero salino, FK 33-824 (n= 8) y, naloxona + FK 33-824 (n= 6). Las líneas punteadas delimitan los períodos de infusión.

Perfiles integrados de LH		
n	FK 33-824	FK 33-824/ Bromocriptina
1	308	102
2	89	73
3	126	191
4	66	275
5	146	182
6	279	80
7	139	385

n.s.

Tabla II

estadística de las diferencias apreciadas entre los distintos tratamientos por un test de Student para pares. Como se indicaba anteriormente, el FK 33-824 inhibe significativamente la pulsatilidad de LH ($p < 0.01$) y la infusión simultánea de naloxona bloquea dicha acción ($p < 0.05$), no observándose diferencias respecto al control.

La encefalina en estas condiciones produce una clara hiperprolactinemia en siete de las personas investigadas, efecto que puede ser abolido por pretratamiento con bromocriptina (3×1 mg/día) (figura 9ª), sin alterar el efecto inhibitor del FK 33-824 sobre la secreción pulsátil de LH (Tabla III).

IV 1.f. Estudio de la acción inhibitora del FK 33-824 sobre la secreción de ACTH y cortisol

Los resultados que se recogen en la figura 10ª (media \pm E.S.M.) fueron analizados por un test de Student para pares. En la parte superior de la misma, puede apreciarse que la inyección de 5 UI de LVP a los 60 min. del placebo (0) fue seguida de una elevación significativa de ACTH ($p < 0.05$, comparado con la línea de base 0-60 min., $n = 8$) obteniéndose el máximo después de 15 min. de la administración del péptido. En el panel intermedio se muestra la estimulación de los niveles plasmáticos de cortisol ($p < 0.001$, comparado con la línea de base 0-60 min., $n = 8$).

El FK 33-824 inyectado a tiempo "cero", y la LVP a los 60 min. resulta en la abolición de la estimulación de ACTH y cortisol (paneles superior e intermedio).

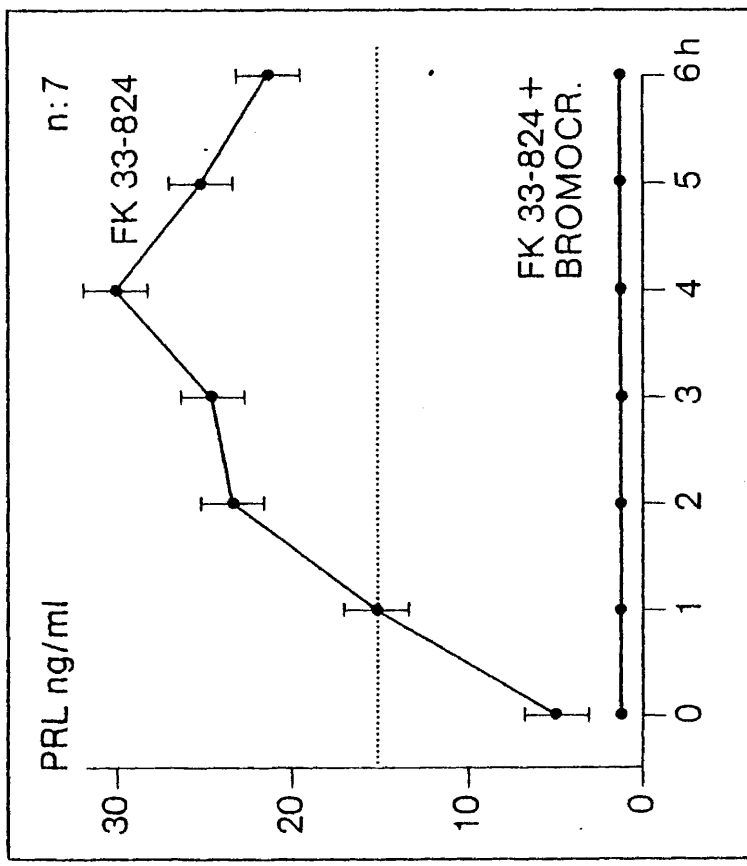


Figura 9ª

Efecto de la infusión de FK 33-824 solo y tras pretratamiento con bromocriptina sobre la secreción de PRL. La línea punteada representa el límite superior de los valores normales (media \pm E.S.M.).

Perfiles integrados de LH

n	Basal	FK 33-824	FK 33-824/ Naloxona
1	341	308	240
2	221	89	935
3	260	126	191
4	530	66	168
5	394	139	292
6	235	146	731
7	577	151	
8	438	279	

$p < 0.01$ $p < 0.05$
 n.s.

Tabla III

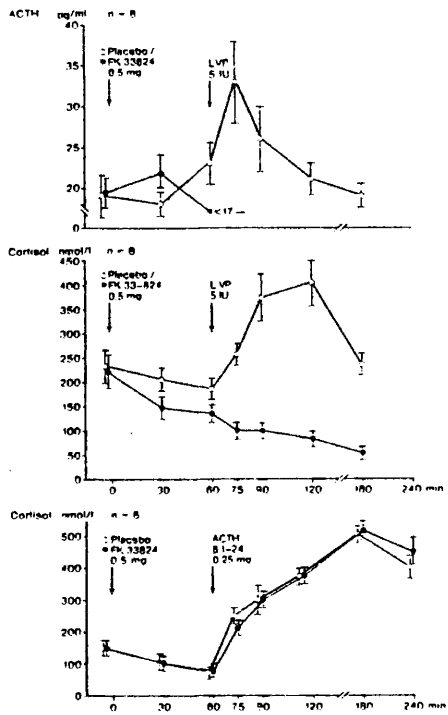


Figura 10³

Efecto inhibitor del FK 33-824 sobre la estimulación de los niveles plasmáticos de ACTH y cortisol provocado por la LVP (paneles superior y medio). Esta Met-enkefalina no modifica la elevación de cortisol provocada por la ACTH 8¹⁻²⁴ (panel inferior).

En la última parte del experimento se estudió el posible efecto directo de esta encefalina sobre la corteza adrenal, inyectándose ACTH β^{1-24} a los 60 min. del placebo 0 min., se produce un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de cortisol ($p < 0.001$, comparando con la línea de base 0-60 min.), que alcanza su máximo al cabo de los 120 min. de la inyección del péptido. La administración de FK 33-824 a tiempo 0 min., no modifica la acción de la ACTH, confirmando el efecto central del opiáceo.

IV 2. Estudio durante el sueño nocturno: Efecto del bloqueo de receptores opiáceos, sensibles a naloxona, sobre la secreción de prolactina, hormona de crecimiento y hormona luteinizante

El perfil de la secreción nocturna de PRL no fue modificado por la infusión de naloxona (0.8mg/h x 4h) como puede observarse en la figura 11ª (media \pm E.S.M., n= 10). Sin embargo, en el caso de la GH, el bloqueo de receptores opiáceos, sensibles a naloxona, produce una disminución significativa ($p < 0.01$) en el período de hipersecreción, las dos primeras horas, cuando se compara con la experiencia control, figura 12ª (media \pm E.S.M., n= 10). La aparición del pico de GH durante la noche, ha sido asociado a los estadios 3 y 4 del sueño (95, 116, 118). En este estudio, se realizó un control encefalográfico de los niveles de sueño. La figura 13ª recoge los valores acumulados de los estados 3 y 4 del sueño en los tres períodos en que se dividió el tiempo total analizado (6 horas). Es en el primer período de 2 horas donde se produce la elevación de GH durante el ensayo con infusión salina.

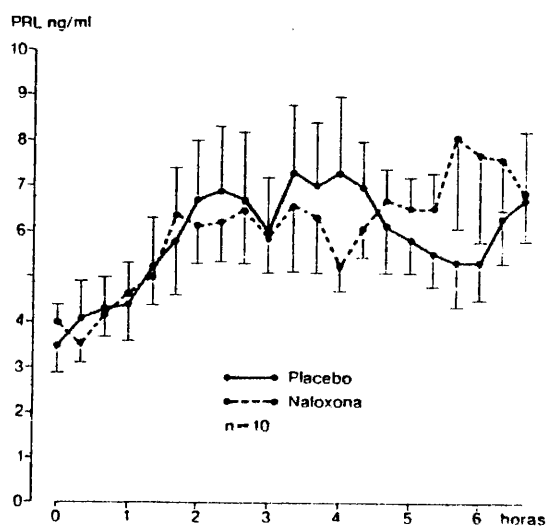


Figura 11ª

Efecto de la infusión de naloxona comparado con el producido por una infusión salina (placebo), sobre la secreción de PRL durante el sueño nocturno.

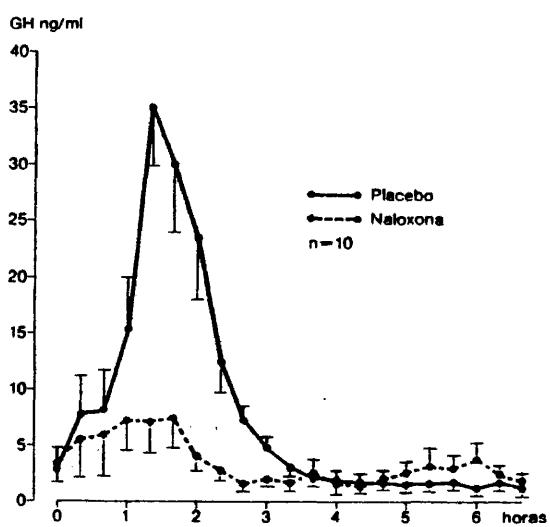


Figura 12*

Efecto de la infusión de naloxona comparado con el producido por una infusión salina (placebo), sobre la secreción de GH durante el sueño nocturno.

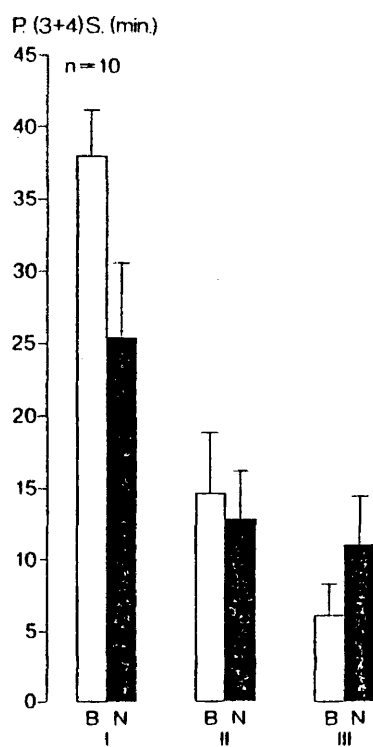


Figura 13^a

Valores acumulados de los períodos (3 + 4) del sueño (media \pm E.S.M., n= 10) para el basal (B) y naloxona (N), en las tres partes (2 horas) en las que se dividió el estudio realizado (6 horas).

Examinando los resultados por un test de Student para pares, no se aprecian diferencias significativas entre los valores obtenidos por infusión salina y de naloxona, aunque se constata una tendencia a la disminución de la duración de los estados 3 y 4 del sueño bajo la influencia de este antagonista opiáceo.

Por lo que se refiere a la secreción pulsátil de LH, los valores integrados de las áreas comprendidas entre los picos y las líneas de regresión linear calculadas para las bases de los mismos, no muestran diferencias significativas tras ser analizados los datos por un test de Student para pares (tabla IV).

IV 3. Efectos secundarios de las drogas empleadas

Tanto la administración intramuscular como la infusión intravenosa de FK 33-824, no produjo cambios notables en la frecuencia respiratoria, tensión arterial, temperatura corporal y pulso, que fueron controlados hasta seis horas después de la inyección de este análogo sintético de la Met-enkefalina. Tampoco se registraron variaciones en el tamaño de la pupila, tests hematológicos, urea, electrolitos, pruebas funcionales hepáticas, calcio, fosfato; electroencefalograma (30 min., 2h) también fue normal.

Sin embargo, se apreciaron una serie de efectos secundarios subjetivos y objetivos. El síntoma más llamativo y constante fue una sensación de fatiga muscular, particularmente acentuada en las piernas; aparecía en el espacio de 3-5 min. y duraba de 15 a 30 min.; iba acompañada frecuentemente por una impresión de opresión en el pecho o en la garganta, que inducía ansiedad.

Tabla IV

Efecto del bloqueo de receptores sensibles a naloxona sobre la secreción nocturna de LH.

Sujetos	Basal	Naloxona
1	5,5	1,9
2	20,5	8,6
3	2,5	16,9
4	23,9	20,5
5	28,5	20,3
6	14,5	13,6
7	13,7	3,8
8	7,9	6,3

92

Los resultados están expresados en mUI del patrón MRC68/40/ml por hora. El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un test de Student para pares, no apreciándose diferencias significativas entre el control y el ensayo con naloxona (0.8mg/h x 4h).

Otros síntomas, presentes en el 50-60% de los sujetos, fueron: un aumento de la motilidad intestinal (sin producir diarrea), eritema facial ligero e inyección de la conjuntiva. En algunos individuos se observó un enrojecimiento de todo el cuerpo, ataques de rinitis, sequedad en la boca, picores y dolor de cabeza. No aparecieron síntomas semejantes a los provocados por la morfina (cambios del comportamiento, náuseas, etc.).

Todos estos efectos secundarios pudieron ser antagonizados por la naloxona y, en ningún caso dieron lugar a una interrupción del tratamiento.

La naloxona sola, al igual que la bromocriptina y LH-RH, no desencadenaron efectos secundarios; la administración de Torean[®], sin embargo, en un caso, fue seguida de un corto episodio de nerviosismo e hiperactividad, efecto característico de las fenotiazinas.

11

V DISCUSSION

Con la intención de dar una idea más completa del papel regulador que juegan los receptores opiáceos sobre la secreción de las hormonas estudiadas, el análisis de los resultados obtenidos se ha agrupado en tres grandes apartados, referentes a: 1º prolactina y hormona de crecimiento; 2º hormona luteinizante; y, 3º ACTH y cortisol.

V A. Regulación de la secreción de prolactina y hormona de crecimiento por sustancias opiáceas

Los datos representados en la figura 1ª muestran una elevación significativa de ambas hormonas tras la administración aguda de FK 33-824 (0.5 mg, i.m.), confirmando los resultados obtenidos por von Graffenried y cols. (119) y Stubbs y cols. (98). La infusión de la encefalina (0.01 mg / Kg / h x 4h) provoca también un aumento de los niveles plasmáticos de prolactina por encima de los valores normales durante 6 horas (figura 6ª); Grossman y cols. (120) observaron una respuesta similar de las dos hormonas tras la infusión de FK 33-824 (1mg/30min.). Por el contrario, Rolandi y cols. (121) no apreciaron alteración en los niveles séricos de prolactina y hormona de crecimiento después de la inyección i.v. de 250 µg de Met-encefalina. Sin duda este hecho es debido a la rápida degradación enzimática del péptido natural (69-74). Es interesante destacar que la morfina provoca un aumento significativo de prolactina sin modificar los valores basales de la hormona de crecimiento (97).

El efecto producido por el FK 33-824 puede ser contrarrestado por la administración previa de naloxona (4 mg, i.v.), demostrando así el

mecanismo de acción opiáceo de esta encefalina. Sin embargo, un antagonista parcial, como la nalorfina, no es activo (119). La naloxona sola (4 mg, i.v.) no modificó la secreción basal de dichas hormonas, hecho que concuerda con los datos de Stubbs y cols. (98). En este sentido, la literatura examinada muestra resultados contradictorios; Barreca y cols. (122), administrando 0.8 mg de naloxona por vía i.m. a individuos normales, no aprecian variaciones significativas de prolactina y hormona de crecimiento respecto a los controles; Morley y cols. (123), empleando dosis muy superiores (10 mg, i.v.), tampoco observan diferencias en relación al suero salino, y los resultados obtenidos por Grossman y cols. (120), tras infusión de este antagonista opiáceo (16 mg i.v./5min), se expresan también en esta dirección. Por el contrario, Rubin y cols. (124) observan una disminución significativa de los niveles plasmáticos de prolactina (a concentraciones de 0.2 mg/Kg) y Gold y cols. (125), utilizando dosis similares en *Macaca arctoide*, llegan a las mismas conclusiones.

Para clarificar esta situación y poder definir el papel que juegan los receptores opiáceos en la regulación de la secreción de prolactina y hormona de crecimiento, se analizó el efecto que podía tener el bloqueo de los receptores, sensibles a naloxona, sobre la elevación fisiológica de ambas hormonas, que se produce durante el sueño (95). Como es sabido, el aumento de los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento se halla íntimamente asociado a la duración de los estadios III y IV del sueño, de forma que la supresión de estos, supone la abolición del pico secretorio (95, 116-118). El de prolactina, se produce más tarde y

se ha relacionado vagamente con los períodos de movimiento rápido de ojos (REM).

Las figuras 11ª y 12ª resumen los resultados obtenidos y, como puede apreciarse, mientras que la infusión de naloxona (0.8 mg / h x 4h) no altera el perfil secretorio de prolactina inhibe significativamente ($p < 0.01$) el de hormona de crecimiento. Esta disminución, no puede achacarse al efecto producido por este antagonista opiáceo sobre el sueño, ya que la duración total del mismo no fue alterada (311 ± 14.5 min. frente a 331.6 ± 13.4 min. bajo infusión salina) y, aunque durante las dos primeras horas del sueño, período en el que se produce la elevación de hormona de crecimiento, se observa una disminución del tiempo invertido en los estadios III y IV respecto al basal, las diferencias no son significativas. En este sentido, Davis y cols. (126) empleando dosis de 0.4 mg / h de naloxona, no aprecian efecto alguno sobre los distintos estadios del sueño. Martin y cols. (127) tampoco observan ninguna alteración del sueño tras infusión de naloxona (0.8 mg / Kg / h), aunque, en contraste con los resultados aquí expuestos (figuras 11ª y 12ª), no encuentran ningún cambio en los niveles hormonales. Sin embargo, los datos obtenidos por estos autores son discutibles, ya que la elevación de la hormona de crecimiento está íntimamente relacionada con la duración de los estadios III+IV del sueño, que en su trabajo representan tan sólo alrededor del 5% del total del mismo para ambos tratamientos (5.6% basal y 5.1% naloxona), mientras que en este estudio son tres veces superiores (20% y 16% respectivamente). Esta es quizás la razón por la cual, Martin y cols. no aprecian

variaciones significativas en los niveles hormonales al administrar este antagonista opiáceo respecto al control,

Estos resultados hacen pensar en el papel fisiológico que tienen los receptores opiáceos sensibles a naloxona sobre la secreción de hormona de crecimiento. En este sentido, Morley y cols. (123) comprueban que la estimulación provocada por arginina es inhibida por la administración de este antagonista opiáceo.

Por lo que se refiere a la prolactina, los datos recogidos hasta el momento sobre la acción de los opiáceos endógenos en su regulación son negativos. La naloxona (4 mg, i.v.) tampoco logró reducir la hipersecreción patológica de la hormona, confirmando las observaciones previas de Tofis (128).

Estudios realizados en cultivos hipofisarios de rata, en presencia de morfina y diversos derivados de Met-enkefalina (129-131), demuestran que las sustancias opiáceas no alteran la liberación espontánea de estas hormonas por las células de pituitaria, sugiriendo un efecto central para estos compuestos. Sin embargo, estos datos no implican la falta de acción directa de los opiáceos sobre la hipófisis, donde se ha descrito la existencia de receptores para estas sustancias (132). Enjalbert y cols. (96, 131) observaron que la morfina disminuye significativamente el efecto inhibitor de la dopamina cuando ambos compuestos se hallan presentes en cultivos pituitarios de rata, sin alterar las características de unión al receptor para análogos dopaminérgicos, lo que implicaría un mecanismo de regulación intracelular. Estos resultados no descartan una acción a niveles superiores; así Gudelsky y Porter (58) comprobaron que

la morfina, β -endorfina y Met-enkefalina reducen en 85-95% la concentración de dopamina en el tallo hipofisario; Ferland y cols. (133) mostraron que la administración de Met-enkefalina reduce la actividad dopaminérgica en la eminencia media provocando, como la morfina (58), una elevación de prolactina. Tolis y cols. (134) comprobaron que la estimulación de la secreción de prolactina producida por morfina y metadona puede ser bloqueada por la administración previa de bromocriptina, apomorfina o levodopa. Los resultados representados en la figura 4ª (panel superior) confirman esos datos, ya que la estimulación de receptores opiáceos con FK 33-824 (0.5 mg, i.m.) supone la elevación de los niveles plasmáticos de esta hormona, efecto que puede ser ampliamente contrarrestado por la activación dopaminérgica con bromocriptina. Ambos experimentos abogan por una regulación de la secreción de prolactina a través de la interacción entre estas dos vías de neurotransmisión, que, de acuerdo con los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en rata, podría suceder tanto a nivel intracelular, en las células lactotropas de la hipófisis (96, 131), como por reducción de la actividad dopaminérgica en el tallo pituitario (58) y eminencia media (133).

De acuerdo con esta hipótesis, el efecto estimulador de la secreción de prolactina provocado por la administración de un antagonista dopaminérgico podría ser contrarrestado por la naloxona, que al bloquear los receptores opiáceos, eliminaría la inhibición que éstos producen sobre la transmisión dopaminérgica. Los resultados recogidos en la figura 5ª muestran que la naloxona antagoniza la estimulación de la prolactina por el FK 33-824 (0.5 mg, i.m.) y, sin embargo, no compensa la

elección de esta hormona producida por el bloqueo de la transmisión dopaminérgica por Torecan[®].

Estos datos, aunque no asumen las premisas establecidas sobre la interacción entre vías dopaminérgicas y encefalinérgicas en la regulación de la secreción de prolactina, no las contradicen, ya que si bien la naloxona antagoniza la estimulación provocada por el FK 23-824 (figuras 3ª y 5ª), no altera los niveles basales de la hormona (figura 3ª); tampoco refuerza la acción inhibitoria de la bromocriptina sobre prolactina, como han observado Agnati y cols. (135) y, como se indica en la figura 5ª, no contrarresta el aumento de prolactina producido por el Torecan[®]. Hay por tanto dos posibles alternativas en la interpretación de los datos recogidos hasta al momento: una sería la de que las encefalinas endógenas tienen un papel muy limitado en la regulación de esta hormona, por lo que el bloqueo de sus receptores con naloxona no afectaría su secreción; la otra se basa en la especificidad de los receptores opiáceos, los μ son sensibles a la naloxona, morfina y sus derivados, mientras que los δ lo son para las encefalinas y en menor escala, para la naloxona (81); por ello podría pensarse que a las dosis empleadas (4 mg, i.v.), la naloxona no antagoniza la acción de las encefalinas endógenas. Sin embargo, esta explicación parece poco probable si tenemos en cuenta la bibliografía anteriormente citada (123-125).

Aunque la regulación de la secreción de prolactina es debida esencialmente a la acción inhibitoria de la dopamina, no debe olvidarse que hay otros neurotransmisores que juegan también un papel regulador. Los precursores de serotonina, inducen un aumento de los niveles

plasmáticos de la hormona (57). Diversos grupos de investigadores han dado cuenta del aumento en el recambio cerebral y en la liberación neuronal de este neurotransmisor en rata tras la administración aguda de morfina y β -endorfina (136, 137), acumulándose evidencias que sugieren que los opiáceos pueden promover la liberación de prolactina a través de un mecanismo serotoninérgico. Antagonistas tales como metergolina, metisergide y ciproheptadina reducen significativamente el aumento plasmático de la hormona producido por las encefalinas, al igual que la 5, 6-dihidroxitriptamina, droga neurotóxica, que destruye las terminaciones serotoninérgicas (138-140). La inhibición de la síntesis del neurotransmisor por medio de la paraclorofenil-alanina ha sido considerada como potenciadora (139, 141) e inhibidora (140, 142) del efecto estimulador de los péptidos opiáceos sobre la liberación de prolactina. De todo ello podría concluirse que la acción de los opiáceos sobre la secreción de esta hormona es dual: por un lado inhiben la transmisión dopaminérgica y, por otro, estimulan la serotoninérgica.

Por lo que se refiere a la hormona de crecimiento existen evidencias del papel estimulador de norepinefrina, dopamina y serotonina sobre esta hormona (57). El control dopaminérgico de la secreción de hormona de crecimiento puede ser mediada, al menos en parte, por las interacciones axónicas entre las terminaciones de este neurotransmisor y la hormona inhibidora de la liberación de GH (GIH), a nivel de la eminencia media (143, 144). Por otra parte, el FK 33-824 (0.5 mg, i.m.) provoca una elevación significativa de la hormona de crecimiento, que se ve potenciada en su duración ($p < 0.05$ respecto al FK 33-824 sólo, a

los 120 min.) por el tratamiento previo con bromocriptina (figura 5ª) lo que indicaría una cierta interacción entre ambas vías de transmisión. Estos datos se ven corroborados por los estudios realizados en perros por Casanueva y cols. (145, 146), donde comprueban que el aumento de hormona de crecimiento inducido por esta encefalina, puede ser parcialmente bloqueado por pimocida (antagonista dopaminérgico). Sin embargo, no parecer ser éste el mecanismo fundamental de esta acción opiácea, ya que tan sólo el bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina o el de los histamínicos H₁ con difenilhidramina y clemastina son capaces de antagonizar el efecto estimulador del FK 33-824 sobre la hormona de crecimiento (145, 146).

V B. Papel de los opiáceos en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante

Existen evidencias experimentales que muestran un efecto inhibitorio de los opiáceos sobre los mecanismos de ovulación. La morfina previene en la rata la elevación de la LH en el proestro y la consiguiente ruptura folicular, acción que puede ser antagonizada por la naloxona (100, 103). Este efecto parece llevarse a cabo a través de un mecanismo supraselar, ya que en rata la administración de morfina inhibe la liberación de LH-RH (147), mientras que no altera el contenido hipofisario de LH, ni la estimulación producida por LH-RH in vivo e in vitro, aunque reduce la elevación hormonal en animales castrados (101); por su parte la naloxona no modifica los niveles basales ni la acción de LH-RH en cultivos de pituitaria (102).

Los resultados obtenidos en el ser humano son semejantes y, como se observa en la figura 6ª, el FK 33-824 (0.5 mg, i.m.) no afecta la elevación de la LH producida por la subsiguiente administración de LH-RH (200 µg, i.v.). Tampoco la naloxona altera la respuesta hormonal frente al péptido hipotalámico (148, 149), confirmando en el hombre los datos obtenidos en rata sobre el mecanismo regulador de los opiáceos a nivel supraselar.

La infusión de FK 33-824 (0.01 mg / Kg / h x 4h) provoca la abolición de la secreción pulsátil de LH (figura 8ª, tabla II), siendo dicho efecto inhibido por la administración concomitante de naloxona (1 mg / h x 4h). Sin embargo, la encefalina no modifica la pendiente de la línea de regresión calculada para las bases de los picos

secretorios (figura 7ª), hecho que concuerda con el observado por del Pozo y cols. (99) y difiere del apreciado por Stubbs y cols. (98).

Dado que la infusión de FK 33-824 provoca una situación de hiperprolactinemia (figura 9ª), podría pensarse que la inhibición de la pulsabilidad de LH es mediada por este efecto, tal y como se ha descrito en casos de hipersecreción patológica de esa hormona (104). Sin embargo, el tratamiento previo con bromocriptina inhibe la elevación de prolactina producida por la encefalina (figura 9ª), sin modificar la respuesta de la LH (tabla III), lo que prueba una acción directa de los opiáceos sobre la regulación de la secreción de esta hormona.

Aunque no se muestran los resultados, también se analizó la respuesta de la hormona folículo-estimulante a la infusión de FK 33-824, no apreciándose efecto alguno respecto al control salino, lo que confirma los datos observados por del Pozo y cols. (99), y difiere de los de Stubbs y cols. (98), que aprecian una ligera disminución de los niveles hormonales a los 180 min. de la inyección i.m. de 250 µg de FK 33-824. Estos resultados indican una acción selectiva de los opiáceos sobre la LH (100).

Para definir el papel de las encefalinas endógenas sobre la liberación de la hormona luteinizante, se administró una infusión de naloxona (0.8 mg / h x 4h) durante el sueño nocturno. Calculando las áreas entre los picos secretorios y la línea de regresión formada por la base de los mismos, como puede apreciarse en la tabla IV, se ha visto que, aunque existe una paradójica tendencia a la disminución de los niveles hormonales por acción de la naloxona, no se observan diferencias

significativas respecto al control. Sin embargo Moulton y cols. (150), administrando 4 mg i.v. seguidos de una infusión de 2.8 mg / h x 8h de naloxona, observan un aumento significativo ($p < 0.05$) en la frecuencia de los pulsos. Blankstein y cols. (148), utilizando una dosis de 10 mg. i.v., no aprecian variaciones en la fase folicular temprana (al igual que ocurre en este estudio), pero sí en los casos estudiados en la fase folicular tardía, donde existe un aumento en los niveles plasmáticos. En el mismo sentido se expresan los datos obtenidos por Grossman y cols. (149) inyectando 16 mg naloxona por vía i.v. De todo lo expuesto puede deducirse que los receptores opiáceos juegan un papel en la regulación de la secreción de LH y que la falta de respuesta que se aprecia en la tabla IV puede ser debida a las bajas concentraciones de naloxona empleadas, aunque teniendo en cuenta los datos de Blankstein y cols. (148) podría especularse con variaciones en la sensibilidad a la modulación por las encefalinas endógenas a lo largo del ciclo menstrual. Por lo que se refiere a la FSH, ninguno de los tres grupos anteriormente citados aprecia grandes oscilaciones de esta hormona bajo la acción de la naloxona.

Las evidencias acumuladas indican que los opiáceos ejercen un control negativo en la secreción de LH, mientras que no parecen jugar un papel importante en la regulación de FSH. Sin embargo, es difícil explicar el mecanismo básico, responsable de la acción selectiva de esta Met-enkefalina sobre LH. Los estrógenos podrían ser importantes en tal sentido, ya que existe una correlación entre los niveles basales de estos y los aumentos de LH tras la administración de naloxona (148, 151); por

el contrario los andrógenos no parecen intervenir (152). Además, la acción moduladora de los opiáceos sobre la liberación de dopamina por las neuronas tuberoinfundibulares en los vasos portales (58) puede influenciar la función pituitaria, posiblemente por mediación de los catecol-estrógenos (153) y, este puede ser el punto de unión con el control que los esteroides ejercen sobre el sistema reproductivo.

V C. Regulación de la secreción de ACTH y cortisol por sustancias opiáceas

Existen evidencias previas (98, 99) de que la administración de FK 33-824 a individuos normales provoca una disminución de las concentraciones plasmáticas de ACTH y cortisol. Los resultados representados en la figura 10^a (paneles superior y medio) muestran que la encefalina inhibe claramente la liberación de ambas hormonas aumentada por la estimulación hipofisaria con LVP. Aunque hay discrepancias sobre la identificación de la actividad CRF (no aislada todavía) con la vasopresina (154-156), se puede asumir en base a los datos experimentales y clínicos (105-107) que este nonapéptido (AVP) y su análogo sintético actúan directamente sobre la pituitaria anterior favoreciendo la liberación de ACTH y, a través de ésta, la de cortisol.

El hecho de que el FK 33-824 inhiba la vasopresina endógena (110) y a la vez la ACTH tras su estimulación con LVP, hace suponer que el efecto de la encefalina se produce en este último caso a nivel hipofisario. Esta hipótesis se ve reforzada por las apreciables cantidades de Met-encefalina en esta glándula (30). Además, Lamberts y cols. (157) han observado en hipófisis de rata, in vitro, que el FK 33-824, aunque no altera la secreción basal de ACTH, inhibe la estimulación producida por LVP. De cualquier forma todos estos datos no excluyen la modulación a niveles superiores y, por lo que se refiere al cortisol, no permiten deducir si la inhibición por FK 33-824 es un reflejo fisiológico debido a la acción sobre la hipófisis o si también afecta directamente su síntesis adrenal. Sin embargo, dado que este pentapéptido no altera

la elevación de cortisol producida por la administración de ACTH (figura 10³, panel inferior), la última posibilidad mencionada puede descartarse; además, Neher y Podesta (comunicación personal) no aprecian ninguna modificación en la síntesis de corticosterona en incubaciones de células dispersas de la capa fasciculada de la corteza adrenal de rata, cuando se añade al medio simultáneamente ACTH y FK 33-824 en comparación con la adición de la hormona hipofisaria sola.

Este derivado de Met-enkefalina eleva los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento, prolactina y reduce la ACTH y la vasopresina (110) en voluntarios normales. Ese efecto estimulador puede ser antagonizado por naloxona (98, 99). Sin embargo, su acción sobre el eje hipofiso-adrenal y la vasopresina es resistente a este agente (98, 110). Como se indicaba en la introducción, se han descrito diversos tipos de receptores opiáceos (75-81). Esencialmente los μ son responsables de la percepción del dolor y los efectos de la morfina pudiendo ser antagonizados por la morfina, mientras que los δ interaccionan fundamentalmente con las encefalinas, y aunque Kream y Zukin (94) muestran que el FK 33-824 posee la misma afinidad por ambos receptores en cerebro de rata, los resultados obtenidos hacen pensar en una acción a través de los δ , ya que el efecto no es antagonizado por la naloxona. Además, el FK 33-824 exhibe propiedades endocrinas distintas a la morfina, así Tolis y cols. (97) prueban que este prototipo de opiáceo administrado al ser humano, aumenta la secreción de prolactina sin alterar los niveles de hormona de crecimiento y cortisol.

121

VI CONCLUSIONES

Sumario de las acciones del FK 33-824 sobre la secreción de las hormonas hipofisarias.

Hormona	FK 33-824	FK 33-824 + naloxona
PRL	+	∅
GH	+	∅
LH	+	∅
FSH	∅	∅
ACTH/Cortisol	+	+



BIBLIOTECA

Sumario de las acciones de la naloxona sobre la secreción de las hormonas hipofisarias.

Hormona	Diurno	Sueño
PRL	∅	∅
GH	∅	+
LH	∅	∅

Efectos endocrinos de la morfina y FK 33-824

Hormona	Morfina	FK 33-824
PRL	+	+
GH	+	+
LH	+	+
FSH	+	∅
ACTH	+	+
Cortisol	∅	∅

VII BIBLIOGRAFIA

1. Tredelenburg, U. (1957). *Brit. J. Pharmacol.* 12, 79-85.
2. Waterfield, A.A. y Kosterlitz, H.W. (1975). *Life Sci.* 16, 1787-1792.
3. Kosterlitz, H.W. y Watt, A.J. (1968). *Br. J. Pharmac. Chemother.* 33, 266-276.
4. Kosterlitz, H.W. y Waterfield, A.A. (1975). *Ann. Rev. Pharmacol.* 15, 29-47.
5. Hughes, J., Smith, T.W., Morgan, B.A. y Forthegill, L.A. (1975). *Life sci.* 16, 1735-1758.
6. Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Forthegill, L.A., Morgan, B.A. y Morris, H.R. (1975). *Nature* 258, 577-579.
7. Hughes, J. (1975). *Brain Res.* 88, 295-308.
8. Henderson, G., Hughes, J. y Kosterlitz, H.W. (1972). *Brit. J. Pharmacol.* 46, 764-766.
9. Li, C.H., Barhafi, L., Chretien, M. y Chung, D. (1965). *Nature* 208, 1093-1094.
10. Graf, L., Barat, E., Cseh, G. y Sajgo, M. (1971). *Biochem. Biophys. Acta* 229, 276-278.
11. Cseh, G., Barat, E., Patthy, A. y Graf, L. (1972). *F.E.B.S. Lett.* 21, 344-346.
12. Li, C.H., Chung, D. (1976). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 1145-1148.
13. Li, C.H., Chung, D. y Doneen, B.A. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 1542-1547.

14. Chretien, M., Benjannet, S., Dragon, N., Seidah, H.G. y Lis, M. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 472-478.
15. Tseng, L.F., Loh, H.H. y Li, C.H. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4187-4189.
16. Lig, N., Burgus, R. y Guillemin, R. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3942-3946.
17. Hughes, J. (1978). *La recherche* 9, 866-875.
18. Yang, H.Y-T., Hong, J.S. y Costa, E. (1977). *Neuropharmacology* 16, 303-307.
19. Wesche, D., Volker, H. y Herz, A. (1977). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 301, 79-82.
20. Yang, H. Y-T., Hong, J.S., Fratta, W. y Costa, E. (1978). En: "Advances In Biochemical Psychopharmacology", vol. 18, Eds. E. Costa y M. Trabucchi (Raven Press, New York). 149-159.
21. Weber, E., Voigt, K.M. y Martin, R. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 6134-6138.
22. Hong, J.S., Yang, H.Y-T. y Costa, E. (1977). *Neuropharmacology* 16, 451-453.
23. Simantov, R., Kuhar, M.J., Uhl, G.R. y Snyder, S.H. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2167-2171.
24. Elde, R., Hökfelt, T., Johansson, O. y Terenius, L. (1976). *Neuroscience* 1, 349-351.

25. Atweh, S. y Kuhar, M. J. (1977). *Brain Res.* 124, 53-67.
26. Kuhar, M.J., Pert, C.B. y Snyder, S.H. (1973). *Nature* 245, 447-450.
27. Pert, C.B. y Snyder, S.H. (1973). *Science* 179, 1011-1014.
28. Simantov, R. y Snyder, S.H. (1976). En: "Opiates and Endogenous Opioids Peptides", Eds. H.W. Kosterlitz (North Holland, Amsterdam) 41-48.
29. Hill, R.G., Pepper, C.M. y Mitchell, J.M. (1976). *Nature* 262, 604-606.
30. Gramsch, C., Holtt, V., Mehraien, P., Pasi, A. y Herz, A. (1979). *Brain Res.* 171, 261-270.
31. Childers, S.R. y Snyder, S.H. (1977) *Neurosci. Abstr.* 3, 288.
32. Terenius, L. y Wahlström, A. (1975). *Life Sci.* 16, 1759-1764.
33. Herz, A. (1978). En: "Developments in Opiate Research", Ed. A. Herz (Dekker, New York). 153-191.
34. Clement-Jones, V., Lowry, P.L., Rees, L.H. y Besser, G.M. (1980). *Nature* 283, 295-297.
35. Di Giulio, A.M., Yang, H-T., Fratta, W. y Costa, E. (1979). *Nature* 278, 646-647.
36. Schultzberg, M., Lundberg, J.M., Hökfelt, T., Terenius, L., Brandt, J., Elde, R.P. y Goldstein, M. (1978). *Neurosciences* 3, 1169-1186.
37. Bowman. W.C., Rand, M.J., West, G.B. (1968). En: "Testbook of Pharmacology" (Oxford), 797.

38. Polak, J.M., Sullivan, S.N., Bloom, S.R., Facer, P., y Pearse, A.G.E. (1977). *Lancet*, 1., 972-974.
39. Bradley, P.B., Briggs, I., Gayton, R.J. y Lambert, L.A. (1976). *Nature* 261, 425-426.
40. Gent, J.P. y Wolstencroft, J.H. (1976). *Nature* 261, 426-427.
41. Zieglgänsberger, W. y Fry, J.P. (1976). En: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides", Ed. M.W. Kosterlitz (North Holland, Amsterdam) 231-238.
42. Frederickson, R.C.A., Nickander, R., Smithwick, E.L., Shuman, R. y Norris, F.H. (1976). En: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides", Ed. H.W. Kosterlitz (North Holland, Amsterdam), 239-246.
43. Frederickson, R.C.A. y Norris, F.H., (1976). *Sciences*, 194, 440-442.
44. Davies, J. y Dray, A. (1976). *Nature* 262, 603-604.
45. Mayer, D.J. y Price, D.D. (1976). *Pain* 2, 379-404.
46. Pert, C.B., Pert, A., Chang, J-K. y Fang, B.T.W. (1976). *Science* 194, 330-332.
47. Zieglgänsberger, W. Bayerl, H. (1976). *Brain Res.* 115, 111-128.
48. Kosterlitz, H.W. y Hughes, J. (1975). *Life Sci.* 17, 91-96.
49. Jhamandas, K., y Sutak, M. (1974). *Br. J. Pharmac.* 50, 57-62.
50. Jhamandas, K., Sawynok, J. y Sutak, M. (1977). *Nature* 269, 433-434.
51. Montel, H., Starke, K. y Weber, F. (1974). *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* 283, 357-369.

52. Taube, H.D., Borowski, E., Endo, T. y Starke, K. (1976). *Eur. J. Pharmacol.* 38, 377-380.
53. Pollard, M., Llorens-Cortes, C., Schwartz, J.C. (1977). *Nature* 268, 745-747.
54. Loh, H.H., Brase, D.A., Sampath-Khanna, S., Mar, J.B. y Way, E.L. (1976). *Nature* 264, 567-568.
55. Moleman, P. y Bruinvels, P. (1979). *Nature* 281, 686-687.
56. Deyo, S.N., Swift, R.M. y Miller, R.J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3006-3009.
57. Del Pozo, E. y Lancranjan, I. (1978). En: "Frontiers in Neuroendocrinology", Eds. W.F. Ganong y L. Martini (Raven Press, New York) Vol. 5, 207-247.
58. Gudelsky, G.A. y Porter, J.C. (1979). *Life Sci.* 25, 1697-1702.
59. Sosa, R.P., McKnight, A.T., Hughes, J. y Kosterlitz, H.W. (1977). *FEBS Lett.* 84, 195-198.
60. McKnight, A.T., Hughes, J. y Kosterlitz, H.W. (1979). *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 205, 199-207.
61. Lewis, R.V., Stein, S., Gerber, L.D., Rubinstein, M. y Udenfriend, S. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4021-4023.
62. Beaumont, A., Dell, A., Hughes, J., Malfroy, B. y Morris, H.R. (1980). En: "Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists", Ed. Way, E.L. (Pergamon Press, New York), 213-216.

63. McKnight, A.T., Sosa, R.P., Corbett, A.D. y Kosterlitz, H.W. (1980). En: "Endogenous and Exogenous Opiate Agonist and Antagonist", ed. Way, E.L. (Pergamon Press, New York), 209-212.
64. Lewis, R.V., Stern, A.S., Rossier, J., Stein, S. y Udenfriend, S. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 822-829.
65. Yang, H-Y.T., Costa, E., Di Giulio, A.M., Fratta, W. y Hong, J.S. (1979). *Fed. Proc.* 38, Abs.711.
66. Kimura, S., Lewis, R.V., Stern, A.S., Rossier, J., Stein, S. y Udenfriend, S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1681-1685.
67. Büscher, H.H., Hill, R.C., Roemer, D., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D. y Pless, J. (1976). *Nature* 261, 423-425.
68. Graf, L., Szekely, J.I., Ronai, A.Z., Dunai-Kovacs, Z. y Bajusz, S. (1976). *Nature* 263, 240-241.
69. Hambrook, J.M., Morgan, B.A., Rance, M.J., Smith, C.F. (1976). *Nature* 262, 782-783.
70. Lane, A.C., Rance, M.J., Walter, D.S. (1977). *Nature* 269, 75-76.
71. Traficante, L.J., Rotrosen, J., Siekierski, J., Tracer, M. y Gershon, S. (1980). *Life Sci.* 26, 1697-1706.
72. Swerts, J.P., Perdrisot, R., Malfroy, B. y Schwartz, J.C. (1979). *Eur. J. Pharmacol.* 53, 209-210.
73. Malfroy, B., Swerts, J.P., Llorens, C. y Schwarz, J.C. (1979). *Neuroscience Letters* 11, 329-333.
74. Gorenstein, Ch. y Snyder, S.H. (1979). *Life Sci.* 25, 2065-2070.

75. Martin, W.R. (1967). *Pharmac. Rev.* 19, 463-521.
76. Martin, W.R., Eades, C.G., Thomson, J.A. Huppler, R.E. y Gilbert, P.E. (1976). *J. Pharmac. Exp. Ther.* 197, 517-532.
77. Hutchinson, M., Kosterlitz, M.W., Leslie, F.M. y Waterfield, A.A. (1975). *Brit. J. Pharmac.* 55, 541-546.
78. Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. y Kosterlitz, H.W. (1977). *Nature* 267, 495-499.
79. Kosterlitz, H.W., Lord, J.A.M., Paterson, S.J. y Waterfield, A.A. (1980). *Br. J. Pharmac.* 68, 333-342.
80. Gillan, M.G.C., Kosterlitz, H.W. y Paterson, S.J. (1980). *Brit. J. Pharmac.*
81. Wüster, R.S., y Herz, A. (1978). *Neuroscience Letters* 15, 193-198.
82. Frederikson, R.C.A. (1977). *Life Sci.* 21, 23-42.
83. Morgan, B.A., Smith, C.F.C., Waterfield, A.A., Hughes, J. y Kosterlitz, H.W. (1976). *J. Pharm. Pharmac.* 28, 660-661.
84. Terenius, L., Wahltröm, A., Lindeberg, G., Karlsson, S. y Ragnarsson, U. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 175-179.
85. Chang, J.K., Fong, B.T.W., Pert, A. y Pert, C.B. (1976). *Life Sci.* 18, 1473-1482.
86. Coy, D.H., Kastin, A.J., Schally, A.V. Morin, U., Garon, N.G., Labrie, F., Walker, J.M., Fertel, R., Berntson, G.G. y Sandman, C.A. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 632-638.

87. Roemer, D., Buescher, H.H., Hill, R.C., Pless, J., Bauer, W., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D., Huguenin, R. (1977). *Nature* 268, 547-549.
88. Hill, R.C., Roemer, D. y Buescher, H.M. (1978). En: "Advances in Biochemical Psychopharmacology", Vol. 18, eds. E. Costa y M. Trabucchi (Raven Press, New York), 211-215.
89. Bloom, F., Segal, D., Ling, N. y Guillemin, R. (1976). *Science* 194, 630-632.
90. Izumi, K., Motomatsu, T., Chretien, M. Butterworth, R.F., Lis, M., Seidah, H. y Barbeau, A. (1977). *Life Sci.* 20, 1149-1156.
91. Tseng, L.F., Loh, H.H. y Li, C.L. (1976). *Nature* 263, 239-240.
92. Dupont, A., Cusan, L., Labrie, F., Coy, D.H. y Li, C.H. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 75, 76-82.
93. Kwen-Jen, Ch., Barrett, R.C., Hazzin, E. y Cuatrecasas, P. (1979). *Mol. Pharmacol.* 16, 91-104.
94. Kream, R.M. y Zukin, S. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 99-109.
95. Revisión general (1979). En: "Endocrine Rhythms", Ed. D.T. Krieger (Raven Press, New York).
96. Enjalbert, A., Ruberg, M., Fiore, L., Arancibia, S., Priam, M. y Kordon, C. (1979). *Eur. J. Pharmacol.* 53, 211-212.
97. Tolis, G., Hickey, J. y Guyda, H. (1975). *J. Clin. Endocr. Metab.* 41, 797-800.

98. Stubbs, W.A., Delitala, G., Jones, A., Jeffcoate, W.J., Edwards, C.R.W., Ratter, S.J., Besser, G.M., Bloom, S.R. y Alberti, K.G.M.M. (1978). *Lancet* II, 1225-1227.
99. Del Pozo, E., von Graffenried, B., Brownell, J., Derrez, F. y Marbach, P. (1980). *Hormone Res.* 13, 90-97.
100. Ieri, T., Chen, H.T., Campbell, G.A. y Meites, I. (1980). *Endocrinology* 106, 1568-1570.
101. Cicero, T.J., Badger, T.M., Wilcox, C.E., Bell, R. D. y Meyer, E.R. (1977), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 203, 548-555.
102. Cicero, T.J., Schainker, B.A. y Meyer, E.R. (1979). *Endocrinology* 104, 1286-1291.
103. Packman, P.M. y Rothchild, J.A. (1976). *Endocrinology* 99, 7-10.
104. Bohnet, H.G., Dahlen, H.G. y Schneider, H.P.G. (1974). *Acta Endocrinol. (Kbh.) (Suppl.)* 184, 109.
105. Krieger, D.T. y Zimmerman, E.H. (1977). En: "Clinical Neuroendocrinology", eds. L. Martini y G. M. Besser (Academic Press, Inc., New York), 363-391.
106. Gillies, G.T.B., van Wimersma, G. y Lowry, P.J. (1978). *Endocrinology* 103, 528-534.
107. Gillies, G.T.B. y Lowry, P.J. (1979). *Nature* 278, 463-464.
108. Jasinski, D.R., Martin, W.R. y Haertzen, C.A. (1967). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 157, 420- .
109. Evans, L.E.J., Swainson, C.P., Roscoe, P. y Presscott, L.F. (1973). *Lancet* I, 452-455.

110. Brownell, J., del Pozo, E. y Donatsch, P. (1980). *Acta Endocrinol. (Kbh)* 80, 444-452.
111. Rechtschaffen, y Kales.
112. Hwang, P., Guyda, H. y Friesen, H. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1902-1906.
113. Marbach, P. y Haller, R. (1975). Comunicación interna, Sandoz S.A. (Basilea, Suiza).
114. Girard, J., Baumann, J.B., Bühler, U., Zuppinger, K., Haas, H.G., Staub, J.J. y Wyss, H.I. (1978). *J. Clin. Endocrinol.* 47, 581-586.
115. Marbach, P., Götz, U., Veteau, J.P. y Wagner, H. (1978). En: "Radioimmunoassay and Related procedures in Medicine", ed. por International Atomic Energy Agency, Viena, 1, 383-397.
116. Takahashi, Y., Kipnis, D.M. y Daughaday, W.H. (1968). *J. Clin. Invest.* 47, 2079-2090.
117. Sassin, J. F., Parker, D.C., Johnson, L. C., Rossman, L. G., Mace, J.W. y Gotlin, R.W. (1969). *Life Sci.* 8, 1299-1307.
118. Sassin, J. F., Parker, D.C., Mace, J. W., Gotlin, R. W., Johnson, L. C. y Rossman, L. G. (1969). *Science* 165, 513-515.
119. Von Graffenried, B., del Pozo, E., Roubicek, I., Krebs, E., Pöldinger, W., Burmeister, P., y Kerp, L. (1978). *Nature* 272, 729-730.
120. Grossman, A., Stubbs, W.A., Gaillard, R.C., Delitala, G. Rees, L.H., Besser, G.M. (1981). *Clin. Endocr.* (en prensa).

121. Rolandi, E., Cichetti, V., Sannia, A., Magnani, G. y Barreca, T. (1980). *I.R.C.S. Medical Sci.* 8, 235.
122. Barreca, T., Marabini, A., Magnani, G., Sannia, A. y Rolandi, E. (1980). *I.R.C.S. Medical Sci.* 8, 908.
123. Morley, J.E., Baranetsky, N.G., Wingert, T.D., Carlson, H.E., Hershman, J.M., Melmed, S., Levin, S.R., Jamison, K.R., Weitman, R., Chang, R.J. y Vanner, A.A. (1980). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50, 251-257.
124. Rubin, P., Swezey, S. y Blaschke, T. (1979). *Lancet* I, 1293.
125. Gold, M.S., Redmond, D.E. y Donabedian, R.K. (1978). *Lancet* I, 323.
126. Davis, G.C., Duncan, W.C., Gillin, J.C. y Brunney, W.E. (1977). *Commun. Psychopharmacol.* 1, 489-492.
127. Martin, J.B., Tolis, G., Woods, I. y Guyda, H. (1979). *Brain Res.* 168, 210-215.
128. Tolis, G. (1979). *New England J. Medicine* 301, 164-165.
129. Shaar, G.J., Frederickson, R.C.A., Diniger, N.B. y Jackson, L. (1977). *Life Sci.* 21, 853-860.
130. Rivier, C., Vale, W., Ling, N., Brown, M. y Guillemin, R. (1977). *Endocrinology* 100, 238-241.
131. Enjalbert, A., Ruberg, M., Arancibia, S., Priam, M. y Kordon, C. (1979). *Nature* 280, 595-596.
132. Simantov, R. y Snyder, S.H. (1977). *Brain Res.* 124, 178-184.

133. Ferland, L., Fuxe, K., Eneroth, P., Gustafsson, J. y Skett, P. (1977). *Eur. J. Pharmacol.* 43, 89-90.
134. Tolis, G., Dent, R. y Guyda, H. (1978). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47, 200-203.
135. Agnati, L.F., Benfenati, F., Cortelli, P., D'Alessandro, R., Chisoli, E. y Zampa, G.A. (1979). *Neurosci. Lett.* 12, 307-311.
136. Yarbrough, G.G., Buxbaum, D.M. y Sander-Bush, E. (1973) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 328-335.
137. Van Loon, G.R. y De Souza, E.B. (1978) *Life Sci.* 23, 971-978.
138. Clemens, J.A., Roush, M.E. y Fuller, R.W. (1978). *Life Sci.* 22, 2209-2214.
139. Koenig, J.I., Mayfield, M.A., McCann, S.M. y Krulich, L. (1979). *Life Sci.* 25, 853-864.
140. Spampinato, S., Locatelli, V., Cocchi, D., Vicentini, L., Bajusz, S., Ferri, S. y Müller, E.E. (1979). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105, 163-170.
141. Dupont, A., Cusan, L. y Ferlund, A. (1979). En: "Central nervous system effects of hypothalamic hormones and other peptides", ed. R. Collu (Ravens Press. New York), 301-313.
142. Tache, Y., Charpenet, G., Chretien, M. (idem).
143. Agnati, L.F., Fuxe, K., Hökfelt, T., Goldstein, M. y Jeffcote, ST. L. (1977). *J. Histochem. Citochem.* 25, 1222-1236.

144. Anderson, K., Fuxe, K., Eneroth, P., Gustafsson, J.A. y Skell, P. (1977). *Neurosci. Lett.* 5, 83-89.
145. Casanueva, F., Betti, R., Frigerio, C., Cocchi, D., Mantegazza, P. y Müller, E.E. (1980). *Endocrinology* 106, 1239-1245.
146. Casanueva, F., Betti, R., Cocchi, D., Chieli, T., Mantegazza, P. y Müller, E.E. (1981). *Endocrinology* 108, 157-163.
147. Muraki, T., Tokunaga, Y., Matsumoto, S. y Makino, T. (1978). *Arch. Int. Pharmacodyn.* 233, 290-295.
148. Blankstein, J., Reyes, F.I., Winter, J.S.D. y Faiman, C. (1981). *Clin. Endocr.* 14, 287-294.
149. Grossman, R., Moutt, P.J.A., Gaillard, R.C., Delitala, G., Toff, W.D., Rees, L.H. y Besser, G.M. (1981). *Clin. Endocr.* 14, 41-47.
150. Moutt, P.J.A., Grossman, A., Evans, J.M., Rees, L.H. y Besser, G.M. (1981). *Clin. Endocr.* 14, 321-324.
151. Quigley, M.E., Sheehanm, K.L., Casper, R.F. y Yen, S.S.C. (1980). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50, 949-954.
152. Cicero, T., Wilcox, C.E., Bell, R.D. y Meyer, E.R. (1980). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 573-578.
153. Fishman, J., Baiba, I.N., y Hahn, E.F. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2574-2576.
154. Pearlmutter, A.F., Dokas, L., Miller, R. y Saffran, M. (1980). *Nature* 283, 697-698.

155. Gillies, G.E. y Lowry, P.J. (1980). Nature 283, 698.
156. Gillies, G.E. y Lowry, P.J. (1980). J. Endocr. 84, 65-73.

