

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Morfología Microscópica



TESIS DOCTORAL

**Morfinomiméticos : aspectos farmacodinámicos en Ileon de
cobayo estimulado coaxialmente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Amaya Aleixandre de Artiñano

DIRECTOR:

Perfecto García de Jalón y Hueto

Madrid, 2015

María Amaya Aleixandre Artiñano

TP
1981
117



x-53-011604-2

MORFINOMIMETICOS: ASPECTOS FARMACODINAMICOS EN ILEON
DE COBAYO ESTIMULADO COAXIALMENTE

Departamento de Morfología Microscópica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© María Amaya Aleixandre Artiñano
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-15932-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MORFINOMIMÉTICOS: ASPECTOS FARMACODINÁMICOS EN ILEON DE COBAYO
ESTIMULADO COAXIALMENTE.

Doctorando: M^º Amaya Aleixandre Artiñano

MADRID, Marzo 1979

DPTO. COORDINADO DE FARMACOLOGIA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DIOR.: PROF. P. D. GARCIA DE JALON

FACULTAD DE MEDICINA
PABELLON 3
CIUDAD UNIVERSITARIA
MADRID-3
TELEFOS. 243 78 55 - 449 34 33

PERFECTO GARCIA DE JALON HUETO, CATEDRATICO DIRECTOR DEL DE-
PARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que el trabajo experimental titulado "MORFINOMIME-
TICOS: ASPECTOS FARMACODINAMICOS EN ILEON DE COBA-
YO ESTIMULADO COAXIALHENTE", ha sido realizado por
Dña. M^{ra} Amoya Aleixandre Artiñano bajo mi dirección
y tutela, reuniendo todas las condiciones necesarias
para que con él pueda aspirar a la obtención del
grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, a 2 de Marzo de 1.979

EL DIRECTOR



P. D. Garcia de Jalon

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Garcia de Jalón, director de esta tesis por haberme permitido realizar su estudio en este Departamento, así como por su corrección y consejos sobre el tema.

Al Prof. Dr. Fraile que gustosamente aceptó ser su ponente en la Facultad de Ciencias Biológicas.

A la Dra. Lastra por sus decisivas enseñanzas que despertaron mi interés en el presente trabajo y a la Dra. ^{lra} Isabel Martín por su valioso apoyo y participación en él.

A Isabel Gomez y a Mariano Lorenzo que con su incondicionable colaboración en este departamento hicieron posible su realización, y a ^{lra} Elena Vicente por la estimable labor de mecanografiarlo.

Al resto de los compañeros por la ayuda diaria de todo tipo especialmente al Dr. Juan Tamargo, al Dr. Pedro Lorenzo y a la Dra. Melita Rodríguez por todas sus orientaciones en Farmacología.

A todos mi más sincera gratitud.

A mis padres.

INTRODUCCION

I) INTRODUCCION

1. Liberación de acetilcolina en el intestino de cobayo.
2. Opiáceos.
 - 2.1. Receptores opiáceos: Generalidades.
 - 2.2. Influencias en la unión específica al receptor opiáceo.
 - 2.3. Naturaleza y modelos del receptor opiáceo.
 - 2.4. Distribución, desarrollo, y localización de receptores morfinicos.
 - 2.5. Efectos centrales de la morfina.
 - 2.6. Dependencia morfinica (S.N.C.).
 - 2.7. Receptores morfinicos en el S.N.P.: Generalidades.
 - 2.7.1. Morfinomiméticos en el ileon de cobayo.
 - 2.7.2. Dependencia intestinal.
 - 2.7.3. Morfinomiméticos en la membrana nictitante de gato.
 - 2.7.4. Morfinomiméticos en el conducto deferente de ratón.
3. Endorfinas: Generalidades.
 - 3.1. Receptores de encefalinas.
 - 3.2. Acciones y función de endorfinas y encefalinas. Su importancia para explicar los fenómenos de dependencia.
 - 3.3. Liberación de endorfinas por el ileon de cobayo.
4. Sustancia P.
5. Cafeina y bases xánticas: Generalidades y su efecto en la contractión.
 - 5.1. Efectos de metilxantinas en ileon de cobayo.

1. Liberación de Acetilcolina en el intestino de cobayo.

La fuente intestinal de Ach. se ha discutido desde hace tiempo, y su posible procedencia no nerviosa fué la cuestión más debatida. En 1938 DIKSHIT (citado por PATON y col., 1968), llegó a la conclusión de que la Ach tenía un origen exclusivamente nervioso, basándose para ello en la asociación que obtuvo en sus preparaciones entre contenido de Ach y la presencia o ausencia de desarrollo del plexo de Auerbach. Por el contrario FELDBERG y LIN en 1949 y 1950 (citados por PATON y col., 1968), piensan que en el conejo y en el cobayo la Ach del intestino tiene en parte un origen no nervioso. En 1963 JOHNSON, concluye que se origina en fuentes nerviosas después de realizar ensayos con varios fármacos y con cambios en la temperatura y en las condiciones iónicas. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que parte de la Ach liberada por el intestino provenga de la fibra lisa muscular propiamente, e incluso esto está apoyado por observaciones de su formación en otros tejidos no nerviosos (PATON y col. 1968).

MAGNUS en 1904 había observado que era posible separar el músculo circular y el longitudinal, pero la mayoría del plexo de Auerbach se arrastraba con las tiras de músculo longitudinal. Otros investigadores hicieron observaciones similares, y los exámenes de microscopía electrónica hechos por PATON en 1964, sugieren la posibilidad de separar completamente el tejido nervioso del músculo liso. El plexo de Auerbach con las ramificaciones nerviosas originadas en él, parecen formar un estrato en la cara in-

terna del músculo longitudinal, y no mandan fibras nerviosas que penetren al estrato muscular. Si éste fuese el caso, la eliminación total del plexo de Auerbach representaría en ésta especie la denervación total. Al microscopio aparecía la parte proximal, donde comienza la separación de las fibras longitudinales, con el plexo; la distal completamente exenta de plexo; y una zona intermedia exenta en sus márgenes, pero que retiene el plexo en el centro adoptando a veces forma de V.

PATON en 1955 observó la posibilidad de producir y registrar contracciones en el ileon de cobayo estimulado con dos electrodos, uno de los cuales estaba suspendido en la solución que bañaba el órgano, y el otro en el lumen intestinal. También se registraron contracciones aplicando dos electrodos a las fibras longitudinales inervadas, y las tiras denervadas no dan respuesta o la dan muy pequeña (PATON. y col. 1968). Por otra parte, las experiencias que miden la liberación de Ach en reposo y en idénticas condiciones de estimulación de tiras longitudinales inervadas y denervadas, dan siempre una liberación de Ach de las fibras denervadas al menos un 5% menor de la liberación de las inervadas (PATON y col. 1968).

La liberación de Ach en reposo de tiras de músculo longitudinal por unidad de peso es dos veces la liberación del ileon completo. Considerando que el peso de la musculatura longitudinal es aproximadamente el 10% de la de todo el ileon, esto implica que la quinta parte de la liberación en descanso del intestino proviene de la musculatura longitudinal y está asociada con el plexo de

Auerbach. El contenido en Ach se vió que en el músculo longitudinal es unas tres veces el contenido del ileon completo por unidad de peso, y teniendo en cuenta los pesos relativos de los dos, esto significa que aproximadamente la cuarta parte de la Ach de todo el intestino está en el músculo longitudinal y asociada con el plexo (PATON y col., 1968). En ambas preparaciones hay un incremento considerable en la liberación de Ach como consecuencia de la estimulación por campo, y PATON en 1963 observó que en el intestino entero al aumentar la frecuencia de estimulación la liberación por descarga caía, aunque la liberación por minuto aumentaba. El intestino entero y la fibra longitudinal se comportan de forma similar respecto a variaciones de frecuencia, lo que parece indicar que el origen de la Ach es el mismo en ambos casos (PATON y col., 1968).

Ya en 1957 PATON, observó con la técnica de estimulación coaxial que la morfina al igual que la cocaína reducen la liberación de Ach con una reducción mayor en reposo y con estimulación a bajas frecuencias que con estimulación a frecuencias mayores. La sensibilidad a la cocaína y a la morfina también son similares en todo el intestino y en las tiras longitudinales, y la liberación de Ach adicional por el intestino entero parece ser que tiene un origen en tejido nervioso también. La presencia de lugares de síntesis y liberación de Ach en la membrana mucosa, similares a los del plexo de Auerbach por ejemplo no parece que se pueda negar (PATON y col. 1963).

Nuevamente en 1963 y 1970 COMTE y cols., establecieron

que la morfina a concentraciones bajas deprime la liberación de Ach del plexo longitudinal estimulado a bajas frecuencias. En presencia de morfina la liberación por descarga es menor y casi constante a frecuencias comprendidas entre 0.1 Hz y 10 Hz, mientras que sin morfina la liberación por descarga es más alta a bajas frecuencias de estimulación y cae al incrementar la frecuencia. Resultados similares se obtuvieron en la correspondiente preparación de conejo, pero los valores absolutos de la cantidad de Ach liberada son solo la décima parte de los obtenidos en cobayo, y además en el conejo la liberación no se afecta por dosis de morfina que afectan la liberación en el cobayo (GREENBERG, y cols, 1970). Por otra parte, también se estableció que la depresión de la liberación de Ach que la morfina origina en el plexo longitudinal de cobayo es mayor utilizando pulsos simples de frecuencias bajas que utilizando grupos de pulsos de 10 pulsos a intervalos de 20 milisegundos. Aumentando el número de pulsos por grupo la diferencia en la liberación de Ach con o sin morfina no aumenta (GREENBERG y cols. 1970).

La alta liberación de Ach en reposo y a bajas frecuencias, frente a la escasa liberación por minuto a altas frecuencias de estimulación, y la sensibilidad a la morfina dependiente de la estimulación, están ligados a la ausencia de uniones neuroefectoras especializados representando las características de un sistema relativamente primitivo de transmisión (PATON y col. 1968).

Hay que señalar que la porción terminal más próxima a la unión ileo-cecal del ileon de cobayo tiene receptores alfa adrenérgicos excitadores (MUNRO, 1953) por lo que normalmente se desprecia en las preparaciones de ileon de cobayo.

2. Opiáceos.

Posiblemente ya los efectos psicológicos del opio se conocían en tiempos de los sumerios (4.000 a.C.); pero la primera referencia clara que tenemos sobre el llamado jugo de adormidera, está en los escritos de Teofrasto que datan de la tercera centuria antes de Cristo. La Grecia clásica utiliza el opio no solo para aliviar el dolor, si no por su poder euforizante. El término opio deriva de la palabra griega opión, que significa jugo o zumo.

Los médicos árabes conocían bien sus usos, y los comerciantes árabes lo introdujeron en Oriente, donde se utilizó fundamentalmente para controlar las disenterías.

A mediados de la sexta centuria el conocimiento del opio en Europa con usos que todavía prevalecen era un hecho. En la octava centuria se hicieron populares en Oriente los fumadores de opio, y en Europa el uso de los opiáceos por sus efectos subjetivos fué bastante aceptado sin llegar todavía a suponer un problema social.

En 1803 un joven farmacéutico alemán, SERTURNER, aisló y describió un alcaloide del opio que llamó morfina en honor del dios griego del sueño Morfeo. A mediados del siglo XIX ya se había extendido la utilización de la morfina en sustitución de los preparados crudos del opio.

La invención de la aguja hipodérmica y el uso parenteral de la morfina acentuaron los problemas de su dependencia física. En E.E.U.U. el problema se acentuó por la afluencia de trabajadores chinos fumadores de opio, por la administración de opiáceos

a los soldados heridos en la guerra civil, y por la disponibilidad no restringida hasta los primeros años de esta centuria. El problema social creado aceleró la búsqueda de opiáceos sintéticos que no ocasionasen toxicomanía. (JAFPE y col., 1975 y SNYDER, 1977).

2.1. Receptores opiáceos: Generalidades.

Los receptores son macromoléculas que tienen por función el reconocimiento de forma específica de la molécula efectora a la cual ellos corresponden. Establecen con ella una unión induciendo la activación de un sistema biológico dado. Según CUATRECASAS postuló en 1975 (citado por JACOB y col. 1978), los criterios que debe satisfacer la unión a receptores específicos por un ligando los resumiríamos en los siguientes puntos:

- a) Unión específica, y estereoespecífica si hay lugar a ello.
- b) Unión saturable, lo que implica número limitado de receptores.
- c) Afinidades relativamente altas.
- d) Distribución de los lugares de unión concordante con las zonas sensibles al ligando estudiado.
- e) Unión reversible.

Estos criterios no son limitativos y se pueden adoptar otros. Por otra parte tampoco tienen valor absoluto excluyente cada uno en particular.

El reconocimiento específico de las moléculas efectoras agonistas por las moléculas receptoras desencadena una serie de procesos que en último término traen como consecuencia la producción del efecto farmacológico. Este no es el caso de las moléculas

antagonistas, que por su conformación estructural cumplen los requisitos que les permiten unirse a los receptores, pero la consecuencia de esta unión no es la producción del citado efecto farmacológico, sino por el contrario el bloqueo del receptor que no puede unirse a los agonistas para que tenga lugar tal proceso.

Hay diversos hechos que apoyan el concepto de receptor específico para las sustancias opiáceas, pues producen efectos altamente selectivos a concentraciones muy bajas. A parte de esto la morfina y la mayoría de los opiáceos presentan una estructura en T con dos anchas superficies hidrófobas que forman entre sí ángulo recto, un grupo hidróxilo capaz de formar enlaces de hidrógeno, y un átomo de nitrógeno con carga positiva capaz a su vez de formar un enlace iónico. Es decir, que en ellas tendríamos que considerar una relación estructura-actividad, que exige incluso una isomeria levorrotatorio para las moléculas, y que puede convertir por otra parte a una molécula activadora en inhibidora del efecto analgésico por ligeras modificaciones estructurales (SNYDER, 1977). (figuras 1 y 2).

Los primeros estudios que han tentado la búsqueda de receptores opiáceos han utilizado estos compuestos marcados por un radioisótopo, y los han administrado in vivo determinando su fijación por medidas de la radiactividad en los tejidos. Se ha intentado dilucidar la forma física del supuesto receptor opiáceo ateniéndose a sus propiedades de estereoespecificidad, y se han administrado isómeros + y - . En ocasiones se ha fracasado en el intento de poner en evidencia la citada unión estereoespecífica.

Estos fracasos se deben principalmente a la escasa radiactividad específica de los ligandos utilizados por una parte, y al hecho de que la unión observada era solamente estereoespecífica en una proporción muy débil, que a menudo estaba enmascarada por una fijación muy importante no específica. La utilización de ligandos de elevada radiactividad a concentraciones bajas solventó el problema, pues de ésta manera la unión estereoespecífica está privilegiada. Sin embargo, el solo hecho de unirse estereoespecíficamente no es suficiente para establecer una asociación entre un opiáceo y un receptor. Algunos constituyentes del tejido cerebral ordenados de forma simétrica a los opiáceos, pero distintos de los receptores, discriminarían entre sus dos isómeros. SNYDER comprueba que no solo ocurre esto con ciertas sustancias grasas cerebrales, si no que los opiáceos se unen estereoespecíficamente incluso a algunos filtros de fibra de vidrio (SNYDER, 1977). Por otra parte la especificidad como siempre es relativa, y sustancias que no se consideran morfínicos tienen poder de desplazar a ligandos radiactivos. De ésta forma los anestésicos locales inhiben competitivamente la fijación estereoespecífica de la nal-trexona tritiada en el cerebro de ratón, y los esteroides son desplazados competitivamente por los opiáceos (JACOB y col. 1978).

A partir de 1973, combinando técnicas de radiactividad específica elevada y de separación de moléculas libres y unidas a receptores, tres laboratorios han observado de forma independiente uniones estereoespecíficas de morfínicos. TERENIUS en 1973

(citado por JACOB y cols. 1978), ha estudiado la unión de dihidromorfina tritiada sobre membranas sinaptosomales purificadas de cerebro de rata; SIMON y sus colaboradores (citado por JACOB y cols. 1978), la de la etorfina tritiada sobre homogeneizados de cerebro de rata; y PERT y SNYDER (1973a) la de la naloxona tritiada sobre el mismo material. Las fracciones tisulares fueron incubadas con el ligando radiactivo, en presencia o no de isómeros activos e inactivos (generalmente el levorfanol y el dextrorfán). Después de la separación de moléculas libres y unidas del ligando por equilibrio de diálisis, centrifugación, o ultracentrifugación, la actividad de las moléculas se determinó y no fue modificada por la presencia de dextrorfán (isómero inactivo), mientras que lo fue disminuyendo fuertemente por la del levorfanol (isómero activo). La diferencia observada corresponde a la fijación estereoespecífica del ligando tritiado. Después muchos laboratorios han confirmado estos resultados con ayuda de técnicas similares.

Las uniones estereoespecíficas de ligandos opiáceos dan constantes de disociación lentas que corresponden a afinidades relativamente altas. Las uniones son sensibles al pH del medio de incubación y dependientes de la temperatura (PERT y col. 1973a).

Para asegurarse que los receptores morfinicos puestos en evidencia sobre homogeneizados de tejido cerebral, no corresponden a artefactos de preparación, ciertos autores han rebuscado la existencia de estos lugares de unión sobre tejidos intactos.

Así HUANG y TAKEJORI (citados por JACOB y cols. 1970) han estudiado la unión de la etorfina tritfada sobre cortes cerebrales de corteza y cuerpo estriado, y han vuelto a encontrar una unión estereoespecífica saturable y de alta afinidad.

Se han sugerido modelos de receptores basandose en relaciones estructura-actividad que requieren una interacción iónica entre los fármacos morfínicos y sus receptores. Por lo tanto entre los compuestos de estructura similar los altamente ionizados al pH fisiológico de 7,4 deberían tener favorecida su unión estereoespecífica, mientras que sus interacciones inespecíficas hidrofóbicas serían menores. Por otra parte las interacciones hidrofóbicas inespecíficas y los componentes hidrofóbicos de las reacciones de la unión específica dependen de la fuerza iónica en el medio que rodea al receptor, de forma que al aumentar la fuerza iónica se favorecen las interacciones hidrofóbicas (HOLLT y col. 1975).

Se ha llegado a la conclusión de que hay tres clases de interacciones entre un opiáceo y las membranas que contienen sus receptores (GOLDSTEIN, 1976):

- a) Una interacción no saturable que consiste en una solución física de las moléculas de opiáceo lipofílico en las membranas lipídicas.
- b) Una unión saturable, no específica, que consiste fundamentalmente en interacciones entre el átomo de nitrógeno protonado del opiáceo y los grupos aniónicos de las moléculas de las mem-

branas.

- c) Una interacción estereoespecífica de los opiáceos con los receptores opiáceos.

2.2. Influencias en la unión específica al receptor opiáceo.

Ensayos experimentales "in vitro" parecen indicar afinidades semejantes para agonistas y antagonistas, mientras que en ensayos "in vivo" los inhibidores son mucho más potentes que los activadores opiáceos. PERT y SNYDER en 1973 y 1974 demostraron la influencia del sodio en la fijación de ligandos morfínicos marcados; "in vivo" el sodio favorece la unión de los antagonistas a los receptores, Este efecto es específico del sodio, solo el litio, con un radio atómico del mismo orden, tiene efectos similares, pero no otros iones con carga positiva como el potasio, el rubidio y el cesio.

Todo indica que el receptor opiáceo existe en dos conformaciones y cuando está en la conformación-sodio se une preferentemente a los antagonistas, mientras que en la conformación-No-sodio se une a los agonistas. Las acciones farmacológicas ocurren solo como consecuencia de uniones de agonistas, mientras que las uniones de antagonistas reducen el número de conformaciones-No-sodio del receptor disponibles para los agonistas. Ambas conformaciones serían interconvertibles (figura 3).

La afinidad de un ligando por su receptor se determina en parte por su velocidad de disociación; así, se puede predecir

una constante de disociación menor para uniones de mayor afinidad. Se ha comprobado la existencia de lugares de unión para un opiáceo dado de alta y de baja afinidad. Así, PASTERNAK y SNYDER en 1975a, utilizando ^3H naloxona (antagonista), y ^3H dihidromorfina (agonista), evidenciaron uniones de alta afinidad opiácea frente a las ya descritas anteriormente de menor afinidad. El significado funcional de los lugares de unión de alta y baja afinidad opiácea se explicaría también proponiendo dos conformaciones distintas para el receptor opiáceo, de tal forma que un ligando determinado presentaría una alta afinidad por una de las conformaciones, y menor por la otra. Los lugares de alta afinidad encontrados por PASTERNAK y SNYDER para la ^3H naloxona se corresponderían con la unión a la conformación-sodio-antagonista del receptor, mientras que su baja afinidad de unión tiene lugar en los sitios con la conformación-No-sodio-agonista del receptor. Igualmente, las uniones de baja afinidad de ^3H dihidromorfina implican un estado antagonista del receptor, ya que ella se comporta fundamentalmente como agonista. Estas dos conformaciones se corresponden a las admitidas por ALEXANDER GERO: Conformación nativa (receptor- Na^+) y la conformación distorsionada producida por la activación del receptor por los agonistas morfínicos (GERO, 1978).

El efecto discriminador del sodio es dependiente de la temperatura (CREESE y SNYDER, 1975). La unión de antagonistas en presencia de sodio está disminuida por un aumento de la tempera-

tura entre 0° y 30°, mientras que el efecto inverso tiene lugar para los agonistas. Cambios conformacionales también pueden explicar éste fenómeno.

El grupo de SIMON (1975b), también apoya la teoría del sodio, y los estudios en las variaciones de fijación llevan a SIMON a la conclusión de que el sodio aumenta la afinidad de los antagonistas sin desencadenar la puesta en marcha de nuevos lugares de unión, de forma que el número total de receptores permanecería siempre inalterado.

SNYDER introduce el factor llamado "Índice de sodio" que representa la relación entre la concentración del morfinomimético necesaria para inhibir la unión de la naloxona en un 50% en presencia de sodio, y la concentración del morfinomimético necesaria en ausencia de sodio. Los valores pequeños del índice de sodio corresponden a fármacos con marcado carácter antagonista, ya que en ausencia de sodio disminuye mucho su capacidad para unirse al receptor opiáceo (medida por la inhibición que ejerce sobre la unión de la naloxona) (figura 4). La figura 4 es bien demostrativa a este respecto, pero debe quedar bien claro que no existe relación alguna entre la actividad analgésica y el índice de sodio, puesto que aquella está más en relación con la actividad intrínseca que con el grado de afinidad.

El grupo de PASTERNAK (1975b) ha puesto en evidencia un efecto discriminador de iones divalentes. El manganeso aumenta la unión de agonistas y no modifica la de antagonistas. El magnesio

y el níquel poseen también esta propiedad en un grado menor. Por el contrario, los iones ferrosos y el cobre disminuyen la fijación de los agonistas. Estos efectos son por otra parte más netos cuando el medio contiene sodio. La sustancia quelante EDTA inhibe la fijación del agonista sin modificar la del antagonista, efecto reversible por la adición de Mn^{++} . En cambio el quelante más específico del Ca^{++} el EGTA, no modifica la fijación de los agonistas a sus receptores.

Los reactivos de proteínas influyen también sobre la unión. El grupo de SIMON en 1973 (citado por JACOB y cols. 1978), y el de PASTERNAK en 1975c,d, han observado los efectos inhibitorios de muy débiles concentraciones de tripsina o quimiotripsina sobre la fijación de ligandos radiactivos. Estos tratamientos enzimáticos como los de fosfolipasa A reducen más la fijación de agonistas que la de antagonistas, siendo más marcado éste efecto en presencia de sodio. Además las sustancias que modifican las proteínas por reaccionar con grupos sulfhidrilo reducen también la capacidad de fijación de los agonistas al material receptor en mayor proporción que la de los antagonistas; sin embargo, si los agonistas están fijados antes del tratamiento protegen el lugar.

2.3. Naturaleza y modelos del receptor opiáceo.

Diversos modelos teóricos de receptores se han propuesto, pero ninguno es plenamente satisfactorio por el momento, ya que el aislamiento y la purificación de receptores opiáceos no

se ha realizado aún con garantía absoluta.

El grupo de GOLDSTEIN (LOWNEY y cols. 1974), ha extraído un material proteolipídico mediante una mezcla de cloroformo y metanol, que resultó ser capaz de fijar a los opiáceos de forma estereoespecífica. Estos autores piensan que posiblemente existan diversos tipos de receptores.

SIMON y sus colaboradores (1975a) han solubilizado con ayuda de un detergente no iónico un complejo receptor sobre el cual la etorfina está unida de forma estereoespecífica. Este complejo cuando se separa es sensible a las enzimas proteolípídicas y a los reactivos de las proteínas y esto hace probable que su naturaleza fuese protéica. Sin embargo, una vez disociado el ligando, esta macromolécula no es capaz de volverlo a fijar.

LOH y sus colaboradores en 1975 y CHO con los suyos en 1976 (citados por JACOB y cols. 1978), han presentado un modelo estructural de receptor de acuerdo con los teóricos propuestos por PORTOGHESE en 1975 (citado por JACOB y cols. 1978). Este modelo hace intervenir a los cerebrosidos, sobre los cuales los opiáceos se fijan de forma estereoespecífica con alta afinidad. Las diferencias observadas entre las afinidades de agonistas y de antagonistas se podrían explicar por la existencia de puentes electrostáticos entre la molécula opiácea y los cerebrosidos. Estos puentes serían más numerosos en el caso de los antagonistas que en el de los agonistas. Se llegó a la conclusión de que uno de los constituyentes más importantes de los cerebrosidos en la

unión sería la fosfatidilserina. Se puede sugerir que estos cerebrosidos representan todo o parte del receptor, pero no pueden identificarse realmente a un receptor funcional. Desde luego la distribución de los cerebrosidos es bastante general, pero se podría pensar que ciertos de entre ellos representarían los lugares de reconocimiento del receptor por donde son accesibles a la morfina.

Desde luego, el modelo más aceptado es el que apoyan SNYDER, PASTERNAK, y SIMON, que afirma su naturaleza protéica y que pone en juego el efecto discriminatorio del sodio y algunos autores han sugerido estructuras para el receptor morfínico combinado de forma teórica diversos aminoácidos.

Por otra parte diversos estudios apuntan el establecimiento de múltiples receptores opiáceos debido a las diferencias encontradas en la distribución de uniones a receptores con varios ligandos (PATERSON y KOSTERLITZ, 1978) y a las diferencias en las acciones farmacológicas y el antagonismo de naloxona en unos y otros morfínomiméticos (BONNET y cols. 1978, WARD y cols. 1978).

2.4. Distribución, desarrollo y localización de receptores morfínicos.

La distribución filológica de los receptores morfínicos ha sido estudiada por PERT y cols. (citado por JACOB y cols. 1978), y por SNYDER (1977). Los invertebrados no tienen recepto-

res morfnicos, mientras que en los vertebrados estudiados se han encontrado receptores de este tipo incluso en especies muy primitivas de peces cartilaginosos. No se ha encontrado por otra parte ninguna modificaci3n particular de las caracterfsticas fisico-químicas de los receptores morfnicos a lo largo del desarrollo filogénico de los vertebrados. Al contrario de lo previsto no existe ninguna tendencia evolutiva en este sentido. La uni3n receptor-opiáceo era cuantitativamente igual tanto en monos y en humanos como en vertebrados tan primitivos como el tibur3n y la lamprea. Adem3s, el receptor opiáceo de estos peces primitivos presentaba casi la misma especificidad para con el fármaco como el receptor opiáceo de los mamíferos, lo cual significa que durante el curso de la evoluci3n de los vertebrados han ocurrido pocos cambios, si es que hubo alguno, en la estructura química del receptor.

En cuanto al desarrollo ontogénico, COYLE, PERT, CLENDENINN y GARCIN (citados por JACOB y cols. 1978), han demostrado que en la rata los receptores son ya potentes después de dos semanas de gestaci3n, y que su número crece en paralelo al desarrollo del cerebro sin cambios en la afinidad de uni3n del ligando. Los receptores se desarrollan más rápidamente a nivel de regiones cerebrales caudales (hipotálamo) que a nivel rostral (corteza parietal), coincidiendo esto con determinaciones neuroanatómicas, neurofísicas y neurobiológicas, que establecen el desarrollo más precóz de las regiones caudales del cerebro. Por otra par-

te, el cerebro de cobayo tiene un desarrollo más rápido que el de rata, lo que es extensible a sus receptores, y podemos establecer también que su aparición es precóz en relación con receptores de otros neurotransmisores.

Los estudios sobre distribución regional muestran que la distribución cerebral de los receptores morfinicos no es homogénea. Los opiáceos no se fijan a la sustancia blanca ni al cerebelo, si no que presentan mayor afinidad por la sustancia gris, es decir, por elementos del cuerpo neuronal. Las regiones más densas corresponden al núcleo amigdalino de la corteza límbica, a ciertas regiones del cerebro medio (sustancia gris periventricular, sustancia gris periacueductal), al hipotálamo, y núcleos mediales del tálamo (JACOB y cols. 1978; SNYDER, 1977; FLOREZ BELLED, 1977; EIDELBERG y BOND, 1972). Aunque en menos proporción también se han encontrado receptores opiáceos en la sustancia gris de la médula espinal. En el interior de la médula los receptores se localizan en una franja densa que corresponde a la sustancia gelatinosa y que es una importante estación de relevo para la conducción ascendente de la información sensorial relacionada con el dolor (DUGGAN y cols. 1976; SNYDER, 1977). Existen principalmente dos vías cerebrales implicadas en la percepción del dolor. Los compuestos opiáceos apenas alivian el dolor agudo y localizado que parece transmitirse por una vía de evolución tardía, que consiste en una serie de grupos de células a cada lado del tálamo, que es un importante centro de la información sen-

sorial. En cambio los opiáceos alivian el dolor difuso, más crónico y menos localizado, que parece que se transmite por una vía de evolución más temprana, que consiste en muchas neuronas intercolares, la mayoría de las cuales carecen del aislamiento de la vaina de mielina, y por tanto conducen los impulsos con lentitud. Esta vía, que se llama paleoespinothalámica, asciende por la línea media del cerebro y sus estaciones de relevo comprenden la materia gris central del tallo cerebral y la parte central del tálamo (figuras 5 y 6). El mapa de distribución del receptor opiáceo en el cerebro coincide de forma sorprendente con la vía paleoespinothalámica del dolor (SNYDER, 1977; FLOREZ BELEDO, 1977). Lo que si se sabe es que la morfina ejerce al menos parte de su acción antinociceptiva a través de una acción en el cerebro (BRADLEY, y BRANWELL, 1975). Otras regiones ricas en receptores se corresponden con otras acciones morfínicas distintas de las antinociceptivas, como es la corteza límbica, donde se sitúan sus efectos sedativos y antiemocionales euforizantes; el hipotálamo, centro de sus actividades neurovegetativas; y la hipófisis, donde se ejercen efectos hormonales (JACOB y cols. 1978). Las áreas del cerebro con menores DI_{50} tienen funciones termorreguladoras (WEI, y cols. 1975).

La distribución de receptores morfínicos es diferente de la de terminaciones de sistemas gabaérgicos, triptaminérgicos, catecolaminérgicos y colinérgicos, aun a pesar de lo cual no debemos olvidarnos de la existencia de ciertas interacciones (JACOB y cols. 1978).

En cuanto a su localización subcelular y celular, los estudios en membranas sinaptosómicas purificadas dan valores más altos de unión de los ligandos frente a los estudios en homogeneizados brutos de tejidos. Cuando se homogeneiza el cerebro en una solución de sacarosa a determinadas concentraciones, las terminaciones nerviosas se desgarran y se vuelven a soldar formando sáculos intactos denominados sinaptosomas. En el interior de los sinaptosomas se encuentran las vesículas sinápticas y las mitocondrias del terminal. Cuando se separan los sinaptosomas por procedimientos clásicos, a muchos de ellos se les adhiere la membrana de la otra célula que participa en la sinápsis, y un solo sinaptosoma puede constituir una sinápsis completa. Los sinaptosomas se pueden romper por choque osmótico al colocarlos en agua. Se ha visto que los lugares de unión opiócea son tanto más abundantes si la preparación es rica en membranas sinaptosómicas; por el contrario las fracciones que contienen mitocondrias o vesículas sinápticas son pobres (SINDER, 1977; JACOB y cols. 1973; FLOREZ BELEDO, 1977). Según HIZEMAN y LOH (citados por JACOB y cols. 1973) los receptores están en la cara externa no endoplásmica de membrana

2.5. Efectos centrales de la morfina.

Desde el descubrimiento de VOGT en 1954 de la acción depletadora de la morfina de las catecolaminas cerebrales, y el estudio de SCHNEIDER en el mismo año (citados por VEDERNIKOV y AFRIKANOV, 1969), la cuestión del significado de las catecolaminas en la acción de la morfina suscitó la atención de muchos investi-

gadores, llegandose a la conclusión de que la activación simpática central podría elevar el umbral al dolor, y la analgesia morfínica sería el resultado de la liberación de noradrenalina de los lugares de almacén cerebral (VEDERNIKOV, 1969).

En 1970 JAMES, propuso que si la morfina altera el metabolismo de la serotonina y catecolaminas en el cerebro, inversamente la depleción de aminas antes de la administración de morfina podría modificar los efectos de los narcóticos en el comportamiento. Sin embargo, la relación exacta entre las aminas biógenas y los fármacos narcóticos no se puede definir por medidas en el contenido de catecolaminas del tejido nervioso, ya que este refleja solo cambios generales de gran magnitud, y no puede manifestar cambios locales a alteración de la velocidad de turnover de las aminas (CLOUET y RATNER, 1970). También ha sido observado en ciertas áreas del S.N.C. (cerebro medio), un rápido incremento en la concentración de catecolaminas en ratas y ratones, que parece deberse sobre todo a un incremento en la síntesis de aminas; existen al parecer diferencias a través del tiempo en los sistemas neuronales de diferentes catecolaminas y también existen diferencias entre ratones y ratas que pueden relacionarse con el comportamiento de esas dos especies (HEINRICH y cols. 1971).

Las variaciones en catecolaminas causadas por la morfina, fueron muy similares a las causadas por estimulación eléctrica aguda. Este hecho no resulta extraño ya que cuando se aplica estimulación eléctrica en las zonas de las neuronas que se de-

primen por morfina, se produce también analgesia y depresión de la actividad neuronal (BASBAUM y cols 1976). Existe tolerancia a esta acción analgésica del estímulo eléctrico, y existe tolerancia cruzada entre la analgesia morfinica y la conseguida por estímulo eléctrico. Por otra parte, la naloxona, antagonista opiáceo, también antagoniza la analgesia producida por estimulación eléctrica; y además mecanismos serotoninérgicos parecen estar implicados, al menos en parte, en el mecanismo de ambos tipos de analgesia (FLOREZ BELEDO, 1977).

Numerosos investigadores insisten en el estudio de las modificaciones en los niveles cerebrales de catecolaminas en relación con los analgésicos opiáceos (MONTEL y cols. 1974 y 1975) y llegan a la conclusión de que la morfina a través de una acción específica en receptores opiáceos inhibe la liberación del transmisor de neuronas noradrenérgicas cerebrocorticales de rata evocada por impulsos nerviosos, y por una acción no específica la morfina a altas concentraciones aumenta la estimulación inducida por noradrenalina, presumiblemente inhibiendo su reentrada dentro de los terminales nerviosos. HENDERSON (1972b) propone que las sinápsis insensibles al efecto específico de la morfina están caracterizadas por un incremento en la descarga de noradrenalina por pulso al aumentar la frecuencia de estimulación, mientras que en las sinápsis sensibles a morfina la descarga por pulso es constante aún variando las frecuencias.

En 1976, varios investigadores (GOMES, y cols.) señalan que los efectos cardiovasculares inducidos por morfina están re-

lacionados e incluso mediados por los efectos de ésta sobre los mecanismos cerebrales responsables del turnover de catecolaminas.

Se ha visto que existe un antagonismo de la analgesia morfinica con el AMPc, que parece estar asociado con aminos biógenas. Aumentando la noradrenalina cerebral se antagoniza el aumento en la DI_{50} de la morfina inducido por AMPc. Por el contrario, aumentando la 5HT cerebral aumentan los efectos del AMPc. Parece ser que es más crítico elevar las catecolaminas cerebrales que bajar la 5HT para revertir el antagonismo del AMPc con la antinocicepción (HO, y cols. 1972). Sobre éste antagonismo morfina-AMPc, otros investigadores mantienen la hipótesis de que la sustancia principal responsable es un producto catabólico del AMPc al cual las membranas son más permeables (GOURLEY, y BECKNER 1973). Por otra parte ROY y COLLIER en 1974 y 1975 (citados por JACOB y cols. 1978), han observado sobre homogeneizados de cerebro de rata que la morfina inhibió el incremento de producción de AMPc inducido por prostaglandinas E_1 ó E_2 , inhibiendo la adenil ciclasa. Otros investigadores confirmaron esto y se vió que esta inhibición era estereoespecífica y reversible por naloxona. GULLIS en 1975 (citado por JACOB y cols. 1978), emitió la hipótesis de que el efecto inhibitor de la morfina sobre la formación de AMPc en los cultivos de células podría ser secundario al aumento en la producción de GMPc con un posible papel importante de los agonistas morfinicos sobre la guanil ciclasa.

También se ha estudiado la posibilidad de la existencia

de un componente colinérgico en la analgesia. Morfina en elevada concentración, 10^{-3} M, desciende tanto la producción como la liberación de Ach, en trozos de corteza cerebral de ratón; a estas concentraciones ocurre lo mismo con nalorfina y naloxona (HOWES y cols. 1970). Los lugares de acción morfínica se localizan en terminaciones nerviosas colinérgicas localizadas en la corteza cerebral, o que pueden incluir elementos más profundos localizados subcorticalmente. Más de un lugar en el cerebro podría estar implicado (JHAMANDAS y cols. 1970).

La mayoría de los estudios que conciernen al mecanismo bioquímico de la analgesia inducida por morfina, fueron realizados en ausencia de dolor; sin embargo, es bien conocido que todo estado doloroso puede cambiar los parámetros metabólicos y éstos son capaces de modificar la cuantía y duración de los efectos farmacológicos. Como el dolor se aplica solo en cortos intervalos de tiempo en las pruebas de analgesia experimental, y como la respuesta al dolor es muy rápida, es necesario medir sustratos que tengan rápidos turnovers para que puedan reflejar la presencia de dolor. Se seleccionan los ácidos del ciclo del ácido cítrico como sustratos más representativos del metabolismo cerebral. SHERMAN y MITCHELL describieron una interacción entre la morfina y el dolor, que observaron primero en cerebros de pollos en 1972, y un año más tarde en cerebro de ratón, a nivel de los intermediarios del ciclo de Krebs. Las conclusiones obtenidas se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) La morfina sin hiperalgesia experimental deprime los niveles totales cerebrales de varios ácidos del ciclo de Krebs.
- b) El dolor reduce también los niveles de los intermediarios del ciclo de Krebs.
- c) La combinación de morfina y dolor restaura o incrementa los niveles de los ácidos del ciclo de Krebs. Ninguna evidencia de esto se encontró en hígado, por lo que posiblemente la estimulación debida a la combinación de morfina y dolor no es meramente una reacción generalizada, sí no que puede ser específica para el cerebro.
- d) Los morfínomiméticos y sus antagonistas muestran efectos similares en los cambios en los niveles del ciclo de Krebs mientras que producen efectos opuestos en la analgesia. Parece por ello improbable que el efecto de la interacción de la morfina y el dolor en dicho ciclo esté significando una relación con la analgesia. Por otra parte, también la morfina produce utilización menor de varios sustratos del ciclo de Krebs in vitro, dando valores inferiores del consumo de oxígeno en cerebros de ratones.

2.6. Dependencia morfinica (S.N.C.)

CLOUET y RATNER (1970), comprobaron que en ratas hechas tolerantes por tratamientos prolongados con morfina no hay depleción de aminas biógenas, mientras que en los no tolerantes, la administración de morfina causaba una liberación de dopamina y norepinefrino del cerebro en las primeras horas después de la ad-

ministración de la misma. Por otra parte la velocidad a la que se logra la tolerancia puede cambiarse por administración simultánea de fármacos que alteran las cantidades de aminas biógenas en tejido nervioso.

HAUBRICH y BLAKE (1973), estudian la modificación del metabolismo de la serotonina en cerebro de rata después de la administración aguda y crónica de morfina. En ambos casos se observaron incrementos en el metabolito 5HIAA de la 5HT; pudiera ser que el aumento en 5HIAA fuese por aumento de triptófano, cuya concentración como se sabe es limitante de la velocidad de síntesis de serotonina. Los niveles de 5HIAA volvieron a valores normales a medida que se desencadena la tolerancia morfinica. La velocidad de flujo de salida del 5HIAA desde el LCR a la sangre fue igual en las ratas control y en las tolerantes a morfina. Por otra parte muchos estudios muestran una reducción de la analgesia inducida por morfina, y de la hipotermia y el efecto motor depresor después de una disminución de serotonina, y sugieren que la presencia de esta amina es necesaria para que la morfina ponga en evidencia sus acciones depresoras centrales.

Se comprobó que la administración crónica de morfina inhibe la actividad de la MAO dando como resultado el síndrome de hiperactividad que resulta de los altos niveles cerebrales de catecolaminas e indolaminas. En base a tales hallazgos se sugirió que la morfina no aumenta la biosíntesis de catecolaminas por un efecto directo en la tirosina hidroxilasa, ni tampoco el desa-

rollo de la tolerancia está asociado con un incremento en la actividad de este enzima cerebral (CATRAVAS y cols. 1977).

Las inyecciones de morfina que produjeron un descenso consistente en la velocidad de liberación espontánea de Ach en el cortex de ratas control, no causaron descenso alguno en ratas dependientes (JHAMANDAS y SUTAK, 1974). Durante el desarrollo de tolerancia en ratones fue observado un incremento en la liberación de Ach, por lo cual se produjo un descenso en el contenido de Ach cerebral en todas las regiones con excepción del cerebelo. Las regiones más afectadas fueron: cerebro medio y corteza cerebral. Se observaron descensos en el peso corporal e hipotermia (STAVINOHHA, y cols. 1977).

PERT y SNYDER (1976) señalaron que en los procesos de adicción de los opiáceos estaba implicada una alteración en el número de receptores sin cambios en la afinidad, pero en los ensayos de HIRENBERG y KLEE (citados por SNYDER, 1977) el tratamiento prolongado con opiáceos en células híbridas de neuroblastoma glioma no afecta en absoluto al número de receptores ni a la unión receptor-compuesto opiáceo: y probablemente no es a nivel del propio receptor donde tiene lugar la modificación bioquímica fundamental causante de la toxicomanía.

2.7. Receptores morfinicos en el S.N.P.: Generalidades

Los receptores morfinicos se encuentran presentes no solo en estructuras cerebrales, si no también en tejidos muy dispa-

res. Los efectos de la morfina en el sistema nervioso periférico son por otra parte muy selectivos. La morfina inhibe la transmisión colinérgica en el ileon de cobayo (PATON, 1957) y en el corazón de conejo (KOSTERLITZ y TAYLOR, 1959), pero no tiene efecto sobre la transmisión colinérgica en el corazón de cobayo (KOSTERLITZ y TAYLOR, 1959), o en el ileon de conejo (GREENBERG y cols. 1970). La selectividad de acción de la morfina se extiende también al sistema adrenérgico, y así actúa sobre la transmisión neuroefectora en la membrana nictitante de gato (TRENDELENBURG, 1957; THOMPSON, 1960; CARNIE y cols. 1961), y sobre la transmisión neuroefectora en el conducto deferente de ratón (HENDERSON y cols. 1972a).

El paralelismo que existe entre la actividad analgésica de los analgésicos opiáceos y su capacidad para abolir la transmisión colinérgica en ileon de cobayo y transmisión adrenérgica en membrana nictitante de gato y conducto deferente de ratón, todos ellos estimulados electricamente, lleva a la utilización de éstos tres órganos como posibles modelos in vitro para una fácil valoración de su acción analgésica. Se ha puesto de manifiesto para muchos opiáceos y sus antagonistas la existencia de una correlación satisfactoria entre su afinidad por el receptor y su eficacia farmacológica, y así tenemos opiáceos activos como el levorfanol y la morfina que tienen una afinidad por el receptor mucho mayor que los opiáceos débiles como la meperidina y el propoxifeno. Sin embargo, existen algunas discrepancias como

es el caso de la etorfina, un analgésico con actividad analgésica muy superior a la morfina y cuya afinidad por el receptor solo supera en unas 20 veces la afinidad de la morfina. Esto tiene una explicación lógica si consideramos que la etorfina es 300 veces más soluble en lípidos, y por tanto atraviesa más fácilmente la barrera hematoencefálica. Otro ejemplo es el de la codeína, con una actividad analgésica en el hombre aproximada al 20% de la de la morfina, pero con una afinidad para unirse al receptor cuantitativamente mucho más alejada de la de la morfina. Esta discrepancia se explica fácilmente por el hecho de que la codeína se transforma en morfina por acción de los enzimas hepáticos, y es la morfina realmente la que penetra en el cerebro y provoca los efectos farmacológicos. Se sabe por otra parte que la codeína es mucho menos activa por vía intracerebral que por vía intravenosa, lo cual estaría en consonancia con lo expuesto. Estas interferencias farmacocinéticas para correlacionar la actividad farmacológica con la unión a receptores, se solventan con el estudio del comportamiento in vitro de órganos que presentan gran abundancia de receptores morfínicos, observándose una correlación entre su actividad en estos órganos y la unión a sus receptores (SNYDER, 1977) (Figs. 7 y 8).

2.7.1. Morfinomiméticos en el ileon de cobayo.-

Ya PATON en 1957 y posteriormente COMIE, KOSTERLITZ y MATT en 1963, observaron que la morfina a bajas concentraciones deprimía la liberación de Ach en el plexo mientérico de las fibras

longitudinales de intestino de cobayo estimulado electricamente con frecuencias bajas. En 1970 COMIE, KOSTERLITZ, LYDON y WATERFIELD, comprueban que en el ileon de cobayo los fármacos analgésicos narcóticos tienen propiedades de ambos tipos agonistas y antagonistas, dependiendo de la relación entre su actividad agonista y antagonista como analgésicos. Existen solo unos pocos compuestos que sean antagonistas puros, desprovistos de efecto agonista totalmente; tal es el caso de la naloxona. El orden de actividades agonistas y antagonistas determinado en el ileon de cobayo está en consonancia con las observaciones hechas en cerebro. Este hecho, hizo posible usar el ileon de cobayo para predecir las actividades agonistas y antagonistas de nuevos compuestos. Por otra parte, la estrecha correlación que existe entre la actividad farmacológica de los activadores opiáceos en éste órgano y su afinidad por el receptor en el mismo tejido, demuestra que el receptor es auténtico. (SNYDER, 1977); (figura 7). Podemos ver la utilidad práctica de este modelo en el ejemplo siguiente. Se ha observado que la normorfina y la morfina son equiactivas en preparaciones aisladas del ileon de cobayo, y en el deferente de ratón, lo cual está de acuerdo con los resultados de inyecciones en ventrículos cerebrales de ratas. Sin embargo, la normorfina es considerablemente menos activa que la morfina cuando se inyectó intravenosa en ratas. Esta observación se explicó por el hecho de que la normorfina es menos liposoluble y pasa las barreras más lentamente. Estas relaciones estructura-actividad, no

se tienen en cuenta en preparaciones aisladas, donde la difusión de barreras es de mucha menos importancia. Por todo ello los ensayos con el método del ileon de cobayo son adecuados para los compuestos N-metil y N-nor-homologos, habiéndose encontrado que mientras morfina y normorfina son equiactivas por este método, en general la pérdida del grupo N-metil conduce a una considerable pérdida de actividad agonista. Otra excepción de la regla sería el caso de la codeína y norcodeína que también son equiactivas, pero este caso es de menor significación ya que sus actividades agonistas son muy bajas (KOSTERLITZ y WATERFIELD, 1976).

Las acciones de la morfina en el ileon parecen estar mediadas a través de un mecanismo dependiente de calcio. Se observa que elevando la concentración de ion Ca^{++} en la solución del baño de órganos se redujo la actividad de la morfina para deprimir las contracciones inducidas eléctricamente. Los antagonismos del calcio y las acciones morfínicas en el ileon son interesantes, ya que también el calcio antagoniza la acción analgésica que tiene la morfina en ratones (HEIMANS, 1975).

La morfina se ha observado que tiene también actividad antagonista, y existe la posibilidad de que altas concentraciones de morfina antagonicen los efectos depresores de bajas concentraciones. El aumento en el tamaño de la contracción causado por altas concentraciones de morfina es posiblemente debido a una inhibición parcial de la colinesterasa presente en la preparación. Particularmente se mantiene esta hipótesis desde que se sabe que

estos compuestos inhiben la acetilcolinesterasa en homogeneizados de cerebro, y que la acetilcolinesterasa está presente en el plexo mientérico, y la butirilcolinesterasa en el músculo longitudinal (KOSTERLITZ y WATERFIELD, 1975).

El sitio de los efectos de la morfina en el plexo longitudinal no se conoce. No se sabe si el efecto es pre o postsináptico, y ni siquiera se tiene la certeza en el tipo de neurona ó terminación implicada (colinérgica, purinérgica, serotoninérgica, etc...). Para ver si el efecto es a nivel pre o postsináptico se ha probado en condiciones de bloqueo de la transmisión sináptica, pero los resultados no son concluyentes en su totalidad. Se ha postulado que la estimulación por campo eléctrico activa axones de neuronas colinérgicas motoras, y que la morfina actúa directamente en terminales nerviosos colinérgicos inhibiendo la liberación de neurotransmisor. Otra hipótesis sugiere que la estimulación por campo eléctrico activa receptores serotoninérgicos, pero se ha confirmado que la morfina no actúa bloqueando receptores de 5HT. Sin embargo, parece haber un pequeño componente de la contracción resultante de la activación de impulsos excitadores serotoninérgicos para la neurona colinérgica. Por otra parte, es improbable que la morfina actúe bloqueando la conducción axonal en el plexo mientérico. Su lugar de actuación es en o cerca de las varicosidades terminales (DINGLELINE y GOLDSTEIN, 1976).

Según GOLDSTEIN y SCHULZ en 1973 como la respuesta del

ileon al estímulo eléctrico se bloquea por atropina el efecto recae sobre el receptor muscarínico en el músculo liso. La morfina inhibe la contracción y la liberación de Ach pero parecía arriesgado afirmar que la morfina actuase en terminales colinérgicos cuando se sabía que a una concentración razonable la morfina no interfiere con la liberación de Ach en los terminales colinérgicos de otros tejidos: gónглиos simpáticos, algunas terminaciones parasimpáticas, uniones neuromusculares esqueléticas, etc... Así BELL y REES (1974) estudiaron la acción de la morfina en la unión neuromuscular esquelética. Las altas concentraciones requeridas de morfina para ejercer su acción depresora en la unión neuromuscular esquelética sugerían un efecto no específico en este tipo de unión. Estos investigadores comprobaron que los órdenes de actividad de los analgésicos opiáceos publicados en su efecto específico sobre el dolor y sobre la depresión del ileon de cobayo estimulado transmuralmente, difieren mucho de los órdenes de actividad depresora de la preparación de diafragma de rata. Por otra parte, este último efecto depresor de la morfina no se antagoniza por naloxona, y los estereoisómeros resultan equipotentes en esta preparación. La conclusión de estos hechos fué que los efectos de los analgésicos en la transmisión en la unión neuromuscular esquelética no están mediados por receptores opiáceos. Parece más bien que aquí juega papel la liposolubilidad de los compuestos que les facilitarían el ganar acceso a una fase lipídica y producir una depresión no específica por una acción

de tipo anestésico local. La falta de evidencia de que la morfina actuase en los terminales colinérgicos hizo suponer a GOLDSTEIN en 1973 que la morfina pudiera actuar en el plexo intestinal de cobayo en otras sinápsis distintas de las de la unión nerviosa con el músculo liso; por ejemplo en una sinápsis más proximal en la vía excitatoria.

La explicación más factible del efecto morfínico en ileon de cobayo es la inhibición de la liberación de neurotransmisor en sus terminales nerviosos colinérgicos. Sin embargo, ya que la 5HT es un constituyente endógeno del ileon con localización fundamentalmente neuronal, puede preverse que alguna interacción con el sistema de 5HT puede ser fundamental en la respuesta del ileon a morfina (ROSS y cols. 1972; GINTZLER y col. 1974).

ALDUNETE, YCJAY y NARDONES, estudiaron el efecto inhibitorio que la morfina tiene también sobre la peristólsis del ileon aislado de cobayo. Este efecto ya había sido estudiado por TRENDELENBURG en 1917 (citado por ALDUNETE y cols. 1975). Estos autores comprueban que la morfina exhibe taquifilaxis en su efecto, posiblemente porque su efecto estaría mediado por la liberación de una sustancia activa, y mantienen que lo que se liberaría serían catecolaminas, que tienen efecto inhibitorio sobre éste órgano. Aunque la dopamina y la norepinefrina no compiten por los lugares de unión opiácea en cerebro de rata, en intestino de cobayo se sabe que las catecolaminas disminuyen la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica y bajan la liberación de Ach

(PATON y VIZI, 1969; KOSTERLITZ y cols. 1970). Sin embargo, diversos autores (KOSTERLITZ y cols. 1970) han comprobado que su efecto no se afecta por alfa y beta bloqueantes, y se mantuvo que la morfina no actúa liberando norepinefrina. La posibilidad de que se libere dopamina fue más difícil de desechar. Podría ser que la morfina bloquee la transmisión en una sinápsis excitadora en la vía de liberación de Ach causando la liberación de un transmisor modulador que podría ser posiblemente dopamina. Un mecanismo regulador de feed-back podrá incrementar la efectividad de las vías excitadoras causando la tolerancia a morfina, y bajando la sensibilidad a las catecolaminas (GOLDSTEIN y SCHULZ, 1973).

BURNSTOCK estudió la presencia de una transmisión purinérgica de carácter inhibitorio en intestino y se ha investigado la existencia de un componente purinérgico en el proceso que media los efectos inhibidores de morfina en ileon de cobayo. Los derivados de adenosina: ATP y AMPc, pueden producir una inhibición significativa de la liberación de Ach y de las contracciones inducidas por estimulación a baja frecuencia, pero no a alta frecuencia. Los efectos inhibidores de morfina estarían mediados al menos en parte por la formación de AMPc (GINTZLER y MUSACCHIO, 1975). Se estableció que el plexo mientérico de mamíferos contiene un sistema de neuronas inhibitorias, no adrenérgicas, que inervan el músculo longitudinal y que serían de naturaleza purinérgica. Si estas neuronas inhibitorias también sinápsan con células ganglionares mientéricas, es posible que los opiáceos activasen

los receptores postsinápticos. Sin embargo, el sistema purinérgico está muy extendido, y en particular aparece en el plexo mientérico de conejo que es insensible a los opiáceos (DINGLELINE, y GOLDSTEIN, 1976). Referente a los efectos inhibidores de adenosina y los nucleótidos de adenina: AMP, ADP, ATP, AMPc, y dbcAMP, en la respuesta contráctil de las fibras longitudinales de ileon cobaya estimulada electricamente, la teofilina antagonizó la respuesta inhibitoria de éstos nucleótidos (SAWYNOK y cols. 1976). En 1976 se observó también el efecto antagonista competitivo de las metilxantinas y la adenosina en el ileon de conejo aislado (ALLY y NAKATSU, 1976) y en 1977 se vió que también la acción inhibitoria de ATP, ADP y adenosina en la actividad peristáltica del ileon de cobayo es selectivamente antagonizada por metilxantinas (OKHUSABA y cols. 1977).

2.7.2. Dependencia intestinal.

La tolerancia a la morfina se produjo por tratamientos largos con inyecciones diarias a cobayos (TAKAGI y cols. 1965), y por la implantación de pellets de morfina en ratón (MAGGIOLO y cols. 1961; WAY y cols. 1969; GOLDSTEIN y cols. 1969; CHENEY y cols. 1971). La técnica de la implantación de pellets fue utilizada por GOLDSTEIN y SCHULZ en 1973, en cobayos para mantener una exposición continua de los tejidos a los analgésicos narcóticos. La implantación de 4 pellets de morfina básica de 75 mg cada uno produjo en los cobayos un alto grado de tolerancia y dependencia en un espacio de tres días, que se puso de manifiesto por una re-

ducción de su actividad hipotérmica a la sexta parte; en el plexo mientérico longitudinal las contracciones del músculo inducidas por estimulación eléctrica de animales tolerantes, se deprimieron menos por morfina que las contracciones en preparaciones de animales no tolerantes. La reducción de la actividad fué también a la sexta parte de la normal. La naloxona no alteró la contracción y antagonizó la acción depresora de la morfina, tanto en animales tolerantes como en los no tolerantes. La respuesta contráctil del músculo liso intestinal, a la Ach fué por otra parte la misma en ambos casos, pero las preparaciones de animales tolerantes mostraron una sensibilidad reducida a los efectos depresores de adrenalina, isoprenalina y particularmente dopamina. Los intentos que se hicieron para influir el grado de tolerancia mediante lavados antes de realizar las pruebas no tuvieron éxito.

También en 1973 SCHULZ y GOLDSTEIN han visto que tiras de músculo intestinal en reposo de cobayos tolerantes a la morfina muestran 10 veces mayor sensibilidad a los efectos excitadores de 5HT que las tiras de no tolerantes.

SCHULZ y GOLDSTEIN en 1974 comprobaron además que las alteraciones farmacológicas observadas durante la tolerancia morfinica y dependencia en el plexo mientérico de cobayo como en el SNC son completamente reversibles. En el plexo mientérico la tolerancia a la morfina se pierde gradualmente al quitar los pellets y la sensibilidad a los neurotransmisores vuelve a la normal, perdiéndose la subsensibilidad a catecolaminos y la supersensibilidad

a 5HT. La recuperación fue total a los siete días de quitar el pellet, y en este momento la recuperación del efecto hipotérmico también fué completa.

En 1974 VAN NUETEN y LAL, inyectando subcutáneamente sulfato de morfina con dosis de 100 mg/kg diaria durante ocho días, encontraron que se necesitaban concentraciones de tres a diez veces más altas de morfina para inhibir las contracciones de tiras de intestino estimuladas coaxialmente de animales tolerantes que de animales control. También observaron que las tiras de los cobayos tolerantes fueron más sensibles a la estimulación coaxial, y se obtuvieron mayores contracciones con intensidades de estimulación mucho menores. También se detectó mayor actividad espontánea de desconocido origen todavía, y un incremento en la contracción máxima en respuesta a Ach de tiras de animales tolerantes. Todos estos cambios no desaparecieron con lavados de las tiras intestinales ni por supresión de la morfina de los animales hasta de ocho días antes de matarlos.

Una de las teorías en boga que intentan explicar el fenómeno de tolerancia a la morfina es el propuesto por COLLIER en 1965 y 1968, pero esta teoría ha carecido hasta ahora de apoyo experimental. La teoría expuesta por COLLIER sugiere que la morfina produce sus efectos de tolerancia aguda reduciendo la liberación de neurotransmisores. La continua inhibición de liberación de neurotransmisor lleva a cabo un incremento en el número de receptores activos para ese transmisor. Así la morfina aparen-

temente pierde su efecto (tolerancia) porque la cantidad reducida de transmisor resulta hiperactiva. La ausencia de morfina conduce el flujo normal de neurotransmisor a interactuar con el área efectara activada, resultando una respuesta exagerada o síndrome de abstinencia. En 1974 SHOHAM y WEINSTOCK, examinaron experimentalmente la hipótesis de COLLIER en la preparación de ileon de cobayo estimulado coaxialmente después de exponerlo a la DI_{50} de morfina durante 90 minutos, y sustituir una vez transcurrido este tiempo la solución de morfina del baño por solución Krebs normal con repetidos lavados. Se obtuvo una taquifilaxis a morfina más consistente que la que se obtiene sin perfundir el ileon con morfina los 90 minutos, pues sin la perfusión previa la taquifilaxis observada es muy variable y se puede abalir incrementando el intervalo de tiempo entre las dosis. La liberación de Ach sin embargo se inhibió en el mismo grado antes y después de la perfusión. Por otra parte la taquifilaxis a morfina se acompañó de una potenciación significativa de la respuesta del ileon a la aplicación de Ach. Estos resultados indican que la aparente pérdida de efecto de la morfina en la altura de la contracción, resultaría de una sensibilización del músculo para las cantidades de neurotransmisor liberado. Se observó también una potenciación en la respuesta a histamina, siendo la DI_{50} el doble en controles que en tolerantes. También en ocasiones se potenció la respuesta a KCl. Todo esto sugiere que la sensibilización del ileon para Ach, histamina y KCl por morfina puede ser no específica. Los trabajos de

GOLDSTEIN y SCHULZ en cobayos pretratados con morfina en forma de depósito de pellets no muestran cambios en la sensibilidad del ileon in vitro a Ach aunque fuesen menos sensibles a la acción depresora de morfina. Ellos concluyeron que la tolerancia a la morfina no resulta de la supersensibilidad del músculo a Ach, pero es posible que la tolerancia producida en todo el animal difiera de la producida por perfusión del intestino in vitro con morfina. Por otra parte, los cobayos de GOLDSTEIN y SCHULZ (utilizando pellets) no mostraron tolerancia a la analgesia morfínica, si no solo al efecto hipotérmico del fármaco, cuyos mecanismos implicados pueden diferir con los de la tolerancia analgésica.

Se realizaron nuevamente ensayos induciendo tolerancia mediante la incubación de segmentos aisladas de ileon de cobayo con morfina, pudiéndose relacionar la dosis de incubación con el grado de tolerancia logrado y con el tiempo en que la morfina mostró una capacidad reducida para deprimir las contracciones producidas por estímulo eléctrico (OPMEER y VAN-REE, 1978).

La tolerancia a los morfínicos también se ha estudiado en especies en las cuales estos fármacos aumentan la actividad contractil del intestino, como ocurre en el perro, donde se utilizaron técnicas de perfusión. Se sabe que la morfina interactúa en éste caso con un receptor opioide, lo que conduce a que se libere 5HT que estimula el músculo liso intestinal directamente y a través de mecanismos similares a los del ileon de cobayo activando

elementos neurales colinérgicos. Durante la perfusión con morfina se observaron fenómenos de taquifilaxis o tolerancia aguda, pero se mantienen las respuestas a 5HT exógena y a los agonistas colinérgicos. Por otra parte, la tolerancia es cruzada con levorfanol, También las respuestas de segmentos intestinales de perros tratados crónicamente con morfina durante 16 días son similares a las obtenidas en la tolerancia aguda. Aunque los mecanismos de tolerancia aguda y crónica pueden ser bastante distintos, todos los datos obtenidos apoyan que la tolerancia a morfina en el intestino de perro refleja efectos específicos a nivel de receptor opiáceo o del mecanismo de liberación de 5HT, pero no efectos en receptores de 5HT ó de Ach (BURKS y GRUBB, 1974). En estas especies se ha estudiado también el antagonismo de morfina y teofilina (GRUBB y BURKS, 1975).

En 1975 HEIMANS, estudió también los fenómenos de tolerancia en el ileon de cobayo. La respuesta en el ileon a la aplicación de morfina presentaba varias fases. Había una fase inicial depresora en la cual se presentó taquifilaxis, es decir una tolerancia aguda a repetidas administraciones de la misma dosis seguidas por lavado. Cuando la administración de morfina se hizo de una forma acumulativa se produjo tolerancia crónica, en la cual subsiguientes aumentos en concentración no produjeron incrementos en las depresiones de la amplitud contráctil. Aumentando más la dosis apareció una nueva fase en la cual tuvo lugar un aumento de las respuestas a la estimulación eléctrica. Si en este momento

el fluido del baño se cambió a una solución sin fármaco, se observó una respuesta de abstinencia, en la cual las contracciones se deprimieron marcadamente. Al obtenerse esta respuesta de abstinencia se consideró que el ileon era dependiente a morfina, y en ileon dependiente, concentraciones graduales de morfina produjeron incrementos graduales en la altura de la contracción. Se observó que la sensibilidad del ileon a Ach no se altera durante el desarrollo de tolerancia, ni en la abstinencia, ni en la readministración del ileon dependiente a morfina. La teoría propuesta por PATON (citado por HEIMANS, 1975), para explicar los fenómenos de tolerancia es que la morfina deprime la liberación de Ach de los nervios postganglionares parasimpáticos, pero el aumento endógeno del neurotransmisor vence la depresión de la liberación, y si se retira la morfina podría tener lugar una excesiva liberación de neurotransmisor dando los síntomas de abstinencia. Sin embargo, el síntoma de abstinencia para HEIMANS consiste en un periodo en el cual la amplitud de la contracción se deprime mucho, y para que tal depresión sea el resultado de una liberación exagerada de neurotransmisor, la teoría de PATON implica una rápida desensibilización de la preparación, que HEIMANS no encontró.

2.7.3. Morfinomiméticos en la membrana nictitante de gato.-

La morfina inhibe las contracciones producidas por estimulación nerviosa de la membrana nictitante de gato, tanto in vivo como in vitro (TRENDELEBURG, 1957; THOMPSON, 1960; CARNIE, y cols. 1961; HENDERSON y cols. 1975). CARNIE y sus colaboradores

en 1961 encontraron que la morfina fué más eficaz reduciendo la medida de las contracciones a bajas frecuencias que a altas frecuencias de estimulación en la membrana nictitante de gato en vivo. Un resultado similar se obtuvo in vitro con una marcada disminución en la liberación de noradrenalina a 1 Hz, mientras que a 15 Hz no se alteró significativamente (HENDERSON y cols. 1975).

La acción de la morfina en éste tejido es un efecto específico y parece envolver una inhibición de la liberación de noradrenalina. Su efecto parece deberse a una acción en los terminales nerviosos que inervan el músculo liso, ya que sus cuerpos celulares están en el ganglio cervical superior y no hay células ganglionares dentro del músculo liso (HENDERSON y cols. 1975).

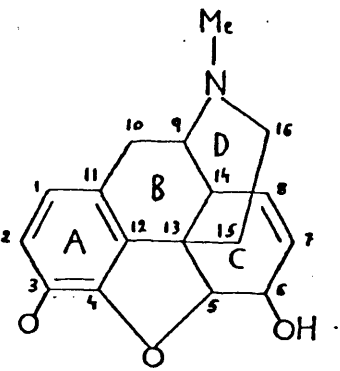
2.7.4. Morfinomiméticos en el conducto deferente de ratón.-

El conducto deferente aislado de ratón posee una inervación excitadora adrenérgica, que al igual que la de la membrana nictitante de gato, puede ser inhibida por bajas concentraciones de morfina, siendo éste efecto de la morfina mediado por receptores específicos bloqueables por naloxona. La activación de los receptores morfinicos inhibe la liberación de NA y ésta acción es selectiva, de forma que la transmisión en el deferente de conejo o de cobayo no se afecta por este fármaco. De ésta forma el deferente de ratón es un tejido sensible a morfina, que puede usarse como método de screening para los fármacos analgésicos narcóticos (HENDERSON y cols. 1972a; HUGHES y cols. 1975a; HENDERSON y HUGHES, 1976).

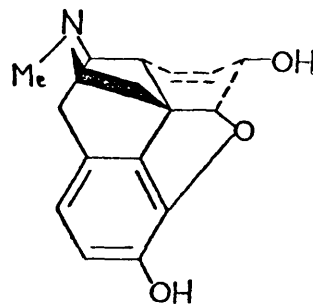
FIGURAS DE RECEPTORES
OPIACEOS

Figura 1

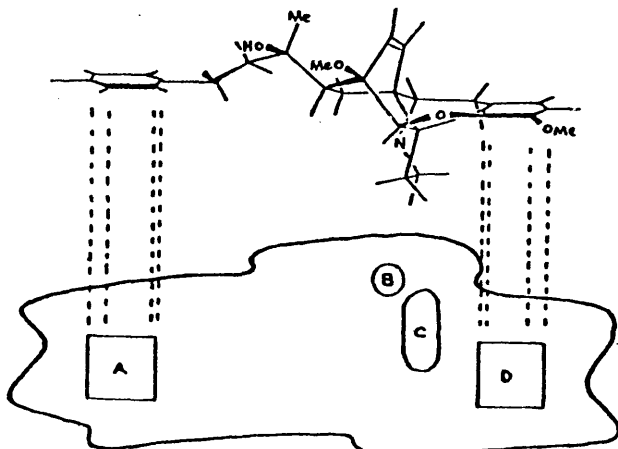
MORFINA



Formula plana



Visión tridimensional de la molecula



- A. LUGAR LIPOFÍLICO
- B. LUGAR ANIÓNICO (N)
- C. CAVIDAD PARA C-15 Y C-16
- D. SUPERFICIE PLANA PARA EL ANILLO AROMÁTICO

Modelo del receptor opiáceo según Bentley y Lewis (1972)

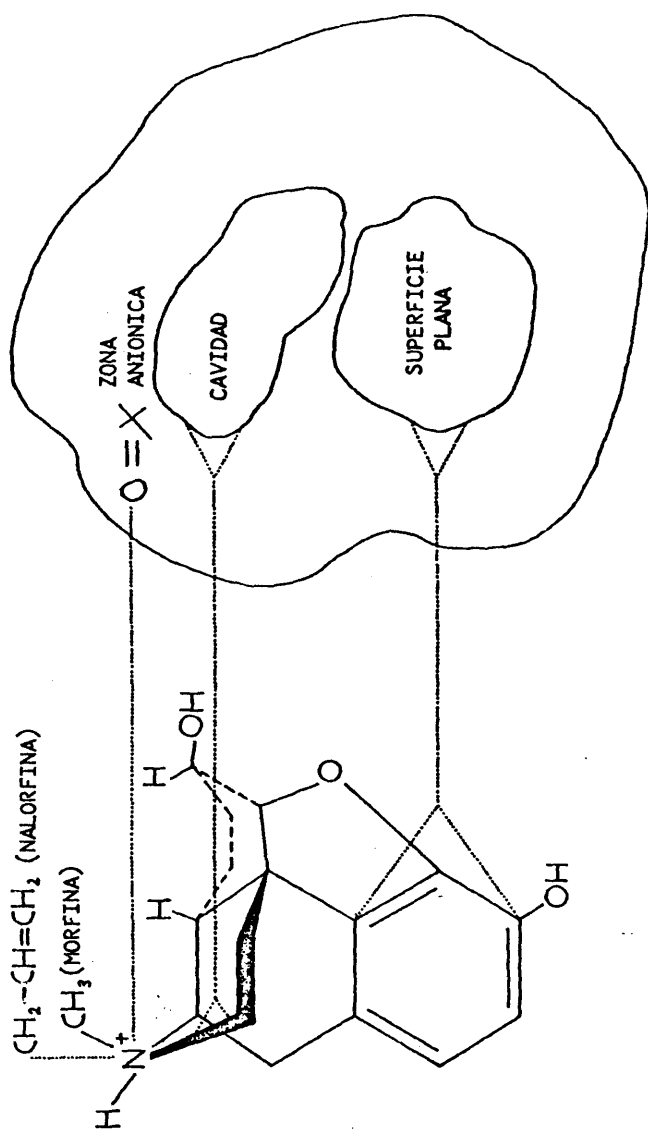


Fig. 2.- Receptor analgésico para la morfina. En la representación tridimensional de la estructura de la molécula de la morfina y de la nalorfina (antagonista de la primera), el nitrógeno con carga positiva se une con la zona aniónica del receptor, el anillo aromático a la superficie plana del mismo, mientras que la porción hidrocarbonada del anillo piperidínico, en trazo grueso situado hacia delante del plano del papel, se coloca en la cavidad del receptor analgésico; los enlaces en trazos están situados por detrás del plano del papel; en la nalorfina, en vez del grupo metilo, existe un alilo, que da lugar al antagonismo competitivo (Litter, 1970 modificado de Soine y Willette, 1966).

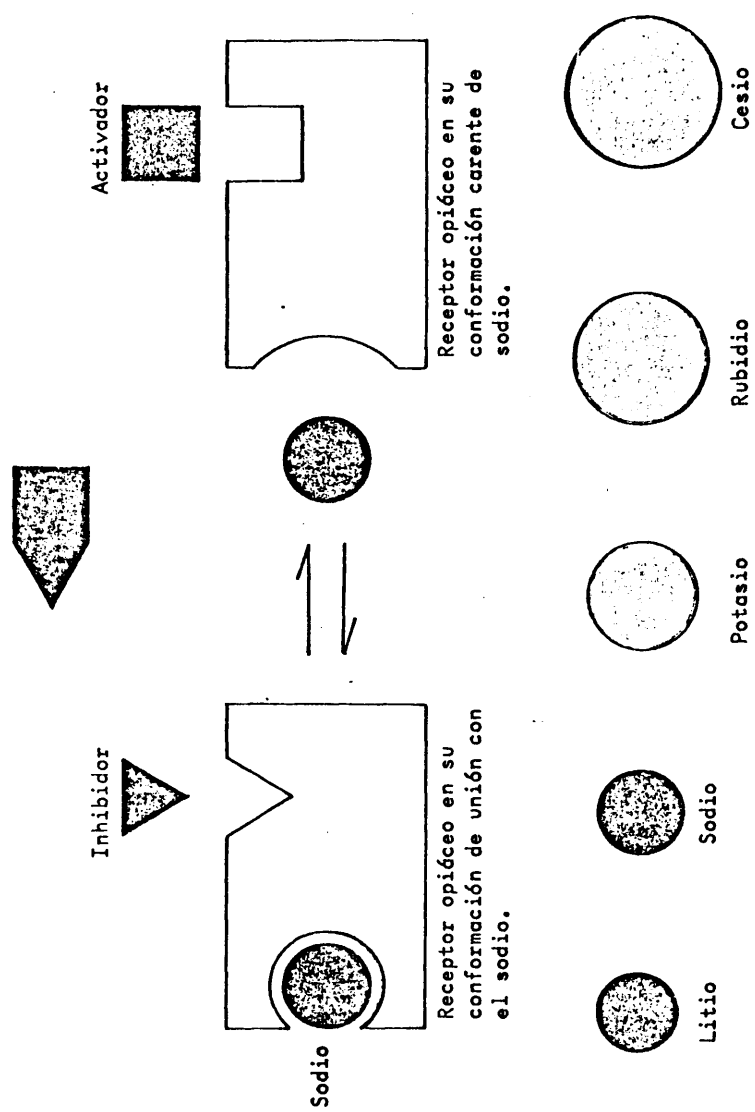


Fig. 3.- El modelo del receptor opiáceo explica el efecto del sodio postulando que el receptor puede estar en dos conformaciones diferentes.

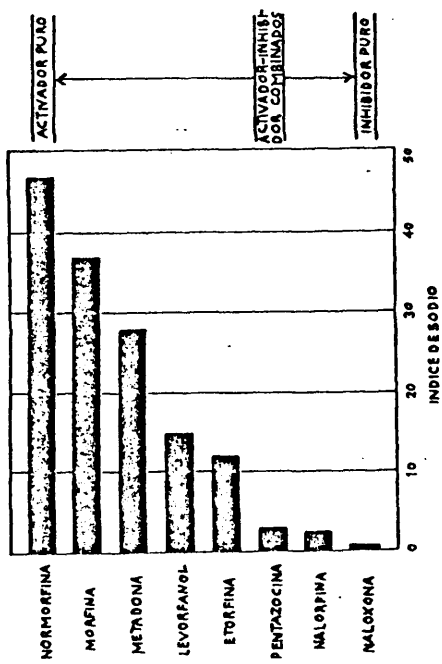
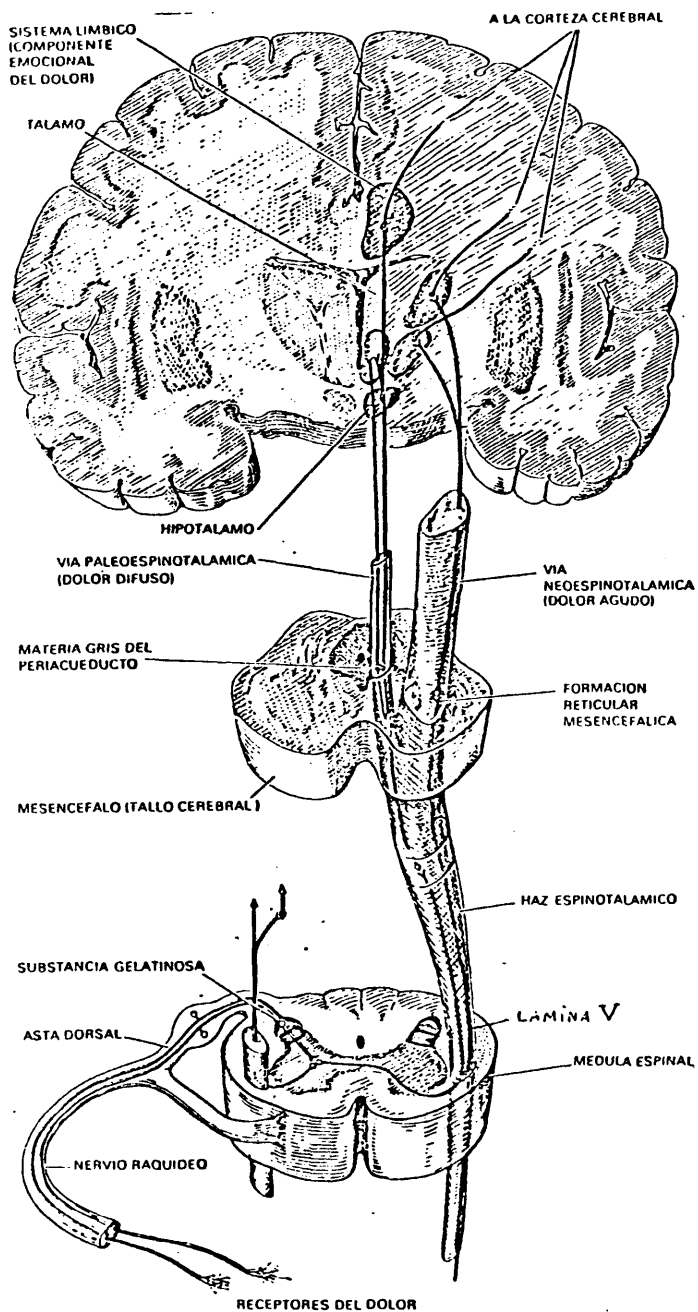


Fig. 4.- La presencia de iones sodio reduce drásticamente la afinidad del receptor opiáceo por los activadores, sin alterar su afinidad por los inhibidores. Las franjas indican la relación que existe entre la concentración del fármaco necesario para inhibir en un 50% la unión con el receptor de naloxona, marcada con radiactividad, en presencia de sodio, y la concentración del fármaco necesaria en ausencia de sodio.



g. S.- LAS VIAS DEL DOLOR, que conducen la información desde la periferia del sistema nervioso hasta el cerebro, están separadas en dos tipos: la vía neoespinotalámica de localización lateral, que transmite el dolor agudo y localizado, y la vía paleoespinotalámica, de localización media. Los receptores opiáceos se concentran en la sustancia gelatinosa y en el tálamo central. (SNYDER, 1977).

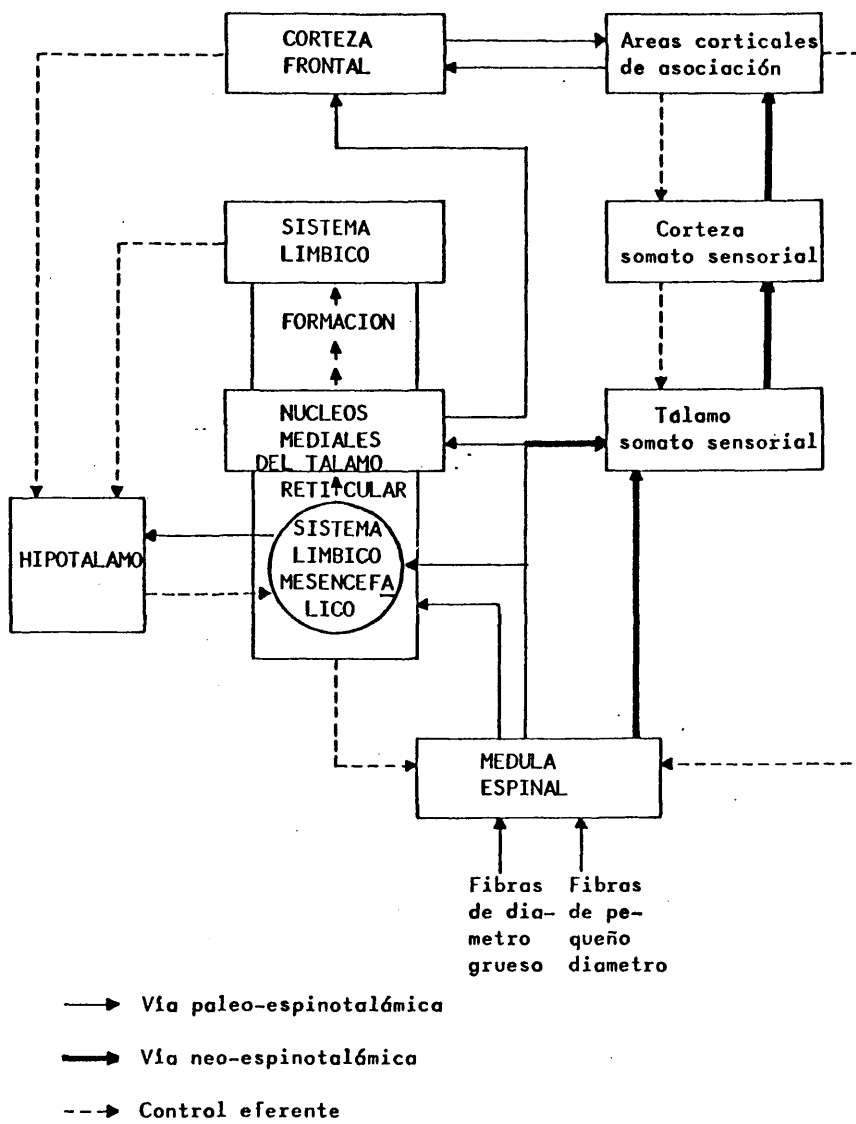


Fig. 6.- Vías de la sensibilidad dolorosa (Florez Beledo, 1975)

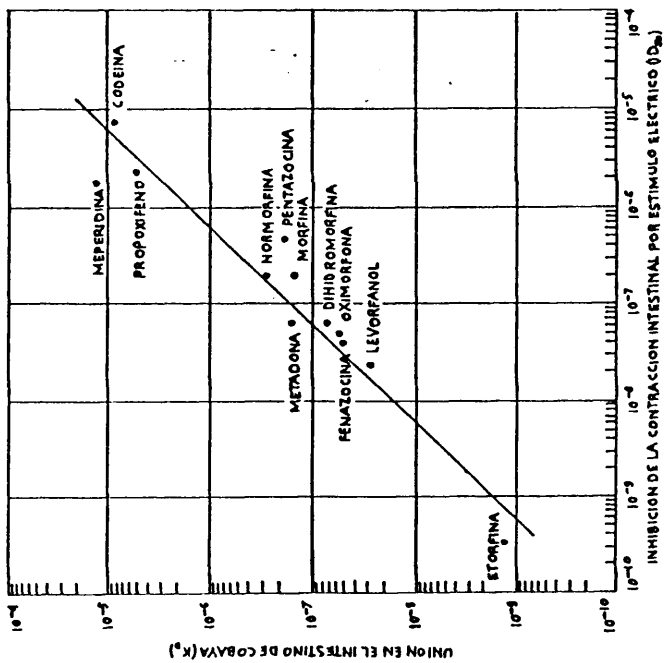


Fig. 7.- La estrecha correlación que existe entre la potencia farmacológica de los activadores opiáceos en el intestino de cobayo y su afinidad por el receptor opiáceo en el mismo tejido demuestra que el receptor es auténtico. Aquí se representa la DI_{50} de varios opiáceos frente a su KD (concentración necesaria para inhibir el 50% de la unión este- reoespecífica de naloxona radiactiva).

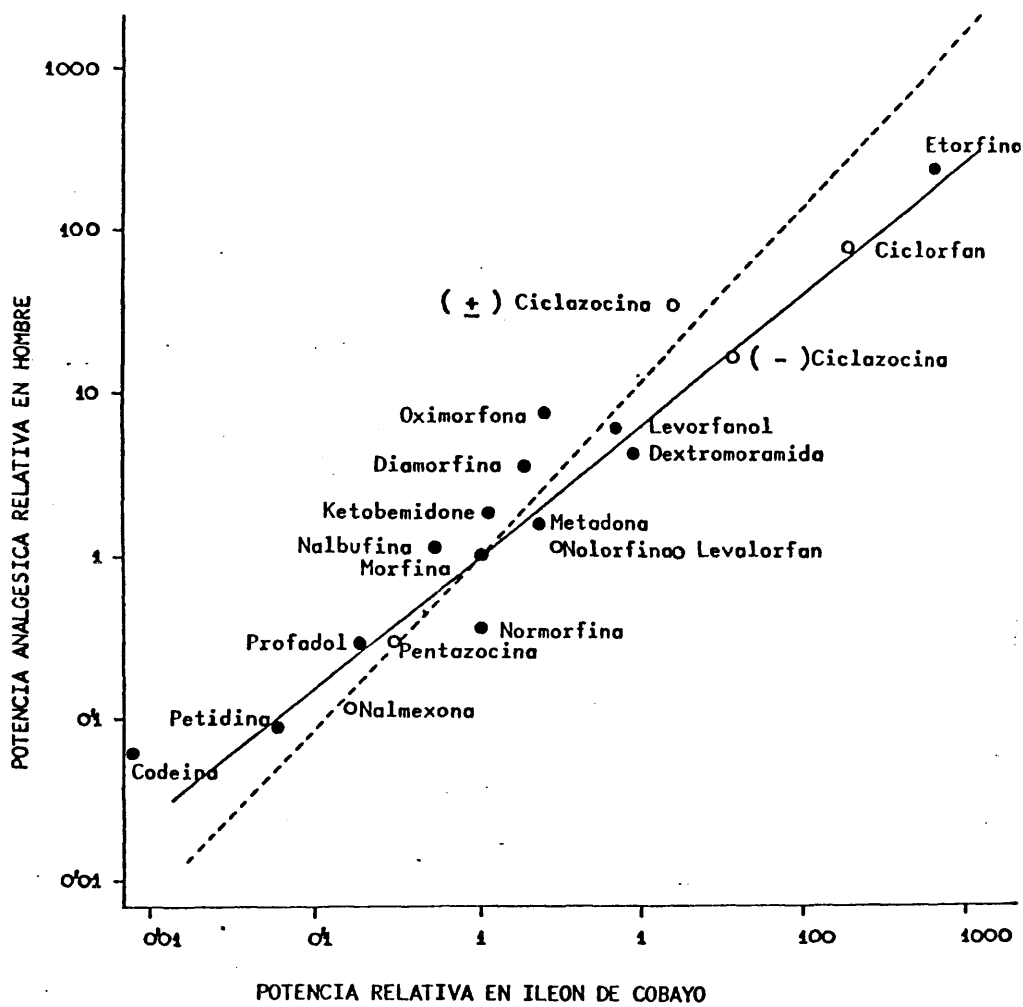


Fig. 8.- Recopilación de datos de diversos autores en la que se ve la correlación entre la actividad farmacológica de los morfínomiméticos en ileon de cobayo y su efecto analgésico.

3. Endorfinas: Generalidades.

La falta de evolución por parte del receptor opiáceo hace pensar que su función normal dentro del organismo es recibir alguna molécula que se ha mantenido inalterada a lo largo de la evolución. Intuitivamente parece inverosímil que exista un receptor específico de fármacos con origen vegetal sin existir una sustancia endógena actuando en este receptor. En 1974 JACOB confirmó la existencia de tales sustancias al comprobar la aparición de reacciones nociceptivas en animales tratados con naloxona (JACOB y cols. 1974).

TERENIUS y WAHLSTROM en Suecia y HUGHES en Escocia, trabajando con extractos de cerebro de rata, conejo, ternera, y cerdo, y con líquido cefalorraquídeo humano consiguieron obtener una fracción hidrosoluble que contenía un componente capaz de ocupar de forma específica el receptor opiáceo. TERENIUS y WAHLSTROM midieron los desplazamientos de dihidromorfina marcada sobre una preparación de membranas sinápticas, y HUGHES utilizó el test biológico de inhibición reversible por naloxona, de la contracción por estimulación eléctrica de ileon de cobayo. TERENIUS y WAHLSTROM denominaron a su producto factor tipo morfina (morphine-like-factor = MLF), y HUGHES lo denominó encefalina que deriva del significado de la expresión griega " en la cabeza". Este componente cerebral se unía de forma reversible y competitiva al receptor opiáceo, y no existe de forma detectable en cerebelo que se sabe que tiene pocos receptores opiáceos. Su peso molecular

es de 1000 a 2000 daltons, y es termoestable (TERENIUS y WAHLSTROM 1974; HUGHES, 1975; TERENIUS y WAHLSTROM, 1975).

Las características del compuesto obtenido parecían indicar una naturaleza peptídica. HUGHES y KOSTERLITZ comprobaron que dicho factor estaba constituido por dos péptidos cortos e íntimamente relacionados, compuestos ambos por unidades de cinco aminoácidos. Estas unidades tenían las secuencias siguientes:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

La única variante residía en el quinto aminoácido de las cadenas, lo que da origen a dos encefalinas: la Met-encefalina y la Leu-encefalina (HUGHES y col. 1975b). Ambas se vio que tenían actividad opioide, y una vez descubierta la composición y secuencia de aminoácidos de los productos naturales, se procedió a su síntesis, obteniéndose las encefalinas sintéticas que poseen propiedades idénticas a las naturales; e incluso se ha logrado la síntesis de pentapeptidos con mayor estabilidad y mayor actividad en los ensayos in vitro que los naturales (BAXTER y cols. 1977).

HUGHES y KOSTERLITZ hallaron que el cerebro de cerdo contenía aproximadamente cuatro veces más metionina-encefalina que leucina-encefalina. SNYDER purificó las dos encefalinas del cerebro de vacunos y vieron que la relación entre ambos péptidos era inversa a la hallada por los anteriores autores en cerdo. Quizá esta discrepancia entre las especies se deba sencillamente al resultado de una deriva genética debida al azar. Por otra parte,

se ha demostrado que la relación entre las dos encefalinas varía de unas regiones del cerebro a otras, lo que sugiere que la ligera diferencia estructural que existe entre ambos péptidos podría desempeñar alguna función reguladora (SNYDER, 1977). La rata, el conejo, y el cobayo, presentan una relación de Met y Leu-encefalinas similar al cerdo (HUGHES y KOSTERLITZ, 1977).

El grupo de GOLDSTEIN, siguiendo otra línea de investigación, anunció la presencia y aislamiento de ligandos polipeptídicos en los extractos hipofisarios bovinos (GOLDSTEIN, 1974). La actividad opiácea no dependía de la presencia de las hormonas conocidas, si no que va ligada a un péptido de peso molecular alrededor de 1750 daltons. Su origen, su insensibilidad a algunas enzimas, sus propiedades, y su peso molecular le diferencian claramente de la encefalina de HUGHES.

El término endorfina es ahora ampliamente aceptado como descriptor genérico de los péptidos opioides. Las encefalinas son pentapeptidos específicos pertenecientes a la clase de las endorfinas. Actualmente, sin embargo, ambos términos endorfinas y encefalinas se utilizan indistintamente.

La endorfina básica que describió primeramente GOLDSTEIN de 1750 daltons, parece ser un artefacto del proceso de fabricación. Otros extractos de pituitaria porcina, así como extracciones en vaca, rata y pituitarias humanas producen solo endorfinas en el rango de 3000 daltons que suponen residuos de 25 a 30 aminoácidos. La concentración por unidad de peso de tejido es aproximadamente ocho veces mayor en la hipófisis posterior que en la

hipófisis anterior, de forma que la actividad total es aproximadamente igual en los dos lóbulos (GOLDSTEIN, 1976).

HUGHES y KOSTERLITZ se dieron cuenta de una coincidencia sorprendente: la secuencia de aminoácidos de la metiminencefalina era idéntica al segmento 61-65 de la hormona pituitaria beta-lipotropina (β -LPH), que es un péptido de 91 aminoácidos normalmente relacionado con la estimulación de la degradación de las grasas. La hormona está desprovista de actividad opiode.

CHOH HAO LI (1976) extrajo de la glándula pituitaria de camello un fragmento de beta-lipotropina de una longitud de 31 aminoácidos, cuya función resultaba un tanto misteriosa; en efecto, su actividad metabolizadora de grasas era escasa pero contenía la secuencia metionina-encefalina. LI denominó a su péptido beta-endorfina por ser como morfina endógena, ya que su actividad analgésica era considerable.

Por otra parte, se aisló de la hipófisis de vaca el fragmento de beta-lipotropina correspondiente a los aminoácidos 61-91, que también ha demostrado tener actividad opiácea en diversos test. A esta molécula se le ha llamado beta-endorfina o también fragmento C. GUILLEMIN (citado por SNYDER, 1977), ha aislado otros dos péptidos además de la beta-endorfina, a partir de una mezcla de tejido hipofisario e hipotalámico procedente de cerdos. Uno de los péptidos, llamado alfa-endorfina, tenía una secuencia que correspondía a los aminoácidos 61 a 76 de la beta-lipotropina, y poseía efectos analgésicos y tranquilizantes

en los animales. El otro denominado gamma-endorfina, tenía una secuencia que correspondía a los aminoácidos 61 a 77 de la beta-lipotropina. Producía conducta violenta en ratas (figura 9).

Se han aislado también otros fragmentos de β -LPH que contienen la secuencia de la Met-enkefalina como son el fragmento 61-79 = delta-endorfina y el 61-87 = C'-fragmento, ambos con actividad analgésica (GRAY, 1978) (figura 9).

No se ha precisado claramente la biogénesis de las endorfinas. Parece sin embargo, que una sustancia natural que existe en la pituitaria es la beta-lipotropina, y que varias endorfinas menores pueden derivarse de este péptido. El mecanismo RNA mensajero parece ser que es incapaz de producir péptidos pequeños, por lo que la existencia de las encefalinas en cerebro se supone consecuencia de roturas de mayores endorfinas de las cuales derivarían. No hay evidencia hasta ahora de que las encefalinas se sinteticen en el cerebro. Existe la posibilidad de que las encefalinas del cerebro se originen en la pituitaria. La endorfina de la pituitaria sería segregada, y se libera la encefalina que entra en el cerebro y se combina allí con los receptores. Sin embargo, no se observaron descensos de actividad opiácea cerebral en ratas hipofisectomizadas, lo cual implica que los péptidos largos postulados precursores de encefalina, se encuentran tanto en el cerebro como en la pituitaria. También existe la posibilidad de que los pentapéptidos de encefalinas sean productos de degradación natural, o incluso artefactos de un procedimiento de aislamiento, y que la endorfina nativa activa fisiológicamente en el

cerebro sea un péptido considerablemente mayor (GOLDSTEIN, 1976). HUGHES y KOSTERLITZ también piensan que muy posiblemente la metionina-encefalina se forme por rotura proteolítica de una prohormona similar o idéntica a la beta-lipotropina, y sería de gran interés ver si las endorfinas de la pituitaria contienen la secuencia de Leu-encefalina, ya que ésto reforzaría la hipótesis del precursor (HUGHES y KOSTERLITZ, 1977).

Es posible que las encefalinas no sean artefactos, y la variación en su distribución sugiere que incluso podrían tener papeles individuales. Las encefalinas serían secuestradas en estructuras subcelulares, casi ciertamente dentro de las terminaciones nerviosas, y parecen estar asociadas con sistemas neuronales esparcidos en el cerebro e intestino. Las neuronas encefalinérgicas están muy distribuidas, no solo en el S.N.C. sino también en el S.N.P. También se han encontrado cantidades apreciables de ambas encefalinas en los tractos intestinales de rata, ratón, cobayo y conejo. Esta actividad está altamente concentrada en el plexo mientérico sito en el músculo longitudinal con actividades mayores a las de la mayoría de las áreas del cerebro (HUGHES y KOSTERLITZ, 1977). También se han encontrado encefalinas en hígado y aurícula de rata y conejo. El conducto deferente no contiene. Por otra parte, el fragmento C se ha encontrado no solo en la hipófisis sino también en el cerebro (JACOB y cols. 1978).

En el S.N.C. las tasas más elevadas se han encontrado regularmente en el estriado y en el hipotálamo. También contienen

notables cantidades el cerebro medio, la protuberancia, el bulbo, el hipocampo y el tálamo. El cortex contiene relativamente poco. La distribución filogénica es por otra parte parecida a la de receptores opiáceos. No se han encontrado en invertebrados, y en los vertebrados las tasas cerebrales de mamíferos son muy bajas, posiblemente debido al desarrollo de la corteza en ellos. Actualmente se aíslan encefalinas en líquido cefalorraquídeo y sangre humana (JACOB y cols. 1978; ROSS y cols. 1978; FOLEY y cols. 1978).

3.1. Receptores de encefalinas.

Se piensa que las encefalinas compiten directamente con el receptor opiáceo, cuya existencia estaría en último término basada en la presencia endógena de estos péptidos. Sin embargo, estos péptidos no tienen una estructura primaria similar a los opiáceos. Se ha buscado la base de la competición en la estructura secundaria propuesta para el péptido. Se han constituido modelos moleculares espaciales de morfina, oripavina, importante derivado morfínico, y metionina-encefalina (BRADBURY y cols. 1976; SCHILLER y cols. 1977; HUIBLET, 1978). La conformación de la morfina viene definida por la rigidez de su estructura molecular, y similar es el caso de la oripavina. El pentapéptido es capaz de asumir varias conformaciones en solución acuosa, pero en el receptor solo una, pudiéndose construir un modelo que presenta elementos estructurales en común con la morfina, y sobre todo un sorprendente parecido con la estructura espacial de la oripavina. Los grupos funcionales específicos quedan así colocados

en la misma orientación, bien suspendidos del esqueleto peptídico o formando parte de una estructura alcaloídica rígida. El modelo presenta como base un doblez que parece estar presente en la conformación propuesta para la forma biológica activa de la metionina-encefalina (BRADBURY y cols. 1976) (figura 10).

Es importante el grupo amino del residuo de la tirosina, y su eliminación o bloqueo abole completamente la actividad. La introducción de un grupo metilo en el N de la tirosina hace también variar la actividad en los ensayos in vitro (WATERFIELD, y cols. 1977). Sorprendentemente la adición de un aminoácido adicional al N terminal no altera marcadamente la actividad. Sin embargo, se ha demostrado que la eliminación de cualquier aminoácido terminal da tetrapeptidos con solo el 1% de la actividad del compuesto padre. El grupo OH aromático de la tirosina sí es esencial absolutamente para la actividad (HUGHES y KOSTERLITZ, 1977).

Los estudios con metilaciones en el OH del residuo tirosina y la N metilación de su grupo amino terminal, indican que estos grupos se corresponden con el grupo fenol y el nitrógeno terciario respectivamente en la morfina (BRADBURY, y cols. 1976; SCHILLER, y cols. 1977).

La parte aromática de las cadenas de la tirosina y la fenilalanina, así como el grupo terminal metionina o leucina son componentes esenciales (HUGHES y KOSTERLITZ, 1977).

También los residuos de glicina juegan un papel esencial para establecer la distancia requerida entre los grupos funciona-

les que se unen a los receptores (KNOLL, 1976).

Se ha demostrado también que ciertas sustituciones en posición 2 sobre todo por D-alanina, realizadas para proteger la unión Tyr-Gly, confieren una resistencia mayor a la inactivación de extractos de cerebro (JACOB y FILLON, 1978), igualmente aumenta la actividad en el ileon de cobayo y deferente de ratón (WATERFIELD y col. 1977).

Se siguen haciendo estudios sobre la relación estructura-actividad de las encefalinas y compuestos análogos (SHAW y TURNBULL, 1978; SMITHWICK y cols. 1978; GACEL y cols. 1978).

Se ha discutido la existencia de receptores idénticos para opiáceos y péptidos endógenos. Los estudios hechos en órganos parecen sugerir según el grupo de KOSTERLITZ que los receptores del ileon de cobayo serían preponderantemente receptores con mayor afinidad para morfina y etorfina que para encefalinas y el fragmento C, y en el deferente de ratón ocurriría lo contrario. Los primeros serían de tipo μ , y los segundos se llamarían de tipo δ , que sería también el de los extractos de cerebro de cobayo (JACOB y cols. 1978). Según KNOLL existirían en la arteria de conejo receptores de encefalinas insensibles a los compuestos morfínicos. En este órgano las encefalinas inhiben la liberación de noradrenalina actuando en receptores específicos (KNOLL, 1976). Lo contrario también podría ser cierto, y las encefalinas no serían ligandos naturales para los receptores opiáceos, si no que solo se unirían por similitudes estructurales a

tales receptores, mimificando el efecto de los opiáceos. Incluso los tests de analgesia han demostrado que farmacológicamente los más importantes receptores opiáceos en cerebro son insensibles a encefalinas (KNOLL, 1976).

SIMANTOV y cols. (1976a) han estudiado la distribución regional de la encefalina en el cerebro de mono, comparándola con la distribución de receptores opiáceos analizada anteriormente por ellos mismos. En primer lugar se observan grandes variaciones según las regiones. Aunque no hay una correspondencia regional absoluta entre la riqueza de receptores opiáceos y abundancia de actividad encefalínica, existen ciertas áreas en donde abundan ambos elementos y otras en las que no hay ninguno de los dos.

Actualmente se siguen haciendo estudios de la unión estereoespecífica de encefalinas y morfínicos en las membranas de cerebro, y se han determinado constantes de disociación distintas para unos y otros. Las encefalinas tienen una cinética de asociación y disociación más lenta, y dependiente de la temperatura. Esto puede que sea debido a la necesidad de cambios conformacionales por parte del péptido en las interacciones con el receptor opiáceo, mientras que los opiáceos presentan una estructura más rígida, y no sufren cambios conformacionales al unirse al receptor. También parece ser que el residuo fenilalanina de la encefalina se uniría al receptor opiáceo por un lugar del que no se desplaza rápidamente por ciertos opiáceos (SIMANTOV y cols 1978).

Se señalan también, la existencia de lugares de unión de encefalina con alta afinidad, (Sitios I, que corresponderían a los receptores opiáceos) y otros lugares donde las encefalinas se unen con menor afinidad (Sitios II) (MILFROY y cols. 1978).

Igual que en el caso de los opiáceos las influencias iónicas también juegan papel en la actividad encefalinérgica. La actividad encefalinérgica aumento por iones manganeso pero no por iones cálcio, y se deprime por iones sodio pero no por iones potasio. Las influencias iónicas son iguales en las preparaciones de encefalina tanto en ratas control como en animales tratados con pellets de morfina o animales tratados con pellets de morfina y pellets de naloxona. En los tres casos 15 mM y 100 mM de sodio reduce la actividad encefalinérgica alrededor de 60% y 70%, mientras que idénticas concentraciones de potasio no tienen efecto. En contraste 1 mM de manganeso aumenta la actividad encefalinérgica alrededor de 50% a 70% en los tres grupos de animales, mientras que la misma concentración de calcio no tiene influencia apreciable (SIMANTOV y SHYDER, 1976b). También parece ser que existirían endorfinas con acción principalmente antagonista: naloxone-like-factor o antiendorfinas (JACOB y cols. 1978).

Se han aislado también sustancias endógenas similares a morfina de naturaleza no peptídica mediante la utilización de anticuerpos específicos de morfina que son capaces de reconocerlas (GINTZLER, y cols. 1976).

3.2. Acciones y función de endorfinas y encefalinas. Su importancia para explicar los fenómenos de dependencia.

Utilizando el bioensayo del conducto deferente de ratón o el del ileon de cobayo, se comprobó que tanto la Met-encefalina como la Leu-encefalina, poseían actividad agonista opiácea. En el ileon de cobayo Met-encefalina, normorfina y morfina son equiactivas para deprimir las contracciones producidas por estimulación eléctrica. La Leu-encefalina tiene aproximadamente el 25% de la actividad. El deferente de ratón es más sensible a las encefalinas, que son de 30 a 60 veces más activas que la morfina. Comparando las actividades de estos compuestos en cada uno de los bioensayos, se vió que la Leu-encefalina es casi 50 veces más activa en el deferente que en el ileon de cobayo, mientras que Met-encefalina, y beta-endorfina son 8,6 y 1,4 veces más activas respectivamente. En el ileon de cobayo la naloxona antagoniza a la normorfina y a las encefalinas igualmente bien, mientras que en el deferente de ratón se requieren alrededor de diez veces más de naloxona para las encefalinas que para la normorfina (HUGHES y KOSTERLITZ, 1977; WATERFIELD y cols. 1977).

Los estudios de unión a receptor en homogeneizados de cerebro presentan pérdidas debidas a la degradación enzimática, y los inhibidores enzimáticos como bacitracina pueden interferir con la unión. El fragmento C es mucho más estable que encefalinas menores, tanto en el ileon de cobayo como en extractos de cerebro (JACOB y cols. 1978). En ensayos de unión al receptor con membra-

nas cerebrales de cobayo se ha visto que beta-endorfina sintética tiene 2 ó 3 veces la actividad de normorfina, y la Met-encefalina la quinta parte (LOH y cols, 1976).

El análisis farmacológico de las acciones de las encefalinas in vivo también se hace difícil por su rápida degradación en el plasma, por lo que los compuestos se aplican bastante cerca de su lugar de acción. La labilidad de endorfinas hace que presenten débil actividad analgésica. Así inyectando a ratones encefalina en los ventrículos cerebrales o por vía intravenosa se vió que ambas encefalinas mostraron actividad analgésica comparable a la de la morfina, aunque su actividad fue menor que la de ésta. La naloxona inhibió el efecto de la Met-encefalina pero el de la Leu-encefalina lo inhibió solo a dosis muy altas (BUSCHER y cols. 1976). También se observó el efecto analgésico de las encefalinas en ratas, descartándose la posibilidad de la existencia de artefactos al inyectar la sustancia directamente en cerebro (BELLUZZI y cols. 1976). En contraste, la beta-endorfina es un analgésico muy activo, incluso cuando se aplica intravenoso, resultando entonces de 3 a 4 veces más activo que la morfina. Cuando se administra directamente dentro del cerebro los tests en ratones y ratas dieron a la beta-endorfina de 18 a 33 veces más actividad analgésica que la morfina, y ésta acción se antagonizó por naloxona (LOH y cols. 1976).

También se ha investigado el efecto local de encefalinas sobre diversas neuronas para evitar los problemas de degrada-

ción, y se ha comparado con el efecto de la morfina. La aplicación iontoforética de Met-enkefalina en neuronas del tallo cerebral de rata, mostró un alto efecto depresor en éstas neuronas. El efecto es más similar al de la etorfina que tiene en ellas siempre efecto depresor, pues la morfina muestra efectos excitadores además de los inhibidores (BRADLEY y cols. 1976). En el tallo del cerebro de gato Met-enkefalina como Leu-enkefalina tienen efectos inhibidores similares a los que en él muestra la morfina, pero sorprendentemente ninguno de éstos efectos puede ser bloqueado por naloxona (GENT y WOLSTENCROFT, 1976). También otros autores han estudiado la depresión de neuronas por aplicación microiontoforética de Met-enkefalina en rata y gato (HILL y cols. 1976).

Se ha comprobado que aunque la Met-enkefalina muestra fundamentalmente actividades agonistas en órganos aislados, al inyectarla introvicularmente en ratas es capaz de desencadenar el síndrome de abstinencia. Esto resultó sorprendente, pero también los estudios de su sensibilidad al sodio en experiencias de unión al receptor, sugieren que la Met-enkefalina tiene al menos algún efecto antagonista. El fenómeno de la abstinencia se explicó pensando que existe una sustancia opiode endógena, no identificada, más activa como agonista opiáceo que Met-enkefalina, que se moviliza cuando se produce estimulación dolorosa, y que la Met-enkefalina desplazaría al ser administrada introvicularmente. Los resultados con Leu-enkefalina son compatibles con los datos *in vitro*, y muestran que es un agonista más puro que Met-

encefalina (LEYBIN y cols. 1976).

El hecho de que las encefalinas administradas exógenamente produzcan analgesia puede interpretarse en el sentido de que estas sustancias tienden a reducir o modular la actividad de las vías de la sensibilidad dolorosa. Estas vías son constantemente bombardeadas por estímulos potencialmente nociceptivos, y los polipéptidos endógenos pueden mantener un alto nivel del umbral de la sensibilidad, de manera que controlarían constantemente la percepción del dolor producido por estímulos nociceptivos físicos. Es posible que la estimulación eléctrica, productora de analgesia, sea capaz de liberar los polipéptidos endorfinicos, que sean los que después se fijan a los receptores opiáceos (BUCKETT, 1978). También la analgesia por acupuntura parece que estaría mediada por las endorfinas, (POMERANZ y CHIU, 1976; GARCIA DE JALON, 1977; POMERANZ y CHENG, 1978). No es nueva la idea de que polipéptidos puedan desempeñar un papel en la neurotransmisión (SNYDER, 1977). Puede que las endorfinas se liberen como elementos independientes provenientes de una molécula común, o puede que sea ésta la liberada y que sufra sucesivas particiones extraneuronales, dando origen a las diversas endorfinas, hasta llegar a la molécula principal de la Met-encefalina (FLOREZ BELEDO, 1977; JACOB y FILLON, 1978). Varios hechos apoyan el papel de las encefalinas en el S.N.C. como neurotransmisores como es su liberación "in vitro" en forma dependiente de la concentración de Ca^{++} (RICHTER y cols. 1978).

También se piensa que las encefalinas podrían intervenir

en la regulación de la liberación de otros transmisores, y se han descrito otros efectos morfinomiméticos además de la producción de analgesia. Se ha descrito la inhibición de la liberación de noradrenalina por las encefalinas en cortes de corteza de rata, y también una inhibición de la liberación de dopamina en el S.N.C. por beta-endorfina (LOH y cols. 1976). Se han descrito aumentos en DOPA y en 5HT en cerebros de rata por beta-endorfina (AHTEE y cols. 1978) y aumentos en la síntesis de dopamina (ALGERI y cols. 1978) y no se descarta la posibilidad de que las encefalinas sean moduladoras de la transmisión por catecolaminos en regiones cerebrales específicas (VERSTEEG y cols. 1978).

Si se analizan los efectos de las encefalinas a nivel bioquímico, también se han podido probar nuevas similitudes con la morfina. Así por ejemplo, la encefalina a dosis muy pequeñas estimula en cultivos de células de neuroblastoma y glioma la formación de GMPc e inhibe la formación de AMPc, tanto basal como la estimulada por prostaglandinas; efectos que son característicos de la morfina (GOLDSTEIN, 1976; FLOREZ BELEDO, 1977). Estos mismos efectos se observaron en cortes de estriado de rata pero con concentraciones mucho más altas, posiblemente debido a la inestabilidad de estas sustancias en tejidos de mamíferos (MINNEHAN e IVERSEN, 1976).

Otras evidencias existen también de que polipéptidos morfinicos podrían intervenir en fenómenos emocionales, de comportamiento y de regulación térmica (BLOOM y cols. 1976; JACQUET y

MARKS, 1976; ERVIN y cols. 1978; SEGAL y BROWNE, 1978; BROWNE y SEGAL, 1978; MORETON y cols. 1973; HAVLICEK y cols. 1978; PERT y cols. 1978; IWAMOTO y col. 1978). Incluso se ha sugerido que las encefalinas pueden jugar algún papel en la epileptogénesis (URCA, y cols. 1977).

La participación de las endorfinas en las enfermedades mentales ha sido sugerida por TERENIUS y cols. en 1976 (citado por JACOB y cols. 1978), que habían observado aumentos de las tasas de encefalinas en el líquido cefalorraquídeo de esquizofrénicos, y existen ensayos de tratamientos de esta afección por naloxona (RIGTER y cols. 1978). Otros investigadores han sugerido que el fragmento C podría comportarse como un neuroléptico o antipsicótico endógeno, y otros han propuesto que el fragmento C y la Leu-encefalina se podrían considerar como antidepresores potenciales (JACOB y cols. 1978).

Se ha visto recientemente que el efecto de las encefalinas también podría venir condicionado por otros neurotransmisores. Así el efecto encefalínico parece ser dependiente de pautas funcionales de 5HT en cerebro, y se ha comprobado que la inyección de 5HT potenciaba la acción de encefalinas (LEE y cols. 1973).

Se ha observado tolerancia en la rata para el efecto analgésico del fragmento C, de endorfinas hipofisarias, y para la 2d Ala-Met-encefalina. Por otra parte, la tolerancia es cruzada y los animales tratados con el fragmento C o la 2d Ala-Met-encefalina responden peor a la morfina. El cruzamiento sustancia C-

morfina no es sin embargo total. Inversamente la Met-enkefalina el fragmento C y las endorfinas resultan menos eficaces en animales hechos tolerantes a morfina, lo cual ha sido observado para los efectos analgésicos en ratón y rata, y para los efectos sobre neuronas corticales y estriado de rata. La naloxona por otra parte, ha precipitado signos de abstinencia en animales tratados con Met-enkefalina o con fragmento C, y también en ratas tratadas por vía intraventricular con extractos purificados de hipófisis de cerdo o con 2d Ala-Met-enkefalina. Las endorfinas pueden también sustituir a la morfina para deprimir o inhibir un síndrome de abstinencia (JACOB y cols. 1978). En 1976 WATERFIELD, HUGHES y KOSTERLITZ comprobaron la existencia de tolerancia cruzada entre enkefalinas y opiáceos en el plexo mientérico de ileon de cobayo y en el deferente de ratón.

La importancia fisiológica del factor endógeno morfino-mimético también es considerable para explicar los fenómenos de dependencia y tolerancia (WEI y LOH, 1976), de forma que estos no serían consecuencia de un cambio en los niveles de receptores (TERENIUS y WAHLSTROM, 1975). SNYDER en 1977 propone un mecanismo de tolerancia celular para explicar los fenómenos de tolerancia y de dependencia opiácea. El mecanismo de inhibición de las enkefalinas podría ser indirecto. En vez de actuar inmediatamente sobre la neurona receptora, la enkefalina podría bloquear la liberación del neurotransmisor excitador Ach disminuyendo así la fuerza excitadora que llega a la célula receptora. Según este mo-

delo la encefalina liberada de una neurona encefalinérgica se une a los receptores opiáceos situados sobre el terminal de una neurona excitadora, despolarizando parcialmente la membrana del terminal y disminuyendo la despolarización neta producida por la llegada de un impulso nervioso. La cantidad de neurotransmisor liberada por el terminal es proporcional a la despolarización neta, por lo que se libera menos neurotransmisor excitador. En consecuencia, la célula receptora también está expuesta a una estimulación excitadora menor, y reduce su frecuencia de producción de impulsos. Un sistema inhibitorio de éste tipo para la encefalina podría modular la actividad de las vías ascendentes que conducen los estímulos dolorosos de la médula espinal y del cerebro. En condiciones de reposo los receptores opiáceos están sometidos a un determinado nivel basal de encefalina, y los opiáceos actuarían uniéndose a los receptores de la encefalina desocupados, reforzando así los efectos del sistema. Si el tratamiento con morfina es prolongado las células que poseen receptores opiáceos se encuentran con una sobrecarga de material opiáceo y por algún bucle hipotético de retroalimentación neuronal envían un mensaje a las células de encefalina para detener su producción de impulsos y su liberación de encefalinas. Cuando esto ocurre, las células receptoras están sometidas tan solo a la morfina, de modo que la toleran en cantidades superiores a fin de sustituir a la encefalina que ya no reciben. Cuando cesa la administración de morfina, los receptores opiáceos se encuentran con que no tienen ni morfi-

na ni encefalina y esta carencia inicia una serie de sucesos que dan lugar a los síntomas de abstinencia (SNYDER, 1977) (figura 11).

En otros sistemas neurotransmisores del cerebro, la detención de la producción de impulsos nerviosos está asociada a una acumulación del neurotransmisor contenido en el cerebro, que se debe sencillamente a que se sigue sintetizando el transmisor aunque no se siga liberando. Lo mismo ocurre en los sistemas de encefalina, y así SIMANTOV y SNYDER comprobaron los aumentos en los niveles de encefalina en cerebros de ratas dependientes de morfina. Los niveles aumentados permanecen aparentemente indiferentes a las manipulaciones iónicas (SIMANTOV y SNYDER, 1976b).

Los fenómenos de tolerancia podrían ser explicados pensando que el mensaje de feedback para las neuronas de encefalinas es debido a cambios en nucleótidos cíclicos (SIMANTOV y SNYDER, 1976b). La administración de opiáceos inhibe la adenilciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc. Tras una exposición prolongada a los opiáceos la célula se adapta y sintetiza un mayor número de moléculas del enzima. Cuando cesa la administración del opiáceo todas las moléculas del enzima están activas y sintetizan AMPc en exceso, lo que podría ser el factor desencadenante de una secuencia de hechos que abocan en los síntomas de abstinencia (SNYDER, 1977).

Varios laboratorios están trabajando para desarrollar un radioinmunoensayo que permita la medida sensible de endorfinas en los fluidos del cuerpo. Esto podría permitir una prueba directa

de que los mecanismos clásicos de feedback hormonal podrían actuar para suprimir la síntesis de opiáceos endógenos cuando los receptores están ocupados por un opiáceo exógeno. En otros sistemas endocrinos ya se ha demostrado que la administración de una hormona exógena también activa el feedback homeostático negativo que baja la producción endógena. Incluso se ha propuesto la hipótesis de que en algunas personas una deficiencia endorrfínica genéticamente determinada podría predisponer a la adicción narcótica (GOLDSTEIN, 1976).

Sobre la relación que puede existir entre sustancias opiomiméticas y la toma de alimento podemos considerar los trabajos de ZIOUDROU y KLEE (1978) que comprobaron la existencia de péptidos opiomiméticos con el aminoácido Tyr terminal provenientes de la digestión proteica por pepsina. Procedente de los productos digestivos del gluten de trigo y la α caseína aislaron unos péptidos hidrofóbicos que inhibían las contracciones del deferente de ratón estimulado eléctricamente y que inhibían también la adenil ciclase de células híbridas de neuroblastoma x glioma; inhibiciones ambas reversibles por naloxona. A estos péptidos provenientes de sustancias exógenas que poseían actividad opioide les llamaron exorfinas y consideraron la posibilidad de que estén implicadas en el control de la toma de alimentos así como en algunos estados de enfermedad.

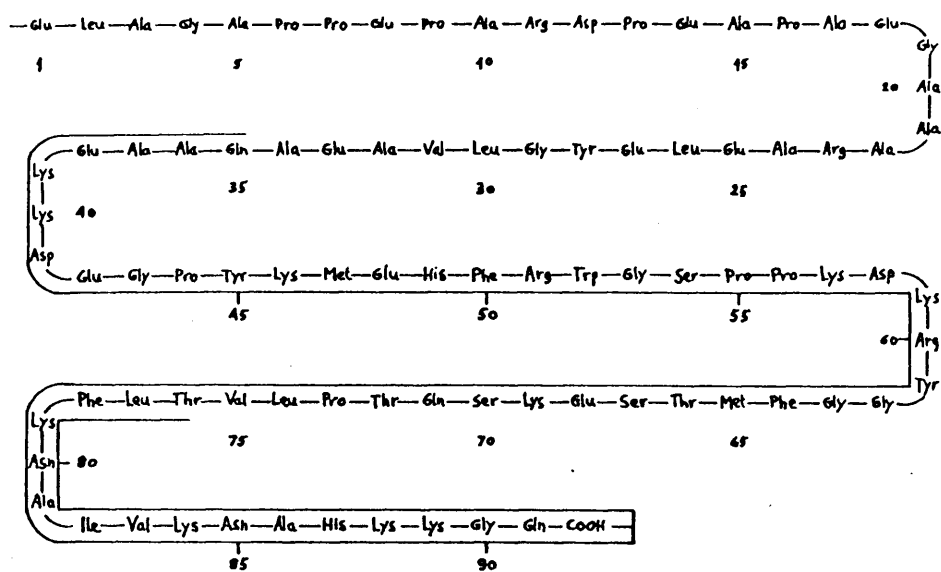
3.3. Liberación de endorfinas por el ileon de cobayo.

En 1975 HUGHES (citado por SCHULZ y cols. 1977), ya había aislado encefalina del ileon de cobaya, y ELDE (citado por SCHULZ y cols. 1977), localizó este pentapéptido inmunohistoquímicamente en el plexo mientérico, pero aún permanece oscuro su papel fisiológico. En 1977 el grupo de SCHULZ y SNYDER ha comprobado también que por estimulación eléctrica, se libera del plexo mientérico un material con actividad opiácea. El material liberado perdía actividad cuando se incubaba con pronasa, pero no cuando se incubó con tripsina. El uso de radioinmunoensayos selectivos para metionina y leucina encefalinas mostraron que la mitad de éste material se une a los anticuerpos de la metionina, y la otra mitad a los de la leucina. Si el material sensible a pronasa, liberado por el plexo mientérico se metaboliza por degradación enzimática, la adición de un inhibidor de la peptidasa como bacitracina se esperaba que aumentase la concentración en el baño; sin embargo, la bacitracina a concentración $2 \cdot 10^{-5} M$, que no tiene efecto sobre la amplitud de la contracción, causó un gran descenso en la cantidad de material encefalínico liberado que se valoró por cromatografía en capa fina. Estos autores explicaron, los inesperados resultados suponiendo que la bacitracina podía afectar directamente el mecanismo de liberación de endorfinas, o más posiblemente afectaría su formación por rotura enzimática a partir de un péptido mayor sin actividad opiácea (SCHULZ y cols. 1977).

En 1977 se comprobó (PUIG y cols.), que la estimulación prolongada a 10 Hz de la preparación de músculo longitudinal-plexo mientérico del ileon de cobayo libera ligandos endógenos reduciéndose la amplitud de la contracción al volver a las condiciones iniciales de estimulación anteriores al período de exposición a 10 Hz. La especificidad del fenómeno se demostró por la reversión obtenida con antagonistas opiáceos. Este sistema puede usarse para el estudio de la liberación de las endorfinas del plexo. Numerosos ensayos se siguen haciendo para estudiar la liberación de ligandos endógenos con ésta preparación de intestino de cobayo utilizando diversas frecuencias de estimulación (SOSA y cols. 1978).

FIGURAS DE ENDORFINAS

Figura 9



Fragmentos de la beta-lipotropina (β -LPH de 91 aminoácidos sin actividad analgésica):

<u>Nombre</u>	<u>Nº aminoácidos</u>	<u>Fracción</u>	<u>Actividad analgésica</u>
Gamma-lipotropina	58	1-58	NO
Beta-melanotropina	18	41-58	NO
Met-enkefalina	5	61-65	SI
Beta-endorfina=Fragmento C	31	61-91	SI
Alfa-endorfina	16	61-76	SI (poca)
Gamma-endorfina	17	61-77	NO
Fragmento C'	27	61-87	SI
Delta-endorfina	19	61-79	SI

(Snyder, 1977; Graf, 1978)

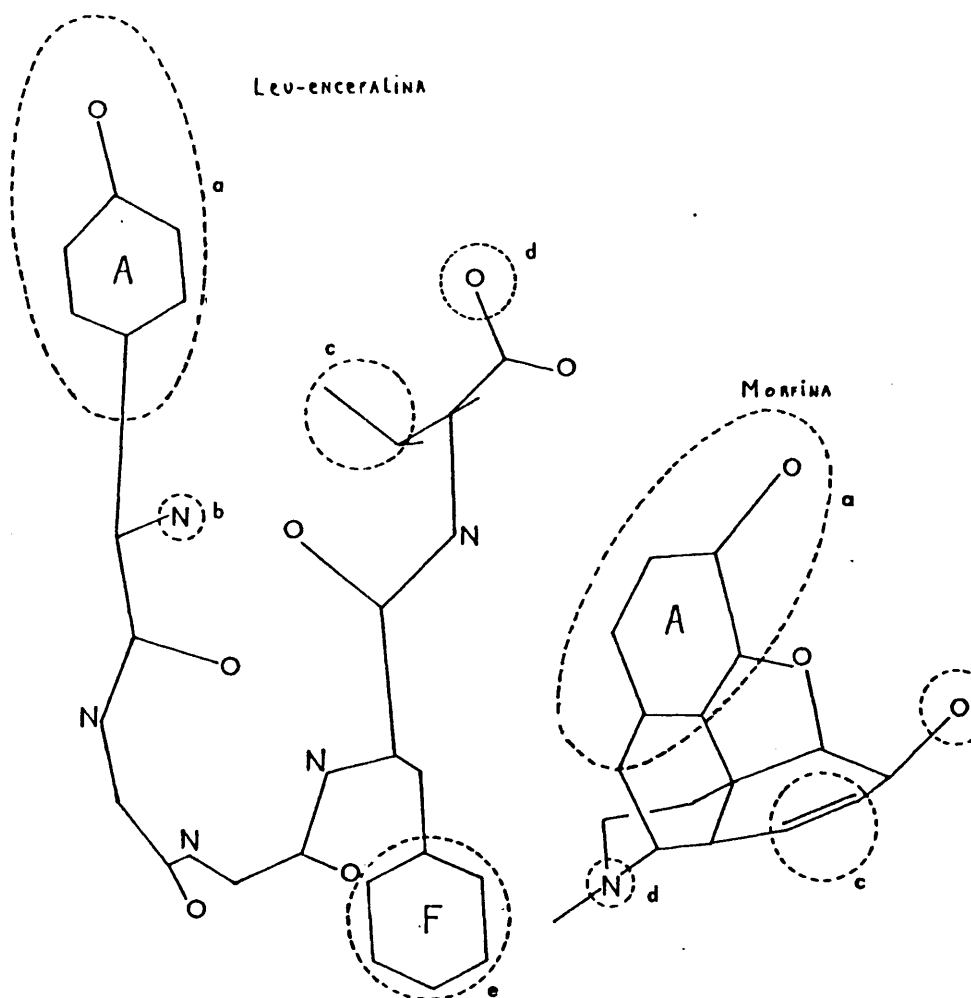


Fig. 10.- Se observan 5 regiones importantes aunque no todas necesarias para la actividad opiócea:

- a) Un grupo fenilhidróxilo unido al anillo A de la morfina, análogo al hidróxilo de la tirosina de la encefalina.
- b) Un nitrógeno aminico, el nitrógeno terciario de morfina, análogo al grupo amino primario de la tirosina de la encefalina.
- c) Una región hidrofóbica, la superficie C(7)-C(8) localizada en la misma región que la parte de la cadena de la leucina y análoga del lado de la cadena de la metionina en Met⁵-encefalina.
- d) Grupo hidrofílico en la región del O(6) de la morfina, el cual corresponde al carboxilo terminal de la encefalina.
- e) Un anillo fenólico el cual falta en morfina pero identificado como el anillo F, en numerosos fármacos opiáceos más potentes, y el cual corresponde a la parte relativamente no apretada de la cadena de la fenilalanina de la encefalina. (Smithy & Griffin 1978)

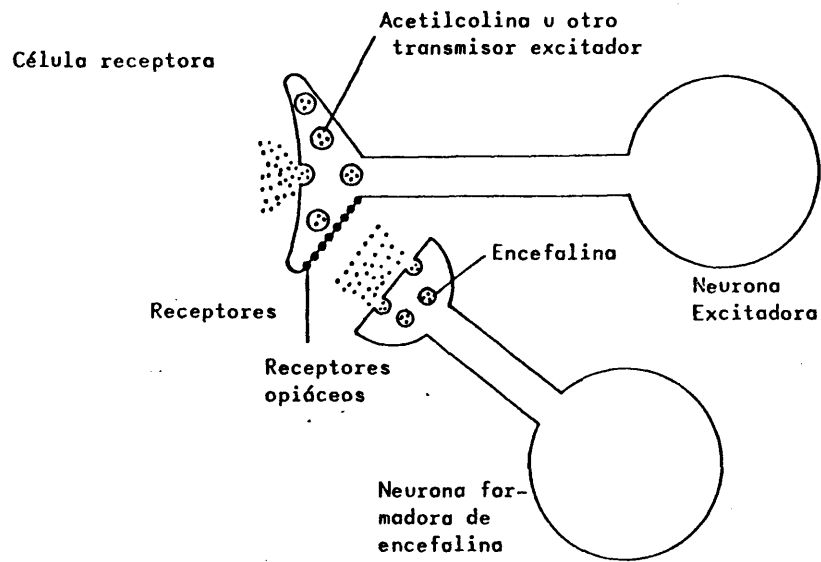


Fig. 11.- Probablemente existen neuronas encefalinérgicas capaces de mantener un cierto nivel basal de encefalinas actuando como moduladoras de la liberación de otros neurotransmisores excitadores (Snyder, 1977).

4. Sustancia P.

La sustancia P (SP) desde hace tiempo se sabe que tiene efectos marcados en el S.N.C. LEMBECK en 1953 (citado por STEWART y col. 1976), sugirió que la SP podría ser un neurotransmisor de los aferentes sensoriales primarios. La sustancia natural excepto cuando se encuentra altamente purificada se sabe que está contaminada con bradykinina o algunas otras sustancias kinin-like. Como la bradykinina tiene también marcados efectos en el S.N.C. los ensayos con SP a menudo podían inducir a error. Esto puede suceder con algunas de las observaciones conflictivas que existen sobre el papel de SP en la transmisión sensorial, y puede explicar su interacción con los opiáceos. La sustancia P impura se ha visto que antagoniza a la morfina, y existen evidencias de su marcado carácter dólgo; sin embargo la sustancia P sintética a concentraciones mayores a 1 mg/ml no dió reacciones dolorosas que si manifestaron fuertemente Ach y bradykinina a esa concentración. Por otra parte la sustancia P sintética al administrarla con inyecciones intracerebrales o intraperitoneales se comportó como analgésico con el test de la placa caliente aumentando el tiempo de reacción de los ratones. Este efecto se pudo antagonizar con naloxana y además en animales tratados crónicamente con morfina la SP no produjo ninguna reacción analgésica (STEWART y cols. 1976).

COX en 1975 (citado por STEWART y cols. 1976), comprobó que la sustancia P no actúa como la morfina en el ileon de

cobayo estimulado electricamente, y TERENIUS en 1975 (citado por STEWART y cols. 1976) comprobó que esta sustancia no se combina con los receptores morfínicos. Los fallos de SP para actuar como morphine-like en el ileon de cobayo y en la unión a receptores opiáceos se pueden deber a su potente poder estimulante de la contracción por una parte, y a la posible diversidad de receptores opiáceos por otra (STEWART y cols. 1976). HUGHES en 1975 (citado por STEWART y cols. 1976), sugirió que las encefalinas podrían actuar como análogos de la sustancia P.

También es posible que la acción analgésica de SP este mediada a través de la liberación de otras sustancias. Otra posibilidad sería que el efecto analgésico fuese atribuible no a la SP si no a un metabolito suyo (STEWART y cols. 1976).

Por otra parte hay que destacar que la estricta localización en los intestinos y el cerebro de las encefalinas recuerda la distribución de péptidos que parecen desempeñar papeles hormonales en los intestinos y actuar como neurotransmisores en el cerebro: tal es el caso de la somatostatina y la sustancia P (SNYDER, 1977).

Los estudios que se siguen haciendo para relacionar los efectos de morfina y sustancia P parecen a pesar de todo indicar que estas sustancias no actúan en el mismo receptor (HENRY, 1978).

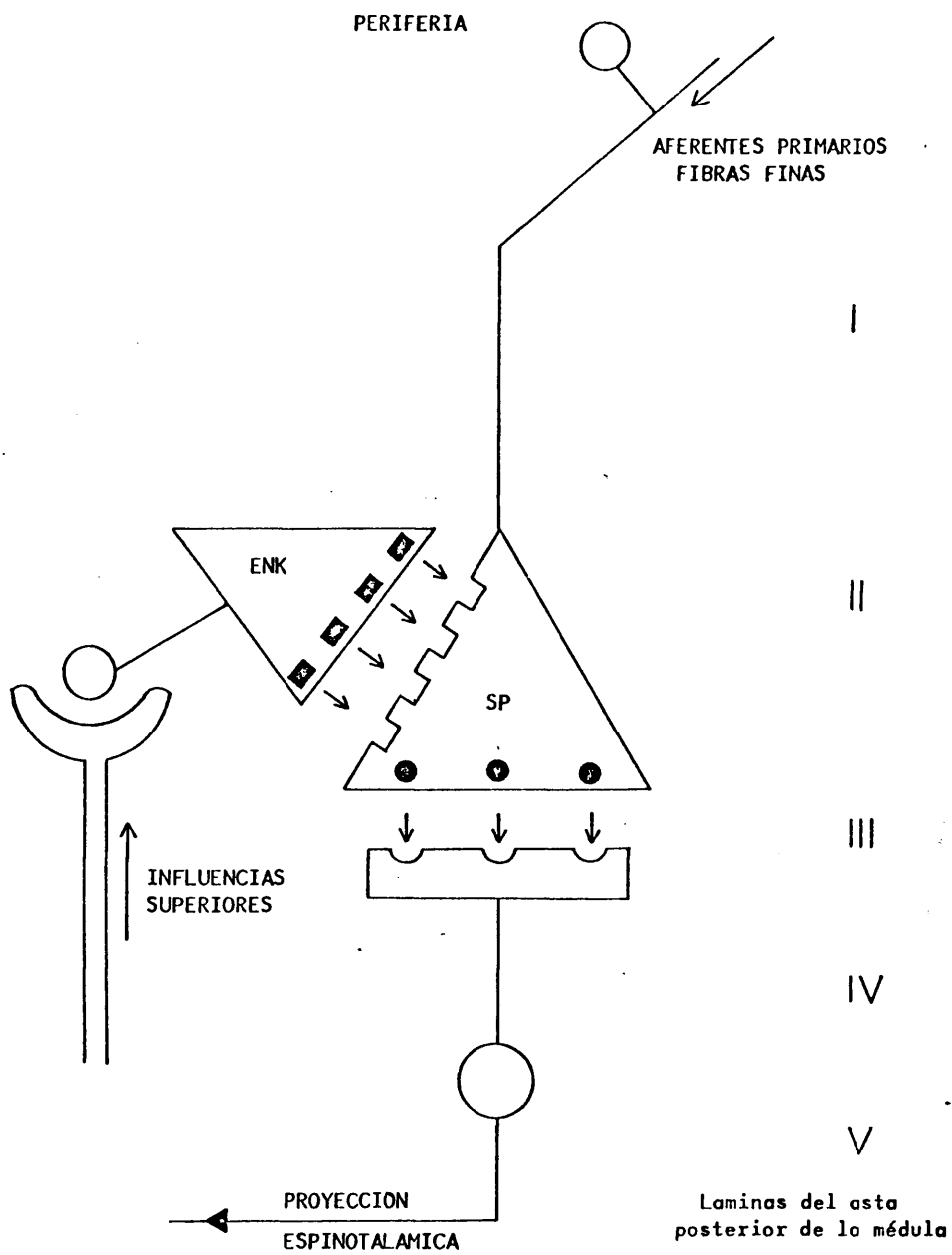


Figura 12.- Posible relación entre encefalinas y sustancia P.

5. Cafeina y bases xánticas: Generalidades y su efecto en la contracción.

La cafeina fue extraída por primera vez de plantas en 1820 por el científico germano FRIEDLIEB RUNGE (citado por SYED 1976), como un polvo blanco cristalino sin olor. Posteriormente, se han estudiado sus efectos centrales, metabólicos, y genéticos (WALDECK, 1972; SYED, 1976). Algunas acciones específicas de metilxantinas se han estudiado también a nivel celular; así se ha visto que las metilxantinas inhiben la rotura del AMPc por fosfodiesterasa potenciando la acción estimulante metabólica del AMPc en muchos tejidos. La estimulación de células del músculo esquelético es otra propiedad fundamental de las metilxantinas, y el mecanismo básico para este efecto parece ser que sería la liberación de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico dentro del mioplasma. Desde hace tiempo se ha supuesto que el sistema T tubular sería el lugar de acción de la cafeina ; y el hinchamiento de éste sistema en medio hipertónico puede alterar la efectividad de la cafeina en la contracción (ISAACSON, 1969). Se ha comprobado también que los músculos esqueléticos de rata son más sensibles a la estimulación de la cafeina cuando se usan soluciones a pH = 8 que a pH = 6, y los estudios de difusión indican que las soluciones de cafeina en Krebs a pH = 6 contienen mayor proporción de cafeina agregada en forma coloidal que a pH = 8, justificando así el efecto del pH en la sensibilidad de los músculos de rata para la estimulación de cafeina. En el rango de pH utilizado más del

99,8% de la cafeína permanece en la forma no ionizada, de forma que parece improbable que los cambios de estado ionizado a no ionizado en solución pudieran justificar la efectividad de la cafeína en la estimulación (FRANK y cols, 1970).

La cafeína inhibe la reincorporación de calcio, y su efecto tiene lugar en la fracción pesada citoplasmática fundamentalmente, cuyos elementos celulares tienen como función la liberación, reincorporación y almacenamiento de calcio. La fracción pesada contiene mitocondrias y una variedad de estructuras vesiculares. La mitocondria se ha visto que contribuye insignificativamente a la reincorporación y unión de calcio. Los elementos vesiculares sensibles a la cafeína parece ser que derivan del retículo sarcoplásmico, posiblemente en la unión de los túbulos transversos y la cisterna terminal (FAIRHURST y HASSELBACK, 1970). Por centrifugación diferencial de músculo sartorio de rana se ha visto que el tratamiento con cafeína trae un aumento de calcio en la fracción mitocondrial. Las fracciones mitocondrial y microsomal contienen más de un tercio del calcio total del músculo. La cafeína parece ser que produce una ganancia de calcio por la fracción mitocondrial o expensas de la microsomal que libera el calcio. También se acusan con el tratamiento de cafeína cambios morfológicos en las mitocondrias (DORYS, y KARI, 1971).

Los estudios de salida de calcio radiactivo de músculo esquelético de sapo indican que el calcio está contenido en tres compartimentos:

- a) Espacio extracelular
- b) Calcio del retículo sarcoplásmico y el calcio intercambiable unido a los myofilamentos durante la contracción.
- c) Calcio inintercambiable que representa varios depósitos intracelulares (McCALLISTER y HADEK, 1973).

La cafeína también se ha llegado a la conclusión de que facilita la transmisión neuromuscular afectando los depósitos intracelulares de calcio (WILSON, 1973).

La cafeína parece ser que aumenta el calcio intracelular en diversas preparaciones por aumentar la permeabilidad de la membrana al calcio (COCHRANE y PARSON, 1972; KOHLHARDT, 1974). Cuando la concentración de calcio aumenta la fuerza con que es conducido al interior es suficiente y el aumento de permeabilidad debido a la cafeína deja de jugar un papel importante (COCHRANE y PARSON, 1972). En la preparación de taenia coli para el acoplamiento excitación-contracción la cafeína moviliza el ión Ca^{++} desde la membrana del músculo liso el cual alternativamente modifica la permeabilidad iónica de la membrana. Seguidamente podría posiblemente prevenir la reincorporación y la unión. No se descarta la posibilidad sin embargo de que el efecto de la cafeína al inhibir la fosfodiesterasa en ésta preparación, sea por acumulación de NIPc (McFARLAND y PFAFFMAN, 1972). En ésta preparación la cafeína actúa directamente en la membrana celular afectando su permeabilidad para el calcio y produce un efecto excitatorio seguido por una acción inhibidora final en la actividad contráctil.

que se debería a una interferencia con la entrada de calcio (SUNANO y MIYAZAKI, 1973).

Para algunos músculos lisos el Ca^{++} presente en el espacio extracelular penetra la membrana plasmática durante el proceso de excitación. Para el tejido cardíaco el mecanismo preferente es por la liberación de calcio unido a la cara de la membrana del lado del espacio extracelular. La contracción de este músculo es altamente dependiente de la contracción extracelular de calcio. En el acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético la excitación se propaga al retículo sarcoplásmico donde tiene lugar la liberación de Ca^{++} . Este mecanismo es menos sensible a los cambios de concentración de Ca^{++} del medio de incubación (LULLMANN y cols, 1974). Desde luego parece haber al menos tres lugares posibles subcelulares para el almacén y liberación de Ca^{++} ; el retículo endoplásmico, la membrana celular, y la mitocondria (KUBA y NISHI, 1976). La cafeína induce la contracción en músculo esquelético por acción en los depósitos de calcio mediante un mecanismo de liberación del calcio del retículo sarcoplásmico similar a la liberación que tiene lugar bajo condiciones fisiológicas (McCALLISTER, y HADEK, 1973; HUIR y SCOTT, 1977).

5.1. Efectos de metilxantinas en ileon de cobayo.

Se estudiaron los efectos de las metilxantinas y el imidazol en la transmisión autónoma colinérgica de las contracciones del ileon de cobayo inducidas por estimulación transmural (MORITOKI y cols, 1976), y estos autores llegaron a los siguientes resul

tados:

- 1^a) La cafeína, a concentraciones por encima de $3 \cdot 10^{-5} M$, aumentó la amplitud de las contracciones del ileon de cobayo inducidas por estimulación transmural con pulsos de corta duración, apareciendo el efecto a los pocos segundos y manteniéndose luego.
- 2^a) La amplitud de las contracciones aumentó progresivamente al incrementarse la concentración por encima de $10^{-3} M$.
- 3^a) La potenciación varió considerablemente en diferentes preparaciones, siendo mayor cuando la sensibilidad del ileon a la estimulación era inicialmente baja.
- 4^a) Al pasar a un medio sin cafeína las contracciones aumentadas descendieron lentamente, a veces a valores incluso inferiores a los anteriores a la adición de cafeína.
- 5^a) Los efectos de otras metilxantinas fueron similares. La teobromina tuvo efecto mayor y más persistente, pero su efecto fue lento en aparecer. La teofilina mostró efecto menor y a concentraciones mayores a $10^{-3} M$ se suprimió su efecto potenciador.
- 6^a) Las metilxantinas no potencializaron las contracciones inducidas por estimulación de campo con trenes de pulsos de 5-50 milisegundos de duración, con frecuencias de 10-100 Hz por periodo de 10 segundos cada 3 minutos en presencia de tetrodoxina a concentración de $10^{-7} g/ml$.
- 7^a) El inidazol, que forma parte de la estructura de las metilxan-

tinias, también mostró efecto potencializador muy semejante a las mismas, pero con efectos bastante lentos en su aparición y más persistentes.

- 8^o) La cafeína necesitó la presencia de cierto nivel de calcio en el medio para mostrar su poder potencializador, pero el grado relativo de potencialización fué menor en presencia de altas concentraciones.
- 9^o) El efecto potencializador de la cafeína fué dependiente de la temperatura, y fué mayor con temperaturas bajas.
- 10^o) Los efectos de metilxantinas e imidazol no variaron en caboyos reserpinizados.
- 11^o) La tetrodotoxina redujo los efectos potencializadores de las metilxantinas y el imidazol.
- 12^o) El AMPc a concentración 10^{-5} M deprimió las contracciones producidas por estimulación transmural, y su efecto inhibitorio se revirtió por metilxantinas e imidazol, que al parecer actúan de una forma más específica que en la inhibición producida por morfina, adrenalina, o tetrodotoxina.
- 13^o) La cafeína aumentó la liberación de Ach durante la estimulación y también en estado de reposo.

Se propuso la hipótesis de que las metilxantinas ejerciesen sus efectos en el ileon antagonizando un mecanismo purinérgico, pero esto carece de evidencia. Tampoco parece posible que bloqueen el efecto inhibitorio de fibras adrenérgicas, pues actúan igual en animales reserpinizados. Tampoco parece probable

que actúen aumentando el AChE por inhibición de su destrucción, por fosfodiesterasa, pues el imidazol es un activador de la fosfodiesterasa y debería tener efectos opuestos a metilxantinas si el efecto fuese sobre dicho enzima (HORITOKI y cols. 1976).

De todos los resultados obtenidos se sugirió que los efectos potencializadores de metilxantinas se deben a una acción en los terminales nerviosos, no en las membranas postsinápticas o elementos contráctiles. Posiblemente el efecto se deba a una facilitación de la liberación de Ach de los terminales nerviosos en el ileon, y por eso aumentan la cantidad de Ach liberada en respuesta a la estimulación transmural, y se puede correlacionar su potenciación con la cantidad de Ach liberada (HORITOKI y cols. 1976). Parece probable que estos agentes actúen en los terminales nerviosos del ileon a través del calcio y sin mediación de AChE. Estos agentes en la excitación pueden hacer a las membranas del nervio más permeables al calcio, y éste calcio en juego puede aumentar la liberación de Ach de los terminales nerviosos. Alternativamente justo cuando la cafeína baja la capacidad del retículo sarcoplásmico para fijar el calcio intracelular en la excitación, estos agentes podrían actuar en las membranas de los nervios para bajar la unión del calcio que las estabilizaría. Este descenso en la unión del calcio podría volver a las membranas altamente permeables al calcio extracelular. Los efectos del imidazol también tendrían un mecanismo similar (HORITOKI y cols. 1976).

MATERIAL Y METODOS

II) MATERIAL Y METODOS

1. Preparación.
2. Composición del líquido nutritivo.
3. Estimulación eléctrica de la preparación.
4. Fármacos utilizados. Formulación.
5. Tipos de ensayos.
 - 5.1. Curvas dosis-respuesta.
 - 5.2. Efecto de la cafeína. Antagonismo de los morfínicos y la cafeína.
 - 5.3. Relación respuesta-frecuencia. Relación respuesta-frecuencia en presencia de cafeína.
 - 5.4. Choques de frecuencia elevada.
 - a) Sin fármaco
 - b) En presencia de fármaco.
 - 5.5. Respuestas de los morfínicos en presencia de bicitracina.
 - 5.6. Fenómeno de adicción: Ensayos comparativos entre cobayos adictos a morfina y cobayos no tratados.
 - a) Curvas dosis-respuesta.
 - b) Control de pesos.
 - c) Choques de frecuencia elevada.
 - 5.7. Curva dosis-respuesta con AIPc. Respuesta de AIPc en presencia de propranolol.
6. Análisis estadístico.

1. Preparación.

Se utilizaron cobayos de ambos sexos y de peso comprendido entre 300 y 600 gramos, que han permanecido en ayunas durante 24 horas. Se sacrifican mediante un golpe en la cabeza seguido de un corte en la yugular para desangrarlos.

Se toma una porción de ileon distal de unos 30 cm., despreciando los 10 cm. más próximos a la unión ileocecal. Estos 30 cm. se conservan en solución Krebs a 4°C y de ellos empleamos para los ensayos porciones más pequeñas de 5 cm. aproximadamente.

La preparación que utilizamos es una modificación de la descrita por PATON en 1955. Los fragmentos intestinales de 5 cm. se canulan por ambos extremos con cánulas de polietileno (figura 13), y se suspenden verticalmente con una tensión de 2 gramos en un baño de órganos de 8 c.c. de capacidad que contiene solución Krebs como líquido nutritivo. La cánula de la parte más proximal de la porción intestinal se fija a la base del baño de órganos, y la cánula de la parte más distal se conecta a un transductor isométrico (figura 14). El líquido nutritivo está oxigenado por gas carbónico (95% O₂ y 5% CO₂), y a temperatura constante de 32°C.

Para la estimulación eléctrica de la preparación se utilizan dos alambres de plata como electrodos. Uno de ellos se suspende verticalmente dentro del baño de órganos, y queda tangencial a la pared de éste recorriéndolo desde arriba hasta casi su base. El segundo electrodo se introduce por la cánula superior

y queda flotando en el lumen intestinal (figura 13). Con esta técnica se logra obtener una estimulación coaxial uniforme de la preparación.

2. Composición del Líquido Nutricio.

Como líquido nutricio se utilizó la modalidad de Krebs Henseleit de 1932 con la composición siguiente:

	<u>Concentración milimoles/litro</u>
Na ⁺	143,3
K ⁺	5,9
Ca ⁺⁺	2,6
Mg ⁺⁺	1,2
Cl ⁻	128,3
PO ₄ H ₂ ⁻	2,2
CO ₃ H ⁻	24,9
SO ₄ ⁼	1,2
Glucosa	10

Para lavar la preparación se renueva el líquido nutricio introduciendo solución nueva por la parte inferior del baño de órganos.

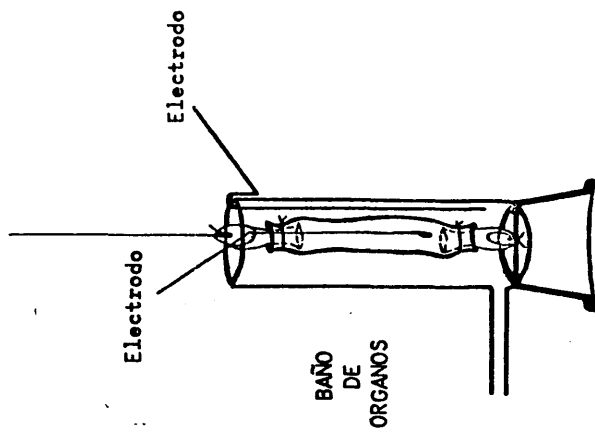
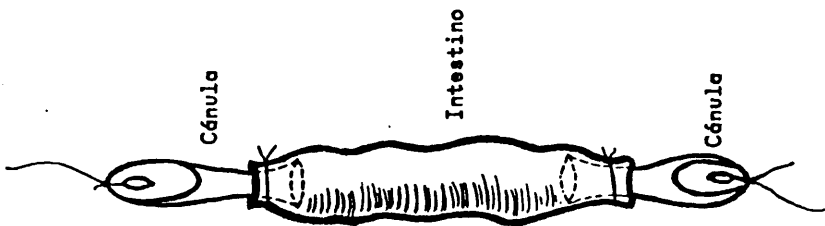


Figura 13

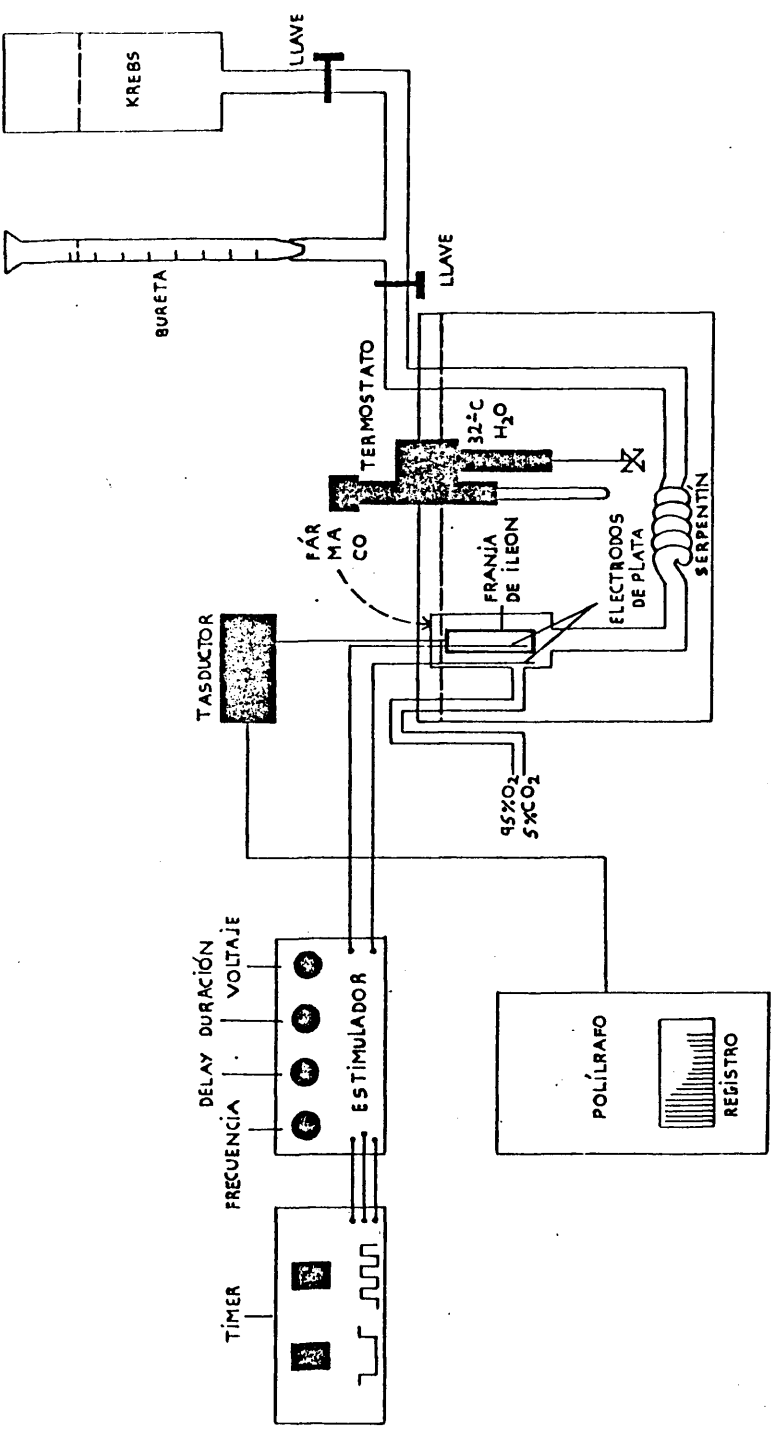


Fig. 14.- Esquema de la preparación de ileon completo de cobayo montado con estimulo electrico coaxial.

3. Estimulación eléctrica de la preparación.

Antes de comenzar a estimular la preparación se deja pasar un periodo mínimo de 10 minutos que permite la relajación intestinal procurando mantener al final los 2 gramos de tensión establecidos. Del mismo modo se espera hasta obtener una respuesta estable al estímulo eléctrico antes de comenzar el ensayo.

Las modalidades de estimulación utilizadas son las siguientes:

a) Estímulo simple con los siguientes parámetros:

Frecuencia = 0,2 Hz
Duración = 2 milisegundos
Voltaje = Supramaximal.

b) Trenes de estímulo con los siguientes parámetros:

Frecuencia = 10 Hz
Duración = 2 milisegundos
Voltaje = Supramaximal
Duración de cada tren = 5 segundos
Intérvalo entre cada dos trenes = 1 minuto.

c) Choques de frecuencia elevada con los siguientes parámetros:

Frecuencia = 10 Hz
Duración = 2 milisegundos
Voltaje = Supramaximal
Duración de cada choque = 5 minutos
Intérvalo entre cada dos choques = 10 minutos

Para el estímulo simple y para los choques de frecuencia elevada se utilizó un estimulador Grass modelo SD9. Para los trenes de estímulo se utilizó el mismo estimulador acoplado a un timer-Escribano diseñado por la Sección de Electrónica del Departamento.

Las respuestas a la estimulación eléctrica se registraron en un polígrafo Grass modelo 7B mediante el transducer isométrico conectado a la preparación.

4. Fármacos utilizados.

Clorhidrato de morfina.

Fosfato de codeína.

Clorhidrato de Levorfanol.

Metadona.

Citrato de Fentanilo, y su preparado comercial (Fentanest).

Clorhidrato de Etorfina.

Sulfato de Morfina (únicamente para provocar adicción).

Cafeína.

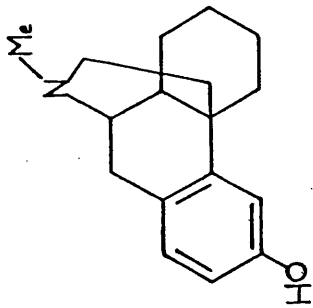
Bacitracina. (se administró siempre en presencia de anti-espumante).

Sulfato de Atrapina.

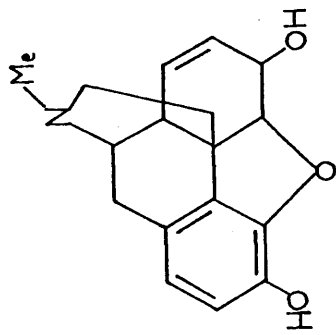
Maleato de Clorfeniramina.

NiPc.

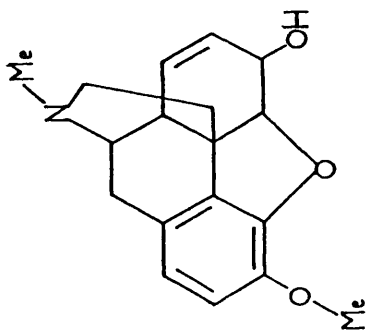
Clorhidrato de Propranolol.



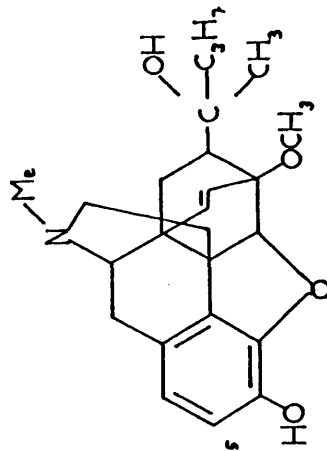
LEVORFANOL



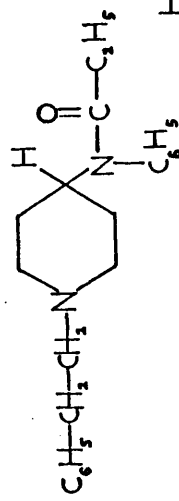
MORFINA



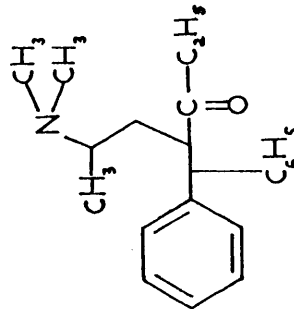
CODEINA



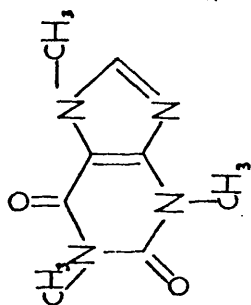
ETORFINA



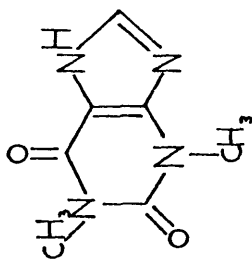
FENTANYL



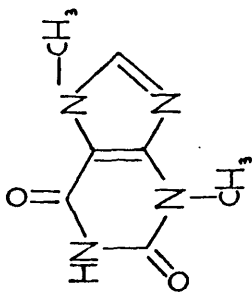
METADONA



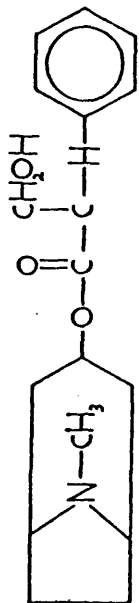
Cafeina
1-3-7 trimetilxantina



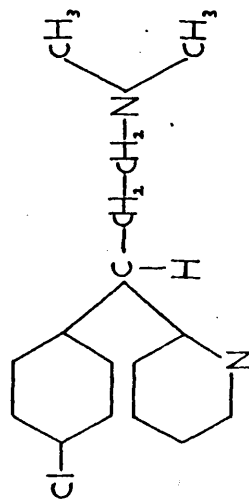
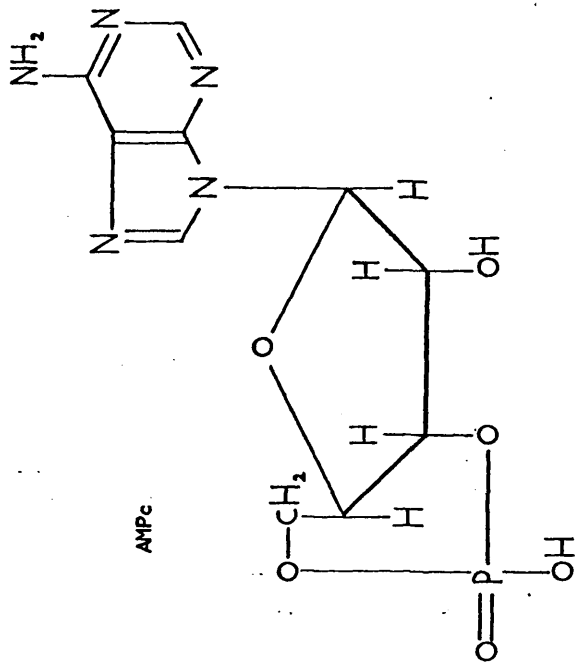
Teofilina
1-3 dimetilxantina



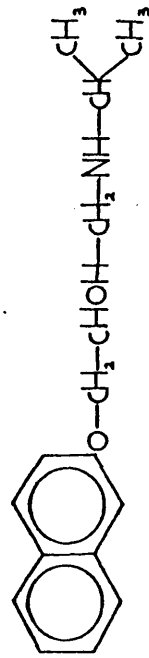
Teobromina
3-7 dimetilxantina



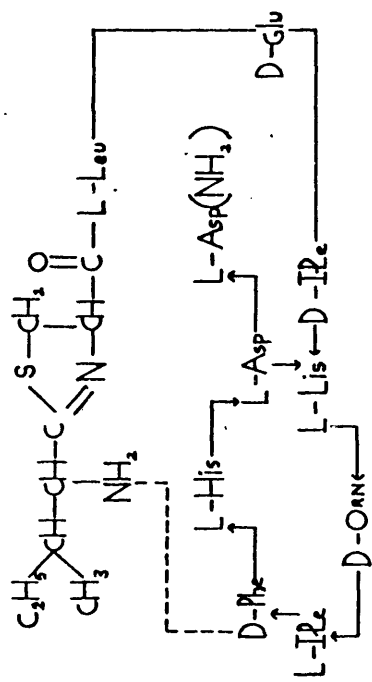
ATROPINA



CLORFENIRAMINA



PROPRANOLOL



Bacitracina A

5. Tipos de ensayos.

5.1. Curvas dosis-respuesta a diversos morfinomiméticos utilizando estímulo simple y utilizando trenes de estímulo.

Los analgésicos utilizados para las curvas dosis-respuesta fueron: Fosfato de codeína, Clorhidrato de morfina, metadona, Citrato de fentanilo, Clorhidrato de levorfanol y Clorhidrato de etorfina. Los ensayos se realizaron administrando dosis acumulativas de cada uno de estos fármacos con un intervalo entre cada dos dosis de 3 minutos cuando se utilizó estímulo simple y de 4 minutos cuando se utilizaron trenes de estímulo. Se valoraron los porcentajes de disminución de la amplitud de la respuesta contractil con las distintas dosis, respecto a la amplitud de la respuesta anterior a la administración de fármaco. Cuando se utilizaron trenes de estímulo además de administrar las dosis empleadas con estímulo simple en algunos fármacos se utilizaron otras mayores. Las DI_{50} y DI_{25} (dosis inhibitoras del 50% y del 25% de la respuesta contractil) se obtuvieron por extrapolación en las curvas dosis-respuesta.

5.2. Potenciación de la respuesta contractil al estímulo simple con cafeína. Respuesta a los morfinomiméticos en presencia de cafeína.

La cafeína se administró en dosis única de concentración $5 \cdot 10^{-5} M$ en el baño de órganos. La solución de cafeína empleada

da para ello se preparó con calentamiento para mejorar su solubilización. Se valoró el potenciamiento producido en la amplitud de respuesta a los 10 minutos de la administración.

Se estudió la respuesta a morfina, metadona, y fentanest en presencia de la concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M. de cafeína. Para ello se administró una dosis de analgésico con efecto próximo al 50% en la preparación, y se valoró el porcentaje de disminución de la amplitud de la contracción a los 3 minutos. Esta medida se utilizó como control. A continuación se lavó repetidas veces la preparación hasta recuperar una contracción de amplitud igual o mayor a la que teníamos antes de administrar la dosis de analgésico. Seguidamente se administró la dosis de cafeína establecida, y a los 10 minutos se volvió a administrar la dosis de analgésico utilizada para el control anteriormente. En el caso de la morfina se eligió para todas las preparaciones la dosis $12 \cdot 10^{-8}$ M. algo inferior a la DI_{50} de la morfina hallada por extrapolación en su curva dosis-respuesta. En el caso de la metadona y el fentanest se hizo un tanteamiento previa en cada preparación de su DI_{50} . Se valoró el porcentaje de disminución de la amplitud de la contracción con la dosis administrada de analgésico en presencia de cafeína a los 3 minutos de la administración, y se halló la diferencia con el porcentaje del control.

5.3. Relación respuesta-frecuencia primero sin fármaco y a continuación en presencia de cafeína.

Se estimuló la preparación con estímulo simple utilizando sucesivamente las siguientes frecuencias: 0,2 Hz., 0,3 Hz. 0,4 Hz., 0,5 Hz, 0,6 Hz, 0,7 Hz, 0,8 Hz, 0,9 Hz y 1 Hz. Se valoró el porcentaje de disminución de la respuesta contráctil con las distintas frecuencias de estimulación considerando el 100% de respuesta a la obtenida con 0,2 Hz. Nuevamente se volvió a estimular la preparación con 0,2 Hz y se administró cafeína en concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M. A los 10 minutos de haber administrado la cafeína se subió progresivamente la frecuencia de estimulación desde 0,2 Hz hasta 1 Hz con la misma esola anteriormente utilizada. Se valoraron los porcentajes de disminución de la respuesta contráctil considerando esta vez el 100% a la respuesta obtenida con 0,2 Hz a los 10 minutos de haber administrado la cafeína.

5.4. Choques de frecuencia elevada.

- a) Sin fármaco.
- b) En presencia de fármaco.

a) La utilización de choques de frecuencia elevada se llevó a cabo en porciones de intestino completo de cobayo estimuladas coaxialmente con estímulo simple, basandose en la técnica de estimulación empleada por MARGARITA PUIG en 1977 en plexo mien-

térico de fibras longitudinales de ilcon de cobayo para la liberación de endorfinas. Para ocasionar un choque en intestino estimulado con estímulo simple se elevó la frecuencia de estimulación durante un periodo de 5 minutos desde los 0,2 Hz utilizados en esta modalidad de estímulo a 10 Hz. Transcurridos los 5 minutos se volvió a estimular con 0,2 Hz y se mantuvo esta frecuencia de estimulación durante 10 minutos antes de volver a ocasionar un nuevo choque. De este modo, en las preparaciones utilizadas para control de sucesivos choques, se ocasionaron 6 sucesivamente de 5 minutos y 10 Hz cada uno, con un intervalo entre cada dos choques de 10 minutos de estimulación a 0,2 Hz de frecuencia. Después de ocasionar el último choque de 10 Hz también se mantuvo la preparación otros 10 minutos con 0,2 Hz de frecuencia para ver el efecto del choque.

b) En las preparaciones utilizadas para ver el efecto de sucesivos choques en presencia de fármacos se administró 10 minutos antes de ocasionar el primer choque una dosis única del fármaco en el baño de órganos, y a continuación se ocasionaron los sucesivos choques de 5 minutos cada 10 minutos.

<u>Fármaco</u>	<u>Concentración</u>	<u>Nº de choques</u>
Cafeína	$5 \cdot 10^{-5} M$	5
Bacitracina	$2 \cdot 5 \cdot 10^{-4} M$	8
Atrapina	$3 \cdot 1 \cdot 10^{-8} M$	6
Clorfeniramina	$6 \cdot 4 \cdot 10^{-6} M$	6

5.5. Respuestas de los morfinomiméticos en presencia de bacitracina.

Se estudió la respuesta a morfina y metadona en presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina. Para estas ensayos se hizo un tanteamiento previo de la respuesta al analgésico en cada preparación. Se administró una dosis de analgésico con efecto próximo al 50% en la preparación, valorándose el porcentaje de disminución de la amplitud de la contracción a los 3 minutos. Esta medida se utilizó como control. A continuación se lavó repetidas veces la preparación hasta recuperar una contracción de amplitud igual o mayor a la que teníamos antes de administrar la dosis de analgésico. En este momento se administró la dosis de bacitracina, y a los 10 minutos se volvió a administrar la misma dosis de analgésico utilizada para el control. Se valoró el porcentaje de disminución de la amplitud de la contracción con la dosis administrada de analgésico en presencia de bacitracina a los 3 minutos de la administración y se halló la diferencia con el porcentaje del control.

5.6. Ensayos comparativos entre cabayas adictos a morfina y cabayas no tratados.

- a) Curvas dosis-respuesta.
- b) Control de pesos.
- c) Choques de frecuencia elevada.

La administración crónica de morfina se llevó a cabo

en cobayos machos cuyo peso oscilaba entre 450 y 700 gramos. Se utilizó para ello la inyección subcutánea durante 14 días de una dosis de 100 mg/Kg diaria de sulfato de morfina según la técnica empleada por VAN NUETEN y LAL en 1974.

A los animales sin tratar se les inyectó durante los 14 días 1 ml. de suero fisiológico, volumen similar al inyectado en cada dosis de sulfato de morfina.

a) Se obtuvo la curva dosis-respuesta a morfina en intestino estimulado con estímulo simple de cobayos que sufrieron la administración crónica de morfina durante 14 días y la curva dosis-respuesta a morfina en intestino estimulado con estímulo simple de cobayos no tratados con morfina que pertenecían al mismo lote de los tratados. Las curvas dosis-respuesta de éstos ensayos se hicieron con dosis acumulativas que se administraron cada 3 minutos como todas las realizadas con morfomiméticos y con estímulo simple.

b) Se llevó a cabo un control de pesos en los cobayos con administración crónica de morfina y un control de pesos en cobayos no tratados. 5 animales tratados y 5 animales sin tratar permanecieron en jaulas individuales durante las 14 días, y por otra parte, 5 animales tratados y otros 5 sin tratar permanecieron en libertad dentro del mismo recinto. De esta forma tuvimos 4 grupos de cobayos para establecer posibles diferencias:

- Cobayos tratados con morfina enjaulados.
- Cobayos tratados con morfina en libertad.
- Cobayos no tratados enjaulados.
- Cobayos no tratados en libertad.

Se pesó a los animales cada día. Durante 13 días tanto los animales enjaulados como los libres dispusieron de comida y agua en cantidad sobrante para sus necesidades y la ingesta fue voluntaria. Se valoraron los porcentajes de variación de peso respecto al peso inicial. Durante este periodo de tiempo también se observó si aparecían otras anomalías y diferencias en los 4 grupos de cobayos.

c) Se provocaron choques de frecuencia elevada en procciones intestinales de cobayos que habían sufrido la administración crónica de morfina durante 3 días y durante 14 días; y también en cobayos a los que se les inyectó suero fisiológico durante 14 días. La técnica utilizada para ello fué idéntica a la descrita para intestino completo de cobayos sin tratar basada a su vez en la de MARGARITA PUIG en la preparación de fibras longitudinales-plexo mientérico para la liberación de endorfinas (PUIG y cols. 1977). También se ocasionaron choques de frecuencia elevada en presencia de bacitracina $2,5 \cdot 10^{-4}$ U, en intestino de cobayos que sufrieron la administración crónica de morfina durante 14 días y en cobayos del mismo lote sin tratar, con esta técnica.

5.7. Curva dosis-respuesta con AMPc. Respuesta de AMPc en presencia de propranolol.

Las curvas dosis-respuesta con AMPc se hicieron utilizando estímulo simple, pero no se administraron las dosis de forma acumulativa. Se administraron en orden creciente, valorando la acción de cada una a los 3 minutos de administrarla y lavando la preparación con solución Krebs después de transcurrir 10 minutos de la administración. Antes de administrar una nueva dosis se comprobó que la contracción después de lavar hubiese recuperado una altura igual o mayor a la obtenida antes de administrar la última dosis. En estos mismos ensayos se estudió la respuesta al AMPc en presencia de la concentración $1,25 \cdot 10^{-5} M$ de propranolol. Para ella después de lavar la preparación al finalizar con la administración de la última dosis de AMPc necesaria para la curva dosis-respuesta, se repitió la administración de la dosis de AMPc más próxima a su DI_{50} en esa preparación. El porcentaje de disminución de la altura de la contracción producida esta vez se utilizó como control. Después de lavar la preparación se administró la dosis $1,25 \cdot 10^{-5} M$ de propranolol y a los 10 minutos se volvió a administrar la misma dosis de AMPc utilizada para el control. Se valoró el porcentaje de disminución de la altura de la contracción en esta ocasión y se halló la diferencia con el porcentaje del control.

6. Análisis estadístico

Los resultados fueron tratados de la siguiente forma:

Se agruparon los datos experimentales según los distintos grupos y los diferentes parámetros medidos.

Se calculó la media, la desviación standard y el error standard de la media según las siguientes fórmulas:

$$\text{Media} = \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Desviación standard} = \text{DS} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

$$\text{Error standard de la media} = \text{ES} = \frac{\text{DS}}{\sqrt{n}}$$

La significación estadística de los distintos grupos se efectuó utilizando el test de student para comparación de medias en poblaciones emparejadas. De esta forma calculamos el valor de t según la fórmula siguiente:

$$t = \frac{|\bar{y} - \bar{x}|}{\text{ES}} ; \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n} ; \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$
$$\text{ES} = \sqrt{\frac{\sum (y-x)^2 - \frac{(\sum y - \sum x)^2}{n}}{n(n-1)}} ; \quad \text{g.l} = n-1$$

Este valor "t" observado en la tabla de distribución de "Student" con n-1 grados de libertad nos da el valor "p" de significación. Consideramos significativa la diferencia para valores $P < 0.05$.

En las curvas dosis-respuesta hallamos la pendiente de la recta que definiría la curva y el coeficiente de correlación según la fórmula:

$$\text{Coeficiente de correlación} = r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

EXPOSICION DE RESULTADOS

RESULTADOS

1. Curvas dosis-respuesta de los morfinomiméticos: codeína, morfina, levorfanol, metadona, fentanilo, y etorfina.
2. Efecto de la cafeína. Antagonismo de los morfinomiméticos y la cafeína.
3. Relación respuesta-frecuencia. Relación respuesta-frecuencia en presencia de cafeína.
4. Choques de frecuencia elevada.
5. Respuestas de los morfinomiméticos en presencia de bacitracina.
6. Adicción:
 - a) Curvas dosis-respuesta.
 - b) Contról de pesos.
 - c) Choques de frecuencia elevada.
7. Curva dosis-respuesta con AMPc. Respuesta de AMPc en presencia de propanolol.



1. Curvas dosis-respuesta.

Los resultados con codeína en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 1

Número de ensayos realizados = 6

Concentración Molar	Media del % de dis- minución de la con- tracción	Error Standard
3.1×10^{-6}	24	4,51
$9,3 \times 10^{-6}$	50,17	6,03
$2,1 \times 10^{-5}$	71	6,87
$2,7 \times 10^{-5}$	73,50	7,81
$3,9 \times 10^{-5}$	76,50	6,74
$6,4 \times 10^{-5}$	78	6,63
$1,1 \times 10^{-4}$	78,33	7,03
$2,1 \times 10^{-4}$	80,17	6,70

Pendiente de la recta que definiría esta curva = 66,4749

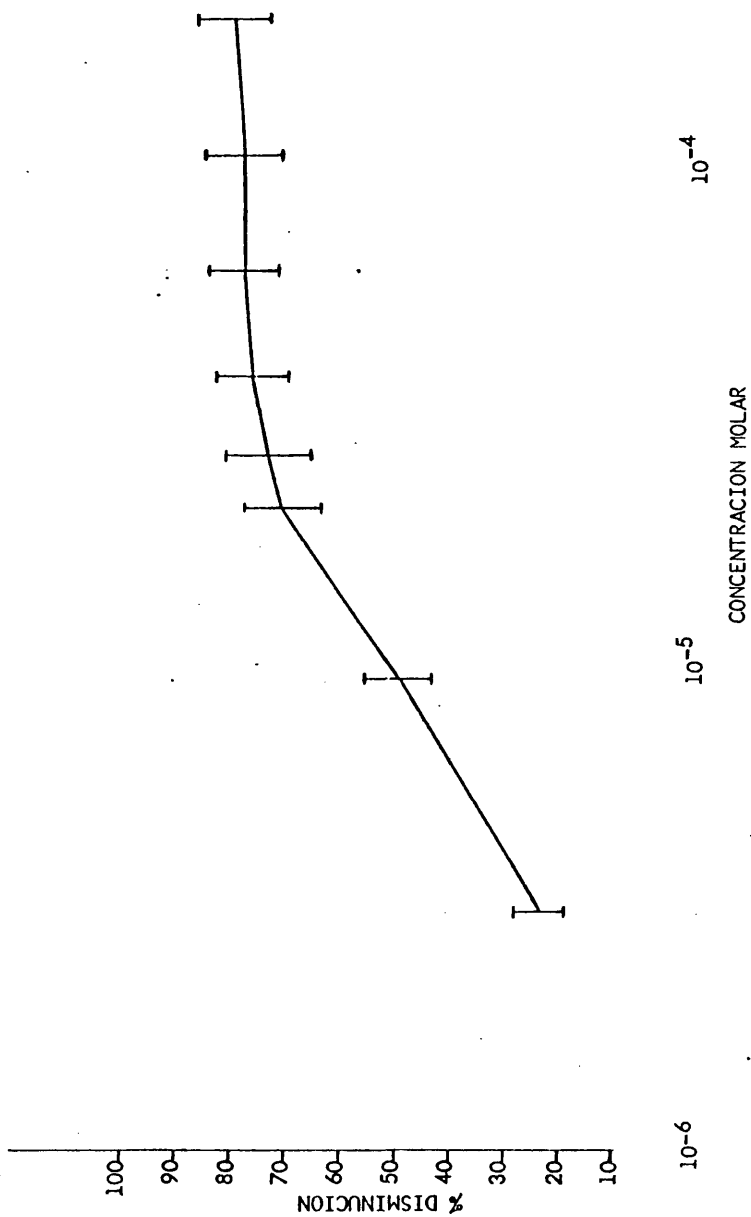
Coefficiente de correlación = 0,99979

(Ver figura nº 15).

Fig.15.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Codeína frente a estímulo simple. En barras el error standard de la media.

$DI_{50} = 9'3 \cdot 10^{-6}$;
 $DI_{25} = 3'2 \cdot 10^{-6}$

Pendiente = 56'4749
 $r = 0'99979$



Los resultados con codeína en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

TABLA 2

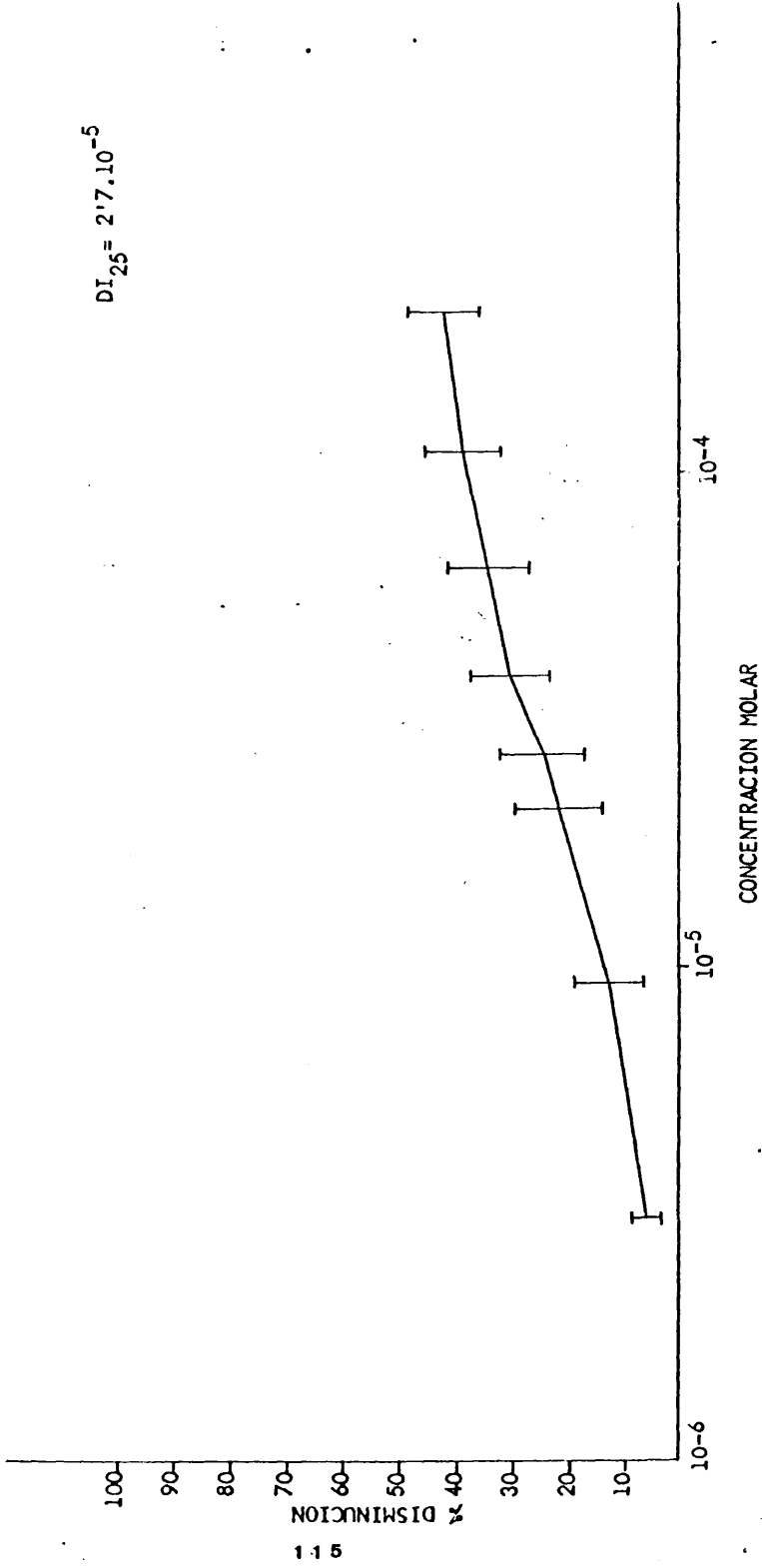
Número de ensayos realizados = 8

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$3,1 \cdot 10^{-6}$	5,87	2,81
$9,3 \cdot 10^{-6}$	13,25	6,57
$2,1 \cdot 10^{-5}$	22,12	7,70
$2,7 \cdot 10^{-5}$	25,12	7,57
$3,9 \cdot 10^{-5}$	30,50	7,18
$6,4 \cdot 10^{-5}$	34,62	7,32
$1,1 \cdot 10^{-4}$	39,12	6,87
$2,1 \cdot 10^{-4}$	42,50	6,53

(Ver figura 16)

Fig. 16.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Codeína frente a trenas de estímulo. En barras el error standard de la media.

$$DI_{25} = 2'7 \cdot 10^{-5}$$



Los resultados con morfina en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 3

Número de ensayos realizados = 6

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$3,1 \cdot 10^{-8}$	11	3,31
$9,3 \cdot 10^{-8}$	24,83	7,62
$2,1 \cdot 10^{-7}$	42,33	11,12
$2,7 \cdot 10^{-7}$	47,17	11,17
$3,9 \cdot 10^{-7}$	54,83	11,14
$6,4 \cdot 10^{-7}$	62,17	9,82
$1,1 \cdot 10^{-6}$	70,33	8,27
$2,1 \cdot 10^{-6}$	76,83	7,82
$3,1 \cdot 10^{-6}$	79,33	6,71

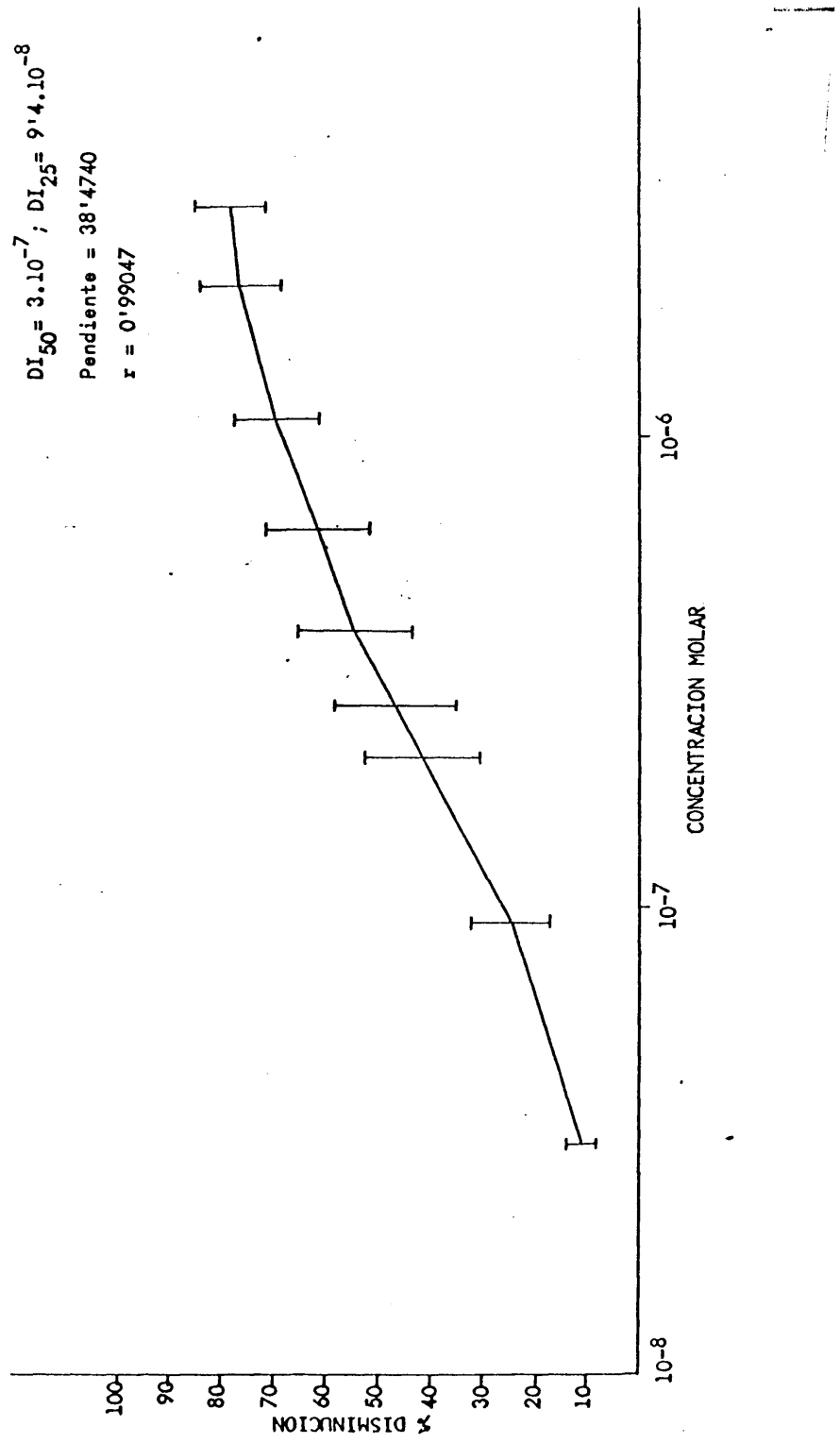
Pendiente de la recta que definiría esta curva = 38,4740

Coefficiente de correlación = 0,99047

(Ver figura 17).

Fig. 17.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Morfina frente a estímulo simple. En barras el error standard de la media.

$DI_{50} = 3 \cdot 10^{-7}$; $DI_{25} = 9 \cdot 4 \cdot 10^{-8}$
 Pendiente = 38'4740
 $r = 0'99047$



Los resultados con morfina en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

TABLA 4

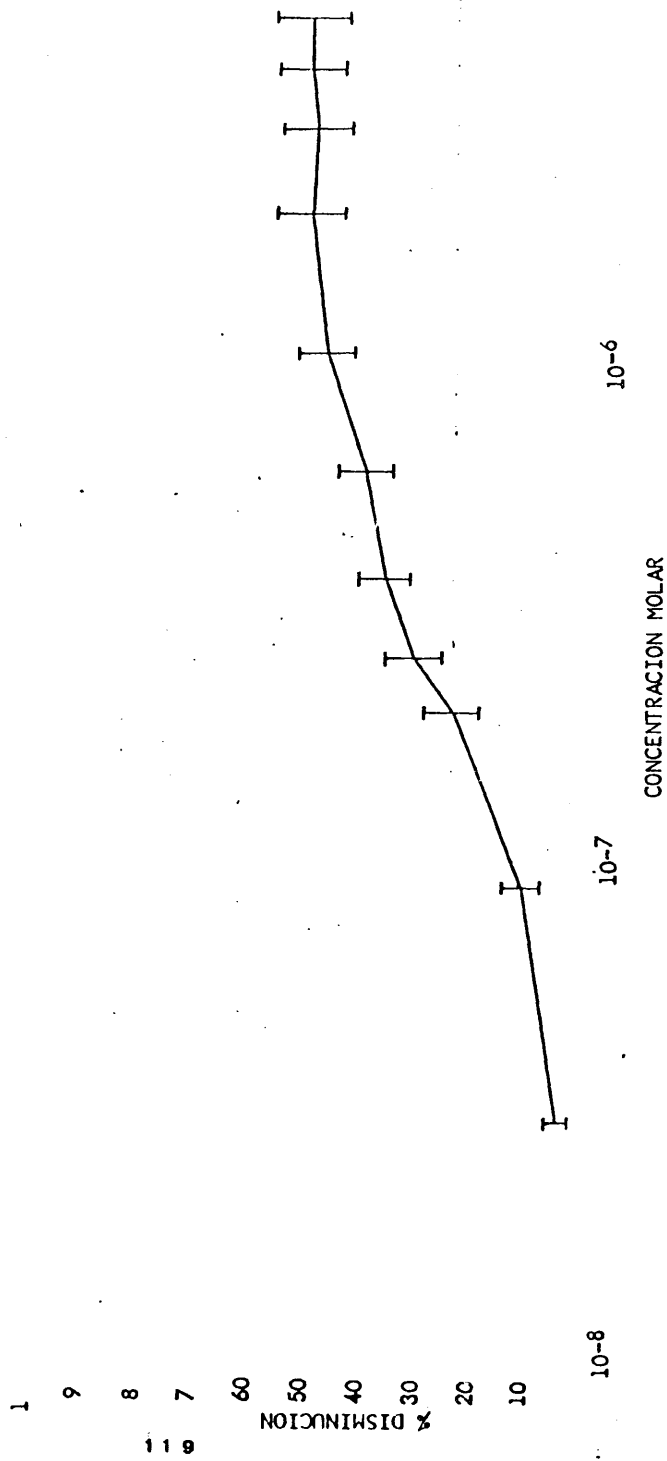
Número de ensayos realizados = 7

Concentración Molar	Media del % de dismi- nución de la contrac- ción	Error Standard
$3,1 \cdot 10^{-8}$	4,43	2,42
$9,3 \cdot 10^{-8}$	11,71	3,40
$2,1 \cdot 10^{-7}$	25	4,94
$2,7 \cdot 10^{-7}$	31,71	4,74
$3,9 \cdot 10^{-7}$	37,43	4,81
$6,4 \cdot 10^{-7}$	40,86	4,88
$1,1 \cdot 10^{-6}$	48,28	4,91
$2,1 \cdot 10^{-6}$	51,28	5,84
$3,1 \cdot 10^{-6}$	50,14	5,91
$4,1 \cdot 10^{-6}$	51	6,03
$5,1 \cdot 10^{-6}$	50,86	6,53

(Ver figura 18)

Fig. 18.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Morfina frente a trenes de estímulo. En barras el error standard de la media.

$$DI_{50} = 1'8 \cdot 10^{-6}; DI_{25} = 2'1 \cdot 10^{-7}$$



Los resultados con levorfanol en ilcon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz. de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 5

Número de ensayos realizados = 7

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$1,2 \cdot 10^{-8}$	11,14	2,86
$2,5 \cdot 10^{-8}$	21,28	4,73
$3,7 \cdot 10^{-8}$	29,71	4,96
$1,6 \cdot 10^{-7}$	47,71	7,22
$2,9 \cdot 10^{-7}$	51,86	7,40
$9,1 \cdot 10^{-7}$	53,43	8,18

Pendiente de la recta que definiría esta curva = 28,4223

Coefficiente de correlación = 0,99035

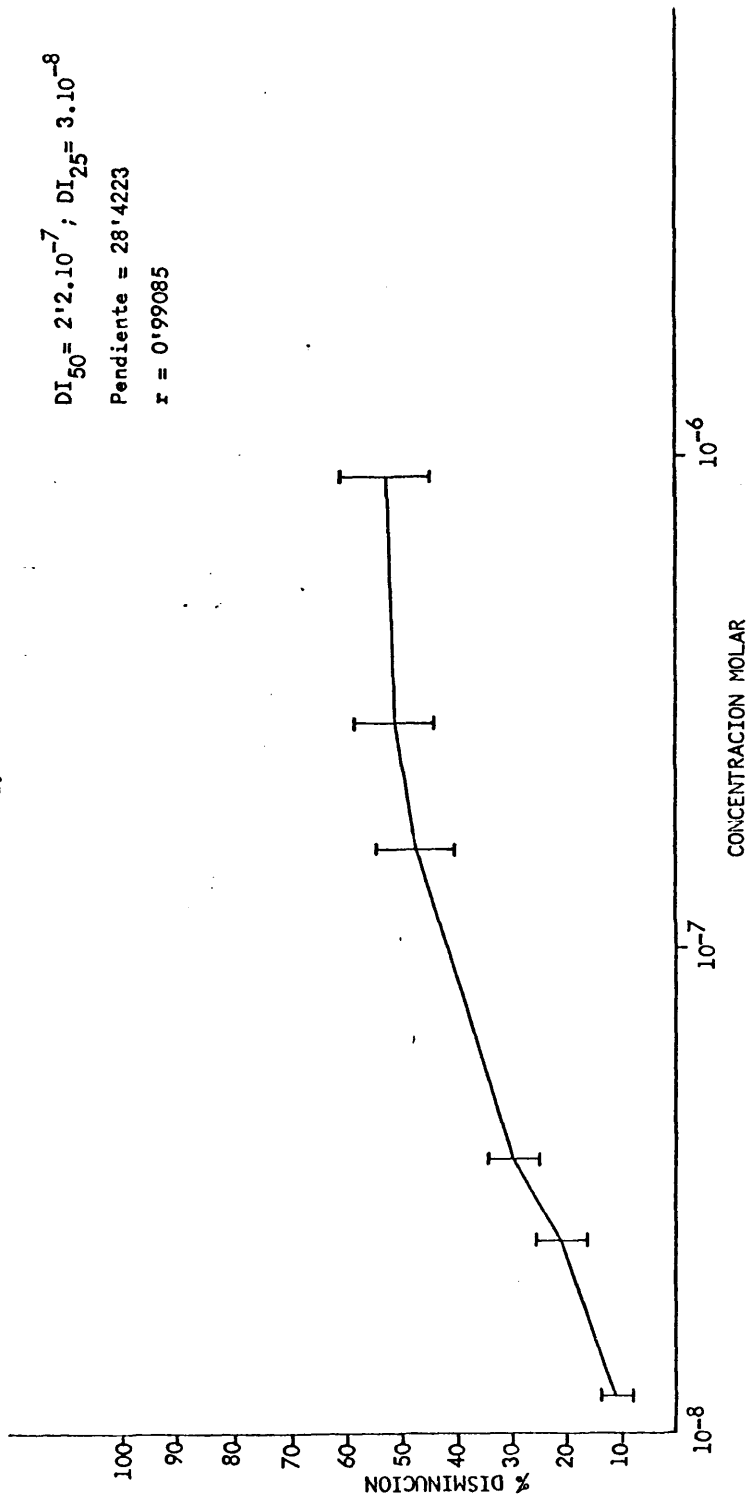
(Ver figura 19).

Fig. 19.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Levorfanol frente a estímulo simple. En barras el error standard de la media.

$$DI_{50} = 2.2 \cdot 10^{-7}; DI_{25} = 3 \cdot 10^{-8}$$

$$\text{Pendiente} = 28.4223$$

$$r = 0.99085$$



Los resultados con levorfanol en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10.Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

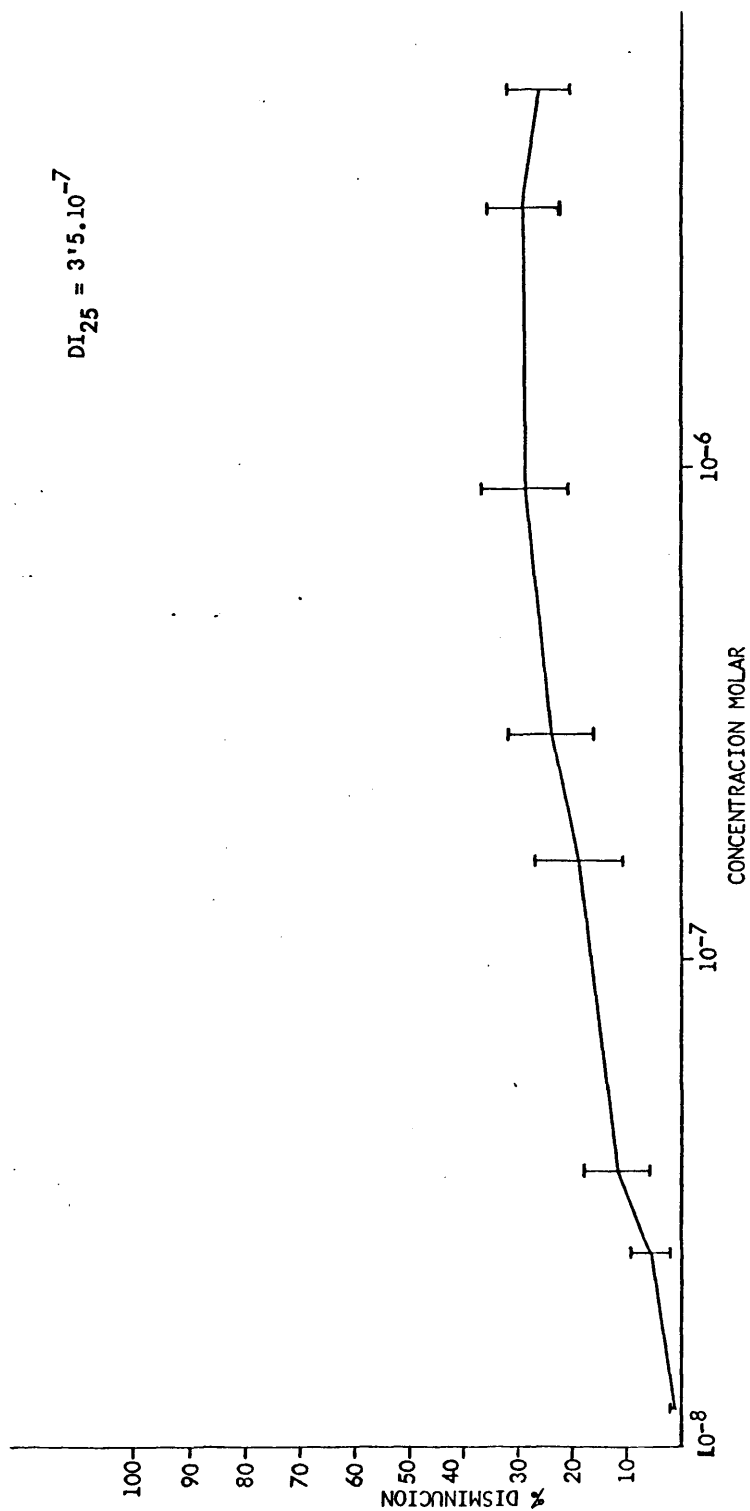
TABLA 6

Número de ensayos realizados = 8

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$1,2 \cdot 10^{-8}$	0,75	1,23
$2,5 \cdot 10^{-8}$	5,75	3,66
$3,7 \cdot 10^{-8}$	11,75	6,07
$1,6 \cdot 10^{-7}$	19,12	8,36
$2,9 \cdot 10^{-7}$	24,25	8,14
$9,1 \cdot 10^{-7}$	29,12	7,86
$3,4 \cdot 10^{-6}$	29,50	6,83
$5,9 \cdot 10^{-6}$	26,75	5,92

(Ver figura 20).

Fig. 20.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Levorfanol frente a trenes de estímulo. En barras error standard de la media.



Los resultados con metadona en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 7

Número de ensayos realizados = 7

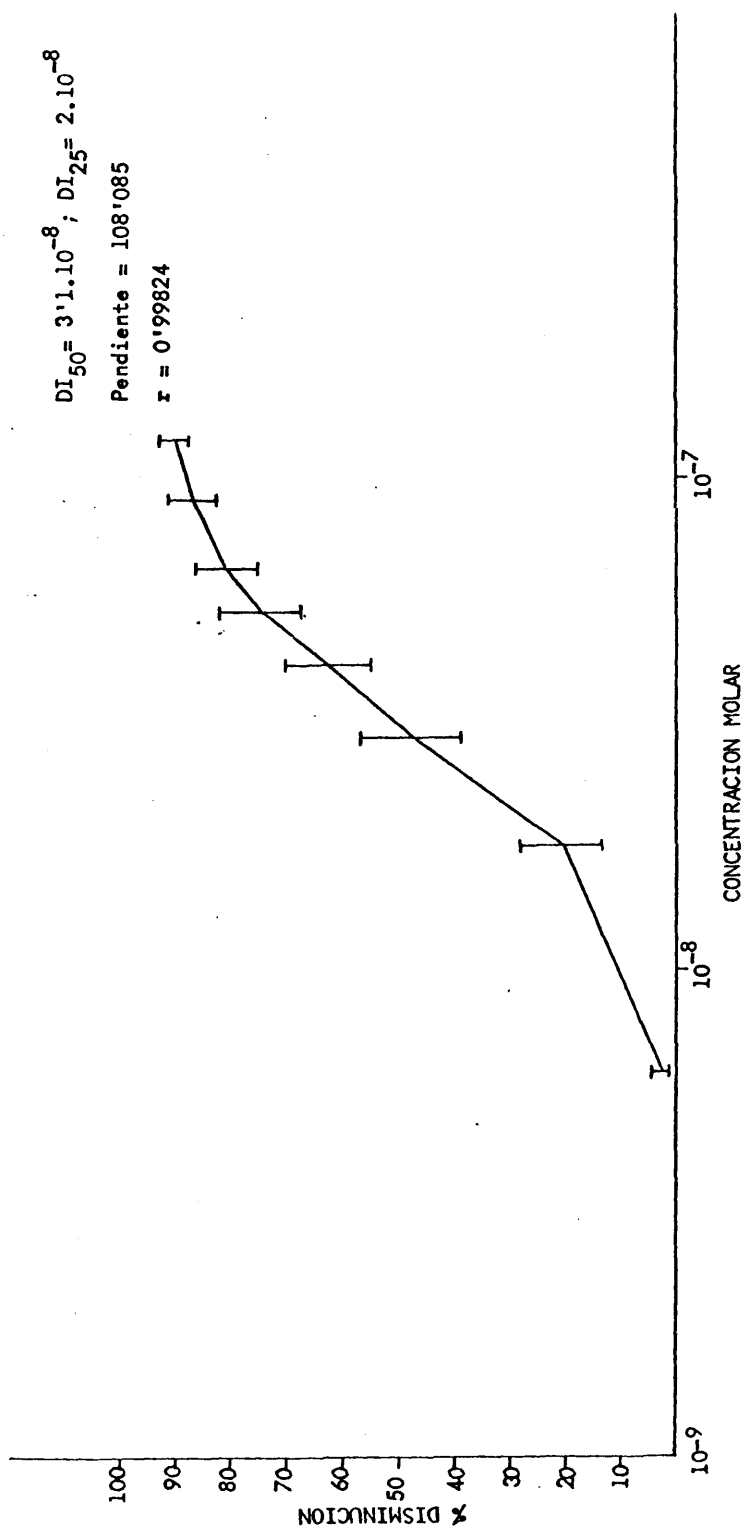
Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$6,2 \cdot 10^{-9}$	2,71	1,86
$1,8 \cdot 10^{-8}$	21,28	7,60
$3 \cdot 10^{-8}$	47,71	8,83
$4,2 \cdot 10^{-8}$	62,86	7,68
$5,4 \cdot 10^{-8}$	75,14	7,45
$6,6 \cdot 10^{-8}$	81,57	5,44
$9,1 \cdot 10^{-8}$	87,57	4,34
$1,2 \cdot 10^{-7}$	90,71	2,59

Pendiente de la recta que definiría esta curva = 108,035

Coefficiente de correlación = 0,99824

(Ver figura 21).

Fig. 21.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Metadona frente a estímulo simple. En barras el error standard de la media.



Los resultados con metadona en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supra-maximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

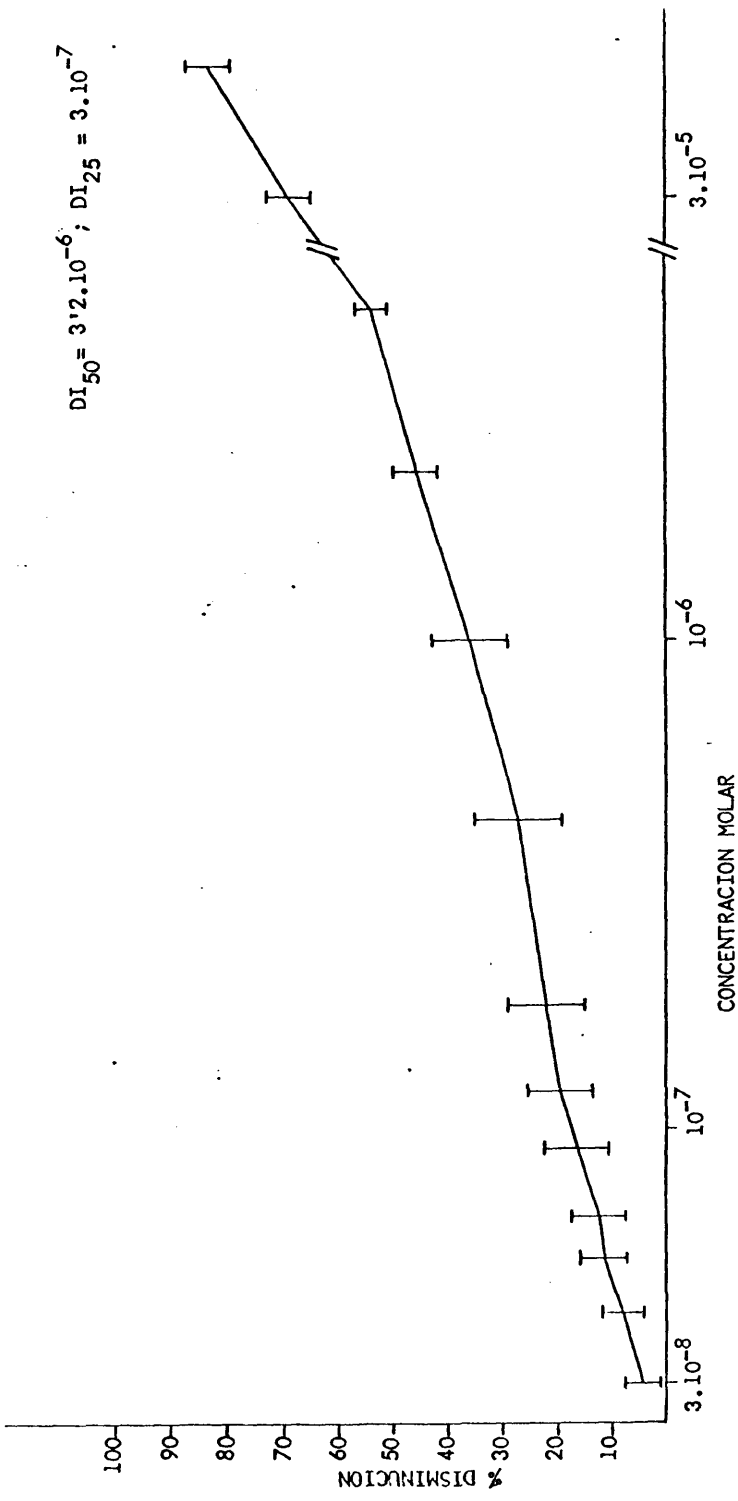
TABLA 8

Número de ensayos realizados = 6

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$6,2 \cdot 10^{-9}$	-0,50	1,61
$1,8 \cdot 10^{-8}$	1,67	1,99
$3 \cdot 10^{-8}$	4,67	3,20
$4,2 \cdot 10^{-8}$	8,33	4,24
$5,4 \cdot 10^{-8}$	11,50	4,81
$6,6 \cdot 10^{-8}$	12,50	5,26
$9,1 \cdot 10^{-8}$	16,50	6,29
$1,2 \cdot 10^{-7}$	19,50	6,23
$1,8 \cdot 10^{-7}$	22,33	6,87
$4,3 \cdot 10^{-7}$	26,83	7,84
10^{-6}	36	7,09
$2,2 \cdot 10^{-6}$	46,33	4,15
$4,7 \cdot 10^{-6}$	53,83	2,76
$3 \cdot 10^{-5}$	68,83	3,94
$5,5 \cdot 10^{-5}$	83,50	4

(Ver figura 22)

Fig. 22.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Metadona frente a trenes de estímulo. En barras el error standard de la media.



Los resultados con fentanilo en ilcon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 9

Número de ensayos realizados = 8

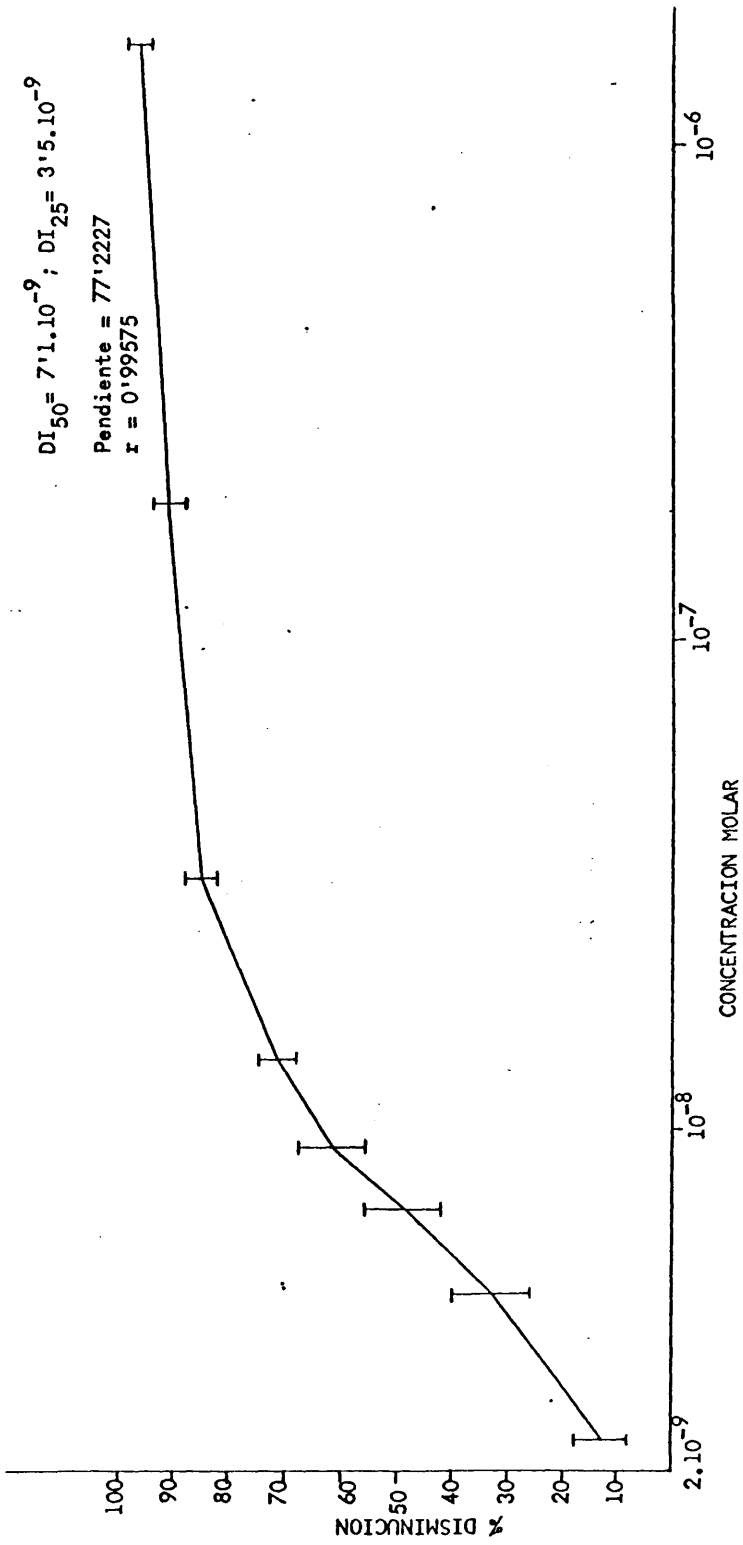
Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$2,3 \cdot 10^{-9}$	13,25	4,89
$4,6 \cdot 10^{-9}$	32,75	7,43
$6,9 \cdot 10^{-9}$	49,25	7,29
$9,2 \cdot 10^{-9}$	61,62	6
$1,4 \cdot 10^{-8}$	71,62	3,54
$3,3 \cdot 10^{-8}$	85	2,95
$1,9 \cdot 10^{-7}$	91,37	2,76
$1,6 \cdot 10^{-6}$	96,62	1,90

Pendiente de la recta que definiría esta curva = 77,2227

Coefficiente de correlación = 0,99575

(Ver figura 23).

Fig. 23.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Fentanilo frente a estímulo simple. En barras el error standard de la media.



Los resultados con fentanilo en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

TABLA 10

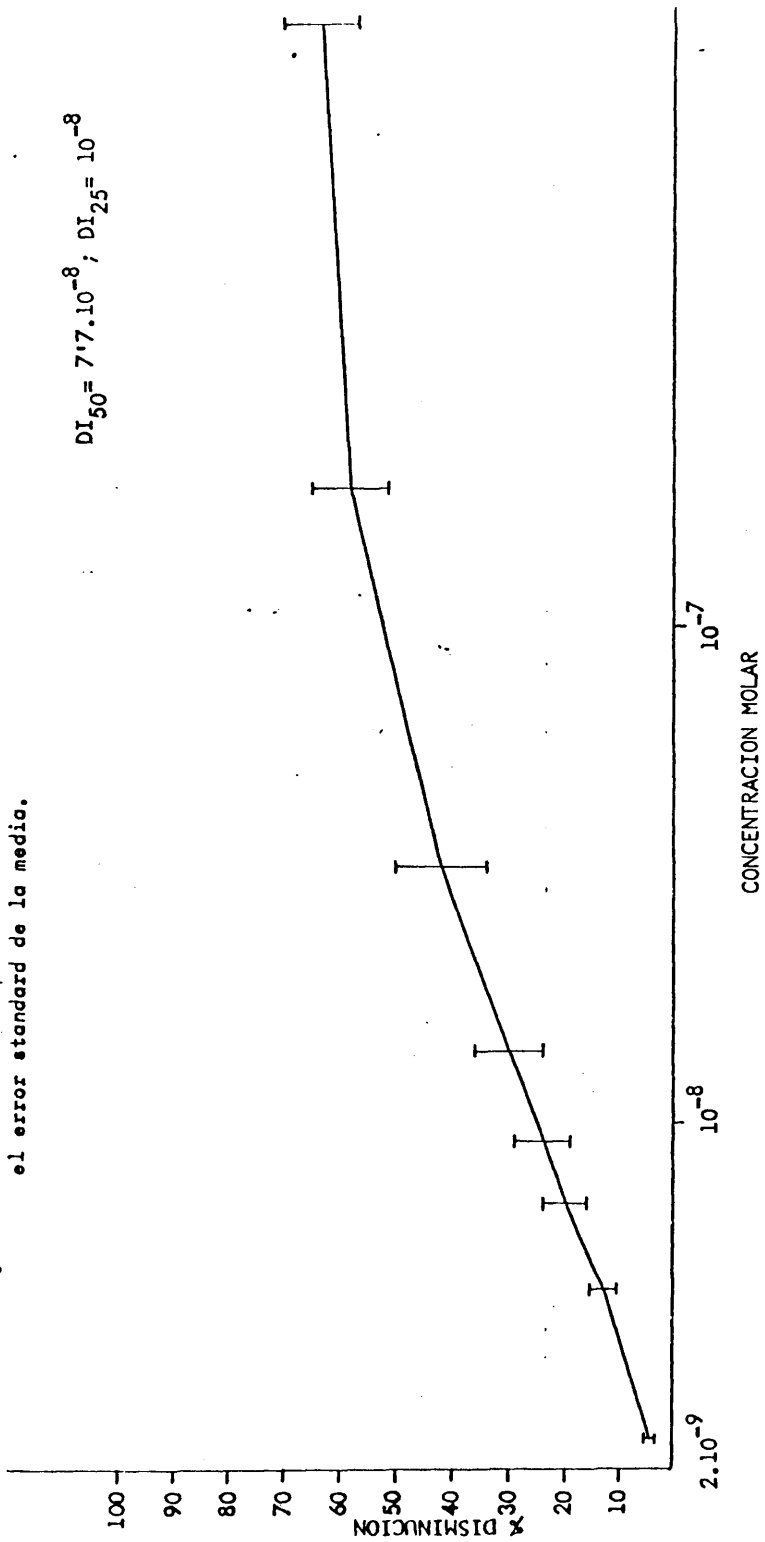
Número de ensayos realizados = 7

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$2,3 \cdot 10^{-9}$	4,57	0,97
$4,6 \cdot 10^{-9}$	13	2,51
$6,9 \cdot 10^{-9}$	19,86	3,78
$9,2 \cdot 10^{-9}$	23,71	4,86
$1,4 \cdot 10^{-8}$	30,28	5,99
$3,3 \cdot 10^{-8}$	41,71	7,71
$1,9 \cdot 10^{-7}$	58,57	7,26
$1,6 \cdot 10^{-6}$	64,14	7,30

(Ver figura 24)

Fig. 24.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Fentanilo frente a trenes de estímulo. En barras el error standard de la media.

$DI_{50} = 7.7 \cdot 10^{-8}$; $DI_{25} = 10^{-8}$



Los resultados con etorfina en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 11

Número de ensayos realizados = 6

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$1,2 \cdot 10^{-11}$	2,67	2,69
$7,5 \cdot 10^{-11}$	18,50	5,01
$1,4 \cdot 10^{-10}$	31,83	5,63
$2,6 \cdot 10^{-10}$	47,67	5,78
$3,9 \cdot 10^{-10}$	57	4,72
$5,1 \cdot 10^{-10}$	60	4,40
$7,6 \cdot 10^{-10}$	65,33	5,93
$3,3 \cdot 10^{-9}$	74,50	6,51

Pendiente de la recta que definiría esta curva = 48,3680

Coefficiente de correlación = 0,99330

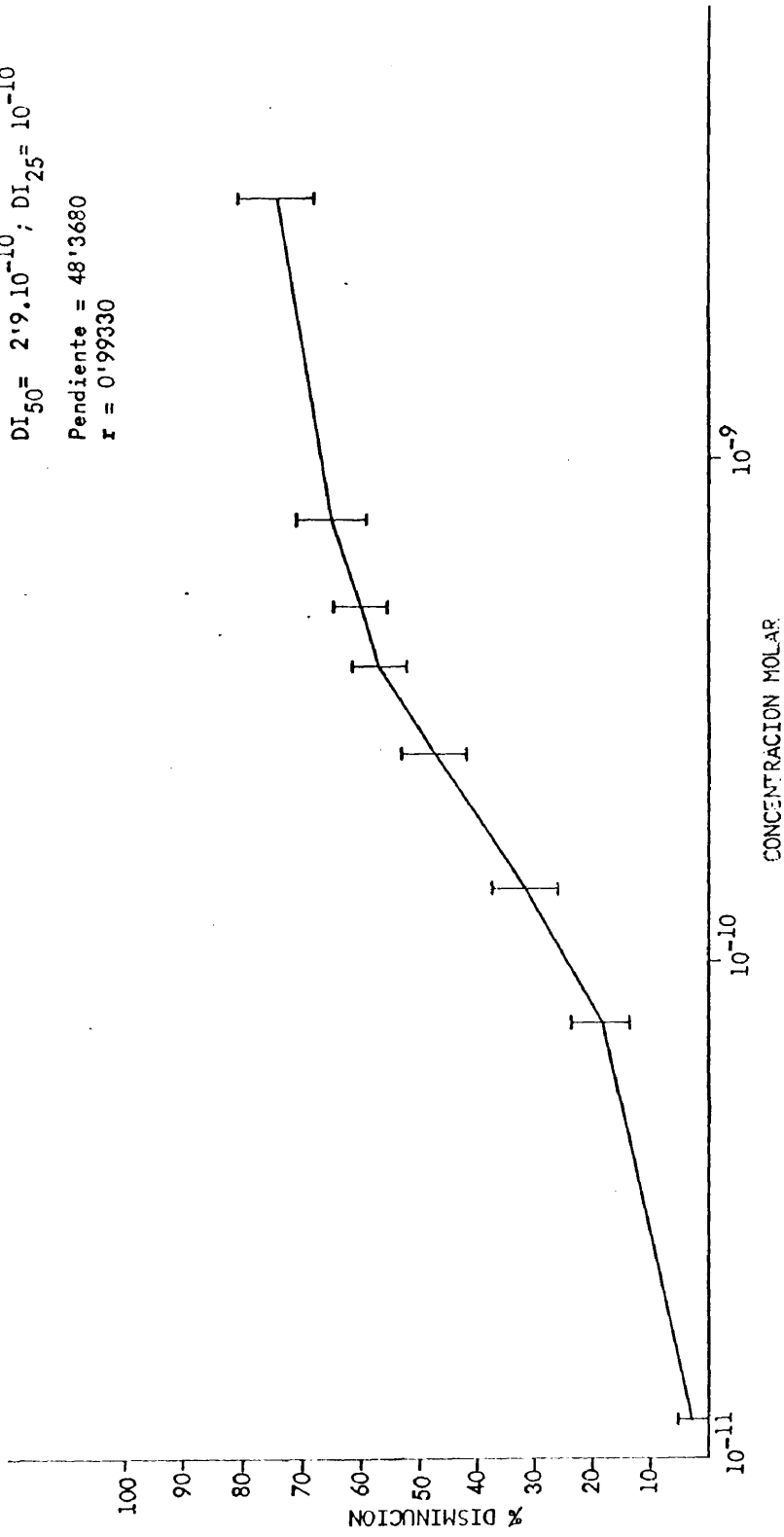
(Ver figura 25).

Fig. 25.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Etorfina frente a estímulo simple. En barras error standard de la media.

$$DI_{50} = 2.9 \cdot 10^{-10}; DI_{25} = 10^{-10}$$

$$\text{Pendiente} = 48.3680$$

$$r = 0.99330$$



Los resultados con etorfina en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

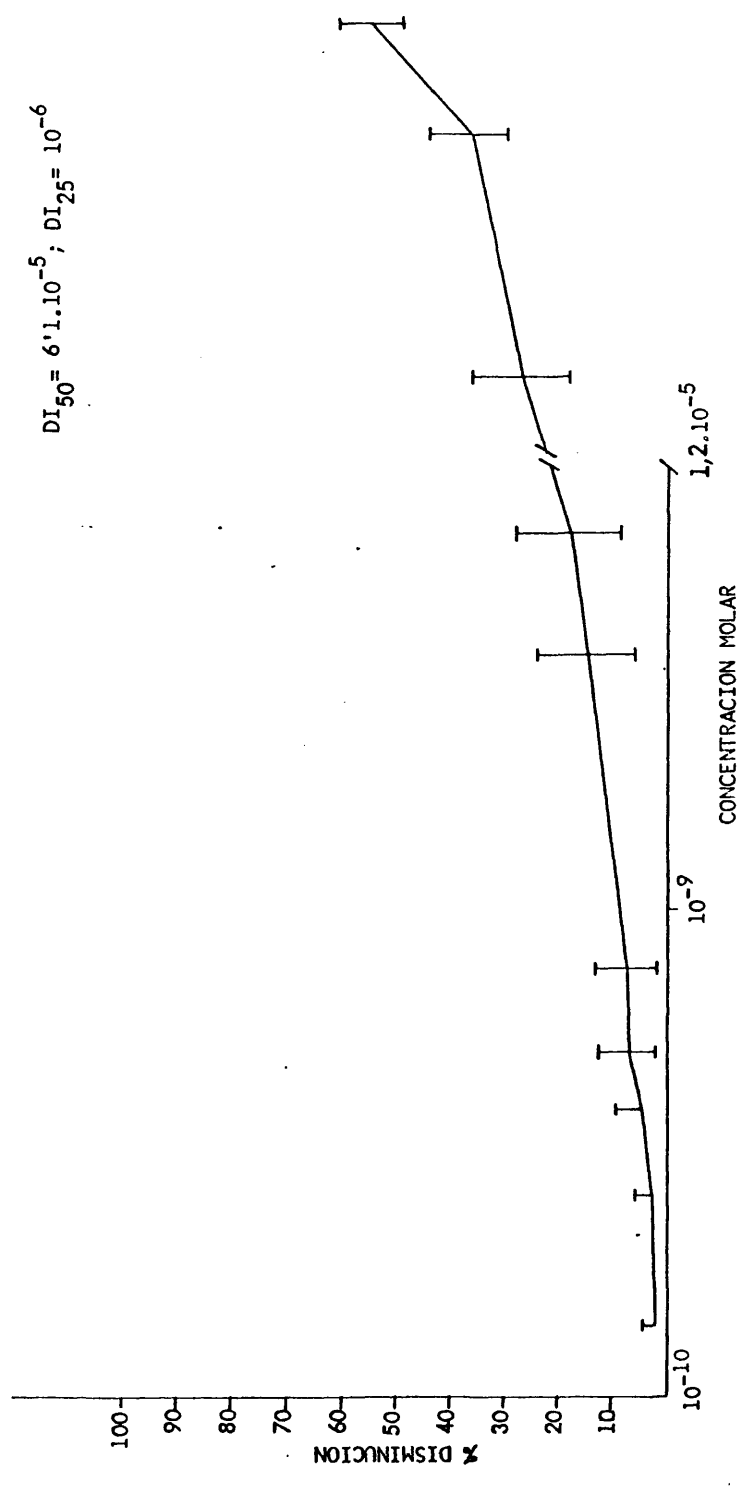
TABLA 12

Número de ensayos realizados = 6

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$1,2 \cdot 10^{-11}$	-0,17	1,19
$7,5 \cdot 10^{-11}$	-0,33	1,31
$1,4 \cdot 10^{-10}$	2,17	2,53
$2,6 \cdot 10^{-10}$	2,83	3,36
$3,9 \cdot 10^{-10}$	4,67	5,15
$5,1 \cdot 10^{-10}$	7,33	5,31
$7,6 \cdot 10^{-10}$	7,67	5,94
$3,3 \cdot 10^{-9}$	15,17	9,02
$5,8 \cdot 10^{-9}$	18,33	9,62
$1,8 \cdot 10^{-8}$	21,50	9,53
$1,2 \cdot 10^{-5}$	27,33	9,01
$3,7 \cdot 10^{-5}$	36,83	7,18
$6,2 \cdot 10^{-5}$	55,17	6,02

(Ver figura 26).

Fig. 26.- Curva dosis-respuesta acumulativa con Etorfina frente a trenes de estímulo. En barras el error standard de la media.



TRENES DE ESTIMULO

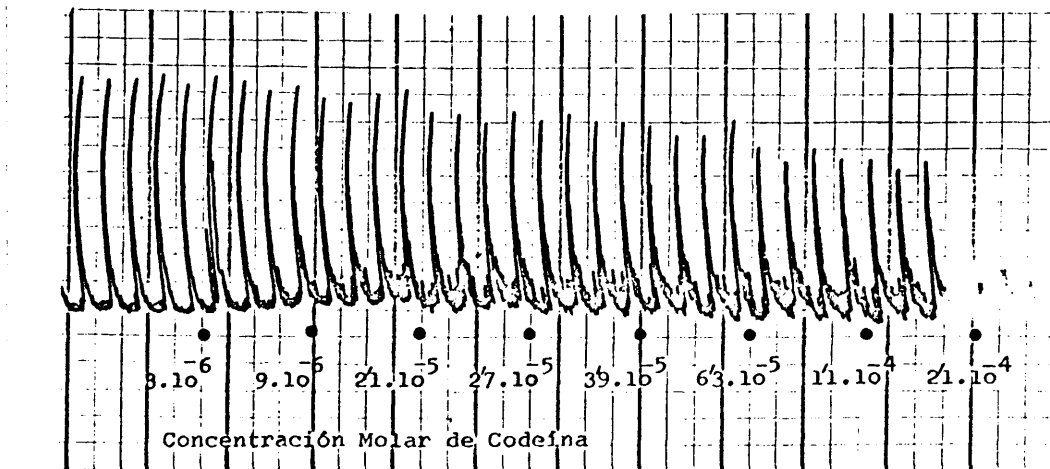
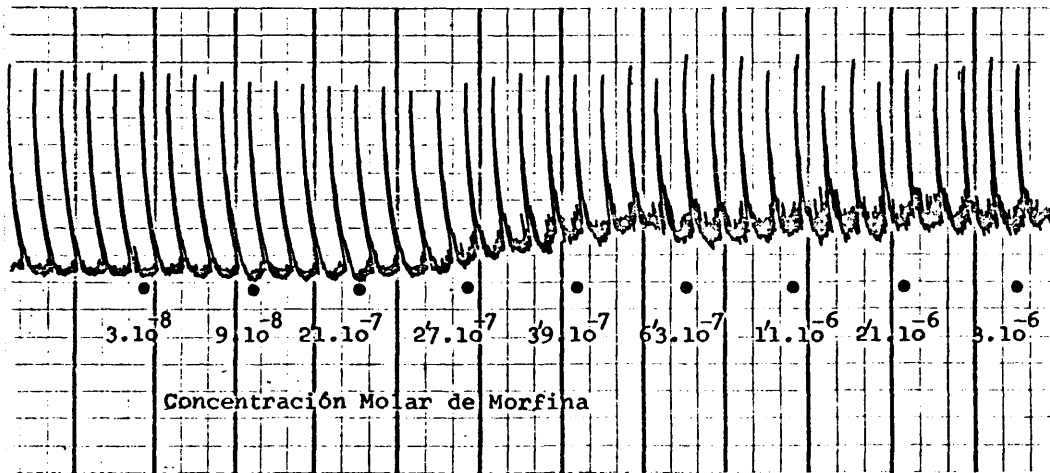
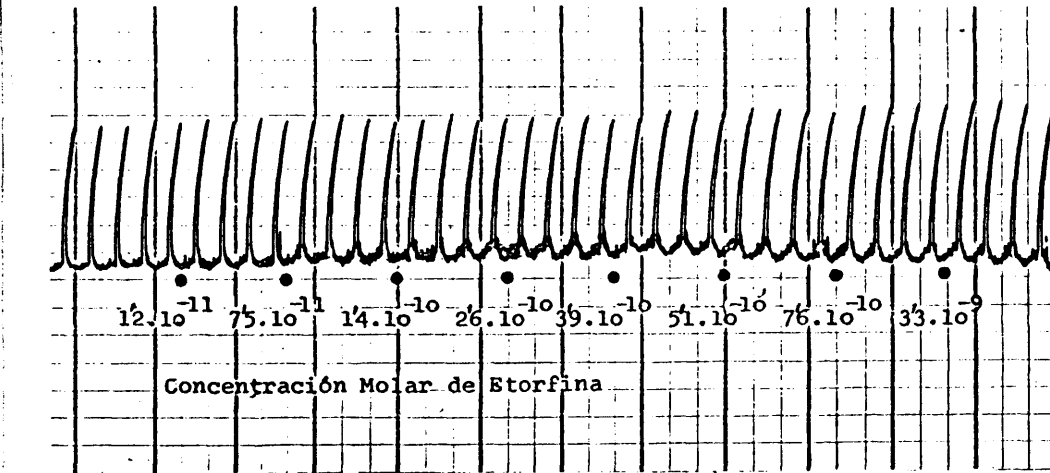


Figura 27
136

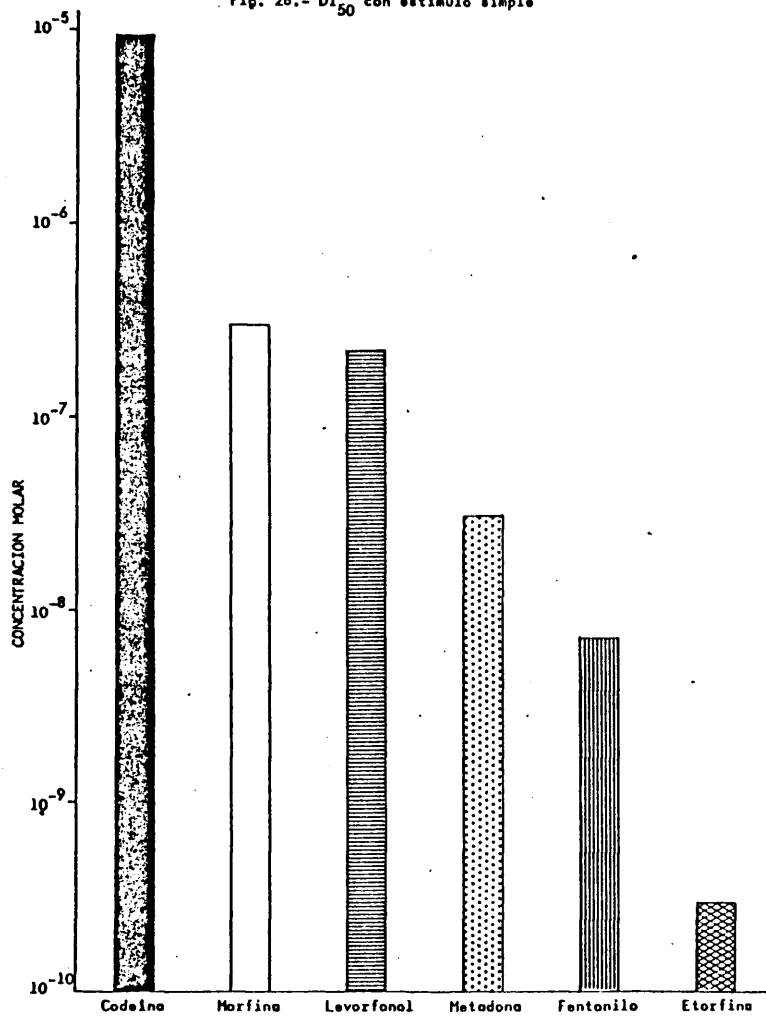
Las DI_{50} (dosis inhibitoras del 50% de la respuesta contráctil), obtenidas por extrapolación en las curvas dosis-respuesta a los distintos analgésicos morfínicos del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 13

Analgésico	DI_{50}
Codeína	$9,3 \cdot 10^{-6} M$
Morfina	$3 \cdot 10^{-7} M$
Levorfanol	$2,2 \cdot 10^{-7} M$
Metadona	$3,1 \cdot 10^{-8} M$
Fentanilo	$7,1 \cdot 10^{-9} M$
Etorfina	$2,9 \cdot 10^{-10} M$

(Ver figura 28)

Fig. 28.- DI_{50} con estímulo simple



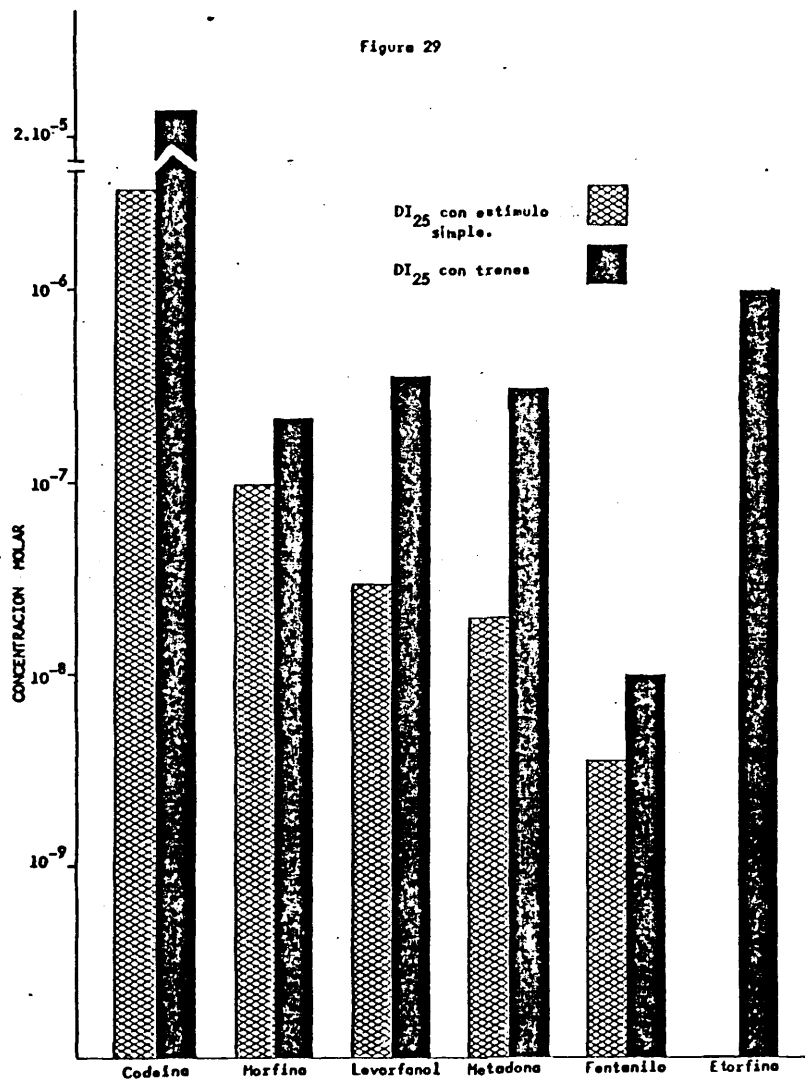
Las DI_{25} (dosis inhibidoras del 25% de la respuesta contráctil) obtenidas por extrapolación en las curvas dosis-respuesta a los distintos analgésicos morfínicos del ileon de caba-ya estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto fueron:

TABLA 14

Analgésico	DI_{25} con estímulo simple	DI_{25} con trenes de estímulo
Codeína	$3,2 \cdot 10^{-6} M$	$2,7 \cdot 10^{-5} M$
Morfina	$9,4 \cdot 10^{-8} M$	$2,1 \cdot 10^{-7} M$
Levorfanol	$3 \cdot 10^{-8} M$	$3,5 \cdot 10^{-7} M$
Metadona	$2 \cdot 10^{-8} M$	$3 \cdot 10^{-7} M$
Fentanilo	$3,5 \cdot 10^{-9} M$	$10^{-8} M$
Etorfina	$10^{-10} M$	$10^{-6} M$

(Ver figura 29)

Figura 29



Síntesis de resultados.-

La disminución de la altura de la contracción causada por los morfinomiméticos en el ileon de cobayo estimulado con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, fué mucho más acentuada que la disminución causada por estos fármacos en la respuesta que se observa al estimular con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos con un intervalo de 1 minuto entre cada dos trenes. Cuando se utilizó estímulo simple se observó que el orden y la relación de las DI_{50} de la altura de la contracción obtenidas están de acuerdo con el orden y la relación de las potencias analgésicas de estos fármacos.

Cuando se utilizaron trenes de estímulo en el caso de la codeína no se llegó a obtener una DI_{50} y únicamente con las dosis más altas de las utilizadas para el estímulo simple obtuvimos una disminución de la altura de la contracción próxima al 50%. En el caso de la morfina obtuvimos valores de disminución del orden del 50% con las dosis más altas que habíamos utilizado en el estímulo simple, pero con dosis mayores no conseguimos disminuciones mayores. En el caso de la metadona con las dosis utilizadas con estímulo simple obtuvimos en el caso de los trenes, porcentajes de disminución inferiores incluso al 20%, pero al aumentar progresivamente las dosis se llegó a obtener hasta un 83,5% de disminución con una dosis más de 100 veces superior

a la más alta utilizada en el estímulo simple. Con el fentonilo en el rango de dosis utilizado con estímulo simple se llegó a conseguir la DI_{50} con trenes, pero los porcentajes de inhibición fueron menores en el caso de los trenes. Con el levorfanol en el rango de dosis utilizado con estímulo simple obtuvimos con trenes porcentajes de disminución inferiores al 30% y con dosis mayores no se consiguió lograr una mayor disminución. La etorfina, por último, no actuó prácticamente sobre la respuesta a la estimulación con trenes de estímulo aunque elevamos las dosis respecto a las utilizadas con estímulo simple progresivamente y en mayor proporción que con los otros analgésicos. Por otra parte, hay que señalar el hecho a modo de excepción de que determinadas preparaciones intestinales aisladas estimulando con trenes de estímulo no respondieron en absoluto a morfinomiméticos (codeína, morfina y metadona) sin que podamos encontrar ninguna explicación y por ello fueron excluidos en el computo de estos resultados.

Con todos los analgésicos utilizados hubo una diferencia significativa ($P < 0.0005$) entre la utilización de estímulo simple y la utilización de trenes de estímulo.

2. Efecto de la cafeína. Antagonismo de los morfinomiméticos y la cafeína.

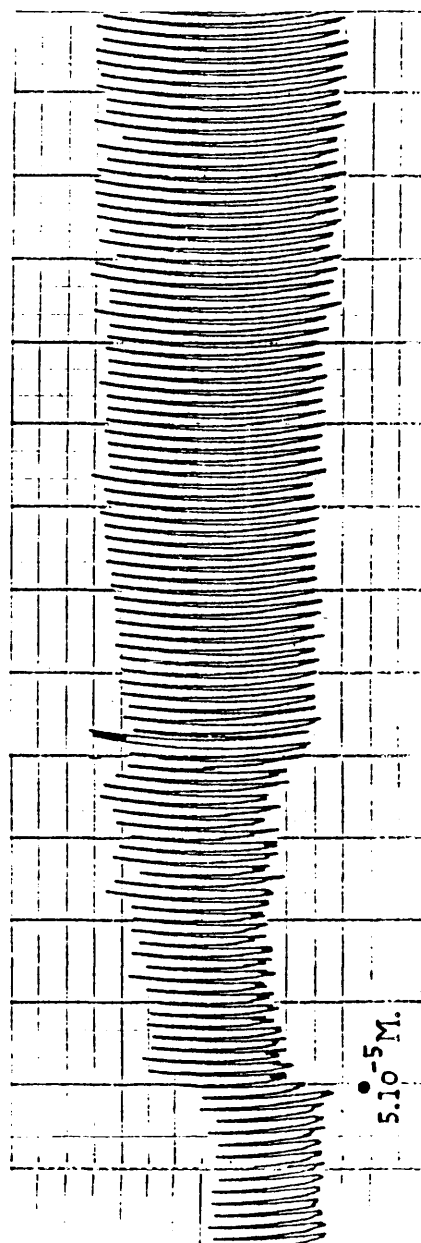
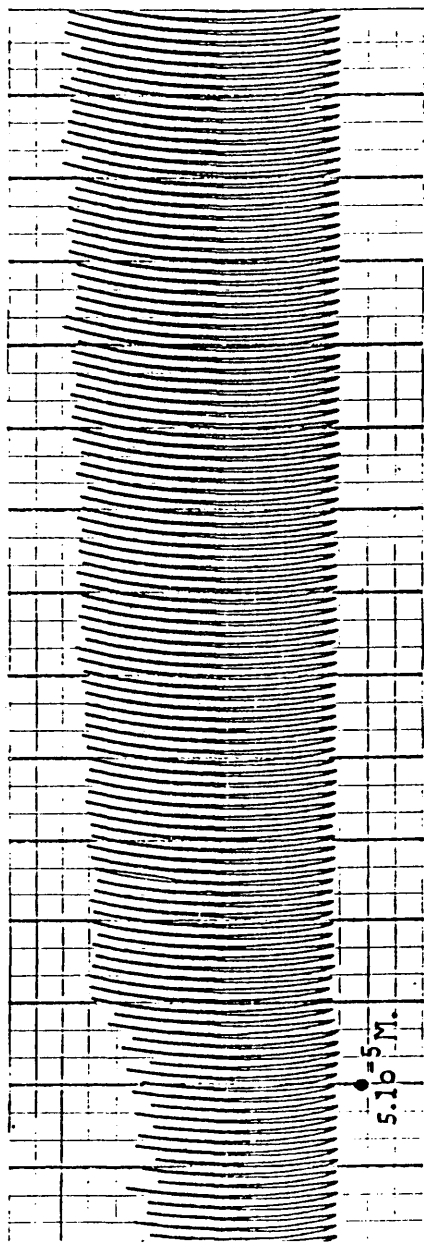
Resultados obtenidos con cafeína en ileon de cobayo estimulado con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración:

La potenciación de la respuesta contráctil del ileon de cobayo al estímulo eléctrico coaxial por la dosis $5 \cdot 10^{-5} M$ de cafeina fué muy variable en intestinos de diversos animales e incluso en distintas porciones del mismo intestino. La respuesta fué un aumento lento y progresivo de la altura de la contracción que se consideró estabilizada después de transcurridos diez minutos de haber administrado la dosis. En general, en intestinos con pequeña respuesta contráctil aparecieron mayores porcentajes de aumento. En todos los ensayos realizados utilizando cafeina señalamos los porcentajes de aumento de la contracción logrados con esta dosis.

(Ver figura 30).

Figura 30

POTENCIAMIENTO DE LA CONTRACCION CON CAFEINA



Se puede observar la diferencia entre el % de disminución de la altura de la contracción logrado con una dosis determinada de morfina en ileon de cobaya estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el % de disminución de la altura de la contracción de la misma preparación con esa misma dosis de morfina en presencia de la concentración 5.10^{-5} M de cafeina.

TABLA 15

soyo	Dosis Molar de morfina	Control del % de disminución	% aumento con cafeina	% disminución en presencia de cafeina	Diferencia con el % del control
I	$1,2.10^{-7}$	50	126	23	27
II	$1,2,10^{-7}$	22	17	11	11
III	$1,2.10^{-7}$	38	6	12	26
IV	$1,2.10^{-7}$	33	25	14	19
V	$1,2.10^{-7}$	31	45	2	29
VI	$1,2.10^{-7}$	37	4	26	11

(Ver figuras 31, 32, y 33).

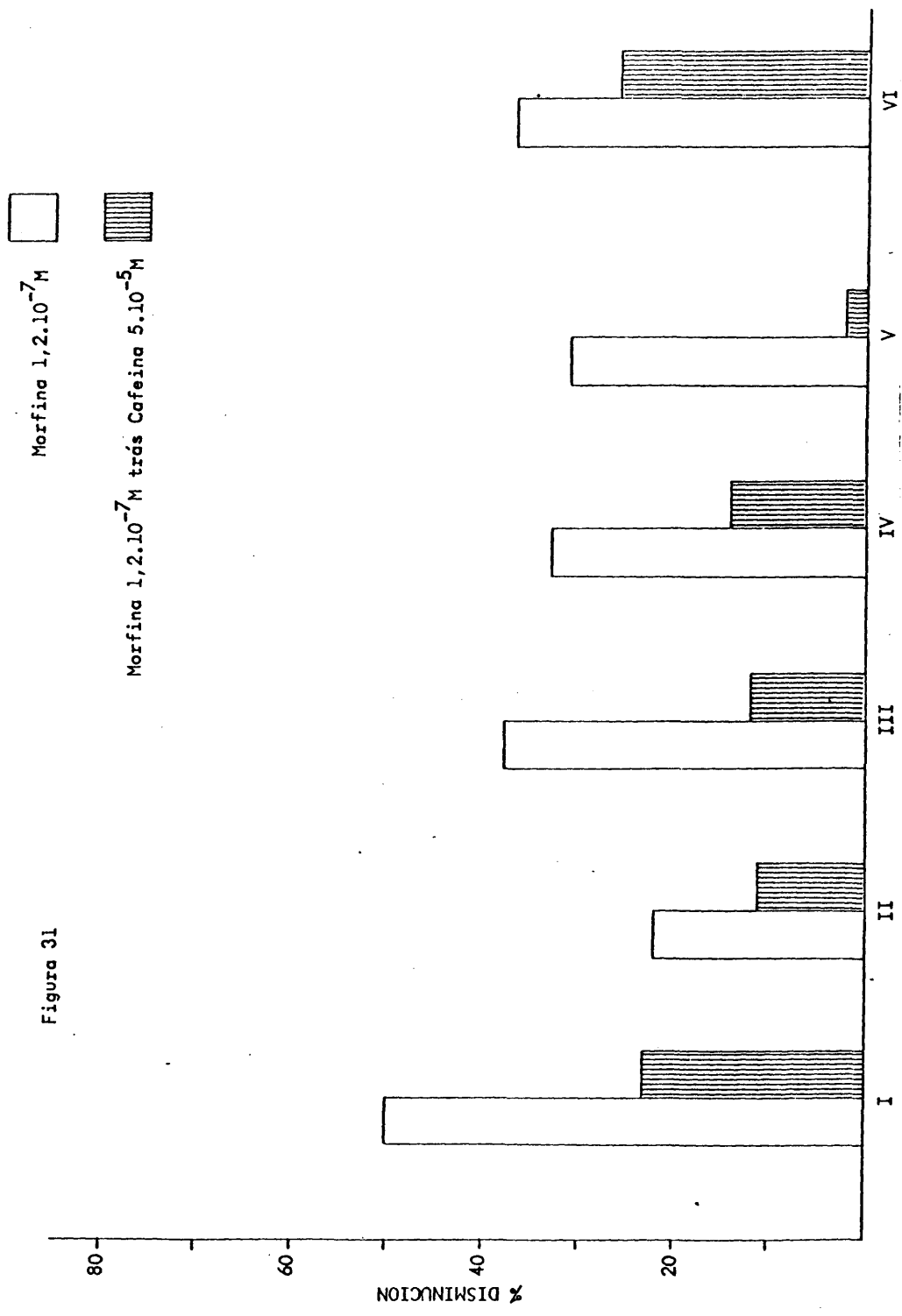


Figura 31

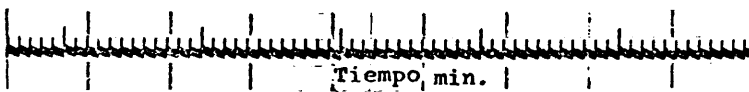
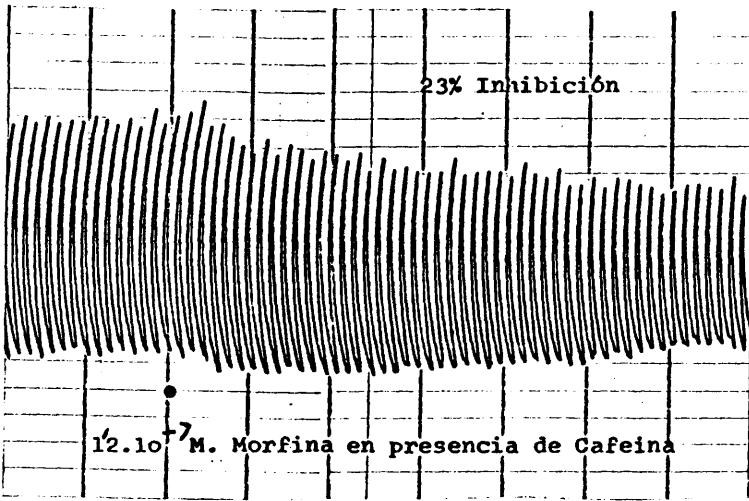
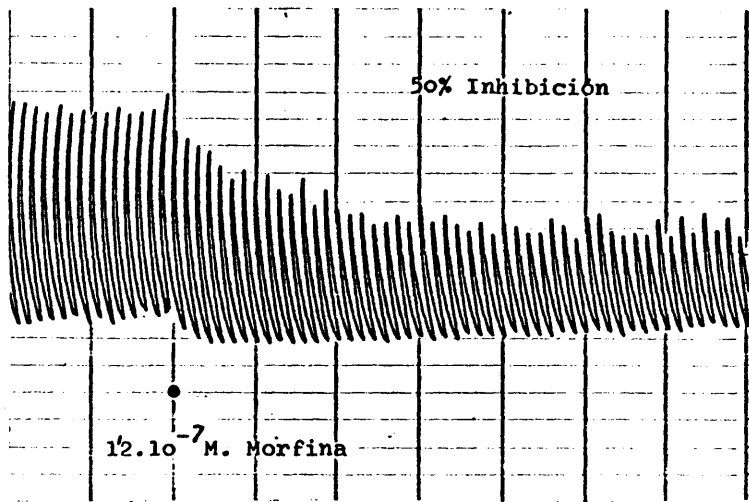


Figura 32

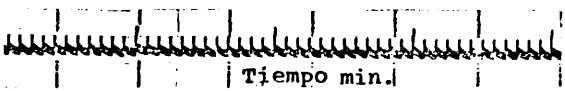
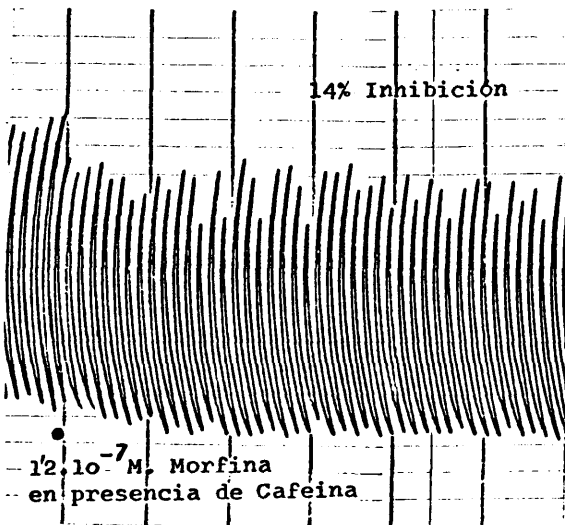
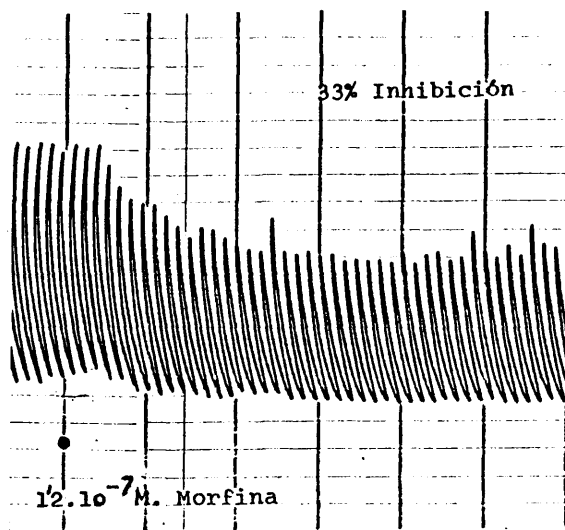


Figura 33

Se puede observar la diferencia entre el % de disminución de la altura de la contracción logrado con una dosis determinada de metadona en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el % de disminución de la altura de la contracción de la misma preparación con esa misma dosis de metadona en presencia de la concentración 5.10^{-5} M de cafeina.

TABLA 16

Ensayo	Dosis Molar de metadona	Control del % de disminución	% aumento con cafeina	% disminución en presencia de cafeina	Diferencia con el % del control
I	$4,4.10^{-8}$	36	40	14	22
II	$5,6.10^{-8}$	46	40	14	32
III	$3,7.10^{-8}$	23	83	13	10
IV	$3,7.10^{-8}$	14	20	4	10
V	$3,7.10^{-8}$	29	74	-18	47
VI	$5,6.10^{-8}$	19	7	10	9
VII	$3,7.10^{-8}$	29	21	-3	32
VIII	$3,7.10^{-8}$	45	14	17	28

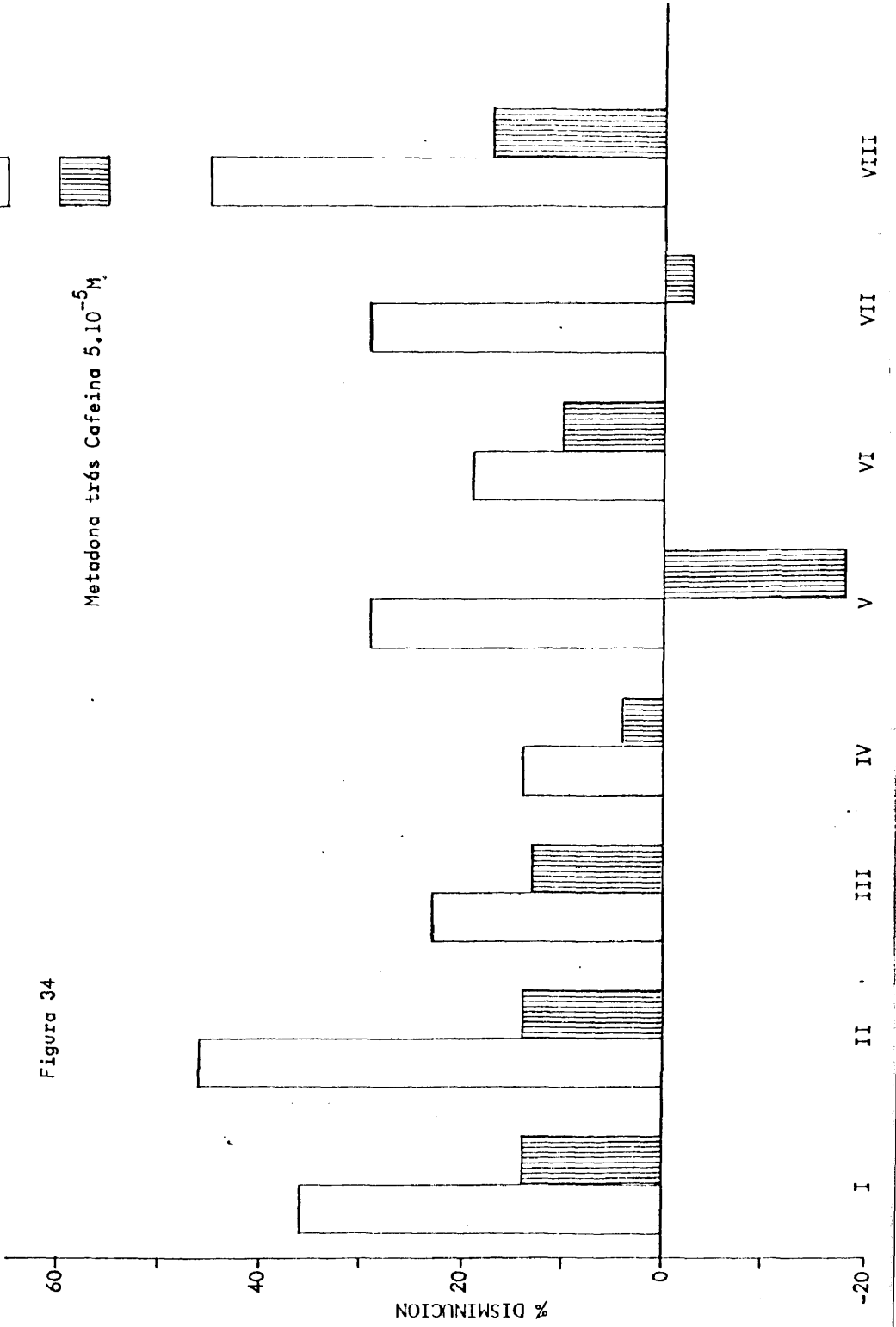
(Ver figuras 34 y 35).

Metadona



Metadona trs Cafeina $5 \cdot 10^{-5} M$

Figura 34



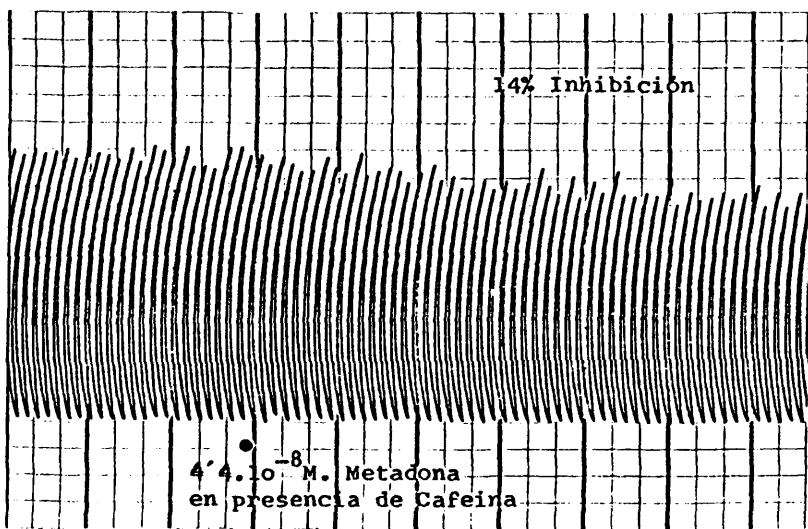
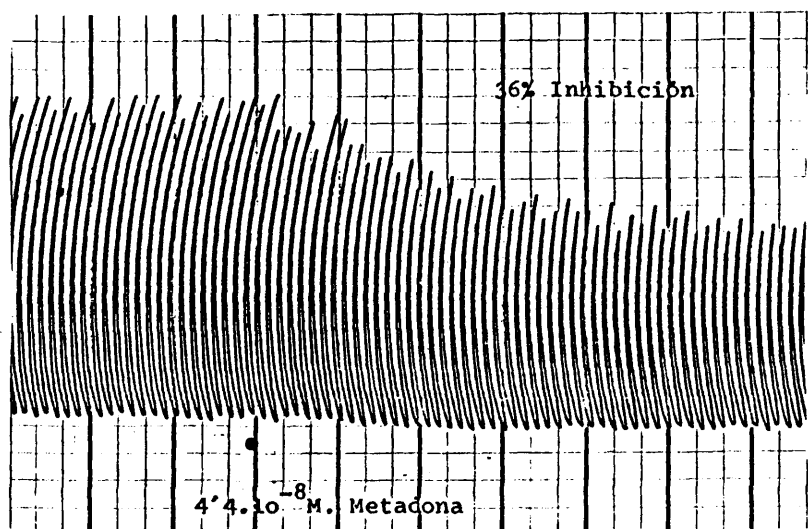


Figura 35

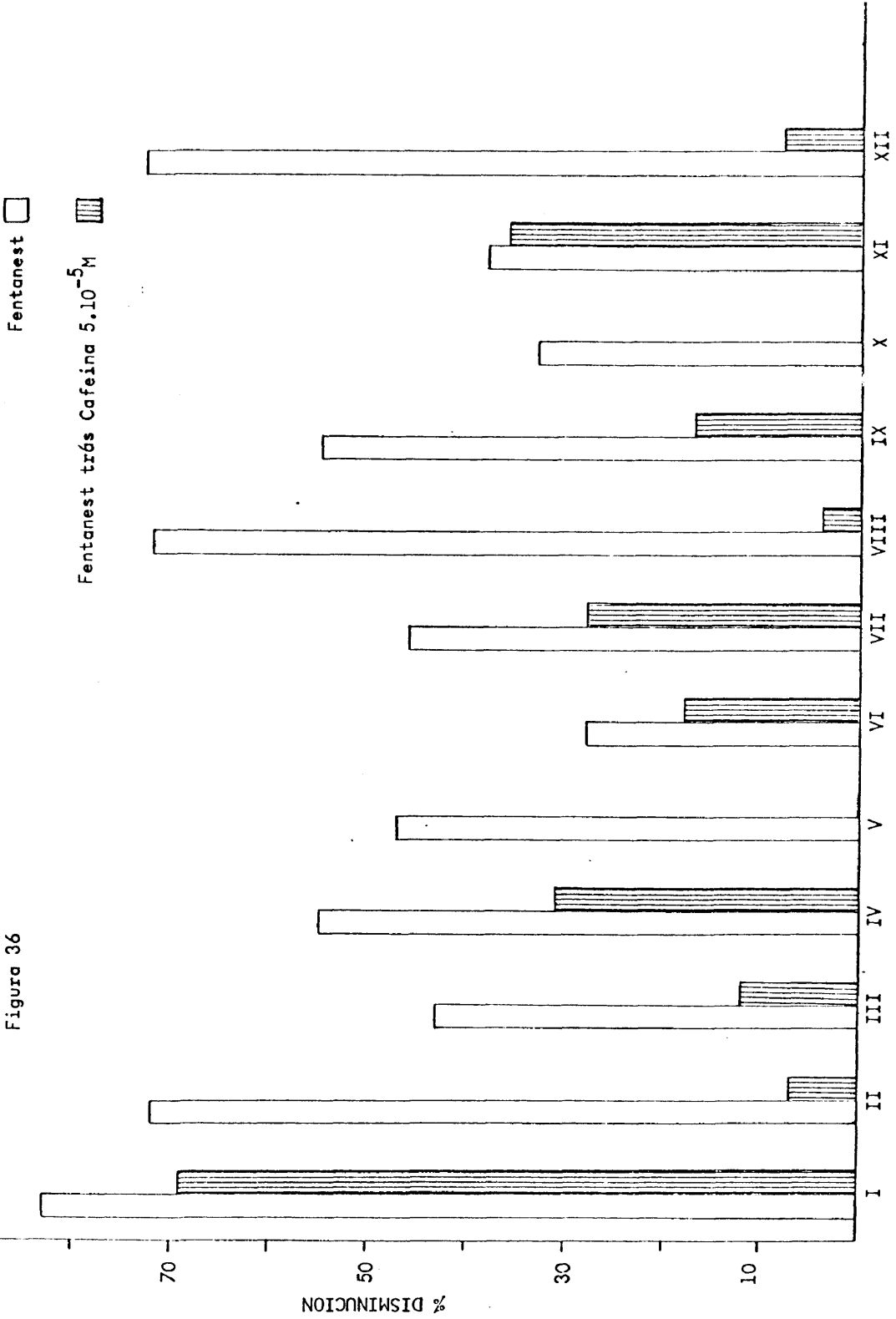
Se puede observar la diferencia entre el % de disminución de la altura de la contracción logrado con una dosis determinada de fentanest en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el % de disminución de la altura de la contracción de la misma preparación con esa misma dosis de fentanest en presencia de la concentración 5.10^{-5} M de cafeina.

TABLA 17

Ensayo	Dosis Malar de fentanest	Control del % de disminución	% aumento con cafeina	% disminución en presencia de cafeina	Diferencia con el % del control
I	$1,1.10^{-7}$	83	18	69	14
II	$2,8.10^{-8}$	72	7	7	65
III	$1,8.10^{-8}$	43	32	12	31
IV	$1,8.10^{-8}$	55	33	31	24
V	$1,8.10^{-8}$	47	22	0	47
VI	$3,7.10^{-8}$	28	5	18	10
VII	$1,8.10^{-8}$	46	43	28	18
VIII	$2,8.10^{-8}$	72	28	4	68
IX	$3,7.10^{-8}$	55	44	17	38
X	$1,8.10^{-8}$	33	41	0	33
XI	$2,8.10^{-8}$	38	16	36	2
XII	$1,8.10^{-8}$	73	21	8	65

(Ver figuras 36, 37 y 38).

Figura 36



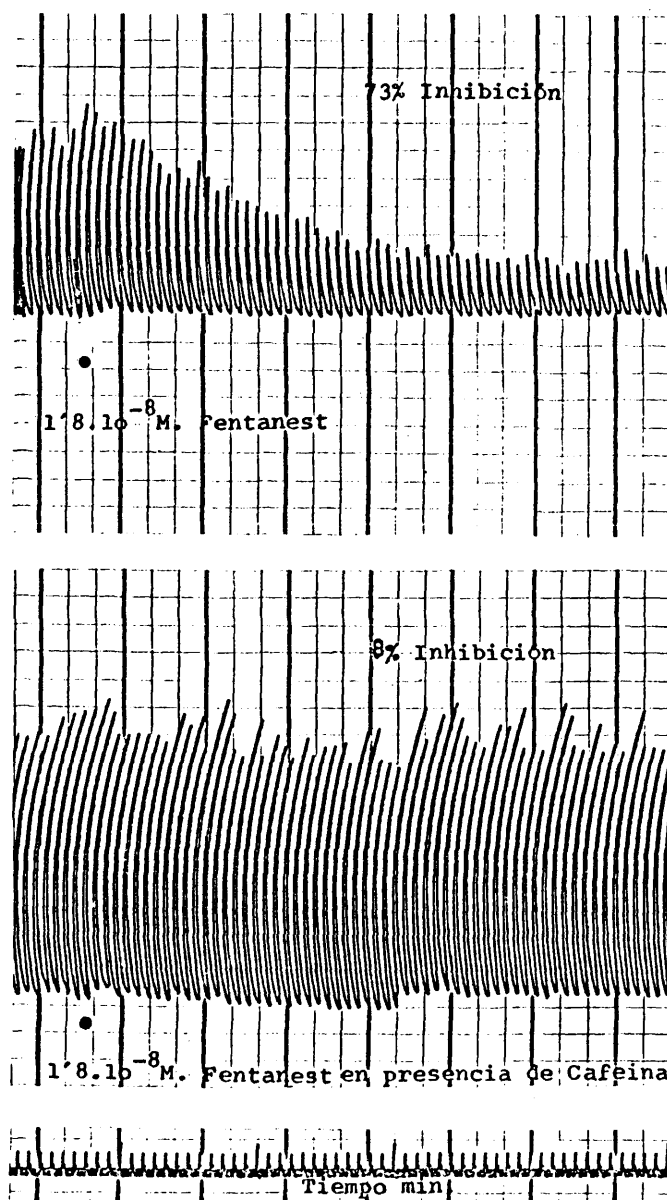


Figura 37

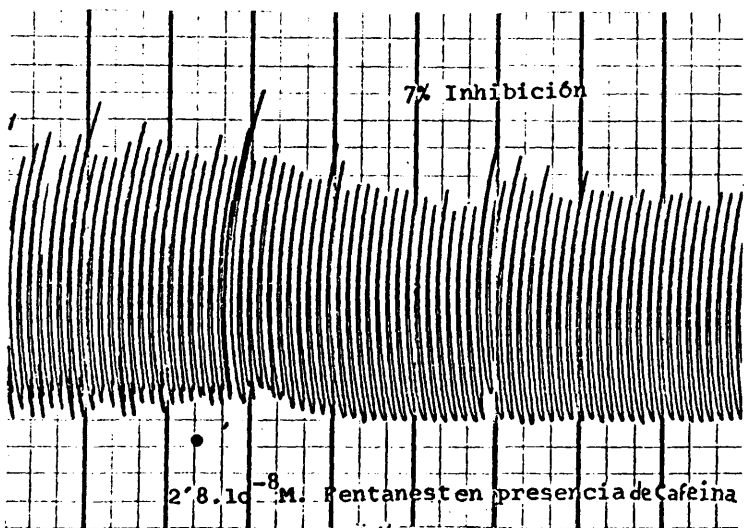
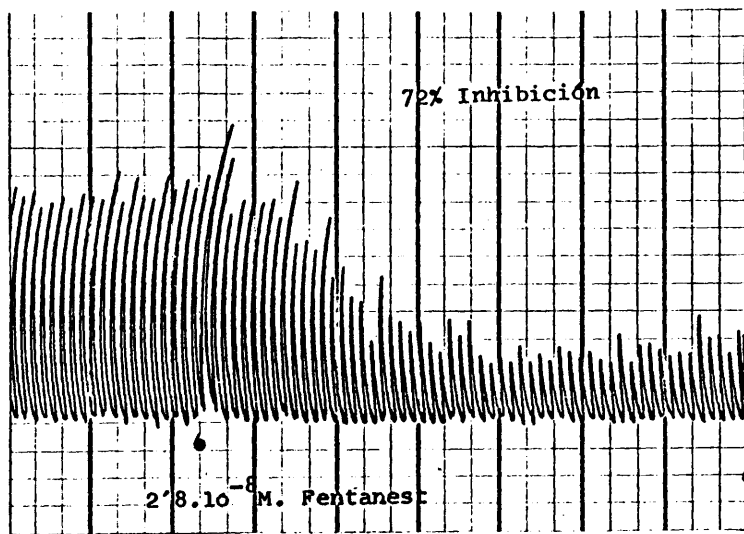


Figura 38

Síntesis de resultados.-

Se comprueba que el porcentaje de disminución de la altura de la contracción del ileon de cobayo inducida por estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración causada por una dosis determinada de analgésico es siempre menor cuando el analgésico se administra en presencia de la concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M de cafeina. Este fenómeno se observó con morfina, metadona, y fentanest, y en el caso de la metadona la dosis administrada en presencia de cafeina en dos ocasiones no produjo ninguna disminución en la altura de la contracción, si no que por el contrario este aumentó después de administrarla.

La diferencia entre el % control de disminución de la altura de la contracción del analgésico, y el % de disminución de la altura de la contracción del analgésico en presencia de cafeina, fué siempre significativa ($P < 0,0025$ para morfina y metadona y $P < 0,0005$ para fentanest).

3. Relación respuesta-frecuencia. Relación respuesta-frecuencia en presencia de cafeina.

Se observó la respuesta a la estimulación coaxial de ileon de cobayo con estímulo simple supramaximal de 2 milisegundos de duración con diversas frecuencias de estimulación comprendidas entre 0,2 Hz y 1 Hz, y a continuación en la misma preparación se observaron nuevamente las respuestas con la misma serie

de frecuencias en presencia de la concentración $5 \cdot 10^{-5} M$ de cafeína. Se hallaron porcentajes de disminución de la contracción frente a un 100% de contracción a 0,2 Hz.



TABLA 18

Número de ensayos realizados = 5

Frecuencias	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
0,3 Hz	5,80	2,24
0,4 Hz	21,80	5,26
0,5 Hz	38	6,34
0,6 Hz	77,40	13,91
0,7 Hz	100	0
0,8 Hz	100	0
0,9 Hz	100	0
1 Hz	100	0

(Vease figura 39).

Figura 39

Frecuencias 
Frecuencias trds Cafeina $5 \cdot 10^{-5} M$ 

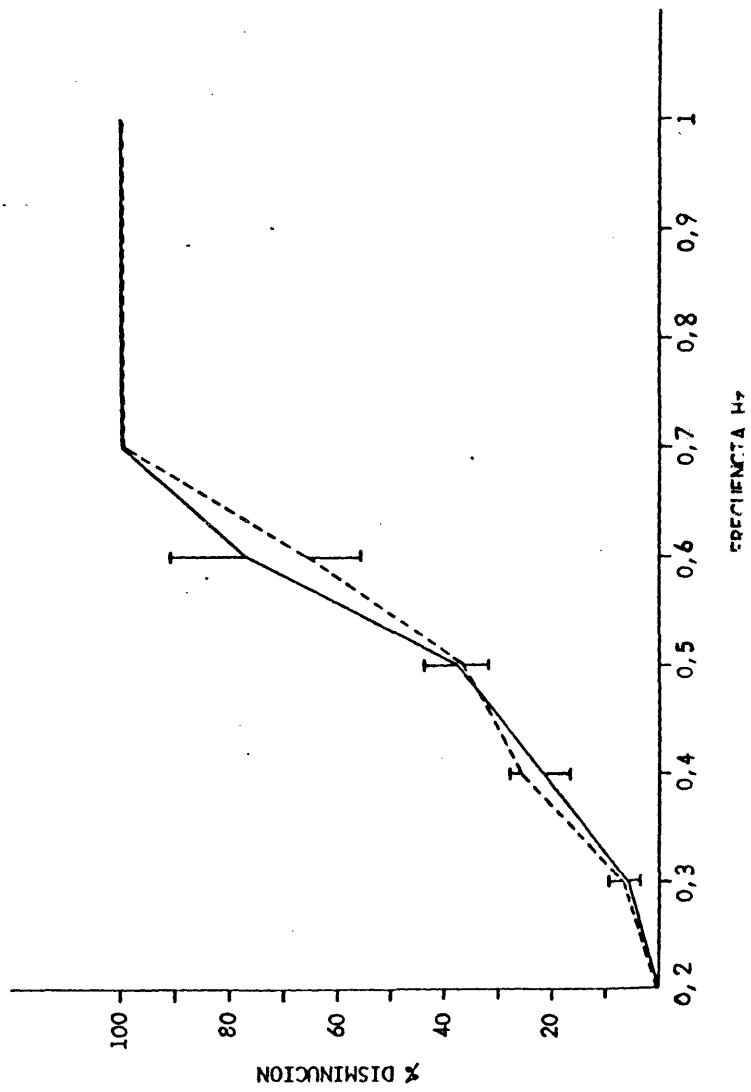


TABLA 19

Frecuencias	Media del % de disminución de la contracción en prede cafeina	Error Standard
0,3 Hz	6,40	3,31
0,4 Hz	26,20	2,26
0,5 Hz	37,20	5,17
0,6 Hz	65,60	9,65
0,7 Hz	100	0
0,8 Hz	100	0
0,9 Hz	100	0
1 Hz	100	0

(Vease figura 39)

Los porcentajes de aumento de la respuesta contráctil obtenidos a 0,2 Hz de frecuencia con la concentración $5 \cdot 10^{-5} M$ de cafeina fueron: 3, 28, 17, 0 y 6 respectivamente para los 5 ensayos realizados.

Síntesis de resultados.-

La amplitud de la contracción obtenida en ileon de cobayo con estímulo simple supramaximal de 2 milisegundos de duración fué disminuyendo al aumentar progresivamente la frecuencia de estimulación desde 0,2 Hz a 1 Hz, de tal forma que ya con 0,7 Hz consideramos la respuesta obtenida como nula, por

lo que la disminución fué del 100% a partir de dicha frecuencia.

En presencia de cafeína el fenómeno fué el mismo.

Progresivamente al ir disminuyendo la amplitud de la contracción también va disminuyendo la regularidad en la respuesta contráctil.

La diferencia entre la progresiva disminución de la altura de la contracción al elevar la frecuencia de estimulación con y sin cafeína no fué significativa ($P > 0,25$).

4. Choques de frecuencia elevada.

Para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos después de haber finalizado (Tabla 20).

TABLA 20

Número de ensayos realizados = 10

º de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	55	7,1	38,10	7,93	27,60	7,24
2º	30	11,49	10,80	11,43	23,10	6,75
3º	-1	19,34	-20,30	20,65	14,90	10,24
4º	-9,40	27,65	-35,20	32,90	-12	8,43
5º	-19,30	30,99	-39,30	34,06	-10,30	4,90
6º	7	12,32	-10,40	12,02	- 2,50	5,23

Véase figuras 40 y 43).

En presencia de la concentración $5 \cdot 10^{-5} M$ de cafeína, para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz, se tomaron referencias: a) nada mas finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos después de haber finalizado (Tabla 21).

Los porcentajes de aumento de la altura de la contracción obtenidos a 0,2 Hz de frecuencia con la concentración $5 \cdot 10^{-5} M$ de cafeína fueron: 53, 5, 44, 4, 58 y 8 respectivamente para los

6 ensayos realizados.

TABLA 21

Número de ensayos realizados = 6

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	36	4,85	27,83	4,77	26,50	7,89
2º	2,50	26,59	-5,67	22,98	13,83	10
3º	-8	17,61	-14,83	13,43	-4,83	3,29
4º	-34,17	37,56	-43,17	41,66	2,17	3,85
5º	-30,67	28,55	-36	29,85	8,17	4,56

(Ver figura 43).

En presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina, para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos después de haber finalizado (Tabla 22).

TABLA 22

Número de ensayos realizados = 6

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	61,83	3,67	67,17	4,96	47,33	7,63
2º	39,83	11,59	52,67	9,16	21,33	4,08
3º	12,67	20,41	45,17	10,56	3,17	5,93
4º	13,50	21,66	44	5,98	-2	8,44
5º	15,83	17,75	29,50	10,45	-7,17	8,23
6º	7	22,86	12	17,53	-27,67	13,23
7º	28,67	14,22	11,50	17,68	-29,17	10,35
8º	43,17	14,90	27,67	11,41	-10,33	7,26

Ver figuras 41 y 43).

En presencia de la concentración $3,1 \cdot 10^{-3}$ M de atropina, para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz, se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos después de haber finalizado (Tabla 23).

Los porcentajes de disminución de la altura de la contracción obtenidos a 0,2 Hz de frecuencia con la concentración

$3,1 \cdot 10^{-6}$ g de atropina fueron: 17, 51, 47, 41, 24 y 32 respectivamente para los 6 ensayos realizados.

TABLA 23

Número de ensayos realizados = 6

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	94,33	4,34	85,50	5,92	47,17	12,52
2º	92,67	7,33	70,17	13,26	15,50	20,96
3º	93,83	6,17	62,83	13,97	-13	11,77
4º	92	8	43,33	22,28	-41,33	21,04
5º	94,83	4,78	44	11,81	-22,50	10,06
6º	90,17	6,32	33,33	12,42	-13,67	11,62

(Ver figuras 42 y 43)

En presencia de la concentración $6,4 \cdot 10^{-6}$ g de clorfeniramina, para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz, se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos después de haber finalizado (Tabla 24).

Los porcentajes de disminución de la altura de la con-

tracción obtenidos a 0,2 Hz de frecuencia con la concentración $8,7 \cdot 10^{-6} M$ de clarfeniramina fueron: 54, 46, 17, 44, 20 y 31 respectivamente para los 6 ensayos realizados.

TABLA 24

Número de ensayos realizados = 6

de oque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	95,17	4,08	83	5,37	49,50	11,25
2º	95	5	63,83	15,11	-22,50	9,09
3º	94,67	3,61	49,33	11,83	-0,50	6,78
4º	91,17	6	36,67	14,38	0,17	9,61
5º	83	10,42	12	26,79	-39,83	45,05
6º	73,33	11,50	16,33	16,45	-34,83	13,27

er figuras 42 y 43).

Síntesis de resultados.-

En los ensayos control de sucesivos choques de frecuencia elevada observamos que el efecto de los dos primeros choques fué una disminución con 0,2 Hz de la altura de la contracción, con una recuperación parcial en los 10 minutos de estimulación a 0,2 Hz anteriores a un nuevo choque. A partir del tercer choque

se observaron aumentos de altura de la contracción después de finalizar el choque.

En presencia de cafeína el fenómeno fué similar pero los porcentajes de disminución de los primeros choques fueron menores y fué mayor el incremento en la altura de la contracción lograda por sucesivos choques.

En presencia de bacitracina por el contrario se observó que las disminuciones de la altura de la contracción fueron mayores con los primeros choques y cuando el número de choques fueron de un total de 8 nunca se obtuvieron incrementos de la altura de la contracción, si no que siempre se lograron aboliciones parciales, las cuales fueron más acentuadas a los 2 minutos de finalizar el choque.

En presencia de atropina o de clorfeniramina también disminuyó la altura de la contracción a 0,2 Hz después de cualquier choque. Con estos dos fármacos además se observó que después de cada choque la contracción a 0,2 Hz quedó prácticamente abolida y luego hubo una recuperación parcial.

Utilizando los valores del % de disminución de la altura de la contracción a 0,2 Hz de frecuencia después de 2 minutos de ocasionar los choques de frecuencia elevada, la diferencia fué significativa entre las preparaciones control y las de sucesivos choques en presencia de bacitracina, atropina y clorfeniramina ($P < 0,0025$, $P < 0,0005$ y $P < 0,0005$ respectivamente). Por el contrario, en el caso de la cafeína la diferencia no fué significativa ($P > 0,10$).

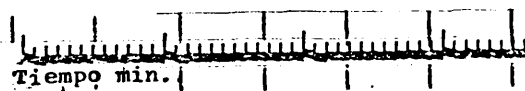
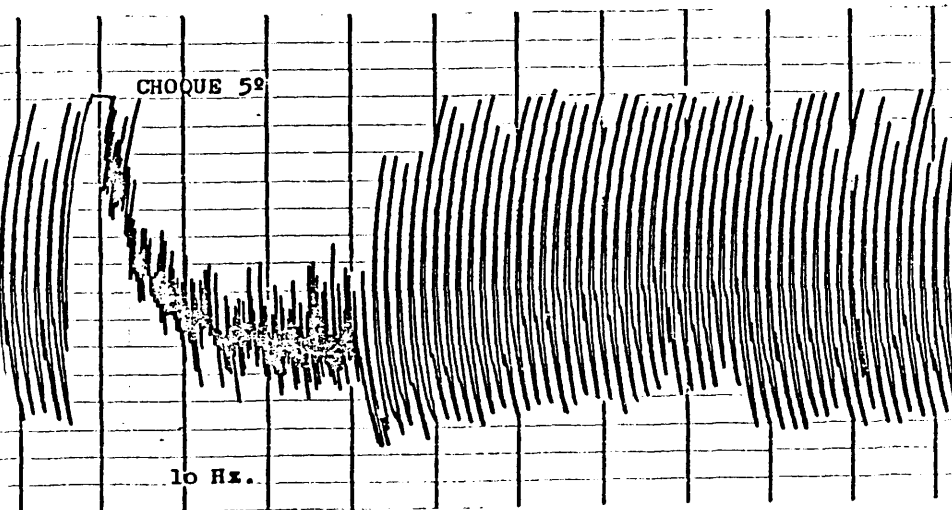
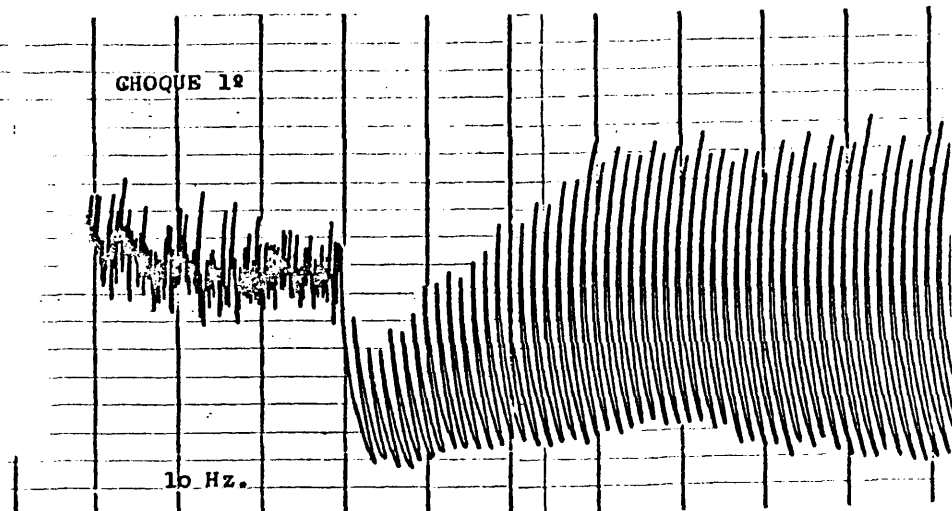
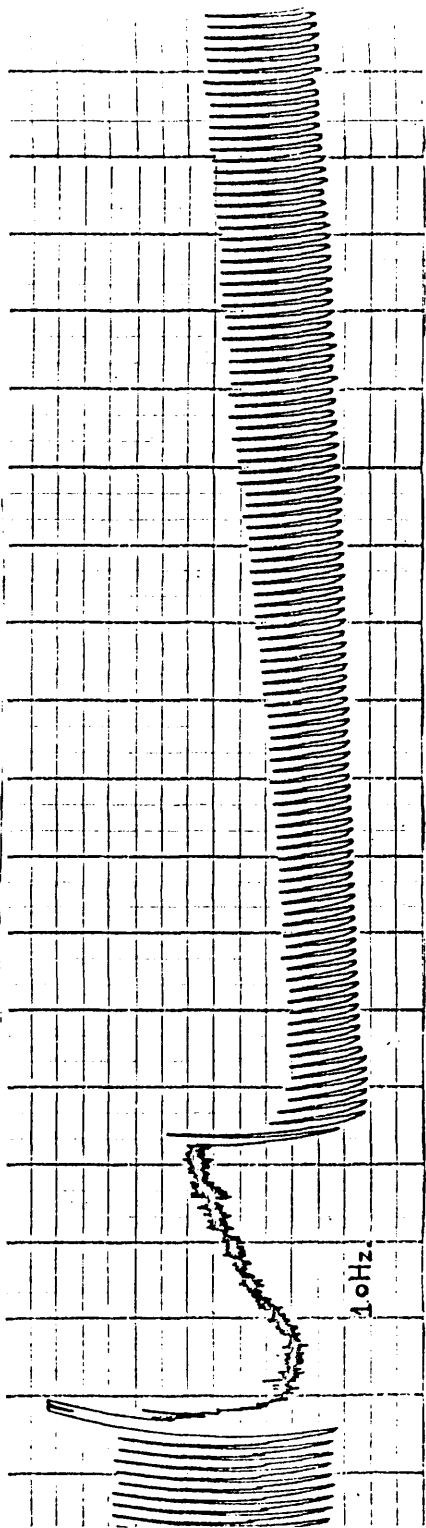


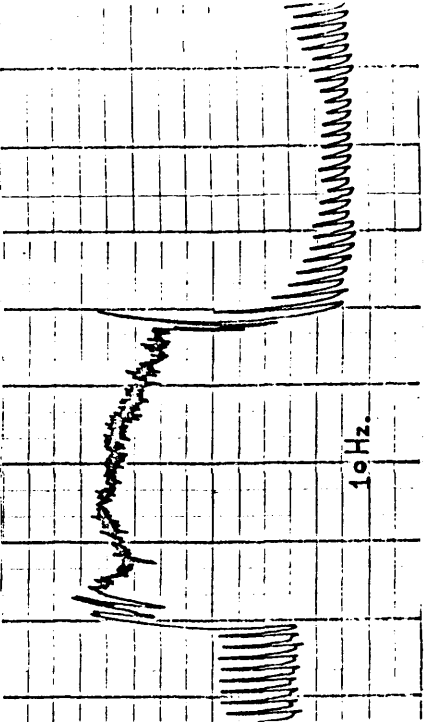
Figura 40

Figura 41

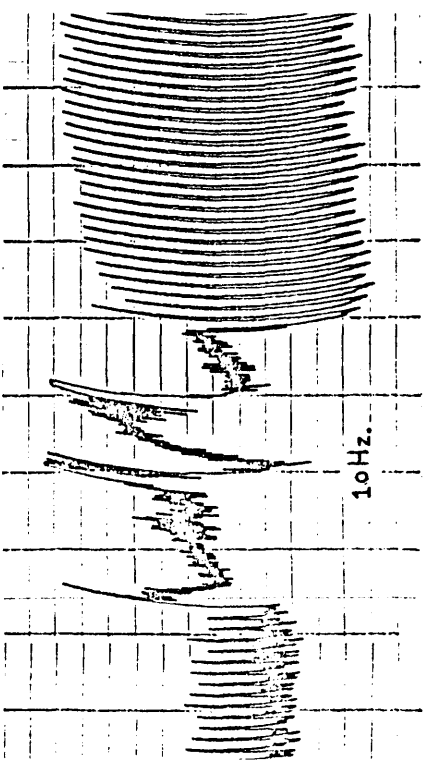
CHOQUE 1º en presencia de BACITRACINA



CHOQUE 5º en presencia de BACITRACINA



CHOQUE 5º CONTROL



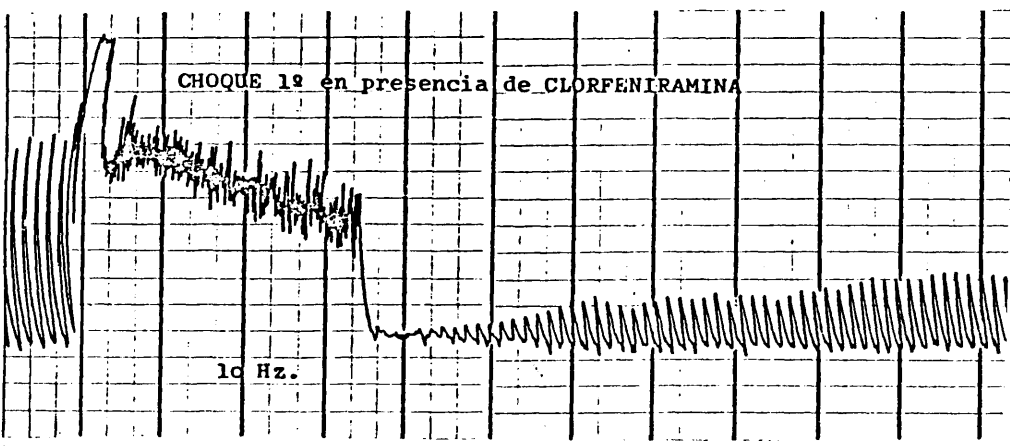
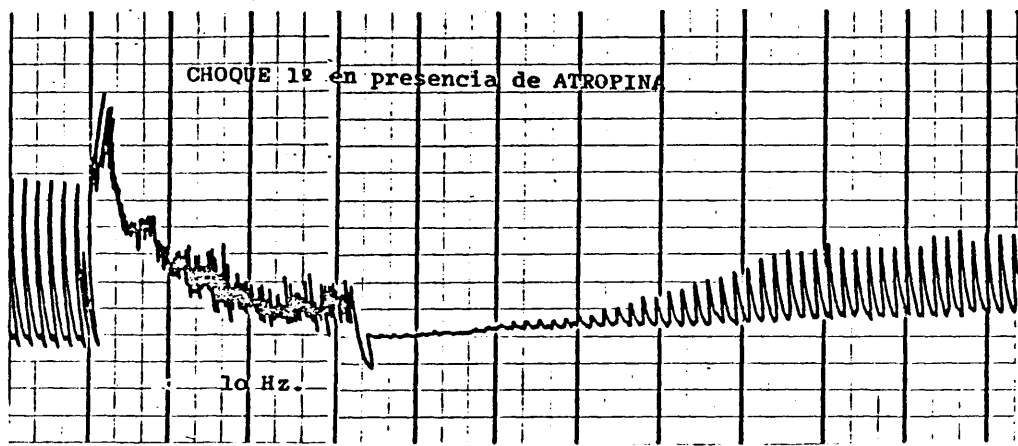
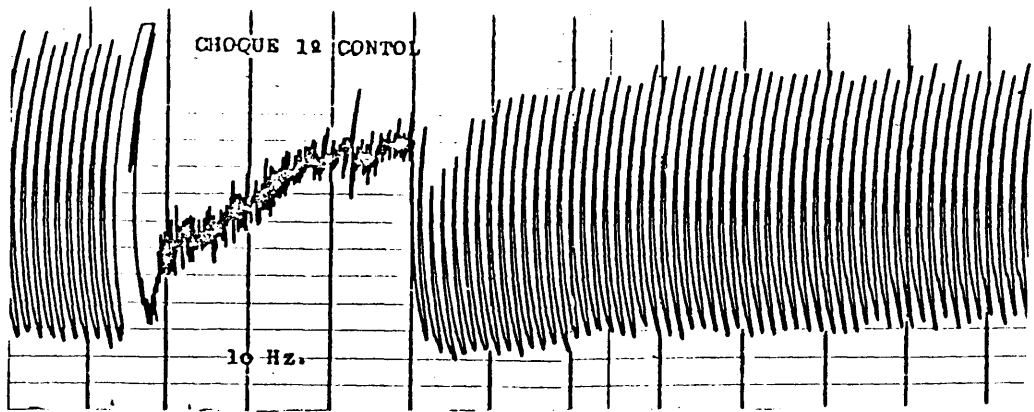


Figura 42

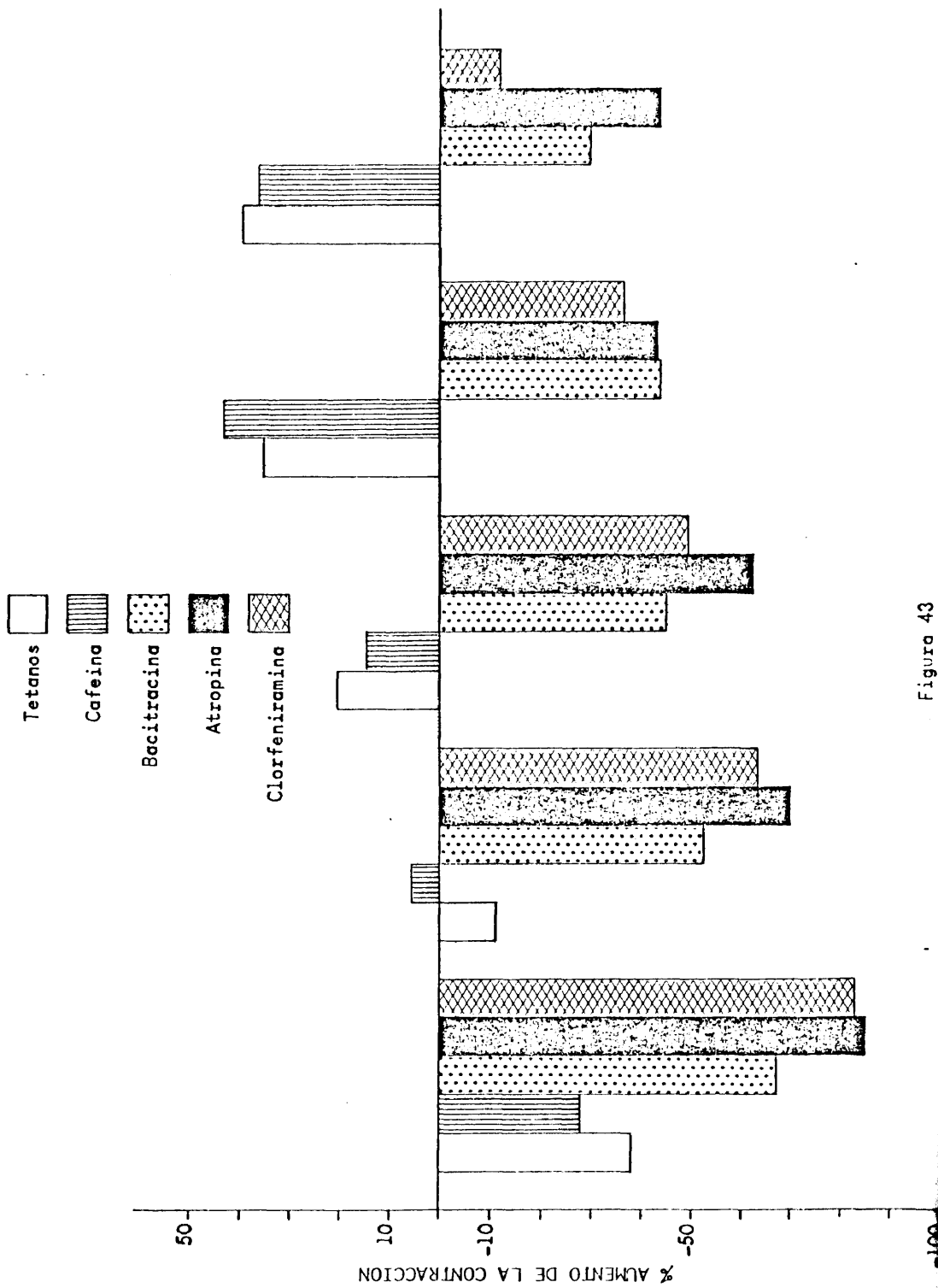


Figura 43

5. Respuestas de los morfinomiméticos en presencia de bacitracina.

Se observa el % de disminución de la altura de la contracción lograda con una dosis determinada de morfina en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supraximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el % de disminución de la altura de la contracción de la misma preparación con esa misma dosis de morfina en presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina.

TABLA 25

Ensayo	Dosis Molar de morfina	Control del % de disminución	% de aumento con bacitracina	% de disminución en presencia de bacitracina
I	$4 \cdot 10^{-7}$	52	4	65
II	$2 \cdot 10^{-7}$	69	-28	74
III	$4 \cdot 10^{-8}$	46	- 2	41
IV	$6 \cdot 10^{-8}$	36	0	39
V	$8 \cdot 10^{-8}$	51	0	42
VI	$8 \cdot 10^{-8}$	31	2	11
VII	$2 \cdot 10^{-7}$	27	0	37
VIII	$2 \cdot 10^{-7}$	50	-3	54

(Vease figura 44).

Morfina
 Morfina trds bacitracina $2,5 \cdot 10^{-4} M$

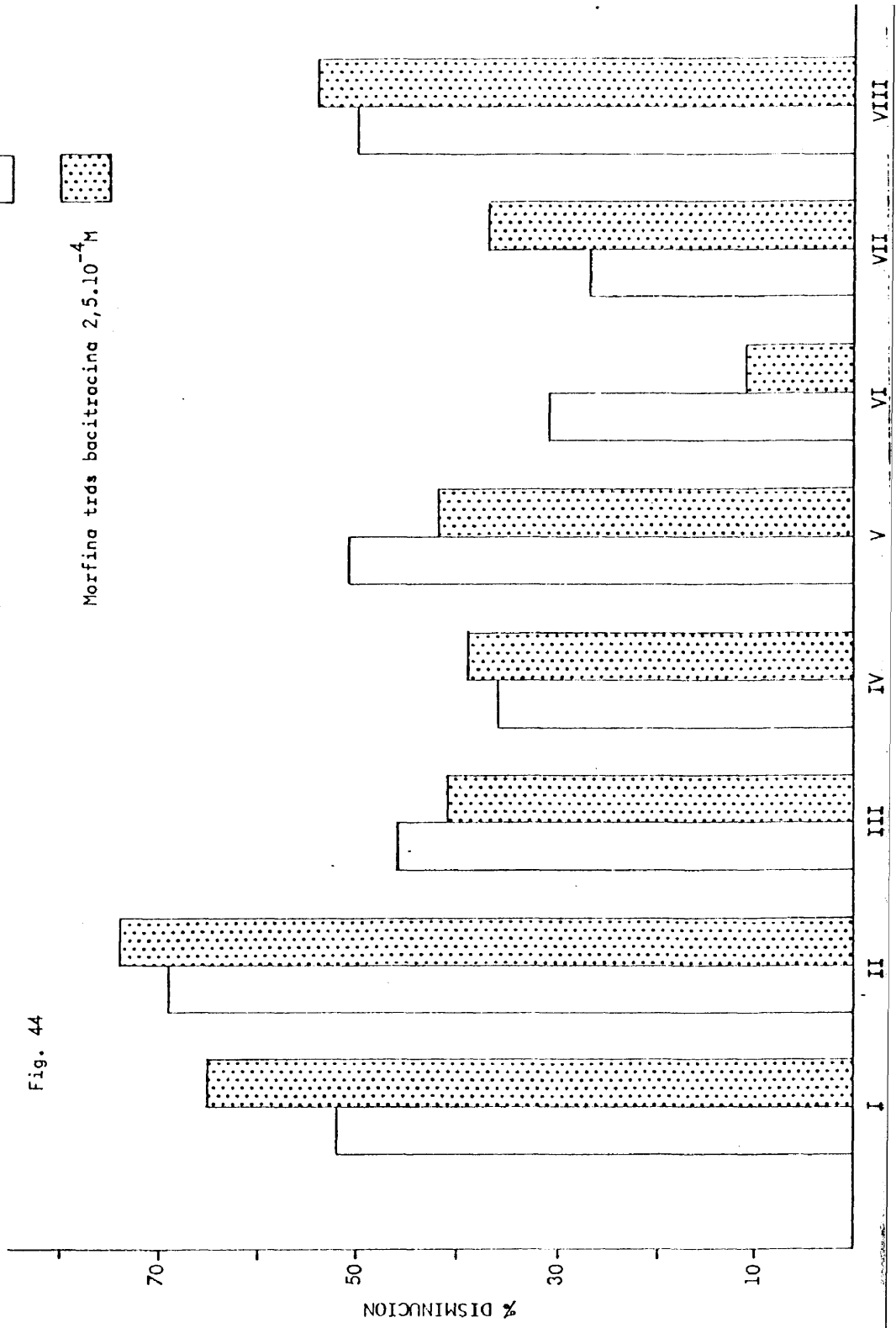


Fig. 44

Se observa el % de disminución de la altura de la contracción logrado con una dosis determinada de metadona en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el % de disminución de la altura de la contracción de la misma preparación con esa misma dosis de metadona en presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina.

TABLA 26

Ensayo	Dosis Molar de Metadona	Control del % de disminución	% de aumento con bacitracina	% de disminución en presencia de bacitracina
I	$8,1 \cdot 10^{-8}$	40	21	32
II	$6,9 \cdot 10^{-8}$	48	11	56
III	$5,6 \cdot 10^{-8}$	48	2	46
IV	$1,2 \cdot 10^{-7}$	49	-2	30
V	$1,2 \cdot 10^{-7}$	54	5	42
VI	$1,6 \cdot 10^{-7}$	65	9	60
VII	$5,6 \cdot 10^{-8}$	39	3	43
VIII	$1,9 \cdot 10^{-7}$	33	37	33

(Ver figura 45)

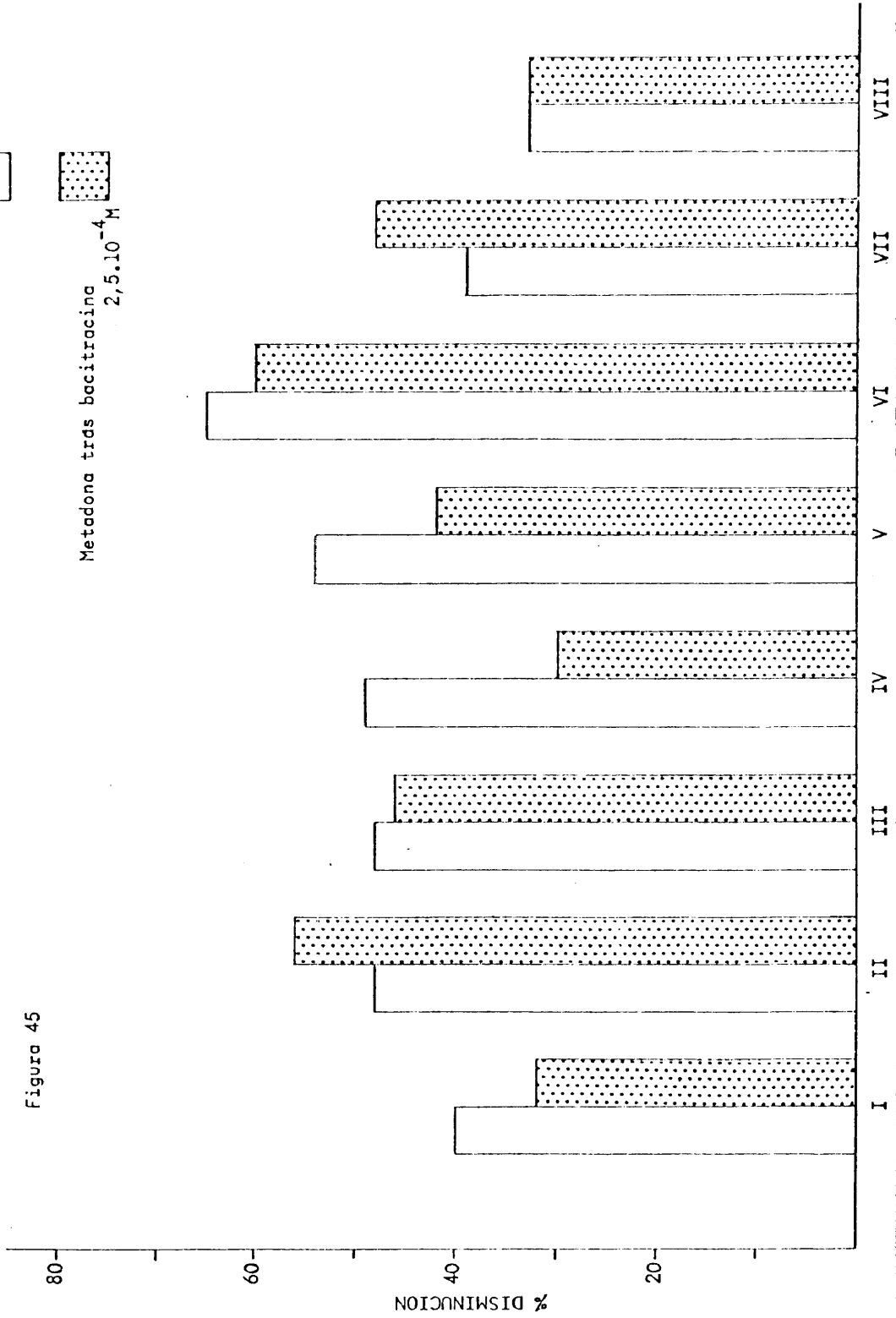


Metadona



Metadona tras bacitracina
 $2,5 \cdot 10^{-4} M$

Figura 45



Síntesis de resultados.-

En la preparación de ileon de cobaya estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración los analgésicos se comportan igual en presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina que sin ella, de tal forma que la disminución de la altura de la contracción que una dosis determinada de analgésico ocasiona unas veces resulta mayor y otras menor en presencia de bacitracina respecto a su control correspondiente sin bacitracina. La diferencia entre el % control de disminución de la altura de la contracción del analgésico, y la disminución de la altura de la contracción del analgésico en presencia de bacitracina, no fué significativa ($P > 0,475$ para morfina y $P > 0,15$ para metadona).

La concentración utilizada de bacitracina no parece tener un efecto concreto sobre la respuesta contráctil pero en algunas preparaciones modificó ligeramente la altura de la contracción.

6. Adicción.

a) Curvas dosis-respuesta.-

Los resultados con morfina en ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos inyectados con 100 mg/kg

de sulfato de morfina diariamente durante 14 días fueron:

TABLA 27

Número de ensayos realizados = 7

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$3,1 \cdot 10^{-8}$	1,14	1,29
$9,3 \cdot 10^{-8}$	1,14	1,90
$2,1 \cdot 10^{-7}$	8,71	2,69
$2,7 \cdot 10^{-7}$	15	3,73
$3,9 \cdot 10^{-7}$	18,85	5,64
$6,4 \cdot 10^{-7}$	26,57	7,53
$1,1 \cdot 10^{-6}$	39,14	10,13
$2,1 \cdot 10^{-6}$	51,85	10,45
$3,1 \cdot 10^{-6}$	63,23	9,21

(Ver figura 46).

Los resultados con morfina en ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos no tratados con sulfato de morfina, pero pertenecientes al mismo lote que los tratados fueron:

TABLA 28

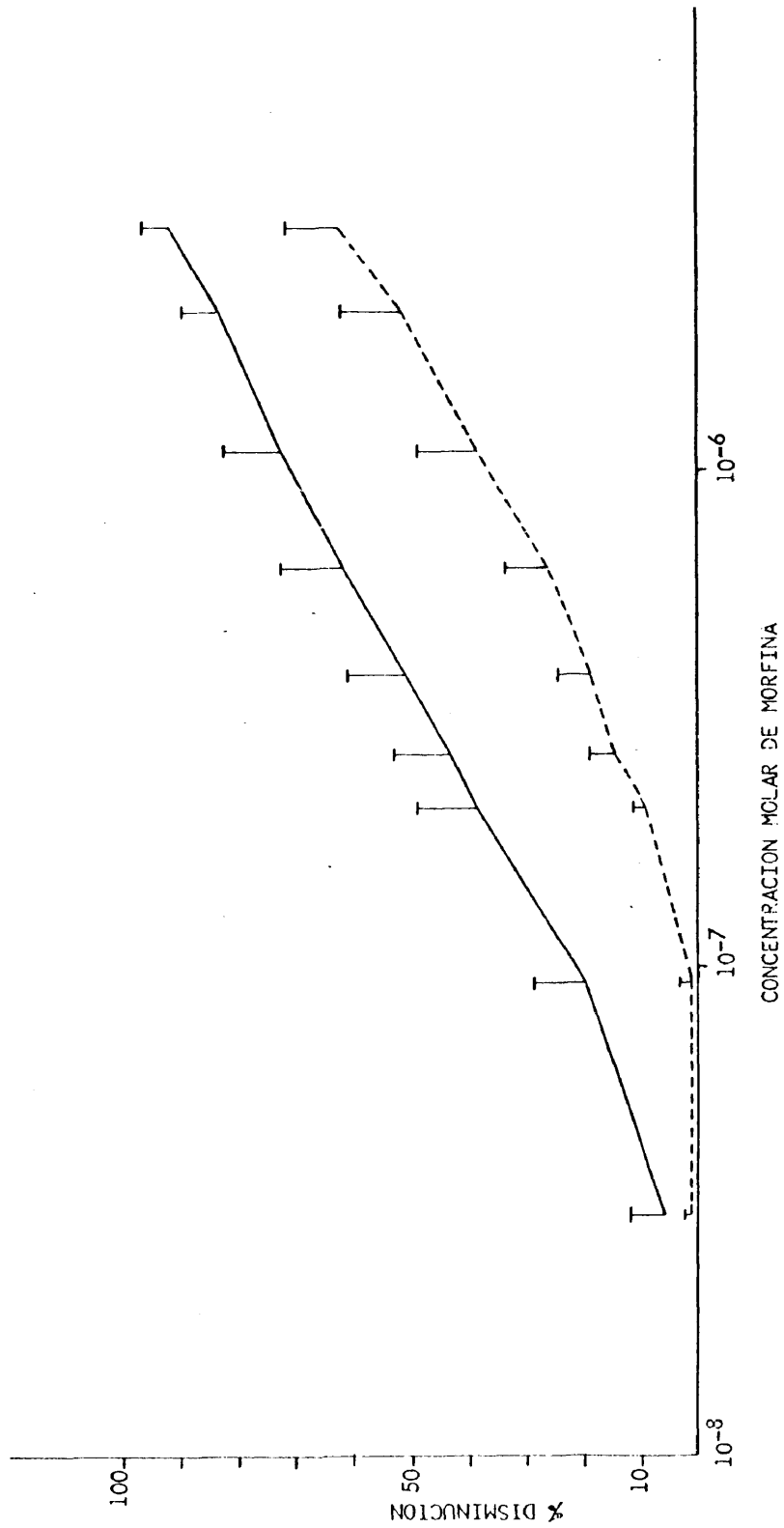
Número de ensayos realizados = 7

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$3,1 \cdot 10^{-8}$	5,7	6,11
$9,3 \cdot 10^{-8}$	20,14	9,38
$2,1 \cdot 10^{-7}$	39,14	10,13
$2,7 \cdot 10^{-7}$	43,57	9,82
$3,9 \cdot 10^{-7}$	51,28	10,19
$6,4 \cdot 10^{-7}$	62,28	10,67
$1,1 \cdot 10^{-6}$	72,71	9,64
$2,1 \cdot 10^{-6}$	84	6,26
$3,1 \cdot 10^{-6}$	92,57	4,79

(Ver figura 46).

Controles DI_{50} Controles = $3,7 \cdot 10^{-7}$
 Adictos Morfina DI_{50} Adictos = $1,9 \cdot 10^{-6}$

Figura 46



b) Control de pesos.-

Tabla de los % de disminución del peso de cobayos en-
laulados inyectados diariamente con 100 mg/Kg de sulfato de mor-
fina durante 13 días.

TABLA 29

Número de cobayos utilizados = 5

Días inyectados con morfina	Media del % de disminu- ción de peso	Error Standard
1	6,66	1,25
2	9,38	1,30
3	10,98	1,81
4	10,58	1,63
5	11,56	2,11
6	12,08	2,06
7	12,60	2,19
8	13,80	2,67
9	13,66	2,88
10	13,44	3,38
11	14,12	2,59
12	13,54	2,79
13	13,28	2,14

(Ver figura 47).

Tabla de las % de disminución del peso de cobayos libres inyectados diariamente con 100 mg/Kg de sulfato de morfina durante 13 días.

TABLA 30

Número de cobayos utilizados = 5

Días inyectados con morfina	Media del % de disminución de peso	Error Standard
1	3,84	0,72
2	4,52	0,54
3	5,32	0,85
4	5,60	1,24
5	4,18	1,12
6	3,53	1,42
7	3	1,47
8	2,64	1,49
9	2,10	1,96
10	3,60	1,69
11	2,08	1,45
12	3,22	1,65
13	1,23	1,70

(Ver figura 47).

Tabla de los % de disminución del peso de cobayos en-
 jaulados inyectados diariamente con 1 c.c. de suero fisiológico
 durante 13 días.

TABLA 31

Número de cobayos utilizados = 5

Días inyectados con suero	Media del % de disminu- ción de peso	Error Standard
1	5,30	1,95
2	1,74	1,58
3	2,36	1,77
4	1,26	1,78
5	1,64	0,88
6	1,48	1,14
7	1,44	1
8	1,56	0,89
9	0,26	1,66
10	1,08	0,85
11	-0,10	1,90
12	-1,62	2,08
13	-2,42	2,42

(Ver figura 47)

Tabla de los % de disminución del peso de cobayos libres inyectados diariamente con 1 c.c. de suero fisiológico durante 13 días.

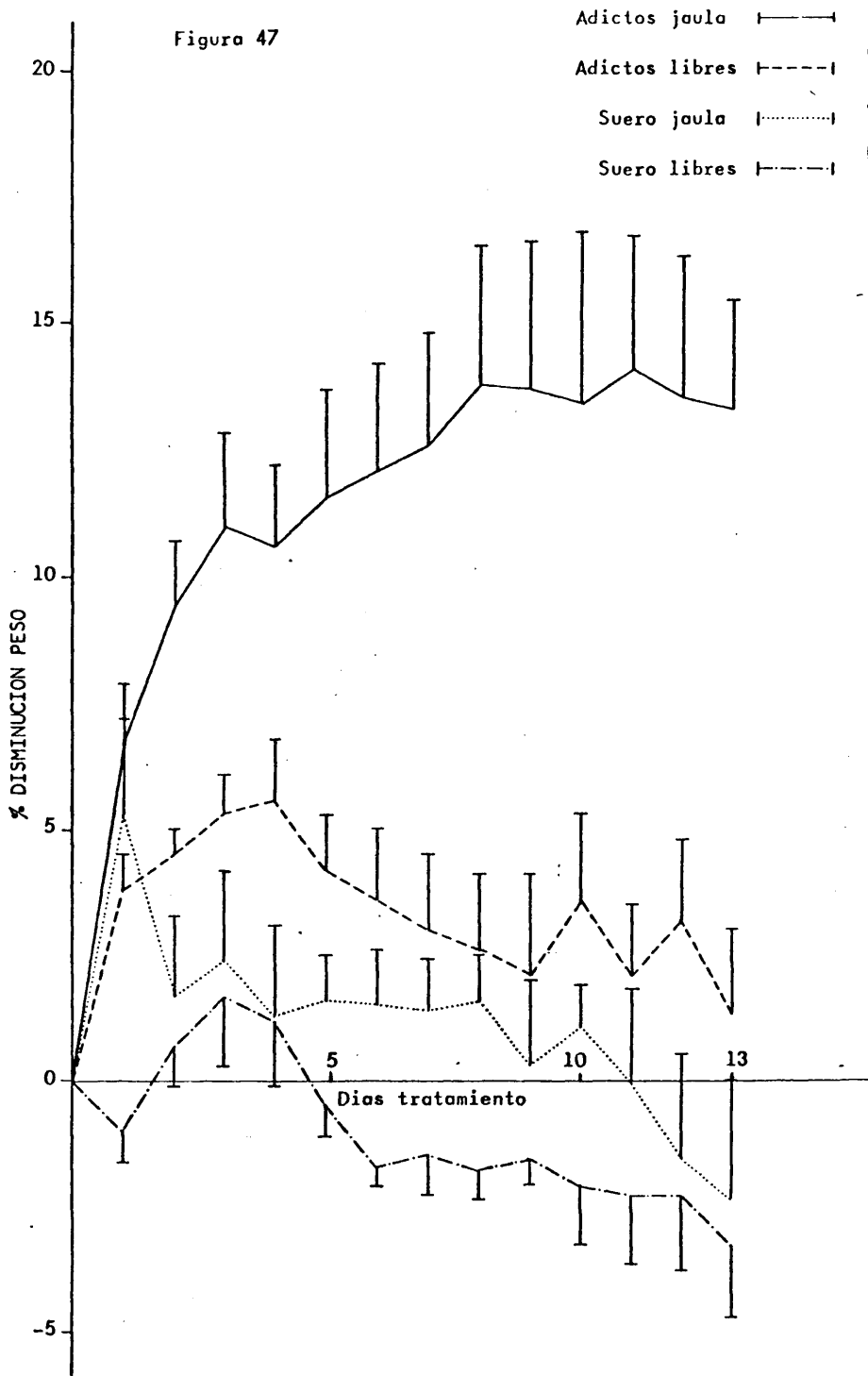
TABLA 32

Número de cobayos utilizados = 5

Días inyectados con suero	Media del % de disminución de peso	Error Standard
1	-1	0,58
2	0,68	0,84
3	1,70	1,43
4	1,18	1,29
5	-0,36	0,70
6	-1,72	0,41
7	-1,54	0,76
8	-1,78	0,61
9	-1,64	0,55
10	-2,06	1,25
11	-2,28	1,37
12	-2,32	1,48
13	-3,32	1,45

(Ver figura 47).

Figura 47



c) Choques de frecuencia elevada en adictos.-

Para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos tratados durante 14 días con inyecciones diarias de 1 c.c. de suero fisiológico, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos de haber finalizado.

(Tabla 33).

TABLA 33

Número de ensayos realizados = 6

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	56,83	4,33	36,67	6,24	13,67	6,53
2º	56,50	5,91	27	5,54	3,50	4,80
3º	50,17	5,66	23,83	7,55	-2,67	8,39

Para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos tratados durante 3 días con inyecciones diarias de 100 mg/kg de sulfato de morfina, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos de haber finalizado. (Tabla 34)

TABLA 34

Número de ensayos realizados = 6

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	50,83	8,21	42,17	9,71	17	6,84
2º	42,50	4,60	31,67	6,79	20,33	8,08
3º	33,17	5,37	22,83	8,10	24,83	8,79

Para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos tratados durante 14 días con inyecciones diarias de 100 mg/kg de sulfato de morfina, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos de haber finalizado.(Tabla 35).

TABLA 35

Número de ensayos realizados = 8

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	49,50	9,28	34,37	7,94	13,25	4,80
2º	42,75	11,23	24,62	8,01	-2,62	4,91
3º	45,37	12,22	33,12	11,14	8,12	3,09

En presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina, para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos tratados durante 14 días con inyecciones diarias de 100 mg/kg de sulfato de morfina, por sucesivos periodos de 5 minutos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos de haber finalizado. (Tabla 36).

TABLA 36

Número de ensayos realizados = 7

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	69,14	11,61	58,71	13,97	18,28	8,33
2º	49,57	9,36	36,43	9,72	-3,28	6,79
3º	45,71	8,06	32,57	9,34	0,86	8,97

En presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4} M$ de bacitracina, para los resultados de los porcentajes de variación de la altura de la contracción de ileon estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, de cobayos no tratados con sulfato de morfina pero pertenecientes al mismo lote que los tratados, por sucesivos periodos de estimulación con 10 Hz se tomaron referencias: a) nada más finalizar el choque, b) a los 2 minutos de finalizar, c) a los 10 minutos de haber finalizado (Tabla 37).

TABLA 37

Número de ensayos realizados = 6

Nº de choque	\bar{x} del % de disminución a los 0'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 2'	Error Standard	\bar{x} del % de disminución a los 10'	Error Standard
1º	82,83	12,75	73,67	15,37	42,33	9,85
2º	78,17	12,02	62,67	16,01	-0,17	13,97
3º	85,17	8,41	60	14,90	-20,33	16,50

Síntesis de resultados.-

Para la morfina la DI_{50} de la altura de la contracción de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, cuando los animales habían sido tratados durante 14 días con inyecciones diarias de 100 mg/kg de sulfato de morfina, resultó 5 veces mayor aproximadamente a la DI_{50} cuando los animales no habían sido tratados. La diferencia entre el % de disminución de la altura de la contracción del ileon de cobayos tratados durante 14 días con morfina, y el % de disminución de la altura de la contracción del ileon de cobayos sin tratar, fué significativa ($P < 0,0005$), en las curvas dosis-respuesta con morfina.

El control diario de pesos de los animales nos permitió observar mayores pérdidas por parte de los animales tratados que coincidió con una menor ingestión de alimento, que pudimos observar en los que permanecieron en jaulas. El control mostró en los animales tratados en todo momento también mayores pérdidas para los animales enjaulados que para los que permanecieron en libertad. Por otra parte en los enjaulados tratados la pérdida fué progresiva durante todo el periodo de tratamiento y en los libres tratados hubo una pérdida los primeros días seguida de una recuperación parcial sin llegar a alcanzar el peso primitivo. Pudimos observar también que los animales tratados con morfina sufrían pérdida de peso durante el periodo de tratamiento. Todos los animales inyectados solo con suero fisiológico perdieron tam-

bién algo de peso los primeros días. En éste caso los animales enjaulados después de la fase de pérdida estabilizaron su peso durante algunos días por debajo del valor primitivo anterior a las inyecciones, y a continuación comenzaron a engordar hasta llegar a recuperarlo. Los animales libres lo recuperaron rápidamente y a continuación siguieron engordando hasta finalizar los 13 días del control de pesos. Entre los animales adictos enjaulados y los controles enjaulados la diferencia en el control de pesos fué significativa ($P < 0,0005$). Entre los animales adictos libres y los controles libres la diferencia en el control de pesos fué significativa ($P < 0,0005$). Entre los animales adictos enjaulados y los animales adictos libres la diferencia en el control de pesos fué significativa ($P < 0,0005$). Entre los controles enjaulados y los controles libres la diferencia en el control de pesos fué significativa ($P < 0,0005$).

Utilizando los valores del % de disminución de la altura de la contracción a 0,2 Hz de frecuencia después de 2 minutos de ocasionar sucesivos choques de frecuencia elevada, la diferencia no fué significativa entre las preparaciones de ileon de cobayos tratados durante 3 días y durante 14 días con inyecciones diarias de sulfato de morfina, respecto a las preparaciones de ileon de cobayos tratados durante 14 días con inyecciones diarias de suero fisiológico ($P > 0,10$ y $P > 0,35$ respectivamente). La diferencia fué significativa entre las preparaciones de ileon de cobayos tratados durante 14 días con inyecciones diarias de sulfato de morfina en presencia de bacitracina, y las preparacio-

nes de ileon de cobayos no tratados en presencia de bacitracina (P < 0,025).

7. Curva dosis-respuesta con AIPc. Respuesta de AIPc en presencia de propranolol.

Los resultados con AIPc en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron:

TABLA 38

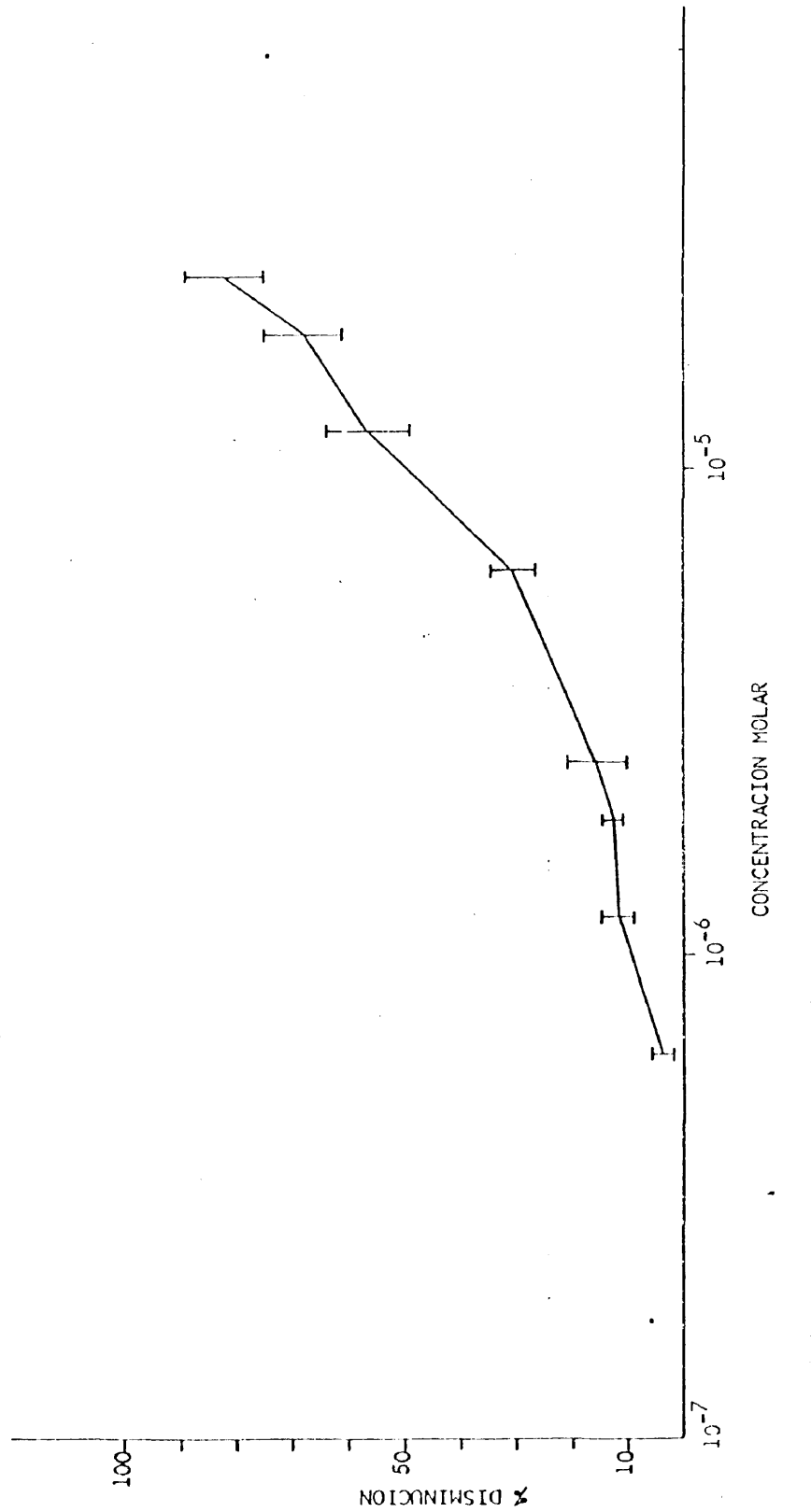
Número de ensayos realizados = 5

Concentración Molar	Media del % de disminución de la contracción	Error Standard
$6,2 \cdot 10^{-7}$	3,80	1,96
$1,2 \cdot 10^{-6}$	11,80	3,29
$1,9 \cdot 10^{-6}$	13	2,28
$2,5 \cdot 10^{-6}$	15,30	5,49
$6,2 \cdot 10^{-6}$	31,20	4,32
$1,2 \cdot 10^{-5}$	57,20	7,49
$1,9 \cdot 10^{-5}$	63,40	6,90
$2,5 \cdot 10^{-5}$	82,40	7,21

(Ver figura 48).

DI₅₀ = 10⁻⁵

Fig. 48.- Curva dosis-respuesta con AMPc frente a estímulo simple. En barras el error estandard de la medic.



Se puede observar la diferencia entre el % de disminución de la altura de la contracción logrado con una dosis determinada de AMPc en ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el % de disminución de la altura de la contracción de la misma preparación con esa dosis de AMPc en presencia de la concentración $1,25 \cdot 10^{-5} M$ de propranolol.

TABLA 39

Dosis Molar de AMPc	Control del % de disminución	% de disminución con propranolol	% de disminución en presencia de propranolol	Diferencia con el % del control
$1,9 \cdot 10^{-6}$	59	59	77	18
$1,9 \cdot 10^{-5}$	33	9	75	42
$6,2 \cdot 10^{-6}$	43	11	56	13
$2,5 \cdot 10^{-5}$	36	8	58	22
$1,2 \cdot 10^{-5}$	32	8	76	44

(Ver figuras 49 y 50).

Síntesis de resultados.-

En la curva dosis-respuesta para el AMPc en ileon de cobayo estimulado con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de

frecuencia y 2 milisegundos de duración la DI_{50} extrapolada fue 10^{-5} M. Se observó también que la disminución de la altura de la contracción que causa el AIPc fue mayor en presencia de la concentración $1,25 \cdot 10^{-5}$ M de propranolol. La diferencia en la disminución causada por AIPc en la altura de la contracción con y sin propranolol fue significativa ($P < 0,01$).

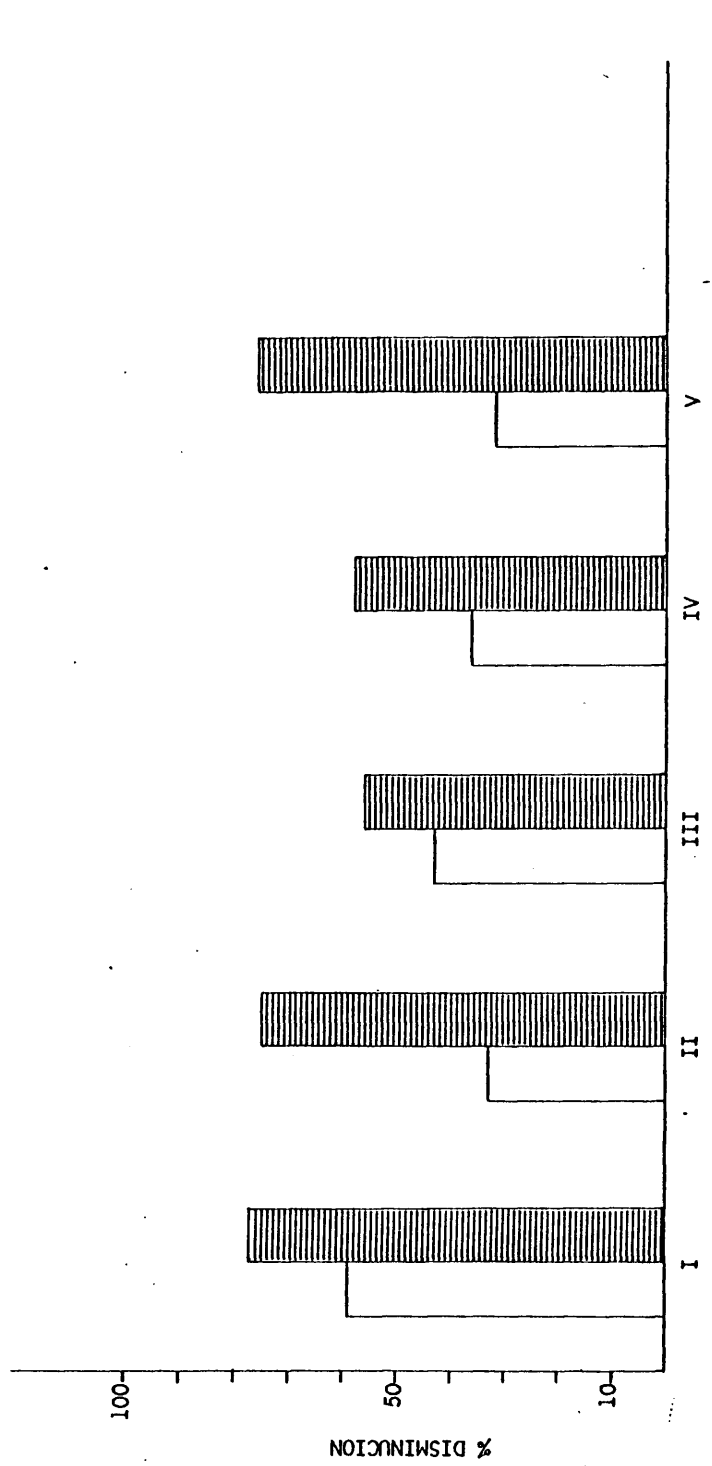


AMPc



AMPc tras propranolol $1,25.0^{-5} M$

Figura 49



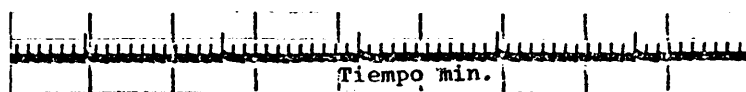
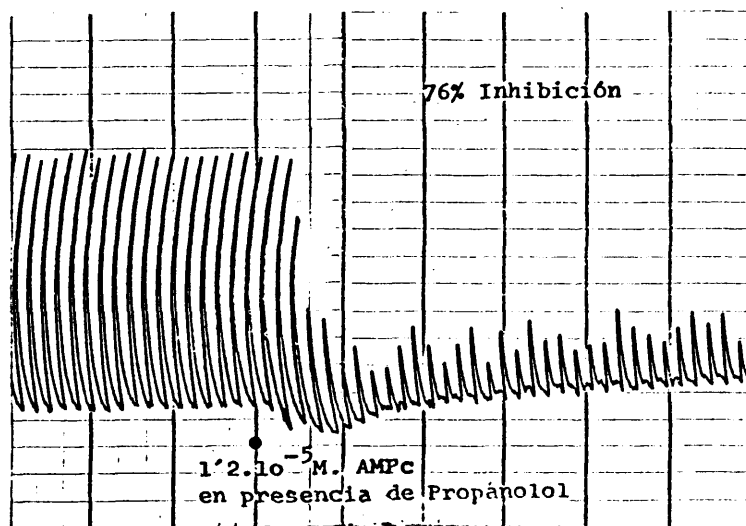
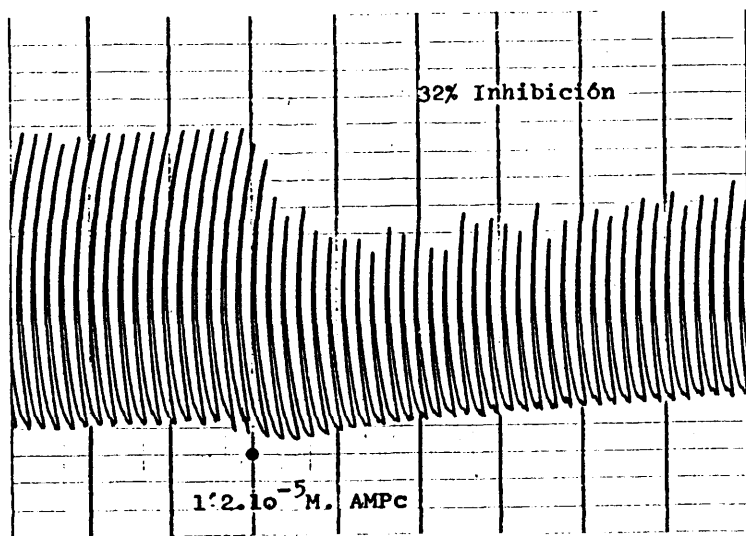


Figura 50

DISCUSSION

Curvas dosis-respuesta con estímulo simple.

Las DI_{50} obtenidas para los diversos morfinomiméticos en la preparación de ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración fueron relativamente correlacionables con el orden de actividad analgésica y con el orden de actividad de otros parámetros hallados en otras preparaciones y tests, por lo que esta preparación también sería adecuada para su estudio. Las relaciones entre la actividad de estos fármacos in vivo vienen condicionadas por interferencias farmacocinéticas y de comportamiento (HEINRICH, 1971; SNYDER, 1977), por lo que fué un tanto diferente la relación encontrada en los ensayos de unión a receptores y en los ensayos de actividad in vitro (KOSTERLITZ y WATERFIELD, 1976). Observemos en la siguiente tabla como los fármacos para los que hemos encontrado menores DI_{50} en nuestra preparación son aquellos a los que se les ha atribuido una mayor actividad analgésica en relación con la que posee la morfina (Tabla 40 y Figura 2C).

TABLA 40

Analgésico utilizado	Actividad analgésica (Florez, 1975; SNYDER, 1977)	DI ₅₀ en el ileon completo
Morfina	Patrón	3.10 ⁻⁷ M
Codeína	20% de la de morfina	31 veces la de Morfina
Levorfanol	En el mismo rango	Similar a Morfina
Metadona	Ligeramente superior	1/10 de la de Morfina
Fentanyl	100-1000 veces más	1/42 de la de Morfina
Etorfina	6000 veces más	1/1000 de la de Morfina

Podemos observar además la correlación que hay entre nuestros resultados y los obtenidos en la preparación de fibras longitudinales aisladas del ileon de cobayo, estimulado en condiciones similares a las utilizadas en el ileon completo con estímulo simple. En nuestra preparación las dosis son siempre algo menores. Similar es la relación encontrada por KOSTERLITZ entre las DI₅₀ en estas dos preparaciones (KOSTERLITZ y cols. 1972). (Tabla 41 y Tabla 42).

TABLA 41

Analgesico utilizado	DI ₅₀ en fibra longitudinal (MARTIN, 1978)
Morfina	2,1.10 ⁻⁶ M
Codeína	2,7.10 ⁻⁵ M
Levorfanol	6.10 ⁻⁶ M
Metadona	2,4.10 ⁻⁶ M
Fentanyl	1,7.10 ⁻⁸ M
Etorfina	7,4.10 ⁻⁹ M

TABLA 42

Analgesico utilizado	DI ₅₀ en el ileon completo	Relación de potencia DI ₅₀ morfina/DI ₅₀ analgesico
Morfina	3.10 ⁻⁷ M	1
Codeína	9,3.10 ⁻⁶ M	0,03
Levorfanol	2,2.10 ⁻⁷ M	1,36
Metadona	3,1.10 ⁻⁸ M	9,68
Fentanyl	7,1.10 ⁻⁹ M	42,25
Etorfina	2,9.10 ⁻¹⁰ M	1.034,48

Las diferencias en relación a los datos de KOSTERLITZ y de otros autores se deben fundamentalmente a que nosotros hemos hecho curvas dosis-respuesta acumulativas en nuestros ensayos. Así KOSTERLITZ obtiene una DI₅₀ para la morfina en el ileon completo de 56,8 ± 5,8 nM y de 63 ± 6,4 nM; y en la preparación de fibras longitudinales obtiene para la morfina una DI₅₀ =

77 \pm 14,6 nM (KOSTERLITZ y cols. 1972). De igual forma podemos observar que las DI_{50} para codeino, levorfanol, fentanyl y etorfina son igualmente muy inferiores en los trabajos de KOSTERLITZ (KOSTERLITZ y WATT, 1968; KOSTERLITZ y cols. 1972) comparandolas con las obtenidas por nosotros. En nuestros ensayos las primeras dosis previenen el efecto de las últimas, que administradas en dosis única individual tendrían un efecto mayor. Este fenómeno de taquifilaxia a los morfínomiméticos que hemos observado es similar al descrito por HEIMANS en 1975 para la morfina, y ya KOSTERLITZ afirmó que cuando el intervalo entre las exposiciones a morfina es menor de 10 minutos sus efectos inhibitorios en el ileon se reducen mucho (LEES y cols. 1972). También se pudo apreciar el desigual grado en la velocidad de actividad entre los morfínomiméticos estudiados; que fué más acentuada en unos que en otros (Fig. 19 y Fig. 21). Esto viene expresado por la pendiente de la recta (Tabla 43). Igualmente con algunos de los fármacos empleados en las curvas dosis-respuesta con estímulo simple se alcanzó la fase de meseta sin llegar a obtener altos porcentajes de inhibición de la contracción (Tabla 43 y Fig. 19). Esto confirma la teoría expuesta por COWIE y sus colaboradores en 1970 sobre la existencia en ileon de cobayo de los morfínomiméticos de dos componentes: agonista y antagonista. Estos fármacos sin embargo pueden presentar una alta actividad intrínseca como indican sus pequeñas DI_{50} y éste es el caso de la etorfina y el levorfanol en los que precisamente encontramos un comportamiento como si fueran agonistas parciales por lo que son pequeños los valores más-

ximos de inhibición cuando son administrados en dosis acumulativas. Esta apreciación coincide con las determinaciones de SNYDER que clasifica a la etorfina y al levorfanol entre los opiáceos con fuerte carácter antagonista por su pequeño índice de sodio (SNYDER, 1977) (Fig. 4).

TABLA 43

Analgésico	Pendiente	% Máxima de inhibición
Fentanilo	77,2227	96
Metadona	108,085	90
Codeína	56,4749	80
Morfina	38,4740	79
Etorfina	48,3680	74
Levorfanol	28,4223	53

Con arreglo a los estudios de ANDEN (1976) creemos que con los morfínomiméticos puede acontecer lo mismo observado con otros fármacos que ejercen una acción dual: una ejercida en receptores presinápticos con disminución de liberación de encefalinas de la neurona encefalinérgica (componente élgico?) y otra en receptores presinápticos de la neurona efectora con bloqueo en la liberación del neurotransmisor excitador. El esquema que proponemos (fig. 51) resultaría compatible con el pensador de SNYDER y nos explica el feed-back negativo en la liberación de encefalinas observado tras la administración de morfina continuamente.

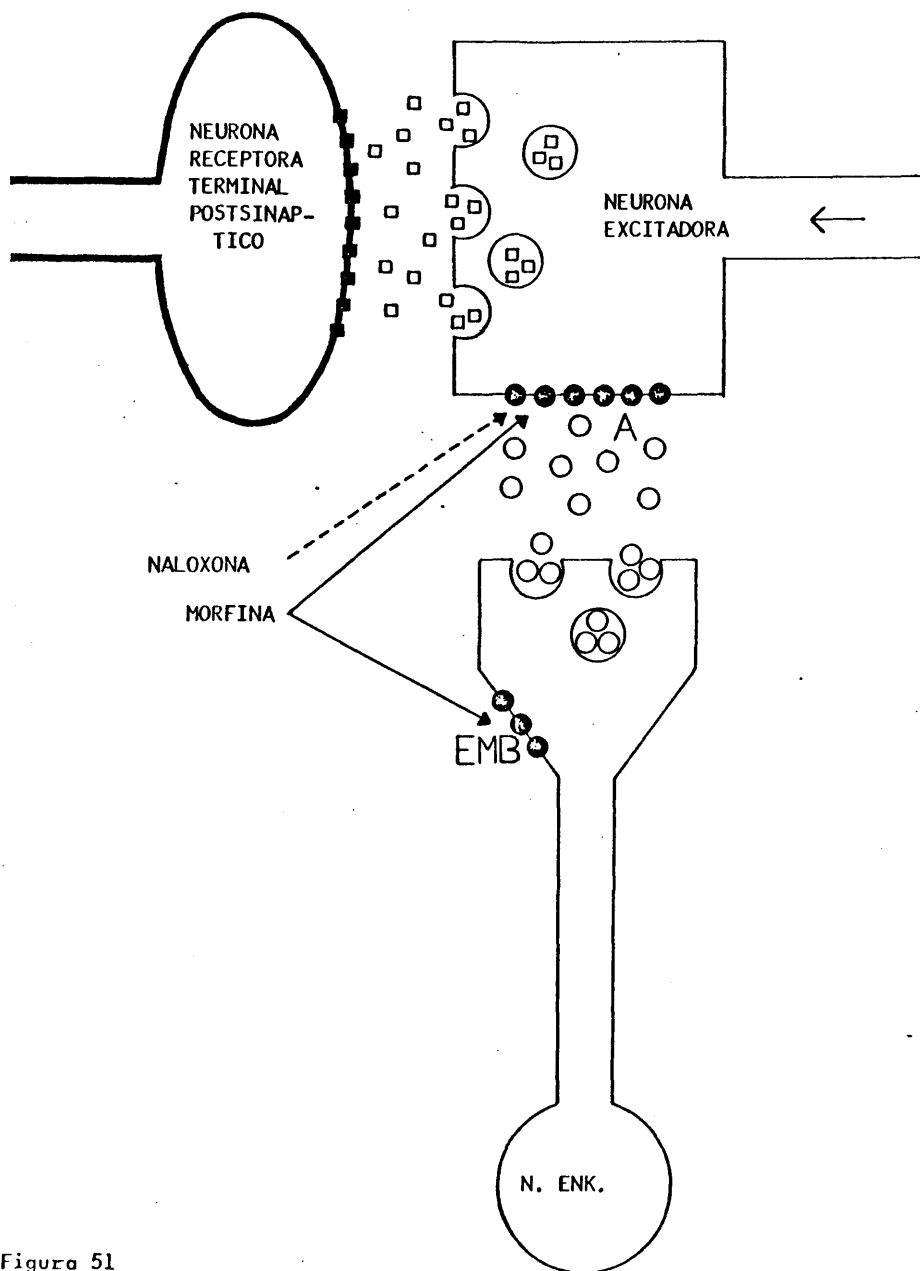


Figura 51

Fig. 51.- En este esquema estan representados: 1) Un terminal axónico presináptico de una neurona excitadora, un espacio intersináptico y un terminal postsináptico de una neurona efectora. 2) Una neurona encefalinérgica con su soma y su terminación axónica, la cual en contacto axon-axon entra en conexión con la neurona excitadora.

La morfina según JACQUET (1978) tendría dos componentes en su actividad cuando es administrada en inyección intraventricular cerebral o en la substancia gris periacueductal: 1) Efecto analgésico (A) y 2) un efecto de conducta motora explosiva (EMB). Esto se explica porque en el área presináptica (A) de la neurona excitadora existen receptores estereoespecíficos y naloxona-sensibles y son los que cuando interactúan las endorfinas provocan un estado de analgesia. Los receptores (EMB?)sitos en el terminal presináptico de la neurona encefalinérgica no son estereoespecíficos ni naloxona-sensibles. La morfina per se aún a pesar de su componente dual siempre hay en ella un predominio del receptor A sobre el receptor EMB y por ello solo da lugar en las condiciones apuntadas anteriormente al componente analgésico, y únicamente tras la administración de naloxona que bloquea específicamente A es cuando la morfina produce el efecto motor-explosivo.

Curvas dosis-respuesta con trenes de estímulo.

Cuando utilizamos trenes de estímulo en esta preparación no encontramos ninguna correlación entre el efecto de los diversos morfinomiméticos inhibiendo las contracciones producidas por este tipo de estimulación y su actividad analgésica descrita hasta el momento (figs. 27 y 29). Los resultados obtenidos con trenes de estímulo en la preparación de ileon completo con estímulo coaxial fueron paralelos a los resultados obtenidos en la preparación de fibras longitudinales (MARTIN, 1978). Para explicar estos resultados debemos tener presente que la liberación intestinal de Ach fué más alta a frecuencias bajas y cayó al incrementar la frecuencia (COWIE y cols. 1968; COWIE y cols. 1970); por otra parte la morfina redujo la liberación de Ach con una reducción mayor en reposo y con estimulación a bajas frecuencias que con estimulación a frecuencias mayores (PATON, 1957, PATON y ZAR, 1967; COWIE y cols. 1968; COWIE y cols. 1970). En 1978 COWIE y cols. comprueban nuevamente que en la preparación de fibras longitudinales-plexo mientérico a bajas frecuencias la liberación por pulso baja al aumentarla (0,017 Hz - 10 Hz). La liberación por minuto no se alteró con frecuencias menores a 0,5 Hz pero entre 5 y 10 Hz la liberación por minuto es menor al descender la frecuencia y esta relación ya se había estudiado en segmentos de ileon de cobayo estimulados a frecuencias entre 0,03 y 30 Hz (PATON, 1963). Además idénticas relaciones entre la liberación del neurotransmisor NA y la frecuencia de estimulación se obtuvieron en

las sinapsis sensibles al efecto específico de la morfina en el conducto deferente de ratón (HENDERSON y cols. 1972b) y en la membrana nictitante de gato tanto in vivo como in vitro (CARNIE y cols. 1961; HENDERSON y cols. 1975). Posiblemente la contracción causada por los trenes de estímulo con frecuencia de 10 Hz sea debida a la liberación de otros agentes además de Ach. En el plexo de Auerbach considerado como un mini-cerebro pudieran acontecer cambios análogos que en el S.N.C. con puesta en libertad de factores como: sustancia P, angiotensina, histamina, etc... Los trabajos de JACOB en 1978 establecen que los efectos de los morfomiméticos en S.N.C. son el resultado de funciones integradas entre endorfinas y otros neurotransmisores moduladores diversos como Ach, sustancia P, dopamina, glicina y GABA; por lo que su resultante es muy compleja. También existen evidencias de una mayor liberación de encefalinas al elevar la frecuencia de estimulación (PUIG y cols. 1977; SOSA y cols. 1978); liberación que por otra parte también se ha podido determinar con las frecuencias menores en algunas ocasiones (SCHULZ y cols. 1977). Aunque no podemos eliminar la posibilidad de que existan interrelaciones entre la liberación de encefalinas y la liberación de las otras sustancias, pensamos que el escaso número de pulsos que supone la estimulación cada minuto con trenes de 10 Hz y 5 segundos de duración utilizado en nuestra preparación (50 pulsos en total), no serían suficientes para liberar encefalinas que deprimiesen la contracción, pero sí otros factores contracturantes del intestino, los cuales cambiarían en parte los efectos depresores de

los morfinomiméticos. Desde luego dada la estructura polipeptídica de las encefalinas se ha querido ver una similitud en su localización y distribución con otros presuntos neurotransmisores de porte excitador como sustancia P y sobre todo el tridecapeptido neuropeptidina, que ha sido localizado en el hipotálamo, en el canal gastrointestinal, y en todas aquellas áreas nerviosas en donde abundan los receptores morfínicos (SHYDER, 1977; ZIEGLANSBERGER y cols. 1978; MILETIC y RANDIA, 1978). Sin embargo la sustancia P parece ser que actúa sobre receptores musculares (COSTA y cols. 1978) para contraer el ileon de cobayo y sus efectos no se afectaron ni por atropina, ni por naloxona, ni por encefalinas (NORT y KATAYAMA, 1978). Lo que sí es cierto es que los resultados discrepan de los obtenidos en cualquier inhibición específica colinérgica y serían más bien consecuencias de antagonismos fisiológicos. Los trabajos de COMIE y cols. 1978 señalan además que cuando se trabajó con grupos de pulsos la morfina descendió solo la liberación de Ach provocada por el primer pulso del tren pero no la liberación ocasionada por los restantes pulsos. Por otra parte aún tendríamos que señalar la posibilidad de que existan fenómenos de feed-back con este tipo de estimulación en la que el componente colinérgico es pequeño. RAMA SASTRY y cols. en 1978 hablan de la posible existencia a nivel de la terminación colinérgica de receptores inhibidores muscarínicos presinápticos que bloquearían la liberación de Ach en el preparado fibras longitudinales-plexo mientérico y existiría la posibilidad de que las encefalinas pudieran ser liberadas por su

mediación (fig. 52). En terminaciones adrenergicas dotadas de un feed-back negativo en la liberación de norepinefrina existen receptores presinápticos endorfinicos (LAWGER, 1977). En este sentido también cabe señalar las consideraciones de BARTOLINI en 1978 sobre el efecto antagonista de naloxona en la analgesia inducida por agentes muscarínicos en cerebro y sobre la hiperalgesia inducida por atropina, que le llevaron a la conclusión de que los efectos de los parasimpaticomiméticos deben estar relacionados con la liberación de factores endógenos morfínomiméticos.

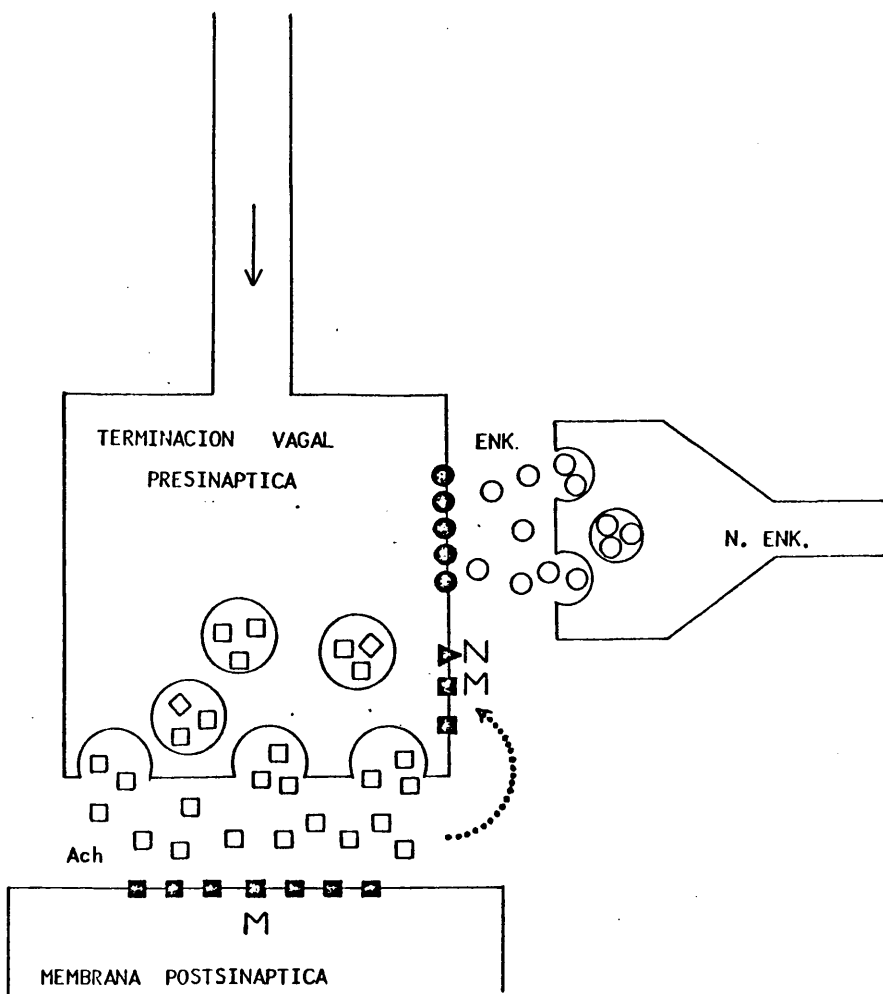


Figura 52

Figura 52.- Terminación vagal presináptica con receptores muscarínicos (M) presinápticos, con receptores encefalinérgicos (ENK) y con receptores nicotínicos (N); espacio intersináptico en el cual están representadas las moléculas de acetilcolina (Ach); y membrana postsináptica con receptores muscarínicos (M) postsinápticos.

Rama Sastry (1978) admite en el terminal vagal receptores M-presinápticos cuyo estímulo es capaz de originar un feed-back negativo en la liberación de Ach. En el supuesto caso de que la terminación vagal posea tantos receptores presinápticos como la terminación adrenérgica es la razón por la cual se ha representado una neurona encefalinérgica (N-ENK) y receptores encefalinérgicos presinápticos y nicotínicos (N) que tendrían un feed-back negativo y positivo respectivamente en la liberación del neurotransmisor colinérgico.

Efectos de la cafeína

Potenciamientos de la contracción similares a los obtenidos con cafeína ya fueron descritos por MORITOKI y colaboradores en 1976 con una preparación de ileon de cobayo basada también en la técnica de estimulación coaxial de PATON en 1955, en la cual ensayaron el efecto que tenían las bases xánticas y el imidazol. Los potenciamientos posiblemente se deben a una facilitación de la liberación de Ach de los terminales nerviosos del ileon actuando a través de la permeabilización al calcio de las membranas del nervio y sin mediación del AMPc (MORITOKI y cols. 1976); es decir que su modo de acción no puede ser a través de la fosfodiesterasa (Fig. 30). Existe evidencia de un antagonismo entre metilxantinas y morfina a nivel intestinal sobre la contracción producida por estímulo eléctrico, aunque este antagonismo es menor al existente entre las bases xánticas y los nucleó-

tidos de adenina (SAIYNOK y JHAMANDAS, 1976; MORITOKI y cols. 1976). También se ha descrito un antagonismo de la teofilina sobre los aumentos de actividad contráctil que causa la morfina al ser perfundida en segmentos intestinales de perro (GRUBB y BURKS, 1975). Todos estos resultados estarían en consonancia con los obtenidos en nuestra preparación con morfinomiméticos en presencia de cafeína (figs. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38).

En nuestra preparación la cafeína potenció la respuesta al estímulo eléctrico pero no fué capaz de prevenir la inhibición progresiva de la respuesta que se observa al ir elevando la frecuencia de estimulación. Esta inhibición progresiva de la contracción es consecuencia directa de la inhibición de la liberación de Ach que tiene lugar al elevar la frecuencia de estimulación (COWIE y cols. 1968; COWIE y cols. 1970; COWIE y cols. 1978). (fig. 39).

Choques de frecuencia elevada

Los resultados obtenidos para liberar endorfinas basándonos en la técnica de MARGARITA PUIG de 1977 corroboran en nuestra preparación la existencia de sustancias endógenas, íntimamente relacionadas con las estructuras intestinales que tienen un efecto similar al de la morfina. En nuestra preparación debemos tener en cuenta que no hemos eliminado el componente colinérgico descrito por PATON y ZAR en 1968 correspondiente a la fibra muscular circular del intestino. Probablemente incluso otras sus-

tancias contracturantes como la histamina se eliminan del músculo circular o en los histocitos existentes en la mucosa. Todo esto nos permite comprender nuestros resultados en los que apreciamos mayores inhibiciones de la contracción después de ocasionar choques de elevada frecuencia al realizar los ensayos en presencia de concentraciones de atropina o de clorfeniramina que reducen parcialmente el componente colinérgico o el histaminérgico respectivamente (figs. 42 y 43).

El hecho de que a partir de cierto número de choques tetanizantes no se produzcan inhibiciones de la contracción, si no por el contrario potenciamiento en su altura respecto a la correspondiente anterior al choque, nos indica un agotamiento en la liberación de los compuestos endógenos similares a morfina, y posiblemente la liberación por el contrario de la Ach y la histamina que han permanecido sin poderse liberar durante los 5 minutos de estimulación a frecuencia elevada. Las encefalinas liberadas por el plexo mientérico se supone se encuentren encerradas en vesículas tal como indicó SNYDER en el S.N.C. (SNYDER, 1977), y con su liberación masiva por los primeros choques se agotaría su almacén (figs. 40 y 43).

Las encefalinas al igual que otros factores liberados con los choques parece probable que se vayan degradando con el tiempo y esto explicaría también las recuperaciones parciales de la altura de la contracción que hemos observado en los 10 minutos que siguen a cualquiera de los choques que las libera. Esto está de acuerdo con la naturaleza peptídica de las encefalinas acepta-

da por todos los investigadores desde su descripción por HUGUES y colaboradores en 1975b y estas encefalinas serían destruidas por las peptidasas liberadas en nuestra preparación.

Nuestros resultados confirman el papel que la bacitracina tiene como inhibidor de las peptidasas capaces de destruir los péptidos endógenos, y desmienten por el contrario la teoría de su papel como inhibidor de las peptidasas capaces de convertir a los péptidos endógenos de gran tamaño en péptidos activos (SCHULZ. y cols. 1977). Nuestros resultados con bacitracina señalan una mayor magnitud de los efectos intestinales de inhibición provocados por los choques (figs. 41 y 42).

La presencia de cafeína no parece afectar esencialmente el fenómeno de liberación de endorfinas y si existiese algún antagonismo de la cafeína sobre el efecto de los péptidos endógenos o del componente purinérgico que se pueda liberar por los choques en la presente preparación queda poco patente por las variaciones en el efecto que los mismos péptidos tienen incluso en los controles de su liberación. Por todo ello, la diferencia entre los ensayos con cafeína y los ensayos control no es extraño que no sea significativa (fig. 43).

Respuesta de los morfinomiméticos en presencia de bacitracina.

Sobre el efecto desarrollado tras la administración exógena de morfina o metadona en la preparación del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple, la bacitracina

no tuvo ninguna influencia por faltar el sustrato endórfnico cuyo liberación no se produce por lo administración de otros morfonomiméticos exógenos. La morfina no ocasionaría liberación de otras sustancias capaces de actuar en los receptores opiáceos, sino que ello misma se uniría a este tipo de receptores cuya existencia sin embargo, si estaría condicionada a la existencia de sustancias endógenas morfonomiméticas. (figs 44 y 45).

La bacitracina solo afectaría el efecto de sustancias polipeptídicas morfonomiméticas que por su semejanza estructural competirían con el mismo tipo de enzimas.

Pensamos que la bacitracina no tiene ningún efecto sobre la liberación de Ach y las ligeras variaciones en la altura de la contracción que se observan con su administración se deben a alteraciones en la tensión superficial.

Animales adictos.

En animales adictos hemos encontrado que necesitamos mayores dosis de morfina para la inhibición de la altura de la contracción, habiéndose extrapolado una DI_{50} 5 veces superior a la de los controles en los animales inyectados durante 14 días (fig. 46). Podemos citar algunas observaciones similares como son las de GOLDSTEIN y SCHULZ en 1973 con la preparación fibras longitudinales-plexo mientérico con una reducción de la actividad de morfina en los animales tolerantes por pellets de morfina a la sexta parte de lo normal; las de HAYCOCK y REES en 1972 con reducción de la sensibilidad a la morfina en las secciones de

ileon estimulado transmuralmente perteneciente a cobayos inyectados con clorhidrato de morfina; y las de VAN NUETEN y LAL en 1974 que necesitaron concentraciones de 3 a 10 veces más altas de morfina para inhibir las contracciones del intestino estimulado coaxialmente de los animales a los que hicieron tolerantes con la misma técnica utilizada por nosotros (inyecciones subcutáneas de 100 mg/kg día de sulfato de morfina) pero solo durante un periodo de 6 días.

Nuestros resultados corroboran nuevamente la especificidad del fenómeno y la autenticidad del receptor morfínico localizado en el plexo mientérico del ileon de cobayo, y reflejan claramente un fenómeno de tolerancia que se traduce en una pérdida de la capacidad de la morfina para abolir la contracción intestinal provocada por estímulo eléctrico.

Aunque no hemos encontrado diferencias en las respuestas a choques de elevada frecuencia (10 Hz durante 5 minutos) entre las preparaciones control y las de animales tratados con inyecciones diarias de morfina durante 3 días o durante 14 días pensamos que esto no se debe a que no exista una diferencia real en la liberación de compuestos endógenos morfinomiméticos. Los resultados obtenidos en la preparación de las fibras longitudinales (MARTIN, 1978) muestran claras diferencias en las respuestas a los choques entre animales control y los mismos animales tratados que nosotros utilizamos. La diferencia encontrada entre los resultados obtenidos con la técnica de las fibras longitudinales y la técnica del ileon completo se debe probablemente a

que utilizando el ileon completo se liberan más sustancias de por-
te excitador. Por otra parte habría que señalar el que las encef-
falinas no son el único neurotransmisor inhibidor, GABA, glicina,
taurina, etc... también son capaces de disminuir los efectos del
neurotransmisor excitador.

El menor efecto encefalinérgico por parte de los anima-
les adictos se podría atribuir a una menor liberación de encef-
falinas (SIMANTOV y SNYDER, 1976b; SNYDER, 1977) o a una menor afi-
nidad de estas por el receptor. Esta segunda suposición ya fué
descartada con los trabajos de PERT y SNYDER en 1976, los de
NIREMBERG y KLEE (citados por SNYDER, 1977) y los de COX y PADHYA
en 1977. La teoría clásica de SNYDER (1977) sostenida también por
GARCIA DE JALON en 1977 con la existencia de un feed-back nega-
tivo que suprime la liberación de encefalinas al administrar mor-
fina de forma continuada explica poco satisfactoriamente sin em-
bargo el síndrome de abstinencia. Este síndrome no se debería
producir si tuviera lugar una liberación masiva de las encefali-
nas que estarían acumuladas sin liberarse mientras se administra-
ba la morfina. El síndrome de abstinencia provocado por adminis-
tración de naloxona en animales adictos se traduce a nivel de
las fibras longitudinales de ileon de cobayo en una disminución
de la sensibilidad a la naloxona (MARTIN, 1978).

A nivel cerebral en adicto existe un aumento de los ni-
veles de encefalinas bien por disminución de liberación o por au-
mento de síntesis y el síndrome de abstinencia no se explica fa-
cilmente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles

elevados de encefalinas que encuentran SIMANTOV y SNYDER en ratas tolerantes (1976b) se refieren a determinaciones de contenido total del cerebro. Es probable que la elevación solo tenga lugar en algunas áreas cerebrales y puede que estén más implicadas en el síndrome de abstinencia otras áreas más reactivas como son las zonas emocionales del área límbica o la sustancia gris periacueductal. En este aspecto cabe señalar la disociación del comportamiento de los sistemas encefalinérgicos del núcleo accumbens y el núcleo caudatus estudiado por DILL y COSTA en 1977. Estos autores observaron que la morfina no descendía la velocidad del turnover de Ach en el estriado pero sí en el núcleo accumbens, mientras que aumenta en ambos la velocidad del turnover de dopamina. Además la naltrexona bloquea la analgesia y la catalepsia ocasionada por morfina cuando se inyectó en el núcleo accumbens pero no cuando se inyectó en el núcleo caudatus. Puede que los receptores opiáceos del estriado no regulen neuronas de Ach. Quizá en el núcleo accumbens un descenso en la actividad colinérgica regula la actividad de neuronas aferentes de GABA las cuales pueden estar relacionadas con neuronas de la sustancia gris periacueductal donde están localizados receptores morfínicos importantes para la mediación de analgesia. Es decir que la activación de los receptores opiáceos en el núcleo accumbens juega un papel importante en la catalepsia y la analgesia causada por morfina pero no se puede atribuir un papel similar a los receptores opiáceos del núcleo caudatus donde las inyecciones de morfina no causaron ningún efecto.

Por otra parte para explicar el síndrome de abstinencia con la teoría clásica de SNYDER (1977) podemos considerar que las encefalinas tienen una cinética de asociación y disociación más lenta que la morfina posiblemente debido a la necesidad de cambios conformacionales por parte del péptido en las interacciones con el receptor opiáceo (SIMANTOV y cols. 1978).

Se concluye que en el fenómeno de tolerancia-dependencia y en el de abstinencia a los morfínicos estaría más bien implicada una alteración en las respuestas a nivel celular (MARTIN, 1978), como también se deduce de los trabajos de HERR en 1978 y los de NIRENBERG y KLEE (citados por SNYDER, 1977). Según COX (1972) la morfina aumentaría la síntesis de proteínas y por consiguiente la síntesis enzimática y el desarrollo de la tolerancia a los efectos analgésicos se puede inhibir por algunas sustancias que inhibirían la síntesis proteica.

También tendríamos que tener en cuenta que el fenómeno puede ser complejo debido a las múltiples variantes de receptores aceptadas por diversos investigadores hasta el momento. Por una parte hay que tener en cuenta que existirían receptores más específicos para unos morfínicos exógenos que para otros y de esta forma se estableció que la morfina era el prototipo de agonista para el tipo μ , la ketocyclazocina para el tipo K y la N-allylnorphenazocina (SKF-10,047) para el σ receptor (MARTIN y cols. 1976). Numerosos investigadores siguen aceptando la diversidad en los receptores morfínicos (PATERSON y KOSTERLITZ, 1978; BONNET y cols. 1978; WARD y cols. 1978) pero además tenemos

que tener en cuenta que se ha comprobado que existen receptores más sensibles a encefalinas que a morfina que serían los del tipo δ localizados fundamentalmente en el deferente de ratón, y receptores de tipo μ más sensibles a morfina y etorfina que a encefalinas, que no serían los del cerebro de cobayo pero si los de la preparación de ileon de cobayo utilizada por nosotros (JACOB y cols. 1978 ; KOSTERLITZ, 1978).

Pérdidas de peso.

Las pérdidas de peso que acusan los animales tratados con inyecciones de morfina pueden estar relacionadas con el aumento del metabolismo que causa su administración en sujetos que no padecen dolor (SHERMAN y MITCHELL, 1972 y 1973); sin olvidarnos tampoco que la morfina posee el papel de interactuar en la liberación de factores hipotalámicos y de hormonas de la hipófisis (MARTIN, 1973). Tampoco podemos descartar que hubo menor ingesta posiblemente por la propia depresión central que la morfina causa. En este aspecto podemos señalar también las pérdidas de peso corporal que STAVINOHÁ y colaboradores en 1977 observaron en ratones tolerantes y las observadas por TAGASHIRA y colaboradores en 1978 en ratas tolerantes. También podemos señalar los trabajos de MARGULES y colaboradores en 1978 que obtuvieron los niveles de β endorfina duplicados en las pituitarias de ratones de peso elevado aunque en cerebro eran normales; y además observaron que la naloxona disminuía la sensación de sobreingesta

en ratones y ratas de peso elevado. Explicaron el fenómeno pensando que la β endorfina de la pituitaria puede jugar papel en el desarrollo de los síntomas de sobreingesta y en el síndrome de obesidad. Pudiera ser que las variaciones en la liberación de endorfinas debidas a la administración continuada de morfina estuvieran también íntimamente relacionadas con las pérdidas de peso observadas en los animales tolerantes. (fig. 47).

Las pérdidas de peso por parte de los animales inyectados con suero fisiológico son atribuibles al stress ocasionado que se acentúa con la pérdida de libertad. En este aspecto podemos señalar los trabajos de SPARBER y COLELLI en 1978 en los que la producción de stress en ratos también reduce la velocidad para adquirir el alimento y por otra parte el stress parece antagonizar también el efecto de la naloxona en el comportamiento de estos animales para conseguir alimento. (fig. 47).

Pensamos por todo ello que también las situaciones de stress podrían estar asociadas con una menor liberación de encefalinas de igual forma que la adicción es capaz de producirla, y a su vez estos niveles inferiores de encefalinas tendrían mucho que ver con los fenómenos de alimentación, así como con todos los otros fenómenos de comportamiento.

Efectos del AMPc.

Hemos observado en nuestra preparación que el AMPc disminuyó la altura de la contracción producida por estimulación

eléctrica con estímulo simple de 0'2 Hz de frecuencia (figs 48 y 50). Similares observaciones con los derivados de adenosina, cuando se estimula el intestino de cobayo con frecuencias bajas, son las de GINTZLER y MUSACCHIO en 1975 y las de MORITOKI y cols. en 1976 con AMPc. Este efecto no resulta difícil de entender y podría tratarse de un efecto directo en receptores purinérgicos ya que BURNSTOCK afirmó la existencia de la neurona purinérgica intestinal que posiblemente sea la misma neurona inhibitoria descrita por KOTTEGODA en 1970 (BURNSTOCK y cols 1970; BURNSTOCK 1975 a y b; KOTTEGODA 1970) (fig. 53). Tampoco podemos olvidar que los efectos vagales están relacionados con aumentos de GiPc y con disminución del AMPc.

Los resultados en presencia de propanolol son algo difíciles de explicar, pues el bloqueo de receptores adrenérgicos tanto presinápticos como postsinápticos disminuiría la relajación intestinal causada por cualquier efecto de la inervación adrenérgica intestinal (figs. 49 y 50).

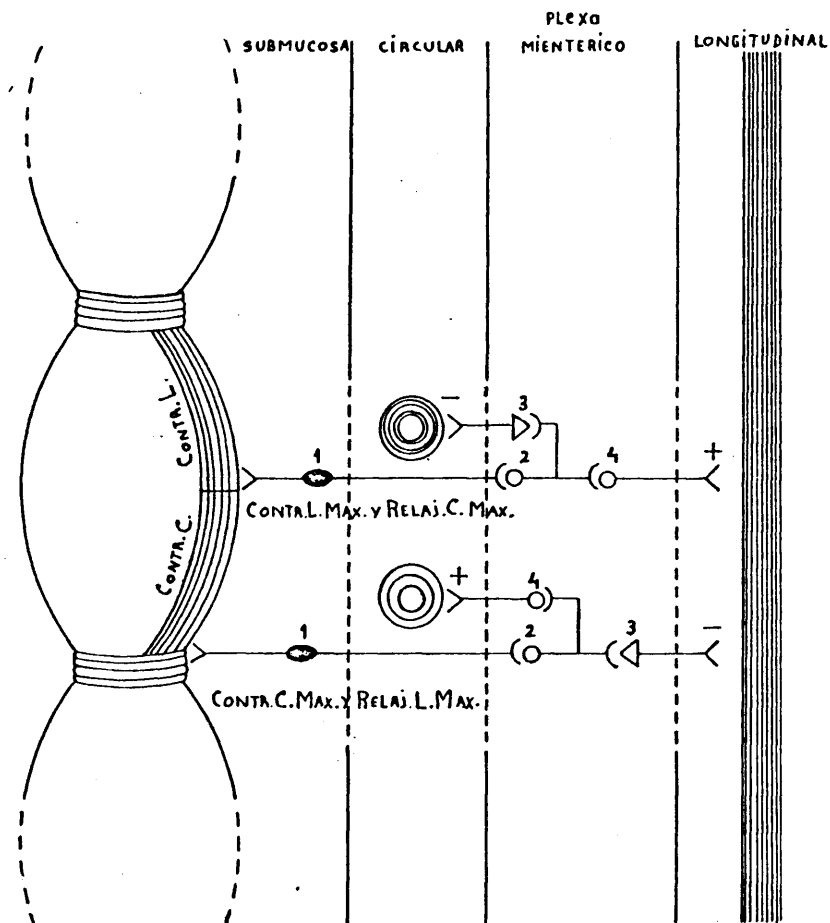


Fig. 53,- Esquema sobre la inervación intestinal (García de Jalón, 1976)

- 1) Neurona sensitiva de la submucosa (sustancia P como mediadora)
- 2) Neurona colinérgica intercalar (excitadora)
- 3) Neurona caudal inhibitorio purinérgica
- 4) Neurona colinérgica efectora.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1ª) Con las condiciones experimentales empleadas los morfinomiméticos inhibieron las contracciones del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal de 0,2 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración, y el orden de actividad encontrada para ellos en esta preparación basada en la técnica de Paton de 1955 fué correlacionable con su orden de actividad analgésica y con el orden de actividad que presentan en otras preparaciones y tests, habiéndose obtenido las siguientes DI_{50} :

Codeína : $9,3 \cdot 10^{-6} M$	Metadona : $3,1 \cdot 10^{-8} M$
Morfina : $3 \cdot 10^{-7} M$	Fentanilo : $7,1 \cdot 10^{-9} M$
Levorfanal : $2,2 \cdot 10^{-7} M$	Etorfina : $2,9 \cdot 10^{-10} M$

2ª) Los morfinomiméticos inhibieron las contracciones del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con trenes de estímulo supramaximal de 10 Hz de frecuencia y 2 milisegundos de duración durante 5 segundos y con un intervalo de 1 minuto, pero su efecto fué menor al que produjeron con estímulo simple y el orden de actividad encontrado no guardó ningún paralelismo con su actividad analgésica.

3ª) La dosis $5 \cdot 10^{-5} M$ de cafeína potenció la respuesta contráctil del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con las características fijadas de estímulo simple, siendo muy variable el grado de potenciamiento en las preparaciones y siendo en ge-

neral mayor cuando la actividad contráctil del intestino era inicialmente bajo

- 4^a) La dosis $5 \cdot 10^{-5}$ M de cafeina antagonizó el efecto de morfina, metadona y fentanest sobre la contracción del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con las características fijadas de estímulo simple.
- 5^a) El intestino de cobayo estimulado coaxialmente con estímulo simple supramaximal respondió solo cuando la frecuencia de estimulación era baja y progresivamente se inhibió su respuesta al ir elevándola, considerándose nula la respuesta obtenida con 0,7 Hz de frecuencia. Este fenómeno fué idéntico en presencia de la concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M de cafeina.
- 6^a) La estimulación con choques tetanizantes de 10 Hz de frecuencia durante un periodo de 5 minutos basándonos en la técnica utilizada por Margarita Puig en 1977 para liberar endorfinas en la preparación de fibras longitudinales-plexo mientérica de intestino de cobayo, liberó sustancias morfinomiméticas endógenas también en las porciones de ileon completa, lo cual hizo que la altura de la contracción disminuyese cuando volvimos a estimular con estímulo simple, y este efecto fué más patente en presencia de concentraciones de atropina o de clorfeniramina que redujeron parcialmente la contracción con estímulo simple.
- 7^a) Con las porciones de ileon completo de cobayo si el número de

choques tetanizantes de 10 Hz era elevado, ocurrieron fenómenos de potenciamiento con aumentos de la altura de la contracción al volver a estimular con estímulo simple después del choque.

- 8ª) El efecto de las sustancias morfinomiméticas endógenas liberadas por choques tetanizantes de 10 Hz en las porciones de ileon completo de cobayo fué más duradero en presencia de la concentración $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de bacitracina, probablemente por disminuir este antibiótico su degradación
- 9ª) En presencia de la concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M de cafeína la liberación de sustancias morfinomiméticas endógenas en las porciones de ileon completo provocada por choques tetanizantes de 10 Hz no fué significativamente diferente de los controles correspondientes.
- 10ª) La respuesta a los morfinomiméticos del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con las características fijadas de estímulo simple no se alteró en presencia de bacitracina.
- 11ª) El ileon estimulado coaxialmente con las características fijadas de estímulo simple, perteneciente a cobayos tratados durante 14 días con dosis diarias de 100mg/Kg de sulfato de morfina, fué menos sensible al efecto de la morfina, habiéndose obtenido una DI_{50} 5 veces superior a la de sus controles correspondientes.
- 12ª) No apreciamos diferencias significativas en la liberación de

endorfinas en las porciones de intestino completo de cobayo, provocada por choques tetanizantes de 10 Hz, de animales tratados con 100mg/Kg día de sulfato de morfina durante 3 o durante 14 días respecto a sus controles correspondientes; probablemente debido a la liberación que acontece de otras sustancias cuando se utiliza ileon completo.

13ª) Los cobayos tratados con inyecciones diarias de morfina sufrieron una pérdida de su peso corporal que fué más acusada si permanecían enjaulados que si permanecían en libertad. Durante los primeros días se observó pérdida de peso también en los controles no tratados probablemente debido al stress causado por la manipulación, y las pérdidas fueron también mayores con controles enjaulados que con los libres.

14ª) El AMPc inhibió la contracción del ileon de cobayo estimulado coaxialmente con las características fijadas de estímulo simple habiéndose obtenido una $DI_{50} = 10^{-5}M$, y siendo el efecto del AMPc mayor en presencia de la concentración $1,25 \cdot 10^{-5}M$ de propanolol.

BIBLIOGRAFIA

- AMTEE, L., GARCIA-SEVILLA, J.A., MAGNUSSON, T., CARLSSON, A. (1979): Effects of morphine, naloxone, naltrexone and β -endorphin on monoamine synthesis in rat brain. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 78.
- ALDUNETE, J., YOJAY, L., MARDONES, J. (1975): Studies on the Mechanism of the Action of Morphine on the Peristalsis of Guinea Pig Ileum in situ. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 219, 395-403.
- ALGERI, S., CALDERINI, G., CONSOLAZIONE, A. (1978): Interaction of opiate peptides with catecholamines and serotonin in the rat CNS. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 80.
- ALLY, A.I., NAKATSU, K. (1975): Adenosine inhibition of isolated rabbit ileum and antagonism by theophylline. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 199, No1, 208-215.
- ANDEN, N.E. (1976): Effects of drugs on the DA mechanisms in the corpus striatum and in the limbic system and on the NA and 5HT mechanisms in the spinal cord. Drug and Central Synaptic Transmission. Mac. Millan, Press Ltd. London 48-62.
- BARTOLINI, A., BARTOLINI, R., AIELLO-HALMBERG, P., GALLI, A., RINZI, G. (1978): Indirect evidences of release of cerebral morphine like factors through the stimulation of muscarinic receptors. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts, C1446, 565.
- BASBAUM, A.I., CLAUTON, C.H., FIELDS, H.L. (1976): Opiate and stimulus-produced analgesia: Functional anatomy of a medullospinal pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 73, No2, 4685-4688.
- BAXTER, H.G., GOFF, D., MILLER, A.A., SAUNDERS, I.A. (1977): Effect of a potent synthetic opioid pentapeptide in some antinociceptive and behavioural tests in mice and rats. Proceedings of the Brit. Pharmacological Society.
- BELL, K.H., REES, J.H.H. (1974): The depressant action of morphine on transmission at a skeletal neuromuscular junction is non-specific. J. Pharm. Pharmacol., 26, 686-691.

- BELLUZZI, J.D., GRANT, N., GARSKY, V., SARANTAKIS, D., WISE, C.D., STEIN, L. (1976): Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. *Nature*, 260, 625-626.
- BENTLEY, K.W., LEWIS, J.W. (1972): The relationship between structure and activity in the 6, 14-endoethenotetrahydrothebaine series of analgesics. Agonist and antagonist actions of narcotic analgesic drugs. H.W. Kosterlitz, H.O.J. Collier, J.E. Villarreal, 7-16.
- BLOOM, F., SEGAL, D., LING, N., GUILLEMIN, R. (1976): Endorphins: Profound Behavioral Effects in Rats Suggest New Etiological Factors in Mental Illness. *Science*, 194, 630-632.
- BONNET, K.A., SUNSHINE, A.G., GUSIK, S. (1978): Multiple opiate receptors reflected in region-specific alterations in brain cyclic nucleotides. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 133.
- BORYS, H.K., KARI, R. (1971): Effects of Caffeine on the Intracellular Calcium in Frog Sartorius Muscle. *J. Cell. Physiol.*, 78, 387-404.
- BRADBURY, A.F., SMYTH, D.G., SNELL, C.R. (1976): Biosynthetic origin and receptor conformation of methionine enkephalin. *Nature*, 260, 165-166.
- BRADLEY, P.B., BRAWNELL, G.J. (1975): A stereospecific action of morphine on brain stem neuronal activity: a microiontophoretic study. *Br. J. Pharmacol*, 53(3): 462.
- BRADLEY, P.B., BRIGGS, I., GAYTON, R.J., LAMBERT, L.A. (1976): Effects of microiontophoretically applied methionine enkephalin on single neurones in rat brainstem. *Nature*, 261, 425-426.
- BROWNE, R.G., SEGAL, D.S. (1978): μ -Endorphin- and opiate-induced immobility: behavioral characterization and tolerance development. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 89.
- BUCKETT, W.R. (1978): Pharmacological studies on stimulation-produced analgesia. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 33.

- BURKS, T.F., GRUBB, M.W. (1974): Sites of acute morphine tolerance in intestine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 191, No 3, 518-526.
- BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., SATCHELL, D.G., SHYTHE, A. (1970): Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by nonadrenergic inhibitory nerves in the gut. *Brit. J. Pharmacol.*, 40, 668-688.
- BURNSTOCK, G. (1975a): Purinergic transmission. In "Handbook of psychopharmacology", Eds. L. Iversen, S. Iversen, and S. Snyder, Vol. 5, Plenum Press (N.Y.), 131-194.
- BURNSTOCK, G. (1975b): ATP and purinergic transmission. *Proceedings Sixth International Congress of Pharmacology, Vol. 2, Neurotransmission*, 49-59.
- BUSCHER, H.H., HILL, R.C., ROHER, D., CARDINAUX, F., CLOSSE, A., HAUSER, D., PLESS, J. (1976): Evidence for analgesic activity of enkephalin in the mouse. *Nature*, 261, 423-425.
- CARNIE, A.B., KOSTERLITZ, H.W., TAYLOR, D.W. (1961): Effect of morphine on some sympathetically innervated effectors. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 17, 539-551.
- CATRAVAS, G.N., TAKENAGA, J., MC. HALLE, C.G. (1977): Effect of chronic administration of morphine on monoamine oxidase activity in discrete regions of the brain of rats. *Biochemical Pharmacology*, 26, 211-214.
- CHENEY, D.L., GOLDSTEIN, A. (1971): Tolerance to opioid narcotics, III Time course and reversibility of physical dependence in mice. *Nature, Lond.*, 232, 477-478.
- CLOUET, D.H., RATHNER, M. (1970): Catecholamine Biosynthesis in Brains of Rats Treated with Morphine. *Science*, 168, 854-856.
- COCHRANE, D.E., PARSON, R.L. (1972): The Interaction between Caffeine and Calcium in the Desensitization of Muscle Postjunctional Membrane Receptors. *The Journal of General Physiology*, 59, 437-461.
- COLLIER, H.O.J. (1965): A general theory of the genesis of drug dependence by induction of receptors. *Nature, Lond.*, 205, 181-182.

- COLLIER, H.O.J. (1968): Supersensitivity and dependence. *Nature*, Lond., 220, 228-231.
- COSTA, M., FRANCO, R., FURNESS, J.B. (1978): The effect of substance P on intestinal nerves and muscle. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts C310, 129.
- COMIE, A.L., KOSTERLITZ, H.W., WATT, A.J. (1968): Mode of action of morphine-like drugs on autonomic neuroeffectors. *Nature*, Lond., 220, 1040-1042.
- COMIE, A.L., KOSTERLITZ, H.W., LYDON, R.J., WATERFIELD, A.A. (1970): The effects of morphine-like substances and their antagonists on transmission at the neuroeffector junction of the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the guinea pig ileum. *British Journal of Pharmacology*, 38, 465P-466P.
- COMIE, A.L., KOSTERLITZ, H.W., WATERFIELD, A.A. (1973): Factors influencing the release of acetylcholine from the myenteric plexus of the ileum of the guinea-pig and rabbit. *B. J. Pharmac.*, 65, 565-580.
- COX, B.M. (1972): Effects of inhibitors of protein synthesis in morphine tolerance and dependence. Agonist and Antagonist actions of narcotic analgesic drugs. H.W. Kosterlitz, H. O.J. Collier, J.E. Villarreal, 235-239.
- COX, B.M., PADHYA, R. (1977): Opiate binding and effect in ileum preparations from normal and morphine pretreated guinea-pigs. *Br. J. Pharmac.*, 61, 271-273.
- CREESE, I., SHYDER, S.H. (1975): Receptor Binding and Pharmacological activity of opiates in the guinea-pig intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 194, No1, 205-219.
- DILL, R.E., COSTA, E. (1977): Behavioural dissociation of the enkephalinergic systems of nucleus accumbens and nucleus caudatus. *Neuropharmacology*, 16, 323-326.
- DINGLELINE, R., GOLDSTEIN, A. (1976): Effect of synaptic transmission blockade on morphine action in the guinea-pig myenteric plexus. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 196, No1, 97-106.
- DUGGAN, A.W., HALL, J.G., HEADLEY, P.M. (1976): Morphine, enkephalin and the substantia gelatinosa. *Nature*, 264, 456-465.

- EIDELBERG, E., BOND, M.L. (1972): Effects of Morphine and Antagonists on Hypothalamic Cell Activity. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 196, 16-24.
- ERVIN, F.R., PALHOUR, R.M., GUZMAN-FLORES, C., CHANG, J.K., FONG, B., SHIMIZU, M. (1978): Behavioral and electrophysiological effects of endorphins and enkephalins. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 92.
- FAIRHURST, A.S., HASSELBACH, W. (1970): Calcium Efflux from a Heavy Sarcotubular Fraction. Effects of Ryanodine, Caffeine and Magnesium. *Eur. J. Biochem.*, 13, 504-509.
- FLOREZ, J. (1975): Analgésicos narcóticos. *Farmacología y su proyección a la clínica*. L. Velazquez, 12ª edición, 364-383.
- FLOREZ BELEDO, J. (1977): Neurofarmacología del dolor: nuevas perspectivas. *Oncología*, revisiones, Nº1, 37-47.
- FOLEY, K., ITURRISI, C., KOURIDES, I., KAIKO, R., POSNER, J., LI, C., HOUDE, R. (1978): Intravenous and intraventricular administration of beta-endorphin in man; safety and disposition. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 98.
- FRANK, G.B., SINGH, S., BUSS, W.C. (1970): A Possible Explanation For Some Peculiar Properties of Caffeine Solutions. II. Krebs Solution. *Arch. int Pharmacodyn.*, 184, 104-110.
- GACEL, G., FOURNIE-ZALUSKI, M.C., FELLION, E., ROQUES, B.P. (1978): Respective roles of the ammonium and hydroxyl groups of tyrosine in the conformation and activity of enkephalins. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 48.
- GARCIA DE JALON, P.D. (1977): Encefalinas y endorfinas como vectores de respuestas analgésicas. *Archivos de la Facultad de Medicina de Madrid*, Vol. XXXI, Nº6, 327-334.
- GENT, J.P., WOLSTENCROFT, J.H. (1976): Effects of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin compared with those of morphine on brainstem neurones in cat. *Nature*, 261, 426-427.

- GERO, A. (1978): A model of the opiate receptor. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 117.
- GINZLER, A.R., MUSACCHIO, J.M. (1974): Interaction between serotonin and morphine in the guinea-pig ileum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 189, 482-492.
- GINZLER, A., MUSACCHIO, J.M. (1975): Interactions of morphine, adenosine, adenosine triphosphate and phosphodiesterase inhibitors on the field-stimulated guinea-pig ileum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 194, №3, 575-581.
- GINZLER, A.R., LEVY, A., SPECTOR, S. (1976): Antibodies as a means of isolating and characterizing biologically active substances. Presence of a non-peptide, morphine-like compound in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 73, №6, 2132-2136.
- GOLDSTEIN, A., SHEEHAN, P. (1969): Tolerance to opioid narcotics; I. Tolerance to the running fit caused by levorphanol in the mouse. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 169, 175-184.
- GOLDSTEIN, A., SCHULZ, R. (1973): Morphine-tolerant longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac.*, 48, 655-666.
- GOLDSTEIN, A. (1974): Opiate receptors. *Life Sci.*, 14, 615-623.
- GOLDSTEIN, A. (1976): Opioid Peptides (Endorphins) in Pituitary and Brain. Studies on opiate receptors have led to identification of endogenous peptides with morphine-like actions. *Science*, 193, №4258, 1081-1086.
- GOMES, C., SVEINSSON, T.H., TROLIN, G. (1976): Effects of Morphine on Central Catecholamine Turnover, Blood Pressure and Heart Rate in the Rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 294, 141-147.
- GOURLEY, D.R.H., BECKNER, S.K. (1973): Antagonism of Morphine Analgesia by Adenine, Adenosine and Adenine Nucleotides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 144, 774-778.

- GRAF, L. (1973): Chemistry and biochemistry of pituitary endorphins and their precursors. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts, C1.
- GREENBERG, R., KOSTERLITZ, H.W., WATERFIELD, A.A. (1970): The effects of hexametonium, morphine and adrenaline on the output of acetylcholine from the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the ileum. *British Journal of Pharmacology*, 40, 553P-554P.
- GRUBB, M.N., BURKS, T.F. (1975): Selective antagonism of the intestinal stimulatory effects of morphine by isoproterenol, prostaglandin E and theophylline. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 193, 884-891.
- HAUBRICH, D. R., BLAKE, D.E. (1973): Modification of serotonin metabolism in rat brain after acute or chronic administration of morphine. *Biochemical Pharmacology*, 22, 2753-2759.
- HAVLICEK, V., LA BELLA, F., PINSKY, C., CHILDIRAEVA, R. (1978): Dose-response study of beta-endorphin (BE) given intracerebroventricularly in rats. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids, Abstracts, 91.
- HAYCOCK, V.K., REES, J.M.H. (1972): The effect of morphine pretreatment on the sensitivity of mouse and guinea-pig ileum to acetylcholine and to morphine. Agonist and Antagonist actions of narcotic analgesic drugs. H.W. Kosterlitz, H.O.J. Collier, J.E. Villarreal, 235-239.
- HEINANS, R.L.H. (1975): Effects of Morphine on the Ileum of the Guinea Pig In vitro. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 215, 13-19.
- HEINRICH, V., LICHTENSTEIGER, W., LANGHANN, H. (1971): Effect of morphine on the catecholamine content of midbrain nerve cell groups in rat and mouse. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 179, No2, 259-267.
- HENDERSON, G., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W. (1972a): A new example of a morphine-sensitive neuroeffector junction: adrenergic transmission in the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmac.*, 46, 764-766.

- HENDERSON, G., HUGHES, J., THOMPSON, J.W. (1972b): The variation of noradrenaline output with frequency of nerve stimulation and the effect of morphine on the cat nictitating membrane and on the guinea pig mienteric plexus. *Brit. J. Pharmacol.*, 46, 524-525P.
- HENDERSON, G., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W. (1975): The effects of morphine on the release of noradrenaline from the cat isolated nictitating membrane and the guinea-pig ileum myenteric plexus-longitudinal muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.*, 53, 505-512.
- HENDERSON, G., HUGHES, J. (1976): The effects of morphine on the release of noradrenaline from the mouse vas deferens. *Brit. J. Pharmacol.*, 57, 551.
- HENRY, J. L. (1978): Morphine and naloxone effects on substance P excitation in cat spinal dorsal horn. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioic's. Abstracts; 22.
- HENSELEITZ (1932): *J. Phys. Chem. Ithaca*, 210, 33.
- HERZ, A. (1978): Opiate receptors. Their endogenous ligands and chronic opiate actions. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts, C6, 6.
- HILL, R.G., PEPPER, C.H., MITCHELL, J.F. (1976): Depression of nociceptive and other neurones in the brain by iontophoretically applied met-enkephalin. *Nature*, 262, 604-606.
- HO, I.K., LOH, H.H., WAY, E.L. (1972): Effect of Cyclic AMP on Morphine Analgesia Tolerance and Physical Dependence. *Nature*, 238, 397-398.
- HOLLT, V., TESCHEMACHER, H. (1975): Hydrophobic Interactions Responsible for Unspecific Binding of Morphine-Like Drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 233, 163-177.
- HOVES, J.F., HARRIS, L.S., DEWEY, W.L. (1970): The effect of Morphine, Nalorphine, Naloxone, Pentazocine, Cyclazocine and Oxotremorine on the Synthesis and Release of Acetylcholine by Mouse Cerebral Cortex Slices In Vitro. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 184, 267-276.

- HUGHES, J. (1975): Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.*, 88, 295-308.
- HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W., LESLIE, F.M. (1975a): Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of analgesics. *Brit. J. Pharmacol.*, 53, 371.
- HUGHES, J., SMITH, T.W., KOSTERLITZ, H.W., FOTHERGILL, L.A., MORGAN, B.A., MORRIS, H.R. (1975b): Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258, 577-579.
- HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W. (1977): Opioid peptides. *Br. Med. Bull.*, 33, No 2, 157-161.
- HUIBLET, C. (1978): Synthetic narcotics and enkephalins; to the finding of any structural explanation. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 50.
- ISAACSON, A. (1969): Caffeine-Induced Contractures and Related Calcium Movements of Muscle in Hypertonic Media. *Experientia*, 25, No 12, 1263-1265.
- IMAYOTO, E.T., LEGIWAY, E. (1978): Stereotyped behavior induced by intranigral opiate microinjection in rats. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 94.
- JACOB, J.J., TREMBLAY, E.C., COLOMBEL, M.C. (1974): Facilitation de reactions nociceptives par la naloxone chez la souris et chez le rat. *Psychopharmacologia*, 37, 217-223.
- JACOB, J., FILLON, G., MICHAUD, G. (1978): Recepteurs morphiniques et leurs ligands. *Actualités Pharmacologiques* 30^e série, Masson, 113-158.
- JACOB, J. (1978): Physiological and pathophysiological relevance of the opiate receptor and their endogenous ligands. 7^{eme} Congrès International de pharmacologie. Abstracts C7, 7.
- JACQUET, Y.F., MARKS, H. (1976): The C-fragment of β Lipotropin: An Endogenous Neuroleptic or Antipsychotogen? *Science*, 194, 632-634.

- JACQUET, Y.F. (1973a): β -Endorphin: endogenous morphine? International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 100.
- JACQUET, Y.F. (1973b): Beta-endorphin: endogenous morphine? 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts C278, 118.
- JAFFE, J.H., MARTIN, W.R. (1975): Narcotic Analgesics and antagonists. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman. Fifth edition. 245-283.
- JAMES, W.H. (1970): Possible Mechanism of Action of Morphine on Brain. *Nature*, 225, 1152-1153.
- JHAWANDAS, K., PINSKY, C., PHILLIS, J.W. (1970): Effects of Morphine and its Antagonists on Release of Cerebral Cortical Acetylcholine. *Nature*, 223, 176-177.
- JHAWANDAS, K., SUTAK, M. (1974): Modification of brain acetylcholine release by morphine and its antagonists in normal and morphine dependent rats. *Br. J. Pharmacol.*, 50, 57-62.
- JOHNSON, E.S. (1963): The origin of acetylcholine released spontaneously from the guinea-pig ileum isolated. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 21, 555-568.
- KNOLL, J. (1976): Neuronal peptide (Enkephalin) receptors in the ear artery of the rabbit. *European Journal of Pharmacology*, 39, 403-407.
- KONLHARDT, M. (1974): Ambiguous Effect of Caffeine Upon the Transmembrane Ca Current in Mammalian Ventricular Myocardium. *Experientia*, 30, 254-255.
- KOSTERLITZ, H.W., TAYLOR, D.W. (1959): The effect of morphine on vagal inhibition of the heart. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 14, 209-214.
- KOSTERLITZ, H.W., MATT, A.J. (1968): Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 33, 266-276.

- KOSTERLITZ, H.W., LYDON, R.J., WATT, A.J. (1970): The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory alpha- and beta-adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac.*, 39, 393-413.
- KOSTERLITZ, H.W., LORD, J.A.H., WATT, A.J. (1972): Morphine receptor in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. Agonist and antagonist actions of narcotic analgesic drugs, H.W. Kosterlitz, H.O.J. Collier, J.E. Villarreal, 45-61.
- KOSTERLITZ, H.W., WATERFIELD, A.A. (1975): An analysis of the phenomenon of acute tolerance to morphine in the guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmac.*, 53, 131-138.
- KOSTERLITZ, H.W., WATERFIELD, A.A. (1976): The assay of the agonist activities of N-methyl and N-nor-homologues of morphine derivatives by the guinea-pig ileum method. *J. Pharm. Pharmac.*, 38, 325.
- KOSTERLITZ, H.W. (1973): Multiple opiate receptors. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts, C2, 2.
- KOTTEGODA, S.R. (1970): Peristalsis of the small intestine. Smooth Muscle. Arnold Publisher, London, 521-541.
- KUBA, K., NISHI, S. (1976): Rhythmic Hyperpolarizations and Depolarization of Sympathetic Ganglion Cells Induced by Caffeine. *Journal of Neurophysiology*, 39, No3, 547-563.
- LANGER, S.Z. (1977): Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Br. J. Pharmac.* 60, 481-497.
- LEE, R.L., SEWELL, R.D.E., SPENCER, P.S.J. (1973): Importance of 5-hydroxytryptamine in the antinociceptive activity of the leucine-enkephalin derivative, D-Ala²-Leu⁵-enkephalin (B W 180 C), en la rata. *European Journal of Pharmacology*, 47, 251-253.
- LEES, G.M., KOSTERLITZ, H.W., WATERFIELD, A.A. (1972): Characteristics of morphine-sensitive release of neuro-transmitter substances. Agonist and antagonists actions of narcotic analgesic drugs. H.W. Kosterlitz, H.O.J. Collier, J.E. Villarreal, 142-152.

- LEYBIN, L., PINSKY, C., LA BELLA, F.S., HAVLICEK, V., REZEK, M. (1976): Intraventricular Met⁵-enkephalin causes unexpected lowering of pain threshold and narcotic withdrawal signs in rats. *Nature*, 264, 458-459.
- LI, C.H., CHUNG, D. (1976): Isolation and structure of an untriatkontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73, 1145-1148.
- LITTER, M. (1970): *Farmacología*, cuarta edición.
- LOH, H.H., BRASE, D.A., SAMPATH-KHANNE, S., MUR, J.B., WAY, E.L. (1976): β -Endorphin in vitro inhibition of striatal dopamine release. *Nature*, 264, 567-568.
- LOWNEY, I.L., SCHULZ, K., LOWERY, P.W., GOLDSTEIN, A. (1974): Partial Purification of an Opiate Receptor from Mouse Brain *Science*, 183, 749-753.
- LULLMANN, H., PREUNER, J., SUNANO, S. (1974): On the Interaction of Acetylcholine, Caffeine and Altered Ca-Concentrations upon the Denervated Skeletal Muscle. *Pfluegers Arch.*, 352, 279-290.
- MAGGILOLO, C., HUIDOBRO, F. (1961): Administration of pellets of morphine to mice; abstinence syndrome. *Acta Physiol. Latinoam.*, 11, 70-78.
- MAGNUS, R. (1904): Versuche am uberlabenden dunndarm von Säugetieren. III. Die Erregungsleitung. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 103, 515-524.
- MALFROY, B., SWERTZ, J.P., SCHWARTZ, J.C. (1978): Binding sites of ³H-enkephalins in mouse brain: pharmacological characterization, localization and effects of chronic treatment with morphine. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 110.
- MARGULES, D.L., MOISSET, B., SHIBUYA, H., PERT, C.B. (1978): β -Endorphin associated with overeating and obesity. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 36.
- MARTIN, W.R., JASINSKI, D.R., HAERTZEN, C.A., KAY, D.C., JONES, B. E., MANSKY, P.A., CARPENTER, R.W. (1973): Methadone a reevaluation. *Arch. gen. Psychiat.*, 28, 286-295.

- MARTIN, W.R., EADES, C.G., THOMPSON, J.A., HUPPLER, R.E., GILBERT, P.E. (1976): The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 197, Nº3, 517-532.
- MARTIN, M.I. (1978): Morfinomiméticos: Aspectos farmacológicos en fibras longitudinales de ileon de cobayo. Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid (Fac. Medicina).
- MC. CALLISTER, L.P., HADEK, R. (1973): The Localization of Calcium in Skeletal Muscle: Its Distribution in Muscles in which the Caffeine-Induced Contracture Was Arrested. *J. Ultrastruct. Res.*, 45, 59-81.
- MC. FARLAND, S.A., PFAFFMAN, M.A. (1972): The Effects of Caffeine on E-C Coupling in Gastrointestinal Smooth Muscle. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 198, 49-60.
- MILETIC, V., RANDIA, M. (1978): Excitatory action of neurotensin on cat dorsal horn neurons in laminae I-III. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts C1222, 472.
- MINNEMAN, K.P., IVERSEN, L.L. (1976): Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature*, 262, 313-314.
- MONTEL, H., STARKE, K., WEBER, F. (1974): Influence of Morphine and Naloxone on the Release of Noradrenaline from Rat Brain Cortex Slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 283, 357-369.
- MONTEL, H., STARKE, K., TRAUBE, H.D. (1975): Influence of Morphine and Naloxone on the Release of Noradrenaline from Rat Cerebellar Cortex Slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 288, 427-433.
- MORETON, J.E., TORTELLA, F.C., KHAZAN, N. (1978): EEG and behavioral effects of acute and chronic administration of opiate-like peptides in the rat. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 90.
- MORITOKI, H., MORITA, M., KANBE, T. (1976): Effects of methylxanthines and imidazole on the contractions of guinea-pig ileum induced by transmural stimulation. *European Journal of Pharmacology*, 35, 185-198.

- MUIR, C.K., SCOTT, N.C. (1977): Comparison of the effects of caffeine and a 2-alkyl-1,2,3-benzoyriazinium iodide on frog recrus abdominis. *Br. J. Pharmac.*, 60, 375-378.
- MUNRO, A.F. (1953): Effect of autonomic drugs on the responses of isolated preparations from the guinea-pig intestine to electrical stimulation. *J. Physiol.*, 120, 41-52.
- NORT, A., KATAYAMA, Y. (1978): Mechanism of action of substance P in myenteric neurones. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts C311, 129.
- OKWUASABA, F.K., HAMILTON, J.T., COOK, M.A. (1977): Antagonism by methylxantines of purine nucleotide- and dipyridamole-induced inhibition of peristaltic activity of the guinea pig ileum. *European Journal of Pharmacology*, 43, 181-194.
- OPMEER, F.A., VAN REE, J.M. (1978): Induction of morphine tolerance in isolated guinea pig ileum. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 11.
- PASTERNAK, G.W., SNYDER, S.H. (1975a): Identification of novel high affinity opiate receptor binding in rat brain. *Nature*, 253, 263-265.
- PASTERNAK, G.B., SNOWMAN, A.M., SNYDER, S.H. (1975b): Selective enhancement of ³H-Opiate agonist binding by divalent cations. *Molec. Pharmacol.*, 11, 735-744.
- PASTERNAK, G.W., SNYDER, S.H. (1975c): Opiate receptor binding: enzymatic treatments that discriminate between agonist and antagonist interactions. *Molec. Pharmacol.*, 11, 478-484.
- PASTERNAK, G.W., WILSON, H.A., SNYDER, S.H. (1975d): Differential effectors of protein-modifying reagents on receptor binding of opiate agonists and antagonists. *Molec. Pharmacol.*, 11, 340-351.
- PATERSON, S.J., KOSTERLITZ, H.W. (1978): Regional distribution of opiate receptor binding in guinea-pig brain. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 123.
- PATON, W.D.M. (1955): The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. *The Journal of Physiology*, 127, 40P-41P.

- PATON, W.D.M. (1957): The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 12, 119-127.
- PATON, W.D.M. (1963): Cholinergic transmission and acetylcholine output. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41, 2637-2653.
- PATON, W.D.M. (1964): Electron microscopy of the smooth muscle and nerve networks of guinea-pig ileum. *J. Physiol.*, 173, 20P.
- PATON, W.D.M., ABOO ZAR, M. (1968): The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *J. Physiol.*, 194, 13-33.
- PATON, W.D.M., VIZI, E.S. (1969): The inhibitory action of noradrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br.J. Pharmac.*, 35, 10-28.
- PERT, C.B., SNYDER, S.H. (1973a): Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science*, 179, 1011-1014.
- PERT, C.B., PASTERNAK, G., SNYDER, S.H. (1973b): Opiate Agonists and Antagonists Discriminated by Receptor Binding in Brain. *Science*, 182, 1359-1361.
- PERT, C.B., SNYDER, S.H. (1974): Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Molec. Pharmacol.*, 10: 868-897.
- PERT, C.B., SNYDER, S.H. (1976): Opiate receptor binding-enhancement by opiate administration in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 25, 847-853.
- PERT, A., DE WALD, L.A., GALLAGER, D.W. (1978): Effects of opiates on nigrostriatal dopaminergic activity: electrophysiological and behavioral analyses. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 93.
- POMERANZ, B., CHIU, D. (1976): "Naloxone blockade of acupuncture analgesia: Endorphins implicated". *Life Science*, Vol. 19, 1757-1762.

- POMERANZ, B., CHENG, R. (1978): Dextronaloxone has no effect on acupuncture analgesia. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 38.
- PUIG, M.M., GASCON, P., GRAVISO, G.L., MUSACCHIO, J.M. (1977): Endogenous Opiate Receptor Ligand: Electrically Induced Release in the Guinea Pig Ileum. *Science*, 195, 419-420.
- RAMA SASTRY, B.V., OMENS, L.K., CHATURVEDI, A.K. (1978): The role of presynaptic muscarinic receptors and enkephalins for release of acetylcholine in guinea-pig longitudinal ileal muscle. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts C443, 173.
- RICHTER, J.A., WESCHE, D.L., FREDERICKSON, R.C.A. (1978): K^+ -Stimulated release of Leu- and Met-enkephalin from rat striatal slices in vitro. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 62.
- RIGTER, H., BERENDSEN, H., CRABBE, J.C., DE WIED, D. (1978): Activity of naloxone in an animal test predictive of clinical antipsychotic activity. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 105.
- ROSS, L.L., GERSHON, M.D. (1972): Electron microscopic radioautographic and fluorescence localization of sites of 5HT uptake in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J. Cell. Biol.* 55:220a.
- ROSS, M., GHAZAROSSIAN, V., DENT, R., COX, B.M., GOLDSTEIN, A. (1978): μ -Endorphin in plasma. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 65.
- SAWYNOK, J., JHAMANDAS, K.H. (1976): Inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerves by adenosine, adenine nucleotides and morphine. Antagonism by theophylline. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 197, 2, 379-390.
- SCHILLER, P.W., YAM, C.F., LIS, M. (1977): Evidence for Topographical Analogy between Methionine-Enkephalin and Morphine Derivatives. *Biochemistry*, 16, N°9, 1831-1838.

- SCHULZ, R., GOLDSTEIN, A. (1973): The effect of catecholamines acetylcholine and serotonin on the morphine tolerant longitudinal muscle strip of guinea pig ileum. *Fed. Proc.* 32: 688 Abs.
- SCHULZ, R., CARTWRIGHT, C., GOLDSTEIN, A. (1974): Reversibility of morphine tolerance and dependence in guinea pig brain and myenteric plexus. *Nature*, 251, 329-331.
- SCHULZ, R., WUSTER, M., SIMANTOV, R., SNYDER, S., HERZ, A. (1977): Electrically stimulated release of opiate-like material from the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *European Journal of Pharmacology*, 41, 347-348.
- SEGAL, D.S., BROWNE, R.G. (1978): Behavioral activating effects of opioid peptides and opiates. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. *Abstracts*, 106.
- SHAW, J.S., TURNBULL, M.J. (1978): Structure/activity studies with some enkephalin analogues. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. *Abstracts*, 40.
- SHERMAN, A.D., MITCHELL, C.L. (1972): Effects of Morphine and pain on brain intermediary metabolism. *Neuropharmacology*, 11, 871-877.
- SHERMAN, A.D., MITCHELL, C.L. (1973): Influence of naloxone and tolerance on citric acid cycle response to morphine and pain. *Neuropharmacology*, 12, 363-366.
- SHOHAM, S., WEINSTOCK, M. (1974): The role of supersensitivity to acetylcholine in the production of tolerance to morphine in stimulated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac.*, 52, 597-603.
- SIMANTOV, R., KUCHAR, M.J., PASTERNAK, G.W., SNYDER, S.H. (1976a): The regional distribution of a morphine-like factor enkephalin in monkey brain. *Brain Res.*, 106, 189-197.
- SIMANTOV, R., SNYDER, S.H. (1976b): Elevated levels of enkephalin in morphine-dependent rats. *Nature*, 262, N°5568, 505-507.

- SIMANTOV, R., CHILDERS, S.R., SNYDER, S.H. (1978): The opiate receptor binding interactions of ³H-methionine enkephalin, an opioid peptide. *European Journal of Pharmacology*, 47, 319-331.
- SIMON, E.J., HILLER, J., EDELMAN, I. (1975a): Solubilization of a Stereospecific Opiate-Macromolecular Complex from Rat Brain. *Science*, 190, 389-390.
- SIMON, E.J., HILLER, J.M., GROTH, J., Edelman, I. (1975b): Further properties of stereospecific opiate binding sites in rat brain on the nature of the sodium effect. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 192, №3, 531-537.
- SMITH, G.D., GRIFFIN, J.F. (1978): Conformation of (Leu⁵)Enkephalin from X-ray Diffraction: Features Important for Recognition at Opiate Receptor. *Science* Vol. 199, №4334, 1214-1216.
- SMITHWICK, E.L., SHUMAN, R., FREDERICKSON, R.C.A. (1978): Structure-activity studies of opioid peptides. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 41.
- SNYDER, S.H. (1977): Los receptores de los opiáceos y sustancias opiáceas endógenas. *Scientific American*, №8, 26-40.
- SOINE, T.O., WILLETE, R.E. (1966): Analgesic agents. In Wilson, C. O., Gisvold, O., and Doegge, R.F. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 5th Ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 639.
- SOSA, R.P., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W. (1978): Biosynthesis and release of enkephalin from the myenteric plexus longitudinal muscle of guinea-pig small intestine. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 72.
- SPARBER, S.B., COLELLI, B. (1978): Foot shock mitigates the suppression of operant behavior caused by naloxone in morphine-naïve rats. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 107.

- STAVINOHA, W.B., HOSOYA, E., MARUYAMA, Y., MODAK, A.T. (1977): Regional Acetylcholine Content in Mouse Brain after Morphine Tablet Implantation. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 225, 58-63.
- STEWART, J.M., GETTO, C.J., NELDNER, K., REEVE, E. B., KRIVOVY, W.A. ZIMMERMANN, E. (1976): Substance P and analgesia. *Nature*, Vol. 262, 784-785.
- SUNANO, S., MIYAZAKI, E. (1973): Effects of Caffeine on electrical and mechanical activities of guinea pig taenia coli. *American Journal of Physiology*, 225, No2, 335-339.
- SYED, I.B. (1976): The Effects of Caffeine. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 16, (10), 568-572.
- TAGASHIRA, E., IZUMI, T., YANAURA, S. (1978): Mode of antagonistic action of levallorphan in rats dependent on opioids. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 13.
- TAKAGI, K., TAKAYANAGI, I., IRIKURA, T., NISHINO, K., ICHINOSEKI, N., SHISHIDO, K. (1965): Responses of the isolated ileum of the morphine tolerant guinea pig. *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.*, 158, 39-44.
- TERENIUS, L., WAHLSTROM, A. (1974): Inhibitor(s) of narcotics receptor binding in brain extracts and cerebrospinal fluid. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 35: Suppl. 1, 55.
- TERENIUS, L., WAHLSTROM, A. (1975): Search for an Endogenous Ligand for the Opiate Receptor. *Acta Physiol. Scand.*, 94, 74-81.
- THOMPSON, J.W. (1960): The cat's nictitating membrane as an isolated preparation. Ph. D. Thesis, University of London.
- TRENDELENBURG, U. (1957): The action of morphine on the superior cervical ganglion and on the nictitating membrane of the cat. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 12, 79-85.
- URCA, G., FRENK, H., LIEBESUND, J.C., TAYLOR, A.N. (1977): Morphine and Enkephalin: Analgesic and Epileptic Properties. *Science*, 197, 83-86.

- VAN NUETEN, J.M., LAL, H. (1974): Naloxone Induced Facilitation of Contractions, Spontaneous Activity and Tolerance to Morphine in Ileum of Morphine-Dependent Guinea-Pigs. Arch. int. Pharmacodyn., 208, 111-999.
- VEDERNIKOV, Y.P. (1969): Interaction of amphetamine apomorphine, disulfiran with morphine and the role played by catecholamines in morphine analgesic action. Arch. int. Pharmacodyn., 182, №1, 59-64.
- VEDERNIKOV, Y.P., AFRIKANOV, I.I. (1969): On the role of a central adrenergic mechanism in morphine analgesic action. J. Pharm. Pharmac., 21, 845-847.
- VERSTEEG, D.H.G., DE KLOET, E.R., DE WIED, D. (1978): Effects of endorphins on regional α -MPT-induced catecholamine disappearance in rat brain. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 77.
- WALDECK, B. (1972): Increased accumulation of (³H) catecholamines formed from (³H) dopa after treatment with caffeine and aminophylline. J. Pharm. Pharmacol., 24, 654-655.
- WARD, S.J., METCALF, G., REES, J.M.H. (1978): Effects of proposed μ - κ -and σ -agonists in rodents. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 114.
- WATERFIELD, A.A., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W. (1976): Cross tolerance between morphine and methionine-enkephalin. Nature, 260, 624-625.
- WATERFIELD, A.A., SMOKEUM, R.W.J., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W., HENDERSON, G. (1977): In vitro pharmacology of the opioid peptides, enkephalins and endorphins. European Journal of Pharmacology, 43, 107-116.
- WAY, E.L., LOH, H.H., SHEN, F. (1969): Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. J. Pharmac. exp. Ther., 167, 1-8.
- WEI, E., SIGEL, S., WAY, E.L. (1975): Regional sensitivity of the rat brain to the inhibitory effects of morphine on wet shake behavior. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics., 193 (1), 56-63.

- WEI, E., LOH, H. (1976): "Physical dependence on opiate-like peptides". *Science*, 193, 1262.
- WILSON, D.F. (1973): Effects of caffeine on neuromuscular transmission in the rat. *American Journal of Physiology*, 225, №4, 862-865.
- ZIEGLANSBERGER, W., SIGGINS, G., BROWN, M., VALE, W., BLOOM, F., (1978): Actions of neurotensin upon single neurone activity in different regions of the rat brain. 7eme Congrès International de Pharmacologie. Abstracts C300, 126.
- ZIOUDROU, C., KLEE, W.A. (1978): Exorphins-Peptides with opioid activity derived from wheat gluten and α casein. International narcotic research conference. Characteristics and function of opioids. Abstracts, 43.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION	pag.
1. Liberación de acetilcolina en el intestino de cobayo	2
2. Opiáceos	7
Figuras de receptores opiáceos	4 6
3. Endorfinas	5 4
Figuras de endorfinas	7 7
4. Sustancia P	8 0
5. Cafeína y bases xánticas	8 3
II. MATERIAL Y METODOS	
1. Preparación	9 1
2. Composición del líquido nutritivo	9 2
3. Estimulación eléctrica de la preparación	9 5
4. Fármacos utilizados	9 6
5. Tipos de ensayos	1 0 1
6. Análisis estadístico	1 0 9
III. RESULTADOS .	
1. Curvas dosis-respuesta de morfínomiméticos	1 1 2
2. Efecto de la cafeína. Antagonismo de los morfí- nomiméticos y la cafeína	1 4 2
3. Relación respuesta-frecuencia. Relación respues-	

ta-frecuencia en presencia de cafeina	156
4. Choques de frecuencia elevada	160
5. Respuestas de los morfínicos en presen- cia de bacitracina	171
6. Adicción	175
7. Curva dosis-respuesta con AMPc. Respuesta de AMPc en presencia de propranolol	191

IV. DISCUSION

Curvas dosis-respuesta con estímulo simple	197
Curvas dosis-respuesta con trenes de estímulo	204
Efectos de la cafeina	209
Choques de frecuencia elevada	210
Respuesta de los morfínicos en presencia de bacitracina	212
Animales adictos	213
Pérdidas de peso	218
Efectos del AMPc	219

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFIA

