

POSIBLE PAPEL FISIOLÓGICO DE ALGUNAS ENCEFALINAS

*URIEL ESTRADA-ROBLES

**FRED LUX

RESUMEN

La administración intratecal (i.t.) en la región lumbar baja de dosis altas de (—)—morfina, (25-50 µg) en ratones, (125 µg) en ratas jóvenes, produjo casi de inmediato un espectacular síndrome conductual con duración de 30-45 min., que se caracterizó principalmente por agresividad, rascado intenso y persistente de las patas y espalda, convulsiones tónico-clónicas y mortalidad. Además, estos fenómenos se acompañaron de una caída notable en los niveles sanguíneos de glucosa que se inició a los 15 ó 30 min., fue máxima en 30-60 min. y duró aproximadamente 3 horas. La hipoglicemia brusca producida por (—)—morfina i.t. resultó ser bastante específica ya que no se observó con otros varios opioides administrados intratecalmente incluyendo (+)—morfina la cual causó un cuadro conductual parecido al del enantiómero natural. Un efecto hipoglicémico similar solamente, es decir sin otras manifestaciones conductuales, también se observó con la administración i.t. de [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-encefalina (DAGO), 2-15 µg; y en menor cuantía con [D-Ser²]-Leu-encefalina-Tre (DSLET), 5-10 µg. Dosis altas de DAGO i.t., 50 µg, resultaron completamente atóxicas.

Las características farmacocinéticas de la hipoglicemia producida por (—)—morfina i.t. sugieren que esta droga probablemente activa mecanismos endógenos de tipo encefalinérgico, sin embargo, y mucho más importante aún, revela el hecho de que algunas encefalinas pueden regular el paso de glucosa al interior de las células nerviosas. Esta fuerte respuesta hipoglicémica del DAGO, que es proporcional a la dosis y se produjo en animales con o sin ayuno no ha sido descrita con anterioridad. Se postula la existencia de un sistema hormonal doble para la captura intracelular de glucosa, que consiste en encefalinas para los tejidos nerviosos e insulina para otros tipos de células; constituyendo aquéllas una parte muy importante, pero prácticamente desconocida, de los mecanismos fisiológicos responsables de la homeostasis de la glucosa en los vertebrados.

Palabras clave: Diabetes Mellitus; Encefalinas, glucosa, homeostasis, insulina

Opioides: Morfina intratecal

Neuropéptidos.

SUMMARY

Intrathecal (i.t.) administration of high doses of (—)—morphine, (25-50 µg) into the lower lumbar region of mice, or (125 µg) in young rats, caused an almost immediate striking behavioral syndrome that lasted 30-45 min. which was characterized mainly by aggressiveness, persistent intense scratching of the limbs and back, tonic-clonic seizures and lethality. Furthermore, these phenomena were accompanied by a marked drop in blood-glucose levels that started in 15-30 min., peaked at 30-60 min. and lasted approximately 3 hours. The sudden hypoglycemia produced by i.t. (—)—morphine was found to be quite specific since it was not observed with several other opioids given intrathecally, including (+)—morphine which also caused a comparable behavioral pattern to its natural enantiomer. A similar hypoglycemic effect only, that is without any behavioral manifestations, was also observed with i.t. administration of [D-Ala²,N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol] enkephalin (DAGO), 2-15 µg; and to a lesser extent with [D-Ser²]-Leu-enkephalin-The (DSLET), 5-10 µg. Higher doses of i.t. DAGO, 50 µg, were completely non-toxic.

Pharmacokinetic characteristics of hypoglycemia by i.t. (—)—morphine suggest that this drug probably activates enkephalinergic mechanisms, but far more importantly, however, it reveals the fact that some enkephalins may regulate glucose uptake in nerve cells. This strong dose-dependent hypoglycemic response produced in both normal or fasted mice by DAGO has not been reported previously. It is postulated that there is a dual-hormonal system for cellular-glucose uptake consisting of enkephalins in nervous tissues and insulin for other types of cells, the former being a very important, yet poorly understood, part of physiological mechanisms responsible for glucose homeostasis in vertebrates.

*Investigador asociado.

**Alumno de Posgrado.

Trabajo elaborado en el Departamento de Farmacología y Toxicología.

Colegio Médico de Virginia. Virginia Commonwealth University, Richmond Va 23248-001 USA.

Recibido: 18 de enero de 1988. Aceptado: 15 de febrero de 1988.

Sobretiros: Uriel Estrada-Robles, Castilla 82, Col. Alamos, 05400 México, D.F.

Desde que la técnica para inyecciones intratecales fue inicialmente descrita en 1980,¹ ha habido un aumento del número de trabajos experimentales para analizar respuestas farmacológicas de varias drogas, principalmente analgésicos opiáceos, en animales no anestesiados cuando se administran directamente en esa zona del sistema nervioso central (SNC). Se ha demostrado que dosis muy pequeñas, 0.2-0.5 μg , de (—)—morfina i.t. tienen efectos antinociceptivos observados en pruebas del levantamiento de la cola en ratones.^{2,3} En el otro extremo del espectro de dosis, cantidades 100 veces mayores de (—)—morfina, 25-50 μg , administradas por la misma vía a ratones normales produjeron en 1 o 2 min., un espectacular y típico síndrome que ha sido reportado recientemente,⁴ y que se caracterizó fundamentalmente por rascado intenso y constante de las patas y la región dorsolumbar, agresividad, convulsiones tónico-clónicas y letalidad. Estos efectos duraron 30 a 45 min. y no fueron antagonizados con naloxona inyectada por vía subcutánea.⁴ Se ha descrito que un cuadro conductual parecido también se observó en ratas adultas inyectadas intratecalmente con 150 μg de (—)—morfina.⁵

En los ratones resultó aun más interesante observar una marcada hipoglicemia después de la inyección de (—)—morfina, efecto que duró 3 o más horas. El descenso de la glicemia a niveles muy bajos no se evitó con la administración previa de glucosa a los animales lo cual resultó paradójico. La caída de la glucosa sanguínea también se observó en ratones con diabetes producida por estreptozotocina y en ratones con diabetes transmitida genéticamente. Esta fuerte hipoglicemia producida por (—)—morfina i.t. se evitó únicamente seccionando la médula espinal a nivel T-10, T-11.⁴

Los efectos antinociceptivos de opiáceos y neuropéptidos i.t. han sido ampliamente estudiados en animales,⁵⁻⁷ y en menor escala hay trabajos sobre su uso como analgésicos en pacientes;⁸⁻¹⁰ por el contrario hay muy pocos informes sobre sus efectos en el metabolismo de la glucosa. La administración parenteral de (—)—morfina, por otras rutas distintas a la i.t. a nivel espinal, generalmente produjo hiperglicemia en los animales experimentales.^{11,12} Otros informes sobre el metabolismo de la glucosa en preparaciones *in vitro* mostraron que se aumentó la glucogenólisis en hepatocitos aislados,¹³ o que careció de efectos en el metabolismo cerebral de glucosa, a dosis bajas,¹⁴ pero que con dosis altas aumentó la captura de glucosa en cortes de tejido cerebral.¹⁵ Para ahondar en la investigación de este intrigante fenómeno de la hipoglicemia causada por (—)—morfina i.t. y tratar de averiguar el mecanismo fisiológico subyacente responsable de dicho efecto, se llevaron a cabo una serie de experimentos. Inicialmente

se realizó un cernimiento de actividad hipoglicémica con varios (—)—, (+) y (\pm)— opiáceos. Después se hizo una búsqueda sistemática entre varios neuropéptidos para averiguar si algunos de ellos producían hipoglicemia al inyectarse por vía i.t.

MATERIAL Y METODO

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos ICR-Suizos, de 25-35 g, (Dominion Laboratory Animals, Dublin VA). Se incluyó un grupo experimental de 7 ratas jóvenes, machos y hembras, para corroborar si el efecto hipoglicémico de la (—)—morfina ocurría en otra especie animal. En los primeros experimentos animales descritos como normales tuvieron acceso libre a la comida y el agua, otra serie de experimentos incluyó ratones en ayuno de 24 horas solo con acceso a beber agua *ad libitum*. Todas las inyecciones i.t. se llevaron a cabo de acuerdo a la técnica descrita inicialmente por Hylden y Wilcox,¹ modificada por Lux.⁴ Brevemente descrita consistió en sujetar firmemente un ratón no anestesiado por la espalda y pelvis con una mano, cubriendo la parte superior del animal con una toalla de papel, después se estiró la piel de la región lumbar entre el pulgar e índice. Al mismo tiempo con la otra mano se inyectó intratecalmente un volumen de 5 μl utilizando para ello una jeringa de 50 microlitros modelo 705-LT (Hamilton Co. Reno, NV) a través de una aguja calibre 30 \times 13 mm. La aguja se insertó en la piel en dirección cefálica en un ángulo aproximado de 30° y se dirigió cuidadosamente entre las láminas transversas de las vertebrae L-5, L-6 hasta llegar al espacio subaracnoideo. Por otra parte puncionando con un tubo capilar heparinizado el seno retro-orbital derecho se tomaron muestras de sangre, 20-40 μl , a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min. Luego se procedió a colocar una gota de sangre sobre el área correspondiente de una tira reactiva Glucostix (Ames) para determinar la cantidad de glucosa en la muestra por medio de una reacción enzimática de glucosa-oxidasa. Los resultados en mg % aparecieron en la carátula de un foto-reflectómetro portátil (Glucometer II, Miles Laboratories Inc., Elkhart, IN) que se calibró previamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las drogas, en forma de sales correspondientes, se obtuvieron de los siguientes proveedores: sulfato de (—)—morfina, alcaloide de (—)—morfina (disuelto como HCl), clorhidrato de (—)—codeína (Mallinckrodt, St. Louis, MO), bromhidrato de levometorfan, tartrato de levorfanol (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ), clorhidrato de (—)—naloxona (Endo, Garden City, NY), clorhidratos de (—)—, (+)— y (\pm)—metadona (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN), metanosulfonato

de (—)-cetociclazocina, lactatos de (—)-, (+)- y (±)-pentazocina (Sterling-Winthrop Research Institute, Rensselaer, NY), metanosulfonato de (±)-U-50488 (Upjohn Co., Kalamazoo, MI), clorhidrato de (—)-etil morfina (S.B., Penick & Co., Newark NJ), bromhidratos de (+)-morfina, y (+)-codeína, clorhidratos de (—)-diacetilmorfina, (—)- y (+)-Nalilnormetazocina (NANM), bromhidrato de (+)-naloxona, clorhidrato de (—)-naltrexona (NIH, Rockville, MD), Met-enkefalina, [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-encefalina (DAGO), [D-Ser²]-Leu-enkefalina-Tre (DSLET), [D-Ala²]-Met-enkefalina (DAME), Leu-enkefalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), [D-Pen², 5]-encefalina (DPDPE) (Peninsula Laboratories, Belmont, CA), solución USP estéril y libre de pirógenos, 0.9% NaCl (Salina), (Elkins-Sinn Inc, Cherry Hill, NJ).

Los tratamientos con solución salina o droga se asignaron al azar a grupos diferentes de 6 o 12 ratones. Los resultados se expresaron en mg %. El promedio \pm e.e., y también los cambios en porcentajes, se calcularon en cada uno de los intervalos de prueba en todos los experimentos. El análisis estadístico para calcular los valores de *p* que expresan los niveles de significancia, entre columnas de datos, se hicieron en una computadora Macintosh Plus usando un programa Statview para análisis de varianza (ANOVA) de un solo sentido. Las diferencias que resultaron significativas al comparar contra la línea basal se expresaron en cuadros y figuras como **p* < .05 y ***p* < .01.

RESULTADOS

Experimentos en animales normales. En esta primera serie de trabajos grupos de 6 ó 12 animales, se inyectaron intratecalmente con distintos isómeros de opiáceos o antagonistas de la morfina, generalmente en dosis de 50 μ g/ratón; excepto cuando se indica otra cantidad. Los animales de grupos control recibieron 5 μ l de solución salina.

Manifestaciones conductuales. Como se mencionó con anterioridad, el aparatoso síndrome de agresividad y convulsiones se observó en todos los animales inyectados con (—)-morfina i.t. esto incluyó a las ratas jóvenes las que además emitieron una vocalización muy intensa. Junto con este patrón conductual otras manifestaciones objetivas observadas fueron: piloerección, cola tiesa y levantada (Straub) y una hipermotilidad caracterizada por caminatas rápidas en círculos en la periferia de las jaulas. Otros opiáceos que mostraron un síndrome conductual como el de (—)-morfina, aunque de menor intensidad y duración más corta fueron: (—)-etil morfina, (—)-codeína y (—)-diacetilmorfina. Esta última droga además produjo una diaforesis

intensa y profusa. Por otro lado, en forma inesperada, la (—)-naloxona y la (—)-naltrexona también produjeron un patrón similar de duración ultracorta (2-5 min.).

La (+)-morfina i.t. causó un síndrome parecido pero que resultó aún más espectacular porque todos los animales además manifestaron fuertes y persistentes chillidos, pelearon ferozmente entre ellos, exhibieron una hiperreflexia marcada y mostraron episodios de grandes saltos súbitos dentro de las jaulas. Esta conducta duró 15-30 min., lapso durante el cual fue casi imposible manejar a los animales sin ser mordido. Resultó muy notorio que los niveles de glucosa en sangre con la (+)-morfina permanecieron por arriba de la línea basal durante todo el transcurso de las sesiones experimentales. Un síndrome parecido al producido por (+)-morfina, pero de menor intensidad, también se observó con (+)-codeína o (+)-naloxona i.t. Otros opiáceos que no alteraron visiblemente la conducta en los ratones fueron (±)-U-50488 (un agonista específico de tipo kapa), (—)-metadona, (±)-metadona, 100 μ g, (—)- y (+)-pentazocina 50 μ g.

Cambios en los niveles sanguíneos de glucosa. El promedio de la glicemia en grupos control fue de 166 \pm 5 mg% (figura 1). En términos generales, la mayoría de los opiáceos y también la solución salina produjeron hiperglicemia en los ratones normales que se inició en 15 min. después de la inyección i.t., alcanzó un valor máximo a los 30-60 min. y duró aproximadamente 3 horas. Las drogas que se mencionan a continuación produjeron una respuesta hiperglicémica similar a la de solución salina en animales normales (no se detallan los resultados), levometorfán 50 μ g, (—)-metadona 50 μ g, (±)-metadona 100 μ g, (—)- y (+)-naloxona 50 μ g, (—)-naltrexona 50 μ g y (+)-pentazocina 50 μ g.

Los neuropéptidos en esta misma categoría, es decir hiperglicémicos, fueron β -endorfina (fragmento 1-27)

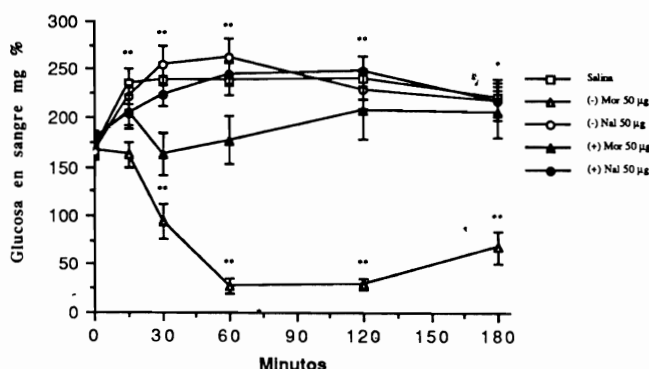


Figura 1. Inyecciones intratecales en ratones sin ayunar. Solamente los cambios inducidos por la (+)-morfina no resultaron significativamente diferentes de los niveles basales de glucosa.

1.3 μg , leu-encefalina 10 μg , met-encefalina 10 μg y DPDPE 5 μg . La (—)—codeína mostró durante todo el curso de los experimentos una tendencia a neutralizar la subida de la glucosa que se observó en los grupos control. La (+)—codeína mostró así mismo una tendencia a no producir cambios durante la primera hora, aunque a los 120 y 180 min., produjo un efecto hiperglicémico obvio.

Por otra parte, en dirección opuesta, casi de manera exclusiva la (—)—morfina en forma de sulfato o clorhidrato mostró claramente un efecto hipoglicémico en todos los animales, esta respuesta tuvo una latencia de 15 min., fue máxima cerca de los 60 min. y duró más de 3 horas tiempo después del cual se observó una clara tendencia hacia la recuperación de la homeostasis. En algunos casos la caída brusca de la glucosa llegó a niveles muy bajos (0-20 mg %), sin embargo la mortalidad no se correlacionó con la hipoglicemia. La diacetilmorfina produjo un efecto hipoglicémico leve que resultó significativo, $p < .05$, solamente a los 30 min. ($-15.7 \pm 0.9\%$) con una tendencia a mantener normoglicemia entre los 60 y 180 min. El levorfanol produjo una hipo-

glicemia muy leve a los 120 min., que no resultó significativa (-14.4 ± 1.9). El DAGO, 5 μg , produjo ligera hipoglicemia ($-11.7 \pm 2.3\%$) que fue máxima los 120 min. y a dosis de 10 μg causó hipoglicemia moderada (-22.9 ± 3.4) que también fue mayor a las 2 horas. Una dosis de 50 μg de DAGO no redujo los niveles de glucosa en sangre durante los primeros 180 minutos que siguieron a su administración i.t. en ratones normales. El cuadro I muestra algunos ejemplos de agonistas que actúan sobre diferentes tipos de receptores opiáceos, sus efectos al transcurrir los tiempos de observación, se expresan como cambios en los porcentajes de las glicemias comparados con la línea basal.

La figura 1 muestra el efecto de la solución salina i.t. y los isómeros de morfina y naloxona en animales sin ayunar, $n = 12$ por grupo.

Todos los antagonistas de narcóticos estudiados y ambos isómeros de la pentazocina, que tiene efectos mixtos como agonista y antagonista, produjeron hiperglicemia por más de 3 horas, como se expresa en el cuadro II que muestra los resultados en cambios de porcentajes de experimentos de 6 ratones por cada droga. Los

CUADRO I
EFECTOS DE AGONISTAS OPIACEOS I.T. SOBRE LA GLICEMIA EN RATONES NORMALES¹

DROGA 50 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$	15	30	60	120	180
Salina	$51.1 \pm 2.6^{**}$	$58.2 \pm 2.6^{**}$	$69.2 \pm 5.4^{**}$	$68.1 \pm 3.6^{**}$	$49.5 \pm 3.5^{**}$
(—)—Morfina	-9.2 ± 1.3	$-43.4 \pm 13.3^*$	$-81.5 \pm 30.6^{**}$	$-82.7 \pm 27.6^{**}$	$-52.6 \pm 10.3^{**}$
(+)—Morfina	$31.6 \pm 2.5^*$	8.9 ± 1.2	$31.1 \pm 1.2^{**}$	$53.2 \pm 5.3^{**}$	$46.8 \pm 3.5^{**}$
(—)—Cetociclazocina	$31.1 \pm 1.8^{**}$	$43.5 \pm 3.9^{**}$	$42.7 \pm 3.9^{**}$	$33.2 \pm 1.7^{**}$	19.2 ± 1.2
(±)—U-50488	$60.0 \pm 4.2^{**}$	$90.6 \pm 4.0^{**}$	$73.3 \pm 6.3^{**}$	$26.1 \pm 2.8^{**}$	16.7 ± 1.2
(—)—NANM ²	$36.3 \pm 2.0^*$	$40.0 \pm 2.7^{**}$	$45.0 \pm 2.5^{**}$	24.4 ± 1.5	23.1 ± 1.8
(+)—NANM	$56.3 \pm 2.2^{**}$	$76.8 \pm 5.2^*$	$66.6 \pm 6.2^{**}$	$52.8 \pm 5.1^{**}$	$38.0 \pm 4.1^{**}$

Datos = Δ % de promedios \pm e.e. comparados con la línea basal.

¹ Ratones machos ICR Suizos, sin ayunar, $n = 6$ por grupo.

² N-alilnormetazocina.

* $p < .05$, ** $p < .01$ comparando con valores previos a la droga (ANOVA de un solo sentido).

CUADRO II
EFECTOS DE INYECCIONES INTRATECALES DE AGONISTAS PUROS O PARCIALES SOBRE LA GLICEMIA DE RATONES NORMALES¹

Droga. 50 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$	15	30	60	120	180
(—)—Naloxona	$51.3 \pm 2.1^{**}$	$86.1 \pm 5.6^{**}$	$98.7 \pm 4.1^{**}$	$76.5 \pm 6.6^{**}$	$62.0 \pm 7.8^*$
(+)—Naloxona	5.6 ± 0.5	14.2 ± 0.8	$28.4 \pm 1.5^{**}$	$42.6 \pm 2.1^{**}$	$25.4 \pm 1.5^{**}$
(—)—Naltrexona	$29.4 \pm 2.6^*$	$33.8 \pm 3.2^*$	$36.9 \pm 2.9^{**}$	$41.3 \pm 2.6^{**}$	13.8 ± 0.8
(—)—Pentazocina	$38.8 \pm 1.7^{**}$	$49.3 \pm 2.9^{**}$	$35.5 \pm 3.1^*$	$47.4 \pm 0.2^*$	50.0 ± 7.7
(+)—Pentazocina	$46.8 \pm 3.9^{**}$	$91.4 \pm 0.3^{**}$	$82.0 \pm 8.1^{**}$	$55.4 \pm 7.7^*$	$53.2 \pm 5.0^{**}$

Datos = Δ % de promedios \pm e.e. comparados con la línea basal.

¹ Ratones machos ICR Suizos, sin ayunar, $n = 6$ por grupo.

* $p < .05$, ** $p < .01$ comparando con valores previos a la droga (ANOVA de un solo sentido).

valores típicos del grupo control pueden ser consultados en el cuadro I mostrada anteriormente.

La (—)—naloxona, 10 μ g, y la (—)—morfina 50 μ g, administradas ambas intratecalmente con 5 minutos de diferencia, potenciaron la letalidad ya que todos los animales de este grupo ($n = 6$) murieron durante la primera media hora. La (—)—naloxona, 10 μ g, i.t. no antagonizó el efecto hipoglucémico de la (—)—morfina, 38 μ g, i.t. (no se detallan los resultados) y aquella potenció la toxicidad de la (—)—morfina ya que 3 animales murieron durante los primeros 30 min. y solo uno sobrevivió más de 3 horas.

En 7 ratas sin ayunar, de 20 días de edad, la (—)—morfina, 125 μ g, i.t. causó una profunda hipoglucemia (datos no pormenorizados) que fue máxima a los 60 min. y duró más de 3 horas. El cambio máximo observado fue de -86.5% comparado con la línea basal.

Pruebas con animales en ayunas. En esta segunda serie de experimentos a los animales se les retiró la comida durante 24 horas previas a las inyecciones i.t. pero tuvieron acceso libre al agua. Incluyó grupos de 6 ó 12 ratones. Los únicos opiáceos estudiados en animales en ayunas fueron la (—)—morfina y la (—)—naloxona, además de otros neuropéptidos que después se mencionan.

Únicamente la (—)—morfina produjo hipoglucemia y resultó más potente que en los animales sin ayunar. Además de los grupos inyectados con solución salina se incluyó en esta serie otro grupo control al que no se le inyectó ninguna droga por vía i.t. Los resultados observados se muestran en la figura 2.

Manifestaciones conductuales. Como era de esperarse la (—)—morfina, 25 μ g, i.t., produjo el mismo cuadro observado en animales sin ayunar. Las convulsiones fueron más severas, se acompañaron de opistotonus, priapismo y eyaculación en algunos ratones. La (—)—morfina, 10 μ g, i.t. no causó convulsiones pero todavía se observó en los animales un rascado leve de las patas. La met-enkefalina, DAME, DSLET y DAGO no alteraron para nada la conducta normal.

Efectos sobre la glucosa sanguínea. El promedio de la glicemia en ayunas fue de 97 ± 6 mg % en un grupo control representativo. Se observó hiperglicemia en el grupo que no fue inyectado y en aquellos tratados con solución salina (—)—naloxona, met-enkefalina, o DAME. La dosis óptima de (—)—morfina para producir hipoglucemia fue de 25 μ g, aunque una dosis menor, 10 μ g, produjo una caída insignificante de los niveles de glucosa en la sangre. Los resultados respectivos se presentan en el cuadro III y en la figura 2.

El DSLET, 5 μ g, (no se muestra el curso temporal de los efectos) produjo hipoglucemia a los 60 min. (-17.9 ± 1.4) que resultó significativamente diferente solo comparando con el grupo control ($p < .01$). Este péptido a dosis de 10 μ g, produjo un descenso de la glicemia a los 30 y 60 min. (Tabla III) que tampoco resultó significativo comparado contra la línea basal y sólo fue diferente comparado contra el grupo control ($p < .01$). Finalmente para demostrar el efecto hipoglucémico

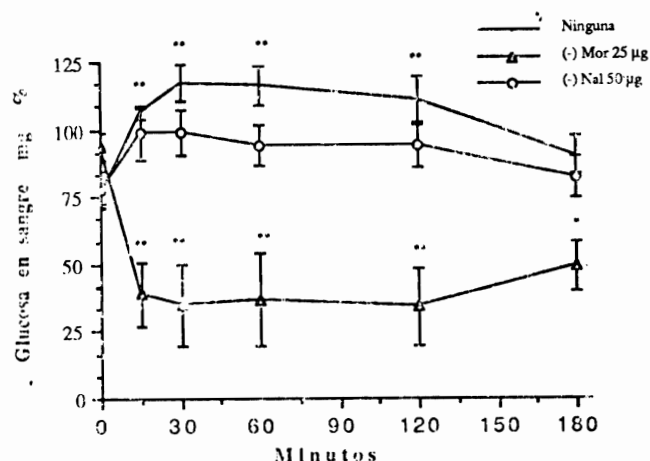


Figura 2. Inyecciones intratecales en ratones en ayunas. Obsérvese el efecto máximo a los 30-60 min. y que la meseta y duración fueron más prolongados. Nótese que los niveles basales de glucosa son como la mitad de los encontrados en ratones sin ayunar. La curva de salina (no representada) fue similar al del grupo que no recibió inyecciones. $N = 6$ por grupo.

CUADRO III
EFECTOS DE INYECCIONES I.T. DE OPIACEOS EN LA GLICEMIA DE RATONES EN AYUNAS¹

DROGA	15	30	60	120	180
Salina	24.7 \pm 1.1**	31.2 \pm 1.8**	25.8 \pm 2.2*	23.7 \pm 1.4*	5.4 \pm 0.3
(—)—Morfina	19.3 \pm 2.3	- 8.4 \pm 1.7	- 22.9 \pm 4.7	- 21.7 \pm 2.7	- 15.7 \pm 1.8
Met-enkefalina	29.7 \pm 2.5*	34.2 \pm 5.3*	21.6 \pm 1.6	17.1 \pm 1.3	12.6 \pm 0.4*
DSLET	34.2 \pm 3.9	- 7.6 \pm 1.4	- 29.1 \pm 5.7	6.3 \pm 0.8	2.5 \pm 0.2
DAME ²	70.5 \pm 3.7**	75.4 \pm 4.9**	68.0 \pm 4.6**	58.2 \pm 5.4**	34.4 \pm 2.9**

Datos = Δ % de promedios \pm e.e. comparados con la línea basal.

¹ Ratones machos ICR Suizos, sin ayunar, $n = 6$ por grupo.

² Dosis = 5 μ g/5 μ l

* $p < .05$, ** $p < .01$ comparando con valores previos a la droga (ANOVA de un solo sentido).

del DAGO, que fue proporcional a la dosis, se inyectaron 5 distintas dosis de este neuropéptido en grupos de 12 ratones cada uno. Los resultados se muestran en forma gráfica en la figura 3.

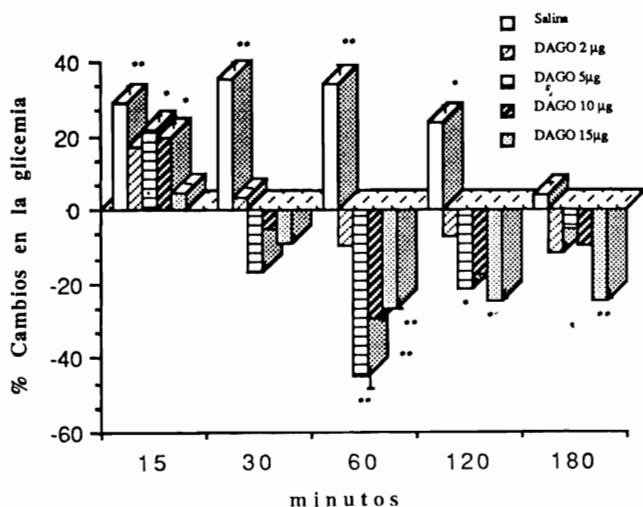


Figura 3. Inyecciones intratecales de DAGO en ratones en ayunas. Nótese que la dosis más baja no produjo hipoglicemia a los 30 ni a los 180 min. También obsérvese que los efectos de la dosis mayor fueron más duraderos.

DISCUSION

La primera respuesta observada en ratones inyectados intratecalmente con morfina, 50 µg, en estos experimentos así como en un estudio previo,⁴ fue el rascado que se ha atribuido a un intenso prurito, ya que se ha mencionado que ese síntoma también ocurre en pacientes.^{9, 16} El mecanismo íntimo de este fenómeno se desconoce, aunque la histamina, la substancia P, la glicina la serotonina, y otros mediadores han sido incriminados como sustancias causales.^{5, 16}

Se supone que el rascado o la comezón son efectos inespecíficos ya que no fueron antagonizados por la (—)—naloxona.⁴ Resultó interesante el hecho de que la (+)—morfina también produjo intenso rascado, este hecho hasta ahora era desconocido e indica que el efecto no es estereoespecífico. Previamente han sido descritas otras acciones farmacológicas del isómero artificial de la morfina, lo que llevó a suponer la existencia de diferentes sub-tipos de receptores mu para explicar sus acciones.¹⁷ Sin embargo, la observación del rascado fugaz producido por (—)—naloxona y (—)—naltrexona en este trabajo indica que el prurito probablemente se debe más a una irritación local de tipo físico-químico producida cuando dosis muy altas de algunos opiáceos se inyectan en la región lumbar baja del SNC y no a un efecto mediado a través de un receptor específico. El punto principal a discutir es señalar que el rascado ocurre independientemente de las propiedades analgésicas

o hipoglicémicas de este tipo de compuestos.

Por otra parte, la carencia de efectos hipoglicémicos o conductuales de ciertos opiáceos abre la posibilidad para su aplicación clínica con la idea, al menos teórica, de encontrar en el futuro un analgésico con un índice terapéutico superior al de la (—)—morfina para uso i.t.

También es difícil determinar la causa íntima de las convulsiones producidas por el alcaloide natural. Primero se pensó que las convulsiones se debían a los bajos niveles de glucosa, pero los resultados de experimentos con ratones diabéticos no apoyaron dicha conclusión.⁴ Después se tuvo la idea de que la velocidad en la caída de la glucosa circulante era más importante en provocar convulsiones y no los niveles bajos del carbohidrato *per se*. Fundamentalmente esta interpretación resultó inadecuada cuando se observó que los animales inyectados con (+)—morfina i.t., que produjo hiperglicemia, también se convulsionaron. Sin embargo, el aumento en la intensidad de las convulsiones observado en ratones en ayunas sugiere que si los niveles de glucosa no son un factor etiológico directo al menos pueden influir en su intensidad. Es obvio que la cantidad de glucosa en los espacios extra e intracelulares pueden alterar el nivel de excitabilidad del SNC. Resulta importante enfatizar que ninguno de los péptidos i.t. produjeron convulsiones por lo que puede deducirse que éstas y el rascado son fenómenos independientes de la hipoglicemia profunda producida por (—)—morfina i.t.

Desde el siglo pasado, en los inicios de la farmacología experimental, Claudio Bernard fundó las bases para analizar científicamente el metabolismo de los carbohidratos. Primero con su concepto de homeostasis, al declarar el principio de la constancia del "medio interno", permitió no sólo definir los valores de la euglicemia sino que también es una idea clave para entender los sistemas fisiológicos de autorregulación. Ese autor además señaló que "el jugo pancreático juega un papel importante en la digestión de grasas y también de carbohidratos y proteínas". Más tarde, en 1855, él mismo descubrió el glicógeno y declaró su "importancia para el almacenamiento y la liberación del azúcar".¹⁸ Más aún, Bernard también demostró que la morfina inyectada en el 4o. ventrículo produce hiperglicemia en los conejos.¹²

Los cambios en los niveles sanguíneos de glucosa son difíciles de interpretar en los animales conscientes, porque además de las influencias de varias respuestas autónomas hay muchos nutrientes, fundamentalmente glucosa y hormonas como incretinas, secretina y varias otras del tracto gastrointestinal que estimulan la secreción de insulina *in vitro* e *in vivo*. Otros compuestos como el glucagon, cortisol, epinefrina, hormona del crecimiento y varios neuropéptidos, que se encuentran en todo el organismo, juegan papeles muy importantes en la homeostasis de la glucosa en un contexto de interacción

nes muy complejas. En términos generales estos moduladores endógenos producen hiperglicemia o evitan que ocurra una hipoglicemia por exceso de insulina.¹⁹ En los experimentos incluidos en este trabajo la regla fue observar hiperglicemia, por lo que esta respuesta no es muy específica y puede deberse a distintos mecanismos. La observación de que en ratones que ni siquiera fueron inyectados por vía i.t. ocurrió una hiperglicemia demostraron que solo el hecho de inmovilizar a un ratón no anestesiado para tomar muestras de sangre altera la glicemia, esto significa que elevaciones ligeras y aun moderadas de la glucosa no deben catalogarse categóricamente como verdaderas hiperglicemias. Esto es especialmente cierto cuando se comparan los efectos temporales con los grupos control ya que la solución salina por sí misma produjo un aumento del 70% en los valores sanguíneos de glucosa a los 60 min. lapso que coincide con el efecto máximo de la mayoría de los opiáceos. El caso de una respuesta hiperglicemia de la (—)—naloxona i.t. que duplicó el nivel de glucosa a los 60 min. puede considerarse, con cierta cautela, como antagonico al efecto hipoglicémico de la (—)—morfina. De cualquier forma el mecanismo de la elevación de la glucosa sanguínea en el animal íntegro muy probablemente refleja la estimulación de sistemas catecolaminérgicos debido a la situación estresante o adversa de manejar y sujetar brevemente a los animales.

Al contrario del antagonismo de la hipoglicemia inducida por (—)—morfina i.t. logrado con (—)—naloxona subcutánea,⁴ en el par de experimentos aquí incluidos no fue posible confirmar dicho efecto cuando ambas drogas se administraron intratecalmente; ello destaca la importancia de la ruta de administración en la investigación de acciones farmacológicas. Sin embargo, aún la ausencia de un antagonismo bien definido, que puede interpretarse simplemente como carencia de una interacción de tipo competitivo mediada por receptores en la parte baja de la médula espinal indica la necesidad de realizar más estudios para explorar los efectos de distintas proporciones de agonistas/antagonistas para esclarecer estas dudas.

Tampoco se sabe exactamente porque la (—)—morfina administrada intracerebralmente produce hiperglicemia. Las estructuras superiores, fundamentalmente áreas hipotalámicas, son sitios precisos y contiguos para estimular o inhibir funciones homeostáticas complejas lo que hace muy difícil interpretar los efectos de drogas inyectadas directamente en el cerebro.^{14, 20, 21} Aunque la organización anatomofisiológica de la médula espinal también es compleja por su multiplicidad de receptores,²² o por las interacciones entre péptidos inyectados localmente,⁸ las inyecciones i.t. por tener una distribución local, al menos al principio,^{1, 23, 24} hacen un poco menos difícil discernir efectos farmacológicos rea-

les sobre el SNC. La idea de que la (—)—morfina es intrínsecamente una droga hipoglicémica es apoyada por observaciones hechas hace dos décadas por Takemori quien reportó un aumento del consumo de glucosa en cortes de cerebro tratadas por morfina. Por coincidencia este investigador utilizó dosis muy altas de morfina y midió el consumo de glucosa a los 60 min.¹⁵

Respecto a la hipoglicemia, que constituye el tema más importante de esta discusión, puede decirse que este efecto producido por (—)—morfina i.t. es estereoespecífico y se relaciona estrechamente con una estructura molecular bien definida. Debido a que la hipoglicemia no ocurrió con cetociclazocina, U-50488 ni con N-alil-normetazocina lo más probable es que no se lleve a cabo por estimulación de receptores kapa ni sigma, al menos en los ratones. Resulta aventurado por ahora afirmar que el efecto hipoglicémico es mediado por un mecanismo relacionado con el receptor mu o algún otro subtipo de receptor, lo cual señala la necesidad de más estudios al respecto.

En cuanto a comparar la hipoglicemia de la (—)—morfina con un mecanismo mediado a través de la insulina, debemos pensar en términos simples y referir las observaciones iniciales de Banting y Best quienes en 1921 en sus clásicos experimentos con perros pancreatectomizados fueron los primeros en reportar la hipoglicemia causada por administración i.v. de un extracto pancreático "después de la inyección el azúcar bajó de 330 a 170 mg % en una hora",²⁵ esto representa un cambio de -48.5%. Ambos compuestos, la hormona pancreática i.v. y el alcaloide i.t. poseen la misma capacidad para producir hipoglicemia en sujetos normales o diabéticos con una latencia equivalente pero aquí termina la semejanza. Hasta ahora se sabía que solamente la insulina es capaz de producir en forma directa una brusca caída del azúcar sanguíneo, tanto en animales como en seres humanos sanos y al mismo tiempo estimular la formación de glucógeno. Esta fuerte acción sobre la glucosa sanguínea de la insulina puede ser contrarrestada con una rápida infusión de glucosa, un hecho afortunado ya que una hipoglicemia profunda producida por insulina pone en peligro la vida, si se continúa durante cierto tiempo, aun en organismos sanos. Por el contrario el efecto hipoglicémico de la (—)—morfina i.t. no fue contrarrestado en los animales a los que se le dió una carga de glucosa,⁴ más aún, la (—)—morfina i.t. también produjo glicogenolisis (Han y Lux, datos no publicados), lo que concuerda con su actividad *in vitro*.¹⁵ La idea inicial de que estaba ocurriendo una liberación simultánea de insulina y glucagon en los ratones inyectados con (—)—morfina i.t. tuvo que ser abandonada teniendo en cuenta que la hipoglicemia también se presentó en los animales diabéticos. Además la activación conjunta de la glucogénesis y glucogeno-

lisis a un mismo tiempo resultaría fisiológicamente inútil; si no es que materialmente imposible.

Un análisis más cuidadoso de la hipoglicemia producida por morfina indicó que era más intensa que la mediada por la insulina y aparentemente predominaba sobre los efectos de esta última, pero la caída brusca de la glucosa aún era un fenómeno intrigante. Una pista importante para entender un poco más este nuevo efecto, procedió de la observación de que los animales con hipoglicemia profunda por inyecciones i.t. de (—)—morfina no estaban inconscientes y parecían perfectamente normales después de terminadas las convulsiones, indicando que probablemente los niveles de la glucosa en el SNC no eran tan bajos como los sanguíneos. Hasta entonces empezó a surgir una idea más clara, indicando que este fenómeno de tan profunda hipoglicemia era probablemente debido a algún mecanismo fisiológico desconocido. Inicialmente las inyecciones de varios neuropéptidos inyectados por vía i.t. produjeron hiperglicemia, después de algunas pruebas negativas, el DAGO mostró algo de actividad hipoglicémica en animales normales, señalando hacia una acción mediada quizá a través de receptores mu. Después los experimentos en animales en ayunas confirmaron claramente la suposición de la existencia de mediadores hipoglicémicos

naturales en los tejidos nerviosos.

Pronto resultó más claro que si la insulina no era responsable de la hipoglicemia por (—)—morfina la idea de un mecanismo mediado por encefalinas explicaba más fácilmente la caída de la glucosa en sangre, si en el SNC estaba produciéndose una captura intracelular súbita del carbohidrato. Esta idea asombrosa era la deducción más lógica, es decir la morfina i.t. estaría actuando como una "neuroinsulina" probablemente a través de un mecanismo encefalinérgico y así mismo el propio DAGO i.t. Esta hipótesis de un sistema hormonal doble, o tal vez múltiple, para el paso intracelular de glucosa en los animales superiores resulta muy atractiva. Teóricamente no solo es posible sino que representa la mejor alternativa en una organización jerárquica si se piensa que una distribución preferencial de los recursos energéticos es necesaria para tejidos como el nervioso que debe tener una prioridad más alta en su función para la supervivencia del individuo.

Si este papel tan importante de estos neuropéptidos ha permanecido hasta hoy desconocido es porque los análisis *in vitro* no pueden revelar un cuadro integral y en situaciones *in vivo* estos efectos que son normalmente muy sutiles sólo pudieron ser puestos de manifiesto por medio de inyecciones i.t. de dosis muy altas de morfina a nivel de la médula espinal baja.

REFERENCIAS

1. HYLLEN J K, WILCOX G L. *Intrathecal morphine in mice: a new technique*. Eur J Pharmacol 1980; 67:313-316.
2. HWANG A S, WILCOX G L. *Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants*. Pain 1987; 28:343-355.
3. LUX F, BRASE D A, DEWEY W L. *Antagonism of antinociception in mice by glucose and fructose: comparison of subcutaneous and intrathecal morphine*. (Enviado a: Eur J Pharmacol).
4. LUX F, BRASE D A, DEWEY W L. *Differential effects of s.c. and i.t. morphine on blood glucose in mice: comparison with i.c.v. administration*. (Enviado a: J Pharmacol Exper Ther).
5. YAKSH T L, HARTY G J, ONOFRIO B M. *High doses of spinal morphine produce a non-opiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretical implications*. Anesthesiology 1986; 64:590-597.
6. HUGHES J, SMITH T W, KOSTERLITZ H W. *Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity*. Nature 1975; 258:577-579.
7. YAKSH T L. *Opioid receptor systems and the endorphins: a review of their spinal organization*. J Neurosurg 1987; 67:157-176.
8. COUSINS M J, MATHER L E. *Intrathecal and epidural administration of opioids*. Anesthesiology 1984; 61:276-310.
9. LANZ E, THEISS D, RIESS W, SOMMER U. *Epidural morphine for postoperative analgesia: a double-blind study*. Anesth Analg 1982; 61:236-240.
10. PAYNE R. *Role of epidural and intrathecal narcotics and peptides in the management of cancer pain*. Med Clin N Amer 1987; 71:313-327.
11. FELDBERG W, SHALIGRAM S V. *The hyperglycemic effect of morphine*. Br J Pharmacol 1972; 46:602-618.
12. LALA A, BOULOUX P, TAMBURRANO G, GALE E. *Opioid peptides and glucose metabolism*. J Endocrinol Invest 1987; 10:95-104.
13. LEACH R P, ALLAN E H, TITHERADGE A. *The stimulation of glycogenolysis in isolated hepatocytes by opioid peptides*. Bioch J 1985; 227:191-197.
14. LEVY R M, FIELDS H L, STRIKER M P, HEINRICHER M M. *The effect of analgesic doses of morphine on regional cerebral glucose metabolism in pain-related structures*. Brain Res 1986; 368:170-173.
15. TAKEMORI A E. *The influence of morphine on glucose utilization in cerebral preparations of rats*. J Pharmacol Exper Therap 1967; 145:20-26.
16. SCOTT P V AND FISHER H B J. *Intraspinal opiates and itching: a new reflex?* Br Med J 1982; 284:1015-1016.
17. JACQUET Y F, KLEE W A, RICE K C, IJIMA I, MINAMIKAWA J. *Stereospecific and nonstereospecific effects of (+)— and (—)—morphine: evidence for a new class of receptors?* Science 1977; 198:842-845.
18. HOLDMSTED B, LILJESTRAND G. *Readings in pharmacology*. Ch. II. The rise of experimental pharmacology. Raven Press N Y. 1981; 68-72.
19. LARNER J. *Insulin and oral hypoglycemic drugs; glucagon*. Ch. 64, Goodman and Gilman Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman-Gilman A. Goodman L S, Rall T W, and Murad F, Eds. 7th Ed. p. 1493, Macmillan Inc. New York, N.Y. 1985.
20. CHESLET M F, CHERAMY A, REISINE T D AND GLOWINSKI J. *Morphine and δ -opiate agonists locally stimulate in vivo dopamine re-*

- lease in cat caudate nucleus.* Nature 1981; 291:320-322.
21. HILL R G, PEPPER C M. *The depression of thalamic nociceptive neurones by D-alal², D-Leu⁵-enkephalin.* Eur J Pharmacol 1978; 47:223-225.
22. KRUMINS S A. *Opioid receptor binding in rat spinal cord.* Neurochem. Res 1987; 12:231-235.
23. HARVIG P, GUSTAFSSON LL, BERGSTROM K, MOSTROM U, PONTEN U, LINDBERG B, LUNDVIST H. *Positron emission tomography: and animal model of spinal distribution of drugs after intrathecal administration.* Upsala J Med Sci 1987; 92:205-213.
24. LOOMIS C W, MILNE B, CERVENKO F W. *Determination of cross tolerance in rat spinal cord using intrathecal infusion via sequential mini-osmotic pumps.* Pharmacol Bioch Beth 1987; 26:131-139.
25. KRANTZ JR, J C AND CARR C J. *The pharmacological basis of medical practice.* 7th. Ed. Ch. 42 Carbohydrate metabolism and insulin p 683-685, Williams and Wilkins Co. Baltimore MD 1969.