

# EXPLORACION PRELIMINAR SOBRE LOS EFECTOS NEUROFARMACOLOGICOS DE LA CF4. ca.

*Dr. Pablo J. Cdmbar, Dr. Ricargo Bulnes, Dr. Hugo Castro Sierra, M.S. Tomds Salgado y Dr. Jaime May en. (\*)*

El Departamento de Ciencias Fisiologicas de la Facultad de Ciencias Medicas ha efectuado una serie de experimentos encaminados a estudiar los efectos farmacologicos de las diferentes fracciones quimicas aisladas de la Calaguala; es asi que se ha descubierto una accion antipsoriatica en algunos pacientes y se han practicado experimentos que sugieren una accion antiartritica en animales.

Los experimentos que a continuation se detallan corresponden a la investigation preliminar sobre los efectos farmacologicos generales de la sal calcica de CF4 en este caso referidos al Sistema Nervioso Central y Autonomo; se realizaron algunos estudios para tratar de detectar algun efecto analgesico producido por la CF4. Ca. debido a que algunos pacientes originalmente tratados por sufrir de tumores malignos experimentaban mejoría de su estado general y alivio temporal de sus dolores.

## MATERIAL Y METODOS

### EXPERIMENTOS EN RATONES

Para el ensayo neurofarmacologico preliminar se usaron ratones albinos de cuatro semanas de edad, machos de 25 gms. de peso corporal, sus pesos no variaron en mas de un gramo en cada grupo que estaba integrado por cuatro ratones.

La CF4. Ca se administro en una serie logarftmica de 30, 100 y 300 mg/kg por via I.P. Los animales controles recibieron solution de Tyrode en un volumen similar al correspondiente a la droga Las ob-

servaciones se llevaron a cabo durante 5 dias. Cada día los animates fueron evaluados por un perfodo de tres horas. Se practico el examen neurologico cada hora y se apuntaron los resultados finales en fichas de Irwin. Para comparar los efectos de la droga se usaron grupos de animales a los que se administro un tranquilizante menor (Diazepan 10 mgs/kg. I.P.). El estudio se dividió en tres secciones: Conducta, Neurologico y Sistema Nervioso Autonomo.

En la parte de conducta para medir el grado de consciencia del animal se estimaron los siguientes parametros: Localization visual, estado de alerta, pasividad y estereotipia. Para medir el humor o animo de los ratones se estudio el grado de acicalamiento, vocalization, inquietud, irritabilidad o timidez. La actividad motora incluyo la reactividad ambiental y espontanea ademas la respuesta al tacto. Sobre la reactividad motora se practicaron otros metodos que adelante se describen en detalle. (Se usaron grupos diferentes de ratones).

La seccion neurologica incluyo el grado de excitacion del Sistema Nervioso Central por la respuesta a sustos, se busco la reaction de Straub, temblores, contorsiones o convulsiones. Se observo la posicion de las extremidades y del cuerpo; para detectar incoordinacion motora se busco la presencia de marcha tambaleante o anormal y se exploro el reflejo de enderezamiento. El tono muscular de las extremidades, el corporal, abdominal y la fuerza de agarre tambien se midio; se exploraron los reflejos corneal y flexor ipsilateral.

!

---

(\*) Dpto. de Fisiologia de la Facultad de Ciencias Medicas.

La seccion de estudio del Sistema Nervioso Autonomo incluye los siguientes parametros: diametrol

a las que se administro sulfato de morfina por via subcutanea a la dosis de 1, 2,5 y 5 mgs/kg. Un tiempo de reaccion mayor de 15 segundos se considero como analgesia completa (A.C.).

#### EXPERIMENTOS EN PERROS EXPERIMENTOS PARA INVESTIGAR EL REFLEJO PRESOR

- A. Se usaron 3 perros de 10 a 15 kg. de peso corporal a los que se administro tiopental sodico (30 mgs/kg) y cloralosa (3-50 mgs/kg) intravenosamente. Se administraron dosis adicionales de cloralosa (10 mgs/kg) para mantener el grado de anestesia en la forma mas superficial posible, sirvieron como guia la presencia del reflejo comeal y el grado de relajacion muscular. Despues de una incision abdominal en la h'nea media y de la practica de una meticulosa diseccion, el bazo fue expuesto y aislado; una rama de la arteria esplénica fue canulada retrogradamente para inyecciones intraarteriales. La arteria femoral fue canulada y conectada a un transductor electromagnetico Statham Modelo P 23 B. C. Sus senales fueron registradas en un poli'grafo Grass Modelo 5 D., con el objeto de mantener una adecuada ventilacion pulmonar se inserto una canula intratraqueal. Se administro CF4 Ca a la dosis de 1 y 10 ug/kg/min. durante 10 minutos por medio de una bomba de infusion continua. La CF4 Ca se disolvio en solution de Tyrode. Tambien se hicieron inyecciones de Bradiquinina 1, 2, 4 ng. y Prostaglandina E1 (200 ng/min.) via intra-arterial al bazo (esta ultima por infusion continua).
- B. Se usaron 5 perros cuyos pesos oscilaron entre 9 y 15 kg. para investigar el reflejo presor evocado desde las rodillas por la administracion de Bradiquinina. Los perros se anestesiaron con tiopental sodico intravenoso (30 mgs/kg). Se cateterizo la arteria femoral para medir la presion arterial por medio de un transductor electromagnetico Statham (P23bc). Se introdujo una canula intratraqueal que se conecto a un pneumatocografo Fleish para medir flujo, volumen y secundariamente frecuencia respiratoria; para medir las caidas de presion entre los extremos del pneumotaco-

grafo se usaron transductores de bajo volumen y presion Grass (PT5). Se tomo registro electrocardiografico usando electrodos de platino para medir frecuencia cardiaca. Simultaneamente se uso un transductor fotoelectrico (Grass) para pletismografia. Las rodillas de los animales fueron sujetadas firmemente en un angulo de aproximadamente 60 grados. Se inserto una aguja dotada de una Have en T en ambas cavidades articulares. Se lavo el liquido sinovial usando solution salina isotonica. Se uso Bradiquinina intraarticular para producir el reflejo presor a la dosis de 1, 2 y 4 ug/kg. Se uso solution salina como control. La CF4 Ca fue inyectada intraarticularmente a la dosis de 100 ug y 10 mgs. Los registros se hicieron en un poli'grafo Grass Modelo 5 D, no se investigo sensibilizacion inducida por prostaglandinas.

#### RESULTADOS

##### EXPERIMENTOS EN RATONES. EXAMEN NEUROFARMACOLOGICO.

1. CONSCIENCIA: El estado de alerta de los ratones estudiados disminuyo ligeramente sobre todo a la dosis de 100 mgs/kg, tambien se observo cierto grado de pasividad. No se produjo alteraciones de la localizacion visual o esterotipia.
2. HUMOR: Se produjo una disminucion del acicalamiento, los otros parametros no cambiaron practicamente. Actividad Motora: Se produjo una ligera reduccion de la reactividad ambiental y espontanea. La respuesta al tacto no se modifico.
3. EXCITACION DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: No se produjo reaccion de Straub, convulsiones u otras indicaciones de estimulacion.
4. POSICION: No se produjeron alteraciones.
5. INCOORDINACION MOTORA: El reflejo de enderezamiento fue normal, no se produjo paso tambaleante o marcha anormal.
6. TONO MUSCULAR: Dentro de limites normales.
7. REFLEJOS: Dentro de limites normales.
8. SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO: No se detectaron modificaciones significativas.
9. MUERTOS: No se produjo ninguna muerte aguda o tardia.

ACTOFOTOMETRIA. La administracion de CF4. Ca produjo una reduccion de la actividad motora

total cuyo efecto fue maximo a la dosis de 300 mgs/kg. (—43o/o) comparado con un grupo control, la dosis de 500 mgs/kg practicamente no disminuyo la motilidad significativamente (—810 o/o). Se debe notar que se usaron diferentes grupos para comparacion.

**CONTORSIONES EN RATONES.**

La sal calcica de CF<sub>4</sub>, produjo una disminucion del numero de contorsiones en los ratones a los que se inyecto intraperitonealmente acido acetico al 3o/o (300 mgs/kg); esa disminucion se produjo en los grupos III, IV y V que habian sido tratados previamente a la inyeccion del irritante, con dosis de 250, 500 y 750 mgs/kg de la droga comparados con los animales control. La dosis de 100 mg/kg de la droga fue insuficiente para proteger a los animales. A la dosis de 250 mgs/kg se obtuvo un porcentaje de proteccion "P" de 62o/o, la de 500 mg/kg 70o/o y la de 750 mg/kg un 79o/o. El porcentaje de proteccion fue calculado de acuerdo a la siguiente formula:

$$\frac{\text{Numero de Contorsiones del Lote Testigo} - \text{Numero de Contorsiones del Lote Tratado}}{\text{Numero de Contorsiones del Lote Testigo}} \times 100$$

Incoordinacion en los Ratones. La administration de CF<sub>4</sub>Ca a la dosis de 500 y 750 mgs/kg no produjo ninguna incoordinacion cuantificable por los metodos descritos anteriormente. (Figura No. 1)

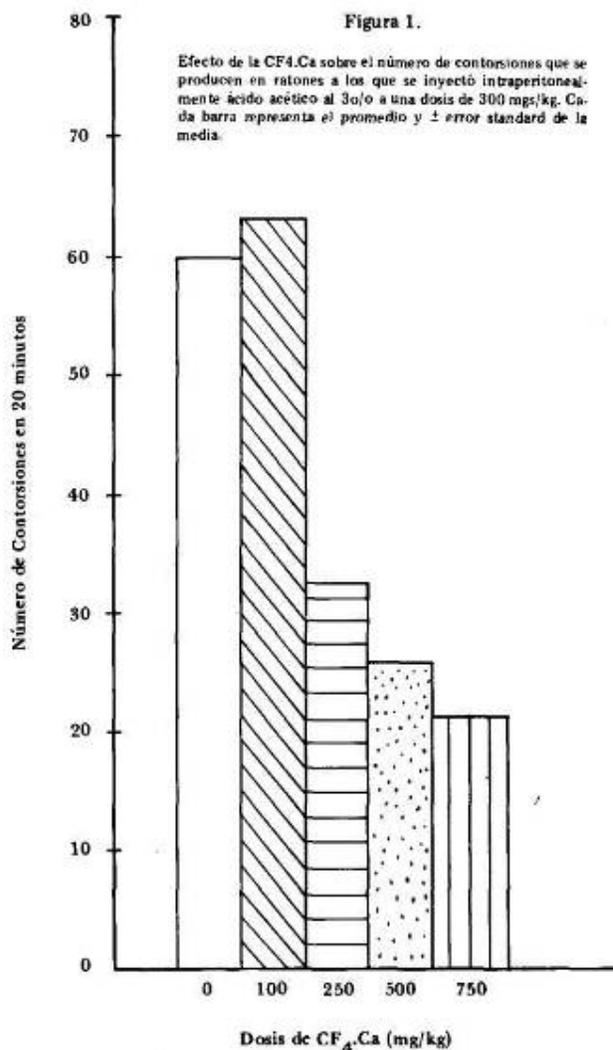
**EXPERIMENTOS EN RATAS**

**TIEMPO DE REACCION EN LAS RATAS**

**DOLORIMETRO DE CONDUCCION TERMICA.**

En las ratas que recibieron sulfato de morfina por via subcutanea se observaron prolongamientos en sus tiempos de reaccion de una magnitud proporcional a la dosis administrada siendo particularmente notables con los de 2.5 mgs y 5 mgs/kg.

En estos dos grupos de animales se obtuvo una analgesia completa (A. C.) a los 15 minutos des-



pues de la inyeccion. En el grupo que recibio 2.5 mgs/kg se prolongo hasta los 120 minutos (Tabla I).

Las ratas que recibieron la sal calcica de CF<sub>4</sub> h las dosis de 100, 250 y 500 mgs/kg no mostraron cambios significativos sobre el tiempo de reaccion y los valores obtenidos durante dos horas de registro fueron muy parecidos a los controles previa administracion de la droga. (Tabla II).

T A B L A I

Efecto de la Administración de Sulfato de Morfina, por Vía Subcutánea,  
Sobre el Tiempo de Reacción a Estímulos Térmicos en Ratas

Rata Número	Peso (g)							
		Control	15 Minutos	30 Minutos	45 Minutos	60 Minutos	120 Minutos	180 Minutos
Dosis: 1 mg/kg Vía Subcutánea								
1	129	4	5	AC*	AC	26	7	—
2	145	4	7	AC	AC	AC	6	—
3	117	8	5	AC	AC	AC	6	—
4	153	3	11	AC	3	3	3	—
Dosis: 2,5 mg/kg Vía Subcutánea								
5	182	3	AC	AC	AC	AC	3	—
6	145	8	AC	AC	AC	AC	9	—
7	120	4	AC	AC	AC	AC	4	—
8	178	8	AC	AC	AC	AC	6	—
9	165	2	AC	AC	AC	AC	4	—
10	182	6	AC	AC	AC	AC	7	—
11	141	3	AC	AC	AC	AC	11	—
12	163	3	AC	AC	AC	AC	7	—
13	177	7	7	AC	AC	AC	88	—
14	118	5	7	AC	AC	AC	8	—
Dosis: 5,0 mg/kg Vía Subcutánea								
15	201	6	AC	AC	AC	AC	AC	6
16	186	10	AC	AC	AC	AC	AC	9
17	159	5	AC	AC	AC	AC	AC	5
18	214	5	AC	AC	AC	AC	AC	5
19	179	5	AC	AC	AC	AC	AC	6
20	167	5	AC	AC	AC	AC	AC	5
21	182	6	AC	AC	AC	AC	AC	6
22	184	5	AC	AC	AC	9	6	5

\* AC—Analgésia Completa

#### REFLEJO PRESOR INDUCIDO POR LA INYECCION INTRAESPLENICA DE BRADIQUINA

La inyección de Bradiquinina por vía intra-arterial en el bazo produjo un incremento de la presión arterial que fue proporcional a la dosis administrada. Se considero como una respuesta presora las mayores de 5 mm. H#. que aparecieron en su periodo de

tiempo estimado de 3 a 20 segundos después de la inyección intraesplénica de la bradiquinina. La administración de prostaglandina E<sub>1</sub> produjo un apocamiento del reflejo presor inducido por la bradiquinina. La administración de CF<sub>4</sub>.Ca previa a) ensayo del reflejo presor produjo resultados variables.

una disminucion de la respuesta presora inducida por la bradiquinina en la rodilla tratada previamente con CF4Ca. (10 nags). No se intento restablecer la sensibilidad de la respuesta a la bradiquinina por la administracion de prostaglandina Ei o E2, tampoco se compara su potencia con otros analgesicos inhibidores de la sintesis de prostaglandinas. Este estudio se llevara a cabo posteriormente. La administracion de bradiquinina a dosis lo suficientemente elevadas como para evocar el reflejo presor produjo una respiracion de tipo superficial, la frecuencia cardiaca en varios casos aumento probablemente como respuesta al dolor.

#### COMENTARIO.

Despues de la inyeccion intraperitoneal de un agente nocivo, las ratas o los ratones presentaron una respuesta que consiste en una onda de constriction y elongation que corre caudalmente a lo largo de la pared abdominal, algunas veces acompañada de retorcimientos del tronco y seguido de la extension de las patas traseras. Esta es la llamada "respuesta abdominal constrictora" que se ha considerado como nociceptiva.<sup>(2)</sup> En nuestros experimentos el agente que se uso fue el acido acetico que por su latencia larga se ha considerado que actua posiblemente en forma indirecta liberando sustancias endogenas que estimulan las terminaciones nerviosas.<sup>(3)</sup> La administracion de la sal calcica de CF4 redujo la incidencia de la respuesta abdominal constrictora a la dosis de 250, 500 y 750 mgs/kg, a dichas dosis no se produce incoordinacion de los ratones sometidos a la prueba del tambor rotatorio. La reduccion de la respuesta abdominal constrictora no fue completa. Los experimentos para medir el tiempo de reaction a un estimulo doloroso termico cuando se administro morfina mostraron un efecto anticonceptivo; en cambio cuando se uso la sal calcica de CF4, no se produjo una elevation del umbral al dolor. La inyeccion intra-arterial de Bradiquinina en el bazo de perros ligeramente anestesiados produce un incremento reflejo de la presion arterial que es probablemente una respuesta automatica a la estimulacion de las terminaciones nerviosas.<sup>3,4</sup> Este efecto de la Bradiquinina puede ser disminuido o bloqueado por las drogas del tipo aspirina. En nuestros experimentos solo en un caso se produjo una disminucion del reflejo presor como resultado de la infusion continua de CF4Ca. al

bazo; las respuestas fueron variables lo que podria explicarse por las dosis empleadas, el alto contenido de Ca de la droga o el nivel de anestesia que afecta mucho los resultados y se usaron pocos animales. Se decidio estudiar el reflejo presor que se produce por la inyeccion de Bradiquinina en la cavidad articular de la rodilla de perros ligeramente anestesiados, pero debido a que existe la sospecha de que diferentes sustancias productoras de dolor pueden tener diferentes actividades intrinsecas e interesados por los momentos en un estudio cualitativo de dolor nos abstuvimos de sensibilizar mas la respuesta presora a la Bradicininina con prostaglandinas Ei OE2 exogenas. El uso exclusivo de tiopental sodico nos permitio mantener una anestesia muy superficial. Cuando se administro la CF4.Ca en la cavidad articular, se produjo una disminucion del reflejo presor inducido por la inyeccion intra-articular de bradiquinina mientras que la rodilla. no tratada respondio bien a la bradiquinina inyectada. Cuando se realizo el examen neurofarmacologico en los ratones se observo que en contraste a los analgesicos narcoticos que tienen una accion predominantemente central a la sal calcica de CF4 no produce el fenomeno de Straub, si notamos que se produce cierta disminucion de la reactividad ambiental y actividad espontanea, que se comprobo con el uso de actofotometria.

Los resultados de los experimentos anteriormente señalados sugieren que la CF4.Ca puede ser un anti-conceptivo debil, se debe hacer notar que varias drogas pueden ser inactivas segun los metodos empleados para medir efecto analgesico y no son raros los falsos positivos o negativos sobre todo las de tipo aspirina o analgesicos antipireticos y este comentario se hace en virtud de que la CF4.Ca parece que no es un analgesico narcotico, sino mas bien un analgesico que actua perifericamente y el mecanismo de accion debera dilucidarse si posteriormente se estima conveniente. Sea cual fuere el mecanismo de accion involucrado y reconociendo que en el hombre la respuesta al dolor es mas compleja, ya que comprende talamo, corteza cerebral y otras estructuras, podemos concluir que nuestros experimentos apoyan las observaciones clinicas subjetivas de un alivio del dolor en algunos pacientes tratados con FC4.Ca. En el estudio neurofarmacologico fue el hallazgo mas importante que se hizo.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Turner, R. A. (1965) Screening methods in Pharmacology Neuropharmacological tests in Blind Screening 26 - 34 Academic Press, London, New York.
2. Collien, H. O. J., Dinneen, L. C, Johnson, C. A. and Schneiden, C. (1968) the abdominal constriction response and its suppression by analgesic Drugs in the mouse. Br. J. Pharmac. Chemother., 32 295-310.
3. Guzman, F., Braun, C, Lim, R. K. S., Potter, G. D. and Rodgers, D. W. (1964) Narcotic and non-narcotic analgesics wich block visceral pain evoked by intra-arterial injections of bradykinin and other algesic agents. Arch. int. Pharmacodyn., 149, 571-588.
4. Hashimoto, K., Kumakura, S. and Taina N. (1964). Vascular reflex responses induced by an intra-arterial injection of Azaazepinophenothiazine, Andromedotoxin, Veratridine, Bradykinin and kallikrein and blocking action of Sodium salicylate. Jap. J. Physiol., 14, 299-308.
5. Moncada, S., Ferreira, S. H. and Vane J. R. (1975) inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of Aspirin-like drugs in the Dog Knee Joint Eur. J. Pharmac. 31, 250 - 260.