

20 345

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DPTO. BIOLOGIA ANIMAL II



* 5 3 0 9 5 3 9 4 5 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**HIPERTENSION ARTERIAL INDUCIDA POR
DEPRIVACION SOCIAL EN RATAS: IMPLICACION
DE LOS SISTEMAS NORADRENERGICO Y OPIOIDE
CENTRALES.**

Vº Bº Directoras de Tesis Doctoral

Doctorando

**Dña. Angela Alsasua del Valle
Prof. Titular de Farmacología
Facultad de Medicina
UCM**

**Dña. Paz Fernández-Tomé
Colaborador Científico
CSIC**

Mª Soledad Alonso

Madrid, 1995.



FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA

28040 MADRID

TELF. 394 14 64

UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ANGELA ALSASUA DEL VALLE, Profesora Titular de Farmacología de la Facultad de Medicina, PAZ FERNANDEZ TOME Colaborador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y ROSA MARIA ARAHUETES PORTERO, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, como Directoras y Ponente,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "HIPERTENSION ARTERIAL INDUCIDA POR DEPRIVACION SOCIAL EN RATAS: IMPLICACION DE LOS SISTEMAS NORADRENERGICO Y OPIOIDE CENTRALES " presentado por Dña. María Soledad Alonso Domínguez ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y reúne los requisitos necesarios para optar al Título de Doctor.

Madrid, Mayo de 1995.

Fdo. Angela Alsasua

Fdo. Paz Fernández-Tomé

Fdo. Rosa María Arahuetes

AGRADECIMIENTOS

Debo iniciar esta relación de sinceros agradecimientos refiriéndome a quien ha sido la protagonista de toda la actividad que este libro representa: la Profesora Angela Alsasua del Valle.

En primer lugar, debo solicitar de ella su benevolencia por aquellas actitudes mías que, siendo fruto de la inexperiencia, han representado para ella un suplemento a la actividad, ya de por si extenuante, que implicó dirigir esta Tesis Doctoral. A continuación, he de expresarle mi más profundo agradecimiento por la entrega y absoluta dedicación que ha mostrado para que obtuviese una excelente formación en un campo al que es tan difícil acceder como es el de la investigación. De su mano he ido atesorando en estos años conocimientos que han sido fundamentales en mi formación como persona y como investigadora. De sus valores personales debo destacar una inaccesible, por exigente, capacidad de trabajo, su vocación al servicio de la Universidad y de todos los valores que esta institución representa y la gran ilusión que sabe transmitir, máxime, en aquellas circunstancias cuando la apatía impera. Por todas las razones expuestas la quiero expresar aquí mi cariño y amistad que de forma tan paciente se supo ganar y es mi deseo que las personas que estan iniciando la etapa que para mi finaliza dispongan de las mismas oportunidades que a mi me ha concedido.

La Doctora Dña. Paz Fernández-Tomé posee, en mi concepto, una personalidad que es la síntesis de una vida entregada al estudio, el trabajo y la creación, por esta razón y, gracias a sus exigencias, he aprendido cual es el camino que debo emprender para alcanzar su categoría humana y profesional. Todos los valores que me ha transmitido durante estos años no se pueden plasmar en estas breves líneas aunque sí mi profundo reconocimiento y afecto.

La Profesora Dña. Rosa María Arahuetes del Departamento de Biología animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM ha tenido la gentileza de tutelar y participar en la elaboración de este trabajo experimental. Además, me ha enseñado cuales son las virtudes que ha de poseer en el momento actual una profesora universitaria para conseguir que los resultados sean fruto de una actividad multidisciplinaria.

Al Profesor Pedro Lorenzo, director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM, debo la excelente acogida para realizar este trabajo experimental en el Departamento que con tanta eficacia, rigor, ilusión y cariño dirige. Asimismo, me ofreció en todo momento su apoyo incondicional y el ánimo necesario para que no desfalleciera en aquellos momentos que fueron más criticos en las sucesivas etapas de esta obra.

Al Profesor Jose Angel Fuentes mi agradecimiento por haberme hecho recipendaria del equipo que durante los años ha desarrollado esta linea de investigación.

Conocer a Itziar Aldamendi Gomendio ha sido para mi un inolvidable privilegio. Representa un difícil equilibrio entre el rigor y la responsabilidad

profesional con la categoría humana. Su vitalidad, seriedad, coherencia, valentía y coraje para valorar y decir lo que piensa, pese a quien pese, unido a un cariño y lealtad que superan todas las pruebas son cualidades propias de una persona excepcional.

A Lucia Parra quiero expresarle mi especial agradecimiento y cariño, por haber compartido conmigo tanto los buenos como los malos momentos que han acaecido durante los años que hemos trabajado juntas. Supo transmitirme su experiencia, su seriedad en el trabajo y su capacidad investigadora cuando yo me incorporé al Departamento.

A Luis Gonzalez y a Guillermo Rodriguez por su apoyo incondicional y porque me han demostrado una verdadera amistad.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología por su cordial acogida, porque han conseguido hacerme especialmente agradable este periodo de mi formación y porque el hacerme partícipe de todas sus actividades “extraprofesionales” ha conseguido que la diversión compartida hiciera más llevaderos los numerosos momentos de desánimo. Por todo ello gracias.

A todo el personal del Departamento, muy especialmente a Rubén y M^a Luisa por la ayuda que me han dispensado en todo momento.

Por último, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia por el cariño y apoyo que me han ofrecido siempre. Gracias a su continuo esfuerzo durante todos estos años he podido formarme tanto personal como científicamente. Nunca podré agradecerles lo suficiente la confianza que siempre me han demostrado. Por todo ello, gracias.

A todos gracias.

*A mis padres.
A mi hermana.*

INTRODUCCION

I. ESTRES

1. PERSPECTIVA HISTORICA. DEFINICION	2
2. MODELOS, ANIMALES Y PARAMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRES.	3
3. SELECCION E INTERES DEL MODELO DE DEPRIVACION SOCIAL.	5
4. RESPUESTA FISIOLÓGICA AL ESTRES	5
4.1. Activación del sistema simpatoadrenal	6
4.1.a. Sistema catecolaminérgico	7
4.1.a.1. Síntesis de catecolaminas	7
4.1.a.2. Almacenamiento y liberación	9
4.1.a.3. Receptores adrenérgicos	9
4.1.a.4. Vías catecolaminérgicas en el SNC	11
4.1.a.5. Metabolismo de las catecolaminas	16
4.1.a.6. Efectos fisiológicos de las catecolaminas	16
4.1.a.7. Metabolismo y sinergismo hormonal	17
4.2. Sistema opioide	18
4.2.a. Biogénesis de los péptidos opioides	19
4.2.b. Distribución de los péptidos opioides en el sistema nervioso central.	20
4.2.c. Biosíntesis, liberación y degradación de los péptidos opioides	22
4.2.d. Receptores opioides	23
4.2.d.1. Distribución y significado fisiológico de los receptores opioides	24
4.2.e. Mecanismo de acción de los péptidos opioides	28
4.2.f. Péptidos opioides y sistema nervioso autónomo: Acciones sobre el sistema cardiovascular	30
4.2.g. Activación del sistema opioide durante el estrés	31
4.3. Activación del eje Hipotálamo-hipófiso-adrenal	33
4.3.a. Hormona liberadora de corticotropina	34
4.3.b. Hormona adrenocorticotropa	36
4.3.c. Glucocorticoides	37
4.4. Respuesta de fase aguda	37

4.4. Respuesta de fase aguda	37
II. HIPERTENSION ARTERIAL	39
1. CLASIFICACION ETIOLÓGICA DE LA HIPERTENSION	39
2. HIPERTENSION ESENCIAL. ETIOPATOGENESIS	40
3. ESTRES E HIPERTENSION	41
<u>PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</u>	45
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
I. MATERIAL	47
II. FARMACOS Y PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS	47
III. ANIMALES DE EXPERIMENTACION	48
IV. LESION DEL HAZ NORADRENERGICO VENTRAL (HNV) CON 6-HIDROXIDOPAMINA	48
V. MEDIDA INDIRECTA DE LA PRESION ARTERIAL (TAIL-CUFF)	49
VI. MODELO DE ESTRES POR DEPRIVACION SOCIAL	50
VII. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS	
1. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	51
1.1. Preparación y extracción de muestras	51
1.2. Condiciones cromatográficas	51
1.3. Cuantificación y análisis de los resultados	52
2. ENSAYOS DE FIJACIÓN (“BINDING”)	53
2.1. Metodología de los ensayos de fijación a receptores opioides (“binding”)	53

2.1.a. Preparación de las membranas	54
2.1.b. Ensayo de fijación a receptores opioides δ y μ	54
2.2. Valoración de la proteína	55
VIII. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS	56
 <u>RESULTADOS</u>	
I. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL	
1. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV POR 6OHDA	58
2. EFECTO DEL AISLAMIENTO (DEPRIVACION SOCIAL)	58
3. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV CON 6OHDA Y POSTERIOR AISLAMIENTO	58
 II. EVOLUCION DE LA PRESION ARTERIAL	
1. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV POR 6OHDA	58
2. EFECTO DEL AISLAMIENTO (DEPRIVACION SOCIAL)	64
3. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV CON 6OHDA Y POSTERIOR AISLAMIENTO	64
 III. ESTUDIO DE LA CONCENTRACION DE CATECOLAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOS CENTRAL (SNC)	
1. ANALISIS DE LAS CATECOLAMINAS DEL SNC EN ANIMALES SOMETIDOS A LESION DEL HAZ NORADRENERGICO VENTRAL CON 6OHDA	65
1.1. Hipotálamo	65
1.2. Bulbo raquídeo	65
1.3. Médula espinal	67
2. ANALISIS DE LOS NIVELES DE CATECOLAMINAS EN ANIMALES SOMETIDOS A AISLAMIENTO	67

2.1. Hipotálamo	67
2.2. Bulbo raquídeo	71
2.3. Médula espinal	71
3. ANALISIS DE LAS CATECOLAMINAS DEL SNC EN ANIMALES LESIONADOS CON 6OHDA EN EL HNV Y SOMETIDOS A AISLAMIENTO	74
3.1. Hipotálamo	74
3.2. Bulbo raquídeo	76
3.3. Médula espinal	76
IV. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FIJACION AL RECEPTOR δ OPIOIDE	76
1. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV POR 6OHDA SOBRE RECEPTORES δ OPIOIDES	76
1.1. Hipotálamo	76
1.2. Hipocampo	79
1.3. Núcleo estriado	79
1.4. Bulbo raquídeo	79
1.5. Corteza cerebral	88
1.6. Médula espinal	88
2. EFECTO DEL AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES δ OPIOIDES	88
2.1. Hipotálamo	88
2.2. Hipocampo	93
2.3. Núcleo estriado	93
2.4. Bulbo raquídeo	93
2.5. Corteza cerebral	93

2.6. Médula espinal	102
3. EFECTO DE LA LESION CON 6OHDA DEL HAZ NORADRENERGICO VENTRAL ASOCIADA A AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES δ OPIOIDES	102
3.1. Hipotálamo	102
3.2. Hipocampo	108
3.3. Núcleo estriado	108
3.4. Bulbo raquídeo	108
3.5. Corteza cerebral	111
3.6. Médula espinal	111
V. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL RECEPTOR μ OPIOIDE	115
1. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV CON 6OHDA SOBRE LOS RECEPTORES μ OPIOIDES	115
1.1. Hipotálamo	115
1.2. Hipocampo	115
1.3. Nucleo estriado	115
1.4. Bulbo raquideo	120
1.5. Corteza cerebral	120
1.6. Médula espinal	120
2. EFECTO DEL AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES μ OPIOIDES	129
2.1. Hipotálamo	129
2.2. Hipocampo	129
2.3. Núcleo estriado	129

2.4. Bulbo raquídeo	136
2.5. Corteza cerebral	136
2.6. Médula espinal	136
3. EFECTO DE LA LESION CON 6OHDA DEL HAZ NORADRENERGICO VENTRAL ASOCIADO A AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES μ OPIOIDES	143
3.1. Hipotálamo	143
3.2. Hipocampo	143
3.3. Núcleo estriado	143
3.4. Bulbo raquídeo	146
3.5. Corteza cerebral	146
3.6. Médula espinal	149
<u>DISCUSION</u>	
I. CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRES PRODUCIDO POR DEPRIVACION SOCIAL	153
II. EFECTO DE LA LESION DEL HNV SOBRE LA PRESION ARTERIAL	154
III. VALORACION DE CATECOLAMINAS EN AREAS CEREBRALES	
1. CATECOLAMINAS EN RATAS SOMETIDAS A AISLAMIENTO	155
2. CATECOLAMINAS EN RATAS CON LESION DEL HNV	157
3. CATECOLAMINAS EN RATAS SOMETIDAS A AISLAMIENTO Y CON LESION DEL HNV	158
IV. VARIACIONES EN EL SISTEMA OPIOIDE CENTRAL	
1. DEBIDAS AL AISLAMIENTO	159

2. EFECTO DE LA LESION DEL HNV	163
3. EFECTO DEL AISLAMIENTO ASOCIADO A LA LESION DEL HNV	164
<u>CONCLUSIONES</u>	167
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	169

ABREVIATURAS

Ach: acetilcolina
ACTH: adenocorticotropina
Ad: adrenalina
AMP_c: Adenosin monofosfato cíclico
ATP: adenosin trifosfato
CA: catecolaminas
COMT: catecol-orto-metil-transferasa
CRF: factor liberador de corticotropina
CRH: hormona liberadora de corticotropina
CVLB: zona caudal ventrolateral del bulbo raquídeo
DA: dopamina
DBH: dopamina-beta-hidroxilasa
DE: desviación estandar
DNA: acido desoxirribonucleico
DOPA: dihidroxifenil-alanina
ES: estadísticamente significativo
FNMT: feniletanol-amina-N-metiltransferasa
GH: Hormona de crecimiento
HHA: eje hipotalamo-hipofiso-adrenal
HND: Haz noradrenérgico dorsal
HNV: haz noradrenérgico ventral
i.c.v.: intracerebroventricular
KD: constante de disociación
LC: locus ceruleus
MAO: monoamino oxidasa
MHPG: 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol
NTS: núcleo del tracto solitario
6OHDA: 6-hidroxidopamina
PA: presión arterial
POMC: proopiomelanocortina
RNA: ácido ribonucleico
RNA_m: ácido ribonucleico mensajero
RVLB: zona rostral ventrolateral del bulbo raquídeo
SNC: sistema nervioso central
SNS: sistema nervioso simpático
TH:tirosina hidroxilasa
TSH: Hormona estimulante de tirotropina
VMA: acido vanilmandélico
 \bar{x} : media aritmética

INTRODUCCION

I. ESTRES

1. PERSPECTIVA HISTORICA. DEFINICION.

El concepto de estrés aparece desde tiempos históricos remotos, asociado estrechamente con el término daño o lesión. Ya el filósofo natural griego Empédocles (500-430 a.c.) sostenía que toda materia estaba constituida por elementos esenciales (tierra, aire, fuego y agua) y de cualidades (calor, frío, sequedad y humedad) y que se encontraban entre ellos a favor o en contra. Este concepto de equilibrio lo extendió Hipócrates (460-375 a.c.) a la salud. Definición ésta como un equilibrio armonioso de elementos y cualidades de la vida. La enfermedad, en contraste, era la consecuencia natural del desequilibrio. Hipócrates también reconoció las respuestas adaptativas corporales al estrés estando estas respuestas inscritas a las intrínsecas "fuerzas de la naturaleza". (Singer, 1941)

Sydenham (1624-1689) avanzó más en el concepto de que la enfermedad es la manifestación de la reacción del cuerpo a las fuerzas externas. Sin embargo fué Claude Bernard (1813-1878) quien desarrollo el término "milieu interieur" (medio interno), concepto por el cual los organismos vivientes estabilizan sus ambientes internos. (Chrousos y cols, 1988)

Esta formulación clásica sirvió para preparar el trabajo preliminar de Walter Cannon (1871-1945) quien acuñó el término "homeostasis". Sus enseñanzas fueron aprovechadas y desarrolladas por Hans Selye, quien introdujo el concepto de "síndrome general de adaptación", por el cual todos los organismos responden al estrés. Describió una secuencia de cambios patológicos originados en el organismo cuando éste es sometido a diversos estímulos nocivos. Esta respuesta universal al estrés se acompaña de una hiperplasia adrenal y respuestas adaptativas no específicas. Selye también sugirió que un estrés no remitente por si mismo podría dar como resultado enfermedades de adaptación.

Selye definió tres fases en el estrés a las que denominó respectivamente: 1.- **reacción de alarma**, caracterizada por hipertrofia adrenal, ulceración de la mucosa y atrofia del timo y tejidos linfoides; 2.- **fase de resistencia o adaptación**, cuyas manifestaciones pueden ser opuestas a las descritas en el caso de la reacción de alarma y 3.- **fase de agotamiento**, la cual sobreviene cuando la intensidad o la duración del estrés es excesiva. Por todo ello, Selye definió el estrés como la respuesta inespecífica del organismo ante un aumento de las exigencias del medio ambiente, y "estresantes" a los agentes responsables de dicha respuesta.

A pesar de lo señalado, actualmente se han ido acumulando una serie de datos que indican la existencia de un cierto grado de especificidad en la respuesta al estrés. J. Manson (1971) criticó el concepto de inespecificidad inherente a la teoría de Selye, y fué el primero en conceder una adecuada importancia a los componentes psicológicos del estrés.

En definitiva, el estrés constituye una alteración del proceso homeostático normal cuyo fin es favorecer la adaptación al entorno, proporcionando estrategias adaptativas al individuo.

La respuesta al estrés presenta un mecanismo evolutivo muy conservado por el cual las células son capaces de responder y de defenderse de los posibles cambios abruptos y aversivos que se produzcan en su ambiente.

El organismo responde al estrés regulando el medio interno, manteniéndolo en unos niveles de funcionalidad adecuados que posibilitan su supervivencia. Cuando las circunstancias estresantes desaparecen, el organismo vuelve a recuperar su anterior estado de reposo, aunque si la respuesta es excesivamente intensa o duradera puede que ya no sea posible el retorno a la situación basal configurándose entonces un nuevo equilibrio biológico. (Axelrod y Reisine, 1984; Welch, 1992)

2. MODELOS, ANIMALES Y PARAMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS.

Los animales de laboratorio han sido indispensables como modelos en el estudio del estrés. Son numerosos los modelos experimentales diseñados con el fin de estudiar el estrés. Estos se generan de manera sencilla en el animal de laboratorio. A pesar de ello, cuando el fin último es obtener resultados extrapolables al ser humano hay que considerar algunas limitaciones que restringen en gran medida su utilización.

Se podrían hacer múltiples clasificaciones del estrés y los métodos para producirlo, dependiendo de la intensidad del estímulo estresante, la duración, la edad y el sexo de los sujetos estudiados, etc. Existen también animales de experimentación, fundamentalmente ratas, que han sido manipuladas genéticamente para responder de formas distintas al estrés.

De esta manera se puede distinguir entre estrés:

1. Agudo o crónico.
2. Leve o intenso
3. Constante o intermitente
4. Psicológico o físico
5. Farmacológico

Los métodos más frecuentemente utilizados son los físicos, entre los que se encuentran:

1. Frío
2. Inmovilización
3. Aislamiento
4. Natación forzada
5. Ejercicio en rueda
6. Deprivación de comida
7. Bebida hipertónica
8. Choque eléctrico de la cola (tail-shock)
9. Choque eléctrico en las patas (Foot shock)

También hay modelos experimentales que utilizan factores que provocan alteraciones en el componente social o en la esfera emocional del animal como:

1. Hacinamiento (Armario y cols, 1984)
2. Aislamiento o privación social (Gardiner y Bennett, 1977)
3. Estimulación audiovisual (Galeno y cols, 1984)
4. Estrés psicosocial-Agresividad (Adams y Blizard, 1987)
5. Aislamiento de las crías de la madre en el periodo de lactancia (Kehoe y cols, 1990)

Dentro de los métodos farmacológicos los más utilizados son:

1. Inyecciones intraperitoneales de Yohimbina, Ketamina, M-clorofenilpiperazina, suero salino hipertónico, formaldehído.
2. Inyecciones intracerebroventriculares (icv) de CRH o interleucinas (IL-1, IL-6)
3. Inoculación de gérmenes como E. coli o H. influenzae
4. Aspiración de eter

Para la valoración del grado de estrés se miden infinidad de parámetros que comprenden respuestas psicológicas y fisiológicas, entre las que se encuentran:

1. Alteraciones de la conducta y actividad locomotora
2. Incrementos de la presión arterial
3. Variaciones del eje HHA (medidas de cortisol plasmático, liberación de ACTH, beta-endorfinas y mRNA de POMC)
4. Variaciones del eje simpático adrenal (medidas de catecolaminas y sus metabolitos plasmáticos, urinarios y cerebrales)
5. La hiperactividad adrenérgica afecta a otros componentes celulares como linfoquinas y la actividad citotóxica de células NK y a los receptores para linfoquinas
6. Variaciones de otros péptidos (prolactina, NPY, sustancia P, factores de crecimiento nervioso)
7. Alteración de la función reproductora
8. Desórdenes gastrointestinales, úlceras

(Sutanto y De Kloet, 1994)

Las ratas que han sido manipuladas genéticamente responden de distinta manera al estrés con parámetros específicos de emocionalidad y muestran diferencias fisiológicas endocrinas y no endocrinas, de conducta y de respuesta a los fármacos. Algunas de las que han sido desarrolladas son las siguientes:

1. RHA (Roman High Avoidance) y RLA (Roman Low Avoidance), que presentan cambios de conducta y del grado de consciencia al ser sometidas a pruebas de estrés. Son análogos a los humanos muy ansiosos y a personalidades reprimidas. Presentan diferencias en el eje HHA.
2. APOSUS (Apomorfina susceptibles), APOUNUS (Apomorfina no susceptibles) que presentan diferentes respuestas del eje HHA. En distintos ensayos unas tienden a la huida y otras a quedarse quietas. Esta última respuesta se correlaciona con la actividad roedora facilitada por el agonista dopaminérgico apomorfina.

3. Alteradas inmunológicamente LEW/N y que padecen distintas enfermedades autoinmunes. Presentan respuestas disminuídas a ACTH y corticosterona.
4. SHR (ratas genéticamente hipertensas), son hiperactivas y presentan respuestas anormales a ACTH, CRH y AVP. Sus controles las WKY son menos activas pero sin embargo presentan mayor incidencia de úlceras gastroduodenales.

(Sutanto y De Kloet, 1994)

3. SELECCION E INTERES DEL MODELO DE DEPRIVACION SOCIAL

Para la elaboración del presente trabajo se ha elegido como método inductor de estrés la privación social o aislamiento social. La producción de estrés por este método está basado en el carácter marcadamente gregario atribuido a los roedores. La rata es una especie ideal para la aplicación de este método porque a la condición de su carácter gregario se suma un comportamiento territorial muy similar al observado en primates. (Brain, 1985)

El empleo de este modelo de estrés permite en primer lugar una aplicación homogénea del estímulo a todos los individuos de la muestra, además constituye un estímulo de carácter moderado, esencialmente psicológico, lo que permite, en cierta manera, equipararlo con determinadas situaciones de estrés que afectan al ser humano posibilitando la extrapolación de los resultados obtenidos.

Así, en estudios realizados en nuestro laboratorio, en ratas aisladas, se ha constatado que la elevación de la presión arterial observada es reversible por interrupción del estímulo aversivo (resocialización), sólo durante la fase inicial del aislamiento (periodo menor de 30 días), ya que cuando las ratas alcanzan un periodo de tiempo de privación social superior a los 30 días, la resocialización ya no es capaz de restaurar en dichos animales los valores de presión sistólica elevada. Paralelamente, otros estudios demostraban que si se administraba naloxona a las ratas, dicha sustancia revierte el efecto sobre la presión arterial solamente en las ratas socialmente privadas durante un breve tiempo, no en aquellas sometidas a aislamiento por un tiempo superior a 30 días. (Florentino y cols, 1987).

Por último se ha demostrado que en situaciones de estrés psicológico se produce una activación del sistema opioide paralelo a un incremento en la presión arterial (McCubbin y cols, 1988); así pues resulta un modelo interesante de hipertensión experimental permitiéndonos estudiar los efectos que provoca el estrés psicológico sobre el sistema cardiovascular, efectos aun escasamente conocidos.

4. RESPUESTA FISIOLOGICA AL ESTRES

La respuesta fisiológica al estrés difiere cualitativamente dependiendo de la duración del mismo. Los mecanismos que permiten la reacción inicial no son los mismos que intervienen cuando el organismo se ve sometido a un estrés

prolongado. Así pues, en las formas de estrés agudo, donde la supervivencia depende de una reacción rápida de emergencia se precisa de una respuesta rápida y breve, que se logra mediante la activación de funciones nerviosas o neuroendocrinas; mientras que en las situaciones de estrés crónico, denominadas por Selye "fase de resistencia", en las que resulta más adecuada la adaptación al estímulo, se produce una activación o respuesta a largo plazo, de acción más persistente como la que lleva a cabo el sistema endocrino.

A pesar de ello, tanto en el estrés agudo como en el crónico la alteración inicial que provoca el estímulo estresante es una activación del SNC, el cual es el encargado de poner en marcha los mecanismos que se mencionaron anteriormente.

En último lugar se presentaría la denominada "fase de agotamiento" la cual sobreviene si la intensidad o duración del estrés es excesiva, produciéndose en consecuencia un agotamiento de la respuesta y una disminución de la resistencia del individuo.

4.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA SIMPATOADRENAL

La reacción de emergencia o de alarma, asociada a formas de estrés agudo, desencadena la acción conjunta del sistema nervioso simpático y de las hormonas liberadas desde la médula adrenal, es decir de la activación del denominado sistema simpatoadrenal. La activación del sistema simpático da como resultado un incremento en el ritmo cardíaco, así como en la contractibilidad vascular y a dilatación de determinados lechos vasculares que están aparentemente implicados en la supervivencia inherente a las situaciones de "lucha y huida". Además el tronco bronquial se dilata, hay un incremento en el campo visual y determinadas funciones viscerales no esenciales como el peristaltismo intestinal y la evacuación de la vejiga urinaria se ven inhibidas.

En contraste, el incremento del tono parasimpático estimula la actividad visceral de los tractos gastrointestinales y genitourinarios, controla la pupila y produce descenso del ritmo cardíaco.

La función integrativa del sistema nervioso autónomo fué reconocida tanto por Bernard como por Cannon quienes apreciaron su importancia en el mantenimiento de la homeostasis. Estas funciones incluyen la regulación de la respiración, la circulación, la digestión y la temperatura corporal, así como una numerosa cantidad de interacciones con otros sistemas endocrinos.

El neurotransmisor de las fibras preganglionares del SNA es la acetilcolina (Ach), mientras que el neurotransmisor para las fibras nerviosas postganglionares es la noradrenalina (NA) y para el sistema nervioso parasimpático es la acetilcolina. (Lefkowitz y cols, 1990)

La estimulación simpática da lugar a un incremento en la actividad tónica de los nervios simpáticos con el consiguiente aumento de la liberación de NA en los terminales nerviosos. La médula adrenal es embriológicamente análoga a los ganglios simpáticos periféricos. Las células medulares cromafines poseen fibras

nerviosas rudimentarias y la capacidad de sintetizar, almacenar y secretar catecolaminas. (Cryer, 1980)

Además, la estimulación del nervio esplácnico provoca la activación de las células cromafines de la médula adrenal, las cuales liberan a la sangre una mezcla de NA, AD y distintos fragmentos de péptidos opioides procedentes del procesamiento de la preproencefalina, que se encuentran almacenados en las vesículas junto con las catecolaminas. (Viveros y cols, 1979)

Las consecuencias fisiológicas de la liberación de estas sustancias son múltiples, afectando a la mayoría de los sistemas orgánicos como el sistema cardiovascular, donde se aprecia un aumento tanto de la frecuencia cardíaca como del flujo sanguíneo al músculo esquelético acompañado además de un aumento de la PA; el sistema gastrointestinal en donde se observa un aumento de la secreción y la motilidad gástrica; o el sistema inmunitario en el cual se constata un aumento en su actividad. (Vogel 1987; Udelsman y cols 1994)

4.1.a. Sistema Catecolaminérgico

4.1.a.1. Síntesis de Catecolaminas

Las catecolaminas se forman en el cerebro, células cromafines, nervios simpáticos y cápsulas suprarrenales a partir de su aminoácido precursor, la tirosina, mediante una serie de pasos enzimáticos descritos en primer lugar por Blaschko (1939).

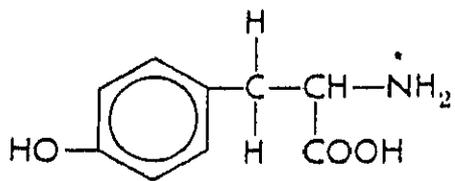
La tirosina se encuentra en el torrente sanguíneo y es captada por el cerebro y otros tejidos inervados por el sistema nervioso simpático (SNS) por un mecanismo de transporte activo. Una vez dentro de la terminación nerviosa va a sufrir una serie de transformaciones bioquímicas que conducen a la formación de NA, DA y AD en el cerebro, dependiendo de la disponibilidad de los enzimas dopamina-beta-hidroxilasa (DBH) y de feniletanol-amina-N-metiltransferasa (FNMT). (Esquema 1)

La tirosina puede también formarse a partir de la fenilalanina de la dieta por medio de una hidroxilasa.

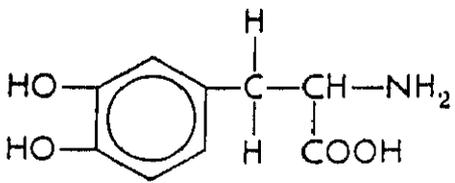
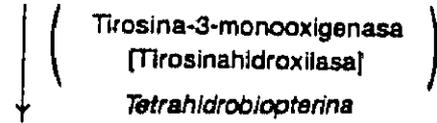
La tirosina hidroxilasa (TH) convierte a la tirosina en dihidroxifenil-alanina (DOPA). Mediante una decarboxilasa (DOPA decarboxilasa) la DOPA se transforma en dopamina y ésta en noradrenalina por medio del enzima DBH. El enzima limitante de la síntesis de noradrenalina es la tirosina-hidroxilasa, es estereoespecífico, requiere O_2 , Fe^{++} y como cofactor tetrahidropterina.

El gen humano para la TH ha sido clonado y codifica varios mRNA que son heterogéneos.

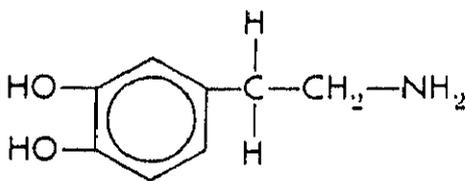
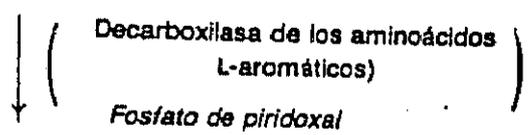
Estos cuatro enzimas no se encuentran en todas las células, cuando están disponibles se forma AD como ocurre con las células cromafines de la médula suprarrenal y algunas regiones cerebrales. Las que carecen de FNMT producen noradrenalina, como las neuronas simpáticas postganglionares, algunas células cromafines de la médula suprarrenal y numerosas neuronas del SNC. La DA se forma en aquellas células que carecen de DBH y FNMT como neuronas del SNC y algunas células periféricas.



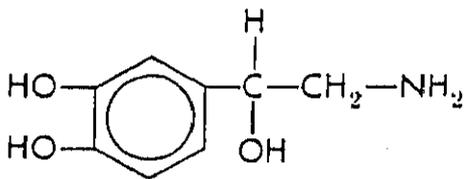
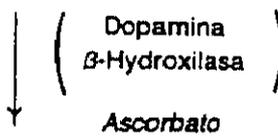
TIROSINA



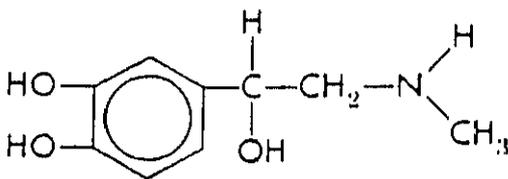
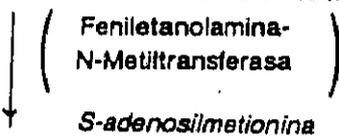
DOPA



DOPAMINA



NORADRENALINA



ADRENALINA

ESQUEMA 1

Biosíntesis de Catecolaminas. Tomada de Goodman y Gilman (1991).

La síntesis de catecolaminas está regulada mediante un mecanismo de retroalimentación negativa por el incremento o disminución de los niveles de CA. La actividad del enzima FNMT está regulada por los glucocorticoides. (Pohopecky y cols 1971)

El incremento del flujo simpático activa a la tirosina-hidroxilasa, pero además, recientes estudios han demostrado la relación de una fosforilación mediante una calmodulina Ca^{++} dependiente en el proceso de activación del enzima (Goldstein y Green, 1987). Además del control inmediato ejercido por la descarga simpática hay una estimulación a largo plazo que se cree que es debida a una inducción de la TH, pero que además se acompaña de un incremento en la formación de DBH sin incrementos significativos en la formación de DOPA-decarboxilasa. Se ha propuesto que estos enzimas derivan de un gen común y por lo tanto pueden ser corregulados (Cooper y cols, 1991)

En situaciones patológicas o farmacológicas este factor limitante puede pasar a depender de la DBH como ocurre con el uso de reserpina.

4.1.a.2. Almacenamiento y liberación.

Las catecolaminas (CA) se almacenan en vesículas de almacenamiento que contienen además ATP en una proporción CA-ATP de 4:1, el enzima DBH y cromogranina. En la médula adrenal las CA se encuentran coalmacenadas con encefalinas. Dentro de las vesículas, las CA están protegidas de la destrucción por monoamino-oxidasas MAO (que son enzimas intraneuronales), en ellas se oxida la DA a NA y cuando el neurotransmisor va a ser liberado se aproximan a la membrana presináptica, se fusionan con ella y se produce la liberación de CA por un mecanismo de exocitosis que es Ca^{++} -dependiente. No solo la concentración local de CA en el espacio intersináptico modula su propia liberación interactuando con receptores presinápticos. Están implicados en la regulación de la liberación las prostaglandinas, Ach, aminas vasoactivas y polipéptidos tales como angiotensina II.

4.1.a.3. Receptores adrenérgicos.

La NA y DA interaccionan con receptores específicos que se encuentran en las membranas celulares y que se conocen con el nombre de receptores adrenérgicos.

La respuesta que sigue a la estimulación de todos los tipos de receptores adrenérgicos se produce a través de proteínas G que van a generar segundos mensajeros y/o a activar canales iónicos.

Los receptores adrenérgicos fueron clasificados por Ahlquist en 1948 en dos clases: α y β . posteriormente se subdividieron los receptores α en α_1 y α_2 considerándose los α_1 como postsinápticos y responsables de los efectos farmacológicos de NA y AD y los α_2 como presinápticos debido a que su

estimulación era capaz de inhibir la liberación de NA provocada por estimulación de fibras noradrenérgicas. Su existencia fué confirmada por la aparición de antagonistas específicos (Prazosín para α_1 y Yohimbina para α_2) pero esta familia de receptores es mucho más compleja ya que últimamente se han caracterizado nuevos subtipos (α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}).

La estimulación del receptor α_1 activa el sistema de la fosfolipasa C que induce la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol asociados ambos con movilización del Ca^{++} intracelular. Este regula una serie de protein-quinasas entre las que se encuentra la proteinquinasa C y proteinquinasas sensibles a calmodulina.

La estimulación del receptor α_2 inhibe a la adenil-ciclase interactuando con una proteína G denominada G_i . Disminuyen las concentraciones intracelulares de AMP_c y el estado de activación de la protein-quinasa AMP-dependiente también disminuye.

Los receptores β se subdividieron inicialmente en dos grupos β_1 y β_2 . Recientemente se ha identificado un nuevo subtipo, los receptores β_3 que predominan en el tejido adiposo.

Todos los receptores β -adrenérgicos estimulan a la adenilciclase. La interacción con el receptor está mediada por una proteína G denominada G_s . La estimulación del receptor aumenta el AMP_c , activa una protein-quinasa AMP-dependiente y fosforila numerosas proteínas celulares alterando su función. Además la G_s puede actuar directamente sobre canales de Ca^{++} voltaje-dependientes en la membrana plasmática de los músculos cardíaco y esquelético.

Los genes de todos estos tipos de receptores adrenérgicos han sido clonados. Su distribución en el organismo es muy heterogénea y las acciones de las aminas simpaticomiméticas dependen del tipo de tejido del que se trate y de la concentración de receptores.

El número de los receptores adrenérgicos en un tejido dado es muy dinámico. Tanto la expresión como el estado funcional de los mismos está bajo estricto control, regulado por los niveles de catecolaminas y otras hormonas, incluyendo los glucocorticoides. (Snyers y cols, 1990; Sakaue y cols, 1991)

La estimulación persistente por agonistas da como resultado una disminución en la capacidad de respuesta del receptor y termina en desensibilización.

Los cambios de función del receptor parece que ocurren mediante alteraciones en la fosforilación del mismo que están mediadas por diferentes clases de serina-treonina protein quinasas. Los glucocorticoides, por otro lado actúan en principio alterando el número de receptores mediante su influencia en la expresión génica.

Las respuestas de las catecolaminas se dividen generalmente en dos secuencias temporales.

Efectos a corto plazo, que son aquellos que se producen en segundos o minutos, mientras que los efectos a largo plazo son aquellos que ocurren en un curso de tiempo extenso.

Los efectos a corto plazo reflejan cambios rápidos en los estados funcionales de las proteínas diana causadas primariamente por efecto de la fosforilación.

Los efectos a largo plazo parecen ser resultado de cambios en el patrón de expresión génica.

Es importante señalar, sin embargo, que incluso los cambios en la expresión génica se generan normalmente inmediatamente después de la estimulación del receptor, produciéndose como resultado de la alteración en el estado funcional de los factores de transcripción específicos que regulan la expresión génica. (Hunter, 1992)

Esta plasticidad en el número de receptores y en la función, asociado con sus afinidades diferenciales para agonistas y antagonistas, permite las interacciones dinámicas a nivel celular. Los receptores adrenérgicos están presentes en la mayoría de los tejidos, pero su actividad predomina en las rutas cardiovasculares, endocrinas y metabólicas.

4.1.a.4. Vías Catecolaminérgicas en el SNC.

El hecho de que las principales áreas cerebrales con influencia tanto sobre la presión arterial como la frecuencia cardíaca se encuentran ampliamente inervadas por neuronas catecolaminérgicas, apoya la importancia de las catecolaminas centrales en la regulación cardiovascular.

Para estudiar en profundidad tanto los grupos celulares cerebrales que sintetizan NA, AD y DA como sus proyecciones axonales a distintas regiones del SNC se han aplicado técnicas neuroanatómicas tales como la utilización de neurotoxinas que logran la destrucción selectiva de un sistema de neurotransmisión, siendo la 6-hidroxi dopamina (6OHDA) una de las neurotoxinas más empleadas en los estudios a nivel central.

NEUROTOXINAS: 6-HIDROXI DOPAMINA

En 1967 Tranzer y Thoenen descubrieron que un análogo de la NA, la 6-hidroxi-dopamina (6OHDA; 2,4,5-trihidroxifenetilamina), inducía una degeneración selectiva de terminaciones adrenérgicas simpáticas nerviosas. Como consecuencia de estas investigaciones se introdujo un nuevo concepto en neurobiología denominado "denervación química".

La 6OHDA es captada y acumulada por neuronas, las cuales poseen en sus membranas mecanismos de transporte para catecolaminas, produciendo, como agente citotóxico que es, una acción neurodegenerativa sobre las mismas.

En animales adultos la 6OHDA no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica pero si se la administra local o intraventricularmente dicha neurotoxina es capaz de actuar sobre las neuronas centrales.

La acción neurotóxica de la 6OHDA es muy rápida. Treinta-sesenta minutos después de su administración se vacían completamente los depósitos de catecolaminas de la neurona.

A pesar de que la 6OHDA es captada por gránulos de almacenamiento intraneuronales no parece que ello sea un requisito imprescindible para provocar el daño nervioso, ya que se ha demostrado que la toxina también se muestra efectiva en animales reserpinizados (Kostrzewa y Jacobowitz, 1974)

Una propiedad asociada con su acción citotóxica es que posee un potencial redox bajo por lo cual es muy susceptible de sufrir una oxidación no enzimática.

El último efecto descrito sobre la 6OHDA es que dicha sustancia induce una permanente depolarización que se encuentra asociada a un incremento en la permeabilidad al Ca^{++} .

Se han propuesto dos teorías moleculares con el fin de explicar los efectos citotóxicos de la 6OHDA, ambos están basados en la facilidad que dicha neurotoxina posee para la oxidación.

Una de las teorías postula que los agentes causales de la toxicidad son el H_2O_2 y otros radicales que se forman (Heikkila y cohen, 1975); mientras que la otra teoría asume que la oxidación de productos quinoides de la 6OHDA actuarían como agentes alcalinizantes (Saner y Thoenen, 1971). Ambos procesos podrían dar lugar a alteraciones en las propiedades tanto funcionales como estructurales de proteínas y lípidos celulares importantes y por tanto pueden causar un daño irreversible.

Diversos estudios han demostrado que los niveles de catecolaminas intraneuronales son capaces de controlar la actividad degenerativa de la 6OHDA, probablemente ello se deba a la captación de radicales por parte de las mismas. (Sachs, 1975)

Un incremento intraneuronal de NA parece que es capaz de ejercer una acción protectora contra las acciones degenerativas de la neurotoxina.

Además de lo anteriormente reseñado se ha podido observar que debido a la rapidez de consumo de oxígeno que se produce durante la autooxidación de la 6OHDA, puede llegar a ser un potente desacoplador de la fosforilación oxidativa. (Wagner y Tlendelenburg, 1971)

En cuanto a la especificidad, se ha constatado que las terminaciones nerviosas parecen ser más sensibles a la neurotoxina, los axones un poco menos sensibles, siendo los cuerpos celulares las estructuras menos sensibles a la acción de la 6OHDA. Estas diferencias parecen que pueden relacionarse, al menos en parte, con las diferencias en la relación superficie-volumen.

Analizando la potencia neurotóxica de la 6OHDA se ha demostrado que el ácido ascórbico (habitualmente utilizado como vehículo para la misma) la incrementa, además la inhibición de ciertas enzimas (complejos enzimáticos) como

la MAO o de la COMT también se consigue un incremento de la potencia y especificidad de la 6OHDA. (Jonsson, 1980)

- Sistema Noradrenérgico

Las neuronas que sintetizan NA se localizan a nivel bulbar y pontino. El grupo de células A1 en la región ventrolateral caudal del bulbo raquídeo (CVLB) y el A2 del núcleo del tracto solitario (NTS), junto con una contribución relativamente menor de los grupos A5 y A7, dan lugar a una de las vías noradrenérgicas ascendentes de mayor relevancia: el haz noradrenérgico ventral (HNV) que se dirige rostralmente inervando el hipotálamo. También se han descrito proyecciones descendentes bulboespinales desde los grupos A1 y A2. (Ungerstedt, 1971)

Uno de los núcleos noradrenérgicos de mayor trascendencia es el locus ceruleus (LC) constituido por el grupo celular A6.

Los axones de estas neuronas forman extensas ramas colaterales que se proyectan ampliamente a lo largo de trayectos bien definidos. A nivel de microscopio electrónico, los terminales de estos axones exhiben, bajo apropiados métodos de fijación, el mismo tipo de pequeñas vesículas granulares observadas en los nervios del sistema simpático periférico.

Este núcleo, con una menor aportación de los grupos A4 y A7, origina otra gran vía ascendente noradrenérgica: el haz noradrenérgico dorsal (HND) el cual cursa rostralmente emitiendo proyecciones al hipotálamo lateral, núcleos talámicos, amígdala, hipocampo y corteza frontal.

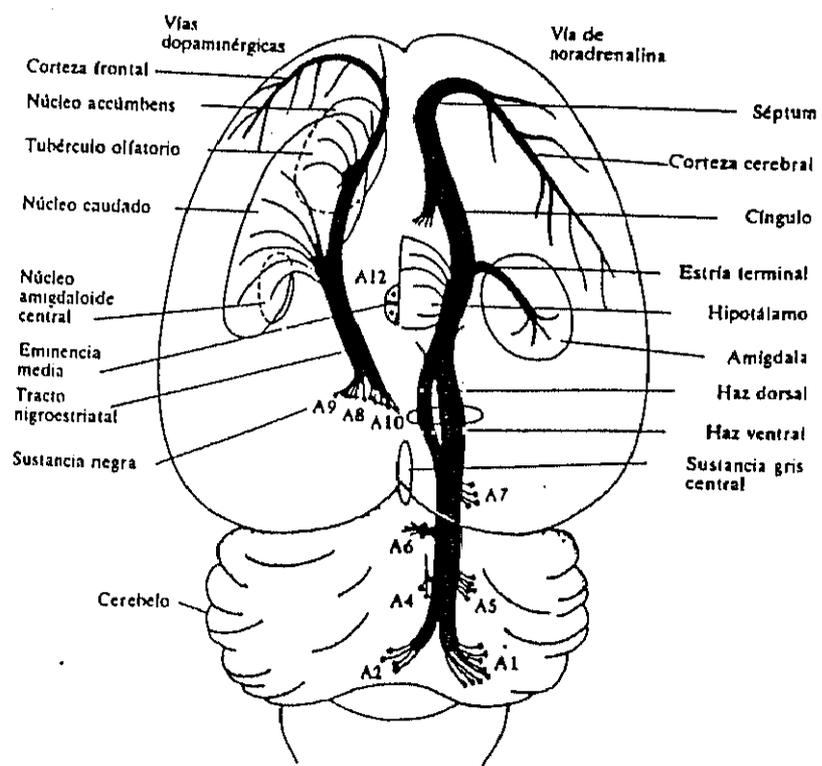
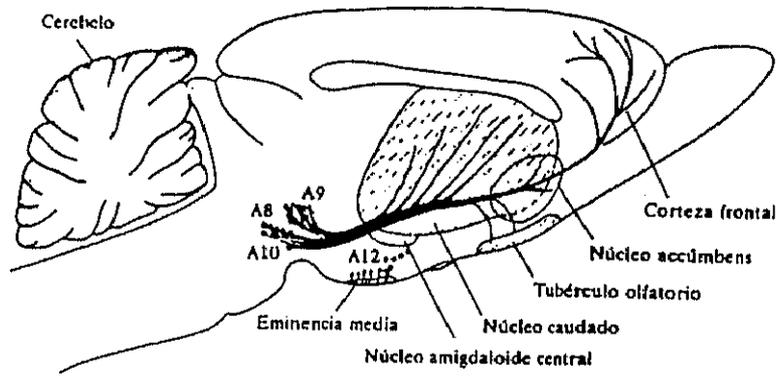
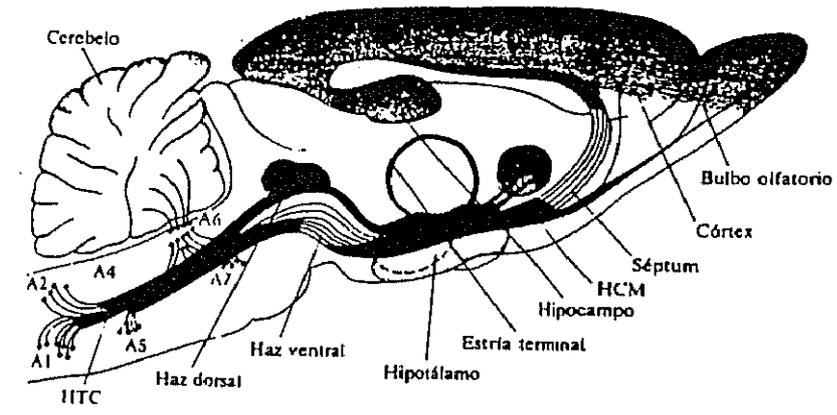
Las proyecciones descendentes del LC inervan algunas estructuras del tronco encefálico y la médula espinal. (Nygren y Olson, 1977)
(Esquema 2)

La relevancia cardiovascular de las vías ascendentes noradrenérgicas no admite duda, dada la profusa inervación que desde los núcleos pontinos y bulbares recibe el hipotálamo. (Van den Buuse y cols, 1991)

Así, áreas implicadas en la regulación básica del sistema cardiovascular se unen a centros involucrados en la respuesta comportamental-emocional-hormonal a estímulos ambientales.

Virtualmente todas las rutas noradrenérgicas que han sido estudiadas fisiológicamente son rutas eferentes de las neuronas del LC, en el cerebelo, hipocampo y corteza cerebral, el principal efecto de la activación de esta ruta es la producción de una inhibición de la descarga espontánea. Este efecto se ha asociado con el tipo lento de transacción sináptica, en la cual, la respuesta hiperpolarizante de la célula diana se acompaña de un incremento en la respuesta de la membrana.

El mecanismo de esta acción ha sido relacionado experimentalmente con el esquema de segundo mensajero en el cual el receptor noradrenérgico, produce su acción característica en las células diana mediante la activación de la síntesis de



ESQUEMA 2

Vías de la noradrenalina (esquema superior) y dopamina (esquema central) esquematizadas en un corte sagital. En el esquema inferior se presentan las mismas vías en un corte horizontal. Tomado de Bradford (1986).

AMP^{célico} en/o sobre la membrana postsináptica. Farmacológica y citoquímicamente, las células diana responden a la NA o la proyección del LC en estas áreas corticales exhibiendo receptores β -adrenérgicos.

- Sistema Adrenérgico

Los grupos celulares que contienen Ad son tres: C1, C2 y C3, estando restringidos al bulbo raquídeo. (Hökfelt y cols, 1973)

El grupo C1 se localiza en la región rostral ventrolateral del bulbo (RVLB), región importante en la regulación central de la presión arterial, está entremezclado con células noradrenérgicas del sistema tegmental lateral.

Las neuronas adrenérgicas del grupo C1 proyectan sus axones para inervar rostralmente diversos núcleos hipotalámicos y caudalmente el núcleo intermedio lateral de la médula espinal. (Fuller, 1982)

El otro grupo, el C2, se sitúa en el NTS, proyectándose a los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y al LC. Además se encuentra en las regiones en las cuales también se hallan células noradrenérgicas de la médula dorsal.

El tercer grupo de células, C3, se describe en el fascículo longitudinal medial.

- Sistema Dopaminérgico

Los sistemas dopaminérgicos centrales son considerablemente más complejos en su organización que los sistemas noradrenérgicos. No sólo hay muchas más células dopaminérgicas, también hay varios núcleos dopaminérgicos principales así como neuronas dopaminérgicas especializadas que realizan conexiones extremadamente localizadas dentro de la retina y el bulbo olfatorio.

Los grupos celulares dopaminérgicos descritos en el SNC se designan desde A8 hasta A15 y están confinados fundamentalmente al mesencéfalo, con pequeños grupos que se sitúan en el diencefalo y en el telencefalo. (Dahlstrom y Fuxe, 1964)

Existen haces ascendentes de gran trascendencia como el sistema dopaminérgico nigroestriatal, constituido por los grupos A8 y A9 que llega a inervar el núcleo putamen y el núcleo caudado; otro haz ascendente importante es el sistema dopaminérgico mesolímbico constituido por el grupo A10 y que inerva diferentes estructuras límbicas y corticales. (Ungerstedt, 1971)

En el diencefalo los grupos celulares dopaminérgicos se circunscriben a dos núcleos hipotalámicos; el núcleo periventricular (A11) y el núcleo arcuato (A12 y su prolongación rostral A14), dicho núcleo dará lugar al sistema dopaminérgico tuberoinfundibular que inerva la eminencia media. Por último, el grupo A13 no está

concretamente localizado y el A15 se sitúa en el bulbo olfatorio (Bjorklund y Nobin, 1973) (Esquema 2)

4.1.a.5. Metabolismo de las Catecolaminas.

Las catecolaminas endógenas y exógenas son metabolizadas por dos enzimas: la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-orto-metil-transferasa (COMT).

La MAO convierte las catecolaminas en sus correspondientes aldehídos que se metabolizan rápidamente por la aldehído deshidrogenasa a ácidos carboxílicos. A veces se reducen a alcoholes o gliceroles, produciéndose el principal metabolito cerebral que es el monohidroxifeniletilenglicol (MHPG). La MAO se considera como un enzima intracelular unido a las membranas de las mitocondrias, aunque también se encuentra fuera de las neuronas en sitios como el hígado y el epitelio intestinal. Se le conocen dos formas: MAO-A y MAO-B, que difieren en su distribución regional, especificidad del sustrato y susceptibilidad a la inhibición por fármacos. La MAO-A metaboliza principalmente NA y 5HT mientras que la DA es sustrato para ambas formas. Se considera que bajo determinadas circunstancias las MAO intracelulares pueden modificar la biosíntesis de NA, controlando la cantidad de sustrato DA disponible para el enzima DBH.

La segunda vía del metabolismo de las catecolaminas es la metilación de uno de los grupos -OH del núcleo catecol por la COMT. Es un enzima neuronal y extraneuronal. El producto final es el ácido vanilmandílico (VMA).

El metabolismo es complejo y se forman diversos intermediarios que pueden ser metabolizados por distintas enzimas.

Las medidas de VMA y MHPG en orina pueden servir para cuantificar la liberación de NA central y periférica.

4.1.a.6. Efectos fisiológicos de las Catecolaminas.

EFECTOS CARDIOVASCULARES: En términos generales la unión de agentes adrenérgicos a receptores α -adrenérgicos da lugar a vasoconstricción, la unión a receptores β_1 da lugar a un incremento en la frecuencia cardíaca y la contractilidad y la unión a receptores β_2 da lugar a una vasodilatación. Sin embargo las catecolaminas endógenas, la NA y AD, son agonistas mixtos. (Lefkowitz y cols, 1990)

Por consiguiente sus efectos fisiológicos reflejan la suma total de la densidad de receptor en un tejido determinado y la afinidad para sus respectivos ligandos.

Para el presente estudio son de gran importancia e interés las acciones inducidas sobre el sistema cardiovascular en especial las que afectan directamente a la presión arterial (PA).

La estimulación simpática del corazón conlleva un aumento tanto de la frecuencia como de la fuerza de contracción. Las catecolaminas (CA) circulantes producen un aumento del tono vasomotor responsable de una vasoconstricción generalizada. Como consecuencia de ello se produce un aumento simultáneo del gasto cardíaco y de las resistencias vasculares periféricas que nos conduce a un incremento de la PA. Esta respuesta es inmediata y de breve duración, siendo la primera respuesta desarrollada ante cualquier tipo de estrés sin depender de su duración.

Ante un estrés agudo o puntual constituye la única respuesta del organismo.

EFFECTOS VISCERALES: El incremento en la actividad α reduce la motilidad intestinal y redistribuye la sangre fuera de las vísceras. Además el tono del esfínter de la vejiga urinaria está incrementado.

En ciertas especies animales (como el perro) la cápsula esplénica se constriñe para incrementar el volumen intravascular funcional.

Otras acciones de las catecolaminas incluyen broncodilatación (β_2), midriasis (α_1) y tanto contracción (α_1) como relajación (β_2) uterina. (Udelsman y cols, 1994)

4.1.a.7. Metabolismo y sinergismo hormonal.

Las catecolaminas tienen efectos tanto directos como indirectos en múltiples rutas endocrinas y metabólicas. Intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

Los efectos directos incrementan la glucemia mediante la estimulación de la glucogenolisis y gluconeogenesis hepática y glucogenolisis muscular.

Los efectos indirectos están mediados a través de una variedad de acciones de la hormona estimuladora-adrenérgica. Estas acciones incluyen un efecto supresivo de la secreción de insulina (α_2) y un efecto estimulador en la secreción de glucagón (β), hormona del crecimiento (α) y renina (β_1).

Además la lipólisis está estimulada en las células adiposas y la cetogénesis es estimulada en el hígado. (Cryer , 1981)

El eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA), el sistema nervioso simpático y las citoquinas de la fase aguda forman el marco a través del cual el sujeto responde al estrés con una respuesta global coordinada. Esto requiere cambios en el programa genético celular para incrementar o disminuir la producción de ciertos productos génicos. Los mecanismos moleculares a través de los cuales estos ejes operan están empezando a ser entendidos.

La expresión de un determinado gen puede ser regulado a múltiples niveles.

Entre estos mecanismos se incluyen:

1. La alteración de su actividad transcripcional (el ritmo al que el DNA es transcrito a RNA)

2. La alteración de la estabilidad de la transcripción del mRNA (incrementando o reduciendo su ritmo de descomposición) (Sachs y cols, 1993)
3. La utilización de patrones de unión alternativos para producir diferentes especies de mRNA que están en parte sometidos a control postranscripcional diferencial y/o que codifica diferentes formas de proteína (Krays y cols, 1990)
4. La alteración de las propiedades translacionales del mRNA (Proudfoot, 1991)

Por estos mecanismos, la activación transcripcional parece que juega un gran papel en el control del nivel de la expresión génica en respuesta al estrés.

La actividad transcripcional está controlada por la interacción de las denominadas proteínas transactivantes o factores transcripcionales con secuencias de DNA específicas denominadas elementos cis-reguladores. (Mitchell y cols, 1989)

Los factores transcripcionales son por si mismos proteínas, y por tanto los genes que los codifican estan sometidos a los mismos procesos reguladores que los que ellos sirven para regular.

Los glucocorticoides, las catecolaminas y las citoquinas asociadas con la respuesta de fase aguda son capaces de modular la expresión génica.

Los glucocorticoides y las catecolaminas son los principales efectores de la adaptación al estrés e interactúan a múltiples niveles en un estilo sinérgico. Ellos se unen a receptores específicos que están virtualmente presentes en todos los órganos, mientras que el número y la afinidad de los receptores de un tejido determinado varía para los ligandos individuales.

La ocupación de un receptor da como resultado efectos a corto y largo plazo que en último caso mejoran las perspectivas del sujeto para tolerar el estrés.

Los efectos a corto plazo dan como resultado acciones rápidas, como respuestas cardiovasculares y metabólicas que benefician al sujeto en las reacciones de "lucha o huida". Los efectos a largo plazo suceden generalmente a través de alteraciones en la transcripción génica, que prepara o adapta al sujeto para un estrés repetitivo o crónico.

Los cambios en el estado de fosforilación de las proteínas intracelulares son una forma de acción común tanto para las respuestas a corto como a largo plazo.

Estas proteínas de respuesta al estrés tienen una enorme capacidad funcional: alteran rutas enzimáticas, modulan niveles hormonales y actúan como factores transcripcionales para modificar la expresión de los genes en respuesta al estrés. (Udelsman y cols, 1994)

4.2. SISTEMA OPIOIDE

El Sistema Opioide es un término genérico que se utiliza para designar a un grupo heterogéneo de péptidos presentes en el organismo los cuales constituyen los

ligandos endógenos de los receptores opioides, y que como característica común contienen en algún lugar de su molécula la secuencia aminoacídica Tyr-Gly-Gly-Phe.

Historicamente, los receptores opioides fueron caracterizados con anterioridad al descubrimiento de los propios péptidos opioides. En el año 1973 se puso de manifiesto, mediante evidencias farmacológicas, la existencia de receptores específicos para el alcaloide morfina y otros derivados opiáceos en el SNC (Pert y Snyder, 1973).

La historia de los péptidos endógenos comenzó también en el año 1973 cuando Hughes observó que algunos extractos de cerebro de cerdo inhibían la contracción de la señal producida por estimulación eléctrica del conducto deferente de ratón, viendo que esta inhibición desaparecía en presencia de naloxona. La inhibición observada en estos experimentos era semejante a la producida por la morfina lo que inducía a pensar en la existencia de un compuesto endógeno con características semejantes a la morfina y sobre cuyo receptor actuaría la morfina exógena. Después de dos años de intenso trabajo, en 1975, Hughes y Kosterlitz descubrieron las encefalinas abriendo un nuevo e interesante campo de investigación.

4.2.a. Biogénesis de los Péptidos Opioides

Gracias al desarrollo de técnicas de recombinación del DNA se sabe que los distintos péptidos opioides se producen por ruptura proteolítica de tres precursores protéicos diferentes: Pro-opiomelanocortina, Pro-encefalina y Pro-dinorfina. Estos tres precursores exhiben tamaños similares (de aproximadamente unos 30000 daltons) y su proteólisis da lugar a una mezcla de péptidos biológicamente activos de distintos tamaños. (Nakanishi y cols, 1979; Legon y cols, 1982; Kakidani y cols, 1982).

Los péptidos derivados de la Pro-opiomelanocortina (POMC) se denominan **endorfinas** a los que pertenece la β -endorfina, los derivados de la Pro-encefalina se denominaron **encefalinas** y cuyos representantes más destacados son la metionina-encefalina (met-encefalina) y la leucina-encefalina (leu-encefalina) y por último los derivados de la Pro-dinorfina a los cuales se denomina **dinorfinas** siendo uno de sus representantes la dinorfina.

Además de lo referido anteriormente, a lo largo de los últimos años se ha podido comprobar que la Pro-opiomelanocortina (POMC) también es responsable de la existencia de otros derivados endorfinicos biológicamente activos (β -endorfina 1-27, β -endorfina 1-16, β -endorfina 1-17), así mismo la adenocorticotropina (ACTH) y las melanotropinas derivan del precursor endorfinico y son co-almacenadas y secretadas junto con la β -endorfina.

Visto ésto sería acertado sugerir que mientras más grande sea el tamaño de un péptido, mayor probabilidad existe de que éste ejerza actividades biológicas diferentes. (Rodríguez, 1992).

Actualmente los péptidos opioides se suelen clasificar en seis grupos:

- 1.- Péptidos opioides de cinco aminoácidos (met-encefalina, leu-encefalina).

- 2.- Péptidos que se supone que se forman a partir de los precursores de las encefalinas (por ejemplo los derivados de la Pro-encefalina de la médula adrenal: met-encefalina-Arg⁶-Phe⁷, péptido E, dinorfina, α y β -neoendorfinas).
 - 3.- β -endorfina y otras endorfinas relacionadas (α y σ -endorfinas).
 - 4.- Péptidos del tipo de la β -casemorfina (presente en la leche de la vaca).
 - 5.- Kitorfina, la cual parece que estimula la biosíntesis e inhibe la degradación de las encefalinas.
 - 6.- Dermorfina.
- (Rodríguez , 1992)

4.2.b. Distribución de los Péptidos Opioides en el Sistema Nervioso Central.

Mediante la utilización de técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas se ha podido determinar tanto la localización intracelular de los opioides endógenos como su distribución en varias áreas cerebrales. Así se ha comprobado que los péptidos opioides no están distribuidos uniformemente en el SNC. Como ejemplo podemos poner el caso de las encefalinas, las cuales, se hallan en concentración máxima en el estriado, en concreto en el globo pálido y no en el putamen y nucleo caudado, mientras que se encuentran concentraciones más pequeñas en el cerebro y en la corteza.

Distribución de encefalinas:

Las neuronas que contienen encefalinas se localizan principalmente en regiones relacionadas con el control del dolor (Hockfelt y cols, 1977; Simantov y cols, 1977); aunque también están presentes en otras áreas.

Los resultados obtenidos de los diferentes estudios inmunohistoquímicos que se han realizado para analizar la distribución de las encefalinas deben ser evaluados con cautela ya que los anticuerpos de los que en este momento se dispone presentan reacción cruzada con otros péptidos.

Haciendo uso de las técnicas autorradiográficas y técnicas de unión al receptor ("Binding") se ha podido demostrar que existe una clara relación entre la distribución de fibras encefalinérgicas y los receptores opioides, lo que nos indica que el receptor opioide en el cerebro es, de hecho, el receptor encefalinérgico.

(Esquema 3)

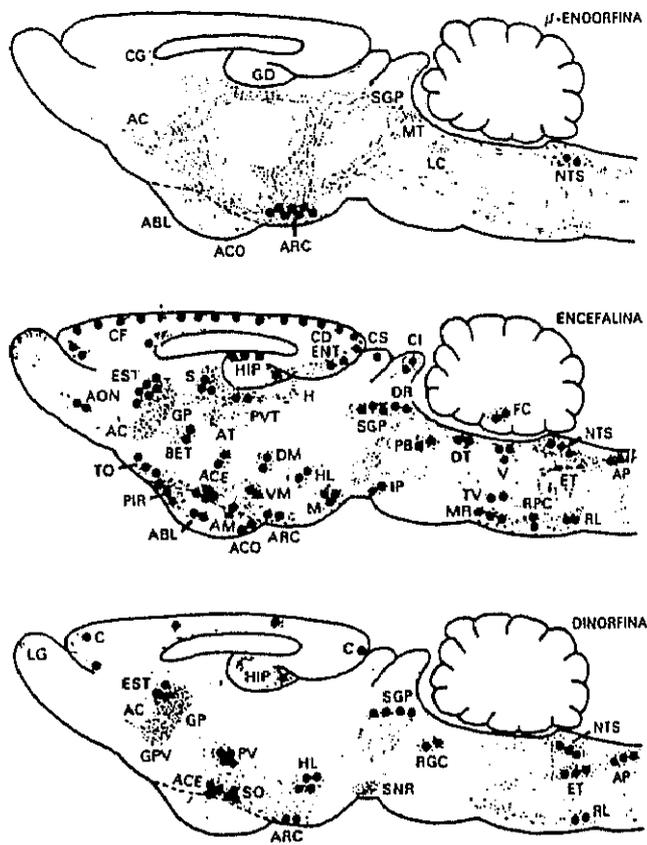
Distribución de la β -endorfina:

La β -endorfina está presente en todas las especies estudiadas incluyendo el hombre.

Se aisló por primera vez de la hipófisis de cerdo (Bradbury y cols, 1975), encontrándose además en el páncreas, sistema gástrico, en la placenta y en el SNC.

En general, tanto la β -endorfina como sus derivados existen en concentraciones muy pequeñas, causa que hace muy difícil su aislamiento e identificación.

En el SNC todas las fibras que contienen β -endorfina tienen su origen en dos poblaciones neuronales, el nucleo arcuato y la eminencia media, regiones que se localizan la primera cerca del borde ventromedial del tercer ventrículo y la segunda en



ESQUEMA 3

Representación esquemática de los tres sistemas de péptidos opioides en SNC de rata, sección sagital. Los cuerpos neuronales se señalan por círculos negros, y las fibras y terminaciones por puntos finos. (Según Watson y col., con autorización de Taylor & Francis.) ABL: amígdala, núcleo basolateral; AC: núcleo *accumbens*; ACE: amígdala, núcleo central; ACO: amígdala, núcleo cortical; AM: amígdala, núcleo medial; AON: núcleo olfatorio anterior; AP: asta posterior de la médula espinal; ARC: núcleo arcuado; AT: núcleo anterior del tálamo; BET: núcleo basal de la estría terminal; CF: corteza frontal; CG: corteza cingulada; CI: tubérculo cuadrigémino inferior; CO: corteza occipital; CS: tubérculo cuadrigémino superior; DM: núcleo dorsomedial; DR: núcleo dorsal del rafe; DT: núcleo dorsotegmental; ENT: corteza entorrina; EST: neostriado; ET: núcleo espinal trigémino; FC: núcleo fastigial cerebelo; GD: *gyrus dentatus*; GP: *globus pallidus*; GPV: pálido ventral; H: habénula; HIP: hipocampo; HL: hipotálamo lateral; IP: núcleo interpeduncular; LC: *locus coeruleus*; LG: lámina glomerulosa bulbo olfatorio; M: núcleo mamar; MR: núcleo magno del rafe; MT: núcleo medial del trigémino; NTS: núcleo del tracto solitario; PB: núcleo parabraquial; PIR: corteza piriforme; PV: núcleo paraventricular; PVT: núcleo periventricular del tálamo; RGC: núcleo reticular gigantocelular; RL: núcleo reticular lateral; RPG: núcleo reticular paragigantocelular; S: *septum*; SGP: sustancia gris periacueductal; SNR: sustancia negra, *pars reticulata*; SO: núcleo supraóptico; TO: tubérculo olfatorio; TV: núcleo tegmental ventral; V: núcleo vestibular; VM: núcleo ventromedial.

el núcleo del tracto solitario. Además existen neuronas productoras de β -endorfina en el hipotálamo, corteza olfatoria, amígdala e hipocampo. (Khachaturian y cols, 1985). (Esquema 3)

4.2.c. Biosíntesis, Liberación y Degradación de los Péptidos Opioides.

Como se ha mencionado anteriormente, los péptidos opioides endógenos surgen de la degradación enzimática de proteínas de alto peso molecular, los denominados precursores, que por lo general son inactivas y que se cree que son sintetizadas a nivel ribosomal; aunque hay indicios de que el retículo endoplásmico podría estar también implicado en la **biosíntesis**. (Khachaturian y cols, 1985).

Dado que los péptidos derivados de la POMC están presentes tanto en la hipófisis como en resto del cerebro, deben ser éstos considerados potencialmente como hormonas o neuromoduladores o neurotransmisores.

La regulación de la síntesis y almacenamiento puede suceder a distintos niveles:

- 1.- Transcripción del gen POMC al RNA mensajero.
- 2.- Traslación del mRNA al precursor.
- 3.- Procesamiento proteolítico del precursor al péptido.
- 4.- Procesamiento postranslacional que puede afectar a las propiedades biológicas del péptido.

Los enzimas que participan en la biosíntesis de los precursores de los péptidos opioides endógenos son del tipo de la tripsina, endopeptidasas y N-carboxipeptidasas; aunque todavía no se sabe si existen enzimas específicos para algún precursor o si los procesos enzimáticos son comunes a todas las prohormonas. (Hughes , 1983).

La **liberación** de los péptidos opioides puede tener lugar en la sinápsis, en la hipófisis como sucede con la β -endorfina, o bien de la médula adrenal como sucede con los heptapéptido y octapéptido (met-enkefalina-Arg-Phe y met-enkefalina-Arg-Gly-Leu respectivamente) hacia la circulación sanguínea.

La liberación de péptidos opioides en situaciones de estrés juega un papel muy importante en las respuestas fisiológicas asociadas al mismo como se comentará en detalle más adelante. (Zeman y col.s, 1988).

A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los péptidos opioides una vez que se liberan y actúan sobre sus receptores no sufren un proceso de recaptación sino que sufren una **degradación enzimática**.

Las encefalinas son degradadas por aminopeptidasas (denominadas en este caso encefalinasas) presentes tanto en el plasma como en el cerebro. Este enzima se une a la membrana, mostrando un patrón diferente de distribución en varias áreas cerebrales y estando asociada además al receptor opioide.

Las encefalinasas hidrolizan a una gran variedad de péptidos (angiotensina, sustancia P...). Sin embargo tanto la β -endorfina como la dinorfina son sustratos muy pobres para estas enzimas.

Por la inactivación mediante peptidasas de los péptidos opioides endógenos se producen otros péptidos biológicamente activos, los cuales pueden mostrar una

actividad similar o diferente al del péptido precursor. También son importantes en la formación de metabolitos peptídicos los procesos de acetilación, sulfatación y formación de amidas en el carbono terminal. (De Wied, 1979).

4.2.d. Receptores Opioides

La demostración bioquímica de la existencia de los **receptores opioides** arranca de los años 60 en los que se realizaron los primeros trabajos encaminados a la determinación de receptores opioides específicos. Entre estos trabajos se encontraban los llevados a cabo por Pert y Snyder (1973) en los que utilizaron como ligando un antagonista selectivo marcado radiactivamente, la ^3H -naloxona. (Pert y Snyder, 1973; Simon y col., 1973; Terenius, 1973).

La naturaleza proteica de estos receptores se intuye al observar que enzimas proteolíticas y otros agentes modificadores de proteínas reducían considerablemente la unión específica de radioligandos opiáceos a este receptor. (Simon y col., 1973; Pasternak y Snyder, 1974). Por otro lado la gran sensibilidad de este receptor a ciertas fosfolipasas sugería la posibilidad de que los fosfolípidos jugaran un importante papel en su estructura y/o función. (Pasternak y Snyder, 1974).

Así parece que los lípidos ácidos de membrana como el sulfato de cerebrósido (Loh y cols., 1974) y la fosfatidilserina (Abood y Takeda, 1976) estén implicados en la función normal del receptor opioide.

La unión de ligandos a este receptor cumple las premisas básicas requeridas para diferenciar un lugar específico del que no lo es, como son que sea una unión estereoespecífica y saturable (Goldstein y cols., 1971), sensible a diversos iones, GTP, pH y temperatura. (Simantov y cols., 1976).

La existencia de múltiples formas de receptores opioides fué postulada inicialmente por Portoghese en 1965, posteriormente Martin y col. (1976) trabajando en perros espinalizados y basándose en los diferentes efectos comportamentales producidos por los agonistas opiáceos clásicos y en la ausencia de tolerancia cruzada exhibida por los mismos postularon la existencia de tres tipos básicos de receptores: receptores mu (μ) para los compuestos tipo morfina, kappa (κ) para el alcaloide sintético ketociclazocina y sigma (σ) para el SKF 10,047.

Estudios posteriores parecen confirmar que el receptor σ no sería específicamente opiáceo. (Cooper y col., 1991).

El aislamiento e identificación de la leu- y met-enkefalina así como el desarrollo de la técnica de fijación de receptores ("binding") posibilitaron la definición de los receptores delta (δ), caracterizados por su interacción con las encefalinas en conducto deferente de ratón (Lord y col., 1977). De modo similar, al descubrimiento de la β -endorfina sucedió la descripción del receptor epsilon (Σ) (Akil y col., 1980).

En la actualidad diversos estudios parecen indicar la existencia de numerosos subtipos de receptores opioides. Así se han diferenciado dos subtipos para el receptor μ , el μ_1 y el μ_2 (Wolozin y Pasternak, 1981), dos subtipos también para el receptor δ , el

δ_1 y el δ_2 (Negri y cols 1991, Traynor y Elliot 1993) y tres subtipos para el receptor k , denominados k_1 , k_2 y k_3 (Zukin y cols 1988, Clark y cols 1988).

Además se sabe que los receptores μ y δ pueden coexistir en las mismas neuronas, como por ejemplo en el ganglio hipogástrico en el ratón (Rogers, 1990) o en el neocórtex en la rata en donde se sugiere que podrían incluso compartir la misma proteína G inhibitoria para llevar a cabo su mecanismo de acción. (Schoffelmeer y cols, 1987).

Tras la interpretación de extensos estudios de unión a receptores ("binding"), en los que se observó que los ligandos para los receptores μ eran capaces de inhibir el "binding" de ligandos para receptores δ tanto de una forma competitiva como no competitiva, Rothman y sus colaboradores propusieron dividir los receptores δ en dos subtipos en relación a esta característica, así habría unos receptores δ asociados con receptores μ y que denominaron δ_{complejo} o δ_{cx} y aquellos receptores delta que no estaban asociados a receptores μ , denominados $\delta_{\text{noComplejo}}$ o δ_{ncx} . (Rothman, 1988; Xu y cols, 1993).

A pesar de los estudios llevados a cabo hasta el momento todavía no se ha podido correlacionar coherentemente los dos tipos de subdivisiones descritos para los receptores delta, por un lado estarían los subtipos δ_1 y δ_2 basados en estudios realizados con agonistas selectivos y por otro los denominados δ_{cx} y δ_{ncx} basados en estudios sobre la relación entre receptores delta y receptores μ . (Traynor y Elliot, 1993).

4.2.d.1. Distribución y significado fisiológico de los receptores opioides:

Se ha podido establecer la distribución de los diferentes tipos de receptor opioide en base a los resultados de estudios de fijación a preparados de membranas de áreas discretas cerebrales así como a la aplicación de técnicas autorradiográficas en cortes seriados del Sistema Nervioso.

Los receptores opioides se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC (Tabla I), particularmente en estructuras límbicas, núcleos talámicos y otras áreas neurales relacionadas con funciones viscerales.

La distribución cuantitativa de los tres principales tipos de receptor opioide (μ , delta y kappa) varía en cada estructura e incluso se encuentran modificaciones entre especies (Lewis y col., 1984; Sharif y Hughes, 1989). De tal forma que mientras en el humano la proporción relativa de los tres tipos es similar, en la rata los receptores kappa representan tan sólo el 9% de la población total frente al 41% y 50% para los receptores μ y delta respectivamente. (Mansour y col., 1988).

Aunque se observa una cierta superposición en la distribución de los tipos μ , delta y kappa en el cerebro, son abundantes, sin embargo, las áreas en las que predomina un tipo sobre los demás. (Mansour y col., 1988).

Así, aunque los tipos μ y delta se encuentran en el neocórtex, su distribución es distinta pareciendo complementaria.

TABLA I

Distribución de receptores opioides en el Sistema Nervioso de la rata. (Adaptado de Mansour y cols, 1988).

REGION	TIPO DE RECEPTOR		
	μ	δ	K
I. Telencéfalo			
cortex frontal	+++	++	+
hipocampo	+++	++	+
tuberculo olfatorio	+	++++	+++
n. accumbens	++++	++++	+++
n. caudado-putamen	++++	++++	+++
globus pallidus	+	+	+
II. Diencefalo			
hipotálamo			
n. supraóptico	0	0	++
n. paraventricular	0	0	++
n. arcuado	0	0	++
tálamo			
n. periventricular	0	0	++
n. centromedial	++++	+	++
habénula	+++	+	+++
III. Mesencéfalo			
n. interpeduncular	++++	+++	+++
substancia negra	+++	0	0
subs. periacueductal	+	0	++
n. dorsal rafe	++	0	++
tub. cuadrigéminos	++++	+	++
IV. Bulbo-Puente			
n. parabraquial	+++	0	++
n. rafe magno	++	0	+
n. tracto solitario	++++	+	+++
n. trigémino	+++	0	++
V. Médula Espinal			
substancia gelatinosa	+++	+	++

En general las estructuras del sistema límbico, así como el neocortex, son ricas en receptores opioides.

El receptor μ se localiza en áreas relacionadas con el control de la sensación nociceptiva e integración sensorial y motora. Este tipo de receptor presenta una ubicación difusa, distribuyéndose en numerosos núcleos a lo largo del neuroeje, incluyendo la corteza, el núcleo estriado, el hipocampo, la sustancia nigra, el locus coeruleus y el NTS.

La distribución del receptor opioide tipo delta es más precisa, restringiéndose a áreas telencefálicas, mientras que el receptor kappa presenta una localización preferente en el área preóptica, la eminencia media del hipotálamo, la amígdala y el NTS, observándose una elevada densidad en el hipocampo mientras que en la corteza y bulbo raquídeo su concentración es baja. (Mansour y col., 1988). Esta distribución es consistente con su posible participación en la regulación de la ingesta, percepción de la sensación dolorosa y función neuroendocrina.

A pesar de lo señalado anteriormente no parece acertado asignar un papel funcional preferente para cada tipo de receptor opioide, ya que hay que tener en cuenta que además de la acción primaria a que dé lugar su activación, inhibición o excitación neuronal, la función de la vía en la que se encuentra es la responsable del efecto final obtenido.

Los receptores opioides están, como hemos señalado ampliamente distribuidos, por lo que se encuentran implicados en la función de una gran variedad de procesos. (Tabla II).

Uno de los efectos más relevantes de los opiáceos/opioides es la analgesia, actualmente se acepta que los tres tipos básicos de receptor opioide están implicados en el control de la sensación dolorosa, sin embargo la importancia relativa de cada tipo en el control de diferentes sensaciones dolorosas (térmica, presión, visceral...) está aun en debate.

La mediación de la analgesia a nivel supraespinal que se atribuía clásicamente a la ocupación de los receptores μ , ha sido recientemente asignada al subtipo μ_1 (Pasternak, 1988), así como a los receptores delta (Porreca y col., 1987; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989). A nivel espinal se produce analgesia mediante la activación de cualquiera de los tres tipos de receptor opioide.

La localización de los receptores μ , delta y kappa en el NTS parece estar relacionada con el control de las funciones autónomas, más concretamente, con el control reflejo del sistema cardiovascular.

Por otro lado diversos estudios han correlacionado el patrón de distribución/densidad de los receptores μ opioides en el tálamo y tronco cerebral con las acciones depresoras de los opioides sobre la respiración y con sus efectos sedantes. (Atweh y Kuhar, 1983).

El aumento de la actividad locomotora parece ser relativo a la localización de los receptores μ en las zonas A9 y A10, donde modulan la liberación estriatal de DA.

TABLA II

Efectos opioides: su asociación a los tipos de receptor.

Comportamentales	
analgesia supraespinal	$\mu > \delta, K$
analgesia espinal	$\mu, \delta > K$
estres	$\delta > \mu$
euforia	μ
disforia	K
sedación	μ, K
catalepsia	μ
actividad motora	$\mu (+, -), K (-)$
supresión del apetito	$K > \mu$
anticonvulsivos	μ, δ, k
Endocrinos	
liberación de ACTH-cortisol	$\mu > \delta, K$
liberación de prolactina	$\mu > K$
liberación de GH	δ
inhibición de ADH	K
inhibición de LH y testosterona	μ, K
Autónomos	
motilidad gastrointestinal (—)	μ
motilidad vejiga (—)	μ, δ
midriasis	μ
miosis	μ
hipertermia	μ
depresión respiratoria	μ, δ
bradicardia	μ, δ
hipertensión	δ
choque hemorrágico	δ, K
choque endotóxico	δ
Inmunes	
inmunoestimulación	$\delta > \mu$
inmunosupresión	$\mu > \delta, K$
producción de anticuerpos (—)	μ
quimiotactismo monocitos (+)	$\mu > \delta$
quimiotactismo resto leucocitos	$K > \mu, \delta$

(Chesselet y col., 1982). De forma paralela, la ocupación de los receptores kappa en estas regiones induce sedación lo que se correlaciona con el elevado contenido del receptor kappa en estas zonas.

En cuanto a lo que se sabe de los efectos de los opioides sobre la secreción hormonal en el SNC hay que señalar que la distribución anatómica de los receptores kappa en la hipófisis posterior se asocia al papel inhibitorio ejercido por los opioides sobre la liberación de la vasopresina, así como a la acción diurética intrínseca que presentan los agonistas kappa (Blackburn y col., 1986). Además la elevada densidad de receptores mu y kappa por un lado y delta por otro se corresponde con el papel excitatorio de los mismos sobre la liberación de ACTH y prolactina respectivamente.

El sistema opioide intrínseco al tracto intestinal modula su motilidad, siendo su efecto más destacado el descenso en el peristaltismo lo cual justifica la actividad constipante y antidiarreica de los opiáceos. También intervienen en el control de la ingesta y en el balance hidrosalino (Holaday, 1985) sin que hasta el momento en todos estos procesos se determine la participación selectiva de un subtipo de receptor.

Estudios recientes han detectado la existencia de receptores opioides periféricos asociados a procesos inflamatorios, posiblemente localizados en terminales cutáneos sensoriales, que al ser activados por agonistas mu modularían las sensaciones nociceptivas. (Stein y col., 1988; Levine y Taiwo, 1989).

4.2.e. Mecanismo de acción de los Péptidos Opioides

La unión de los péptidos opioides a su receptor, el cual se localiza en la membrana postsináptica ha de traducirse en una señal intracelular, señal que puede venir mediada por distintos sistemas de segundos mensajeros.

En la actualidad los estudios se centran en el análisis de los cambios postreceptor que conducen la información a través de la membrana hacia el efector primario.

Existen evidencias que apuntan hacia una asociación de los receptores opioides con la enzima adenilato ciclasa o con canales iónicos; es más, en algunos estudios se sugiere que la acción de los opioides sobre los canales iónicos vendría mediada por dicho enzima. (Loh y Smith, 1990).

Estudios electrofisiológicos han demostrado que los opioides reducen el ritmo de descarga de las neuronas y como consecuencia la cantidad de neurotransmisor liberado. Existen varias formas en que se pueden alterar las propiedades eléctricas de las membranas, así los opioides al actuar sobre los receptores mu y delta aumentan la conductancia del potasio hiperpolarizando dicha membrana, dificultando la producción y/o propagación del potencial de acción el cual en último término es el encargado de liberar al neurotransmisor presináptico (North, 1986). El receptor kappa, por su parte, al activarse va a reducir la entrada de calcio al interior celular dificultando la liberación del neurotransmisor (Werz y McDonald, 1985).

Independientemente de que el efector primario sea una enzima o un canal iónico entre el lugar de reconocimiento y el efector se intercala una proteína transdutora o reguladora que se une a nucleótidos de guanina, proteína G.

En general los receptores unidos a proteínas G responden a diversas hormonas, neurotransmisores y autacoides, regulando los niveles de AMP_c, GMP_c, canales iónicos y recambio de fosfolípidos.

Se sabe que el sistema adenilato ciclasa, encargado de regular la producción de AMP_c, incluye receptores activadores o inhibidores acoplados a proteínas G_s o G_i respectivamente. Algunos estudios sugieren que los receptores opioides producirían un bloqueo en la activación de la adenilato ciclasa. Tanto los agonistas opioides tipo mu (Frey y Kebejian, 1984), como los de tipo delta (Schoffelmeer y cols, 1987; DeMontis y cols, 1987) y los de tipo kappa (Bhoola y Pay, 1986) provocan dicha inhibición de la adenilato ciclasa con la consiguiente reducción de los niveles intracelulares de AMP_c.

La adenilato ciclasa juega también un papel importante en el control de la síntesis de neuropéptidos debido a que diversos genes que codifican para neuropéptidos incluyen en sus promotores elementos capaces de ser activados por proteinquinasa dependientes de AMP_c, por lo que una administración de agonistas opioides produce un descenso en los niveles de AMP_c, reduciéndose los niveles de ARN_m para proencefalina, reducción que es revertida por naltrexona (antagonista opiáceo). (Childers, 1991)

Asimismo la activación de la fosfolipasa c depende de receptores acoplados a proteínas G, dando lugar a la producción de diacilglicerol e inositol trifosfato que activan, respectivamente, la proteína quinasa_c o la salida de calcio desde depósitos intracelulares al citosol. Igualmente, determinados receptores, como es el caso de los receptores opioides, pueden regular la actividad de canales de iones tales como Ca²⁺ o K⁺.

En el caso de los receptores opioides, el receptor mu puede utilizar los tipos G_i y G_o (proteína G) para hacer llegar su información a diferentes efectores, adenilato ciclasa (Ueda y cols, 1988) y canales iónicos (Hescheler y cols, 1987).

Se ha sugerido que al menos una proporción de los receptores opioides se encontrarían preacoplados a la proteína G. Esta forma se asocia a los estados de alta afinidad de los receptores para agonistas que sin embargo no son detectados por los antagonistas. (Costa y cols, 1988).

Para demostrar lo expuesto anteriormente diversos estudios han puesto de manifiesto que la administración in vivo de la toxina pertúxica, la cual se encarga de catalizar la ribosilación dependiente de ADP a partir de NAD de la subunidad α de los tipos G_i/G_o, reduce la analgesia espinal mediada por receptores opioides en la rata (Przewlocki y cols, 1989) y la actividad antinociceptiva supraespinal de ciertos opioides en el ratón. (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989)

Otros agentes capaces de modificar el estado funcional de las proteínas G, como la N-etilmaleimida (NEM) inducen también un descenso diferencial de la actividad antinociceptiva supraespinal de los opioides. (Sánchez-Blázquez y cols, 1989)

Si consideramos que la analgesia supraespinal opioide es mediada predominantemente por el receptor μ , y que los agentes modificadores de las proteínas G_i/G_o , toxina pertúxica y NEM, sólo reducen la analgesia inducida por ciertos opioides se plantea la interesante posibilidad de que el estado funcional de las proteínas transductoras sea responsable de la eficacia de los opioides analgésicos y por lo tanto dependiendo de las modificaciones sufridas y del tipo de interacción del ligando con el complejo receptor-proteína G su eficacia en iniciar los eventos postreceptor se verá modificada en diferente grado. Estos hallazgos indican la importancia del estado funcional de las proteínas transductoras en la eficacia de los agonistas.

Como ejemplo de esto tenemos el fenómeno de tolerancia el cual parece ser debido en principio a un desacoplamiento funcional entre el receptor y el sistema transductor (proteínas G), seguido de un descenso en el número de receptores. (Cox y Werling, 1991)

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el desacoplamiento inicial entre el receptor opioide y las proteína G , así podría deberse a una fosforilación del receptor debida a un aumento de la actividad de kinasas dependientes de AMP_c, producido tras la administración crónica de opioides, esta fosforilación afectará a la activación de la proteína G tras la interacción opioide-receptor (Harada y cols, 1989), o bien a un descenso en el número de subunidades α_c de las proteínas G provocada por agonistas opioides (Schulz, 1991)

4.2.f. Peptidos Opioides y Sistema Nervioso Autónomo: Acciones sobre el Sistema Cardiovascular

Desde mediados del siglo XIX y comienzos del XX se tenía conocimiento de que la morfina y sus derivados además de efectos analgésicos ejercían una potente actividad cardiorespiratoria. (Bernard, 1964)

La actividad que producen los opioides no es uniforme, así se pueden obtener efectos estimuladores o depresores en un mismo animal de experimentación dependiendo de la ruta de administración o de la utilización o no de anestésico. (Kayaalp y cols 1966). Este hecho sugiere que las acciones no se ejercen sobre un único sistema o bien que los efectos observados no son provocados directamente sino a través de diversas sustancias mediadoras como por ejemplo, la serotonina, histamina, la acetilcolina y la noradrenalina, entre otros.

Se sabe que el mantenimiento funcional de las constantes cardiopulmonares depende de la integridad de muchos núcleos que se encuentran localizados en el tronco del encéfalo en donde existen importantes zonas para la regulación de la tensión arterial. (Dampney, 1981)

La administración intravenosa de morfina en ratas provoca en las mismas una disminución de la frecuencia cardiaca y de la tensión arterial, efectos que parecen ser mediados por quimiorreceptores presentes en el árbol cardiopulmonar, provocando, la

estimulación de estos puntos una triple respuesta, bradicardia, hipotensión y apnea transitoria. El desarrollo de tolerancia produce una disminución en la depresión cardíaca. (Fennessy y cols, 1971)

Diversos estudios realizados en ratas demuestran que la morfina provoca un quimiorreflejo vagal, lo que apoya la teoría de que la morfina periférica ejerce un efecto hipotensor. Además la realización de una adrenalectomía o hipofisectomía produce aumento de la sensibilidad a las acciones de la morfina. (Kiang y cols, 1984)

Todo lo expuesto con anterioridad parece evidenciar que los agonistas mu pueden actuar a nivel central estimulando el sistema nervioso simpático y/o inhibiendo el parasimpático.

Esta acción central podría encargarse de modular el reflejo barorreceptor, sobre todo a niveles bajos de activación nerviosa, ya que cuando la frecuencia de impulsos procedentes de los senos aórtico y carotideo es más intensa, el sistema de receptores mu no es capaz de inhibirlo, y en ese momento el reflejo barorreceptor comenzaría a actuar.

Los agentes que actúan selectivamente sobre el receptor opioide delta también son capaces de producir cambios en el sistema cardiovascular. Así se ha observado que tras la administración por vía intravenosa de Met-enkefalina y Leu-enkefalina se producen respuestas presoras y estimuladoras de la frecuencia cardíaca tanto en ratas normales como en hipertensas. En general se ha observado que los agonistas delta modulan los quimiorreceptores del cuerpo carotideo. (Ganten y cols, 1981; Schaz y cols, 1980)

Así pues se ha demostrado que tanto los receptores mu como los delta participan en procesos cardiorrespiratorios, siendo su acción no idéntica aunque sí complementaria.

En cuanto a la relación de los receptores kappa con la actividad cardiovascular, se debe mencionar que en el núcleo preóptico medial, área hipotalámica con demostradas acciones cardiorrespiratorias, se han encontrado a altas concentraciones diferentes compuestos endógenos con actividad agonista sobre receptores kappa. (Feuerstein y cols, 1983)

4.2.g. Activación del sistema opioide durante el estrés.

Muchos autores han confirmado el efecto estimulante de múltiples agentes estresantes sobre la secreción de péptidos opioides en diversas especies.

Ya en 1977, Guillemin y cols describieron como el estrés producido por una fractura tibial provocaba un incremento concomitante de los niveles plasmáticos de ACTH y β -endorfina en la rata. Se ha podido constatar también una clara asociación entre el estrés y la liberación de péptidos opioides durante la activación del eje simpático-adrenal en estas situaciones, en las cuales se observa una liberación paralela de péptidos tipo encefalinas y adrenalina desde la médula adrenal (Viveros y cols 1979; Livett y cols 1981) y de encefalinas y noradrenalina en las terminales simpáticas. (Wilson y cols 1980)

Son bastante bien conocidos los efectos del estrés sobre la secreción de opioides desde que en 1976 Akil y cols describieron por primera vez el fenómeno de analgesia inducida por estrés.

Los efectos sobre los receptores opioides también han sido estudiados. En general tras un estrés crónico, tanto físico (estrés por frío, Hnatowich y cols 1986) o psicológico (estrés por aislamiento, Petkov y cols 1985) se ha observado una disminución de receptores opioides en el cerebro de la rata.

Recientes resultados muestran una disminución de los receptores μ en ratas sometidas a shock inescapable (Stuckey y cols 1979), dicha disminución podría ser debida a la presencia de ligandos endógenos que en estas situaciones compiten por los sitios de unión, o bien, a una inducción de subsensibilidad de los receptores por una exposición persistente de los mismos a niveles elevados de opioides endógenos. (Adams y cols 1987)

Por el contrario, el estrés agudo por inmovilización aumenta el número de receptores μ y δ y una inmovilización repetida (estrés crónico) aumenta el número de receptores δ y la concentración de dopamina sugiriendo este hecho una posible relación entre el sistema opioide y el dopaminérgico. (Zeman y cols 1988). En estudios realizados utilizando shock hipovolémico aparecen alteraciones en los receptores κ (Ramabadram y Bansinath, 1988)

En condiciones normales, la administración de antagonistas opioides en animales carece de efectos ya que la mayoría de las células que contienen opioides endógenos no son activas tónicamente, sin embargo, cuando la homeostasis del organismo se ve alterada, por ejemplo, mediante la aplicación de un estímulo estresante se produce una activación del sistema opioide que dará lugar a efectos muy diversos entre los que podemos destacar modificaciones en las funciones neuroendocrinas, en la actividad cerebral, en la sensación dolorosa, en la temperatura corporal, en el sistema cardiovascular, así como en determinadas reacciones autónomas y comportamentales. (Holaday, 1985)

Durante el estrés agudo se han descrito modificaciones en los niveles de los péptidos derivados de la POMC, se ha demostrado que los niveles de β -endorfina plasmática están elevados en animales sometidos a estrés agudo como el shock inescapable (Rossier y cols 1980; Hulse y Coleman 1984), inmovilización (Kant y cols 1986) y aislamiento (Kalin y cols 1985). Estudios realizados en humanos muestran así mismo dicho incremento en situaciones como el parto (Furuhashi y cols 1984), en el transcurso de ejercicio físico intenso (Fraoli y cols 1982; Metzger y Stein 1984) y de la hipoglucemia insulínica (Wiedemann y cols 1979; Nakao y cols 1979)

Parece ser que la β -endorfina segregada al torrente circulatorio durante el estrés procede de la hipófisis, ya que una hipofisectomía bloquea, en determinados casos, dicha respuesta (Guillemin y cols 1977). Además se ha observado una reducción del contenido hipotalámico de β -endorfina tras la aplicación de estrés por frío (Vaswani y cols 1988), por shock en las patas (Hulse y Coleman 1984) o tras el estrés por natación en la rata (Lim y Funder 1983).

En el estrés crónico, como el producido tras la aplicación crónica intermitente de shock eléctricos en las patas del animal, también se ha observado una elevación en

los niveles de β -endorfina plasmática (Akil y cols 1984), aunque en otros modelos de estrés crónico como el ayuno, otros autores no han encontrado variaciones en dichos niveles (Vaswani y Tejwani 1986)

En el Sistema Nervioso Central se ha descrito que el estrés crónico produce una elevación en el contenido hipofisario del ARN_m para POMC. (Shiomi y cols 1986)

En el caso de ratas sometidas a privación social aparece una elevación de los niveles de ARN_m de preproencefalina en hipotálamo.

En otros dos modelos de estrés en la rata como el síndrome de abstinencia a morfina e inyección hipertónica salina se describe dicha elevación en las concentraciones del ARN_m de preproencefalina, precursor de met-enkefalina y leu-enkefalina, en el núcleo paraventricular del hipotálamo, núcleo cerebral de probada implicación en la regulación del sistema cardiovascular. (Lightman y cols 1987)

En diversos estudios realizados sobre otras áreas cerebrales se han obtenido diversos resultados mostrando en algunos casos discrepancias.

Así Chance y cols (1977) vieron que tras la aplicación crónica de shock eléctricos se producía analgesia asociada a un aumento en SNC de algún opioide endógeno. Por el contrario otros autores han observado un desarrollo de tolerancia al efecto analgésico del estrés crónico aplicado durante un período más prolongado (Akil y cols 1984). También tras la aplicación prolongada de shock eléctrico en las patas de la rata se detecta una disminución en las concentraciones de leu-enkefalina en hipotálamo. (Rossier y cols, 1978)

En resumen, las discrepancias que se observan al estudiar los resultados obtenidos al respecto por diversos autores se deben probablemente al hecho de que no se puede considerar al estrés como un fenómeno concreto causante de una reacción única en el organismo, sino que da lugar a muchas respuestas las cuales vienen condicionadas por la duración, intensidad y tipo de estrés, ya sea físico o psicológico. (Terman y cols 1984)

4.3. ACTIVACION DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-ADRENAL.

El eje Hipotalamo-hipofiso-adrenal (HHA) es posiblemente el sistema más importante de respuesta al estrés. En todas las formas de estrés se produce la activación del eje HHA conjuntamente con la activación del sistema simpático. (Selye, 1976)

Esta activación sólo está ausente en las formas de estrés agudo y de carácter muy puntual; es por ello que la activación del eje HHA se incluye en la fase de resistencia típica del estrés crónico. Paralelamente tenemos que tener en cuenta las dificultades que surgen al intentar delimitar estrictamente las situaciones agudas de las crónicas, pudiendo presentarse mecanismos intermedios entre los efectos simpáticos y los adrenomedulares.

La activación del eje HHA durante el estrés lleva asociada una elevación de la hormona adrenocorticotropa o corticotropina desde la adenohipófisis, elevación de la que es responsable el factor liberador de corticotropina (CRF), producido en los somas

de las neuronas parvocelulares localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo, el cual es el origen, a nivel central, de la activación del eje HHA. (Vale y cols 1981)

El CRF es transportado por medio de la circulación hipofisaria-portal a la hipófisis anterior en donde estimula la liberación de ACTH. Posteriormente la ACTH circulante es transportada hasta la corteza adrenal, en donde induce la síntesis y liberación de glucocorticoides en las células corticoadrenales, sistema que se autocontrola gracias a un mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por los propios niveles de glucocorticoides. (Keller-Wood y Dallman 1984)

Sin embargo, durante periodos de estrés prolongado, a pesar de unos niveles circulantes altos de glucocorticoides, no se produce la retroalimentación negativa, secretándose CRH y ACTH adicionales. (Keller-Wood y cols 1984)

Paralelamente a la liberación de ACTH desde el lóbulo anterior de la hipófisis es importante señalar que se produce la liberación concomitante de β -endorfina, péptido opioide procedente del mismo precursor polipeptídico (Proopiomelanocortina) que la ACTH (Eipper y Mains 1980)

En general, como respuesta a la activación del eje HHA en el desarrollo de la respuesta fisiológica al estrés se provocan una serie de efectos derivados fundamentalmente del aumento de los glucocorticoides circulantes, entre los que podemos destacar una reducción de la capacidad de adaptación o cambios de la respuesta inmunológica, de la actividad del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal, de la producción hipofisaria de GH y TSH y por lo tanto de sus efectos sobre el crecimiento y el metabolismo, alteraciones en la ingesta y en el peso y una disminución de HDL-colesterol. (Udelsman y Holbrook 1994)

4.3.a. Hormona liberadora de Corticotropina.

En 1948 Harris sugirió la presencia de un factor hipotalámico capaz de estimular la liberación de la ACTH desde la hipófisis. En 1955 Saffron y cols demostraron la evidencia de actividad de dicho factor de liberación de corticotropina (CRF), siendo aislado en 1981 por Vale y cols.

Con el tiempo la nomenclatura referente a este péptido se cambió de factor liberador de corticotropina (CRF) a hormona liberadora de corticotropina (CRH). El papel central de este péptido de 41 aminoácidos es la regulación de la secreción de ACTH. Además la CRH juega un papel fundamental en la integración de las respuestas relacionadas con el estrés a través del eje neuro-inmuno-endocrino. La CRH actúa dentro del SNC para integrar las respuestas autónomas, comportamentales, endocrinas y respuestas inmunes al estrés. Más aun, evidencias recientes sugieren que la CRH puede llevar a cabo acciones directas en los inmunocitos para modular la función inmune en la periferia.

Las acciones de la CRH en el SNC, hipófisis y en el bazo están mediadas específicamente por receptores de membrana de alta afinidad con propiedades cinéticas y farmacológicas similares. (De Souza y cols 1991)

Cuando se administra intracerebroventricularmente a animales de laboratorio se observan una serie de respuestas que incluyen acciones hemodinámicas acompañadas de un incremento de noradrenalina, adrenalina, glucagón y glucosa.

Diversos estudios han demostrado que la inmunorreactividad y los receptores de la CRH están concentrados en el sistema límbico, en áreas del cerebro superior, estas áreas incluyen el locus ceruleus y el sistema nervioso simpático central.

Sin embargo, las neuronas responsables de la síntesis y secreción de la CRH se localizan fundamentalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

En diferentes estudios se observa que tanto las neuronas productoras de la CRH, como el ligando y los receptores se localizan en áreas apropiadas del SNC, en las que se sabe que se produce una respuesta ante el estrés.

Mediante estudios por autorradiografía, los receptores de la CRH se localizaban en alta densidad en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, regiones cerebrales implicadas en funciones cognoscitivas, en áreas límbicas implicadas en las emociones y en áreas cerebrales implicadas en la regulación de respuestas autónomas y relacionadas con el estrés.

Todos estos datos proporcionan evidencias adicionales sobre el papel psicológico de la CRH en el eje cerebro-endocrino-inmune y un mayor apoyo sobre la importancia de este neuropéptido en la coordinación de la respuesta al estrés. (De Souza y cols, 1991)

Además, se ha demostrado la existencia de receptores periféricos de la CRH en el sistema nervioso autónomo periférico de los primates localizados en la médula adrenal y ganglios simpáticos. Estos receptores presentan un rango de especificidad, afinidad y características funcionales similares a los receptores de la CRH descritos en la hipófisis y el SNC. (Udelsman y cols, 1986)

La CRH es secretada desde el núcleo paraventricular al sistema portal hipotalámico-hipofisario, siendo transportada a la hipófisis anterior donde promueve la síntesis y liberación de ACTH.

Dicha acción es mediada por la unión de la CRH a receptores celulares corticotróficos de alta afinidad, lo que da como resultado la activación de la adenilato ciclasa y un incremento en los niveles intracelulares del segundo mensajero, AMPc. (Brown y cols, 1988)

La CRH no es el único secretagogo para la ACTH. Otras hormonas del estrés, incluidas la vasopresina, angiotensina II y catecolaminas actúan sinérgicamente estimulando la síntesis y liberación de ACTH por las células de la hipófisis. (Antoni, 1986)

La administración intracerebroventricular de la CRH en animales da como resultado, un aumento de catecolaminas en el plasma y cambios hemodinámicos de acuerdo con un incremento de la actividad simpática, que se manifiesta como una elevación en la presión media arterial y ritmo cardíaco. (Brown y cols, 1988)

4.3.b. Hormona adrenocorticotropa.

Las células corticotróficas de la hipófisis anterior son estimuladas por la CRH a sintetizar un precursor de la ACTH de 240 aminoácidos, la denominada proopiomelanocortina. (Krishnan y cols, 1991)

Esta molécula contiene también las secuencias para las hormonas peptídicas melanocortina y lipotropina. Después de trasladarse, el precursor proteínico proopiomelanocortina se sitúa intracelularmente para poder dar lugar a los productos de secreción, la melanocortina, la ACTH, la lipotropina y el péptido endógeno β -endorfina. (Lowry, 1985)

En ausencia de estrés la ACTH se secreta episódicamente a la circulación periférica en unos ritmos circadianos caracterizados por una elevación a primeras horas de la mañana de ACTH y glucocorticoides. Los glucocorticoides ejercen un efecto de retroalimentación en el hipotálamo y la hipófisis, inhibiendo la CRH adicional y la secreción de ACTH. Este ritmo circadiano está modificado en especies animales con hábitos nocturnos y en sujetos humanos cuando estos están aclimatados a nuevos ciclos de luz/oscuridad.

El estrés puede anular estos patrones circadianos, dando como resultado la clásica respuesta endocrina al estrés.

La ACTH se une específicamente a receptores de membrana de alta afinidad en la zona fasciculada de la corteza adrenal. La unión a dichos receptores da lugar a la activación de la adenilato ciclasa y a un incremento de los niveles de AMP_c. El AMP_c actúa como un segundo mensajero activando a proteínas quinasas dependientes de AMP_c, las cuales incluyen proteínas reguladoras fosforiladas. El resultado neto es la estimulación del paso limitante en la esteroidogénesis, la conversión de colesterol a pregnenolona. (Gill, 1979)

En adición a este efecto agudo en la esteroidogénesis adrenal, la ACTH también ejerce efectos tróficos en la glándula adrenal que son importantes en el caso del estrés repetitivo o crónico.

En este caso la estimulación de la ACTH da lugar a una hipertrofia cortical adrenal que se produce como una respuesta fisiológica a un estrés no remitente o como una respuesta patológica a un exceso de ACTH exógeno o endógeno produciendo un síndrome de Cushing.

La ACTH es el principal, pero no el único, regulador de la secreción de glucocorticoides. Hay otros factores, incluyendo la angiotensina y vasopresina que también influyen en la secreción de glucocorticoides adrenales. (Lilly y cols, 1989)

Además parece que existe una inervación simpática directa para la corteza adrenal, que presumiblemente da como resultado una secreción de glucocorticoides. (Krishnan y cols, 1991)

La ACTH, por sí misma, también puede interactuar con el sistema nervioso autónomo porque parece ser capaz de potenciar los efectos contráctiles de las catecolaminas en el músculo atrial. (Zeiler y cols, 1982)

4.3.c. Glucocorticoides.

Los glucocorticoides se definen como una clase de moléculas esteroídicas que se unen a receptores glucocorticoideos.

El cortisol es el principal glucocorticoide en los humanos, sin embargo se han desarrollado varios glucocorticoides sintéticos los cuales poseen una mayor afinidad por los receptores así como una vida media más prolongada. Estos glucocorticoides sintéticos incluyen a la dexametasona y prednisona, los cuales se utilizan ampliamente en clínica.

Además de los glucocorticoides, en la corteza adrenal se sintetizan los mineralocorticoides y los esteroides sexuales. De estas tres clases de esteroides únicamente los glucocorticoides son esenciales para la vida.

Los glucocorticoides son secretados directamente a la circulación inmediatamente después de su síntesis. (Gill, 1987)

El cortisol, el principal glucocorticoide humano, circula por la sangre tanto en su forma ligada (95%) ya sea a globulinas de unión a glucocorticoides o albúmina, como en su forma libre (5%). Las hormonas libres y ligadas están en equilibrio.

Las hormonas libres parece que se introducen en las células diana por simple difusión y se unen a receptores glucocorticoideos citosólicos específicos.

Todos los efectos fisiológicos de los glucocorticoides están mediados a través de la unión a receptores esteroideos.

Los glucocorticoides ejercen sus efectos uniéndose directamente al DNA para regular la transcripción génica. Estos receptores están presentes virtualmente en todas las células nucleadas del cuerpo. (Baxter y cols, 1987). La afinidad que demuestra el glucocorticoide por su receptor es el principal determinante de su acción biológica. La unión del ligando al receptor tiene lugar en el compartimento citoplasmático celular y tiene como resultado la activación del complejo receptor-glucocorticoide a una forma de asociación al DNA la cual es trasladada al núcleo.

Los efectos de los glucocorticoides se dividen frecuentemente en las dos grandes categorías siguientes:

1. Efectos “permissivos”; que permite a otras hormonas funcionar en el estado basal
2. Efectos “reguladores” que se ejercen sólo cuando están presentes los niveles de glucocorticoides inductivos de estrés

Los efectos reguladores pueden ser tanto estimuladores como supresores. (Munck y cols, 1992)

4.4. RESPUESTA DE FASE AGUDA

La respuesta de fase aguda está íntimamente ligada a la respuesta endocrina al estrés. Tanto la IL-1 como la IL-6 son capaces de activar el eje

hipotálamo-hipófiso-adrenal a nivel del hipotálamo en donde se incrementa la liberación de CRH. (Sapolsky y cols, 1987)

En casos de estrés suave, sólo se incrementan los niveles de IL-6 en la circulación periférica. (Pullicino y cols, 1990)

También se ha sugerido que la IL-1 y la IL-6 incrementan la secreción de ACTH desde la hipófisis y aumenta la síntesis y liberación de glucocorticoides desde la glándula adrenal. (Tominaga y cols, 1991)

Los glucocorticoides, por su parte, influyen en la respuesta de fase aguda en dirección opuesta. Estos participan positivamente en combinación con las citoquinas para regular la transcripción de muchos de los reactivos de fase aguda. Sin embargo, los glucocorticoides también suprimen la expresión de los genes de las citoquinas y por tanto inhiben la producción de las mismas.

Esta actividad dual, está en realidad de acuerdo con el papel de los glucocorticoides propuesto por Munck y cols y Munck y Naray-Fejes-Toth, así pues, en principio los glucocorticoides contribuyen a iniciar las respuestas en el hospedador, pero después, como los niveles de glucocorticoides permanecen elevados, sirven para atenuar las reacciones homeostáticas. (Udelsman, 1994)

La respuesta de fase aguda es una respuesta sistémica para localizar el daño tisular normalmente caracterizada por alteraciones en el nivel de varias proteínas séricas usualmente conocidas como reactivos de fase aguda.

Estas proteínas se sintetizan en primer lugar en el hígado y se dividen en dos grupos:

1. Reactivos positivos, como la α_1 -antiquimotripsina, complemento C₃, ceruloplasmina, fibrinógeno y haptoglobina, cuyos niveles séricos se incrementan durante la respuesta de fase aguda.
2. Reactivos negativos, como la albúmina sérica y la transferrina, cuyos niveles descienden.

(Heinrich y cols, 1990)

La respuesta se inicia como una reacción inflamatoria local caracterizada por vasodilatación, filtración de los vasos sanguíneos, formación de coágulos y liberación de una serie de componentes celulares que incluyen enzimas lisosomales, aminas vasoactivas y prostaglandinas. Los granulocitos y las células mononucleares son reclutadas hacia dicha localización; y estas células, así como los fibroblastos locales y células endoteliales son estimuladas para liberar citoquinas a la circulación periférica. (Udelsman, 1994)

Las principales citoquinas responsables de mediar los efectos sistémicos de la respuesta de fase aguda incluyen la IL-1 y la IL-6 y factor α de necrosis tumoral, jugando la IL-6 un papel predominante. (Le y cols, 1989)

Las citoquinas ejercen sus efectos principalmente alterando la expresión génica. Las citoquinas pueden actuar separadamente o interactuar a múltiples niveles. En numerosos trabajos se ha estudiado la habilidad de estas citoquinas sólo o en combinación para inducir la síntesis de reactivos de fase aguda tanto in vivo como in vitro.

II. HIPERTENSION ARTERIAL

La hipertensión arterial (HTA) se define como la elevación, crónica, de las cifras de presión arterial sistólica, diastólica o de ambas.

La hipertensión arterial constituye el principal factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. Diversos estudios han puesto de manifiesto que cuanto más alta se mantiene la presión sistólica o diastólica, mayores son la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Así pues, la cifra de tensión arterial incide de modo determinante en el riesgo de enfermedad cardiovascular independientemente de la edad.

En 1978, un comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud estableció los valores que deberían considerarse normales y altos, aunque como considera el propio comité, estos valores apesar de ser admitidos universalmente son arbitrarios.

Así pues según el citado comité:

La presión arterial normal se define arbitrariamente como una presión sistólica igual o inferior a 140 mmHg, junto con una presión diastólica (5ª fase de Korotkoff) igual o inferior a 90 mmHg.

La hipertensión se define como una presión sistólica igual o superior a 160 mmHg y además, o independientemente una presión diastólica (5ª fase) igual o superior a 95 mmHg

Entre ambos niveles queda una banda denominada "hipertensión límite" con valores que oscilan entre los considerados normales y como hipertensivos según la descripción anterior.

En el caso de los niños, las cifras que pueden considerarse como hipertensión arterial varían según la edad, siendo más bajas que en los adultos.

1. CLASIFICACION ETIOLOGICA DE LA HIPERTENSION

1. **Hipertensión primaria o esencial:** Elevación mantenida de la tensión arterial de causa desconocida. En un gran porcentaje de los pacientes con hipertensión no es posible encontrar su causa específica.
2. **Hipertensión secundaria:** Elevación mantenida de la tensión arterial provocada por alguna enfermedad.

Accesoriamente existen y se utilizan términos como:

- **Hipertensión fija o estable:** cuando de forma constante se presentan cifras tensionales elevadas.
- **Hipertensión maligna o acelerada:** cuando existe una afectación grave de los órganos diana (cerebro, corazón y riñón). Es la más grave de las complicaciones de la HTA, teniendo consecuencias fatales en pocos meses de no ser tratada.

Diversos estudios han aportado pruebas suficientes en favor de la existencia de determinados factores que se asocian íntimamente a la aparición de la HTA en un individuo, denominados factores de riesgo, entre los que se encuentran la edad,

el sexo, la raza, la herencia, la obesidad, la dieta y sus componentes, los factores psicosociales (estrés) y socioculturales y determinados hábitos.

2. HIPERTENSION ESENCIAL. ETIOPATOGENESIS.

Blaustein desarrolló una trascendental hipótesis sobre la etiopatogenia de la hipertensión esencial sobre la que se basan las más avanzadas investigaciones actuales.

El mecanismo responsable del desarrollo de la hipertensión esencial no ha sido aún completamente dilucidado; sin embargo, existen distintas hipótesis al respecto.

La etiología de la hipertensión esencial continúa sin ser esclarecida debido a la complejidad de los mecanismos que regulan la presión arterial.

El mantenimiento de la presión arterial depende de una gran variedad de complejos mecanismos interrelacionados e interdependientes, los cuales permanecen en equilibrio en el estado fisiológico normal. (Page, 1949). Debido a la complejidad de los circuitos que participan en la regulación de la presión arterial cabe la posibilidad de que no sea un único factor el involucrado en el origen del aumento anormal de la presión arterial, sino resultado de la participación de múltiples mecanismos.

Hay que contar además con la posibilidad de que los sistemas activados en la fase inicial de la hipertensión sean diferentes de aquellos que actúan en una fase posterior, cuando la presión arterial elevada está definitivamente establecida. Hay una hipótesis que postula que la inducción de la hipertensión se debería a un componente central o neurogénico, mientras que del mantenimiento de la misma se ocuparían factores periféricos que operarían a nivel vascular. (Connell, 1986)

A nivel hemodinámico, la hipertensión arterial será el resultado de una anomalía en el gasto cardíaco y/o la resistencia periférica total, variables que determinan la presión arterial.

En determinados casos, al inicio del estado hipertensivo se observa en los pacientes un gasto cardíaco muy elevado mientras que la resistencia vascular no aparece alterada (Julius y cols, 1971), mientras que cuando la hipertensión está establecida se normaliza el gasto cardíaco, incrementándose la resistencia periférica total (Weiss y cols, 1978). Esta evolución es similar a la observada en ratas espontáneamente hipertensas (Pfeffer y cols, 1974) así como en otros animales de laboratorio en los que se han desarrollado modelos de hipertensión renal. (Bianchi y cols 1970)

Aunque también hay que señalar que no todos los individuos que desarrollan hipertensión esencial siguen la evolución hemodinámica descrita anteriormente (Hoffman y cols, 1981) existiendo casos, tanto en humanos como en animales de experimentación, en donde a pesar de no haber alteraciones en el gasto

cardíaco la elevación de la presión arterial se desarrolla a la misma velocidad y con la misma severidad. (Pfeffer y cols, 1977)

Existen pruebas de que los cationes sodio y calcio desempeñan un importante papel en la regulación y el mantenimiento de la presión arterial (Puschett, 1985)

La hipótesis que desarrolló Blaustein en 1977 sobre la etiopatogenia de la hipertensión esencial sugiere que alteraciones en el músculo liso arteriolar pueden causar cambios en la reactividad vascular e hipertensión. Un aumento en la concentración de calcio intracelular determina un incremento de la tensión del músculo liso vascular.

El aumento del Ca^{2+} intracelular se produciría por la activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y ello induciría, como se ha señalado, a un aumento de la contractilidad del músculo liso vascular, además de la constricción arteriolar, de la resistencia periférica y de la presión arterial.

Por otro lado De Wardener y cols (1985) propusieron que la hipertensión arterial esencial en el hombre puede deberse a un defecto hereditario en la capacidad del riñón para excretar sodio. Ello provoca un aumento del volumen sanguíneo, del gasto cardíaco, y en consecuencia de la presión arterial. Pero al mismo tiempo que se altera el volumen sanguíneo se modifica la perfusión tisular y como los tejidos tienen la capacidad de regular el flujo variando la resistencia arteriolar, esta autorregulación conduciría a un incremento de la resistencia periférica total dando lugar a un mayor aumento de la presión sanguínea.

En resumen, actualmente hay pruebas de que en la etiopatogenia de la hipertensión esencial están implicados diversos factores genéticos y ambientales.

En primer lugar una alteración intrínseca de la membrana que provoque cambios en los sistemas de transporte de sodio.

Estos factores promoverían un incremento en la reabsorción renal de sodio capaz de provocar una expansión del volumen extracelular con la consecuente liberación de una o varias sustancias natriuréticas con capacidad de inhibir la bomba de sodio.

Finalmente el desencadenante ambiental vendría representado por un excesivo consumo de sal en la dieta. Todos estos factores se complementarían para provocar un aumento en el contenido intracelular de sodio y secundariamente de calcio libre citosólico, responsable final del aumento del tono vascular y de las resistencias periféricas.

3. ESTRES E HIPERTENSION.

Hans Selye introdujo la noción del estrés como un síndrome definido constituyendo una reacción de alarma producida en respuesta a una variedad de agentes estresantes.

Los cambios en el equilibrio del sistema nervioso autónomo, particularmente la activación del Sistema Nervioso Simpático, parecen mediar los efectos del estrés en la función cardíaca. (Pasternac y cols, 1991)

En la actualidad, el fondo humoral de esta respuesta al estrés está caracterizada por un conjunto de reacciones simpatoadrenomedulares incluyendo opioides, hormonas esteroideas y catecolaminas, las cuales tienen un significativo efecto sobre la actividad del sistema cardiovascular. (Rhee y cols, 1989)

Los hipertensos reaccionan al estrés con una mayor elevación de la presión sanguínea y del ritmo cardíaco que los normotensos. (Shapiro, 1961)

Los agentes estresantes productores de una respuesta incrementada de la presión sanguínea incluyen factores psicoemocionales, inmovilización, dolor, exposición al frío o al calor. (Ohlsson y cols, 1982; Julius y cols, 1985)

Se ha demostrado que incluso un estímulo moderado como la infusión de agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol) induce a una exagerada excreción de catecolaminas y AMP_e, particularmente en los modelos de roedores con hipertensión genética como la rata espontáneamente hipertensa (SHR). (Hamet y cols, 1991)

Los pacientes con hipertensión esencial y las SHR comparten una hiperrespuesta simpatoadrenal-cardiovascular común a los estímulos estresantes, (Goldstein, 1983; Philipp y cols, 1978), incluyendo luz, ruido (Hallback y cols, 1974), vibraciones, restricción, calor y consumo de etanol.

Por otro lado, la adaptación al estrés (a la inmovilización, por ejemplo) puede disminuir la presión sanguínea en los animales hipertensos. (Kvetňansky, 1979)

Los agentes estresantes ambientales como la temperatura modifican la expresión de la hipertensión. Así pues en numerosos estudios se ha observado que las presiones sanguíneas en hipertensos humanos estaban correlacionadas significativamente con la temperatura ambiental. Una pequeña elevación crónica de la temperatura ambiental desciende la presión sanguínea. Diversos estudios parecen sugerir que hay una anomalía de base genética en la sensibilidad al estrés ambiental en los modelos animales genéticos de hipertensión. (Hamet y cols, 1991)

Las variaciones estacionales sobre la presión sanguínea están bien documentadas por varios estudios en sujetos humanos y en ratas genéticamente hipertensas. (Brennan y cols, 1982)

También hay una correlación con la temperatura medioambiental que es altamente significativa tanto para la presión sanguínea sistólica como diastólica.

Los animales hipertensos son termosensibles. (Malo y cols, 1989)

Desde hace tiempo se conoce que el estrés mental, la ansiedad, así como diferentes estados emocionales pueden ser factores desencadenantes de una elevación marcada de la PA. (Folkow, 1987)

Diversos autores consideran que la hiperactividad simpática, en la regulación del sistema cardiovascular, podría ser responsable de los periodos de

PA elevada en los pacientes con hipertensión labil. Parece ser que este estado de hipertensión labil, en buen número de casos, supone el comienzo de una historia natural de hipertensión esencial (oscilaciones generalmente de origen psicógeno). En varios de estos casos, el aumento del gasto cardíaco parece ser la causa principal en la elevación de la PA (Fuentes y cols, 1991).

Existe un gran número de trabajos recientes procedentes de distintos grupos de investigación que sugieren que una descompensación nerviosa a nivel periférico o central podría derivar en una elevación crónica de la presión arterial sistémica (Buckley y Ferrario, 1981).

Es improbable que dicha hipertensión de origen neurogénico aparezca como resultado de la destrucción regional de tejido nervioso. Se contempla como más factible que la elevación de la PA sea consecuencia de alteraciones sutiles, bien de la organización, o en la neuroquímica del mecanismo nervioso involucrado en la regulación cardiovascular (Fuentes y cols, 1991).

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Estudios previos han demostrado que el estrés producido en un modelo experimental de privación social en la rata durante más de 7 días cursa con aumentos de la presión arterial y del umbral doloroso.

Asimismo, antagonistas opioides inespecíficos como Naloxona, Naltrexona o Nalorfina revierten esta hipertensión en una fase inicial que oscila entre los 7 y los 30 días de aislamiento de los animales, pero no en estadios más avanzados.

Por otra parte, el estrés cursa con un incremento en la concentración de CA en plasma y SNC, en particular hipotálamo, amígdala, bulbo raquídeo y locus ceruleus en los primeros días del aislamiento.

Estos hechos permiten establecer la hipótesis de que la respuesta hipertensora inducida por estrés en este modelo experimental se produciría, al menos en un periodo precoz, por activación del sistema opioide central, en tanto que en el mantenimiento de la HTA a más largo plazo estarían implicados otros factores como las CA cerebrales y/o periféricas.

Basándonos en los conocidos efectos de la neurotoxina 6OHDA, que produce la destrucción selectiva de terminaciones nerviosas en tractos noradrenérgicos y evita la aparición de HTA en este modelo experimental, intentamos comprobar cuáles serían sus efectos sobre los receptores opioides en ratas control y en ratas sometidas a aislamiento en diferentes periodos de tiempo, así como el receptor implicado en estos efectos.

Hasta el momento se han descrito hasta nueve subtipos de receptores opioides, si bien el receptor μ , localizado en corteza cerebral, núcleo estriado, hipocampo, sustancia negra, locus ceruleus y núcleo del tracto solitario, constituye el 41% de la población total y el receptor δ , presente en núcleo estriado y amígdala representa el 50%. Ambos receptores regulan la sensación nociceptiva y, por su localización en el NTS, el receptor μ interviene en el control reflejo del sistema cardiovascular.

El sistema opioide produce efectos sobre la liberación de CA y la implicación de estas relaciones en la respuesta hipertensiva es un hecho que se intentaba demostrar también en este trabajo.

El objetivo de este trabajo ha sido, por lo tanto, determinar el patrón de distribución de las dos principales poblaciones de receptores opioides μ y δ en áreas específicas del SNC en el modelo experimental de privación social, su implicación en la producción y/o mantenimiento de la hipertensión, sus relaciones con las CA y que efectos produce la lesión específica de un área noradrenérgica sobre la afinidad y número de estos receptores.

MATERIAL Y METODOS

I. MATERIAL.

Aparato de medida de presión arterial Letica
Equipo estereotáxico (David Köpf)
Torno dental (Emesco) y fresas (Moisinger)
Centrífuga Sorvall RC-5B
Sistema de cromatografía compuesto por:
 Bomba Waters M-510 (Waters)
 Inyector automático refrigerado Rheodyne M 7010. Promis II (Spark Holland)
 Columna Spherisorb ODS 2, 5m de tamaño de partícula. 150x3.9mm
 (Sugelabor S.A.)
 Detector amperométrico Waters M 460 dotado de:
 Trasdutor LC-16
 Electrodo de carbono (Waters ASS)
 Integrador SP 4290 (Spectra Physics)
Baño de ultrasonidos Transsonic T 460 (Elma)
Homogenizador de ultrasonidos Labsonic-U (B. Braun)
Homogenizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel Ika, Labortechnik)
Baño con agitación Unitronic-320 (Selecta-P)
Sistema de filtrado Brandel Harvester M-24 (Brandel U.S.A.)
Bomba de vacío (Sogevac)
Analizador de líquido de centelleo Tri-carb 2500 TR (Packard)
Espectrofotómetro Spectronic 601 (Spectronic)

II. FARMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS.

2,4,5 trihidroxifenetilamina hidrocloreto, 6-hidroxidopamina (6OHDA) (Sigma)
Pentobarbital sódico (Euta-Lender) (Normon)
3,4-dihidroxibenzilamina (3,4 DBH) (Sigma)
3,4-dihidroxifenetilamina (Dopamina, DA) (Sigma)
Noradrenalina (NA) (Sigma)
Adrenalina (AD) (Sigma)
(D-Ala², D-Leu⁵)[tirosil-3,5-³H(N)]encefalina (DADLE ³H), actividad específica 30,0 Ci/mmol (Dupont NeN)
(D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵)[tirosil-3,5-³H(N)]encefalina (DAMGO ³H), actividad específica 60,0 Ci/mmol (Dupont NeN)
[D-Pen^{2,5}]encefalina (DPDPE) (Sigma)
Levorfanol (Sigma)
Albumina bovina sérica estandar (Sigma)

Acido ascórbico (Merck)
Sulfato magnésico (Merck)
Hidrato de cloral (Panreac)
1,2-Propilenglicol (Panreac)
Etanol (Panreac)
Acido cítrico (Merck)
Acetato sódico (Merck)
EDTA (Merck)

Octilsulfato sódico (PIC) (Sigma)
Metanol (Panreac)
Acido perclórico 70% (Merck)
Metasulfito sódico (Merck)
Bisulfito sódico (Merck)
Tris (hidroximetil)-aminometano (Merck)
Sacarosa (Merck)
Polietilendiamida (Sigma)
Líquido de centelleo: Cocktail-22 (Normascint)
Reactivo para el análisis de proteínas de Pierce Coomassie

III. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales fueron suministrados por Interfauna Ibérica S.A. (San Feliú de Codines, Barcelona). Durante su estancia en nuestro estabulario, en el cual permanecieron hasta el momento del sacrificio, se mantuvieron a una temperatura constante de 21°C y luz controlada (12h luz/12h oscuridad), disponiendo en todo momento de acceso libre a la comida y la bebida.

Se utilizaron 816 ratas Wistar macho de peso variable en función del experimento en concreto que fuera a llevarse a cabo.

Para la inducción del estado de estrés, el peso de los animales al inicio del aislamiento fué de 90±10g, estando los animales recién destetados. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que la edad en la que se produce el aislamiento es de suma importancia, siendo tras el destete el momento preciso para realizar el aislamiento y conseguir la inducción del estado de estrés ya que superada esta edad no se produce dicha respuesta a pesar de que se aislen de igual forma los animales.

En aquellos experimentos en los que no se iba a inducir el modelo de estrés por privación social se utilizaron ratas Wistar macho de un peso de 250±10g.

IV. LESION DEL HAZ NORADRENERGICO VENTRAL (HNV) CON 6- HIDROXIDOPAMINA.

Los animales fueron anestesiados previamente por via i.p. con Equitesín (3 ml/kg), cuya composición química se indica a continuación:

Pentobarbital sódico	0,4 mM
Sulfato magnésico	8,6 mM
Hidrato de cloral	2,5 mM
Propilenglicol	56,0 mM
Etanol 90%	11,5 %
Agua	c.s.p. 100ml

Una vez anestesiados, se colocaron adecuadamente en el aparato estereotáxico, practicándose una pequeña incisión en la piel que recubre el cráneo, se limpió cuidadosamente la superficie expuesta con el fin de visualizar las suturas y así poder

proceder a la localización del punto exacto en el que se debía realizar la lesión bilateral según las siguientes coordenadas:

Ratas jóvenes (90-100 g):

Antero-posterior	-5,9 mm desde a la bregma
Lateral	± 1,2 mm desde la línea media
Profundidad	- 6,5 mm desde la duramadre
Angulo de incisivos	2,0

Ratas adultas (240-250 g):

Antero-posterior	- 7,3mm desde a la bregma
Lateral	± 1,3 mm desde la línea media
Profundidad	- 7,4 mm desde la duramadre
Angulo de incisivos	3,5

Tanto las coordenadas de la lesión como las correcciones pertinentes, dependiendo del peso del animal en cada caso, se determinaron utilizando para ello el atlas de Paxinos y Watson (1986).

Una vez localizados los puntos de la lesión, se practicaron con la ayuda de un torno dental dos pequeños orificios en el cráneo, a través de los cuales se procedió a efectuar la inyección de 2 μ l (en ratas jóvenes) ó 3 μ l (en ratas adultas) de una solución de 3 mg/ml de la neurotoxina 6-OHDA (disuelta previamente en ácido ascórbico 0,2%) mediante una jeringa Hamilton. A otro grupo de animales se les administró solo el vehículo, ácido ascórbico 0,2% (serie de animales pseudooperados o sham). La inyección de la neurotoxina se realizó muy lentamente, inyectando 0,5 μ l/min. Una vez finalizada la intervención se suturó de forma discontinua la incisión realizada en la piel del craneo con seda 2/0.

En estudios preliminares no se encontraron diferencias en los parámetros estudiados entre ratas a las que no se había realizado ninguna manipulación y animales a los que se les había sometido a un simulacro de lesión para el cual se les inyectó vehículo exclusivamente en vez de la neurotoxina correspondiente (6OHDA) (serie sham), por lo cual se ha determinado denominar a esta serie sham como serie control.

V. MEDIDA INDIRECTA DE LA PRESION ARTERIAL. (Tail-Cuff).

La medida indirecta de la presión arterial se efectuó en un aparato Letica, según el método descrito por Buñag (1973). Consiste en un manguito que está unido a un dispositivo neumático, generador de una presión que va variando ciclicamente, y un transductor. Cuando la presión en dicho manguito supera la presión sistólica de las arterias caudales, estas se colapsan e interrumpen la transmisión de la pulsación a la parte periférica de la cola. Cuando la presión del manguito desciende retorna la

pulsación que es detectada por el transductor que se ha acoplado previamente a la cola de la rata cuya señal es adecuadamente amplificada y registrada en un lector digital. La frecuencia cardíaca se midió mediante un cardiocómetro acoplado al sistema.

Para poder obtener un registro estable de la presión arterial en el animal es preciso proceder previamente a la vasodilatación de la arteria caudal, para lo cual se situó a la rata bajo una luz infrarroja durante un periodo de tiempo de 5-10 min, procediéndose inmediatamente a la medida de la presión.

Los animales se sometieron a dicha medida durante los tres días previos al inicio de cada experimento con el fin de acostumbrarles a la manipulación. El valor final de la presión arterial sistólica corresponde a la media de, al menos, ocho medidas consecutivas.

VI. MODELO DE ESTRÉS POR DEPRIVACION SOCIAL.

Se utilizó un modelo por aislamiento descrito por primera vez por Gardiner y Bennett (1977) y modificado posteriormente por Naranjo y Fuentes (1985) y denominado **estrés por privación social**.

Para la inducción del estrés por privación social se aisló un determinado número de ratas de seis semanas de edad (90 ± 10 g de peso) colocándolas individualmente en jaulas estándar ($25 \times 25 \times 14$ cm) de paredes opacas, manteniéndose en aislamiento continuo durante 20 ó 40 días, espacio de tiempo en el cual se manifiesta el estado hipertensivo, considerándose que este se ha producido cuando los valores de presión arterial sistólica se encontraban por encima de los 20 mm de Hg de diferencia respecto a los valores del grupo control (animales agrupados), constituido por cinco ratas de la misma edad que las anteriores, que permanecieron agrupadas durante el mismo periodo de tiempo en jaulas de mayor tamaño ($40 \times 33 \times 16$ cm) y en condiciones similares. En estos animales no se presenta el estado hipertensivo.

Como consecuencia de estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio se han podido diferenciar dos fases en el mismo.

1ª FASE DEL MODELO DE AISLAMIENTO: Esta fase se caracteriza porque tras la administración del antagonista opiáceo naloxona (1mg/kg, i.p.) a los 15-20 días en animales sometidos a aislamiento se produce una disminución significativa ($P < 0,05$) en los valores de presión arterial en dichos animales, mientras que la misma dosis no produce ninguna variación en la presión arterial de los animales control.

2ª FASE DEL MODELO DE AISLAMIENTO: En este caso se vió que tras 40 días desde el inicio del aislamiento, la hipertensión que se observaba en los animales aislados ya no era revertida por la administración de naloxona (1mg/kg, i.p.) sin que se observara como en la 1ª fase, ninguna variación en la presión arterial de los animales pertenecientes al grupo control.

VII. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS.

1. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La determinación de los niveles de catecolaminas (NA, AD y DA) en distintas estructuras del SNC se realizó mediante una técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica siguiendo las condiciones descritas por Hammond y Jhonston (1984).

Las catecolaminas son susceptibles de ser detectadas electroquímicamente ya que sus correspondientes ortoquinonas son capaces de oxidarse en la superficie del electrodo de trabajo.

La selectividad de este método se pudo lograr mediante el ajuste de la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia en un valor que en el caso de las catecolaminas es del orden de 0,60-0,70V.

1.1. PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Los animales se sacrificaron por la mañana (9-10h a.m.) por decapitación mediante guillotina, extrayéndose rápidamente las distintas estructuras del SNC que iban a ser motivo de estudio.

Después de practicarse una craneotomía y extraer la masa encefálica se diseccionaron cuidadosamente siguiendo el procedimiento de Glowinski e Iversen (1966) en frío a 4°C las siguientes estructuras cerebrales: hipotálamo y bulbo raquídeo. También se extrajo la médula espinal del animal, para ello a nivel de la cintura pelviana se secciona la columna vertebral, en ese punto se introduce una jeringa, perfundiendo a presión suero fisiológico, esta presión producirá la expulsión de la médula espinal por la zona craneal (en la zona de sección de la guillotina). Se congelaron todas las estructuras en nieve carbónica y se conservaron a una temperatura de -80°C hasta su valoración.

Para esto se procedió a pesar las distintas estructuras en una balanza de precisión y se homogeneizaron en distintos volúmenes (dependiendo de la concentración estimada de las diferentes aminas en cada uno de las estructuras a determinar) de una solución de ácido perclórico 0,4M, metasulfito sódico 0,1M y 3,4 DHBA como estándar interno para la cuantificación de NA, AD y DA. La homogeneización se llevó a cabo con un homogenizador de ultrasonidos Labsonic-U.

Después las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 18000xg durante 20 min a 4°C en una centrifuga Sorvall RC-5B dotada de un rotor Sorvall 5H-MT.

El sobrenadante así obtenido se inyectó directamente en el sistema de HPLC.

1.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Se utilizó el sistema de HPLC descrito previamente en el apartado de materiales. La columna utilizada en el ensayo fue una Spherisorb ODS 2, de 5m de

tamaño de partícula, de 150x3,9mm. Los datos obtenidos quedaron registrados en un integrador acoplado al sistema, para su posterior estudio.

La fase móvil utilizada estaba compuesta por:

Acido cítrico	0,1 M
Acetato sódico	0,1 M
EDTA	0,15 mM
Octilsulfato sódico (PIC)	1mM
Metanol 10%	
PH 3,75	

La adición de PIC como formador de par iónico es imprescindible para la detección de NA ya que al aumentar su tiempo de retención impide que eluya con el frente de inyección.

Además tanto el pH como la concentración de solvente orgánico son factores manejados frecuentemente con el fin de obtener una adecuada resolución.

Para la preparación de la fase móvil se utilizó agua desionizada.

Una vez preparada la fase móvil se filtró a vacío usando filtros Millipore tipo HA con un tamaño de poro de 0,45mm, degasificándose posteriormente a vacío y en un baño de ultrasonidos durante al menos 20 minutos antes de pasarse por el cromatógrafo.

La fase móvil circulaba por el sistema a un flujo de 1ml/min, lo que daba lugar a una presión de 2000 p.s.i, como valor máximo. En el detector electroquímico se aplicó una diferencia de potencial de +0,65V entre el electrodo de referencia y de trabajo.

El volumen de inyección para todas las muestras fue de 20µl.

1.3. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Se prepararon estándares con NA, AD y DA en ácido perclórico 0,4M de varias concentraciones adecuadas para la identificación y cuantificación de las muestras. Los estándares así preparados y almacenados a -20°C se mantienen estables durante un mes.

Para poder llevar a cabo un cuidadoso control del análisis de las muestras y si era necesario compensar la pérdida gradual de sensibilidad que podía sufrir el detector debido a su uso continuado se inyectó el estándar cada 5 muestras.

Las concentraciones de catecolaminas en las muestras se determinaron mediante su análisis a través de un integrador SP 4290.

El valor obtenido de este análisis se corrigió en función de los volúmenes de homogeneización utilizados para cada tejido en concreto con el fin de expresar dichos resultados en pg/mg de tejido.

2. ENSAYOS DE FIJACION ("BINDING").

Este tipo de ensayos se fundamenta en la capacidad que poseen distintos compuestos marcados radiactivamente, radioligandos, a bajas concentraciones, para unirse de forma selectiva a aquellos sitios de fijación por los que presentan una afinidad elevada. Ello nos permite determinar los receptores existentes en un determinado tejido y por tanto tener la posibilidad de observar las variaciones que distintos tratamientos pueden producir, sobre la constante de disociación (K_D) para cada receptor y la concentración de receptores en el tejido estudiado (B_{max}).

Para el estudio de los receptores opioides mediante esta técnica hay dos requerimientos mínimos exigibles: que sea saturable el proceso de unión específica, esto es la diferencia de radiactividad ligada en presencia (binding inespecífico) y en ausencia (binding total) de un exceso de ligando no marcado ("frio"); y que la unión sea estereoespecífica.

2.1. METODOLOGIA DE LOS ENSAYOS DE FIJACION A RECEPTORES OPIOIDES ("BINDING").

Una de las características más atractivas de los experimentos de fijación a receptores es su simplicidad. Sin embargo esta simplicidad en la ejecución rutinaria de los ensayos de binding contrasta con el complejo desarrollo que requieren estos ensayos hasta su validación.

Para el estudio de la interacción opioide-receptor el método habitualmente utilizado es la medida de la fijación de ligandos a preparaciones de membranas. Uno de los isótopos que se utilizan más comunmente en el marcaje de ligandos es el tritio, el cual puede incorporarse a la molécula durante su síntesis o simplemente mediante el intercambio catalítico del tritio con átomos de H presentes en la molécula. Fundamentalmente el ligando marcado con tritio es biológicamente idéntico al compuesto no marcado y su purificación es sencilla.

Las membranas son preparadas mediante homogenización en frío del tejido correspondiente, en un buffer adecuado para el ensayo. A continuación el homogenizado se somete a varias centrifugaciones sucesivas con el fin de separar la fracción enriquecida en membranas plasmáticas. En este momento se procede a la resuspensión del pellet obtenido, siendo en ocasiones necesaria una preincubación para la disociación de los ligandos endógenos del tejido.

Una vez preparadas las membranas, se procede a los ensayos de fijación propiamente dichos, incubando dichas membranas con distintas concentraciones de un radioligando en presencia y en ausencia de un ligando "frio" (no radiactivo) en exceso, que actúa como desplazante.

Se deben controlar determinados factores para asegurar las condiciones óptimas del proceso de fijación: concentración estimada del receptor, concentración del radioligando, tiempo y temperatura de incubación. Tras la incubación, se procede a la separación de la fracción libre, para ello se realiza una filtración rápida al vacío, lavando cada tubo dos o tres veces con 3ml del buffer frío correspondiente. Por último se recogen los filtros y bien secos se introducen en viales con un adecuado volumen de

líquido de centelleo realizando un recuento radiométrico de la radiactividad contenida en los filtros.

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante la representación de Scatchard (Scatchard, 1949) en la que en abcisas se indican los valores de "fijación específica" (BE fmoles/muestra) y en ordenadas BE/DL, donde DL indica la concentración del ligando libre por muestra. La intersección de la recta con el eje de abcisas permite la cuantificación del número de receptores (B_{max}) y la inversa de la pendiente de dicha recta es la constante de disociación (K_D).

2.1.a. Preparación de las membranas:

Tras el sacrificio del animal por decapitación se extrajo cuidadosamente la masa encefálica y se disecaron en frío a 4°C para su posterior análisis las siguientes estructuras: hipotálamo, bulbo raquídeo, corteza cerebral frontal, núcleo estriado e hipocampo. También se extrajo la médula espinal del animal, siguiendo la misma técnica descrita en el apartado anterior, congelándose a -80°C las estructuras hasta su posterior procesamiento. Todo el proceso se llevó a cabo en material plástico y en frío, a 4°C.

Para la preparación de las membranas en primer lugar se pesó el tejido a analizar en una balanza de precisión; a continuación se homogenizó el mismo en 20 volúmenes de Buffer-Tris-Cl 50mM con sacarosa 0,32M. Para ello se dieron 5 pulsos de 3 seg con el Ultra-Turrax a 13500 (min^{-1}). El homogeneizado se centrifugó 10 min a 1000xg (4°C); se recogió el sobrenadante y se repitió la operación descrita para lavar una segunda vez el "pellet" obtenido.

Se preincubó el sobrenadante en un baño con agitación a 37°C durante 15 min con el fin de disociar los posibles ligandos endógenos.

A continuación se centrifugó el sobrenadante preincubado a 20000xg durante 20 min recogiendo el "pellet".

Por último éste se resuspendió en un determinado volumen del Buffer-Tris-Cl 50 mM (sin sacarosa) dependiendo de la estructura analizada mediante 5 pulsos de 3 seg en el Ultra-Turrax a 9500 (min^{-1}).

2.1.b. Ensayo de fijación a receptores opioides δ y μ :

Una vez que se prepararon adecuadamente las membranas pasamos a realizar el ensayo de fijación a receptores (binding) propiamente dicho.

Se estudió la población de receptores δ y μ en las distintas estructuras recogidas para su análisis.

En tubos de plástico se dispone la mezcla de incubación que constó de:

100ml de la muestra (suspensión de membranas)

100ml de distintas concentraciones desde 0,2 a 2nM del radioligando DADLE ^3H para el estudio de receptores δ o del radioligando DAMGO ^3H agonista

opioide con alta afinidad para los receptores μ para el estudio de dicho tipo de receptores.

100ml de un ligando "frio" en exceso que actúa como desplazante, habiéndose utilizado DPDPE (10mM) agonista con alta afinidad para receptores δ para el estudio de dicho receptor (buffer-tris-Cl 50mM en el caso del "binding" total) o levorfanol (10mM) (o agua destilada en el caso del "binding" total) para el estudio de receptores μ .

200ml de buffer-tris-Cl 50mM para completar un volumen final de 500ml.

El orden de adición fué primero el Buffer-Tris-Cl, a continuación el ligando "frio", después el radioligando y por último las membranas preparadas.

Esta mezcla se incubó en un baño con agitación a 25°C durante 45 min, a continuación se procede a la separación de la fracción libre mediante una filtración rápida a vacío, utilizando para ello un aparato de filtración Brandel Harvester y filtros de vidrio GF/C previamente tratados con polietilendiamida 1% (desde 2h antes del filtrado). Se lavó cada tubo 3 veces con 5ml de Buffer-Tris-Cl 5mM frío. Se recogieron los filtros, se introdujeron en viales de plástico opaco con 3ml de líquido de centelleo y se realizó el recuento radiométrico de la radiactividad retenida en los filtros tras, 24h de reposo a temperatura ambiente en un contador β durante 1min/vial.

2.2. VALORACION DE LA PROTEINA.

La evaluación de la concentración de proteína se realizó utilizando para ello el Kit de Pierce Coomassie, el cual consiste en una solución lista para ser utilizada del reactivo Azul Coomassie G-250. Esta técnica se basa en el método de Bradford el cual utiliza el cambio en la absorbancia en una solución ácida Coomassie azul brillante G-250 (Bradford, 1976). Tras la adición de la solución a la proteína el colorante se une a la proteína, resultando un cambio de color desde el marrón rojizo al azul. El colorante se une a la proteína vía la atracción electrostática de los grupos sulfónicos del mismo.

El compuesto coloreado que se origina es susceptible de ser medido espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 595 nm. La coloración obtenida es estable desde 5 a 90min a temperatura ambiente pudiendo procederse a medir las muestras inmediatamente después de la adición del reactivo.

Para realizar la valoración se utilizó una solución de albúmina bovina sérica estandar cuya concentración fué de 1mg/ml, a partir de la cual se prepara, posteriormente, una curva patrón mediante diluciones sucesivas para obtener concentraciones de proteína en un rango de 1 a 25 mg/ml.

El análisis se realizó de la siguiente forma:

- Se agitó cuidadosamente la botella con el reactivo antes de su uso.
- Se preparó una curva patrón de un rango de 1 a 25 mg/ml con albúmina bovina sérica estandar en el mismo diluyente en el que se encuentra la proteína a valorar.

- Se añadió 0,5ml de la dilución estandar o de la dilución problema en un tubo de ensayo (utilizaremos el diluyente como "blanco"). Todos los análisis se realizaron por triplicado.
- Se añadió 0,5 ml del reactivo, agitando en Vortex.
- Las muestras así preparadas se leyeron a 595nm transcurridos 5 min de la adición del reactivo y hasta 90 min como máximo despues de dicha adición en un espectrofotómetro Spectronic 601.

Las concentraciones de proteína en las muestras problema analizadas se determinaron por extrapolación de las absorbancias en la curva patrón.

VIII. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los valores se expresan como media \pm la desviación estándar ($x \pm DE$).

La aplicación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov a todas las variables estudiadas no permite rechazar el supuesto de normalidad de su distribución y por éste motivo se han utilizado pruebas paramétricas de contraste estadístico.

En el caso de datos apareados, la diferencia entre las medias se analizó mediante la t de Student.

La comparación de las restantes variables se realizó mediante un análisis de la varianza y, cuando éste mostró una diferencia significativa, se empleó la prueba de Neuman-Keuls para contrastes a posteriori.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula cuando su probabilidad fué inferior a 0,05.

RESULTADOS

I. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL

1. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV POR 6OHDA.

Se observó tras 20 días de evolución un aumento normal del peso corporal en las series de animales control (C), animales pseudooperados (Sham) mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el HNV (S) y en animales lesionados bilateralmente mediante la administración de 6ng de 6OHDA en el haz noradrenérgico ventral y sacrificados transcurridos 20 días de realizada la lesión (L20d). (Figura 1)

No se encontraron diferencias ES entre las Series antes señaladas a los 20 días de evolución de las mismas.

2. EFECTO DEL AISLAMIENTO (DEPRIVACION SOCIAL)

Se produce un incremento del peso corporal adecuado al tiempo de evolución en la serie de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A), tanto a 20 como a 40 días de evolución. (Figura 2)

3. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV CON 6OHDA Y POSTERIOR AISLAMIENTO

Se obtuvo un incremento del peso corporal, en todas las series estudiadas, serie de animales control (C), animales lesionados bilateralmente (L) mediante la inoculación de 6OHDA en el haz noradrenérgico ventral, animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días y animales lesionados y aislados (AL), tanto a 20 como a 40 días de evolución. (Figura 2)

II. EVOLUCION DE LA PRESION ARTERIAL

1. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV POR 6OHDA

En la serie de animales lesionados bilateralmente (L) en el haz noradrenérgico ventral con 6OHDA se produce un ligero aumento, ES respecto al valor basal que se corresponde con la edad, en la **presión arterial sistólica**, tanto a 20 como a 40 días; esta serie, sin embargo, no presenta diferencias ES respecto a la serie de animales control. (Tabla III, Figura 3)

La **presión arterial diastólica** presenta un incremento ES ($p < 0,001$) en la serie de animales lesionados (L) respecto al valor basal (B) transcurridos 20 días de evolución, que se corresponde con la edad. sin embargo, en el periodo de 20 a 40 días de evolución la presión arterial diastólica descendió ligeramente mostrando aún diferencias ES respecto a su valor basal. (Tabla III, figura 4)

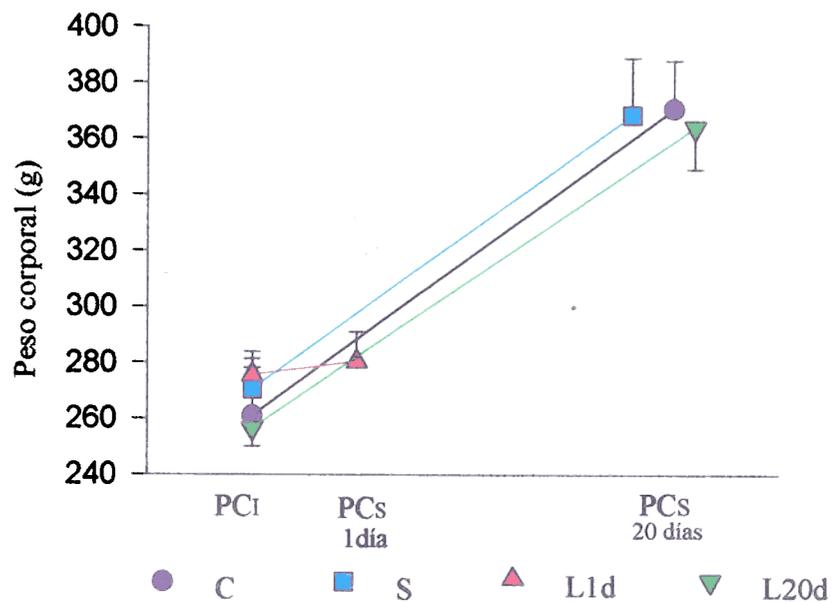


FIGURA 1

Evolución del peso corporal (PCI: peso corporal inicial; PCS: peso corporal en el momento del sacrificio) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

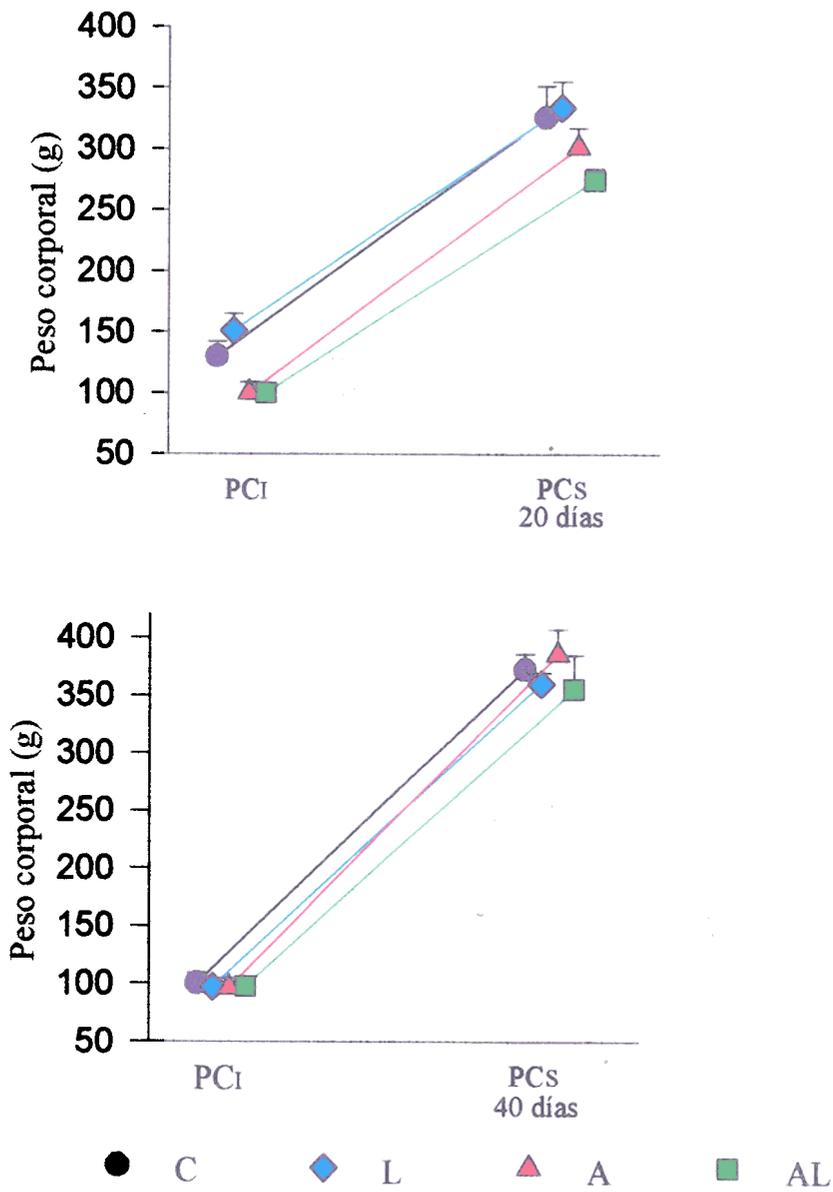


FIGURA 2

Evolución del peso corporal (PCI: peso corporal inicial, PCS: peso corporal en el momento del sacrificio a 20 ó 40 días) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

TABLA III

Estudio de la presión arterial sistólica (PS, mmHg), diastólica (PD, mmHg) y frecuencia cardiaca (FC, latidos /min) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL). Los valores basales (n=20) antes de distribuir los animales en las distintas series fueron: PS=138,6±6,5 mmHg; PD=89,3±9,2 mmHg; FC=377,2±10,1 latidos/min.

		20 días (n=25)		40 días (n=25)	
C (n=50)	PS	140,2±13,8		143,7±14,1	
	PD	97,6±17,8		107,6±10,2	*** ●
	FC	381,5±15,6		372,8±28,1	
L (n=50)	PS	145,4±8,9	**	145,7±9,6	**
	PD	103,2±12,4	***	98,7±8,9	** ΔΔ
	FC	379,7±18,7		363,3±27,4	* ●
A (n=50)	PS	160,0±9,2	*** ΔΔΔ	175,9±8,4	*** ●●● ΔΔΔ
	PD	118,3±12,6	*** ΔΔΔ	123,6±13,82	*** ΔΔΔ
	FC	382,2±7,5		376,3±19,2	
AL (n=50)	PS	152,3±16,7	**	150,5±14,1	** ■■■
	PD	108,4±11,1	*** ■■	106,2±12,23***	*** ●●● ■■■
	FC	383,3±20,6		350,0±26,7	*** ●●● ΔΔ ■■■

Los valores se expresan como $\bar{x} \pm DE$. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 valores ES respecto a los valores basales. ●p<0,05; ●●●p<0,001 valores ES respecto a 20 días. Δp<0,05; ΔΔp<0,01; ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto a la Serie C. ▲▲▲p<0,001 valores ES respecto a la Serie L. ■■p<0,01; ■■■p<0,001 valores ES respecto a la Serie A. (n=): número de animales.

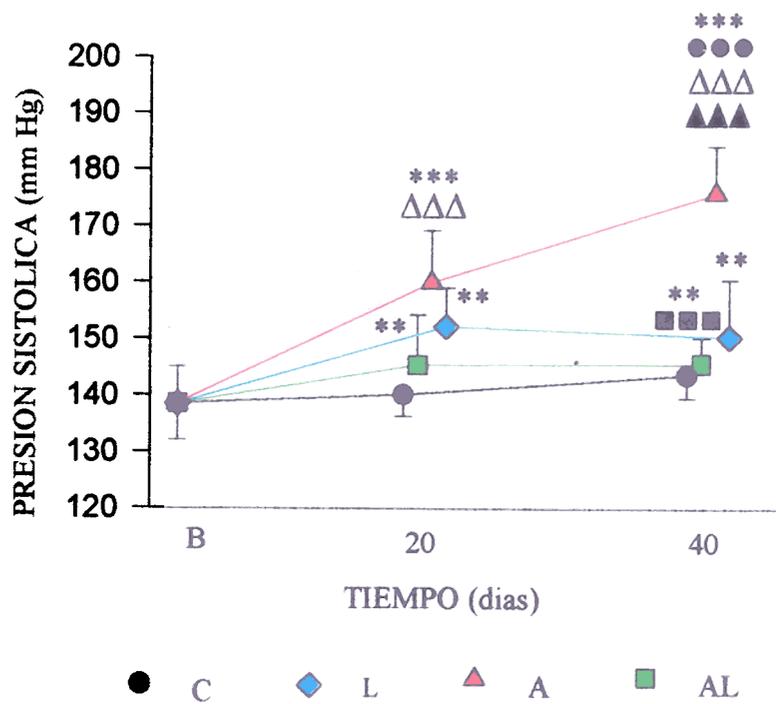


FIGURA 3

Evolución de la presión arterial sistólica (PS, mmHg) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

p<0,01; *p<0,001 valores ES respecto a los valores basales (B) determinados en 20 animales, previamente a su distribución aleatoria en las distintas series.

●●●p<0,001 valores ES respecto a 20 días. ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto a la serie C. ▲▲▲p<0,001 valores ES respecto a la serie L. ■■■p<0,001 valores ES respecto a la serie A.

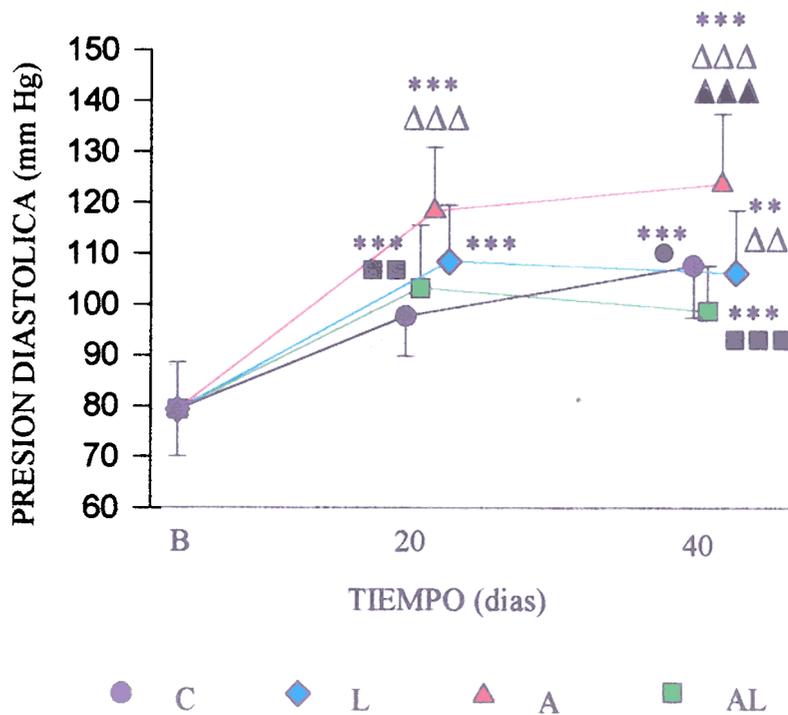


FIGURA 4

Evolución de la presión arteria diastólica (PD, mmHg) en las series de animales control (C), animales lesionados en el haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL). **p<0,01; ***p<0,001 valores ES respecto a los valores basales (B). ●p<0,05 valores ES respecto a 20 días. ΔΔp<0,01; ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto a la serie control (C). ▲▲▲p<0,001 valores ES respecto a la serie L. ■■p<0,01; ■■■p<0,001 valores ES respecto a la serie A.

2. EFECTO DEL AISLAMIENTO (DEPRIVACION SOCIAL)

Al estudiar la evolución de la **presión arterial sistólica** (mm Hg) se vió un considerable incremento, estadísticamente significativo ($P < 0,001$) respecto al valor basal (B) en la serie de animales sometidos a aislamiento (A), tanto a 20 como a 40 días de evolución. Esta serie presentaba diferencias ES respecto a los valores obtenidos en la serie de animales control (C). (Tabla III, Figura 3)

Para la **presión arterial diastólica** (mm Hg) se obtuvo también un incremento en la serie de animales sometidos a aislamiento (A), tanto a 20 como a 40 días de evolución. Dicho incremento presentaba diferencias ES ($p < 0,001$) respecto al valor basal y respecto a la serie de animales control (C). (Tabla III, Figura 4)

3. EFECTO DE LA LESION BILATERAL DEL HNV CON 6OHDA Y POSTERIOR AISLAMIENTO

Al estudiar la evolución de la **presión arterial sistólica** se observó que no se producían apenas variaciones en la misma en la serie de animales control (C), mientras que en el resto de las series sí se dan variaciones.

La serie de animales lesionados y además sometidos a aislamiento durante 20 ó 40 días (AL), no presentaba prácticamente ningún incremento en la presión arterial sistólica durante el periodo de evolución. No presentaba diferencias ES respecto a las series de animales control y animales lesionados, mientras que sí había diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) respecto a la serie de animales sometidos a aislamiento.
(Tabla III, Figura 3)

La **presión arterial diastólica** presenta un incremento ES ($P < 0,001$) respecto al valor basal a 20 días de evolución, para las series de animales lesionados (L), animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y posteriormente aislados (AL).

De 20 a 40 días de evolución descendió ligeramente la presión diastólica en las series antes referidas aunque seguían mostrando diferencias ES respecto a sus valores basales, que se corresponden con el peso. (Tabla III, Figura 4)

III. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE CATECOLAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

1. ANÁLISIS DE LAS CATECOLAMINAS DEL SNC EN ANIMALES SOMETIDOS A LESIÓN DEL HAZ NORADRENERGICO VENTRAL CON 6OHDA

1.1. Hipotálamo.

Al analizar las concentraciones de **noradrenalina (NA)** en el hipotálamo se observó un ligero aumento no significativo de los niveles en la serie control tanto a los 20 como a los 40 días, respecto a la concentración a 1 día (Tabla IV; Figura 1) Asimismo, en la serie de animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral (HNV) mediante la administración de 6ng de 6OHDA se obtuvo un descenso significativo ($P < 0,001$) a los 20 y 40 días respecto a los valores que presentaba dicha serie a las 24h de realizada la lesión. Los valores de la serie de animales lesionados (L) mostraban, así mismo, una diferencia estadísticamente significativa (ES) ($P < 0,001$) a los 20 y 40 días respecto a los valores obtenidos en la serie control a dicho periodo de tiempo. (Figura 5).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos con **adrenalina (AD)** se observó también en la serie control un ligero aumento en la concentración tanto a 20 como a los 40 días siendo dicho aumento no significativo. (Figura 5). En la serie de animales lesionados bilateralmente (L) en el HNV con 6OHDA, las concentraciones de AD experimentaban un descenso muy significativo a 20 y 40 días de la lesión respecto a los niveles obtenidos a 1 día. Asimismo, tanto a 20 como a 40 días las concentraciones obtenidas para la serie de animales lesionados (L) eran menores y presentaban diferencias ES ($P < 0,001$) respecto a los valores de la serie control. (Figura 5)

En cuanto a las concentraciones de **dopamina (DA)**, los niveles eran muy similares a 1, 20 y 40 días dentro de la serie control, sin presentar diferencias estadísticas. (Figura 5).

Respecto a la serie de animales lesionados (L) se observó un ligero descenso en los niveles de DA a 20 y 40 días, no presentando diferencias ES.

Entre los valores obtenidos para la serie de animales control y animales lesionados no se encontraron diferencias ES. (Figura 5)

1.2. Bulbo raquídeo.

Cuando se analizaron las concentraciones de **noradrenalina** en el bulbo raquídeo se observó en la serie de animales control un ligero descenso a los 20

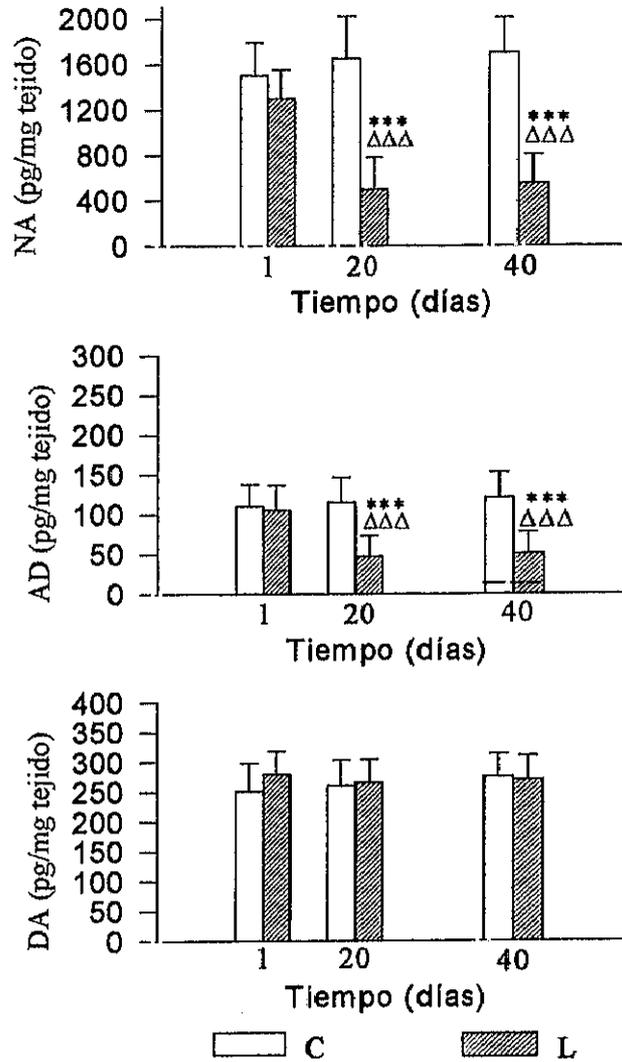


FIGURA 5

Concentraciones de Noradrenalina (NA, pg/mg tejido), Adrenalina (AD; pg/mg tejido), Dopamina (DA; pg/mg tejido) en el **hipotálamo** de animales control (C) y con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6-hidroxi dopamina (6OHDA).

***p<0,001: valores ES respecto de la serie control (C). ΔΔΔp<0,001: valores ES respecto a la serie L después de 1 día de efectuada la lesión.

días, para volver a recuperarse a los niveles iniciales a los 40 días; las diferencias a 1, 20 y 40 días en dicha serie no eran ES. (Figura 6)

En la serie de animales con lesión bilateral (L) del HNV mediante la administración de 6OHDA, se observó una pauta inversa a la descrita anteriormente para la serie control (C), en este caso se obtuvo un ligero aumento a 20 días que tampoco era ES.

Entre las series control y la serie de animales lesionados no se obtuvieron diferencias ES respecto a la concentración de NA en el bulbo raquídeo. (Figura 6)

Los niveles de **adrenalina** no presentaban apenas modificaciones tras 1, 20 y 40 días en las series estudiadas; serie de animales control (C) y animales lesionados (L).

Tampoco se obtuvieron diferencias ES entre las series estudiadas; respecto a las concentraciones de AD. (Figura 6)

Cuando se analizaron las concentraciones de **dopamina** en el bulbo raquídeo no se encontraron diferencias ES ni en las series estudiadas ni entre dichas series. (Figura 6)

1.3. Médula espinal.

La concentración de **noradrenalina** en la serie de animales control y animales lesionados no presentaba diferencias ES, siendo sus valores muy similares tanto transcurridos 1, 20 ó 40 días.

Tampoco se obtuvieron diferencias entre la serie de animales control y animales lesionados respecto a la concentración de NA en la médula espinal. (Figura 7)

En cuanto a la concentración de **dopamina** (pg/mg tejido) en dicha estructura tampoco se observaron diferencias ES transcurridos 1, 20 y 40 días en la serie de animales control y animales con lesión bilateral del HNV. Así mismo, no había diferencias estadísticas entre dichas series. (Figura 7)

2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE CATECOLAMINAS EN ANIMALES SOMETIDOS A AISLAMIENTO

2.1. Hipotálamo.

En el hipotálamo las concentraciones de **noradrenalina** (pg/mg tejido) experimentaron un ligero aumento a los 20 y 40 días respecto a los valores basales (B) en la serie de animales control, no siendo dicho aumento estadísticamente significativo. En la serie de animales aislados (A) también se apreció un ligero aumento en los niveles de NA a los 20 y 40 días no siendo dicho aumento estadísticamente significativo como en la serie control. (Figura 8)

No se obtuvieron diferencias ES entre las series de animales control y animales aislados (A) respecto a la concentración de NA en el hipotálamo.

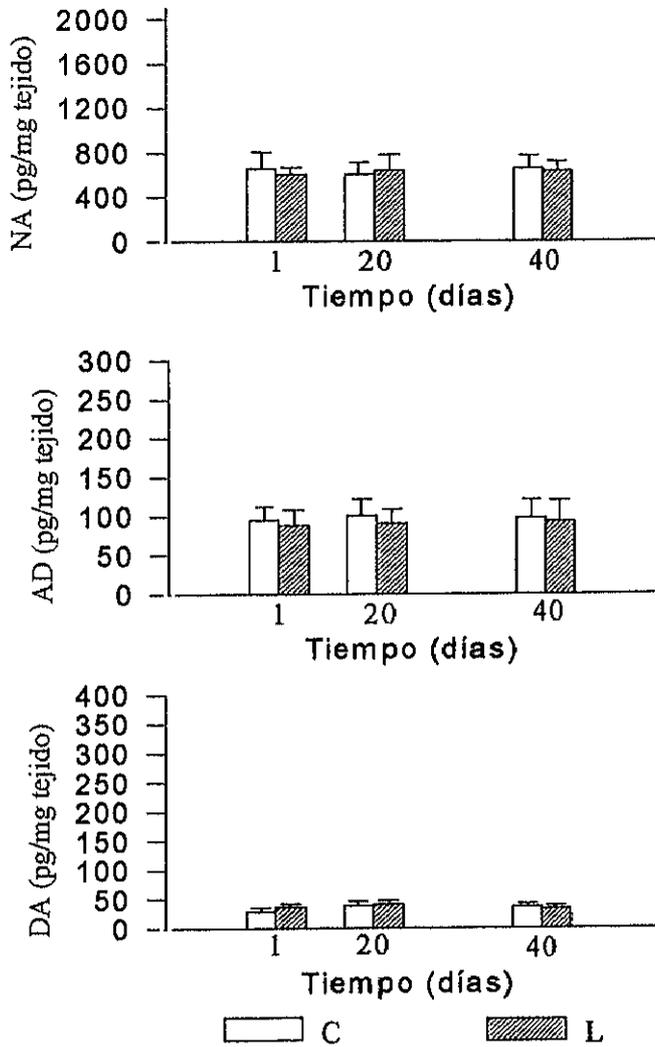


FIGURA 6

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido), Adrenalina (AD; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en el **bulbo raquídeo** de animales control (C) y animales sometidos a lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6-hidroxi dopamina (6OHDA).

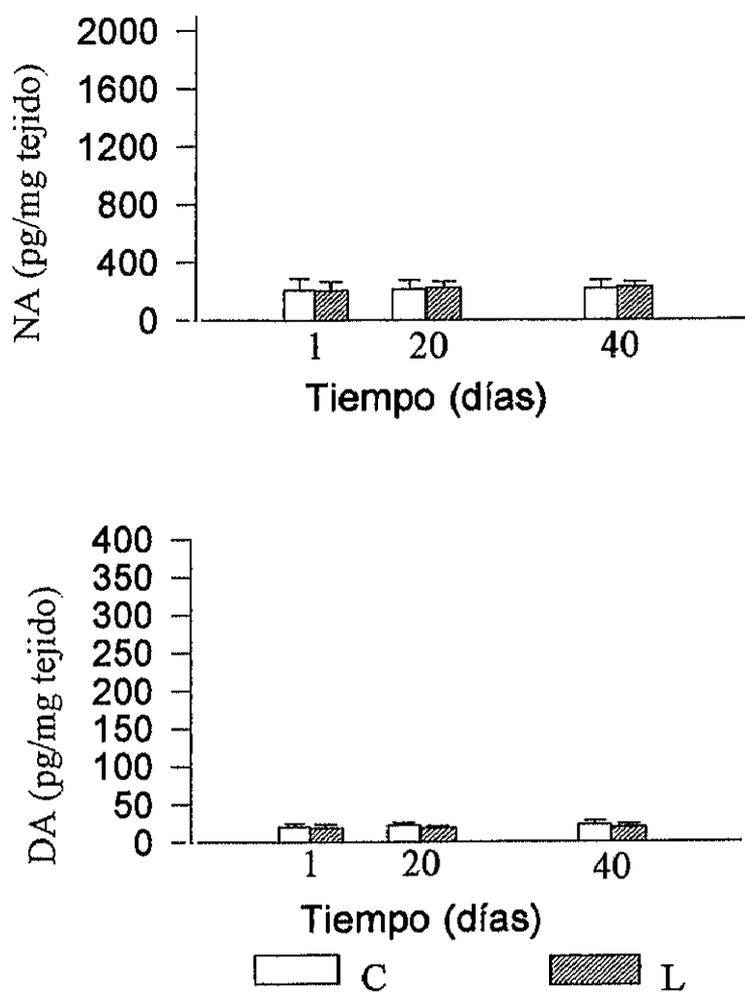


FIGURA 7

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en la **médula espinal** de animales control (C) y animales sometidos a lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6-hidroxi dopamina (6OHDA).

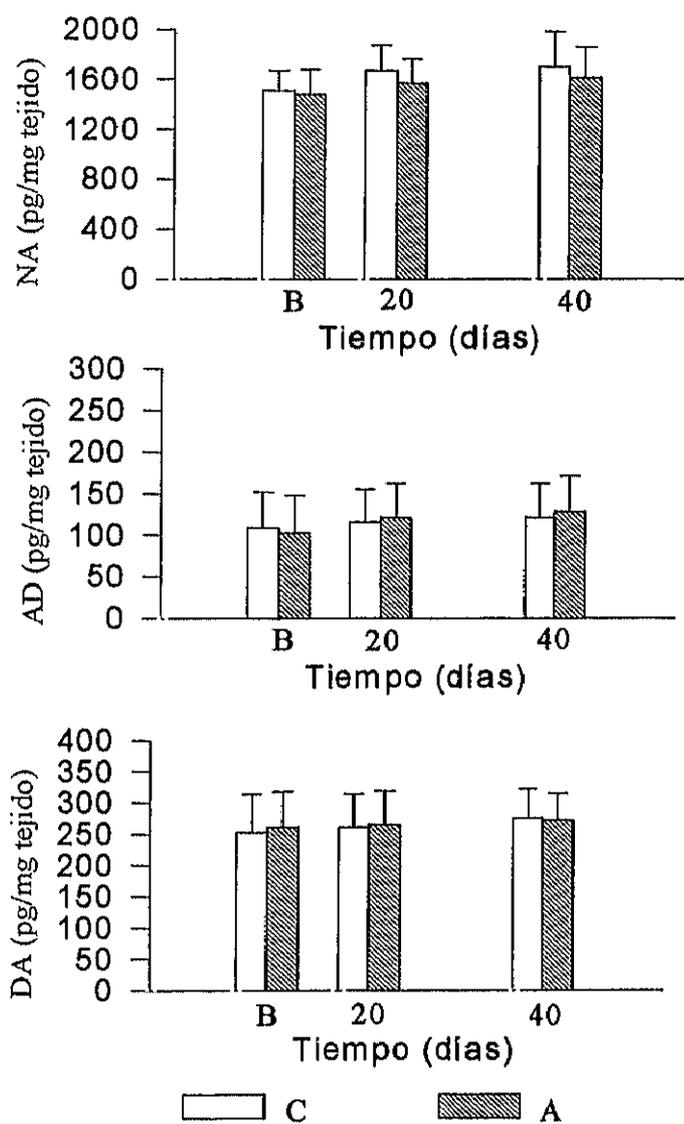


FIGURA 8

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido), Adrenalina (AD; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en el **hipotálamo** de animales control (C) y de animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días.

B: basal

Las concentraciones de **adrenalina** también presentaban un ligero aumento a 20 y 40 días respecto a los valores basales (B) tanto en la serie de animales control como en la serie de animales sometidos a aislamiento; no siendo este aumento estadísticamente significativo. Tampoco se obtuvieron diferencias ES entre las series antes referidas. (Figura 8)

Las concentraciones de **dopamina** (pg/mg tejido) seguían una pauta similar a la observada en el caso de la NA y AD; se observó un ligero aumento tanto a los 20 como a los 40 días de evolución respecto a los valores basales (B) en las series C y A. No se encontraron diferencias significativas entre dichas series. (Figura 8)

2.2. Bulbo raquídeo

Cuando se analizaron las concentraciones de **noradrenalina** en el bulbo raquídeo en las series de animales control y animales sometidos a aislamiento se observó un ligero aumento en ambas series a los 20 y 40 días respecto a los valores basales (B), no siendo este aumento estadísticamente significativo. Los valores obtenidos para ambas series eran muy similares entre si no presentando diferencias ES. (Figura 9)

Respecto a las concentraciones de **adrenalina**, en la serie control dichos valores eran muy similares tanto a tiempo basal como a los 20 ó 40 días, sin presentar diferencias estadísticas.

En la serie de animales sometidos a aislamiento (A) se obtuvo un ligero aumento en la concentración de AD a los 20 días, aunque no fué estadísticamente significativo. (Figura 9)

No se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración de AD entre las series de animales control y animales sometidos a aislamiento.

En cuanto a las concentraciones de **dopamina** en el bulbo raquídeo no se encontraron diferencias ES ni dentro ni entre las distintas series (serie de animales control y serie de animales sometidos a aislamiento) ya que los valores obtenidos a los distintos tiempos eran muy similares. (Figura 9)

2.3. Médula espinal

Las concentraciones de **noradrenalina** en las series de animales control y animales sometidos a aislamiento fueron muy similares tanto a tiempo basal como a los 20 ó 40 días, no obteniéndose diferencias ES en las series referidas ni entre dichas series. (Figura 10)

En la médula espinal no se encontraron en las concentraciones de **dopamina** diferencias ES en las series control y de animales aislados (A), tampoco había diferencias ES entre dichas series ya que los valores obtenidos para ambas eran muy similares. (Figura 10)

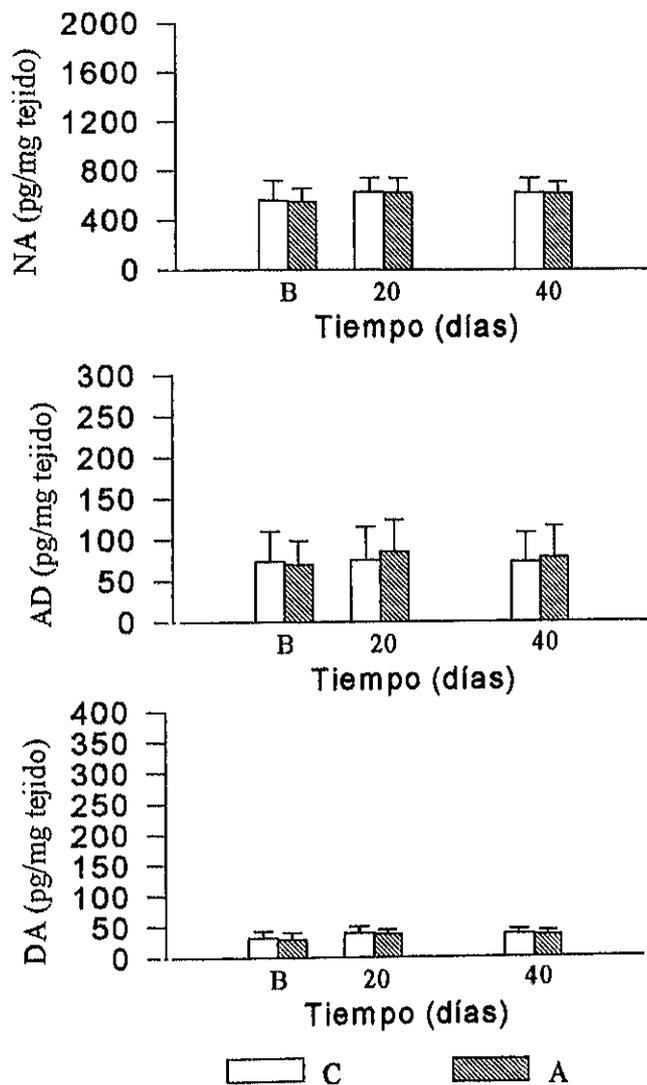


FIGURA 9

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido), Adrenalina (AD; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en el **bulbo raquídeo** de animales control (C) y de animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días.
 B: basal.

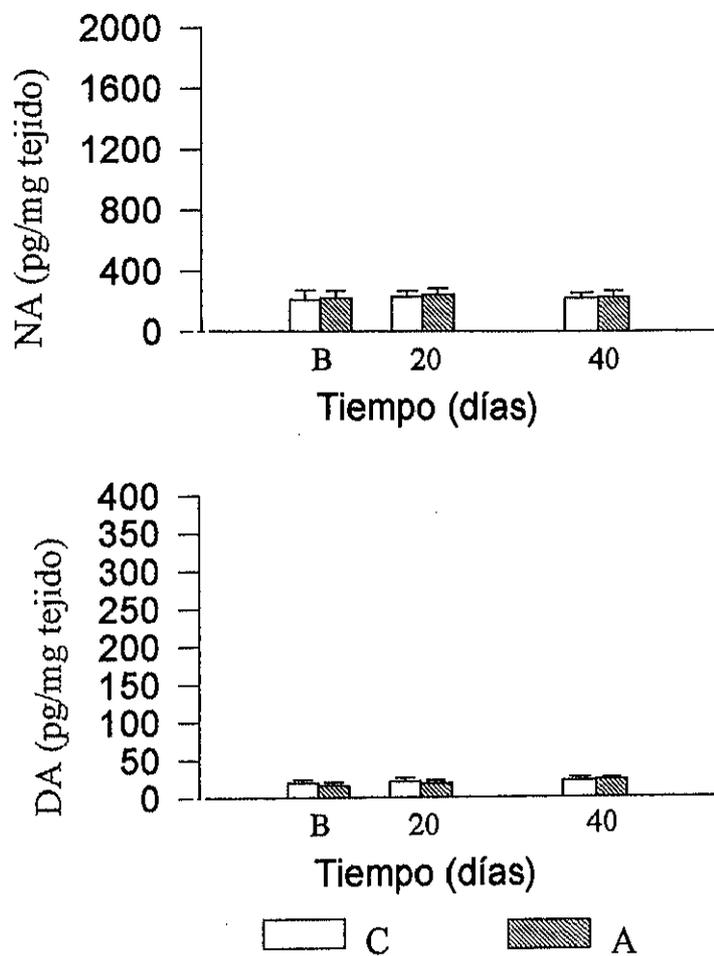


FIGURA 10

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en la **médula espinal** de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días.

B: basal.

3. ANÁLISIS DE LAS CATECOLAMINAS DEL SNC EN ANIMALES LESIONADOS CON 6OHDA EN EL HNV Y SOMETIDOS A AISLAMIENTO

3.1. Hipotálamo

Al analizar las concentraciones de **noradrenalina** (pg/mg tejido) en el hipotálamo a 1 día se observó un descenso no significativo en la serie de animales lesionados bilateralmente en el haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento respecto a la serie de animales control, mientras que la serie de animales sometidos a aislamiento presentaba unos niveles similares a los de la serie control. (Figura 11)

Sin embargo a los 20 y 40 días se encontró un descenso muy pronunciado, estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en las series L y AL respecto a los valores obtenidos en dichas series a 1 día. Ese descenso también era ES ($P < 0,001$) respecto a los valores obtenidos en la serie control, a los 20 y 40 días, y la serie de animales aislados. (Figura 11)

Las concentraciones de NA en la Serie de animales sometidos a aislamiento era, a los 20 y 40 días, muy similares a los obtenidos para la serie control no presentando diferencias ES. (Figura 11)

Las concentraciones de **adrenalina** siguieron una pauta similar a la descrita para las concentraciones de NA; a los 20 y 40 días.

Transcurrido 1 día se observó un ligero aumento en las concentraciones de AD, aumento estadísticamente no significativo, para las series de animales lesionados (L) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) respecto a los niveles obtenidos para la serie de animales control (C). La serie de animales aislados presentó unos valores similares a los de la serie de animales control. (Figura 11)

Transcurridos 20 y 40 días la Serie de animales sometidos a lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6OHDA presentaba una concentración menor que la obtenida a 1 día en dicha serie ($P < 0,001$) y que los valores obtenidos a dicho periodo de tiempo para la serie de animales control, presentando diferencias estadísticamente significativas.

La serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) presentó unos valores de concentración de AD a los 20 y 40 días menores que los obtenidos para las series control y de animales sometidos a aislamiento (A) presentando diferencias ES ($P < 0,001$) respecto a esta última serie. (Figura 11)

Cuando se analizaron las concentraciones de **dopamina** (pg /mg tejido) en el hipotálamo se vió que a 1 día se presentaba un ligero aumento en dichas concentraciones en las series de animales lesionados y animales lesionados y sometidos a aislamiento respecto a los valores obtenidos para las series de animales control y animales sometidos a aislamiento, siendo el aumento estadísticamente no significativo.

Tanto a los 20 como a los 40 días de evolución no existe apenas variación entre las series estudiadas, no presentándose diferencias ES. (Figura 11)

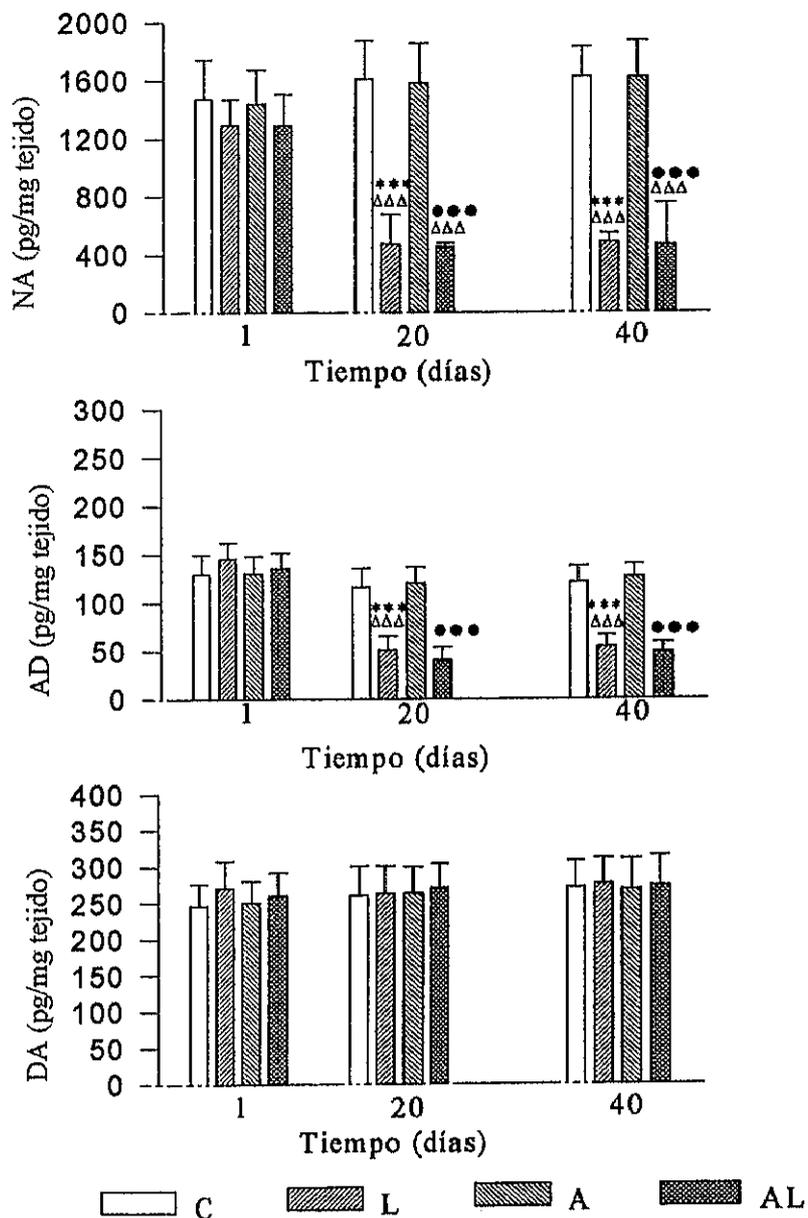


FIGURA 11

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido), Adrenalina (AD; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en el **hipotálamo** de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días y animales lesionados y posteriormente aislados (AL).

***p<0,001; valores ES de la Serie L respecto de la Serie C. ●●●p<0,001; valores ES de la Serie AL respecto de la Serie A. ΔΔΔp<0,001; valores ES de 20 y 40 días respecto de 1 día.

3.2. Bulbo raquídeo

Si observamos los valores obtenidos transcurridos 1, 20 y 40 días en las concentraciones de **noradrenalina** en el bulbo raquídeo en las series de animales control, animales sometidos a aislamiento (modelo de estrés por deprivación social), animales lesionados bilateralmente en el HNV mediante la administración de 6OHDA y animales lesionados y sometidos posteriormente a aislamiento, apenas encontramos variaciones entre ellas no habiendo diferencias ES. (Figura 12)

Las concentraciones de **adrenalina** (pg/mg tejido) tampoco presentan grandes variaciones en las distintas series estudiadas transcurridos 1, 20 y 40 días; no existiendo diferencias ES. (Figura 12)

Respecto a las concentraciones de **dopamina** en el bulbo raquídeo se observa que tampoco hay diferencias ES entre los valores de las distintas series estudiadas a 1, 20 y 40 días, presentando todas ellas unas concentraciones muy similares. (Figura 12)

3.3. Médula espinal

En la médula espinal no se encontraron apenas diferencias, respecto a la concentración de **noradrenalina**, en los valores obtenidos en las distintas series estudiadas, serie de animales control, animales lesionados, animales sometidos a aislamiento y animales lesionados y sometidos a aislamiento, transcurridos 1, 20 y 40 días, no habiendo diferencias ES. (Figura 13)

Respecto a las concentraciones de **dopamina** tampoco se obtuvieron diferencias tanto en, como, entre las series estudiadas y referidas anteriormente a 1, 20 y 40 días obteniéndose unos valores muy similares en todas ellas. (Figura 13)

IV. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FIJACIÓN AL RECEPTOR δ OPIOIDE

1. EFECTO DE LA LESIÓN BILATERAL DEL HNV POR 6OHDA SOBRE RECEPTORES δ OPIOIDES.

1.1. Hipotálamo

En el estudio de la Bmax del receptor δ opioide no se obtuvieron diferencias significativas entre la serie de animales control (C) y la de animales pseudooperados (S).

Por el contrario, sí se hallaron diferencias ES entre las series control y animales pseudooperados respecto a las series de animales lesionados y sacrificados a las 24 horas de realizada la lesión (L1d) o a los 20 días de realizada la misma (L20d); así se observó que estas últimas series presentaban un descenso en la Bmax (fmol/mg

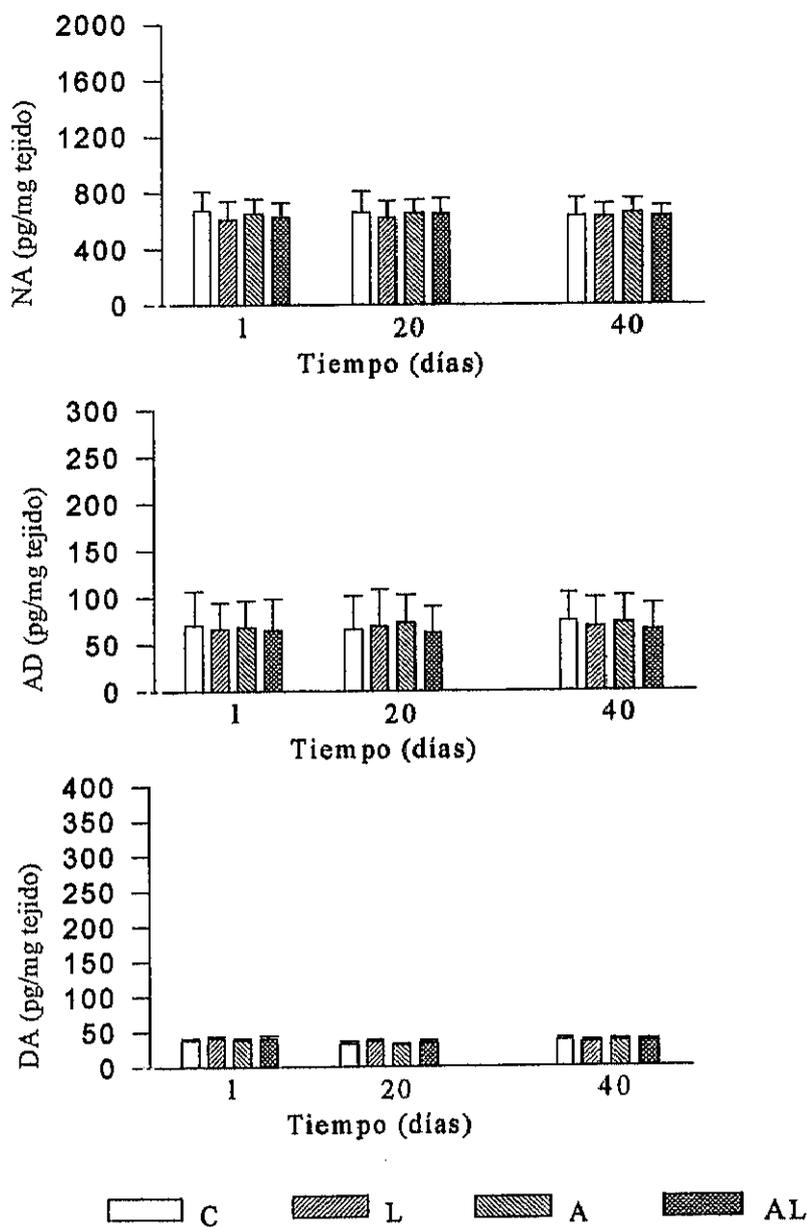


FIGURA 12

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido), Adrenalina (AD; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en el **bulbo raquídeo** de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días y animales lesionados y posteriormente aislados (AL).

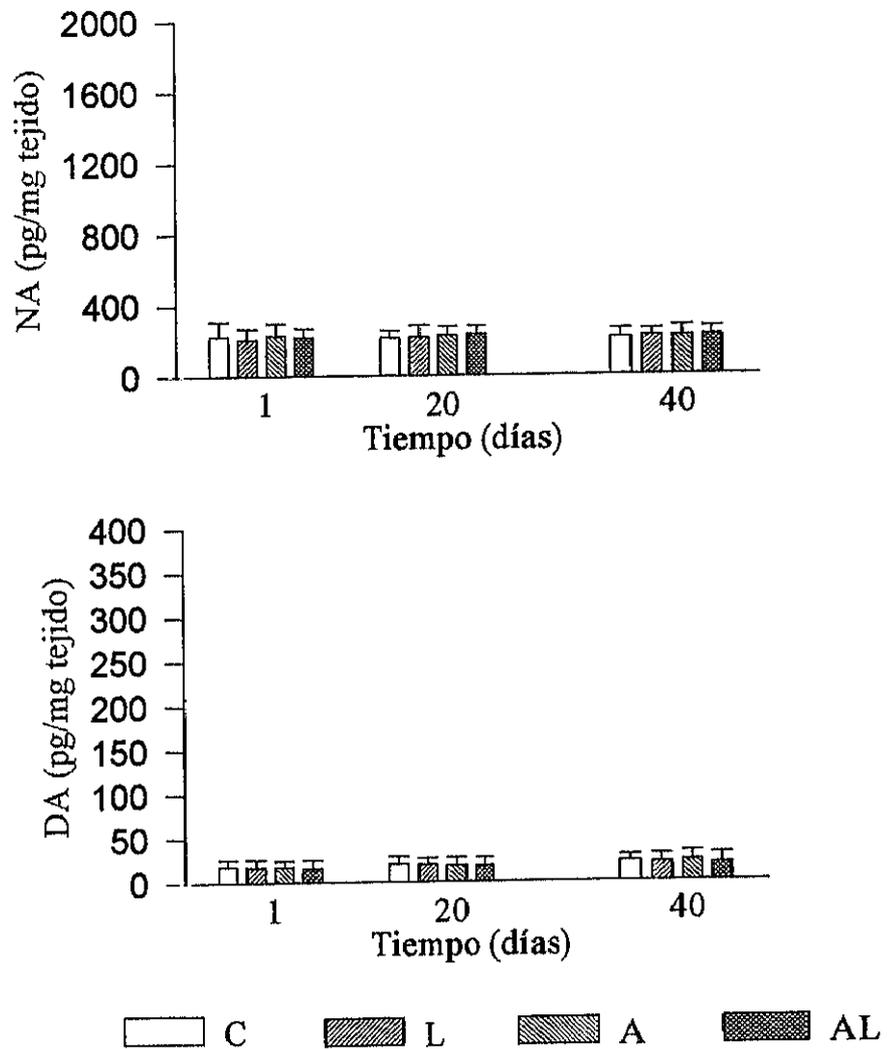


FIGURA 13

Concentraciones de Noradrenalina (NA; pg/mg tejido) y Dopamina (DA; pg/mg tejido) en la **médula espinal** de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento (A) durante 20 ó 40 días y animales lesionados y posteriormente aislados (AL).

proteína), descenso que era ES ($P < 0,001$) respecto a las series C y S. (Tabla IV, Figura 14)

En cuanto al análisis de los resultados obtenidos para la KD (constante de disociación, nM) no se hallaron diferencias ES entre las Series estudiadas. (Tabla IV)

1.2. Hipocampo

Cuando se estudiaron los resultados de Bmax en el hipocampo se observó que apenas había diferencias entre las distintas series, unicamente se obtuvo un ligero aumento, no significativo, de la Bmax en las series de animales pseudooperados (S), animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d) respecto a los animales de la serie control (C). (Tabla V; Figura 15)

Tampoco se obtuvieron diferencias ES para el otro parámetro estudiado, la KD, siendo todos los valores muy similares para las distintas series. (Tabla V)

1.3. Núcleo estriado

Respecto a los valores de Bmax se observó que dichos valores eran muy similares para las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d), en tanto que se apreció un ligero descenso en el mismo en la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d), aunque no presentaba diferencias ES respecto al resto de las series. (Tabla VI; Figura 16)

Las constantes de disociación (KD) obtenidas para las distintas series eran muy similares, presentando las series de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d) unos valores para la misma ligeramente inferiores a los observados en las series de animales Control (C) y animales pseudooperados (S), no siendo este descenso estadísticamente significativo. (Tabla VI)

1.4. Bulbo raquídeo

El bulbo raquídeo presentó un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,001$) de la Bmax (fmol/mg proteína) en las series de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d) respecto a las series de animales Control (C) y animales pseudooperados (S), presentando estas últimas valores muy similares.

En este caso la serie que presentaba una mayor Bmax fué la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h de realizada la lesión (L1d). (Tabla VII; Figura 17)

TABLA IV

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en el **hipotálamo** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) para las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24h (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	44,66±4,03	2,5±0,25
S	47,00±5,02	1,8±0,19
	*** ●●●	
L1d	25,53±3,02	1,9±0,21
	*** ●●●	
L20d	28,33±2,01	1,8±0,17

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

***p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●●p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

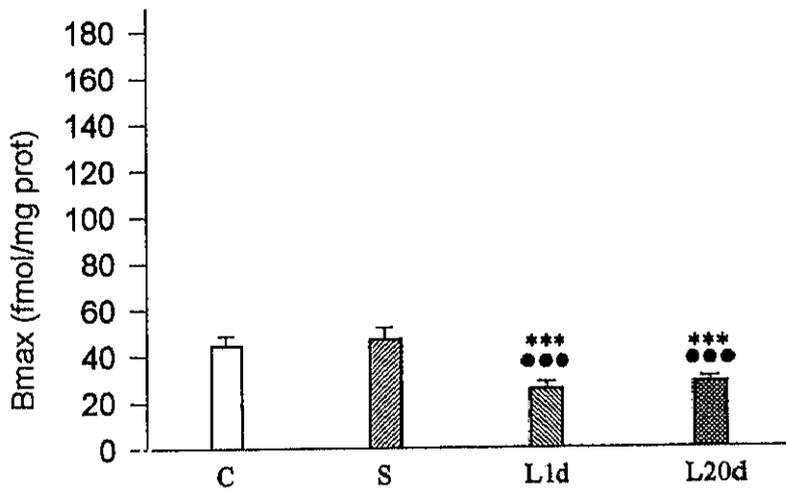


FIGURA 14

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **hipotálamo** en las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

***p<0,001: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●●p<0,001: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

TABLA V

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en el hipocampo para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se les realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24h (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	87,71±9,02	2,5±0,19
S	95,00±10,10	2,3±0,21
L1d	90,47±12,06	2,8±0,30
L20d	90,47±11,03	2,3±0,19

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

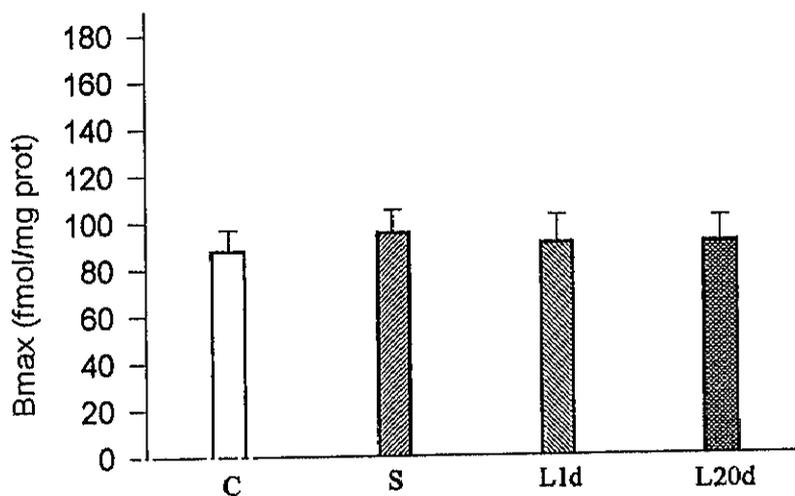


FIGURA 15

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **hipocampo** en las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

TABLA VI

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en el **núcleo estriado** para la **Bmax** (fmol/mg prot) y **KD** (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 h (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d)

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	178,12±15,06	1,7±0,16
S	175,10±17,10	1,8±0,22
L1d	151,06±20,04	1,2±0,17
L20d	166,04±19,03	1,3±0,18

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

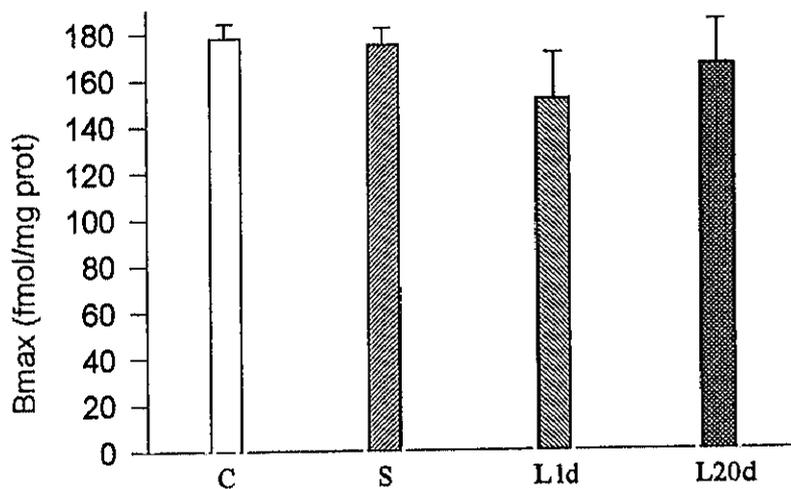


FIGURA 16

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **núcleo estriado** en las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

TABLA VII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en el **bulbo raquídeo** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	60,24±8,06	1,3±0,18
S	65,71±7,04	1,8±0,22
L1d	117,47±15,10	2,7±0,28
L20d	96,38±9,02	2,2±0,25

●●●

●●●

Δ

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$, (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales. ***p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●●p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). Δp<0,05 valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d).

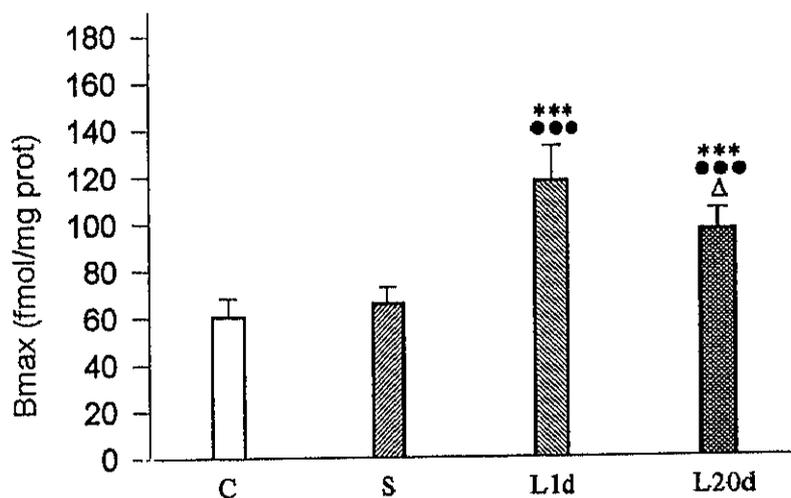


FIGURA 17

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **bulbo raquídeo** en las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

*** $p < 0,001$: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●● $p < 0,001$: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). $\Delta p < 0,05$: valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24 horas (L1d).

Cuando se analizó la KD se observó que no había diferencias ES entre los valores obtenidos para las distintas series. Así mismo, el mayor valor obtenido para la KD fué el de la serie de animales lesionados y sacrificados transcurridas 24h, aunque como se ha señalado anteriormente no se presentaron diferencias ES respecto al resto de las series. (Tabla VII)

1.5. Corteza cerebral

Se encontraron unos valores muy similares para la Bmax (fmol/mg proteína) en los ensayos de fijación al receptor δ para la corteza cerebral en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) y animales lesionados bilateralmente en el HNV con 6OHDA y sacrificados a las 24h (L1d). Además se observó un descenso en la Bmax de la serie de animales lesionados y sacrificados tras 20 días de realizada la lesión (L20d); presentando, así pués, esta serie diferencias ES ($P < 0,01$) respecto de las series de animales control (C) y animales pseudooperados (S) y diferencias estadísticas significativas ($p < 0,001$) respecto de la serie de animales lesionados y sacrificados transcurridas 24h. (Tabla VIII; Figura 18)

Con respecto a la KD (constante de disociación) se obtuvieron unos valores muy similares para todas las series estudiadas no existiendo diferencias ES entre ellas. (Tabla VIII)

1.6. Médula espinal

Al analizar los resultados de Bmax en el caso de la médula espinal se observa un aumento ES en las series de animales lesionados bilateralmente en el HNV con 6OHDA y sacrificados transcurridas 24h (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada dicha lesión (L20d), con respecto a los valores obtenidos para las series de animales control (C) y animales pseudooperados (S). (Tabla IX; Figura 19)

En cuanto a la KD, no se obtienen diferencias ES entre las distintas series, sin embargo se presentan valores ligeramente mayores en las series de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d). (Tabla IX)

2. EFECTO DEL AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES δ OPIOIDES

2.1. Hipotálamo

En el hipotálamo, se obtuvo una Bmax (fmol/mg proteína) en los ensayos de fijación al receptor δ para la serie de animales sometidos a aislamiento (A) que

TABLA VIII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en la **corteza cerebral** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	150,02±17,01	1,4±0,16
S	144,03±13,05	1,6±0,17
L1d	161,08±13,02	1,8±0,19
	** ●● ΔΔΔ	
L20d	106,25±11,06	1,7±0,18

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales. **p<0,01; valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto de la serie de animales lesionados y sacrificados transcurridas 24h (L1d).

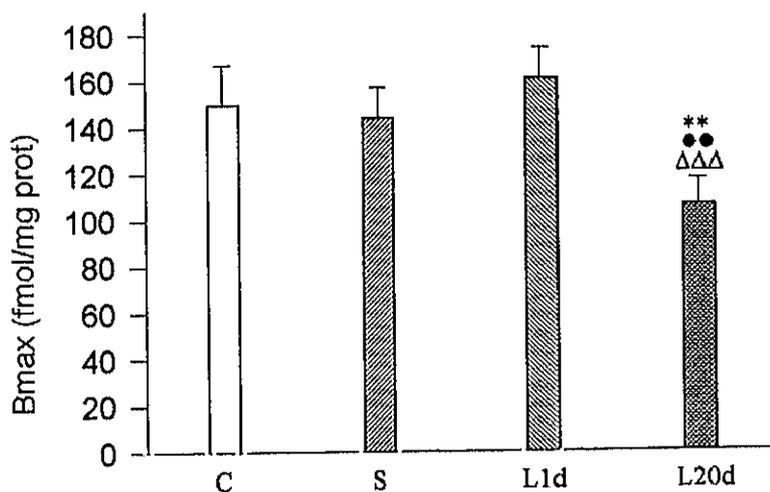


FIGURA 18

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en la corteza cerebral en las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

**p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔΔp<0,001: valores ES respecto de la serie de animales lesionados y sacrificados transcurridas 24 horas (L1d).

TABLA IX

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en la **médula espinal** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	71,87±6,02	1,4±0,19
S	73,70±7,04	1,9±0,22
	*** ●●●	
L1d	113,54±12,10	3,0±0,31
	** ●●	
L20d	104,16±11,08	2,7±0,29

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.
 p<0,01; *p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C).
 ●●p<0,01; ●●●p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

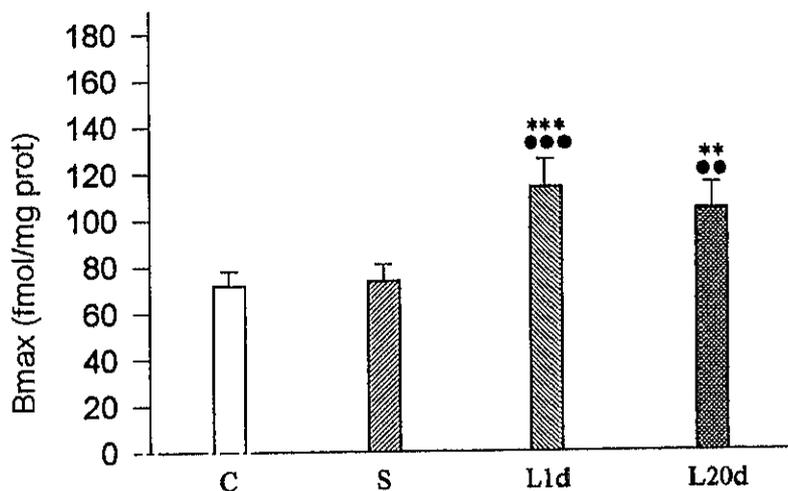


FIGURA 19

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en la **médula espinal** en las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

p<0,01; *p<0,001: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

●●p<0,01; ●●●p<0,001: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

fué, tanto a los 20 como a los 40 días, mayor que la obtenida para la serie de animales control (C) presentando diferencias ES. (Tabla X; Figura 20)

Estudiando los valores obtenidos para la KD (constante de disociación) no se encontraron diferencias ES, ni a 20 ni a 40 días de evolución entre las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A). (Tabla X)

2.2. Hipocampo

En este caso se obtuvo un aumento en la Bmax correspondiente a la serie de animales sometidos a aislamiento (A) que fué estadísticamente significativo ($P < 0,001$) tanto a los 20 como a 40 días de evolución. (Tabla XI; Figura 21)

En cuanto a la otra variable analizada, la KD, no se obtuvieron diferencias ES entre las series estudiadas; presentando ambas unos valores muy similares. (Tabla XI)

2.3. Núcleo estriado

En el núcleo estriado se obtiene un aumento, tanto a los 20 como a los 40 días, para la Bmax de la serie de animales sometidos a aislamiento (A) respecto a la serie de animales control (C), dicho aumento fué ES ($P < 0,001$) a los 40 días de evolución. (Tabla XII; Figura 22)

Respecto a la constante de disociación, KD, no se obtuvieron diferencias ES entre las series estudiadas, presentando, las mismas, resultados similares. (Tabla XII)

2.4. Bulbo raquídeo

En el bulbo raquídeo se observa un aumento, a los 20 días de evolución, en la Bmax correspondiente a la serie de animales sometidos a aislamiento (A) respecto a la serie de animales control, siendo este aumento ES ($P < 0,01$). A 40 días de evolución se obtuvo un ligero aumento en la Bmax correspondiente a la serie A, no siendo ES. (Tabla XIII; Figura 23)

En este caso tampoco se obtienen diferencias estadísticas entre las Series estudiadas con respecto a la constante de disociación (KD). (Tabla XIII)

2.5. Corteza cerebral

Estudiando los valores de Bmax en el caso de la corteza cerebral se observa que esta variable presenta un ligero aumento, tanto a los 20 como a los 40 días de

TABLA X

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al **receptor δ** (binding) en el **hipotálamo** para la **Bmax** (fmol/mg prot) y **KD** (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	44,66±4,02 (5)	2,50±0,25 (5)	31,3±2,40 (5)	1,83±0,16 (5)
	***		***	
L	28,33±2,12 (5)	1,80±0,17 (5)	22,12±1,86 (5)	1,69±0,12 (5)
	*		***	
	ΔΔΔ		ΔΔΔ	
A	51,92±3,24 (5)	1,43±0,12 (5)	46,60±3,20 (5)	2,40±0,18 (5)
	**		*	
	ΔΔ		ΔΔ	
	■■■		■■■	
AL	34,13±1,98 (5)	1,15±0,34 (5)	26,50±17,60 (5)	1,05±0,61 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ΔΔp<0,01; ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L). ■■■p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

() : número de experimentos , en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

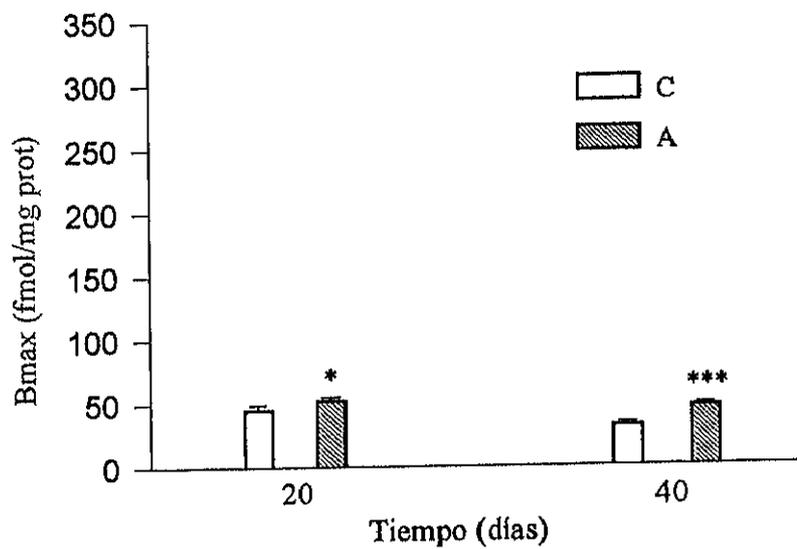


FIGURA 20

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **hipotálamo** para las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

TABLA XI

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en el hipocampo para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L) y animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	87,71±9,64 (5)	2,50±0,19 (5)	60,13±7,20 (5)	2,12±0,22 (5)
L	90,47±11,71 (5)	2,30±0,19 (5)	58,29±8,19 (5)	2,36±0,24 (5)
	*** ΔΔΔ		*** ΔΔΔ	
A	143,82±8,14 (5)	2,60±0,17 (5)	95,30±8,40 (5)	2,40±0,19 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$.

***p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C).

ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

(): número de experimentos , en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

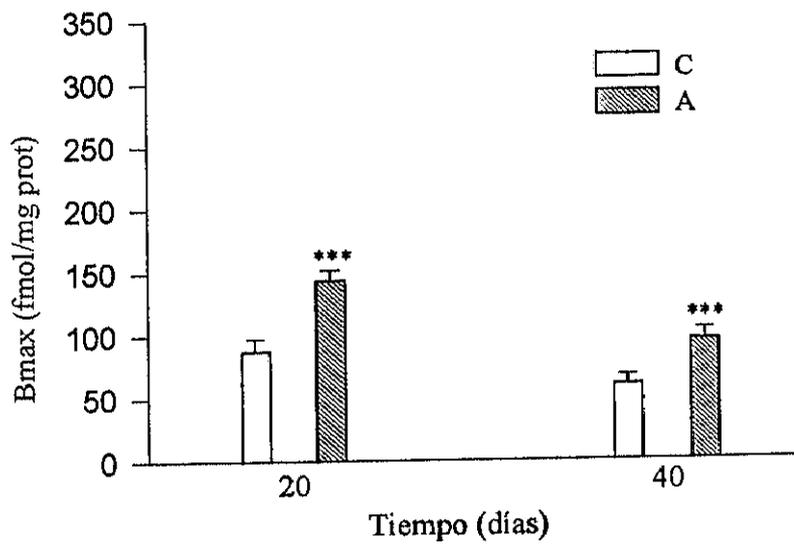


FIGURA 21

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el hipocampo para las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

*** $p < 0,001$: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

TABLA XII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al **receptor δ** (binding) en el **núcleo estriado** para la **Bmax** (fmol/mg prot) y **KD** (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	261,63±27,12 (5)	3,00±0,11 (5)	174,26±15,30 (5)	3,38±0,39 (5)
L	243,82±30,11 (5)	2,30±0,18 (5)	163,49±18,71 (5)	3,54±0,27 (5)
A	^{Δ} 297,24±28,31 (5)	2,83±0,16 (5)	^{$\Delta\Delta$} 225,32±19,92 (5)	3,27±0,32 (5)
AL	^{Δ} ^{■■■} 194,95±24,36 (5)	2,75±0,20 (5)	[■] 184,04±23,06 (5)	3,26±0,27 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$.

**p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales control (C). $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$ valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L). ■ p<0,05; ■■■ p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

(): número de experimentos , en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

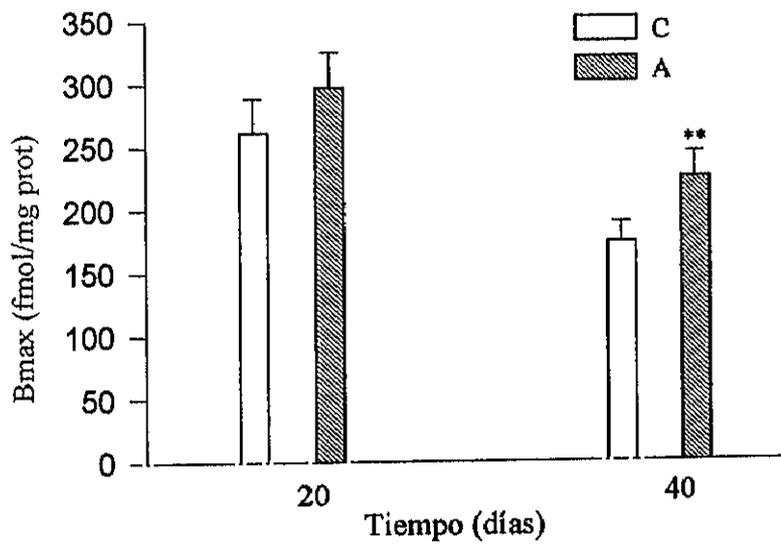


FIGURA 22

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el núcleo estriado para las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

**p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

TABLA XIII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en el bulbo raquídeo para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	48,21±8,12 (5)	2,11±0,26 (5)	39,20±3,12 (5)	2,52±0,21 (5)
	**			
L	76,79±9,22 (5)	2,20±0,21 (5)	44,27±4,56 (5)	2,61±0,18 (5)
	**			
A	74,32±7,37 (5)	2,38±0,28 (5)	43,90±3,80 (5)	2,40±0,19 (5)

	$\Delta\Delta$ ■■		$\Delta\Delta\Delta$ ■■■	
AL	53,43±6,26 (5)	2,00±0,24 (5)	75,62±6,12 (5)	2,85±0,17 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$.

p<0,01; *p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C).
 $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).
 ■■p<0,01; ■■■p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

(): número de experimentos , en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

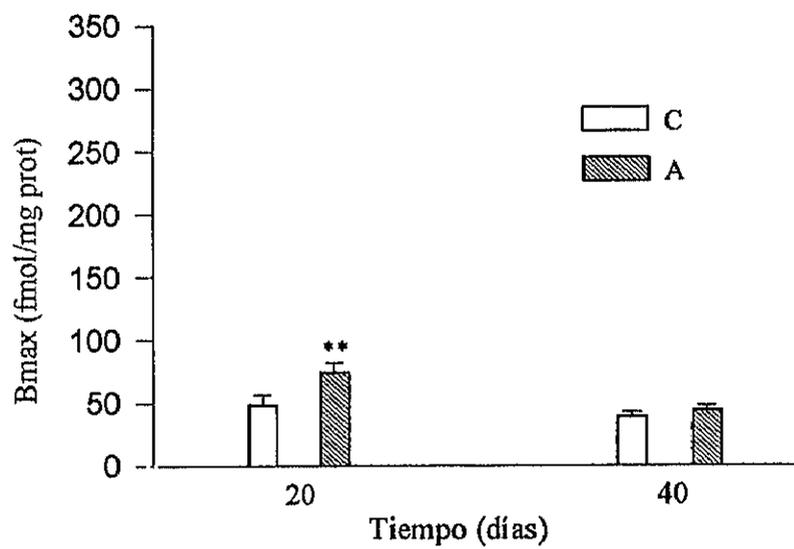


FIGURA 23

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el bulbo raquídeo para las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

**p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

evolución, para la serie de animales sometidos a aislamiento (A) respecto a los valores obtenidos para la serie de animales control (C), no siendo dicha diferencia ES. (Tabla XIV; Figura 24)

Cuando se analizó la K_D (constante de disociación, nM) no se apreciaron diferencias ES entre las series. (Tabla XIV)

2.6. Médula espinal

En este caso, en la B_{max} obtenida en los ensayos de fijación al receptor δ , se obtuvo un aumento, tanto a 20 como a 40 días de evolución, en los valores correspondientes a la serie de animales sometidos a aislamiento (A) con respecto a los obtenidos para la serie de animales control (C), dicho aumento fué ES ($P < 0,01$) a 40 días de evolución. (Tabla XV; Figura 25)

En cuanto a la otra variable analizada, la K_D (constante de disociación) no se encontraron diferencias ES, obteniéndose valores muy similares en las dos series estudiadas. (Tabla XV)

3. EFECTO DE LA LESIÓN CON 6OHDA DEL HAZ NORADRENÉGICO VENTRAL ASOCIADA A AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES δ OPIOIDES.

3.1. Hipotálamo

Estudiando los valores de B_{max} en el hipotálamo se observó que se produce un ligero descenso respecto a la serie de animales control (C), ES, en las series de animales lesionados bilateralmente (L) en el HNV mediante la administración de 6ng de 6OHDA y la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL), tanto a los 20 como a los 40 días.

Para la serie de animales sometidos a aislamiento (A) se obtuvieron unos valores ligeramente mayores a los de la serie de animales control (C), tanto a los 20 como a los 40 días de evolución; al último periodo de tiempo referido los valores presentaban diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$).

También se obtuvieron diferencias ES entre los valores de la B_{max} para las series de animales lesionados (L) y la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) respecto a los valores obtenidos para la serie de animales sometidos a aislamiento (A), la cual presentaba los mayores valores para dicha variable. (Tabla X; Figura 26)

Respecto a la constante de disociación (K_D , nM) no se obtienen diferencias ES entre las distintas series, aunque fueron la serie de animales control (C) a los 20 días y la serie de animales sometidos a aislamiento (A) a los 40 días las que presentaron un mayor valor para dicha constante. (Tabla X)

TABLA XIV

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al **receptor δ** (binding) en la **corteza cerebral** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	232,50±23,12 (5)	2,45±0,20 (5)	170,00±33,02 (5)	2,31±0,31 (5)
	**			
L	164,31±27,23 (5)	2,90±0,16 (5)	162,52±22,33 (5)	2,12±0,22 (5)
	$\Delta\Delta\Delta$			
A	267,24±22,46 (5)	2,46±0,22 (5)	182,23±28,97 (5)	2,62±0,23 (5)
	■■■			
AL	162,72±21,58 (5)	1,03±0,91 (5)	169,34±23,55 (5)	2,89±0,19 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x}\pm DE$.

**p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales control (C). $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L). ■■■p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

(): número de experimentos , en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

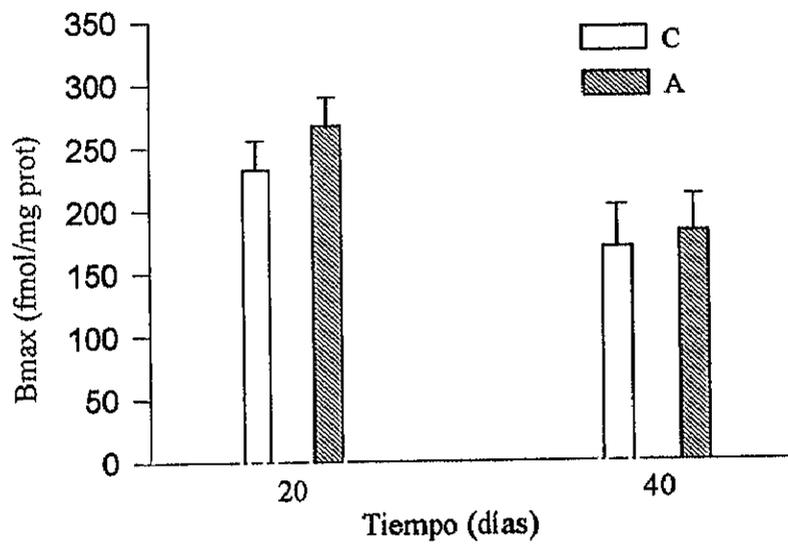


FIGURA 24

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en la corteza cerebral para las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

TABLA XV

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ (binding) en la médula espinal para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	61,21±18,12 (5)	1,27±0,37 (5)	65,1±5,30 (5)	2,47±0,16 (5)
L	88,57±20,62 (5)	2,44±0,28 (5)	73,21±6,18 (5)	2,03±0,21 (5)
A	73,70±19,33 (5)	1,81±0,19 (5)	81,73±6,70 (5)	2,44±0,19 (5)
AL	69,42±16,82 (5)	2,02±0,22 (5)	70,91±4,92 (5)	2,07±0,20 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. **p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ■p<0,05 valores ES respecto a la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

() : número de experimentos realizados, en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 5 animales.

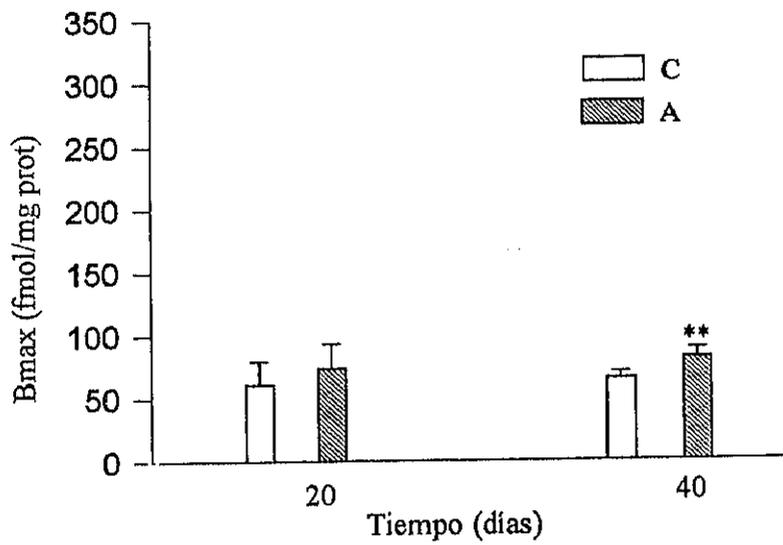


FIGURA 25

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en la médula espinal para las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

**p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

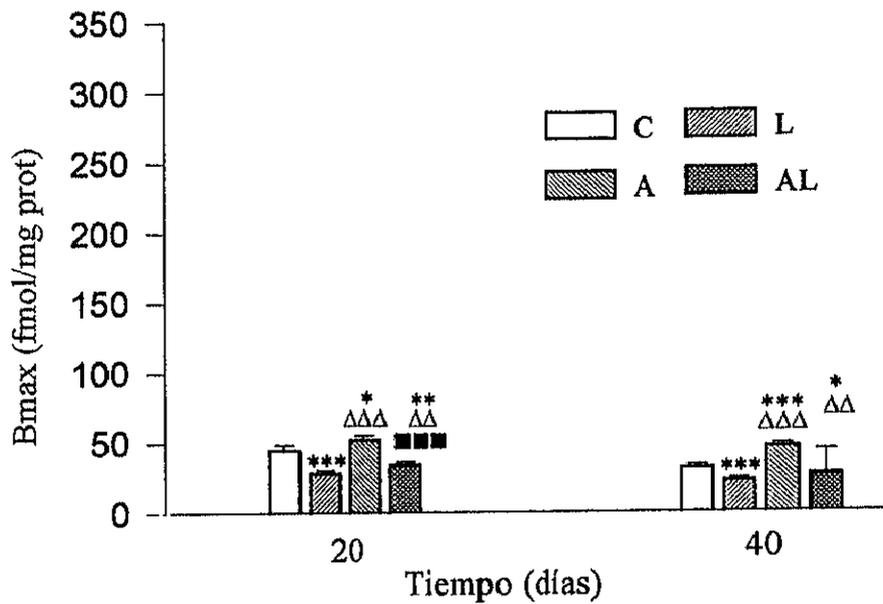


FIGURA 26

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **hipotálamo** para las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales control (C). ΔΔp<0,01; ΔΔΔp<0,001: valores ES respecto de la serie de animales lesionados (L). ■■■p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

3.2. Hipocampo

En los ensayos de fijación al receptor δ realizados en hipocampo se obtuvieron unos valores para la Bmax muy similares en las series de animales control (C) y animales lesionados bilateralmente (L) en el HNV mediante la administración de 6OHDA, no existiendo diferencias ES, tanto a los 20 como a los 40 días. Por su parte, para la serie de animales sometidos a aislamiento se obtuvieron unos valores para la Bmax mayores que presentaban diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) respecto tanto a la serie de animales control (C) como de animales lesionados (L), a 20 ó 40 días. (Tabla XI; Figura 27)

La KD obtenida para las distintas series realizadas fué muy similar para todas ellas sin que se obtuvieran diferencias ES. (Tabla XI)

3.3. Núcleo estriado

Los valores de Bmax obtenidos en los ensayos de fijación al receptor δ en el núcleo estriado se observó que respecto a los valores obtenidos para la serie de animales control, tanto a los 20 como a los 40 días, la serie de animales lesionados (L) presentaba unos valores ligeramente menores, no siendo estadísticamente significativos; la serie de animales sometidos a aislamiento presentaba, por su parte, un aumento en los valores para la Bmax, siendo este aumento ES ($p < 0,01$) a los 40 días y la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento presentaba un descenso ES a los 20 días de evolución, mientras que a los 40 días los valores eran muy similares a los obtenidos en la referida serie de animales control (C).

Tanto a los 20 como a los 40 días, se obtuvieron diferencias ES entre las series de animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL), ya que esta última serie tenía los menores valores para la Bmax. (Tabla XII; Figura 28)

En cuanto a los valores obtenidos para la otra variable estudiada, la KD, no se encontraron diferencias ES entre las distintas series. A los 20 días de evolución los mayores niveles fueron para las series de animales control (C), animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL); siendo los valores en todas ellas muy similares; a 40 días el mayor valor para la KD se obtuvo en la serie de animales lesionados (L). (Tabla XII)

3.4. Bulbo raquídeo

La Bmax en el bulbo raquídeo presentaba un aumento ES a 20 días para las series de animales con lesión bilateral (L) con 6OHDA del HNV y de animales sometidos a aislamiento (A) con respecto al valor obtenido para la serie de animales control; a 40 días las series anteriormente citadas presentaban unos valores muy similares sin diferencias ES.

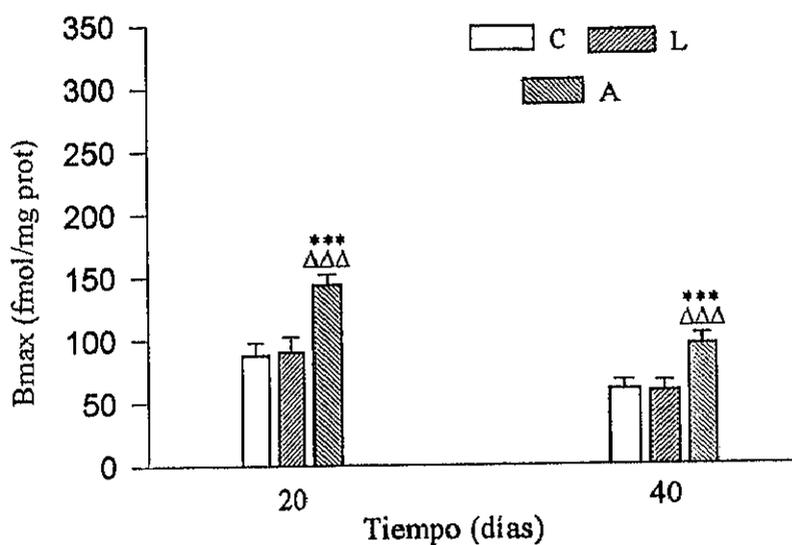


FIGURA 27

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **hipocampo** para las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L) y animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A).

*** $p < 0,001$: valores ES respecto de la serie de animales control (C). $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$: valores ES respecto de la serie de animales lesionados (L).

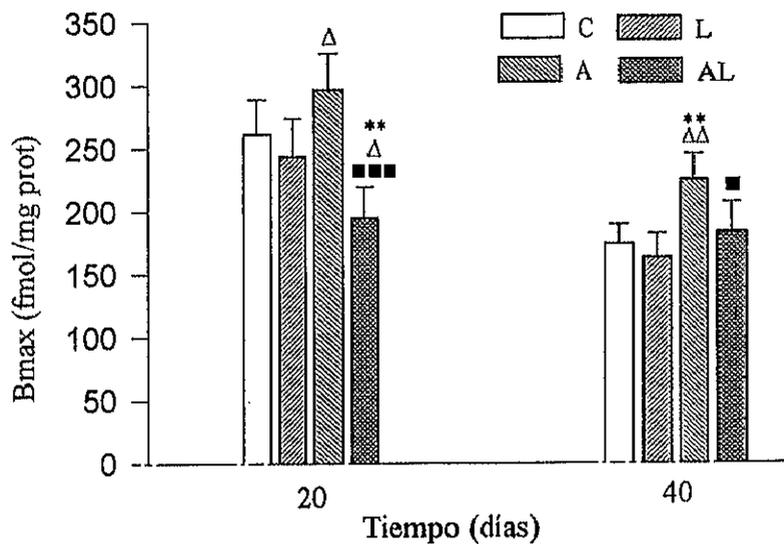


FIGURA 28

Valores para la Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el núcleo estriado para las Series de animales Control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la inoculación de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días y animales aislados y sometidos a aislamiento (AL).

**p<0,01: valores ES respecto a la Serie de animales Control (C). Δ p<0,05;
 $\Delta\Delta$ p<0,01: valores ES respecto a la Serie de animales lesionados (L). \blacksquare p<0,05;
 $\blacksquare\blacksquare\blacksquare$ p<0,001: valores ES respecto a la Serie de animales sometidos a aislamiento (A).

La serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) tenía un valor muy similar al obtenido para la serie de animales control (C) a 20 días de evolución, mientras que a 40 días se observaba un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,001$) respecto tanto a dicha serie control, como al resto de las series estudiadas.

(Tabla XIII; Figura 29)

Respecto a la constante de disociación (KD) no se encontraron diferencias ES entre las distintas series. A 20 días, la serie que presentó un valor mayor para dicha constante fué la serie de animales sometidos a aislamiento (A) y la que presentó un menor valor fué la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL), mientras que a 40 días fué a la inversa, la serie con mayor valor para la KD fué la de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) y la serie con un menor valor para dicha constante fué la serie de animales sometidos a aislamiento (A). (Tabla XIII)

3.5. Corteza cerebral

A 20 días de evolución, respecto a la serie de animales control, se observa un aumento para la serie de animales sometidos a aislamiento, que no fué estadísticamente significativo, mientras que se produce un descenso en las series de animales lesionados bilateralmente en el HNV con 6OHDA y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

A 40 días, aunque las series siguen una pauta similar a la descrita para 20 días de evolución, los valores son muy similares no obteniéndose diferencias ES. (Tabla XIV; Figura 30)

Con respecto a la KD, no se obtienen diferencias ES entre las distintas series. A 20 días el mayor valor para la KD se obtiene para la serie de animales lesionados (L), y el menor valor para la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL); mientras que a 40 días de evolución sucede al contrario. (Tabla XIV)

3.6. Médula espinal

En la Bmax de la médula espinal, con respecto a la serie de animales control (C) se obtienen en el resto de las series unos valores muy similares aunque ligeramente mayores, tanto a los 20 como a los 40 días. La serie de animales sometidos a aislamiento (A), a los 40 días, fué la única que presentó diferencias ES ($P < 0,01$) respecto a la serie de animales control (C). (Tabla XV; Figura 31)

En cuanto a la otra variable analizada, la constante de disociación (KD) no se encontraron diferencias ES entre las series. A los 20 días el valor mayor se obtuvo para la serie de animales lesionados (L) y el menor para la serie de animales control (C), mientras que a los 40 días los mayores valores para la KD se obtuvieron para la serie de animales control y la serie de animales sometidos a

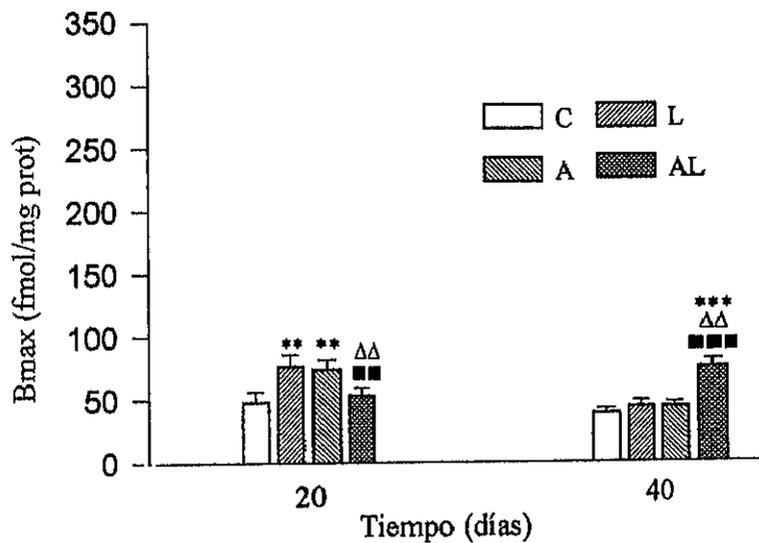


FIGURA 29

Valores de B_{max} (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en el **bulbo raquídeo** para las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

p<0,01; *p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales control (C).
 $\Delta\Delta$ p<0,01; $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales lesionados (L).
 $\blacksquare\blacksquare$ p<0,01; $\blacksquare\blacksquare\blacksquare$ p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

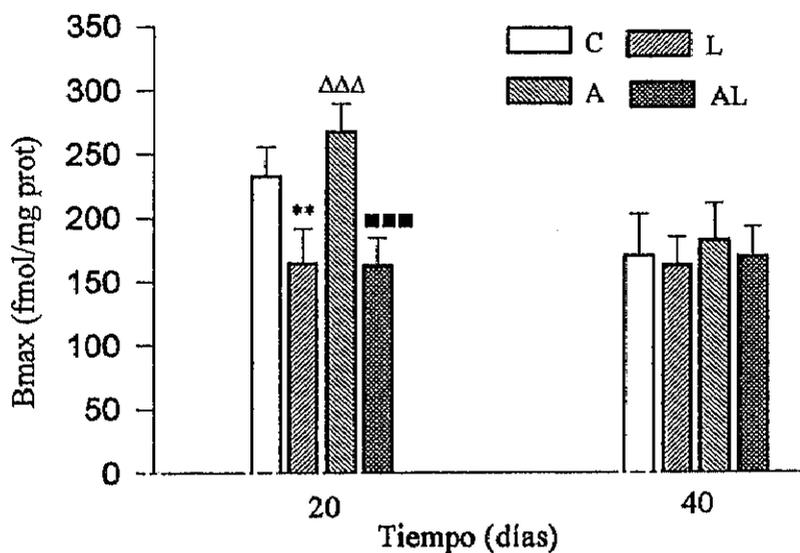


FIGURA 30

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en la corteza cerebral para las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

**p<0,01: valores ES respecto de la serie de animales control (C). $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales lesionados (L). ■■■p<0,001: valores ES respecto de la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

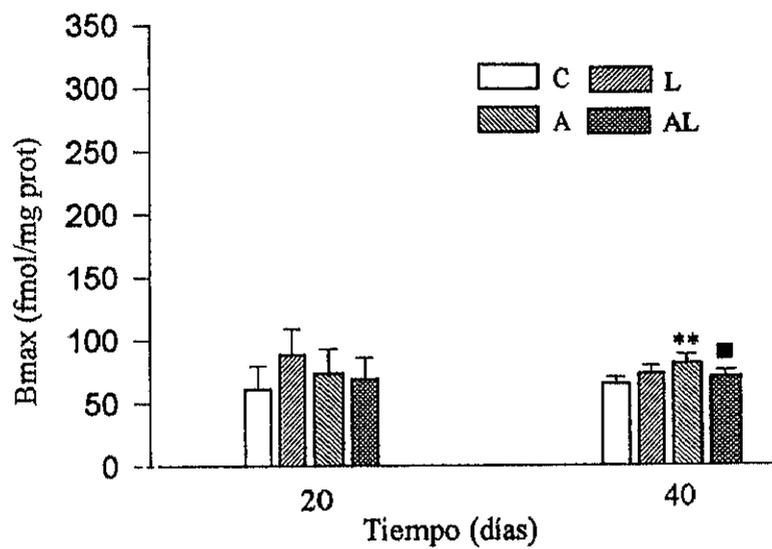


FIGURA 31

Valores de **Bmax** (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor δ en la **médula espinal** para las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

**p<0,01: valores ES respecto de la serie de animales control (C). ■p<0,05: valores ES respecto de la serie de animales sometidos a aislamiento (A).

aislamiento y los menores se obtuvieron para las series de animales lesionados (L) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL). (Tabla XV)

V. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL RECEPTOR μ OPIOIDE.

1. EFECTO DE LA LESIÓN BILATERAL DEL HNV CON 6OHDA SOBRE LOS RECEPTORES μ OPIOIDES

1.1. Hipotálamo

Con respecto a la Bmax (fmol/mg proteína) obtenida en los ensayos de fijación al receptor μ en el hipotálamo se obtiene un aumento en los valores de las series de animales lesionados en el HNV mediante la inoculación de 6OHDA y sacrificados a las 24h (L1d) y de animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada dicha lesión (L20d) con respecto a los valores obtenidos para las series de animales control (C) y animales pseudooperados (S), presentando diferencias ES ($P < 0,05$). (Tabla XVI; Figura 32)

En cuanto a la constante de disociación (KD) se obtuvieron unos valores muy similares para las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) y animales lesionados en el HNV mediante la inoculación de 6OHDA y sacrificados tras 20 días de evolución (L20d), mientras que se obtuvo una elevación en el valor correspondiente a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h, obtuyéndose diferencias ES respecto a las series de animales control (C) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días. (Tabla XVI)

1.2. Hipocampo

Para la Bmax en el hipocampo no se encuentran diferencias ES entre los valores obtenidos en las distintas series estudiadas, siendo todos ellos muy similares. (Tabla XVII; Figura 33)

Tampoco se encontraron para la KD (constante de disociación) diferencias ES entre las diferentes series. (Tabla XVII)

1.3. Núcleo estriado

En el núcleo estriado se obtuvo una Bmax (fmol/mg proteína) muy similar en la serie de animales control (C), la serie de animales pseudooperados (S) y la serie de animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d). Si se obtuvo un menor valor, con respecto a las series antes mencionadas, de la serie de animales

TABLA XVI

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el **hipotálamo** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	157,05±18,93	2,39±0,12
S	163,20±22,54	2,50±0,16
	*	***
L1d	200,23±20,32	2,96±0,15
	*	ΔΔ
L20d	190,26±19,55	2,44±0,16

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales. *p<0,05; ***p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●p<0,05 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔp<0,01 valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados pasadas 24h (L1d).

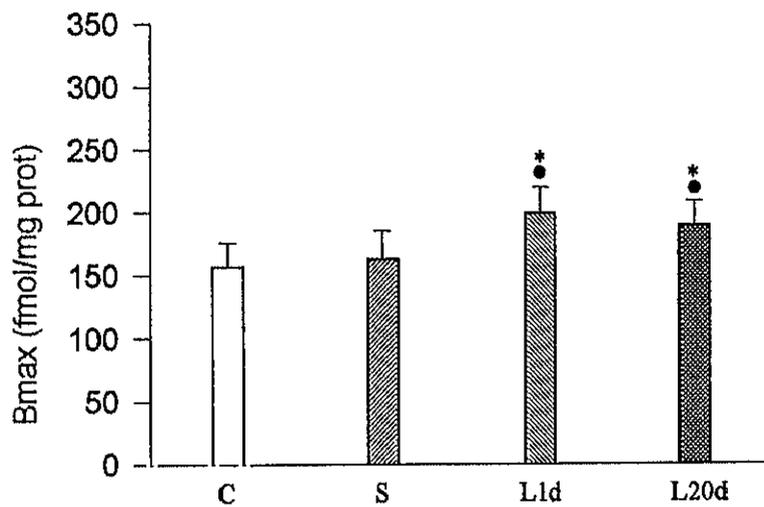


FIGURA 32

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el hipotálamo para las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

*p<0,05: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●p<0,05: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

TABLA XVII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el **hipocampo** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	184,22±26,53	0,44±0,16
S	187,35±28,61	0,46±0,15
L1d	197,51±25,34	0,42±0,13
L20d	201,66±28,77	0,50±0,18

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales señaladas de 4 animales.

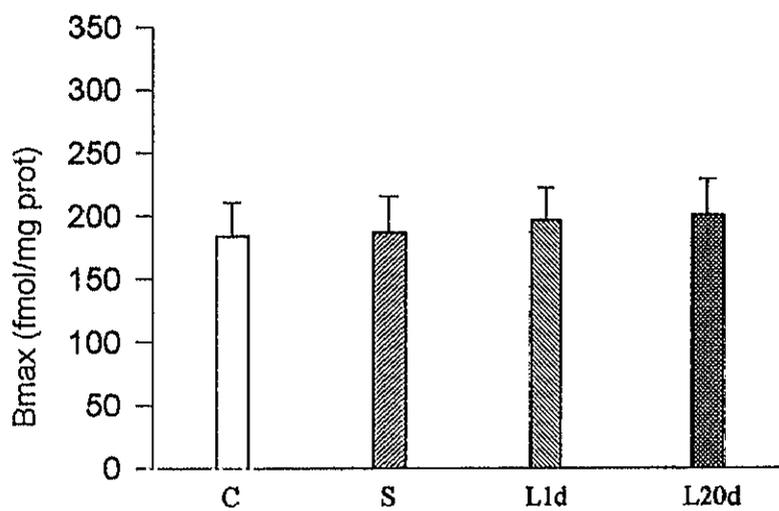


FIGURA 33

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **hipocampo** para las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

lesionados y sacrificados a las 24h, diferencia que fué ES ($p < 0,001$). (Tabla XVIII; Figura 34)

con respecto a la K_D , no se hallaron diferencias ES entre las series estudiadas. El menor valor obtenido para dicha constante fué el de la serie de animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada dicha lesión. (Tabla XVIII)

1.4. Bulbo raquídeo

Para el bulbo raquídeo en los ensayos de fijación al receptor μ se obtiene una B_{max} muy similar en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días (L20d), mientras que se encuentra un valor mayor para la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h, presentando diferencias ES respecto a las demás series citadas. (Tabla XIX; Figura 35)

En cuanto a la constante de disociación (K_D) no se encontraron diferencias ES entre las series estudiadas. Tanto la serie de animales control (C), animales pseudooperados (S) y animales lesionados y sacrificados a las 24h presentaban unas K_D muy similar, siendo la K_D de la serie de animales lesionados y sacrificados a los 20 días algo menor. (Tabla XIX)

1.5. Corteza cerebral

En la B_{max} obtenida en los ensayos de unión al receptor μ en la corteza cerebral no se encontraron diferencias ES entre las distintas series analizadas, presentando todas ellas valores muy similares. (Tabla XX; Figura 36)

Tampoco se encontraron diferencias ES en la K_D de las diferentes series. La serie que presentaba la mayor K_D fué la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d). El resto de las series presentaban unos valores muy similares y algo inferiores al de la serie L1d. (Tabla XX)

1.6. Médula espinal

En este caso tanto la serie de animales control (C), como la serie de animales pseudooperados (S) presentaban unos valores muy similares para la B_{max} . La serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h tenía un valor mayor que en el caso de las series antes citadas y presentaban diferencias ES con las mismas ($p < 0,01$). La serie de animales lesionados y sacrificados a los 20 días tenía un valor ligeramente mayor que la serie de animales control y que la serie de animales pseudooperados, con los que mostraba diferencias ES. (Tabla XXI; Figura 37)

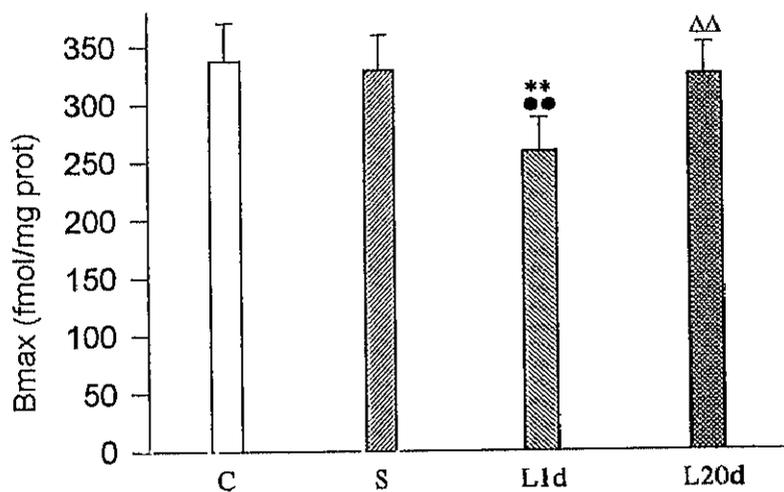


FIGURA 34

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el núcleo estriado para las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

**p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔp<0,01: valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24 horas (L1d).

TABLA XVIII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el **núcleo estriado** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	338,11±32,31	1,31±0,20
S	329,62±30,54	1,28±0,60
	** ●●	
L1d	259,18±28,91	1,33±0,23
	ΔΔ	
L20d	326,02±26,77	1,19±0,29

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizados, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales.

**p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●●p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔp<0,01 valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d).

TABLA XIX

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el **bulbo raquídeo** para la **Bmax** (fmol/mg prot) y **KD** (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	280,51±32,10	1,34±0,17
S	284,10±35,60	1,30±0,20
	*	
	●	
L1d	344,52±28,30	1,20±0,16
	ΔΔΔ	
L20d	250,26±30,20	1,16±0,18

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizado, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales.

*p<0,05 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●p<0,05 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔΔp<0,001 valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24h (L1d).

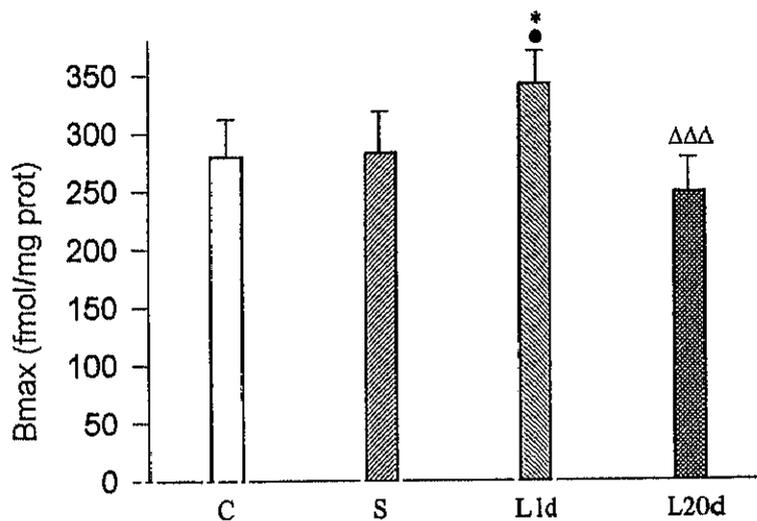


FIGURA 35

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **bulbo raquídeo** para las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

*p<0,05: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●p<0,05: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S). ΔΔΔp<0,001: valores ES respecto a la serie de animales lesionados y sacrificados a las 24 horas (L1d).

TABLA XX

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) de la corteza cerebral para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	185,88±30,53	0,81±0,2
S	188,46±24,62	0,84±0,33
L1d	191,33±28,97	1,13±0,32
L20d	225,00±26,32	0,97±0,18

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizados; para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales.

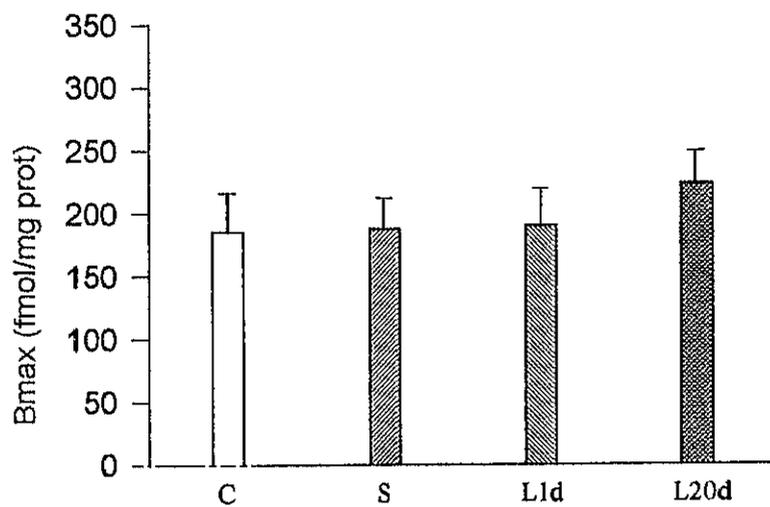


FIGURA 36

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en la corteza cerebral para las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

TABLA XXI

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en la **medula espinal** para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales pseudooperados (S) a los que se realiza la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral, animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y que fueron sacrificados pasadas 24 horas (L1d) y animales con lesión de dicho haz que fueron sacrificados a los 20 días de la lesión (L20d).

	Bmax (fmol/mg prot) (n=5)	KD (nM) (n=5)
C	173,82±20,50	1,10±0,37
S	180,10±22,60	1,20±0,40
L1d	232,49±23,32	1,20±0,50
L20d	220,62±24,51	1,15±0,47

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. (n=): número de experimentos realizados, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales.

*p<0,05; **p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●p<0,05; ●●p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

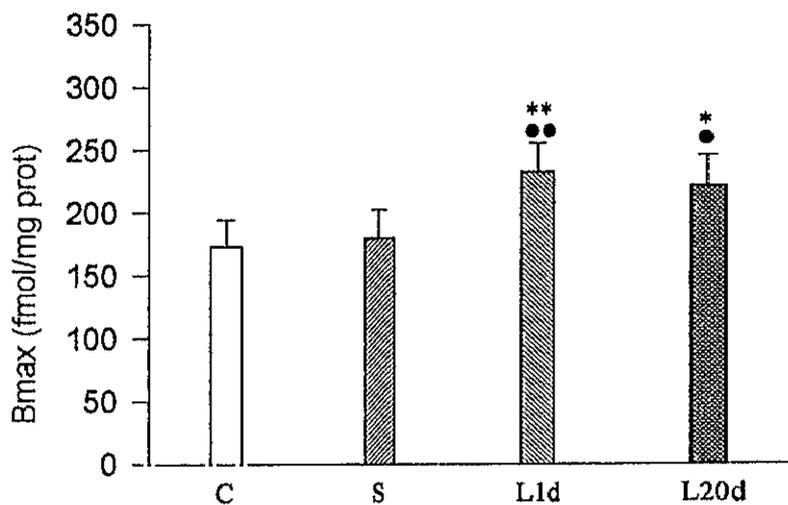


FIGURA 37

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en la **médula espinal** para las series de animales control (C), animales pseudooperados mediante la administración bilateral de vehículo (ácido ascórbico) en el haz noradrenérgico ventral (S), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA y sacrificados a las 24 horas (L1d) y animales lesionados y sacrificados a los 20 días de realizada la lesión (L20d).

*p<0,05; **p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C). ●p<0,05; ●●p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales pseudooperados (S).

En cuanto a la constante de disociación (K_D) no se encontraron, entre ninguna de las series estudiadas, diferencias ES, presentando todas ellas valores muy similares. (Tabla XXI)

2. EFECTO DEL AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES μ OPIOIDES

2.1. Hipotálamo

En la B_{max} obtenida en los ensayos de fijación al receptor μ , en la serie de animales sometidos a aislamiento (A) se obtiene un aumento respecto a la serie de animales control (C), tanto a los 20 como a los 40 días de evolución, encontrándose diferencias ES ($p < 0,05$) a los 40 días. (Tabla XXII; Figura 38)

Para la K_D no se obtuvieron diferencias ES entre la serie de animales control y la serie de animales sometidos a aislamiento. (Tabla XXII)

2.2. Hipocampo

Respecto a la B_{max} (fmol/mg proteína) obtenida para el hipocampo en los ensayos de fijación al receptor μ , se obtuvo en la serie de animales sometidos a aislamiento una elevación de la misma tanto a los 20 como a los 40 días respecto a los valores obtenidos para la serie de animales control (C), elevación que fué ES a 20 días de evolución. (Tabla XXIII; Figura 39)

En cuanto a la constante de disociación no se encontraron diferencias ES entre las series estudiadas. (Tabla XXIII)

2.3. Núcleo estriado

En la B_{max} (fmol/mg proteína) correspondiente al núcleo estriado se obtuvo un ligero aumento no significativo, a 40 días de evolución, de la serie de animales sometidos a aislamiento (A) respecto a la serie de animales control (C), a 20 días los valores obtenidos para estas series eran muy similares. (Tabla XXIV; Figura 40)

En cuanto a la K_D (constante de disociación) no se obtienen diferencias ES entre dichas series. A los 20 días de evolución la serie de animales sometidos a aislamiento presentó una K_D algo mayor que la de la serie de animales control, sin embargo a los 40 días sucedía lo contrario, siendo mayor el valor correspondiente a la serie de animales control. (Tabla XXIV)

TABLA XXII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el hipotálamo para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	326,52±45,3 (5)	1,94±0,32 (5)	290,00±52,6 (5)	1,94±0,27 (5)
L	344,79±48,6 (5)	1,79±0,38 (5)	440,06±62,70 (5)	1,88±0,30 (5)
A	381,67±42,50 (5)	2,05±0,22 (5)	392,07±59,8 (5)	1,88±0,29 (5)
AL	391,69±50,80 (5)	2,05±0,18 (5)	363,53±43,80 (5)	1,99±0,33 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. *p<0,05; **p<0,01 valores ES respecto de la serie de animales control (C).

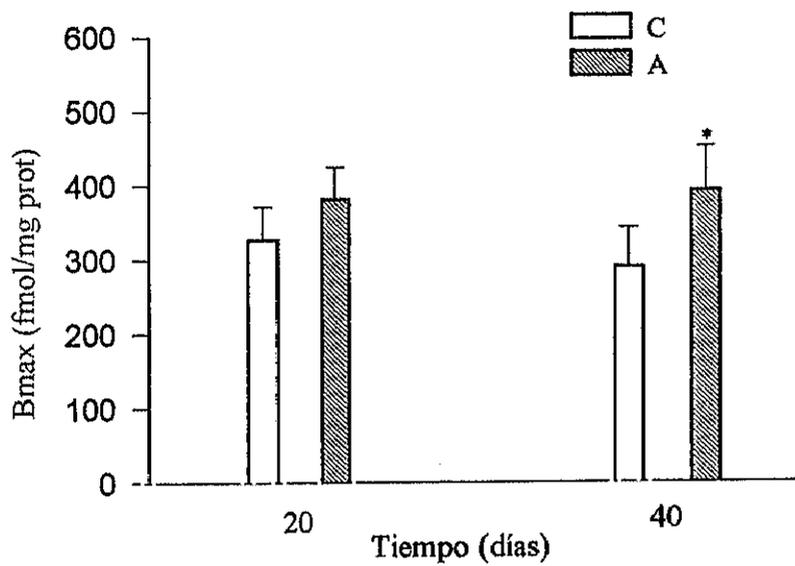


FIGURA 38

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **hipotálamo** en las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días.

* $p < 0,05$: valores ES respecto de la serie de animales control (C).

TABLA XXIII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el hipocampo para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	226,32±26,60 (5)	1,53±0,36 (5)	201,14±23,4 (5)	1,15±0,27 (5)
L	196,05±22,4 (5)	1,56±0,42 (5)	229,12±36,20 (5)	0,99±0,31 (5)
	*			
	ΔΔ			
A	288,25±30,60 (5)	1,41±0,34 (5)	270,61±32,60 (5)	0,90±0,30 (5)
	*			
	ΔΔ			
AL	271,86±21,6 (5)	1,19±0,29 (5)	283,05±43,2 (5)	0,92±0,29 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. * $p < 0,05$ valores ES respecto a la serie de animales control (C). $\Delta\Delta p < 0,01$ valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

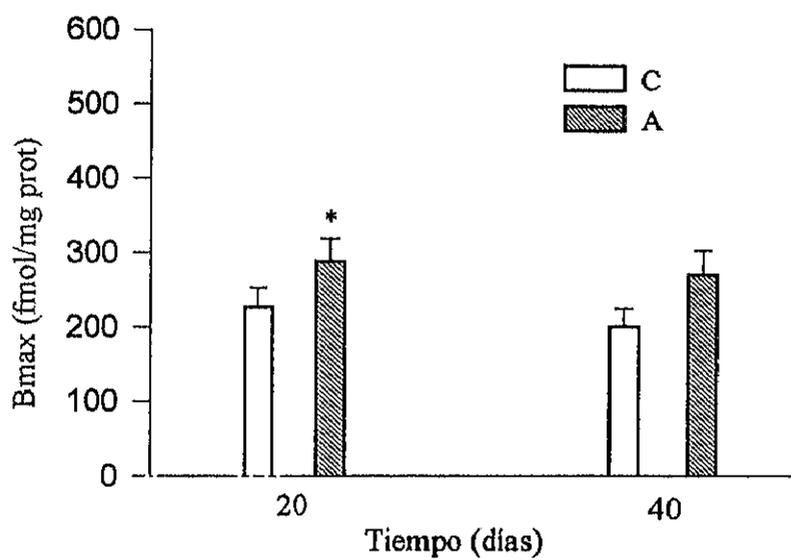


FIGURA 39

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **hipocampo** en las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

* $p < 0,05$: valores ES respecto a la Serie Control (C).

TABLA XXIV

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el núcleo estriado para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	394,77±40,5 (5)	1,29±0,72 (5)	414,26±48,65 (5)	1,22±0,60 (5)
			*	
L	365,64±36,26 (5)	1,71±0,53 (5)	508,73±50,60 (5)	1,80±0,57 (5)
			*	
A	390,4±40,25 (5)	2,88±1,23 (5)	467,87±44,3 (5)	0,94±0,62 (5)
			*	
AL	428,96±52,5 (5)	1,18±0,62 (5)	522,82±55,60 (5)	1,20±0,59 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. *p<0,05 valores ES respecto a la serie de animales control (C).

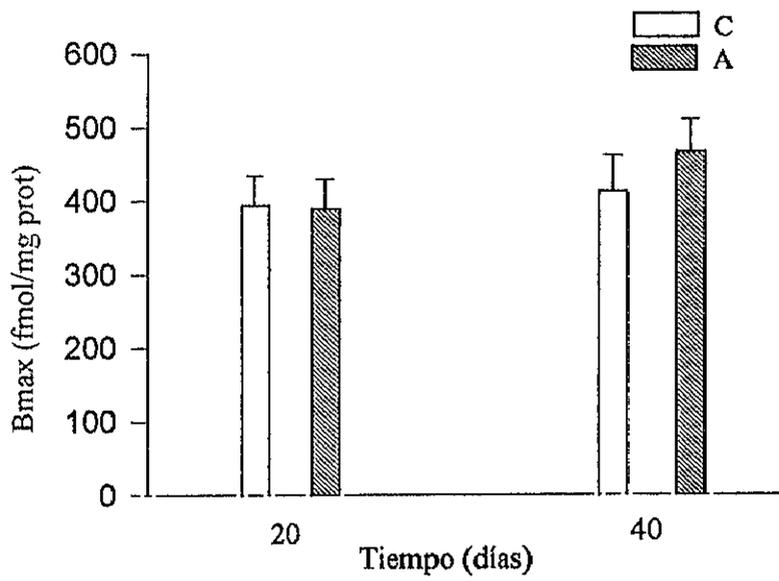


FIGURA 40

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **núcleo estriado** en las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

2.4. Bulbo raquídeo

En los ensayos de fijación al receptor μ en el bulbo raquídeo se obtuvo una B_{max} que fué en la serie de animales sometidos a aislamiento (A) ligeramente menor a los 20 días de evolución y ligeramente mayor a los 40 días respecto a los valores obtenidos para la serie de animales control (C), sin que se dieran diferencias ES entre ellos. (Tabla XXV; Figura 41)

Con respecto a la otra variable analizada, la K_D , no se encontraron diferencias ES entre las series estudiadas. A los 20 días de evolución la serie de animales sometidos a aislamiento (A) tenía un menor valor para la K_D que el obtenido en la serie de animales control, aunque como se ha señalado antes, no se encontraron diferencias ES. A 40 días los valores para la K_D en ambas series fué muy similar (Tabla XXV)

2.5. Corteza cerebral

Para la B_{max} obtenida en los ensayos de fijación al receptor μ en la corteza cerebral, a los 20 días de evolución se obtuvieron unos valores muy similares tanto para la serie de animales control como la serie de animales sometidos a aislamiento; a los 40 días de evolución ya se observa un mayor valor para la B_{max} en la serie de animales sometidos a aislamiento, ES ($p < 0,01$), respecto al valor obtenido en la serie de animales control. (Tabla XXVI; Figura 42)

En cuanto a la constante de disociación, no se encontraron, ni a 20 ni a 40 días de evolución, diferencias ES entre ambas series. A 20 días de evolución el mayor valor para la K_D lo presentaba la serie de animales control (C), mientras que a 40 días los valores para la K_D en ambas series fueron muy similares. (Tabla XXVI)

2.6. Médula espinal

En la médula espinal no se encontraron apenas variaciones entre los resultados obtenidos en la B_{max} (fmol/mg proteína) entre las series de animales control y animales sometidos a aislamiento, tanto a los 20 como a los 40 días de evolución. (Tabla XXVII; Figura 43)

Respecto a la constante de disociación, K_D , no se encontraron diferencias ES entre ambas series. A los 20 días de evolución, la serie que tenía una mayor K_D era la serie de animales sometidos a aislamiento (A), mientras que a 40 días de evolución los valores de la K_D en ambas series fueron muy similares. (Tabla XXVII)

TABLA XXV

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en el bulbo raquídeo para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	230,54±30,80 (5)	3,18±0,91 (5)	210,00±36,90 (5)	1,12±0,99 (5)
			**	
L	227,77±35,60 (5)	3,80±0,88 (5)	355,63±46,20 (5)	1,86±1,34 (5)
			$\Delta\Delta$	
A	195,00±28,63 (5)	1,98±1,22 (5)	240,11±48,25 (5)	1,16±0,77 (5)
			$\Delta\Delta$	
AL	212,45±32,48 (5)	2,51±1,12 (5)	244,26±34,60 (5)	1,18±0,87 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x}\pm DE$. **p<0,01 valores ES respecto a la serie de animales control (C). $\Delta\Delta p<0,01$ valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

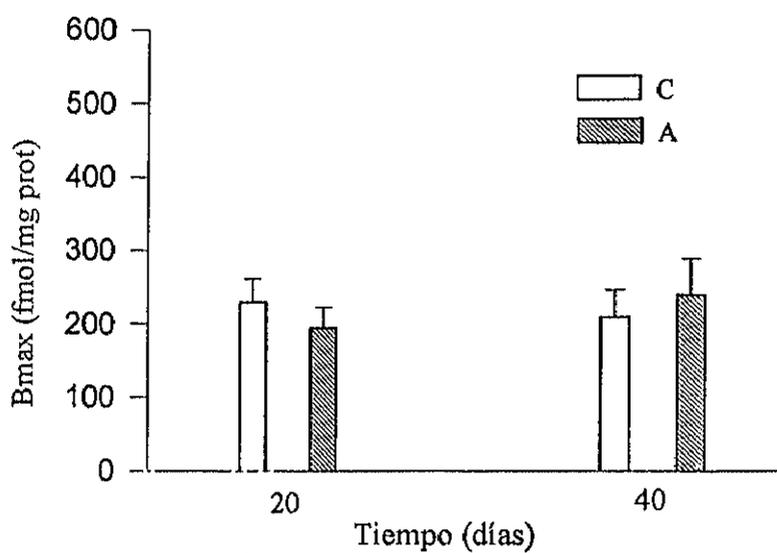


FIGURA 41

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **bulbo raquídeo** en las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

TABLA XXVI

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en la corteza cerebral para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	252,86±20,61 (5)	1,82±0,24 (5)	273,08±21,10 (5)	1,14±0,26 (5)

L	252,80±22,30 (5)	1,17±0,38 (5)	398,16±42,50 (5)	1,23±0,21 (5)
			**	
A	250,79±20,60 (5)	1,26±0,42 (5)	382,11±40,10 (5)	1,16±0,42 (5)
			**	
AL	257,47±24,50 (5)	1,14±0,37 (5)	$\Delta\Delta\Delta$ 347,08±35,60 (5)	0,97±0,56 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x}\pm DE$. **p<0,01; ***p<0,001 valores ES respecto a la serie de animales control (C). $\Delta\Delta\Delta p<0,001$ valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

(): número de experimentos realizados, para cada experimento se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales.

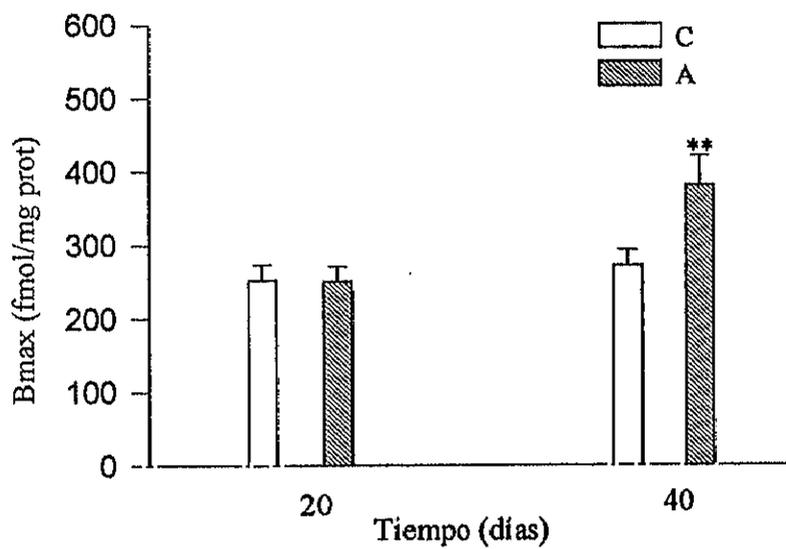


FIGURA 42

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en la corteza cerebral en las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

**p<0,01; valores ES respecto a la serie de animales control (C).

TABLA XXVII

Valores obtenidos en los ensayos de fijación al receptor μ (binding) en la médula espinal para la Bmax (fmol/mg prot) y KD (nM) en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA (L), animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

	20 días		40 días	
	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KD (nM)
C	160,48±21,80 (5)	2,73±0,29 (5)	190,15±32,5 (5)	1,62±0,27 (5)
L	171,63±23,20 (5)	2,59±0,33 (5)	243,47±35,90 (5)	1,88±0,33 (5)
A	168,33±20,50 (5)	3,24±0,42 (5)	200,23±32,6 (5)	1,60±0,28 (5)
AL	172,58±23,90 (5)	3,04±0,36 (5)	187,81±28,70 ^Δ (5)	1,48±0,37 (5)

Los resultados obtenidos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. $\Delta p < 0,05$ valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

(): número de experimentos , en cada uno se utilizan las estructuras cerebrales de 4 animales.

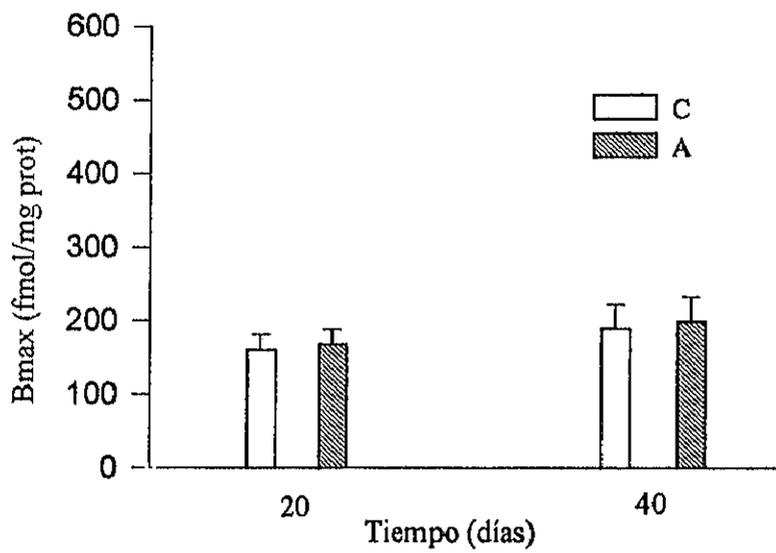


FIGURA 43

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en la **médula espinal** en las series de animales control (C) y animales sometidos a aislamiento (A) durante un periodo de 20 ó 40 días.

3. EFECTO DE LA LESIÓN CON 6OHDA DEL HAZ NORADRENÉRGICO VENTRAL ASOCIADO A AISLAMIENTO SOBRE LOS RECEPTORES μ OPIOIDES

3.1. Hipotálamo

En los ensayos de fijación al receptor μ en el hipotálamo se obtuvo a los 20 días de evolución, respecto a la Bmax (fmol/mg proteína), un ligero aumento respecto al valor obtenido para la serie de animales control de las series de animales lesionados (L), animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL), aunque no se encuentran diferencias ES.

A los 40 días se obtuvo un mayor valor para la Bmax en todas las series estudiadas respecto al obtenido en la serie de animales control, siendo este aumento ES para las series de animales lesionados (L) y animales sometidos a aislamiento (A). (Tabla XXII; Figura 44)

Respecto a la constante de disociación, no se encontraron diferencias ES entre las series estudiadas obteniéndose para todas ellas unos valores muy similares tanto a los 20 como a los 40 días de evolución. (Tabla XXII)

3.2. Hipocampo

Con respecto a la Bmax a los 20 días la serie de animales lesionados (L) presenta un valor ligeramente menor que el obtenido para la serie de animales control (C); las series de animales sometidos a aislamiento (A) y de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) tenían por el contrario un mayor valor, mostrando diferencias ES ($p < 0,05$) respecto al obtenido para la serie de animales control (C); también las citadas series (A y AL) presentaban diferencias ES ($p < 0,01$) respecto a la serie de animales lesionados (L). (Tabla XXIII; Figura 45)

Al analizar la otra variable estudiada, la constante de disociación, KD, no se obtuvieron diferencias ES entre las distintas series realizadas. A los 20 días de evolución la serie que mostraba un valor menor era la de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) mientras que el resto de las series presentaban unos valores muy similares; a 40 días de evolución el mayor valor lo tenía la serie de animales control (C), mientras que el resto de las series tenían unos valores ligeramente menores y muy similares entre ellos. (Tabla XXIII)

3.3. Núcleo estriado

Si se analizan los resultados obtenidos para la Bmax en el núcleo estriado en los ensayos de fijación al receptor μ se observa, a los 20 días de evolución, para la serie de animales lesionados (L) un ligero descenso con respecto al valor obtenido para la serie de animales control (C), la serie de animales sometidos a aislamiento (A) presentaba un valor muy similar al obtenido en la serie de animales

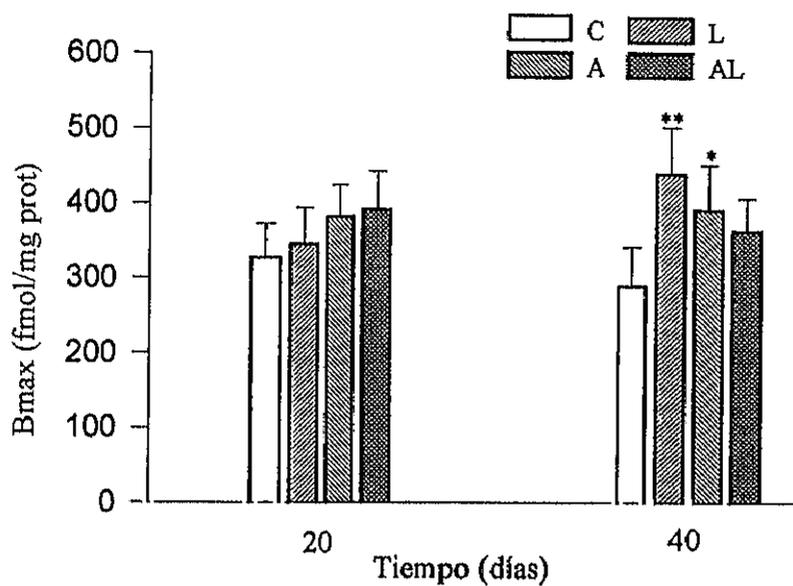


FIGURA 44

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el **hipotálamo** en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

*p<0,05; **p<0,01: valores ES respecto de la serie de animales control (C).

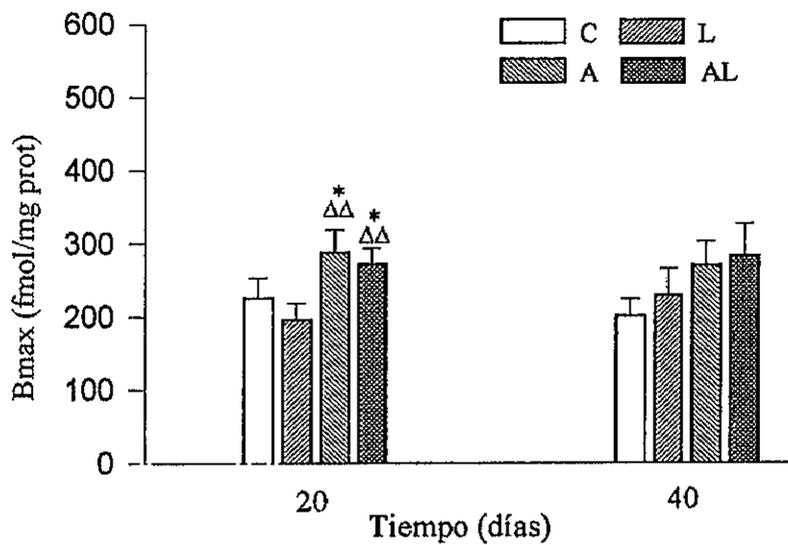


FIGURA 45

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el hipocampo en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

* $p < 0,05$: valores ES respecto a la serie control (C). $\Delta\Delta p < 0,01$: valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

control, mientras que en la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento se observó un ligero aumento respecto a dicha serie control (C).

A 40 días de evolución, se observa un aumento respecto al valor obtenido en la serie de animales control, de las series de animales lesionados (L), animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL); dicho aumento fué ES ($p < 0,05$) para las series L y AL respecto a la serie de animales control (C). (Tabla XXIV; Figura 46)

En cuanto a la KD, constante de disociación, no se encuentran diferencias ES entre las diferentes series realizadas. A los 20 días de evolución el mayor valor para la KD la presentaba la serie de animales sometidos a aislamiento (A), mientras que el menor valor lo tiene la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL). A los 40 días de evolución el mayor valor obtenido para la KD fué el de la serie de animales lesionados (L), y el menor fué para la serie de animales sometidos a aislamiento (A), las otras dos series restantes (C y AL) presentaban unos valores muy similares. (Tabla XXIV)

3.4. Bulbo raquídeo

En el bulbo raquídeo la Bmax obtenida en los ensayos de fijación al receptor μ , a los 20 días de evolución era muy similar en todas las series realizadas, siendo su valor ligeramente menor en la serie de animales sometidos a aislamiento (A) con respecto a la serie de animales control (C).

A los 40 días de evolución se obtuvo un mayor valor de la Bmax (fmol/mg proteína) en las series de animales lesionados (L), animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL), con respecto a la serie de animales control (C), siendo este aumento ES ($p < 0,01$) para la serie de animales lesionados con respecto a la serie de animales control; la serie L presentaba asimismo diferencias ES ($p < 0,01$) respecto a las series de animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL). (Tabla XXV; Figura 47).

Respecto a la KD, no se encontraron diferencias ES entre las distintas series analizadas.

A los 20 días de evolución, el mayor valor para la KD lo presentaba la serie de animales lesionados (L), mientras que el menor valor era el de la serie de animales sometidos a aislamiento (A). A los 40 días de evolución, el mayor valor para la KD lo presentaba la serie de animales lesionados, mientras que el resto de las series presentaban unos valores similares para dicha variable. (Tabla XXV)

3.5. Corteza cerebral

A los 20 días de evolución la Bmax obtenida para las distintas series realizadas en los ensayos de fijación al receptor μ , fué muy similar en todas ellas, no habiendo diferencias ES.

A los 40 días de evolución la Bmax presentaba un valor mayor y ES ($p < 0,01$) para las series de animales lesionados (L), animales sometidos a

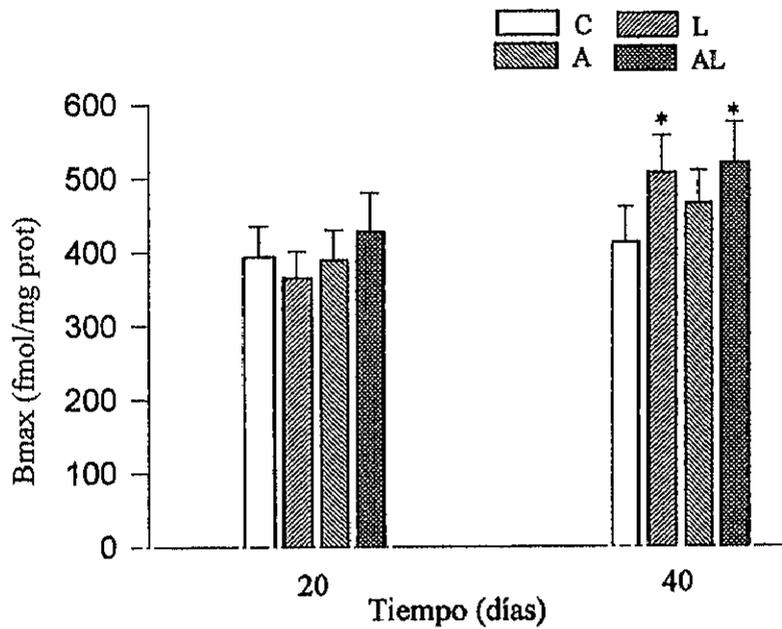


FIGURA 46

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el núcleo estriado en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento durante un periodo de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

* $p < 0,05$: valores ES respecto a la serie de animales control (C).

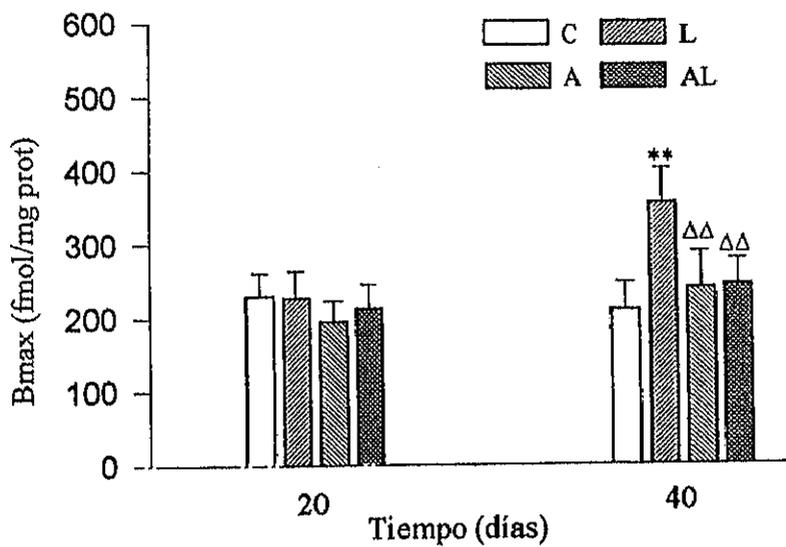


FIGURA 47

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en el bulbo raquídeo en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

**p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales control (C). $\Delta\Delta$ p<0,01: valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) respecto de la serie de animales control (C). La serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento también presentaba diferencias ES respecto a la serie de animales lesionados (L). (Tabla XXVI; Figura 48)

Con respecto a la otra variable analizada, la K_D , no se encontraron diferencias ES entre las series realizadas.

A los 20 días de evolución el mayor valor para la K_D lo presentó la serie de animales control (C), mientras que el resto de las series tenían unos valores algo inferiores y muy similares. A los 40 días de evolución los valores de todas las series eran muy parecidos presentando el mayor valor la serie de animales lesionados (L). (Tabla XXVI)

3.6. Médula espinal

En la médula espinal, en los ensayos de fijación al receptor μ para la B_{max} se obtuvieron a los 20 días de evolución unos valores muy similares para todas las series realizadas, sin que se encontraran diferencias ES entre ellas.

A los 40 días se observa un ligero aumento de la B_{max} en la serie de animales lesionados (L) respecto a la serie de animales control (C), no siendo ES, mientras que las series de animales sometidos a aislamiento (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL) presentaban unos valores muy similares a los de la serie control (C). La serie AL presentó diferencias ES ($p < 0,05$) respecto a la serie de animales lesionados (L). (Tabla XXVII; Figura 49)

Para la constante de disociación, K_D , no se encontraron diferencias ES entre las series realizadas. A los 20 días de evolución el mayor valor para la K_D se obtuvo en la serie de animales sometidos a aislamiento (A), mientras que el menor fué para la serie de animales lesionados (L). A los 40 días de evolución el mayor valor para la K_D se obtuvo para la serie de animales lesionados (L) y el menor para la serie de animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL), mientras que las dos restantes series (C y A) presentaron valores muy similares. (Tabla XXVII).

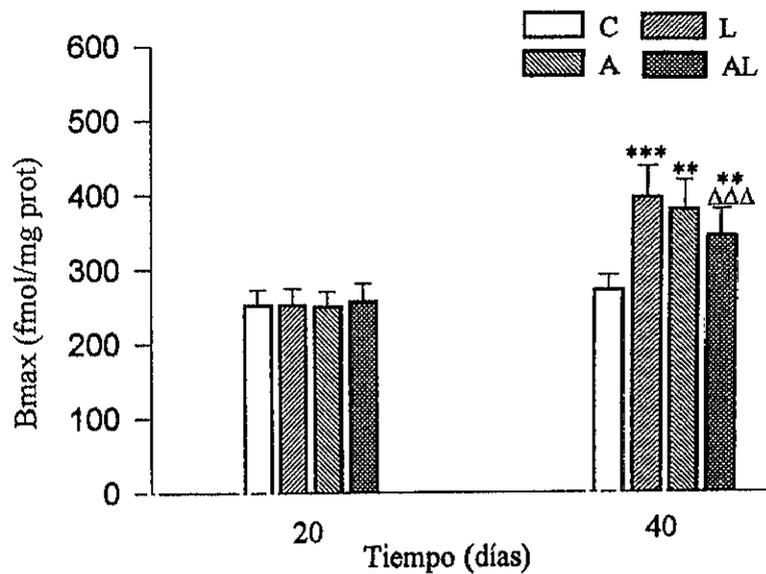


FIGURA 48

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en la corteza cerebral en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

p<0,01; *p<0,001: valores ES respecto a la serie de animales control (C).
 ΔΔΔp<0,001: valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

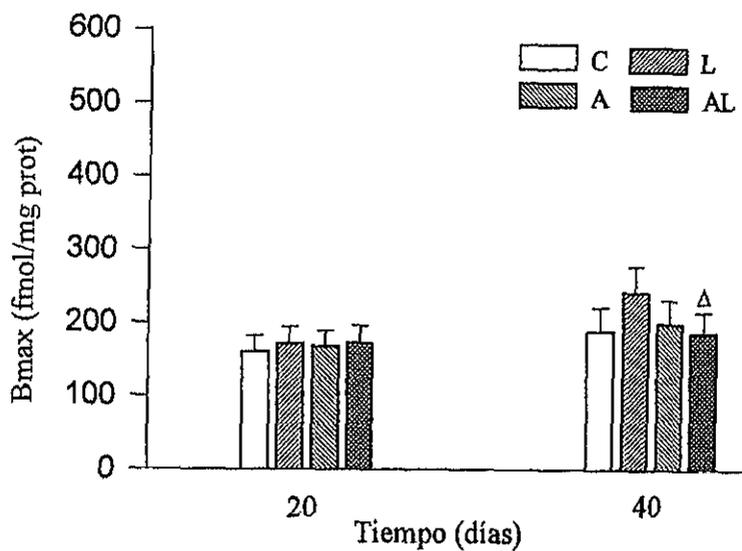


FIGURA 49

Valores de Bmax (fmol/mg proteína) de los ensayos de fijación al receptor μ en la **médula espinal** en las series de animales control (C), animales con lesión bilateral (L) del haz noradrenérgico ventral mediante la administración de 6ng de 6OHDA, animales sometidos a aislamiento de 20 ó 40 días (A) y animales lesionados y sometidos a aislamiento (AL).

$\Delta p < 0,05$; valores ES respecto a la serie de animales lesionados (L).

DISCUSSION

I. CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRES PRODUCIDO POR DEPRIVACION SOCIAL.

La caracterización del modelo experimental utilizado en este trabajo había sido llevada a cabo previamente en nuestro laboratorio (Jiménez,1990; Montero,1992; Parra, 1993). No obstante, y para comprobar la respuesta hipertensiva inducida por privación social y su modificación por la lesión del HNV, se procedió a valorar las PA sistólica y diastólica en todos los grupos de animales utilizados, obteniéndose un aumento estadísticamente significativo a partir de los 12 días de aislamiento, incremento que alcanzó cifras máximas hacia la tercera semana, sin modificaciones de la FC. Esto último no concuerda con resultados previos obtenidos por Naranjo y Fuentes (1985) que encontraron variaciones en la FC, y que puede ser debido a las variaciones genéticas que presenta cada estirpe de ratas (Trippodo y Frohlich,1981).

El aumento de la PA es reversible por Naloxona y/o resocialización de los animales en las 3 primeras semanas de aislamiento. A partir de ese tiempo ya no se consigue revertir el aumento de la presión arterial ni con Naloxona ni mediante la resocialización.

Para validar el estrés producido en estas ratas por el aislamiento nos hemos basado en determinaciones anteriores de glucocorticoides y beta-endorfinas circulantes. El eje HHA es uno de los principales componentes de la respuesta al estrés y se manifiesta por un aumento de ambas sustancias en plasma, considerándose que el incremento de los niveles de glucocorticoides circulantes es uno de los parámetros que se repite mas frecuentemente en los distintos tipos de estrés (Selye,1976).

Se ha demostrado (Iglesias y cols,1991) que los niveles de corticosterona se encuentran aumentados de manera significativa a partir de los 20 días de aislamiento, lo que coincide con los resultados obtenidos por Bennet y Gardiner (1978), a pesar de que estos autores encuentran niveles mas elevados, aunque la proporción del incremento sea la misma, lo que puede ser debido a la edad de las ratas empleadas o a la hora del día en que se sacrificaron los animales ya que este último factor puede modificar los resultados a causa de los ritmos circadianos de los glucocorticoides (Shimoda y cols,1988)

Los niveles plasmáticos de beta-endorfinas, tambien se encontraron elevados en ambas fases del aislamiento (datos no mostrados), así como el RNA de preproencefalina en el hipotálamo de ratas en los primeros días del aislamiento, y los péptidos derivados de Met-encefalina. No se observaron incrementos de este RNA ni en otros núcleos cerebrales estudiados (estriado, hipocampo y bulbo raquídeo) ni en el hipotálamo en periodos de aislamiento mas prolongados (Iglesias y cols., 1992). Estas diferencias indican que la producción y el mantenimiento de la HTA son procesos diferentes.

II. EFECTO DE LA LESION DEL HNV SOBRE LA PRESION ARTERIAL.

En nuestro trabajo, cuando se lesionó el HNV con 6OHDA en animales jóvenes, se encontró una disminución de las presiones arteriales que se mantuvo a todos los tiempos estudiados. Si los animales eran sometidos a deprivación social inmediatamente después de la lesión, las hipertensiones arteriales no se producían, lo que indica un claro predominio de los efectos de la lesión del HNV sobre los efectos producidos por el aislamiento prolongado. Montero (1992) demostró que la lesión no disminuía la presión arterial elevada cuando las ratas habían estado aisladas durante periodos de tiempo de 20 días o más.

La importancia de la 6OHDA como agente citotóxico radica en que es recaptada selectivamente por las neuronas catecolaminérgicas, donde se oxida rápidamente a compuestos que causan la degeneración de las mismas (Jonsson, 1980; Kostrzeva, 1989), lo que ha hecho que sea una herramienta muy útil en el estudio de la función de los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica en la regulación cardiovascular, comportamental y neuroendocrina (Van den Buuse y cols, 1984; Cole y Robins, 1987; Haas y George, 1989). Ha sido empleada en diversos modelos de hipertensión experimental para estudiar los mecanismos patogénicos que originan el aumento de la PA, tanto en ratas con hipertensión renovascular (Dargie y cols. 1976) como en SHR (Van den Buuse y cols. 1986). En todos estos casos la lesión atenúa el desarrollo de la hipertensión.

La relevancia cardiovascular de las vías noradrenérgicas ascendentes está basada en la inervación que reciben estructuras tales como el hipotálamo o la corteza cerebral desde neuronas noradrenérgicas situadas en regiones pontino-bulbares (Ungersted, 1971; Lindvall y Björklund, 1974). Del mismo modo núcleos hipotalámicos proyectan densamente al núcleo del tracto solitario, donde tiene lugar la primera sinapsis de las aferencias barorreceptoras (Palkovits, 1980). Dichos tractos noradrenérgicos parecen mediar diversas respuestas cardiovasculares (Lightman y cols., 1983, 1984a, 1984b) y debido a esto hemos elegido el HNV como lugar de administración de la 6OHDA.

La disminución de la presión arterial ya había sido descrita por otros autores (Korner y cols., 1978; Van den Buuse y cols., 1991) estudiando los efectos circulatorios agudos de la inyección central de 6OHDA en conejos. Encontraron una elevación transitoria de la PA acompañada por una caída gradual de la FC que podría estar ocasionada por la recaptación de la neurotoxina en neuronas noradrenérgicas y el desplazamiento subsiguiente del neurotransmisor que se produciría antes de sus efectos neurodegenerativos. Este mismo resultado fue obtenido en nuestro modelo experimental por Montero (1992) que demostró una respuesta hipertensiva transitoria a las 24 horas de la administración de la neurotoxina, recuperándose las lecturas basales de PA sistólica y diastólica tras un periodo breve de tiempo (2-3 días). Dicho incremento de PA era efecto directo de la lesión, ya que no se producía en los animales sometidos a operación ficticia.

Esto podría estar en relación con cambios en el sistema noradrenérgico, pues la misma autora encontró un aumento en los niveles de MHPG en bulbo raquídeo y

médula espinal 24 horas después de la lesión con 6OHDA lo que podría estar relacionado con la elevación de la presión arterial que acontecía en ese momento.

III. VALORACION DE CATECOLAMINAS EN AREAS CEREBRALES

1. CATECOLAMINAS EN RATAS SOMETIDAS A AISLAMIENTO.

Teniendo en cuenta la regulación de la presión arterial mediada por diversas áreas del SNC y la implicación de las catecolaminas, se estudiaron sus concentraciones en hipotálamo, bulbo raquídeo y médula espinal, no encontrándose variaciones significativas en ninguna de ellas a los tiempos estudiados.

Esto que concuerda con los resultados de Thou y cols (1976) quienes solamente encontraron incremento de las concentraciones de NA en núcleos de la corteza cerebral a las 28 semanas de aislamiento pero no en periodos mas cortos de tiempo.

Un incremento en los niveles de neurotransmisores puede ser debido a un incremento en la síntesis, disminución del metabolismo o variaciones en la velocidad de renovación.

Hay evidencias de un mecanismo compensatorio por disminución de la velocidad de renovación demostrado por Montero (1990) que obtuvo una disminución del principal metabolito cerebral de NA (MHPG) en hipotálamo, transcurridos 20 días de aislamiento y que coincide con los resultados obtenidos en otros modelos experimentales de HTA. Sautel y cols.(1988) encontraron una disminución de la actividad de este sistema de neurotransmisión en distintos núcleos hipotalámicos de ratas genéticamente hipertensas de la raza Lyon, resultados que son coincidentes con los de Wijnen y cols. (1980) en SHR.

Numerosos estudios señalan que la concentración de MHPG en el SNC es el indicador mas sensible de la velocidad de renovación de NA y de este modo, la formación del mismo refleja la actividad funcional de las neuronas noradrenérgicas centrales (Tanaka y cols., 1982; Elsworth y cols., 1983; Artigas y cols., 1986).

Si la mencionada variación en el tono noradrenérgico durante el aislamiento está correlacionada con el aumento de la presión arterial, por el momento es solo una hipótesis, puesto que tambien es posible que dicha variación sea reflejo de otros efectos fisiológicos que acompañan al estrés (Weiss y cols., 1989) y que tambien han sido asociados con modificaciones del tono catecolaminérgico central.

Esta consideración alcanza mayor relevancia al tratarse del hipotálamo, región cerebral que juega un papel fundamental en la coordinación de las respuestas neuroendocrinas y de comportamiento (Swanson y Swachenko, 1983; Yang y cols., 1990; Bachelard y cols., 1992).

Por el contrario, el bulbo raquídeo y la médula espinal son zonas que desempeñan, casi exclusivamente, funciones autónomas como el control cardiovascular, sin aparentes implicaciones directas en el funcionalismo endocrino.

En nuestras condiciones experimentales la hipertensión se manifestaba a los 10-15 días de iniciado el aislamiento, mientras que la disminución en los niveles hipotalámicos de MHPG aparece con posterioridad a la alteración cardiovascular (20 días de aislamiento).

Esto indica que la modificación noradrenérgica hipotalámica es secundaria al aumento de la presión arterial y puede ser que dicha modificación sea resultado de un reflejo fisiológico compensatorio desencadenado con objeto de reducir la presión arterial en estos animales, lo que sería concordante con los resultados de Saavedra (1981) en el caso de ratas SHR.

Puede existir también una relación con las CA plasmáticas, pues en ratas aisladas durante 35-40 días (Parra, 1993) encontró un aumento de la concentración de catecolaminas plasmáticas sin que se hayan encontrado variaciones en los primeros días de aislamiento. Existe una hiperactividad de la glándula adrenal que provoca un aumento de corticosterona plasmática en ese periodo de tiempo de aislamiento, que induciría la síntesis del enzima FNMT y por lo tanto de AD lo cual explica los aumentados niveles de AD plasmática en estas ratas (Parra, 1993).

Sería interesante conocer que ocurre con las CA plasmáticas inmediatamente después del aislamiento, porque podría producirse una elevación rápida que desaparecería al desencadenarse el reflejo barorreceptor que se produce en la hipertensión (Korner y cols. 1974). Este aumento se debería a la hiperactividad de los nervios simpáticos periféricos que tiene como reflejo una elevación de los niveles plasmáticos de NA.

Una clara elevación de NA aparece en el plasma de jóvenes pacientes con HTA esencial (Goldstein, 1983). También en pacientes con hipertensión secundaria existe un aumento significativo en los niveles plasmáticos de NA (Masuyama y cols. 1979; Shiff y cols. 1981; Weidmann y cols. 1982). La alteración de los niveles plasmáticos de NA también ha sido demostrada en diferentes modelos experimentales de HTA (Rascher y cols. 1980; Siri y Kaner, 1985).

Esto podría demostrar que el efecto del estrés agudo podría activar el sistema noradrenérgico en distintas regiones cerebrales para responder a las demandas más inmediatas del organismo en esa situación (Dunn, 1988; Tanaka y cols. 1988; Nakata y cols. 1991). El efecto sería diferente cuando el estrés es persistente y tiene un carácter crónico o semicrónico (Anisman y cols., 1987; Adell y cols., 1988).

En nuestros resultados no se encontraron variaciones en las concentraciones de AD y DA, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Fuxe y cols.(1975) en ratas SHR.

Esto no excluye totalmente su participación en el desarrollo de la hipertensión. Las terminaciones dopaminérgicas en el hipotálamo no solo desempeñan funciones cardiovasculares, sino también las conocidas funciones neuroendocrinas de la DA (Hökfelt y cols., 1973) que aparecen durante el estrés, y que podrían contrarrestar el efecto cardiovascular.

Los resultados obtenidos en bulbo raquídeo y médula espinal pueden interpretarse como consecuencia de la disposición de los neurotransmisores en los distintos núcleos que componen ambas estructuras, y que la ausencia aparente de efectos representase el resultado neto de la activación o inhibición simultánea de distintas poblaciones (noradrenérgicas A1 en la CVLB y A2 en el NTS o adrenérgicas C1 y C2), cuyo efectos en lo que se refiere al control cardiovascular, son contrapuestos (Patel y Schmid, 1987; Louis y cols., 1987; Reis y cols., 1987).

Tampoco se puede descartar una interacción con sistemas peptidérgicos.

Para el sistema opioide se ha descrito en el SNC la existencia de un receptor presináptico opioide situado en el terminal noradrenérgico, regulando la actividad de este sistema de neurotransmisión a través de una acción moduladora inhibitoria (Mulder y cols., 1987)

2. CATECOLAMINAS EN RATAS CON LESION DEL HNV

Cuando lesionamos animales jóvenes en el HNV y analizamos las variaciones en la neurotransmisión noradrenérgica, encontramos algunos cambios en el hipotálamo tanto de NA como de AD que se podrían correlacionar con la modificación en la presión arterial.

La disminución de los niveles de AD hipotalámica podría deberse al deterioro simultáneo ocasionado en la región C1 bulbar cuyas proyecciones ascienden hacia el hipotálamo (Fuller, 1982).

La 6OHDA ha sido ampliamente utilizada en el estudio de los mecanismos patogénicos que originan un aumento de la PA en diferentes modelos de hipertensión experimental. Dargie y cols. (1976) demostraron que la administración intracisternal de 6OHDA en ratas con HTA renovascular previene la elevación de la PA y el incremento de los niveles de NA plasmáticos característicos de este modelo de hipertensión. Del mismo modo, Van den Buuse y cols. (1986) observaron que la lesión con esta neurotoxina atenúa el desarrollo de la HTA en ratas SHR.

La lesión del HNV produce una alteración de las vías NA originadas en el locus ceruleus, el principal núcleo noradrenérgico cerebral, afectando al núcleo paraventricular del hipotálamo y a los axones que se originan en las áreas A1/C1 y

A2/C2 produciendo depleción de CA fundamentalmente AD en el grupo celular C1, mientras que las lesiones del grupo C2 no la afectan (Guillet y cols., 1993). También las lesiones del haz noradrenérgico dorsal producen una depleción de NA hipotalámica de entre el 30 y el 60% como demostraron Cole y cols. (1988).

En otros modelos experimentales de HTA como las ratas SHR se ha puesto de manifiesto que la lesión i.c.v. con 6OHDA previene el desarrollo de la hipertensión (Erinoff y cols., 1975; Kubo y Hashimoto, 1978). Contrariamente, cuando la lesión se efectúa por microinyección de la neurotoxina en las principales bandas noradrenérgicas ascendentes ventral y dorsal, el desarrollo de la hipertensión no se ve afectado por la lesión (Van den Buuse y cols., 1984).

En relación a nuestros resultados, las diferencias podrían deberse al efecto de la neurotoxina sobre los distintos sistemas catecolaminérgicos según la vía de administración utilizada en cada caso. Mientras que la administración local de 6OHDA produce la destrucción de NA, en el caso de la administración i.c.v. también se afectan los sistemas DA y AD.

3. CATECOLAMINAS EN RATAS SOMETIDAS A AISLAMIENTO Y CON LESION DEL HNV.

Nuestros resultados muestran que la lesión en el HNV mediante la administración de 6OHDA previene la respuesta hipertensiva producida por el aislamiento. Encontramos que tras 20 días de realizada la lesión se obtuvo un descenso en los niveles de NA y AD, pero no en los de DA, en el hipotálamo de las ratas lesionadas. Sin embargo no se observaron cambios en los niveles de CA en el bulbo raquídeo. Se demuestra claramente que hay un predominio del efecto de la lesión del HNV sobre el del aislamiento, a semejanza de lo que ocurría con las presiones arteriales.

Todos estos datos sugieren que el HNV podría jugar un papel en el disparo de la respuesta hipertensiva inducida por deprivación social en ratas jóvenes.

El papel del sistema noradrenérgico central en el desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por deprivación social se puso de manifiesto mediante la lesión del HNV por la administración de 6OHDA previa al aislamiento, no encontrándose este efecto cuando la lesión se llevó a cabo después del desarrollo de la respuesta hipertensiva durante 20 días de aislamiento (Montero, 1992). Los animales lesionados y aislados no desarrollaron la respuesta hipertensiva característica, en contraposición a lo que ocurría en la rata con su SNC intacto, que registraba lecturas elevadas de PA sistólica y diastólica a partir de los 12 días de aislamiento continuado.

Después de realizarse la lesión bilateral del HNV con 6OHDA, el hecho de que no se produzca el aumento de la presión arterial sistólica inducida por deprivación social sugiere que es crítica la integridad de las principales rutas ascendentes catecolaminérgicas para producir un nuevo inicio del reflejo barorreceptor

En general existe una buena correlación entre la reducción en el contenido de CA y la acción degenerativa de la neurotoxina a nivel central y periférico (Kostrzewa y Jacobowitz, 1974; Sudo, 1985), de tal modo que los niveles de CA pueden ser considerados un buen índice bioquímico del grado de la lesión ocasionada por 6OHDA (Jonsson, 1980).

Las lesiones en el HNV provocan una disminución de los niveles de NA hipotalámica, y posiblemente de los enzimas de síntesis de esta monoamina que se acompañan de una disminución del MHPG (Montero, 1992). Se produce, por lo tanto, una disminución de la velocidad de renovación de NA tras la administración de 6OHDA hecho descrito por Korstrzewa y Jacobowitz (1974).

El hecho de que la lesión del HNV no produzca efectos sobre PA ni CA plasmáticas una vez establecida la HTA, nos indica que los mecanismos que participan en el mantenimiento de cifras tensionales altas son complejos y abarcan mas sistemas que el puramente catecolaminérgico como podrían ser los glucocorticoides o el sistema opioide (Gaillet y cols., 1993).

IV. VARIACIONES EN EL SISTEMA OPIOIDE CENTRAL

1. DEBIDAS AL AISLAMIENTO

Los resultados obtenidos en este trabajo refieren un aumento de la B_{max} en los ensayos de unión al receptor μ en el hipotálamo y en el hipocampo de animales sometidos a deprivación social a partir de 20 días de aislamiento, siendo mayor el aumento transcurridos 40 días, en tanto que no se encontraron variaciones en la constante de disociación (K_D). En otras areas cerebrales (nucleo estriado, bulbo raquídeo y corteza cerebral) tambien se observa un aumento en la B_{max} a los 40 días de deprivación social, siendo unicamente significativo en la corteza cerebral.

Respecto de los ensayos de fijacion al receptor delta opioide realizados en este trabajo en ratas sometidas a estrés por deprivación social, destaca un incremento en la B_{max} en el hipocampo, hipotálamo y bulbo raquídeo tras 20 días de aislamiento. Cuando la deprivación social se mantiene durante 40 días, es mayor el incremento de B_{max} en hipotálamo, hipocampo y nucleo estriado, en tanto que en bulbo raquídeo no se observan diferencias ES respecto de la serie de animales control.

Nuestros resultados estarían en consonancia con los obtenidos por Gulati (1990) en ratas SHR en las cuales la densidad de receptores (B_{max}) y la constante de disociación (K_D) en ensayos en los que se empleó 3H -DAMGO unido a las membranas del nucleo estriado, corteza cerebral y médula espinal de ratas SHR y WKY no diferían. Por otro lado, en membranas del hipotálamo y cerebro medio de las SHR el valor de la

B_{max} era significativamente mayor que en las WKY, aunque las K_D de ambas estirpes no diferían. Además, la B_{max} en las membranas de amígdala de ratas SHR fue menor que el de las ratas WKY, siendo similar las K_D en ambos tipos de animales.

En otras situaciones de estrés, como el producido por dolor por estimulación de la sustancia gris periacueductal o la colocación del animal repetidamente sobre una placa caliente, se ha demostrado un incremento de los receptores opioides y niveles de encefalina en neonatos (Mc Dowell y Kitchen, 1987). Los mismos autores encontraron que el estrés crónico durante el primer mes post-parto incrementa la sensibilidad de los adultos a la analgesia por morfina. Deducen que el sistema opioide está involucrado en las respuestas al estrés y que el estrés durante este importante estadio del desarrollo puede afectarlo. Parece ser que el aumento de corticosterona típico de las situaciones de estrés está ausente en las ratas en este precoz periodo postnatal y se produciría a partir de los 45 días del nacimiento.

Los receptores opioides han demostrado poseer una notable plasticidad, como refleja su susceptibilidad a la modificación por diversas manipulaciones farmacológicas y comportamentales. La exposición crónica a antagonistas del receptor opioide modifica su número, tanto en homogeneizados de todo el cerebro como en áreas específicas del SNC (Stein, 1992).

Al igual que los opioides son capaces de influenciar otros sistemas transmisores "in vitro", la liberación de péptidos opioides está controlada parcialmente por otros sistemas de neurotransmisión. Así, es posible que las alteraciones en los ensayos de unión al receptor opioide que se asocian a estrés sean el reflejo de una alteración alostérica del receptor debida al incremento de la liberación de otros ligandos endógenos y de su subsecuente unión a sus receptores mas próximos (Jiang, 1990).

En diferentes modelos experimentales de estrés se han detectado cambios en la dinámica del receptor opioide o en los niveles de sus ligandos en la neurohipófisis (Zamir, 1985; Jiménez, 1990).

La evidencia directa de la activación del sistema opioide en nuestro modelo experimental de estrés por aislamiento es el hallazgo de un incremento en las concentraciones de la encefalina inmunorreactiva y del mRNA de la encefalina en el hipotálamo (Iglesias y cols., 1992)

Muchos trabajos han demostrado que en una variedad de situaciones estresantes tiene lugar la activación del sistema opioide y que se producen diferentes tipos de respuesta.

Los resultados de Gulati y cols. (1989) abogan por una participación del receptor mu opioide en el desarrollo de distintas formas de hipertensión experimental. Estos autores han demostrado un aumento de receptores mu opioides en el hipotálamo y una subsensibilización de los mismos en amígdala de ratas SHR respecto a WKY. Estos datos estarían en consonancia con la apreciable correlación anatómica que se ha encontrado entre los receptores mu opioides y las áreas del SNC con mayor relevancia en el control cardiovascular (Mansour y cols., 1988).

Los resultados son diferentes cuando el animal de experimentación se somete a un estrés agudo o a un estrés crónico.

El aislamiento, considerado como un modelo de estrés crónico, es particularmente estresante para las ratas recién nacidas, como lo demuestra la determinación de las vocalizaciones ultrasónicas que emiten en esta situación. Tanto el DPEPE como el DAMGO reducen las vocalizaciones, si bien la acción del DAMGO es mucho más potente, y esto sugiere que los receptores μ deben ser los mediadores primarios de esta respuesta (Barr, 1992)

Diversos estudios han demostrado que el estrés mínimo que acompaña a la manipulación de la rata, reduce el número de receptores μ y δ en varias regiones cerebrales, especialmente en aquellas asociadas con el sistema límbico (Stein y cols., 1992).

El estrés crónico, como el estrés recurrente inducido por descargas electroconvulsivas repetitivas, se ha observado que causa disminución de receptores μ y δ en algunas estructuras del cerebro de rata (Nakata y cols., 1985). Es razonable asumir que este efecto debe ser una respuesta adaptativa al aumento de la liberación de los péptidos endógenos que ocurre durante el estrés.

Sin embargo, Holaday y cols. (1982) reseñaron un aumento de los receptores δ opioides en respuestas a tratamientos con descargas electroconvulsivas repetitivas. Igualmente, un estudio de Stein y cols. (1988) demostró que los agentes estresantes como la descarga eléctrica intermitente (20 minutos) en la extremidades y la privación de agua durante 4 días inducen un incremento en los lugares de unión de los receptores μ y δ en el sistema límbico de la rata. Por el contrario, Lewis y cols. (1987) no consiguieron demostrar ningún cambio en el número y la afinidad de los receptores μ , δ o κ en varias regiones del encéfalo y la médula espinal (Przewlocki y cols., 1991).

Desde el punto de vista bioquímico, Van Loon y cols. (1987) hallaron en ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización un incremento considerable de los niveles plasmáticos de Met-enkefalina.

Los factores estresantes asociados con la falta de acceso a la comida o la bebida pueden activar el sistema opioide. La privación total de agua incrementa el número de receptores μ en el septum y del receptor δ en los núcleos caudado y accumbens. Esto implica una activación opioide del sistema límbico que se produciría como resultado de la exposición a un agente estresante.

En el estrés agudo inducido por temor condicionado en la rata, se ha observado que se produce una disminución de la unión de agonistas como ^3H -Leu-Enk a receptores en el cerebro (Chance y cols., 1978). Resultados similares se han obtenido en ratas sometidas a natación forzada (Pert y Bowie, 1979; Christie y cols., 1981).

También se ha descrito que las descargas eléctricas intermitentes en las extremidades o la natación forzada causan una reducción significativa en la unión a receptores de ^3H -diprenorfina, medido por autorradiografía, en el hipotálamo y otras

estructuras cerebrales (Seegers y cols.,1984). Así, el estrés agudo parece inhibir la unión al receptor opioide de sus agonistas, sugiriendo que existe una activación persistente del receptor opioide que sería secundaria al incremento de la liberación de opioides endógenos.

El estrés producido por choque eléctrico moderado en las extremidades incrementa la liberación de encefalina en el area tegmental ventral, la cual parece modular la liberación de DA en la zona tegmental de la corteza prefrontal y en el nucleo accumbens (Kalivas, 1987)

Además de las situaciones de estrés, diversos autores sugieren que el sistema opioide se encuentra activado en numerosas formas de hipertensión experimental. Así, con datos estrictamente farmacológicos, se ha demostrado que la administración i.v. de Naloxona a ratas SHR disminuye la presión arterial en ratas jóvenes, sin que se observe efecto alguno en sus controles WKY (Delbarre y cols.,1982). La efectividad de la infusión continua de Naloxona para prevenir el desarrollo de HTA ha sido también demostrada en ratas jóvenes SHR en las cuales el tratamiento crónico con dicho antagonista retarda el desarrollo de la hipertensión de manera dosis-dependiente (Quock y cols., 1984).

En la SHR hay muchas evidencias de que el sistema opioide está alterado. La concentración de Dinorfina (1-8) en el hipotálamo e hipocampo es menor en la SHR de todas las edades, pero la concentración de Dinorfina (1-13) en hipocampo cambia con la edad. Previo al desarrollo de la hipertensión la concentración de Dinorfina es superior en las SHR, pero cuando ya se ha producido la HTA sus concentraciones son menores en las SHR. Aunque no existen diferencias en la afinidad para los receptores a ninguna edad, estos resultados sugieren que los cambios en los receptores del hipocampo deben desempeñar un importante papel en el control de la presión sanguínea.

Existen también diferencias entre las SHR y las WKY en las concentraciones de los péptidos opioides en otras áreas cerebrales (Mc Connaughey y cols.,1992). La prevención de la HTA mediante la administración de Hidralazina y Guanetidina en ratas jóvenes fue revertida por opiáceos, lo cual confirma la implicación del sistema opioide en la génesis de la HTA en las SHR (Li y cols.,1992).

La naturaleza central de la elevación de la PA se había puesto de manifiesto mediante el empleo del antagonistas cuaternarios del receptor opioide (Florentino y cols., 1987). Algunos autores han sugerido que los opioides circulantes podrían acceder al SNC a través de diversas áreas donde la BHE es prácticamente inexistente (area postrema, región subfornical, Holaday,1983). El hecho de que el antagonista seleccionado no atravesase la BHE cuando se administra por vía i.v. o i.p. y no tenga efecto sobre la PA indica que el efecto se produce en SNC y no periférico, donde los opioides endógenos liberados como consecuencias del estrés ejercen su acción sobre el receptor para desencadenar la respuesta hipertensiva. La utilización crónica de Morfina impide que las ratas desarrollen HTA a lo largo del periodo de tiempo que están expuestas al efecto del fármaco (Jiménez y Fuentes,1993). Cuando se suprime la administración de Morfina, se produce un aumento brusco de la PA.

Para explicar las discrepancias en los resultados obtenidos por los diversos autores hay que tener en cuenta la enorme complejidad del sistema opioide y sus receptores. Por una parte, las diferencias en la distribución de los receptores mu opioides. Estas pueden explicar parcialmente el efecto distinto y en ocasiones opuesto de los agonistas mu opioides sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca cuando se administran en diferentes áreas cerebrales (Feuerstein, 1985; Gulati, 1990).

Por otra parte, los receptores mu y delta opioides pueden coexistir en la misma neurona, por ejemplo en el neocórtex de la rata comparten la misma proteína G inhibidora. En múltiples estudios de unión al receptor se observa que los ligandos del receptor mu inhiben el "binding" de los ligandos delta de forma competitiva y no competitiva. Este hallazgo constituyó la base para que Rothman y cols. (1988) dividieran los receptores delta en dos subtipos: los que están asociados a receptores mu (denominados δ_{μ}) y aquellos no asociados ($\delta_{\text{no}\mu}$) (Traynor y Elliot, 1993). La nomenclatura de los lugares delta asociados con el complejo receptor opioide mu-delta (lugar δ_{μ}) y los no asociados aparecen en una gran variedad de estudios farmacológicos realizados tanto "in vivo" como "in vitro". El clonaje reciente del receptor delta apoya la idea generalizada de que los receptores opioides son miembros de una familia de receptores unidos a proteínas G transmembranares (Xu y cols., 1993).

Los antagonistas y los agonistas de baja eficacia intrínseca provocan un aumento o bien ningún cambio en la densidad de receptores, en tanto que los que poseen alta eficacia intrínseca pueden disminuir los receptores si la dosis es suficientemente elevada (Yoburn y cols., 1993).

El estrés aumenta la actividad de la adenilato ciclasa en la hipófisis anterior. Este aumento se asocia con un incremento en los niveles de mRNA de adenilato ciclasa. El factor o factores liberados durante el estrés deben aumentar la señal de transducción de la adenilato ciclasa y así conducen a una persistente elevación de la expresión del gen de la POMC, a pesar de la inhibición producida por los glucocorticoides (Morris y cols., 1993).

En condiciones fisiológicas normales el sistema opioide está quiescente, pero cuando se produce una alteración de la homeostasis, los opioides se incluyen entre los múltiples sistemas inhibidores del dolor que se ponen en funcionamiento cuando el organismo recibe una agresión (Watkins y Mayer, 1982).

Nuestros resultados sugieren que el aumento del número de receptores opioides en las mencionadas regiones del SNC puede contribuir al mantenimiento del estado hipertensivo que presentan los animales aislados socialmente.

2. EFECTO DE LA LESION DEL HN V

La administración de 6OHDA en una importante vía catecolaminérgica no solo evita la respuesta hipertensiva que tiene lugar en el modelo de privación social en la

rata; además en este trabajo se ha comprobado que también altera el sistema opioide central.

Se ha comprobado que se produce una disminución de la B_{max} del receptor μ opioide en núcleo estriado transcurridas 24 horas y un aumento en bulbo raquídeo, hipotálamo y médula espinal. Asimismo se encontró un aumento en hipotálamo y médula espinal transcurridos 20 días de la lesión con la neurotoxina.

Con respecto a los ensayos de fijación al receptor δ opioide la disminución de la B_{max} se observó en hipotálamo transcurridos 1, 20 y 40 días de la lesión y a los 20 días en corteza cerebral frontal. Transcurridos 1, 20 y 40 días de la administración de la neurotoxina se encontró un aumento de la B_{max} en bulbo raquídeo y médula espinal. En ninguno de los casos se presentaron variaciones en la K_D .

Pocos trabajos se han llevado a cabo para estudiar los efectos de las lesiones de vías noradrenérgicas, como el HNV.

Smith y cols., (1991) han demostrado en la rata una disminución de receptores μ de aproximadamente el 30% en estriado, dos semanas después de lesionar las vías aferentes nigroestriadas con 6OHDA. Estos datos sugieren que se encuentran receptores μ localizados en terminaciones nigroestriadas. Estudios posteriores demostraron que las lesiones con 6OHDA inducen pérdida de receptores μ en ratas recién nacidas y adultas como resultado de la regulación transináptica de sitios postsinápticos, pero no presinápticos como demostraron Loughlin y cols. (1992) haciendo análisis cualitativo de cerebro entero, no detectando cambios en los receptores μ estriales marcados con 3H -Naloxona en ratas sin lesión cerebral. Tales resultados son consistentes con la conclusión de que los receptores μ no están localizados presinápticamente en terminaciones nigroestriadas y sugieren que la pérdida de neuronas dopaminérgicas no produce necesariamente una subsensibilización del receptor μ opioide.

Esto concuerda con nuestros resultados con respecto al receptor δ opioide en que se ha encontrado una persistente disminución de la B_{max} en hipotálamo, que se corresponde con una disminución de la NA hipotalámica tras la lesión con 6OHDA. Esto sugiere que un cierto número de receptores opioides pueden estar localizados en la terminal noradrenérgica del hipotálamo de la rata y apoya el concepto del papel modulador de los péptidos opioides sobre las vías noradrenérgicas cerebrales.

El incremento de receptores δ en bulbo raquídeo y médula espinal podría ser debido a que una interrupción del sistema de transmisión noradrenérgica alteraría la modulación que las CA ejercen sobre los receptores opioides. Este efecto se demuestra más consistentemente sobre receptores μ en la médula espinal.

3. EFECTO DEL AISLAMIENTO ASOCIADO A LA LESIÓN DEL HNV

Cuando se lesiona el HNV e inmediatamente se aíslan las ratas, en los ensayos con el receptor μ se produjo un aumento de la B_{max} en hipotálamo e hipocampo transcurridos 20 días y en hipotálamo, hipocampo, núcleo estriado y corteza cerebral a los 40 días.

Con respecto al **receptor delta** la lesión del HNV acompañada de aislamiento produjo una disminución de la **B_{max}** en hipotálamo y estriado a los 20 días y en hipotálamo transcurridos 40 días.

Cuando la rata es únicamente sometida a lesión del HNV la afectación del sistema opioide está antagonizada por un descenso en la población de receptores delta de localización hipotalámica y esta alteración persiste aun cuando los animales sean sometidos a privación social.

Los resultados obtenidos sobre las modificaciones de los receptores opioides en las ratas a las que se les lesionó el HNV con 6OHDA muestran una serie de variaciones que, en su conjunto, indican que la lesión de vías noradrenérgicas afecta de alguna manera al sistema opioide.

El incremento o la disminución en la densidad de dichos receptores nos indica que la regulación es compleja y que existen diferencias en cuanto a los mecanismos que controlan ambos tipos de receptor en el SNC.

Jiménez y cols., (1993) demostraron por primera vez "in vivo" que en una estructura cerebral concreta (bulbo raquídeo) puede existir una inhibición selectiva de la transmisión noradrenérgica y adrenérgica debido a la ocupación de distintos receptores opioides.

El estudio de segundos mensajeros o de fosforilización de proteínas posiblemente proporcionaría datos sobre los mecanismos implicados en la actividad de los receptores opioides.

Los tratamientos crónicos con agonistas opioides sugieren que el acoplamiento de los receptores con proteínas G y con efectores de segundos mensajeros ostentan un importante papel en el desarrollo de la tolerancia a opioides (Childers, 1991)

Es importante, con vistas a una posible aplicación terapéutica de nuestros datos, poner de manifiesto el papel del sistema opioide en la etiología, desarrollo y/o mantenimiento de la HTA para el desarrollo de nuevos fármacos que pudieran emplearse en la terapéutica de dicha alteración cardiovascular, especialmente cuando se debe a la exposición continuada a situaciones de estrés.

CONCLUSIONES

1.- Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que la integridad del haz noradrenérgico ventral es necesaria para la elevación de la presión arterial inducida por privación social en la rata. La lesión del haz noradrenérgico ventral afecta fundamentalmente al hipotálamo puesto que se ha demostrado una alteración paralela de catecolaminas y receptores opioides en esta región cerebral que tiene una gran implicación en la regulación central simpática.

2.- Los agonistas opioides endógenos, movilizados como consecuencia del estrés producido por privación social en ratas jóvenes, ejercen un papel crítico en la elevación de la presión arterial a través de su acción sobre los receptores opioides centrales μ y δ , que es evidente tanto a los 20 como a los 40 días de evolución. Su activación podría ser la causa de las alteraciones en la velocidad de renovación de las catecolaminas del SNC que tiene lugar en este modelo experimental.

3.- Asimismo se ha comprobado que la lesión del haz noradrenérgico ventral secundaria a la administración de 6-hidroxidopamina consigue abolir la respuesta hipertensiva que produce la privación social, posiblemente como consecuencia de la afectación del receptor δ opioide hipotalámico, así como del sistema catecolaminérgico central. Esto nos permite concluir que la administración de la neurotoxina no solo afecta a vías catecolaminérgicas sino también del sistema opioide puesto que se comprueban variaciones tanto en la densidad de receptores μ como δ opioides.

BIBLIOGRAFIA

- Abood L.G., Takeda F. Enhancement of stereospecific opiate binding to neural membranes by phosphatidylserine. *Eur J Pharmacol.* 39:71, 1976.
- Adams J.W., Andrews J.S., Hiller J.M., Simon E.J., Holtzman S.G. Effects of stress and beta-funaltrexamine pretreatment on morphine analgesia and opioid peptides. *Life Sci.* 41:2835. 1987.
- Adell A., García-Marquez C., Armario A., Gelpi E. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to further acute stress. *J Neurochem.* 50:1678. 1988.
- Ahlquist, R.P. A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153:586, 1948.
- Akil H., Madden J., Patrick R.L., Barchas J.D. Stress induced increase in endogenous opiate peptides: concurrent analgesia and its partial reversal by naloxone. En: *Opiates and endogenous opioid peptides.* Hosterlitz H.W. (eds.). Elsevier, Amsterdam. 63. 1976.
- Akil H., Hewlett W.A., Barchas J.D. y Li C.H. Binding of H beta-endorphin to rat brain membranes: Characterization of opiate properties and interaction with ACTH. *Eur J Pharmacol* 64: 1, 1980.
- Akil H., Watson S.J., Young E., Lewis M.E., Khachaturian H., Walker J.M. Endogenous opioids: biology and function. *Ann Rev Neurosci.* 7:223. 1984.
- Anisman H., Irwin J., Bowers W., ahluwalia P., Zacharko R.M. Variations on norepinephrine concentrations following chronic stressor application. *Pharmacol Biochem Behav.* 26:653. 1987.
- Anton A.H. y Sayre D.F. A study of the factors affecting the aluminium oxide-trihydroxyndole procedure for the analysis of catecholamines. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 138:360, 1962.
- Antoni F.A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of the 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrine Rev.*7:351, 1986.
- Armario A., Ortiz R., Balasch J. Effect of crowding on some physiological and behavioural variables in adult male rats. *Physiol Behav.* 32:35. 1984.
- Armario A., Castellanos J.M. A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev Esp Fisiol.* 40:437. 1984.
- Artigas F., Sarrias M.J., Adell A., Gelpi E. Quantification of total MHPG in the rat brain using a non enzymatic hydrolysis procedure. *Effects of drugs.* *Life Sci.* 39:1571. 1986.
- Atweh, S.F. y Kuhar, M.J. Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain. *Br. Med. Bull.* 39: 47, 1983.

- Axelrod, J., Weinshilboum, R. Catecholamines. *N. Engl. J. Med.* 287:237, 1972.
- Axelrod J., Reisine T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science.* 224:452. 1984.
- Bachelard H., Harland D., Gardiner S.M., Kemp P.A., Bennet T. Regional haemodynamic effects of noradrenaline injected into the hypothalamic paraventricular nuclei of conscious, unrestrained rats; possible mechanisms of action. *Neuroscience.* 47:941. 1992.
- Barr G.A. Behavioral effects of opiates during development. En: *Development of the central nervous system: Effects of alcohol and opiates.* Miller M. (ed). New York: Wiley-Liss 221, 1992.
- Baxter J.D., Tyrell J.B. The adrenal cortex. En: *Endocrinology and metabolism* Felig P, Baxter J.D., Broadus A.E. (eds). New York. McGraw-Hill. 511, 1987.
- Bennet T., Gardiner S.M. Corticosteroid involvement in the changes in noradrenergic responsiveness of tissues from rat made hypertensive by short-isolation. *Br J Pharmacol.* 64:129. 1978.
- Bernard D.M. Recherches experimentales sur l'opium et ses alcaloids. *Comp Rwnsua Acad Sci.* 59:406. 1964.
- Bhoola K.D., Pay S. Opioid inhibition of adenylate cyclase in the striatum and vas deferens of the rat. *Br J Pharmacol.* 89:109. 1986.
- Bianchi G., Tenconi L.T., Lucca R. Effect in the conscious dog of constriction of the renal artery to a sole remaining kidney on hemodynamics, sodium balance, body fluid volumes, plasma renin concentration and pressor responsiveness to angiotensin. *clin Sci.* 38:741. 1970.
- Bjorklund A., Nobin A. Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cell groups in the rat diencephalon. *Brain Res.* 51:193. 1973.
- Blackburn T., Borkowsky K.R., Friend J. y Rance M.J. On the mechanism of kappa-opioid-induced diuresis. *Br J Pharmacol.* 89:593, 1986.
- Blaschko H. The specific action of L-dopa decarboxylase. *J. Physiol.* 96:50. 1939.
- Blaustein M.P. sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reasement and a hypotesis. *Am J Physiol.* 232:C165. 1977.
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Smell, C.R. *Peptides: chemistry, structure and biology.* Ed. Ann Arbor Sci Publi Michigan. 609, 1975.

- Bradford H.F. Chemical neurobiology. An introduction to neurochemistry. Freeman W.H. (ed). Freeman Co, Nueva York. 1986.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *anal Biochem.* 72:248. 1976.
- Brain P. What does individual housing mean to a mouse?. *Life Sci.* 16:187. 1985.
- Brennan P.J., Greenberg G., Miall W.E., Thompson S.G. Seasonal variation in arterial blood pressure. *Br Med J.* 285:919. 1982.
- Brown, M.R., Hauger, R, Fisher, L.A. Autonomic of corticotropin-releasing factor in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res:* 441:33, 1988.
- Buckley J.P., Ferrario C.M. Central nervous mechanisms in hypertension. Raven Press. Nueva York. 1981.
- Buñag R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol.* 34:279, 1973.
- Cannon W.B. Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* 9:399, 1929.
- Chance W.T., White A.C., Krynock G.M., Rosecrans J.A. Autoanalgesia: behaviourally activated antinociception. *Eur J Pharmacol.* 44:283, 1977.
- Chesselet M.F., Cheramy A., Reisine T.D., Lubetzki C., Glowinsky J., Fournie-Zalusky M.C. y Roques B.P. Effects of various opiates including delta and mu agonists on dopamine release from nigrostriatal dopaminergic neurous in vitro and in vivo in the cat. *Life Sci.* 31:2291, 1982.
- Childers S.R. Opioid-receptor coupled second messenger system. *Life Sci.* 48:1991. 1991.
- Chrousos G.P., Loriaux D.L. Gold P.W. The concept of stress and its historical development. En: *Mechanisms of physical and emotional stress.* Cheousos G.P., Loriaux D.L., Gold P.W. (eds). Nueva York. Plenum Press. 3, 1988.
- Clark J.A., Liu L., Price M., Hersh B., Edelson M., Pasternak G.W. k opiate receptor multiplicity: Evidence for two 450-488 sensitive kappa₁ subtypes and novel kappa₃ subtype. *J Pharmacol Exp ther.* 251: 461. 1989.
- Cole B.J., Robbins T.W. Dissociable effects of lesions to the dorsal or ventral noradrenergic bundle on the acquisition, performance and extinction of aversive conditioning. *Behav Neurosc.* 101:476. 1987.
- Cole B.J., Robbins T.W., Everitt B.J. Lesions of the dorsal noradrenergic bundle simultaneously enhance and reduce responsivity to no relty in good reference test. *Brain Res Rev.* 13:325. 1988.

- Connell J.M.C. Essential hypertension: rational pharmacotherapy. *Treds Pharmacol Sci.* 10:412. 1986.
- Cools A.R., Brachten R., Heeren D., Willemsen A., Eilenbrock B. Search after neurobiological prapile of individual-specific features of Wistar rats. *Brain Research Bulletin* 24:49. 1990.
- Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press. New York. 1986.
- Costa T., Klinz F.J., Vachon L., Hertz A. Opioid receptors are coupled tightly to G proteins but loosely to adenylate cyclase in NG 108-15 membranes. *Mol Pharmacol.* 34:744. 1988.
- Cox B.M., Werling L.L. Opioid tolerance and dependence. En: *The biological bases of drug tolerance and dependence.* Pratt J.A. (ed.). Academic Press. Londres. 199. 1991.
- Cryer P.E. Physiology and patophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N Engl J Med.* 303:436. 1980.
- Cryer P.E. Diseases of the sympathochromaggin system. En: *Endocrinology and metabolism.* Felig P., Baxter J.D., Broadus A.E. (eds). 2nd ed. New York. McGraw-Hill 651, 1981.
- Dahlstrom A., Fuxe K. Evidence for the existance of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand.* 62:1. 1964.
- Dampney R.A.L., Moon E.A. Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia. *Am J Physiol.* 239:H349. 1980.
- Dargie H.J., Franklin S.C., Reid J.L. The sympathetic nervous system and renovascular hypertension in the rat. *Brit J Pharmacol.* 56:365. 1976.
- De Montis M.G., Devoto A., Preti A., Tagliamonte A. Differential effect of mu, kappa and delta opioid agonists on adenylate cyclase activity. *J Neurosci Res.* 17:435. 1987.
- De Souza E.B., Grigoriadis D.E., Webster E.L. Role of brain, pituitary and spleen corticotropin-releasing factor receptors in the stress response. En: *Stress revisited.* 1. Neuroendocrinology of stress. Jasmin G., Cantin M. (eds.) *Methods Achieve Exp Pathol.* Basel, Karger. 14:23. 1991.
- De Wardener H.E., Mc Gregor G.A. Concept of natriuretic Hormone. *Physiol Rev.* 65:658. 1985.
- Delbarre B., Casset-Senon D., Delbarre G., Sestillange P., Christin O. Naloxone effects on blood pressure, analgesia and diuresis in spontaneous hypertensive and normotensive rats. *Neurosci Lett.* 30:167. 1982.

- Dunn A.J. Stress-related changes in cerebral catecholamine and indoleamine metabolism: lack of effect of adrenalectomy and corticosterone. *J Neurochem.* 51:406. 1988.
- Eipper B.A., Mains R.E. Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr Rev.* 1:1. 1980.
- Elsworth J.D., Roth R.H., Redmond D.E.Jr. Relative importance of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and 3,4-dihydroxyphenylglycol as norepinephrine metabolites in rat, monkey and humans. *J Neurochem.* 41:786. 1983.
- Emmerson P.J., Liu M.R., Woods J.H. Medzihradsky F. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 271: 1630, 1994.
- Erinoff L., Keller A., Oparil S. Prevention of hypertension in the SH rat: effect of differential catecholamine depletion. *Proc Soc Exp Biol.* 150:748. 1975.
- Fennesy M.R., Rattray J.F. Cardiovascular effects of intravenous morphine in the anesthetized rat. *Eur J Pharmacol.* 14:1. 1971.
- Feuerstein G., Molineaux C.J., Rosenberg J.C., Faden A.I., Cox B.M. Dynorphins and leu-enkephalin in brain nuclei and pituitary of WKY and SHR rats. *Peptides* 4:225. 1983.
- Feuerstein G., Molineaux C.J., Rosenberger J.G., Zerbe R.L., Cox B.M., Faden A.I. Hemorrhagic shock and the central vasopressing and opioid peptide system of rats. *Am J Physiol.* 249:E244. 1985.
- Florentino A., Jimenez I., Naranjo J.R., Urdin M.C., Fuentes J.A. Hipontensive effect of naloxone on high blood pressure induced. *Life Sci.* 41:2445. 1987.
- Folkow M.D. Psychosocial and central nervous influences in primary hypertension. *Circulation.* 76:1. 1987.
- Fraioli F., Panerai A.E., Santoro C., Fabbri A., Santorio F., Isidori A. Control of gonadotropin secretion in man: role of opioid peptides. *Horm Metab Res.* 14:312. 1982.
- Frey E., Keabian J. A m-opiate receptor in 7315c tumor tissue mediates inhibition of immunoreactive prolactin release and adenylate cyclase activity. *Endocrinology.* 115:1797. 1984.
- Fuentes J.A., Fernández-Tomé P., Alasua A., Florentino A., Jimenez I., Parra L., Montero S., Iglesias T., Castro A. El sistema nervioso central en la fisiopatología de la hipertensión arterial. En: *Actualización clínica: Hipertensión arterial.* Fundación Mapfre Medicina. Madrid. 93. 1991.

- Fuller R.W. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 22:31. 1982.
- Furuhashi N., Takahashi Y., Kono H., Shinkawa O., Fukaya T., Suzuki M. Sex-difference in the human peripheral plasma β -endorphin and β -lipotropin levels. *Gynecol Obstet Invest.* 17:145. 1984.
- Fuxe K., Hökfelt T., Bolme P., Goldstein M., Johansson O., Jonsson G., Lidbrink P., Ljungdahl ., Sachs C. The topography of central catecholamine pathways in relation to possible role in blood pressure control. En: *Central action of drugs in blood pressure regulation.* Davies D.S. y Reid. J.S. (eds) Pitman Medical, Londres. 8. 1975.
- Galeno T.M., Van Hoesen G.W., Brody M.J. Central amygdaloid nucleus lesions attenuates exaggerated hemodynamic responses to noisestress in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 291:249. 1984.
- Ganten D., Uunger T., Ssimon W., Schaz K., Scholkens B., Mann J.F.E., Speck G., Lang R., Rascher W. Central peptidergic stimulation: focus on cardiovascular actions of angiotensin on opioid peptides. En: *Central nervous system. Mechanisms in hypertension.* Buckley J.P., Ferrario C.M. Raven Press. Nueva York. 6:265. 1981.
- Gardiner S.M., Bennet T. The effects of short-term isolation on systolic blood pressure and heart rate in rats. *Med Biol.* 55:325. 1977.
- Gill, G.N. ACTH regulation of the adrenal cortex. En: *Pharmacology of adrenal cortical hormones.* Gill G.N. (ed). New York: Pergamon. 35, 1979.
- Gill G.N. Biosynthesis, secretion and metabolism of hormones. En: *Endocrinology and metabolism.* Feling P., Baxter J.D., Broads A.E. (eds) 2nd ed. New York McGraw-Hill. 39, 1987.
- Glavin G.B., Murison R., Overmier J.B. The neurobiology of stress ulcers. *Brain Res Rev.* 16: 301. 1991.
- Glowinski J., Iversen L.L. Regional studies of catecholamines in the rat brain I *J Neurochem.* 13: 655. 1966.
- Goldstein A., Looney L.J., Pal B.K. Sterospecific and non specific interaction of the morphine congener levorphanol in subcellular fraction of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 68: 742. 1971.
- Goldstein D.S. Plasma catecholamines and essential hypertension. An analitical review. *Hypertension.* 5:86. 1983.
- Goldstein D.S. Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillière's Clin Endocrinol Matebol.* 1:253. 1987.

- Guillemin R., Vargo T., Rossier J., Minick S., Ling N., Rivier C., Wate W., Bloom F. Beta-endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science*. 197:1367. 1977.
- Gulati A., Ramarao P y Bhargava H.N. The binding of ³H-Damgo to discrete brain regions and spinal cord of spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) normotensive rats. *Eur J Pharmacol*. 183:848. 1990.
- Gulati A., Bhargava H.N. Characteristics of central binding sites for ³H DAMGO in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 47(2): 159. 1990.
- Haas D.A., George S.R. Neuropeptide Y- induced effects on hypothalamic corticotropin-releasing factor content and release are dependent on noradrenergic/adrenergic neurotransmission. *Brain Res*. 498:333. 1989.
- Hallback M., Folkow B. Cardiovascular responses to acute mental "stress" in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*. 9:684. 1974.
- Hamet P., Malo D., Temblay J. Genetic basis of increased sensitivity to environmental stress in hypertension. En: *Stress revisited. 2. Systemic effects of stress*. Jasmin G., Proschek L. (eds.) *Methods Achieve Exp Pathol*. Basel, Karger. 15:27. 1991.
- Hammond V.A., Jhonston D.G. A semi-automated assay for plasma catecholamines using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chim Acta*. 137:87. 1984.
- Harada H., Ueda H., Wada Y., Katada T., Ui M., Satoh M. Phosphorylation of m-opioid receptor- a putative mechanism of selective uncoupling of receptor- G_i interaction, measurement with low- K_m GTPase and guanine nucleotide- sensitive agonist binding. *Neurosci Lett*. 100:221. 1989.
- Harris G.W. Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev*. 28:134. 1948.
- Heikkila, R.E., Cohen, G. In *chemical tools in catecholamine research*. Jonsson G., Malmfos T., Sachs C.H. (eds). Amsterdam: Nort-Holland 1:7. 1975.
- Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. Interleukin 6 and the acute phase response. *Biochem J*. 265:621. 1990.
- Henry J.P., Liu Y.Y., Nadra W.E., Oian C., Mormede P., Lemaire V., Ely D. y Hendley E.D. Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains rats. *Hypertension* 21: 714. 1993.
- Hescheler J., Rosenthal W., Trantwein W., Schultz G. The GTP-binding protein, G_o regulates neuronal calcium channels. *Nature*. 325:445. 1987.
- Hnatowich R.J., Labella F.S., Kierman K., Glavin G.B. Cold-restrain stress reduces ³H-endorphine binding to rat brain membranes: influence of acute and chronic morphine and naloxone. *Brain Res*. 380:107. 1986.

- Hockfelt, T. A, Ljungdahl, L, Terenius, R, Elde, G., Nilson: immunohistochemical analysis of peptide pathanays possibly related to pain and analgesia. Proc Natl Acad Sci. 74: 3081. 1977.
- Hoffman A., Roelandt J.T.R.C., Boomsma F. Hemodynamics plasma noradrenaline and plasma renin in hypertensive and normotensive teenagers. Clin Sci. 61:169. 1981.
- Höckfelt T., Fuxe K., Goldstein M., Johansson O. Evidence for adrenalin neurons in the rat brain. Acta Physiol Scand. 89:286. 1973.
- Holaday J.W., Ruvio B.A., Robles L.E., Johnson C.E., D'amato R.J. M154,129, a putative delta antagonist, reverses endotoxic shock without altering morphine analgesia. Life Sci. 31:2209. 1982.
- Holaday J.W. Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 23:541. 1983.
- Holaday J.W. Endogenous opioids and their receptors. Current Concepts Col. Upjohn. Michigan. 1985.
- Huges, J. Isolation of an endogenous compound from the brian with pharmacological properties similar to morphine. Brain Res 88: 295. 1975.
- Hughes J. Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. Br Med Bull. 39:17. 1983.
- Hulse G.K., Coleman G.L. Effects of stress on tissue and plasma levels of immunoreactive β -endorphin in ovariectomized rats primed with oestrogen an progesterone. J Endocrinol. 100:277. 1984.
- Hunter T. The regulation of transcription by phosphorylation. Cell 70:375. 1992.
- Iglesias T., Jimenez I., Montero S., Fuentes J.A. Stress-induced hypertension: effects of adrenalectomy and corticosterone replacement. Life Sci. 49:979. 1991.
- Iglesias T., Montero S., Otero M.J., Parra L., Fuentes J.A. Peproenkephalin RNA increases in the hypothalamus of rats stressed by social deprivation. Cell Mol Neurobiol. 12: 547. 1992.
- Izenwasser S., Buzas B., Cox B.M. Differential regulation of adenylyl cyclase activity by mu and delta opioids in rat caudate putamen and nucleus accumbens. J Pharmacol Exp Ther. 267: 145. 1993.
- Jiang H.K., McGinty J.F. y Hong J.S. Differential modulation of striatonigral dymorphin and enkephalin by dopamine receptor subtypes. Brain Res. 507: 57. 1990.
- Jimenez I. Implicación de los péptidos opioides y de las catecolaminas cerebrales en la respuesta hipertensiva al estres por privación social. Tesis doctoral. facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 1990.

- Jimenez I., Iglesias T.Y., Fuentes J.A. Stereoselectivity and subtype of the opiate receptor involved in stress-induced hypertension. *Eur J Pharmacol.* 182:155. 1990.
- Jiménez I., Fuentes J.A. Subchronic treatment with morphine inhibits the hypertension induced by isolation stress in the rat. *Neuropharmacology* 32:223. 1993.
- Jonsson G. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Ann Rev Neurosci.* 3:169. 1980
- Julius S., Pascual A.V., Sannerstedt R. Relationship between cardiac output and peripheral resistance in borderline hypertension. *Circulation.* 43:382. 1971.
- Julius S., Johnson E.H. Stress, autonomic hyperactivity and essential hypertension: an enigma. *J Hypertens.* 3:S11. 1985.
- Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Nada M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S., Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin Precursor. *Nature.* 298:245. 1982.
- Kalia M., Fuxe K., Goldstein M. Rat medulla oblongata. II Dopaminergic, noradrenergic and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol.* 233:350. 1985.
- Kalin N.H., Carnes M., Barksdale C.M., Shelton S.E., Stewart R.D., Risch S.C. Effects of acute behavioural stress on plasma and cerebrospinal fluid ACTH and beta-endorphin in rhesus monkeys. *Neuroendocrinology.* 40:97. 1985.
- Kalivas P.W. y Abhold R. Enkephalin release into the ventral tegmental area in response to stress: modulation of mesocorticolimbic dopamine. *Brain Res.* 414:339. 1987.
- Kant G.J., Mougey E.H., Meyerhoff J.L. Diurnal variation in neuroendocrine response to stress in rats: plasma ACTH, beta-endorphin, beta-LPH, corticosterone, prolactin and pituitary cyclic AMP responses. *Neuroendocrinology.* 43:383. 1986.
- Kayaalp S.O., Kaymakcalan S. A comparative study of the effects of morphine unanesthetized and anesthetized cats. *Br J Pharmacol.* 26:196. 1966.
- Kehoe, P., Boylan, C., Shoemaker, W. Differential effects of specific endogenous opioid system on affective behaviors in neonatal rats. *Soc. Neurosci Abstr.* 16:211. 1990.
- Keller-Wood M.E., Dallman M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 5:1. 1984.
- Khachaturian H., Lewis M.E., Tson K., Watson S.J. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Gaba and neuropeptides in the CNS.* Elsevier, Amsterdam. Part I:216. 1985
- Kiang J.G., Wei E.T. Sensitivity to morphine-evoked bradycardia in rats is modified by dynorphin (1-13), leu and met-enkephalin. *J Pharmacol Exp Ther.* 229:469. 1984.

- Korner P.I., West M.J., Shaw J., Vther J.B. Steady-state properties of the baroreceptor-heart rate reflex in essential hypertension in man. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1:65. 1974.
- Korner P.I., Oliver J.R., Reynoldson J.A., Head G.A., Carson V.J., Walker M. McD. Cardiovascular and behavioural effects of intracisternal 6-hydroxydopamine in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 53:83. 1978.
- Kosterlitz H.W., Paterson S.J., Robson L.E. Characterization of kappa subtype of opiate receptor in the guinea pig brain. *Br. J. Pharmacol.* 68: 333. 1981.
- Kostrzewa R.M., Jacobowitz D.M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol. Rev.* 26:199. 1974.
- Kostrzewa R.M. Neurotoxins that affect central and peripheral catecholamine neurons. En: *Drugs as tools in neurotransmitter research.* Boulton A.A., Baker G.B., Juorio A.V. (eds.). Humana Press, New Jersey. 1. 1989.
- Krays, V., Beutler, B., Huez, G. Translational control mediated by UA rich sequences. *Enzyme* 44:197. 1990.
- Krishnan K.R.R., Doraiswamy P.M., Venkataraman S. Current concepts in hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation. En: *Stress, neuropeptides and systemic disease.* McCubbin J.A., Kayfmann P.G., Nemeroff C.B. (eds.) San Diego Academic Press, Inc. 19, 1991.
- Kubo T., Hashimoto M. Effects of intraventricular and intraspinal 6-hydroxydopamine on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn.* 232:166. 1978.
- Kvetňanský R., McCarty R., Thoa N.B., Lake C.R., Kopin I.J. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization. *Am J Physiol.* 236:H457. 1979.
- Law P.Y., McGinn T.M., Wick M.J., Erikson L.J., Evans C., Loh H.H. Analysis of Delta-opioid Receptor activities stably expressed in CHO cell lines: Function of Receptor density?. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1686. 1994.
- Le J., Vilcek J. Biology of disease. IL-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase response. *Lab Invest.* 61:588. 1989.
- Lefkowitz R.J., Hoffman, B.B., Taylor, P. Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. En: *Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics.* 8th ed. Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S. (eds). Nueva York. Pergamon Press. 84. 1990.
- Legon S., Glover D.M., Hughes J., Lowry P.J., Rigby P.W.J., Watson C.I. Nucleic acid research. 10:7905. 1982.

- Levine J.D., Taiwo Y.O. Involvement of the m-opiate receptor in peripheral analgesia. *Neurosci.* 32:571. 1989.
- Lewis J.W, Cannon J.T. y Liebeskind J.C. Opioid and non-opioid mechanisms of stress analgesic. *Science* 208: 623, 1980.
- Lewis M.E., Young E.A., Houghton R.A., Akil H., Watson S.J. Binding of ³H dynorphin to apparent kappaopioid receptors indeep layers guinea pig cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 98:149. 1984.
- Li S.J., Wong S.D., Hong J.S., Igenito A.J. Age-related changes in opioid peptide cocentrations in brain and pituitary of spontaneously hypertensive rats: Effect of antihypertensive drugs and comparison with deoxycorticosterone acetate and salt hypertension. *Pharmacology* 44: 245. 1992.
- Lightman S.L., Todd B.J., Everitt M.J. Role of lateral tegmental noradrenergic neurons in the vasopressin response to hypertonic saline. *Neurosci Lett.* 42:55. 1983.
- Lightman S.L., Todd B.J., Everitt M.J. Ascending noradrenrgic projections from the brainstem: evidence for a major role in the regulation of blood pressure and vasopressin secretion. *Exp Brain Res.* 55:145. 1984a.
- Lightman S.L., Todd B.J., Everitt M.J., Brown M.J. Ascending brainstem noradrenergic pathways modulate the renin response to haemorrhage. *Clin Sci.* 67:269. 1984b.
- Lightman S.L., Young W.S. III. Changes in Hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. *Nature.* 328:643. 1987.
- Lilly M.P., De Maria E.J., Bruhn T.O. Potentiated cortisol response to paired hemorrhage: role of angiotensinand vasopressin. *Am J. Physiol,* 257: R118. 1989.
- Lim A.T.W., Funder J.W. Stress-induced changes in plasma pituitary and hypothalamic immunoreactive beta-endorphin: effects of diurnal variation, adrenalectomy, corticosteroids and opiate agonists and antagonists. *Neuroendocrinology.* 36:225. 1983.
- Lindvall O., Björklund A. The organization of the ascending catecholamine neuron system in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand.* Suppl. 412:1. 1974.
- Livett B.G., Dean D.M., Whelan L.G., Udenfriend S., Rossier J. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. *Nature.* 289:317. 1981.
- Loh H.H., Cho T.M., Wu Y.C., Way E.L. Stereospecific binding of narcotic to brain cerebrosides. *Life Sci.* 14:223 I. 1974.
- Lord J.A.H., Waterfield A.A., Hughes J., Kosterlitz H.W. Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors. *Nature.* 267:495. 1977.

- Loughlin S.E., An A., Leslie F.M. Opioid receptor changes in weare mouse striatum. *Brain Res.* 585:149. 1992.
- Louis W.J., Conway E.L., Howes L.G., Maccarrone C., Beart P.M., Jarrott B. Neurotransmitters and neuropeptides in blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 65:1633. 1987.
- Lowry, P.J. Pro-opiocortin peptides and adrenal mitogenesis. En: *The adrenal gland and hypertension.* Mantero F., Biglieri E.G., Funder J.W. (eds). Nueva York. Raven Press. 1, 1985.
- Majled N.H., Lason W. Przewlocka B., Przewlocki R. Brain and peripheral opioids after changes in ingestive behavior. *Neuroendocrinology* 42:267, 1986.
- Malo D., Schlager G., Tremblay J., Hamet P. Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension.* 14:121. 1989.
- Manson J.W. A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res.* 8:323. 1971.
- Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H., Watson S.J. Anatomy of cardiovascular an sympthoadrenal responses to stress. *Am J Physiol.* 257:R901. 1988.
- Mansour A., Khachaturian H., Levis M.E., Akil H., Watson S.J. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 11: 308. 1988.
- Mansour A., Watson S.J. Anatomical distribution of opioid receptors in mammaliam: an overview. En *Opioids.* A. Herz (ed.). Springer-Verlag Berlin. 79, 1993.
- Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Huppler R.E., Gilbert P.E. The effect of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphina-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197:517. 1976.
- Masuyama Y., Nishimura T., Nishio I., Kuchii M. Noradrenaline clearance in hypertensive patients with various degrees of renal function. *Clin Sci.* 57:213. 1979.
- McConnaughey M.H., Wong S.C., Ingenito A.J. Dymorphin receptor changes in hippocampus of the spontaneously hypertensive rat. *Pharmacology* 45:52. 1992.
- Mc Cubbin J.A., Surwit R.S., Williams R.B.Jr. Opioid dysfunction and risk for hypertension: naloxone and blood pressure types of stress. *Psychosom Med.* 50:8. 1988.
- Mc Dowell J., Kilchen I. Development of opioid systems: peptides, receptors and pharmacology. *Brain Res Rev.* 12:397. 1987.
- Metzger J.M., Stein E.A. Beta-endorphin and sprint training. *Life Sci.* 34:1541. 1984.

- Mitchell P.J., Tjian, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science*, 245: 377. 1989.
- Montero S., Fuentes J.A., Fernández-Tomé P. Lesions of the ventral noradrenergic bundle prevent the rise in blood pressure induced by social deprivation stress in the rat. *Cel Mol Neurobiol.* 10:497. 1990.
- Montero S. Implicación del sistema noradrenérgico central en la respuesta hipertensiva al estrés por privación social. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 1992.
- Morril C., Wolfgang D., Levine M.A. Waud G.S. Stress alters adenylyl cyclase activity in the pituitary and frontal cortex of the rat. *Life Sci.* 53:1719. 1993.
- Mulder A., Hogenboom F., Wardah G., Schoffemeer A.N.M. Morphine and enkephalins potently inhibit ³H-noradrenaline release from rat brain cortex synaptosomes. Further evidence for a presynaptic localization of mu-opioid receptors. *J Neurochem.* 48:1043. 1987.
- Munck A., Naray-Fejes-Toth A. The ups and dows of glucocorticoid physiology permissive and suppressive effect revisited. *Molec Cell Endocr.* 90:C1. 1992.
- Nakao K., Nakai Y., Jingami H., Oki S., Fukata J., Imura H. Substantial rise of plasma beta-endorphin levels after insulin-induced hypoglycemia in human subjects. *J Endocrinol Metab.* 49:838. 1979.
- Nakanishi S., Inove A.M., Kita T., Nakamura M., Chang A.C., Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. 278:423. 1979.
- Nakata T., Bernard W., Kogosov E., Alexander N. Effect of enviromental stress on release of norepinephrine in posterior nucleus of the hypothalamus in awake rats: role of sinoaortic nerves. *Life Sci.* 48:2021. 1991.
- Naranjo J.R., Fuentes J.A. Association between hypoalgesia and hypertension in rats after short-term isolation. *Neuropharmacology.* 24:167. 1985.
- Negri L., Potenza R.L., Corsi R., Melchiorri P. Evidence for two subtypes of d opioid receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 192:335. 1991.
- Negus S.S., Burke T.F., Medzihradsky F., Woods J.H. Effects of opioid agonists selective for μ , k and δ opioid receptors on schedule-controlled responding in rhesus monkeys: Antagonism by guadazocine. *J Pharmacol Exp Ther.* 267: 896. 1993.
- North R.A. Opioid receptor types and membrane ion channels. *Trends in Neurosci.* 9:114. 1986.

- Nygren L.G., Olson L. A new major projection from locus coeruleus: the main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res.* 132:85. 1977.
- Ohlsson O., Henningsen N.C. Blood pressure, cardiac output and systemic vascular resistance during rest, muscle work, cold pressure test and psychological stress. *Acta Med Scan.* 212:329. 1982.
- Page I.H. Pathogenesis of arterial hypertension. *JAMA.* 140:451. 1949.
- Palkovits M. The anatomy of central cardiovascular neurons. En: Basic aspects and their role in cardiovascular functions. Fuxe K., Goldstein M., Hökfelt B., Hökfelt T. (eds.). Pergamon Press. Oxford. 3. 1980.
- Parra L. Estudio de la reactividad vascular en ratas sometidas a estrés por privación social: implicación del sistema opioide. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 1993.
- Pasternac A., Talajic M. The effects of stress, emotion and behavior on the heart. en: Stress revisited. 2. Systemic effects of stress. Jasmin G., Proshki. (eds.) *Methods Achieve Exp Pathol.* Basel, Karger. 15:47. 1991.
- Pasternak G.W., Snyder S.H. Opiate receptor binding: Effects of enzymatic treatments. *Mol Pharmacol.* 10:183. 1974.
- Patel K.P., Schmid P.G. The role of central noradrenergic pathways in the actions of vasodepressing on baroreflex control of circulation. En *Brain peptides and catecholamines in cardiovascular regulation.* Buckley J.P., Ferrario C.M. (eds.). Raven Press. Nueva York. 53. 1987.
- Paxinos S y Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Nueva York.
- Pert C.B., Snyder S.H. Opiate receptors: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011. 1973.
- Petkov V.V., Konstantinova T., Grachovska T. Changes in brain opiate receptors in rats with isolation syndrome. *Pharmacol Res Commun.* 17:575. 1985.
- Pfeffer M.A., Frohlich E.D., Pfeffer J.M. Pathophysiological implications of the increased cardiac output of young spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 34:235. 1974.
- Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Weiss A.K. Development of SHR hypertension and cardiac hypertrophy during prolonged beta blockade. *Am J Physiol.* 232:H639. 1977.
- Pfeiffer A. y Herz A. Endocrine actions of opioids. *Horm Metab Res.* 26:386. 1984.
- Philipp Th., Distler A., Cordes U. Sympathetic nervous system and blood-pressure control in essential hypertension. *Lancet.* ii:959. 1978.

- Pohopecky, L., Worthan, R. Adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Pharmacol Rev.* 23:1. 1971.
- Portoghese P.S. A new concept of the mode of interaction of narcotic analgesic with receptors. *J. Med. Chem.* 8:609. 1965.
- Porreca F., Mosberg H.I., Omnaas J.R., Burks T.F., Cowan A. Supraespal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240:890. 1987.
- Proudfoot, N. Poly (A) signals. *Cell* 64: 671. 1991.
- Przewlocki R., Lason W., Holtt V., Silbernig J. y Herz A. The influence of chronic stress on multiple opioid peptide systems in the rat: pronounced effects upon dymorphin in spinal cord. *Brain Res.* 431: 213. 1987.
- Przewlocki R., Majeed N.H., Wedzony K., Przewlocka B. The effect of stress on the opioid peptide systems in the rat nucleus accumbens. En: *Stress: neurochemical and humoral mechanism.* Van Coon G.R., Kvetnansky R., Carthy R., Axelrod J. (eds) Mc Gordon and Breach. New york. 155. 1989.
- Przewlocki R. Opioid receptor types and subtypes: relevance to function and drug desing. En: *Towards a new pharmacotherapy of pain.* Basbaum A.J., Besson J.M. (eds). Nueva York. 227. 1991.
- Pullicino E.A., Carli F., Poole S. The relationship between circulating concentrations of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF) and the acute phase response to elective surgery and accidental injury. *Lymphokine Res.* 9:231. 1990.
- Puschett J.B. Cationes e hipertensión arterial. *Rev Clin Esp.* 177:303. 1985.
- Quock R.M., Vaughn L.K., Kouchich F.J. Influence of chronic naloxone treatment on development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 325:88. 1984.
- Ramabadram K., Bansinath M. endogenous opioid system modulation: a new addition to the therapeutic armamentarium in the treatment of shock and spinal cord injury. *Asia Pac J Pharmacol.* 3:111. 1988.
- Rascher W., Dietz R., Schomig J., Weber J., Gross F. Plasma catecholamine levels and vascular response in deoxicorticosterone acetate hypertension of rats. *Clin Sci.* 59:315. 1980.
- Reis D.J., Ross C., Granata A.R., Ruggiero D.A. Role of C₁ area rostroventrolateral medulla in cardiovascular control. En: *Brain peptides and catecholamines in cardiovascular regulation.* J.P. Buckley., C.M. Ferrario. (eds.) Raven Press. Nueva York.1. 1987.

- Rhee H.M., Hendrix D.W. Effects of stress intensity and modality on cardiovascular system: an involvement of opioid system. En: *Molecular biology of stress. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology New Series.* Brezwitz S., Zinder O. (eds.). 97:87. 1989.
- Rodriguez R.E. Aspectos bioquímicos y fisiológicos de los péptidos opioides. En: *Péptidos reguladores gastrointestinales y recepción y transducción de señales generadas por hormonas polipeptídicas, tiroideas y esteroideas.* Blázquez E y Tamarit J. (eds.). Fundación Ramón Areces. Madrid. 205. 1992.
- Rogers H, Henderson G., Activation of mu- and delta-opioid receptors present on the same nerve terminals depresses transmitter release in the mouse hypogastric ganglion. 101:505. 1990.
- Rossier J., Guillemin R., Bloom F. Foot-shock induced stress decreases leu⁵-enkephalin immunoreactivity in rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol.* 48:465. 1978.
- Rossier J., French E., Rivier C., Shibasaki T., Guillemin R., Bloom F. Stress-induced release of prolactin blockade by dexametasone and naloxone may indicate β -endorphin mediation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:666. 1980.
- Rothman R.B. Beta-FNA binds irreversibly to the opiate receptor complex: in vivo and in vitro evidence. *J Pharmacol Exp Ther.* 247:405. 1988.
- Saavedra J.M. Naloxane reversal decrease in pain sensitivity in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 201:471. 1981.
- Sachs A.B. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74: 413. 1993.
- Sachs C.H., Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem. Pharmacol.* 24:1. 1975.
- Saffran M., Schally A.V., Benfey B.G. Stimulation of the release of corticotropin from the adenohypophysis by a neurohypophyseal factor. *Endocrinology.* 57:439. 1955.
- Sakaue, M., Hoffman, J.B.B. Glucocorticoids induce transcription and expression of the $\alpha_1\beta$ adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cell. *J Clin Invest.* 88:385. 1991.
- Sanchez-Blazquez P y Garzon J. evaluation of δ receptor mediation of supraespal opioid analgesia by in vivo protection against the β -funaltrexamine antagonist effect. *Eur J Pharmacol.* 159:9. 1989.
- Saner A., Thoenen H. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol.* 7:147. 1971.
- Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G. Interleukin 1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science.* 238:522. 1987.

- Sapolsky R.M. El estrés en los animales. *Investigación y ciencia*. 162:68. 1990.
- Sautel M., Sacquet J., Vincent M., Sassard J. NE turnover in genetically hypertensive rats of Lyon strain. I. Brain nuclei. *Am J Physiol*. 255:H729. 1988.
- Schaz K., Stock G., Simon W., Schlor K.H., Unger T., Rockhold R.N., Ganten D. Enkephalin effects on blood pressure, heart rate and baroreceptor reflex. *Hypertension*. 2:395. 1980.
- Schoffelmeer A.N.M., Hogenboom F., Mulder A.H. Inhibition of dopamine-sensitive adenylate cyclase by opioids: possible involvement of physically associated μ - and δ -receptors. *Naunyn Schimiedeberg's Arch Pharmacol*. 335:278. 1987.
- Schoffelmeer A.N.M., Rice K.C., Jacobson A.E., Van Gelderen J.G., Hogenboom F., Heijna M.H., Mulder A.H. μ , δ and κ opioid receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain slices: Studies with fentanyl isothiocyanate. *Eur J Pharmacol*. 154:169. 1988.
- Schulz R. Aspects of opioid tolerance and dependence in peripheral nerve tissues. En: *Neurobiology of opioids*. Almeida O.F.X., Shippeberg T.S. (eds.) Springer-Verlag. Berlin. 407. 1991.
- Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*. 6:117. 1946.
- Selye H. *Stress in health and disease*. Butterwoths, Boston. 1976.
- Shapiro A.P. An experimental study of comparative responses of blood pressure to different noxious stimuli. *J Chronic Dis*. 13:293. 1961.
- Sharif N.A., Hughes J. Discrete mapping of brain μ and δ opioid receptors using selective peptides: Quantitative autoradiography, species differences and comparison with κ receptors. *Peptides*. 10:499. 1989.
- Shiffl H., Weidmann P., Meier A., Ziegler W.H. Relationship between plasma catecholamines and urinary catecholamine excretion rates in normal subjects and certain disease states. *Klin Wochenschr*. 59:837. 1981.
- Shimoda K., Yamada N., Ohi K., Tsujimoto T., Takahashi K., Takahashi S. Chronic administration of tricyclic antidepressants suppresses hypothalamus-pituitary-adrenocortical activity in male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 13:431. 1988.
- Shiomi H., Watson S.J., Kelsey J.E., Akil H. Pre-translational and post-translational mechanism for regulating beta-endorphin/ACTH cells: studies in the anterior lobe. *Endocrinology*. 119:1793. 1986.
- Simantov R., Snowman A.M., Snyder S.H. Temperature and ionic influences on opiate receptor binding. *Mol Pharmacol*. 12:977. 1976.

- Simantov R., Kuhar M.J., Uhl G.R., Snyder S.H. Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci.* 74:2167. 1977.
- Simon E.J., Hiller J.M., Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 70:1947. 1973.
- Singer, L.A. A short history of science to the nineteenth century. London: Oxford University Press. 7. 1941.
- Siri F.M., Kaner C.D. Plasma catecholamine measurements in resting and stressed conscious rats, using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sci.* 37:1923. 1985.
- Smith J.A.M., Loughlin S.E., Leslie F.E. Long-term changes in striatal opioid binding site after 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion of substantia nigra. *Soc Neurosci Abstr.* 1991.
- Snyers, L., Dewit, L., Content, J. Glucocorticoid up-regulation of high affinity interleukin 6 receptors on human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2838. 1990.
- Stein C., Millan M.J., Shippenberg T.S., Herz A. Peripheral effect of fentanyl upon nociception in inflamed tissue of the rat. *Neurosci. Lett.* 31:1205. 1988.
- Stein E.A., Hiller J.M., Simon E.J. Effects of stress on opioid receptor binding in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51:683. 1992.
- Stone E.A. y John S.M. Stress-induced increase of extracellular levels of cyclic AMP in rat cortex. *Brain Res.* 597:144. 1992.
- Stuckey P., Marra S., Minor T., Insel T.R. Changes in mu opiate receptors following inescapable shock. *Brain Res.* 476:167. 1989.
- Sudo A. Decrease in adrenaline content of various organs of the rat after 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol.* 114:79. 1985.
- Sutanto y Kloet. The use of various animal models in the study of stress and stress related phenomena. *Lab Anim.* 28:93. 1994.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E. Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann Rev Neurosci.* 6:269. 1983.
- Tanaka M., Kohno Y., Nakagawa R., Ida Y., Iimori K., Hoaki Y., Tsuda A., Nagasaki N. Naloxone enhances stress-induced increases in noradrenaline turnover in specific brain regions in rat. *Life Sci.* 30:1663. 1982.
- Tanaka M., Ida Y., Tsuda A. Naloxone, given before but not after stress exposure, enhances stress-induced increases in regional brain noradrenaline release. *Pharmacol Biochem Behav.* 29:613. 1988.

- Takayama H., Ota Z., Ogawa N. Effect on immobilization stress on neuropeptides and their receptors in the rat central nervous system. *Regul Pept.* 15: 239. 1986.
- Tempel A. Gardner E.L., Zukin R.S. Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 232: 439. 1985.
- Terenius L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesic in synaptic in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 33:377. 1973.
- Terman J.S., Shavit K., Lewis J.W., Cannon J.T., Liebeskind J.C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science.* 226:1270. 1984.
- Tominaga T., Fukata J., Naito Y. Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocorticoal steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology.* 128:526. 1991.
- Tranzer J.P., Thoenen H. Ultramorphologische veränderungen der sympatischen nervenendigungen der katzenach vorbehandlung mit 5- and 6- hydroxy-dopamin. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 257:343. 1967.
- Traynor J.R., Elliot J. d-opioid receptor subtypes and cross-talk with m-receptor. *TIPS.* 14:84. 1993.
- Trippodo N.C., Frohlich E.D. Similarities of genetic (spontaneous hypertension) in man and rat. *Circ Res.* 48:309. 1981.
- Udelsman, R., Haurwood, J.P., Millan, M.A et al. Functional corticotropin-releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system. *Nature,* 319:147. 1986.
- Udelsman, R., Holbrook N.J. Endocrine and molecular responses to surgical stress. *Curr Probl Surg,* 31:653. 1994.
- Ueda H., Harada H., Nozari H., Katada T., Ui H., Satoh M., Takagi H. Reconstitution of the rat brain m opioid receptors with purified guanine nucleotide-binding regulatory proteins G_i and G_o. *Prod Natl Acad Sci USA.* 85:7013. 1988.
- Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand.* 367:1. 1971.
- Vale W., Speiss J., Rivier C., Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that simulates the secretions of corticotropin and beta-endorphin. *Science.* 213:1394. 1981.
- Van Den Buuse M., De Kloet E.R., Versteeg D.H.G., De Jong W. Regional brain catecholamine levels and the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat: the effect of 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 301:221. 1984.

- Van Den Buuse M., Veldhuis H.D., Versteeg D.G.H., De Jong W. Substantia nigra lesions attenuate the development of hypertension and behavioural hyperreactivity in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Biochem Behavior*. 25:317. 1986.
- Van Den Buuse M., Head G.A., Korner P.I. Contribution of forebrain noradrenaline innervation of the central circulatory effects of alfa-methyldopa and 6-hydroxydopamine. *Brain Res*. 541:300. 1991.
- Van Loon G.R., Pierzchala K., Brown L.V., Brown D.R. Plasma met-enkephalin and cardiovascular responses to stress. En: *Opioid peptides and blood pressure control*. K.O. Stumpe., J. Faden., L. Craft. (eds.). Springer-Verlag. Berlin. 1. 1987.
- Vaswani K.K., Tejwani G.A. Food deprivation-induced changes in the level of opioid peptides in the pituitary and brain of the rat. *Life Sci*. 38:197. 1986.
- Vaswani K.K., Richard C.W. III., Tejwani G.A. Cold swim stress-induced changes in the levels of opioid peptides in the rat CNS and peripheral tissues. *Pharmacol Biochem Behav*. 29:163. 1988.
- Viveros O.H., Diliberto E.J. Jr., Hazum E. Opiate-like materials in the adrenal medulla: Evidence for storage and secretion with catecholamines. 16:1101. 1979.
- Vogel W.H. Stress- the neglected variable in experimental pharmacology and toxicology. *Trends Pharmacol Sci*. 8:35. 1987.
- Wagner K., Trendelenburg U. Effect of 6-hydroxydopamine on oxidative phosphorylation and on monoamine oxidase activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol*. 269:112. 1971.
- Waksman G., Hamel E., Delay-Goyet P., Roques B.P. Neural endopeptidase-24.11, m and opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study. *Brain Res*. 436:205. 1987.
- Watkins L.R., Wiertelak E.P., Maier S.F. Kappa opiate receptors mediate tail-shock induced antinociception at spinal levels. *Brain Res*. 582:1. 1992.
- Weidmann P., Schiffel H., Ziegler W.H., Gluck Z., Meier A., Kensch G. Catecholamines, sodium and renin in unilateral renal hypertension in man. *Miner Electrolyte Metab*. 7:97. 1982.
- Weiss Y.A., Safar M.E., London G.M. Repeat hemodynamic determinations in borderline hypertension. *Am J Med*. 64:382. 1978.
- Weiss J.M., Simson P.G., Simson P.E. Neurochemical basis of stress-induced depression. En: *Frontiers in stress research*. Weiner H., Florin I., Murison R., Hellhammer D. (eds) Hans Huber Publishers, Toronto. 37. 1989.

- Welch W.J. Mammalian stress response: cell, physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72:1063. 1992.
- Werz M.A., McDonald R.L. Dynorphin and neendorphin peptides decrease dorsal root ganglion neuron calcium-dependent action potential duration. *J Pharmacol Exptl Ther.* 234:49. 1985.
- Wiedemann E., Saito T., Linfoot J.A., Li C.H. Specific radioimmunoassay of human β -endorphin in unextracted plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 49:478. 1979.
- Wijnen H., Palkovits M., De Jong W., Versteeg D. Elevated adrenaline content in nuclei of medulla oblongata and the hypothalamus during the development of spontaneous hypertension. *157:191.* 1978.
- Wijnen H., Spierenburg H.A., De Kloet E.R., De Jong W., Versteeg D.H.G. Decrease in noradrenergic activity in hypothalamic nuclei during the development of spontaneous hypertension. *Brain Res.* 157:191. 1980.
- Wilson S.P., Klein R.L., Chang K.J., Gasparis M.S., Viveros O.H., Yang W.H. Are opioid peptides co-transmitters in noradrenergic vesicles of sympathetic nerves?. *Nature.* 288:707. 1980.
- Wolozin B.L., Pasternak G.W. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:6181. 1981.
- Xu H., Partilla J.S., De Costa B.R., Rice K.C., Rothman R.B. Interaction of opioid peptides and other drugs with multiple δ ncx binding sites in the rat Brain: Further evidence for heterogeneity. *Peptides* 13: 1207. 1992.
- Xu H., Partilla J.S., De Costa B.R., Rice K.C., Rothman R.B. Differential binding of opioid peptides and other drugs to two subtypes of opioid δ ncx binding sites in mouse. Brain: Further evidence for δ receptor heterogeneity. *Peptides* 14:893. 1993.
- Yang X., Gorman A.L., Dunn A.J. The involvement of central noradrenergic systems and corticotropin-releasing factor in defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 255:1064. 1990.
- Yoburn B.C., Sierra V., Lutfy K. Chronic opioid antagonist treatment: assessment of receptor upregulation. *Eur J Pharmacol.* 170:193. 1989.
- Yoburn B.C., Billings B., Duttaroy A. Opioid receptor regulation in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 265:314. 1993.
- Young W.S., Lightman S.L. Chronic stress elevates enkephalin expression in the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Mol Brain Res.* 13:111. 1992.
- Zamir N., Zamir D., Eiden L.E., Palkovits M., Brownstein M.J., Eskay R.L., Weber E., Faden A.I., Feuerstein G. Methionine and leucine enkephalin in rat

neurohypophysis: different responses to osmotic stimuli and T2 toxin. *Science*. 228:606. 1985.

Zeiler R.H, Strand F.L., Elsherif M. Electrophysiological and contractile responses of canine atrial tissue to adrenocorticotropin. *Peptides*, 3:815. 1982.

Zeman P., Alexandrova M., Kvetnansky R. Opioid mu and delta dopamine number changes in rat striatum during stress. *Endocrinol. Exp. (Bratisl.)* 22:59. 1988.

Zukin R.Z., Eghalali M., Olive D., Unterwald E.M., Tempel A. Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa₁ and kappa₂ opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4061. 1988.