

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología(Farmacognosia y
farmacología experimental)



Implicación de los péptidos opioides y las catecolaminas
cerebrales en la respuesta hipertensiva al estrés por
deprivación social

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Isabel Jiménez Bueno

Director

José Ángel Fuentes Cubero

Madrid

M^a ISABEL JIMENEZ BUENO

**IMPLICACION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES
Y DE LAS CATECOLAMINAS CEREBRALES EN LA RESPUESTA
HIPERTENSIVA AL ESTRES POR DEPRIVACION SOCIAL**

DIRECTOR: Dr. JOSE ANGEL FUENTES CUBERO

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

1990

ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DIRECTOR DEL TRABAJO: DR. JOSE ANGEL FUENTES CUBERO
PROFESOR TITULAR DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

PONENTE: DR. ANGEL VILLAR DEL FRESNO
CATEDRATICO DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



DPTO. DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

JOSE ANGEL FUENTES CUBERO, PROFESOR TITULAR DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, Y ANGEL VILLAR DEL FRESNO, CATEDRATICO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA, AMBOS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, COMO DIRECTOR Y PONENTE, RESPECTIVAMENTE

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "IMPLICACION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES Y DE LAS CATECOLAMINAS CEREBRALES EN LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRES POR DEPRIVACION SOCIAL" presentada por la Licenciada Dña. M^a ISABEL JIMENEZ BUENO, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmamos el presente en Madrid a 31 de Octubre de 1990.

Fdo. Prof. A. Villar

Fdo. Prof. J.A. Fuentes

A mis padres

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. José Angel Fuentes Cubero y con la ayuda de una beca de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Deseo expresar aquí mi más sincero y profundo agradecimiento al Dr. José Angel Fuentes Cubero, por su constante estímulo e inapreciable dirección durante la realización y elaboración de la presente tesis doctoral, y al Dr. Pedro Lorenzo por acogerme en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, U.C.M., *permitiendo, de esta forma, la realización de este proyecto.*

Al Dr. Angel Villar, por aceptar gentilmente actuar como ponente de esta tesis doctoral.

Al Dr. Javier Fernández Ruiz por su participación activa en la realización de algunos de los experimentos realizados.

A las Dras. Paz Fernandez Tomé y Angela Alsasua por prestarme su experiencia y sus valiosos consejos.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y, con especial cariño, a Antonio Castro, Teresa Iglesias, Sagrario Montero, M^a Jesús Otero, Lucía Parra, Alberto Florentino y Fernando Redondo por darme todo cuanto necesité a lo largo de estos años, su ayuda, su apoyo, su paciencia y sus risas. Y a Carmen Valenzuela y Eva Delpón por cuidarme e imbuirme su capacidad de trabajo. Sin todos ellos hubiera sido imposible la finalización de esta Tesis Doctoral.

Y a Ciru, Eugenia, M^a Mar y Javier, por la paciencia infinita que han demostrado corrigiendo, desde el principio hasta el fin, el manuscrito de esta memoria, por su colaboración en las labores reprográficas y, sobre todo, por tantas y tantas cosas que acontecieron a lo largo de estos años, estando siempre hasta el final a mi lado.

A todos gracias.

Resumen	1
<u>CAPITULO I: INTRODUCCION</u>	4
1. Evolución del concepto de estrés	5
2. Respuesta fisiológica al estrés	7
2.1. Respuesta inmediata: reacción de emergencia	8
2.1.1. Activación del sistema simpatoadrenal	8
2.1.2. Consecuencias fisiológicas de la activación del eje simpatoadrenal	8
2.2. Fase de resistencia	9
2.2.1. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	10
2.2.2. Consecuencias fisiológicas de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	11
3. Marcadores biológicos del estrés	12
4. Estrés y enfermedad	13
5. Modelos de estrés	14
5.1. Clasificación de los modelos de estrés	15
5.2. Selección e interés del modelo de privación social	16
6. Sistema opioide	17
6.1. Familias de péptidos opioides	18
6.1.1. Péptidos derivados de la proopiomelanocortina	18
6.1.2. Péptidos derivados de la proencefalina	20
6.1.3. Péptidos derivados de la prodinorfina	22
6.2. Receptores opioides	23
6.2.1. Distribución y significación fisiológica de los receptores opioides	24

6.3. Biogénesis, liberación e inactivación de los péptidos opioides	26
6.4. Mecanismo de acción	27
7. Activación del sistema opioide durante el estrés	28
7.1. Estrés agudo	29
7.1.1. Activación del sistema de la proopiomelanocortina durante el estrés agudo	30
7.1.2. Activación del sistema de la proencefalina durante el estrés agudo	31
7.1.3. Activación del sistema de la prodinorfina durante el estrés agudo	32
7.2. Estrés crónico	33
8. Control central de la presión arterial	34
8.1. Bases neuroanatómicas y neurofisiológicas en la regulación central de la presión arterial	35
8.2. Bases neuroquímicas y neurofarmacológicas en la regulación central de la presión arterial	38
8.2.1. Sistemas catecolaminérgicos en la regulación central de la presión arterial	38
8.2.1.1. Biosíntesis, liberación e inactivación de catecolaminas en el sistema nervioso central	39
8.2.1.2. Concepto de velocidad de renovación	44
8.2.1.3. Sistema adrenérgico y control central de la presión arterial	44
8.2.1.4. Sistema noradrenérgico y control central de la presión arterial	47
8.2.1.5. Sistema dopaminérgico y control central de la presión arterial	50
8.2.2. Sistema opioide en la regulación central de la presión arterial	51

8.2.2.1. Evidencias anatómicas de la participación del sistema opioide en el control central de la presión arterial	52
8.2.2.2. Evidencias farmacológicas de la participación del sistema opioide en el control central de la presión arterial	53
8.2.2.3. Evidencias clínicas de la participación del sistema opioide en el control central de la presión arterial	57
8.3. Fisiopatología de la hipertensión esencial	58
8.3.1. Control central de la presión arterial durante modificaciones comportamentales	59
8.3.2. Etiopatogénesis de la hipertensión esencial	61
8.3.3. Hipertensión y estrés	62
<u>CAPITULO II: PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS</u>	65
1. Antecedentes inmediatos del trabajo	66
1.1. Evidencias preliminares de la participación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva al estrés por privación social	66
1.2. Modificaciones de la actividad de los sistemas catecolaminérgicos centrales asociadas al estrés	67
1.3. Modulación de la liberación de catecolaminas por opioides	68
2. Objetivos	69
2.1. Aproximaciones experimentales	70
2.1.1. Experiencias "in vivo"	70
2.1.2. Experiencias "in vitro"	72
<u>CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS</u>	74
1. Fármacos y productos químicos	75

2. Animales de experimentación	75
3. Vías y pautas de administración	76
3.1. Administración intracerebroventricular	77
3.2. Administración crónica por implantación de minibombas Alzet	78
3.3. Protocolo para el desarrollo de animales dependientes de morfina	79
4. Métodos de medida de la presión arterial	80
4.1. Medida indirecta ("tail-cuff")	80
4.2. Medida directa	81
5. Test de analgesia	81
6. Técnicas quirúrgicas	82
6.1. Canulación de la aorta abdominal	82
6.2. Canulación de la arteria carótida	83
6.3. Extracción de las adrenales	83
7. Modelo de estrés	83
8. Determinaciones bioquímicas	84
8.1. Fundamentos de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	84
8.1.1. Detección electroquímica	85
8.1.2. Detección fluorimétrica	85
8.2. Determinación de la velocidad de renovación de noradrenalina, dopamina y de los niveles de adrenalina por HPLC	86
8.2.1. Preparación de las muestras	86
8.2.2. Condiciones cromatográficas para la determinación de noradrenalina, adrenalina, dopamina y DOPAC	87
8.2.3. Condiciones cromatográficas para la determinación de MHPG	87
8.2.4. Cuantificación y expresión de los resultados	88

8.3. Ensayos de fijación	89
8.3.1. Metodología de los ensayos de fijación de receptores	90
8.3.2. Fijación de ³ H-Etorfina a receptores opioides	91
8.4. Valoración de proteínas	92
8.5. Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona por radioinmunoensayo	93
8.5.1. Preparación de las muestras	93
8.5.2. Radioinmunoanálisis de corticosterona	94
8.6. Determinación de la actividad de tirosina hidroxilasa	95
9. Tratamiento estadístico de los resultados	98
<u>CAPITULO IV: RESULTADOS</u>	99
1. Estudios sobre la participación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva al estrés por privación social	100
1.1. Caracterización de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social	100
1.2. Reversión de la respuesta hipertensiva al estrés por naloxona	100
1.3. Reversión estereoespecífica de la respuesta hipertensiva al estrés por naloxona	105
1.4. Efecto de la administración aguda de morfina en animales hipertensos por privación social	105
1.5. Desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social en animales expuestos crónicamente a morfina	109
1.6. Desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social en animales tratados crónicamente con naloxona	116
2. Determinación del subtipo de receptor opioide implicado en el desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social	120
2.1. Efectos de los antagonistas selectivos del receptor delta ICI 174,864 e ICI 154,129	120

2.2. Efecto del antagonista selectivo del receptor mu beta-funaltrexamina	122
3. Estudio de los efectos cardiovasculares de agonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides en ratas normotensas	122
3.1. Efectos de la administración intracerebroventricular del agonista selectivo del receptor delta DADLE	122
3.1.1. Efectos en animal consciente	122
3.1.2. Efectos en animal anestesiado	124
3.1.3. Antagonismo por naloxona de los efectos cardiovasculares inducidos por la administración intracerebroventricular de DADLE	125
3.2. Efectos de la administración intracerebroventricular del agonista selectivo del receptor mu, DAGO	132
3.2.1. Efectos en animal consciente	132
3.2.2. Efectos en animal anestesiado	132
3.2.3. Antagonismo por naloxona de los efectos cardiovasculares inducidos por la administración intracerebroventricular de DAGO	137
3.3. Efecto de la anestesia con etiluretano sobre la fijación de ³ H - Etorfina a receptores opioides en bulbo raquídeo e hipotálamo	137
3.4. Efecto de la administración intravenosa de DADLE y DAGO en rata anestesiada	140
4. Interacción entre los sistemas opioide y catecolaminérgico a nivel central	142
4.1. Efecto del estrés por privación social sobre la actividad de los sistemas catecolaminérgicos a nivel central	142
4.1.1. Efecto del estrés por privación social sobre la velocidades de renovación de noradrenalina y dopamina y sobre los niveles de adrenalina	142
4.1.2. Efecto del estrés por privación social sobre la síntesis de catecolaminas: ensayo de actividad del enzima tirosina hidroxilasa	146

4.2. Efecto de la administración intracerebroventricular de DADLE y DAGO sobre la actividad de los sistemas catecolaminérgicos a nivel central	146
4.2.1. Efecto sobre las velocidades de renovación de noradrenalina y dopamina y sobre los niveles de adrenalina	152
4.2.2. Efecto sobre la síntesis de catecolaminas: actividad del enzima tirosina hidroxilasa	158
<u>CAPITULO V: DISCUSION</u>	163
1. Validación de la privación social como modelo de estrés y caracterización de la correspondiente respuesta hipertensiva	164
2. Implicación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva al estrés por privación social	166
2.1. Tratamientos agudos	166
2.1.1. Reversión estereoespecífica de la respuesta hipertensiva al estrés por naloxona	166
2.1.2. Potenciación de la respuesta presora a morfina en los animales privados socialmente	167
2.2. Tratamientos crónicos	169
2.2.1. Tolerancia a la respuesta hipertensiva al estrés en animales aislados tratados crónicamente con morfina	169
2.2.2. Prevención del desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social en animales tratados crónicamente con naloxona	170
3. Determinación del subtipo de receptor opioide implicado en el desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés	172
4. Efectos cardiovasculares de los agonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO	177
5. Modificación de la actividad catecolaminérgica central en el transcurso del estrés por privación social	182
6. Modificación de la actividad catecolaminérgica central por DADLE y DAGO	188

CONCLUSIONES

191

BIBLIOGRAFIA

194

ABREVIATURAS MAS EMPLEADAS

AD:	Adrenalina
CVLB:	Zona caudal ventrolateral del bulbo raquídeo
DOPAC:	Acido 3-4 dihidroxifenilacético
DADLE:	(D-Ala ² , D-Leu ⁵) encefalina
DAGO:	(D-Ala ² , N-Me-Fen ⁴ , Gli-ol ⁵) encefalina
HHA:	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
5-HT:	Serotonina
HVA:	Acido homovanílico
i.c.v.:	intracerebroventricular
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenosa
MHPG:	3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol
NA:	Noradrenalina
NTS:	Núcleo del tracto solitario
POMC:	Proopiomelanocortina
RVLB:	Zona rostral ventrolateral del bulbo raquídeo
SHR:	Ratas espontáneamente hipertensas
SNC:	Sistema nervioso central
TH:	Tirosina hidroxilasa
WKY:	Ratas Wistar-Kyoto

RESUMEN

Una de las múltiples respuestas fisiológicas que experimenta el organismo frente al estrés es un incremento de la presión arterial. Consecuentemente, el estrés puede considerarse como uno de los factores que intervienen en el desencadenamiento de la hipertensión lábil, hipertensión que puede establecerse de modo definitivo si la duración del estímulo aversivo se prolonga.

Por otro lado, a lo largo de la última década, se han acumulado un gran número de evidencias que confirman que uno de los sistemas que son activados preferentemente en el transcurso de numerosas formas experimentales de estrés es el sistema opioide.

Mediante el empleo de diversas aproximaciones farmacológicas, en la presente memoria se ha demostrado la implicación del sistema opioide central en la generación de la respuesta presora que se manifiesta en el modelo de estrés consistente en la privación social de ratas jóvenes. Las evidencias que se han obtenido apoyando este hecho incluyen la reversión estereoespecífica de la mencionada respuesta hipertensiva por el antagonista opioide inespecífico naloxona, así como su prevención tras la administración continuada del fármaco, la imposibilidad que presentan los animales dependientes de morfina para desarrollar la hipertensión y, por último, la potenciación de la respuesta presora a la administración aguda de morfina en los animales aislados. Las implicaciones fisiopatológicas de este hallazgo servirían de base para el control de algunas formas de hipertensión esencial mediante la actuación farmacológica sobre el sistema opioide.

Con posterioridad, ha sido posible precisar que, en concreto, es el subtipo de receptor mu opioide el responsable del aumento de la presión arterial que tiene lugar en este modelo de estrés. Confirmando la importancia del receptor mu opioide cerebral en la hipertensión, la activación farmacológica del mismo mediante la administración central de su agonista sintético DAGO -(D-Ala², NMe-Fen⁴, Gli-ol⁵) encefalina-, producía un incremento de la presión arterial muy superior al observado para el agonista específico del receptor delta DADLE -(D-Ala², D-Leu⁵) encefalina-.

Del mismo modo, el conocido papel de las catecolaminas cerebrales controlando el dinamismo cardiovascular y la capacidad neuromoduladora de los péptidos opioides

sobre este sistema de neurotransmisión, ha quedado patente al haberse demostrado una implicación combinada de ambos sistemas en la respuesta hipertensiva al estrés, así como en el efecto presor producido por los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO respectivamente. Así, en bulbo raquídeo el estrés se ha asociado a una disminución de la velocidad de renovación de adrenalina, mientras que en hipotálamo el aislamiento produjo una disminución tanto de la actividad noradrenérgica como adrenérgica.

Por su parte, el aumento de presión arterial inducido por los agonistas DAGO y DADLE se produce como consecuencia de una activación opioide que, a su vez, parece inducir en bulbo raquídeo una inhibición del tono noradrenérgico por parte del agonista delta, y del tono adrenérgico por lo que se refiere al efecto producido por el agonista mu.

En conclusión, el conjunto de datos expuestos ha servido para confirmar por un lado, y de manera inequívoca, la implicación del receptor mu opioide central en la respuesta hipertensiva al estrés por deprivación social, y adicionalmente la mediación del sistema catecolaminérgico central en la acción presora, provocada tanto por la activación farmacológica de los receptores delta y mu opiáceos, como por los opioides endógenos cuya liberación en el sistema nervioso central está potenciada en el transcurso del estrés. Los resultados expuestos sugieren, pues, el carácter neuromodulador del sistema opioide sobre el sistema catecolaminérgico, hipótesis que, "in vivo", carecía hasta el momento, de todo soporte experimental.

INTRODUCCION

1. EVOLUCION DEL CONCEPTO DE ESTRES

El término estrés es un concepto multifuncional cuya definición es variable dependiendo de la perspectiva desde la cual se aborde su estudio. Sin embargo, puede afirmarse, en cualquier caso, que es toda respuesta que permite al organismo afrontar las amenazas inmediatas contra su equilibrio fisiológico. Esta respuesta puede ser desencadenada ante una agresión real (factor físico del estrés) o ante la sensación de que se va a producir tal agresión (factor psicológico del estrés).

Fue el fisiólogo francés Claude Bernard quien reconoció por primera vez la importancia de los mecanismos de adaptación y afirmó en la segunda mitad del siglo XIX: "La constancia del medio interno es la condición para una existencia libre e independiente". Unos 50 años después, Walter Cannon (1932) amplió la teoría de Bernard y acuñó el término "homeostasis" para definir el conjunto de procesos fisiológicos coordinados que mantienen la constancia de las funciones vitales, y que constituyen el mecanismo adaptativo mediante el cual el organismo reacciona ante la exposición a un estímulo nocivo. Cannon definió un modelo en el que el organismo mantenía el equilibrio mediante mecanismos de retroalimentación y recalcó la importancia del sistema simpato-adrenal como responsable de la coordinación de las respuestas que se suceden en el organismo ante diversos agentes nocivos, físicos o psicológicos. Su teoría estaba basada en la observación de que la exposición a dichos agentes provoca la liberación tisular de una sustancia que denominó "simpatina" y que, posteriormente, sería identificada como adrenalina y noradrenalina. La liberación de "simpatina", según Cannon, era fundamental para desarrollar la estrategia de "fight or flight" (lucha o huida) ante las demandas del medio ambiente.

En 1936, Selye introdujo el concepto de "síndrome general de adaptación", y subrayó el papel de la glándula suprarrenal en su desarrollo. Dicho autor describió una secuencia de cambios patológicos que se observaban en el organismo cuando éste era sometido a diversos estímulos nocivos y los agrupó en tres fases:

1. Reacción de alarma: caracterizada por hipertrofia adrenal, ulceración de la mucosa y atrofia del timo y de los tejidos linfoides.

2. Fase de resistencia o de adaptación: cuyas manifestaciones pueden ser opuestas a las de la reacción de alarma.
3. Fase de agotamiento: sobreviene si la intensidad o la duración del estrés es excesiva.

Selye denominó estrés a la respuesta inespecífica del organismo ante un aumento de las exigencias del medio ambiente, y "stressors" (estresantes) a los agentes responsables de dicha respuesta.

Con posterioridad, este mismo autor (Selye 1946) denominó "enfermedades de adaptación" a una serie de trastornos debidos, no a la presencia de agentes patógenos, sino a la ausencia de la respuesta adaptativa del organismo ante los mismos. Entre estas enfermedades incluía la alergia, el insomnio y los trastornos cardiovasculares, apuntando ya entre los mismos las alteraciones en la presión arterial.

En la década de los 50, Wolff (1950) sistematizó paralelamente la vinculación del estrés con la patología, al definirlo como la respuesta biológica que, basada en patrones fisiológicos estereotipados, permiten la adaptación del organismo ante las amenazas físicas, pero no así ante las de origen psicológico, situando, de este modo, el estrés en un contexto más cercano a los procesos cognitivos.

El concepto de "síndrome general de adaptación" desarrollado por Selye da un énfasis especial a los aspectos inespecíficos de la respuesta al estrés, afirmando que los factores desencadenantes pueden ser distintos, pero que producen esencialmente la misma respuesta biológica (Selye 1970). En la actualidad, se han ido acumulando datos que indican, sin embargo, la existencia de un cierto grado de especificidad en la respuesta al estrés. J. Mason (1971) criticó el concepto de inespecificidad inherente a la teoría de Selye, señalando que todos los agentes estresantes tienen en común la capacidad de incidir sobre la esfera psicológica del organismo, cuya activación provocaría la consiguiente respuesta neuroendocrina. Su gran aportación consistió en haber sido el primero en conceder la importancia adecuada a los componentes psicológicos del estrés. Otros autores han señalado también la existencia de especificidad en el estrés, tanto a nivel de la clase, intensidad o duración del agente estresante, como en las vías que intervienen en el procesamiento de la información en el organismo (mecanismos de defensa,

ansiedad) o de factores tales como la especie, hora del día, etc. (Murison e Isaksen 1982; Kant y cols. 1986).

El estrés constituye, en definitiva, una modificación del proceso homeostático normal, encaminada a favorecer la adaptación al entorno y proporcionar oportunidades y estrategias adaptativas al individuo. No obstante, si bien en la actualidad aún no existe una definición precisa claramente aceptada, las distintas acepciones del término, más que referirse a concepciones antagónicas entre sí, revelan las distintas aproximaciones desde las diversas áreas de estudio.

2. RESPUESTA FISIOLÓGICA AL ESTRÉS

La respuesta fisiológica al estrés difiere cualitativamente en relación a la duración del mismo. Los mecanismos que permiten la reacción inicial no son los mismos que intervienen en el proceso subsiguiente, cuando el organismo se ve sometido a un estrés prolongado. Esto ocurre porque las necesidades para la supervivencia son también distintas. Ante un estímulo repentino o imprevisto, la supervivencia del individuo depende de una reacción rápida de emergencia, mientras que si el estímulo persiste resulta más adecuada la adaptación al mismo, tal como había postulado Selye.

La reacción de emergencia puede asociarse, por tanto, a las formas de estrés agudo donde se precisa una respuesta rápida y breve, que se logra mediante la activación de las funciones nerviosas o neuroendocrinas. Por el contrario, las formas de estrés crónico estarían ligadas a la respuesta adaptativa, denominada fase de resistencia por Selye, donde se verifica una activación o respuesta a largo plazo pero de acción más persistente, propia del sistema endocrino. En ambos casos, la alteración provocada inicialmente por el estímulo estresante es una activación del sistema nervioso central (SNC), el cual pone en marcha la sucesión de mecanismos mencionados anteriormente.

El sustrato neuroquímico responsable de la activación inicial del SNC y, subsecuentemente, del resto de los efectos inducidos por el estrés, no está completamente identificado, si bien se ha sugerido que, en la mayoría de los casos, se produce una activación de los sistemas aminérgicos cerebrales con aumento de

la velocidad de renovación de los neurotransmisores correspondientes a nivel hipotalámico. La noradrenalina (NA), la adrenalina (AD), la dopamina (DA) y la serotonina (5-HT) han sido propuestos como neurotransmisores responsables del desencadenamiento de dicha respuesta (Richardson y cols. 1990; Spinedi y cols. 1988).

2.1. Respuesta inmediata: Reacción de emergencia

La reacción de emergencia se produce mediante la acción conjunta del sistema nervioso simpático y las hormonas liberadas desde la médula adrenal, y permite la movilización inmediata de los recursos orgánicos necesarios para las reacciones de lucha o de huida.

2.1.1. Activación del sistema simpatoadrenal

La estimulación simpática hace referencia al incremento de la actividad tónica de los nervios simpáticos con el consiguiente aumento de la liberación de NA en los terminales nerviosos.

La activación de las células cromafines de la médula adrenal se produce por aumento de la actividad del nervio esplácnico. El tejido cromafín libera a la sangre, conjunta y esquetiométricamente, una mezcla de NA, AD y distintos fragmentos opioides que, procedentes del procesamiento de la preproencefalina, se encuentran coalmacenados en las vesículas con las catecolaminas (Viveros y cols. 1979). La regulación del proceso de liberación de las encefalinas desde la médula adrenal y de la AD de la misma procedencia, ha sido estudiado en detalle (Govoni y cols. 1981). De hecho, la estimulación del nervio esplácnico, incrementa la inmunorreactividad en plasma a met-enkefalina y catecolaminas.

2.1.2. Consecuencias fisiológicas de la actividad del eje simpato-adrenal.

Las consecuencias fisiológicas que desencadenan las catecolaminas adrenomedulares son similares a las que posee la NA procedente de la activación neurogénica simpática, si bien las acciones de las catecolaminas liberadas desde la glándula adrenal son más intensas, esto es debido a que su secreción se da en mayores concentraciones. No obstante, la actividad adrenomedular representa una respuesta prácticamente inmediata y de escasa duración, debido a la corta vida

media de las catecolaminas en sangre.

Los síntomas que constituyen la reacción de alarma son múltiples y afectan a la mayoría de los sistemas orgánicos (Vogel 1987). Entre las funciones que son alteradas cabe destacar:

- Sistema cardiovascular: aumento de la frecuencia cardíaca y del flujo sanguíneo al músculo esquelético, así como aumento de la presión arterial.
- Gastrointestinal: aumento de la secreción y de la motilidad gástrica.
- Inmunitaria: aumento de la actividad del sistema inmune.

Para el objeto del presente estudio son de gran importancia las acciones inducidas sobre el sistema cardiovascular que afectan directamente a la presión arterial. La estimulación simpática del corazón conlleva un aumento de la frecuencia y la fuerza de contracción, provocando asimismo las catecolaminas circulantes un aumento del tono vasomotor responsable de una vasoconstricción generalizada. Las consecuencias son un aumento simultáneo del gasto cardíaco y de la resistencia vascular que producen, en último término, un incremento de la presión arterial. Esta respuesta es inmediata y de breve duración, ya que la máxima concentración plasmática se sucede a los 10-30 sg de la aplicación del estímulo. A tiempos mayores, su actividad decae y el mantenimiento de la elevación de la presión arterial depende de la activación de la médula adrenal.

Por lo tanto, la reacción de alarma se produce siempre como primera respuesta a cualquier tipo de estrés, sea cual sea su duración e intensidad. Ante la aplicación de un estrés agudo y puntual, constituirá la única respuesta del organismo. Si el estímulo persiste, se manifiestan otro tipo de respuestas neuroendocrinas encaminadas al mantenimiento de la homeostasis y, aunque más lentas, *permiten una respuesta más persistente.*

2.2. Fase de resistencia

Un suceso evocado en todas las formas de estrés, conjuntamente con la activación del sistema nervioso simpático es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (H-H-A) (Selye 1976). Que este efecto se incluya en el apartado correspondiente a la fase de resistencia, típica ésta de las formas crónicas de estrés,

es una elección arbitraria, ya que este evento sólo está ausente en las formas de estrés agudo y de carácter muy puntual. En definitiva son dos los mecanismos activados durante el estrés: un sistema que actúa rápidamente y otro que lo hace a largo plazo. Sin embargo, atendiendo a la dificultad de separar estrictamente las situaciones agudas de las crónicas, hay que considerar la posibilidad de mecanismos intermedios entre los efectos simpáticos y los adrenomedulares dentro de los primeros minutos, y la iniciación y desarrollo máximo de la respuesta adrenocortical después de un periodo que se sitúa alrededor de los 15 minutos.

2.2.1. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El origen a nivel central de la activación del eje H-H-A está ubicado en el núcleo paraventricular del hipotálamo, donde se localizan los somas de las neuronas parvocelulares productoras del factor liberador de corticotropina (CRF) (Vale y cols. 1981), principal responsable éste, tras su liberación a la sangre portal, del aumento de secreción de ACTH desde la adenohipófisis durante el estrés (Plotsky y Vale 1984). Con posterioridad, la ACTH circulante estimula en las células corticoadrenales la síntesis y liberación de glucocorticoides (corticosterona en rata, cortisol en humanos; Axelrod y Reisine 1984), que mediarán las consecuentes respuestas fisiológicas.

El sistema se autocontrola mediante un mecanismo de retroalimentación negativo (feed-back), ejercido por los propios niveles de glucocorticoides (Keller-Wood y Dallman 1984). Cuando dichos niveles son elevados, inhiben simultáneamente la liberación de CRF y la secreción hipofisaria de ACTH. Se ha demostrado además, que en estas situaciones, los glucocorticoides inhiben tónicamente la expresión de los genes que codifican el CRF, así como la expresión de otros secretagogos de ACTH como arginina vasopresina, colecistoquinina y catecolaminas cerebrales (Rivier y Plotsky 1986). Incluso se ha propuesto, que la NA y la AD sistémicas, procedentes de los terminales simpáticos, además de las propias catecolaminas adrenomedulares, podrían acceder, a través de los capilares situados en la zona exterior de la eminencia media, a las células secretoras parvocelulares para estimular la secreción de CRF y ACTH (Plotsky y cols. 1989).

La multiplicidad en el control hormonal de la liberación de CRF es complejo, y probablemente refleja la diversidad de vías capaces de evocar su liberación durante el estrés. Debido a la especificidad adscrita a cada modelo de estrés,

parece razonable asumir que diferentes circuitos neuronales puedan ser afectados preferentemente en cada caso. Según Reisine y cols. (1986), la variedad de secretagogos de ACTH puede proporcionar la flexibilidad necesaria para que se dé la respuesta a diferentes estímulos estresantes.

Es importante resaltar que, paralelamente a la liberación de ACTH desde el lóbulo anterior de la hipófisis, se produce la liberación concomitante de beta-endorfina, péptido opioide que procede del mismo precursor polipeptídico (proopiomelanocortina) que la ACTH y a partir de cuyo procesamiento se originan ambos péptidos (Eipper y Mains 1980).

2.2.2. Consecuencias fisiológicas de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

Los efectos provocados como respuesta a la activación del eje H-H-A en el desarrollo de la respuesta fisiológica al estrés, son derivados principalmente del aumento de los glucocorticoides circulantes. Estos efectos incluyen:

- Reducción de la respuesta inmunológica.
- Disminución de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.
- Disminución de la producción hipofisaria de GH y TSH y de sus efectos sobre el crecimiento y el metabolismo.
- Alteraciones en el peso y la ingesta.
- Disminución de los niveles de colesterol-HDL.

La aparente paradoja de que, en las situaciones de estrés que constituyen una amenaza para el organismo, aumente la producción de corticosteroides, cuyos efectos antiinflamatorios e inmunosupresores disminuyen la capacidad de defensa del organismo, ha sido explicada mediante la hipótesis de que el papel de este tipo de hormonas no sería proteger a aquél frente a las fuentes de estrés, sino contra sus propias defensas, que podrían resultar peligrosas si no se hallasen perfectamente controladas (Munck y cols. 1984).

3. MARCADORES BIOLÓGICOS DEL ESTRÉS

Debido a que las respuestas psicobiológicas al estrés son muy específicas, la definición de marcadores resulta extremadamente complicada, tanto más cuanto que parece probable que, aun asumiendo que en todos los casos se produce una activación del eje H-H-A, el origen de tal activación y las consecuentes alteraciones bioquímicas parecen diferentes. No está claro, por lo tanto, el que respuestas similares se repitan de modo sistemático como consecuencia de la aplicación de cualquier tipo de estrés.

Obviando las posibles diferencias entre especies, y atendiendo a la necesidad de encontrar indicadores reales y sensibles para validar los modelos de estrés, la variación de los siguientes parámetros suele repetirse en la mayoría de los distintos tipos de estrés en la rata (Vogel 1987).

Indicadores bioquímicos:

- Aumento de los niveles de corticosterona, variables en función, fundamentalmente, de la duración del estrés aplicado.
- Aumento de catecolaminas plasmáticas, siendo la variación en este parámetro función de la intensidad y la duración del estrés.
- Modificación en los niveles de neurotransmisores a nivel cerebral, principalmente aminas, siendo el sentido de la variación y la naturaleza de la amina modificada función del tipo y de la duración del estrés aplicado.

Indicadores morfológicos:

- Aumento del tamaño de las glándulas adrenales, en respuesta a la mayor actividad desarrollada por las mismas.
- Disminución del tamaño del timo.

4. ESTRES Y ENFERMEDAD

De lo anteriormente expuesto, podemos concluir, por tanto, que la respuesta biológica al estrés incluye una activación H-H-A que, con participación de numerosos sistemas orgánicos, determina una liberación multihumoral. Sin embargo, es difícil precisar a partir de qué momento esta liberación resulta excesiva y nociva para el organismo y entonces la respuesta deja de ser fisiológica para convertirse en patológica.

Aunque Rabkin y Struening (1976) afirman que "la exposición al estrés nunca es causa suficiente para justificar el desarrollo de una enfermedad", si consideramos ésta como un fenómeno que ocurre cuando un agente o condición destruye la dinámica interna de cuya integridad depende el organismo, y entendemos las manifestaciones de esta enfermedad como la consecuencia de los esfuerzos del organismo para adaptarse a la misma, todas las enfermedades son al mismo tiempo desórdenes de adaptación (Hinkle y cols. 1987).

En términos generales, se puede definir el potencial carácter patógeno del estrés como el resultado de la relación entre dos factores: la susceptibilidad orgánica individual y la naturaleza y características del estrés (Tapp y cols. 1988).

Sobre el primer factor, parece que son las características psicológicas y el carácter de amenaza percibido por el individuo los que modulan la incidencia patógena del estrés (Lazarus 1966). Esta amenaza está en función de la percepción que el individuo realiza de los estímulos procedentes de su interacción con el medio ambiente, y de sus propios recursos para afrontar dichos estímulos. Podría afirmarse que, en la medida en que el individuo deja de percibir tales situaciones como estímulos que es capaz de afrontar, pasando a sentirse impotente ante ellos, la respuesta al estrés se convierte en patológica.

En cuanto a la naturaleza del agente estresante, son numerosos los factores a considerar. El tipo, la intensidad y la duración del mismo, así como la exposición previa al agente estresante (Keim y Sigg 1976) y la capacidad para predecir o controlar el estrés (Weiss 1977), parecen determinar el carácter fisiológico o patológico de la respuesta.

En definitiva, y a pesar de que en la actualidad la tesis central de la teoría del estrés como alteración capaz de generar enfermedad, elaborada inicialmente por Canon y Selye, continúa siendo en algunos puntos un enigma, la confluencia de algunos de los factores anteriormente mencionados puede ocasionar en el organismo una pérdida de su homeostasis original, estableciéndose, de este modo, un nuevo equilibrio biológico que puede resultar en muchos casos perjudicial. De hecho, y a pesar de la controversia existente, son numerosos los datos experimentales que asocian el estrés con el desencadenamiento de una gran variedad de patologías: cardiovascular (Brody y cols. 1987; Tapp y cols. 1983), digestiva (Dotevall 1985), autoinmune (Grosman 1989), etc.

5. MODELOS DE ESTRES

Aunque el estrés puede generarse de una manera relativamente sencilla en el animal de laboratorio, siendo numerosos los modelos experimentales diseñados con este fin, deben considerarse algunas limitaciones que restringen en gran medida su utilización, cuando el fin último es obtener resultados extrapolables al ser humano. En primer lugar, las respuestas observadas tras la aplicación del estrés en los distintos animales de un mismo grupo o camada pueden ser diferentes, hecho que se sustenta en la susceptibilidad individual (Dantzer y Mormede 1985). En segundo lugar, la diversificación de las especies, considerando en este punto dos aspectos: por un lado, la dificultad para asimilar los modelos animales de estrés a las situaciones a las que se ve sometido el ser humano, y, por otro lado, a que el transcurso temporal de la respuesta en el animal es también distinto, puesto que el tiempo de exposición de los mismos al agente estresante es, por norma general, sensiblemente inferior al que encontramos en humanos.

Por lo tanto, la elección de un determinado agente como generador de estrés debe considerar los distintos modelos existentes y sus características peculiares en relación con la finalidad perseguida en la investigación.

5.1. Clasificación de los modelos de estrés

Entendiendo las numerosas clasificaciones que se pueden efectuar, y dependiendo del factor seleccionado como referencia para la realización de la misma, los modelos de estrés utilizados experimentalmente se pueden clasificar en:

- Modelos que provocan una alteración en el estado físico del animal:
 - . Inmovilización (Brodie y Hanson 1960).
 - . Choque eléctrico (Foot-shock; Bliss y cols. 1968).
 - . Natación forzada (Forced swimming; McCarty 1985).
 - . Exposición a bajas temperaturas (cold-stress; Inaba y cols. 1981).

- Modelos que provocan alteraciones en el componente social o en la esfera emocional del animal:
 - . Hacinamiento (Armario y cols. 1984).
 - . Aislamiento o privación social (Gardiner y Bennett 1977).
 - . Estimulación audiovisual (Galeno y cols. 1984).

Además de éstos, existen otros muchos modelos surgidos de la aplicación combinada de los agentes mencionados anteriormente (Senay y Levine 1967), así como aquellos inducidos por la administración de anestésicos (Kitchen y Roman 1984).

En cuanto a las características del estrés, es imprescindible tener en cuenta su intensidad, pero aún más importante es considerar su duración, pues, como ya ha sido señalado, los mecanismos fisiológicos responsables de la adaptación al estrés dependen directamente de la duración del estímulo aversivo, más que de su intensidad (Natelson y cols. 1981).

Por lo tanto, sin excluir los modelos enumerados anteriormente, se acuña el término agudo para aquellos tratamientos que se aplican una sola vez a los sujetos de forma más o menos puntual, y crónico para aquellos casos en los que el agente afecta al individuo de manera más o menos prolongada, de modo continuado o intermitente. Desde el caso del estrés absolutamente puntual o agudo hasta las formas de estrés crónico (días o meses, según la especie), hay numerosas

situaciones intermedias que pueden clasificarse, a veces con cierta dificultad, como es el caso del modelo de privación social empleado en el presente trabajo, como agudas o crónicas, en función de su aproximación a uno u otro caso.

Atendiendo a la capacidad de predicción o control que el individuo pueda ejercer sobre el estrés al que es sometido, se puede realizar una clasificación adicional entre aquellas situaciones controlables mediante un periodo previo de aprendizaje e incontrolables. En la medida en que el individuo puede predecir o controlar el estrés, los efectos son menos pronunciados (Weiss y cols. 1987).

Por último, y atendiendo a la capacidad de evitación del daño, pueden dividirse en evitables, también denominados modelos de estrés escapable o de evitación activa, e inevitables, también denominados inescapables. En los primeros, si la respuesta de evitación ("avoidance") conlleva la aplicación de un castigo ("punishment"), los efectos comportamentales observados en el animal son más profundos, causan mayores daños y, desde un punto de vista conductual, inducen depresión.

5.2. Selección e interés del modelo de privación social

En la elaboración del presente trabajo se ha escogido como método productor de estrés el modelo de privación social, que, como se indicará con posterioridad, permite el establecimiento temporal de dos fases atendiendo a la duración de la aplicación del estímulo.

El fundamento de la producción de estrés por este modelo está basado en el carácter marcadamente social atribuido a los roedores. La rata es una especie ideal para el empleo de este modelo porque, a la condición de su carácter gregario, hay que añadir que observa un comportamiento respecto al control de su territorio muy similar al observado en primates (Brain 1985). Todas estas circunstancias la convierten en una especie donde el aislamiento temporal del grupo al que pertenecen provoca alteraciones conductuales y físicas manifiestas que configuran el patrón de respuestas del modelo de estrés al que nos referiremos posteriormente.

El empleo de este modelo de estrés obvia, además, mejor que otros modelos, las limitaciones a las que aludíamos con anterioridad. En primer lugar, permite la

aplicación homogénea del estímulo frente a todos los individuos de la muestra. Por otro lado, constituye un estímulo de carácter moderado, cuyo componente esencial es psicológico y permite, en cierto modo, equipararlo a las situaciones de estrés que afectan al ser humano, facilitando la extrapolación de los resultados obtenidos.

Por último, también constituye una aportación interesante como modelo de hipertensión experimental, ya que, aunque tanto en humanos como en animales de experimentación son numerosos los estudios que documentan los efectos que sobre el sistema cardiovascular originan los modelos de estrés físico (Parati y cols. 1988; Sparrow y cols. 1987; Lawler y cols. 1984; Galeno y cols. 1984), es escasa la información que se posee relativa a las modificaciones inducidas en respuesta al estrés psicológico.

6. SISTEMA OPIOIDE

El sistema opioide es un término genérico, empleado para designar a un grupo heterogéneo de péptidos presentes en el organismo, que constituyen los ligandos endógenos de los receptores opiáceos y que contienen, en algún lugar de su molécula, la secuencia aminoacídica Tir-Gli-Gli-Fen-.

Históricamente, los receptores opiáceos fueron caracterizados con anterioridad al descubrimiento de los propios péptidos, siendo dos las razones que justificaron el desarrollo de las investigaciones para demostrar su existencia. La primera línea de razonamiento era farmacológica y estaba basada en los estrictos requerimientos estructurales que precisaban los agonistas tipo morfina y antagonistas hasta la fecha descritos para inducir sus efectos, circunstancia que sugería la existencia de un receptor opiáceo específico (Goldstein y cols. 1971). El segundo argumento derivaba del interés por justificar los drásticos efectos comportamentales producidos por la morfina.

En el año 1973, tres grupos independientes de investigadores pusieron de manifiesto la existencia de receptores específicos para la morfina y otros derivados opiáceos en el SNC (Pert y Snyder 1973, Terenius 1973, Simon y cols. 1973). El posterior aislamiento de la met-enkefalina y la leu-enkefalina, agonistas endógenos de dichos receptores (Hugues y cols. 1975), abrió importantes perspectivas para el

conocimiento del proceso de transmisión dolorosa, al cual se asociaban los derivados del opio, y del resto de los efectos descritos para los opiáceos.

Desde esta última fecha, se han identificado, aislado y caracterizado una gran cantidad de péptidos opioides en SNC y tejidos periféricos, cuya funcionalidad se ha ido determinando a lo largo de las dos últimas décadas. Entre los que presentan actividad biológica, los más relevantes son la beta-endorfina (Goldstein y cols. 1979) la dinorfina (Li y Chung 1976), junto a las antedichas met- y leu-encefalina.

6.1. Familias de péptidos opioides

La aplicación de las técnicas de ADN recombinante ha permitido demostrar que los péptidos opioides aislados hasta la fecha derivan, por escisión metabólica, de tres precursores polipeptídicos distintos, cada uno de los cuales presenta una forma "prepro" y una forma "pro", de la cual se desdobra el péptido señal (Holtt 1983).

De esta forma los péptidos opioides han sido agrupados en tres familias y clasificados en:

- Péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC).
- Péptidos derivados de la proencefalina.
- Péptidos derivados de la prodinorfina.

6.1.1. Péptidos derivados de la proopiomelanocortina

Los péptidos derivados del procesamiento de la POMC incluyen los opioides alfa, beta y gamma-endorfina y las hormonas adenocorticotropa (ACTH), estimulante de los melanocitos (alfa-MSH) y beta-lipotropina (beta-LPH) (Fig.1).

El precursor POMC con 31 KDal de peso molecular, se sintetiza tanto en la hipófisis como en otras regiones cerebrales. Aunque la existencia de los péptidos hipofisarios ACTH y alfa-MSH estaba bien establecida, el aislamiento y caracterización de la beta-endorfina (Li y Chung 1976) promovió la realización de numerosos estudios inmunohistoquímicos, que permitieron la localización de la beta y alfa-endorfina y la beta-LPH (un fragmento de la POMC que contiene en su secuencia a la beta-endorfina) en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis (Bloom y cols. 1978). Estudios bioquímicos posteriores revelaron que el

La beta-endorfina, el mayor de los péptidos opioides endógenos biológicamente activos, contiene 31 aa (Tabla I) y, aunque se origina por procesamiento de la POMC, su precursor inmediato es la beta-LPH, un péptido de 91 aa, a partir del cual se libera por ataque enzimático en el extremo C-terminal.

Además de su distribución y función como hormona en la hipófisis (lóbulos intermedio y anterior), las neuronas que contienen beta-endorfina tienen limitada su localización al hipotálamo basal y al núcleo del tracto solitario (NTS), desde donde se proyectan rostral y caudalmente a otras regiones cerebrales. Una proporción considerable de las mismas converge con neuronas encefalinérgicas en la amígdala, varios centros hipotálamicos y medulares implicados en la regulación respiratoria y cardiovascular, y en otras áreas, tales como la sustancia gris periacuductal y el tálamo, asociadas con la sensación nociceptiva y la integración sensorial (Akil y cols. 1988).

6.1.2. Péptidos derivados de la proencefalina

La proencefalina, nombre genérico asignado actualmente para definir a la anteriormente denominada proencefalina A, es un precursor polipeptídico de peso molecular similar al de la POMC. En la mayoría de las especies, su estructura contiene seis secuencias del pentapéptido met-enkefalina, y una secuencia de leu-enkefalina, cuyas estructuras aparecen en la Tabla I y el denominado péptido E (Khachaturian y cols. 1985).

Aunque las encefalinas fueron los primeros péptidos opioides descubiertos, es escasa la información que se posee acerca de las modificaciones post-traslacionales que sufre su precursor en SNC, si bien hay algunas referencias sobre el diferente procesamiento que puede sufrir el mismo en los diversos tejidos (Lindberg y Yang 1984).

Parece ser que las encefalinas también pueden derivar de otros precursores, como la prodinorfina, y de otra proteína de 90 KDal, aislada del cuerpo estriado del cobaya, la cual contiene cantidades equimoleculares de met-enkefalina y leu-enkefalina (Beaumont y cols. 1980). Por tanto, la existencia de encefalinas en otros precursores explicaría las variaciones observadas en la relación met-enkefalina/leu-enkefalina en las diferentes regiones cerebrales.

RECEPTOR	AGONISTA ENDOGENO	ESTRUCTURA DEL AGONISTA	PRECURSOR	AGONISTA PROTOTIPO	AGONISTAS	ANTAGONISTAS SELECTIVOS
mu	Beta-endorfina	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-Fen-Lis-Asn-Ala-Ile-Ile-Lis-Asn-Ala-His-Lis-Lis-Gli-Gln.	POMC	Morfina	Tir-D-Ala-Gli NMe-Fen-Gli-ol (DAGO)	Beta-FNA Naloxona
	Met-enkefalina	Tir-Gli-Gli-Fen-Met	Proencefalina A			
delta	Leu-enkefalina	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu	Proencefalina A	Leu-enkefalina	D-Ala ² -D-Leu ⁵ enkefalina (DADLE) D-Pen ² -D-Pen ⁵ enkefalina	Naloxona ICI 154,129 ICI 174,864
kappa	Dinorfina ₁₋₁₇	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lis-Leu-Lis-Trp-Asp-Asn-Gln.	Prodinorfina	Ketociclazocina	U 50,488 Dinorfina ₁₋₁₇	Naloxona WIN-44,441-3 MR-2266

TABLA I.- Subtipos principales de receptores opioides.

Los estudios inmunohistoquímicos y la cuantificación por hibridación "in situ" del ARNm para la proencefalina han puesto de manifiesto que las neuronas encefalinérgicas se distribuyen ampliamente a lo largo de todo el SNC, estando su localización periférica circunscrita a la médula adrenal, intestino, ganglios autonómicos y al sistema nervioso autónomo (Khachaturian y cols. 1985).

En SNC muchas de las vías encefalinérgicas constituyen circuitos locales relativamente cortos, aunque también han sido descritos sistemas de mayor longitud en bulbo raquídeo de rata (Ceccatelli y cols. 1989) o en locus coeruleus (Leger y cols. 1983), donde pueden coexistir con neurotransmisores clásicos.

La mayor densidad de neuronas que contienen péptidos derivados de la proencefalina se localiza en la amígdala, hipocampo, cuerpo estriado y área preóptica, en la mayoría de los núcleos hipotalámicos y bulbares y en el asta dorsal de la médula, donde modulan la transmisión dolorosa. La amplitud de su distribución parece estar asociada a su implicación en numerosas funciones fisiológicas: respiratoria, cardiovascular, neuroendocrina, motora, etc. (Holaday 1985).

6.1.3. Péptidos derivados de la prodinorfina

La prodinorfina, también denominada proencefalina B, es el precursor de dos grupos de péptidos opioides: las dinorfinas y las neoendorfinas, que constituyen los opioides de más reciente descubrimiento (Goldstein y cols. 1979).

Este polipéptido, de biosíntesis ubicua en todo el SNC, da lugar, tras un procesamiento relativamente sencillo, a la dinorfina A (1-8), la más abundante de todos ellos, la dinorfina A (1-17), la dinorfina B (1-13), y las alfa y beta neoendorfinas (Tabla I).

Guthrie y Basbaum (1984) han demostrado que la distribución de la prodinorfina en SNC se solapa con la de las neuronas encefalinérgicas.

Los productos derivados de la prodinorfina se sintetizan en las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, desde donde se proyectan a la hipófisis posterior, coexistiendo en el núcleo magnocelular con neuronas productoras de vasopresina (Watson y cols. 1982a).

Además, se ha referido su ubicación en neuronas del núcleo arcuato, hipocampo, sustancia gris periacuductal y otras regiones cerebrales y medulares donde constituyen neuronas de trayecto corto. Al igual que las encefalinas y la beta-endorfina, la prodinorfina se localiza también en el NTS, zona caudal del bulbo raquídeo donde diversos grupos celulares expresan, de modo específico, las tres familias de opioides (Watson y cols. 1982b). Esta situación puede adscribirse al papel modulador ejercido por estos péptidos sobre las funciones autónomas, ya que este núcleo es conocido por constituir la primera estación central de relevo en dicho control.

6.2. Receptores opioides

Al elevado número de péptidos opioides descubiertos hasta el momento, hay que sumar la diferenciación de los distintos subtipos de receptores para los mismos.

Históricamente, el descubrimiento de los receptores opioides precedió al aislamiento y caracterización de los péptidos. La existencia de múltiples formas de receptores opioides fue postulada inicialmente por Martín y cols. en 1976, basándose en los diferentes efectos comportamentales producidos por los agonistas opiáceos clásicos y en la ausencia de tolerancia cruzada exhibida por los mismos. Los subtipos básicos de receptores propuestos por Martín fueron los siguientes: receptores μ para los compuestos tipo morfina, kappa para el alcaloide sintético ketociclazocina y sigma para el SKF 10,047.

Con posterioridad, el aislamiento e identificación de la leu- y la met-enkefalina y el desarrollo de la técnica de fijación de receptores ("binding"), posibilitaron la definición de los receptores delta, caracterizados por su interacción con las encefalinas en conducto deferente de ratón (Lord y cols. 1977). De modo análogo, al descubrimiento de la beta-endorfina sucedió la descripción del receptor epsilon (Akil y cols. 1980). Estudios posteriores realizados con el receptor sigma han revelado que, probablemente, no se trata de un receptor opioide típico, ya que no muestra la estereoespecificidad clásica que presentan los mismos.

Actualmente, existen evidencias de hasta nueve subtipos de receptores opioides (Mansour y cols. 1988) incluyendo la diferenciación de dos subtipos para el receptor μ , μ_1 y μ_2 (Wolozin y Pasternak 1981), para el receptor kappa, kappa₁ y kappa₂ (Zukin y cols. 1988) y la posible interconversión o acoplamiento alostérico

entre los receptores mu y delta, y mu y sigma (Schoffelmeer y cols. 1988).

La controversia sobre la existencia de múltiples subtipos de receptores opioides y la dificultad para demostrar su presencia en los ensayos de fijación "in vitro", ha incentivado la búsqueda de agonistas y antagonistas más selectivos para dichos receptores, cuyo uso se ha hecho imprescindible a la hora de determinar el subtipo concreto de receptor que media una respuesta fisiológica o farmacológica (Tabla I).

Teniendo en cuenta, como detallaremos más adelante, la complejidad de la distribución de los receptores opioides y de las tres familias de péptidos en el SNC, es aún prematuro el intento de correlacionar un sistema opioide determinado con un subtipo de receptor. Así, la beta-endorfina se une selectivamente tanto a los receptores mu como a los delta, con una ligera preferencia por estos últimos, mientras las encefalinas, en particular la leu-encefalina, muestra una mayor afinidad por el receptor delta y todas las dinorfinas y neoendorfinas por el receptor kappa, excepto la dinorfina A (1-8) que además retiene capacidad delta (Itzhak 1988).

6.2.1. Distribución y significación fisiológica de los receptores opioides

Las técnicas autorradiográficas aplicadas de modo sistemático han permitido determinar la localización de los receptores opioides, poniendo de manifiesto que éstos se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de todo el SNC con algunas localizaciones periféricas.

Mientras los ensayos farmacológicos han demostrado la preferencia teórica de un ligando determinado por un receptor, los resultados de dicho estudio de distribución anatómica han revelado que las asociaciones halladas "in vitro" no predicen, necesariamente, una correlación anatómica exacta entre una determinada familia de péptidos y su hipotético receptor en todas las áreas del SNC (Khachaturian y cols. 1985), por lo que la significación funcional de estos sistemas peptidérgicos depende de la disposición de los elementos pre y postsinápticos y la posibilidad de su interacción (Akil y cols. 1988). Así, por ejemplo, mientras se encuentra una elevada densidad de receptores mu en cuerpo estriado y corteza cerebral, el contenido de los péptidos derivados de la POMC es prácticamente nulo. Por otro lado, la densidad para la proencefalina es alta en la mayoría de los

núcleos del bulbo raquídeo, estando los receptores delta ausentes (Mansour y cols. 1988).

Los estudios de Lamotte y cols. (1976) identificaron que, a nivel neuronal e independientemente de su localización anatómica, estos lugares de unión pueden situarse pre o postsinápticamente.

La distribución cuantitativa de los tres tipos principales de receptores opioides descritos, mu, delta y kappa, varía en cada estructura e, incluso, es posible encontrar modificaciones entre especies (Lewis y cols. 1984; Sharif y Hughes 1989). De este modo, mientras en humanos la proporción relativa de los tres subtipos es similar, en rata los receptores kappa representan tan sólo el 9% de la población total, frente al 41% y 50% para los receptores mu y delta respectivamente (Mansour y cols. 1988).

Los receptores mu presentan una ubicación muy difusa y se distribuyen en numerosos núcleos a lo largo de todo el neuroeje, incluyendo la corteza, el núcleo estriado, el hipocampo, la sustancia nigra, el locus coeruleus y el NTS. Por el contrario, la localización de los receptores delta es más precisa, predominando en las estructuras del cerebro medio (núcleo estriado y amígdala), mientras que no se detectan en hipotálamo, y en el bulbo raquídeo sólo se encuentran concentraciones apreciables en el NTS.

Por lo que respecta a los receptores kappa, el conocimiento de su distribución anatómica es más reciente y presentan una localización preferente en el área preóptica, la eminencia media del hipotálamo, la amígdala y NTS, observándose también una densidad elevada en hipocampo, mientras su concentración en corteza y bulbo raquídeo es muy baja (Mansour y cols. 1988).

En cuanto a las funciones propuestas atendiendo a la distribución de cada subtipo de receptor, los tres tipos principales, mu, delta y kappa, han sido implicados en la modulación de la sensación nociceptiva. La mediación de la analgesia supraespinal atribuida clásicamente a la ocupación de los receptores mu, ha sido asignada recientemente al subtipo mu₁ (Pasternak 1988), así como a los receptores delta (Porreca y cols. 1987), mientras que, a nivel espinal, los tres tipos de receptores parecen participar en la misma proporción.

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

Por otro lado, el patrón de distribución/densidad de los receptores mu opioides en el tálamo y en el tronco cerebral ha sido correlacionada con las acciones depresoras de los opioides sobre la respiración y con sus efectos sedativos (Atweh y Kuhar 1983).

El aumento de la actividad locomotora parece ser relativo a la localización de los receptores mu en las zonas A9 y A10, donde modulan la liberación estriatal de DA (Chesselet y cols. 1982). Paralelamente, la ocupación de los receptores kappa en las mismas regiones a nivel estriatal induce sedación, hecho consistente con el elevado contenido del receptor kappa en estas zonas.

Por lo que se refiere a los conocidos efectos de los opioides sobre la secreción hormonal en SNC, la distribución anatómica de los receptores kappa en la hipófisis posterior se asocia al papel inhibitorio ejercido por los opioides sobre la liberación de vasopresina, así como a la acción diurética intrínseca de los agonistas kappa (Blackburn y cols. 1986). 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.

Otras funciones, como el control de la ingesta, del tránsito gastrointestinal y del balance hidrosalino, presentan un componente opioidoérgico en su regulación (Holaday 1985), sin que hasta la fecha se adscriba selectivamente a un determinado subtipo de receptor.

6.3. Biogénesis, liberación e inactivación de los péptidos opioides

Como se hacía referencia al considerar la existencia de las tres familias de péptidos opioides, los opioides biológicamente activos se originan a partir de un precursor polipeptídico de mayor tamaño. Una vez sintetizado el mismo a nivel ribosomal, la molécula, conjuntamente con los enzimas responsables de su procesamiento, es almacenada en microvesículas que migran a través del axón hacia el terminal nervioso. Allí son finalmente procesadas por endo o exopeptidasas, siendo liberado el péptido en un proceso calcio-dependiente, como producto final

de esta biosíntesis durante la fase de despolarización de la membrana neuronal.

El proceso de inactivación de los opioides, como el de todos los péptidos en general, difiere del que presentan los neurotransmisores clásicos, puesto que, mientras para éstos la recaptación por el terminal nervioso es un mecanismo eficiente, en el caso de los péptidos, una vez que se liberan y actúan sobre el receptor, su vía primordial de inactivación consiste en la degradación enzimática por peptidasas.

Las enzimas que se han identificado como responsables del metabolismo de las encefalinas son tres. Una dipeptidilaminopeptidasa que hidroliza el enlace $\text{Gli}^2\text{-Gli}^3$; una aminopeptidasa 3.14.11, denominada "aminoencefalinasasa a", que ejerce su acción sobre el extremo aminoterminal $\text{Tir}^1\text{-Gli}^2$ y una endopeptidasa 24.11, conocida comunmente como encefalinasasa, que rompe el enlace $\text{Gli}^3\text{-Fen}^4$ de las encefalinas (Hersh 1986).

El metabolismo de los opioides de mayor tamaño, tipo beta-endorfina, ha de ser necesariamente mucho más complejo, y, aún cuando no está perfectamente identificado, en homogenados crudos de la hipófisis anterior se ha podido observar la presencia de gamma-endorfina generada a partir de la beta-endorfina por hidrólisis del enlace Leu-Fen (Graf y Kenessey 1981).

6.4. Mecanismo de acción

Las acciones estereoespecíficas inducidas por los péptidos opioides en la mayoría de las regiones cerebrales son dos: depresión del "firing neuronal" a nivel postsináptico (Schoffelmeer y cols. 1988) y reducción de la liberación de neurotransmisores por inhibición presináptica de neuronas excitatorias (Chesselet 1984).

Aunque no es concluyente la información que se posee acerca de los mecanismos efectores que se suceden a nivel celular tras la activación de los receptores, parece prevalecer el hecho de que los efectos finales tienen lugar como consecuencia de la activación de segundos mensajeros, ya sea por alteración del metabolismo de los nucleótidos cíclicos, incluyendo inhibición de la adenilato ciclasa e incremento de los niveles de GMPc (Childers 1988), y/o por cambios en la conductancia iónica. Este último es el sistema utilizado mayoritariamente por las

poblaciones neuronales opioideórgicas a nivel central (Duggan y North 1983).

Los procesos ligados a canales pueden estar relacionados, bien con una disminución del flujo de Ca^{2+} a través de los canales voltaje-dependientes necesarios para el acoplamiento estímulo-secreción del neurotransmisor, o bien a un aumento de la conductancia al K^+ , originando la consiguiente hiperpolarización celular una disminución de la excitabilidad de la membrana neuronal (Chavkin 1988).

La interacción entre el receptor opioide y los segundos mensajeros descritos requiere, en todos los casos, la existencia de proteínas G ("nucleotide-binding regulatory proteins), que constituyen el sistema de transducción de la señal a través de la membrana (Wollemann 1990). En este sentido, los distintos subtipos de receptores opioides difieren en cuanto a la naturaleza de la proteína G a la cual están conectados. Así, el receptor delta exhibe una intensa inhibición de la adenilato ciclasa a través de proteínas G_i y/o G_o por estimulación de la GTPasa (Kosky y Klee 1981), o bien, según ha sido descrito recientemente, a través de proteínas G_s (Chen y cols 1988), mientras que la acción de los ligandos μ sobre el sistema adenilato ciclasa es menos efectiva y los ligandos kappa no lo activan en ausencia de Na^+ (Mack y cols. 1985).

En relación al canal iónico asociado a cada subtipo de receptor también se encuentra una profunda diferenciación: mientras la disminución del flujo de Ca^{2+} parece ser el sistema activado por los receptores kappa, los receptores μ , y delta estarían acoplados al canal de K^+ (North y cols. 1987).

7. ACTIVACION DEL SISTEMA OPIOIDE DURANTE EL ESTRES

En 1977, Guillemin y cols. describieron por primera vez que el estrés producido por una fractura tibial provocaba un incremento concomitante de los niveles plasmáticos de ACTH, CRF y beta-endorfina en rata. De modo análogo, se produce una clara asociación entre el estrés y la liberación de péptidos opioides durante la activación del eje simpático-adrenal en estas situaciones, donde se ha observado una liberación paralela de péptidos tipo encefalinas y AD desde la médula adrenal (Viveros y cols. 1979; Livett y cols. 1981), y de encefalinas y NA en las terminales simpáticas (Wilson y cols. 1980). Desde entonces, numerosos

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

La mayoría de las células que contienen opioides endógenos no son activas tónicamente, como demuestra el hecho de que los antagonistas opioides carecen de efecto cuando se administran en animales en condiciones normales. Sin embargo, cuando la homeostasis del organismo es distorsionada mediante la aplicación de un estímulo estresante, se produce una activación del sistema opioide que origina efectos muy diversos, incluyendo un amplio espectro de modificaciones en las funciones neuroendocrinas, en la actividad cerebral, en la sensación dolorosa, en la temperatura, en el sistema cardiovascular, así como en otras reacciones autónomas y comportamentales (Holaday 1985).

En este sentido, la gran riqueza de péptidos opioides y el elevado contenido de sus receptores en el principal núcleo central para la regulación autónoma, el NTS, sugieren un papel importante para estos neuropéptidos en lo que respecta a la regulación de la respuesta del organismo a las demandas fisiológicas y ambientales, incluyendo éstas tanto el estrés físico como el psicológico.

7.1. Estrés agudo

Desde que en 1976 Akil y cols. pusieron de manifiesto por primera vez el fenómeno de la analgesia inducida por estrés, los datos relativos a la participación del sistema opioide en las formas de estrés agudo son abundantes. Estos autores demostraron que la aplicación del modelo de shock inescapable en las patas producía en rata una elevación del umbral doloroso, efecto este que podía ser bloqueado parcialmente por administración del antagonista opiáceo naloxona.

En la misma línea, se ha observado una disminución de receptores opioides en cerebro de rata tras la aplicación de diversas formas de estrés, tanto físico -estrés por frío- (Hnatowich y cols. 1986) o psicológico -estrés por aislamiento- (Petkov y cols. 1985). Resultados recientes muestran que ratas sometidas a shock inescapable, presentan una disminución de los receptores μ (Stuckey y cols. 1989). Esta disminución podría ser consecuencia, bien de la presencia de ligandos endógenos durante estas situaciones compitiendo por los sitios de unión, o bien a una inducción de subsensibilidad de los receptores por exposición de los mismos

a niveles persistentemente elevados de los opioides endógenos (Adams y cols. 1987).

7.1.1. Activación del sistema de la proopiomelanocortina durante el estrés agudo

Se ha descrito que los niveles de los péptidos derivados de la POMC también están modificados durante el estrés agudo. Los niveles plasmáticos de beta-endorfina aparecen elevados en animales sometidos a shock inescapable (Rossier y cols. 1980; Hulse y Coleman 1984), inmovilización (Kant y cols. 1986), aislamiento (Kalin y cols. 1985). En el caso de humanos se ha observado asimismo un incremento de los niveles circulantes de beta-endorfina, en mujeres durante el parto (Furuhashi y cols. 1984), en el transcurso del ejercicio físico intenso (Fraïoli y cols. 1982; Metzger y Stein, 1984), y de la hipoglucemia insulínica (Wiedemann y cols. 1979; Nakao y cols. 1979).

La procedencia de la beta-endorfina segregada al torrente circulatorio durante el estrés parece ser la hipófisis, ya que la hipofisectomía bloquea, en algunos casos, dicha respuesta (Guillemin y cols. 1977). Por otra parte, se ha descrito una reducción del contenido hipotálamico de beta-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 rata (Lim y Funder 1983).

En cuanto a la participación de cada lóbulo hipofisario en la secreción de beta-endorfina durante el estrés agudo, existen evidencias de que el estrés físico estimula fundamentalmente las células corticotropas de la adenohipófisis, mientras que el estrés emocional estimularía tanto la actividad del lóbulo anterior como la del lóbulo *intermedio*, ya que *provoca un aumento de la secreción de ACTH y alfa-MSH* (Smelik y cols. 1983).

La significación fisiológica del incremento de los niveles plasmáticos de beta-endorfina durante el estrés agudo no está bien definida, si bien se ha apuntado a su posible papel como modulador de la analgesia inducida por aquél. Dicha analgesia, parece correlacionarse con un aumento de la actividad opioide cerebral (Madden y cols. 1977; Akil y cols. 1978) y, en concreto, con la secreción de beta-endorfina hipotalámica que, en algunos modelos de estrés, se manifiesta por una disminución del contenido del péptido en dicho núcleo cerebral (Akil y cols. 1984). Este hecho, podría atribuirse a un incremento de su liberación. En cambio, otros

autores no han detectado ninguna alteración en el contenido hipotalámico de beta-endorfina tras estrés por natación (Lim y Funder, 1983) o en líquido cefalorraquídeo de monos sometidos a aislamiento (Kalin y cols. 1985).

De modo simultáneo, Harbuz y Lightman (1989) han observado un aumento de los niveles de ARNm para CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo y de POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis, en respuesta al estrés producido por inyección intraperitoneal de salino hipertónico, y al estrés por natación o inmovilización. Sin embargo, el estrés por frío no modifica el contenido de ambos ARNm. Estos resultados sugieren que diferentes vías y neuronas hipotalámicas pueden estar implicadas en la mediación de la respuesta neuroendocrina a las distintas formas de estrés físico o psicológico.

7.1.2. Activación del sistema de la proencefalina durante el estrés agudo

El origen de las encefalinas liberadas a la circulación durante el estrés, se localiza en las células cromafines de la médula adrenal donde se encuentran coalmacenadas en forma de pentapéptidos o de productos intermedios de mayor tamaño derivados del procesamiento de la proencefalina A con AD. Si bien se ha observado un aumento de la inmunorreactividad en plasma a met-enkefalina tras la aplicación de diversas formas de estrés agudo en animales de experimentación (Van Loon y cols. 1987), así como una disminución del contenido de met y leu-enkefalina en la glándula adrenal de ratas sometidas a estrés por frío (Vaswani y cols. 1988), los datos no son del todo concluyentes.

La contribución de las encefalinas adrenales al "pool" de opioides de la circulación periférica parece ser mínima (Owens y cols. 1987). Asimismo, los datos obtenidos no son extrapolables a humanos, en los cuales las concentraciones plasmáticas de met-enkefalina no son afectadas por la hipoglucemia insulínica (Reid y Yen 1981) y donde se ha observado que pacientes adrenalectomizados presentan niveles normales de met-enkefalina. Estos resultados, pues, cuestionan la hipótesis de que la médula adrenal constituya en el hombre la fuente predominante de este péptido (Grossman 1988).

Respecto a la función de la met-enkefalina liberada por la glándula adrenal en estas formas de estrés, los datos avalan, de nuevo, su posible participación en la analgesia (Lewis y cols. 1982).

Estudios realizados por Lightman y Scott Young III (1987) revelan que, a nivel central, la activación de las neuronas encefalinérgicas localizadas en las células parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo, median la respuesta al estrés agudo inducido por inyección de salino hipertónico o por inducción del síndrome de abstinencia a morfina en ratas. De hecho, en ambos casos, se obtiene un incremento paralelo de ARNm para proencefalina y CRF. Los niveles del ARNm para proencefalina A sólo se encuentran elevados en respuesta a la inyección hipertónica de salino, considerada como una forma de estrés físico, no resultando afectados los niveles de este mensajero en animales sometidos a modelos de estrés donde se observa un componente psicológico (natación, inmovilización o estrés por frío) (Harbuz y Lightman 1989).

Otros autores, por el contrario, no han observado variaciones en el contenido central de met- y leu-encefalina tras la aplicación de estrés por frío (Vaswani y cols. 1988), ni por shock eléctrico en las patas (Fratta y cols. 1977).

La regulación de la liberación de ACTH y CRF, así como de una gran variedad de hormonas hipofisarias son los probables sustratos para la actuación de las encefalinas a nivel central durante la compleja respuesta neuroendocrina al estrés (Buckingham y Cooper 1984). Otras alteraciones, como la modificación de la ingesta y la activación del sistema inmune, fenómenos que son subsecuentes a algunas formas de estrés, también han sido asociadas al aumento de la actividad opioideérgica en SNC (Owens y Smith, 1987).

7.1.3. Activación del sistema de la prodinorfina durante el estrés agudo

Aunque al igual que para los péptidos derivados de la POMC y de la proencefalina, la presencia de neuronas y receptores para dinorfina, es notable en diversas áreas implicadas clásicamente en la respuesta del organismo al estrés (hipotálamo, hipófisis y médula adrenal) son muy escasos los datos concretos que han sido referidos en la literatura sobre variaciones en los niveles de dinorfina en respuesta al estrés agudo. El contenido de dinorfina determinado por radioinmunoensayo en diversas áreas cerebrales de ratas expuestas a estrés por frío, revela una disminución apreciable de la misma en hipotálamo, no viéndose afectado el contenido de dinorfina a nivel hipofisario (Vaswani y cols. 1988). Por el

contrario, dichos niveles sí están disminuídos en el lóbulo anterior de la hipófisis, permaneciendo constantes en el lóbulo posterior y en el hipotálamo tras someter a ratas a shock inescapable en las patas (Millan y cols. 1981).

Otros autores (Morley y cols. 1982), sin embargo, han hallado que la exposición aguda a la inmovilización y al estrés por frío, no modifica la inmunorreactividad a dinorfina en hipotálamo y corteza cerebral, contrariamente a los datos descritos por Vaswani y cols. (1988), probablemente debido a las distintas condiciones empleadas en la aplicación del modelo de estrés.

7.2. Estrés crónico

Los efectos del estrés crónico sobre la secreción de opioides son menos conocidos que los producidos por el estrés agudo. Algunos autores han observado que la aplicación crónica intermitente de shocks eléctricos en las patas provoca una gran elevación de las formas acetiladas y no acetiladas de beta-endorfina en plasma (Akil y cols. 1984). Sin embargo, Vaswani y Tejwani (1986) no han hallado variaciones en la beta-endorfina plasmática tras varios días de estrés provocado por ayuno.

A nivel central, los datos más relevantes apuntan a una elevación del contenido hipofisario del ARNm para POMC tras la exposición a diversas formas de estrés crónico (Shiomi y cols. 1986). Aún así, existen datos que demuestran que el estrés crónico no modifica ni la síntesis, ni el procesamiento de la POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis, mientras que sí lo hace selectivamente en el lóbulo intermedio, fenómeno contrario al que se desarrolla durante el estrés agudo (Shiomi y Akil 1982).

En relación a otras áreas cerebrales, Chance y cols. (1977) observaron que la aplicación de shocks eléctricos durante ocho días provocaba analgesia asociada al aumento de algún opioide endógeno a nivel central. Sin embargo, otros autores han observado producción de tolerancia al efecto analgésico del estrés tras la aplicación crónica de éste durante periodos más prolongados (Akil y cols. 1984). En ratas sometidas a privación de alimentos por espacio de varios días, se han hallado incrementos importantes de los niveles de beta-endorfina en cuerpo estriado, sin modificación del contenido hipotalámico de dicho péptido (Vaswani y Tejwani 1986).

Por otro lado, se ha detectado una disminución en las concentraciones de leu-encefalina en hipotálamo de rata debido a la aplicación prolongada de shocks eléctricos en las patas (Rossier y cols. 1978).

El grado de discrepancia entre los resultados de los diversos autores probablemente esté relacionado con el hecho de que no podemos considerar el estrés como un fenómeno concreto que provoca una reacción única en el organismo, sino que muchas de las respuestas observadas están condicionadas por la duración, la intensidad y el tipo de estrés, físico frente a psicológico (Terman y cols 1984). El papel de un subtipo particular de receptor tampoco está definido, aunque los receptores mu probablemente juegan un papel crítico en muchos de estos paradigmas (Akil y cols. 1984).

8. CONTROL CENTRAL DE LA PRESION ARTERIAL

La presión arterial representa el producto neto de las resistencias vasculares y el gasto cardíaco y es la resultante de una compleja integración de sistemas de regulación homeostática -mecánicos, químicos y nerviosos-, donde ningún componente individual puede definirse como el más crítico, al verse modificada su participación relativa según las condiciones del medio externo o interno.

Así, si con carácter muy general la resistencia periférica local es el factor principal en la regulación de la presión arterial en estado normal, otros factores, como el control renal, el hormonal, el químico o el central, abandonan su función más o menos silente adquiriendo protagonismo en aquellas situaciones donde la homeostasis se encuentra alterada.

En este conjunto, el SNC representa el punto de integración de los sistemas mencionados anteriormente, ya que la totalidad del control de aquéllos se sitúa a este nivel. De hecho, el SNC regula el tono simpático de las neuronas que inervan los vasos sanguíneos, y actúa integrando los mecanismos reflejos y controlando la liberación de hormonas vasoactivas, además de acoplar el sistema cardiovascular a los cambios comportamentales (Ferrario y cols. 1985). Es más, la liberación de catecolaminas desde la médula adrenal a la circulación para regular el tono vasomotor, así como la influencia vasoconstrictora de los vasos arteriolares de resistencia periférica, se efectúa vía simpática a través del SNC.

En definitiva, la regulación central de la presión arterial es un proceso complejo, por el cual el SNC recibe información desde diferentes puntos, enviando, a su vez, mensajes para el control apropiado de los órganos efectores, a través de una compleja red de circuitos nerviosos que se distribuyen ampliamente por cerebro y médula espinal. Esta complejidad permite la actuación simultánea de varios sistemas de control, con una respuesta no siempre unitaria, sino que, a menudo, se pueden observar efectos contrapuestos en orden a establecer el equilibrio en un área concreta (Reis 1981).

8.1. Bases neuroanatómicas y neurofisiológicas en la regulación central de la presión arterial

El papel del sistema nervioso en la regulación del sistema cardiovascular ha sido objeto de un amplio estudio por su doble interés científico y clínico, habiéndose avanzado notablemente en lo que se refiere al conocimiento de los reflejos cardiovasculares y a la elaboración de los patrones de respuesta cardiovascular frente a las modificaciones comportamentales, como se detallará posteriormente.

Los dispositivos activadores de este complejo sistema son los reflejos cardiovasculares, consecuencia de la activación de barorreceptores, quimiorreceptores y receptores pulmonares de tipo mixto en la periferia, mientras que diversos núcleos pontinos, bulbares e hipotalámicos, ampliamente interrelacionados entre sí, así como estructuras más rostrales, van a ser el sustrato neuronal integrador, constituyendo, finalmente, las neuronas eferentes preganglionares del sistema autónomo las vías responsables de la respuesta.

Las neuronas preganglionares eferentes que intervienen en los arcos reflejos cardiovasculares se localizan en la médula espinal y en el bulbo raquídeo. El origen de las fibras preganglionares simpáticas se sitúa en el núcleo intermedio lateral de la médula espinal. Dichas fibras inervan tanto el corazón como el músculo liso vascular. Los axones cardioinhibitorios vagales parten de, al menos, dos núcleos bulbares, el núcleo motor dorsal del vago y el núcleo ambiguo.

Los sistemas centrales implicados en el control tónico y reflejo de la presión arterial están localizados principalmente en la zona inferior del tronco cerebral, donde convergen y efectúan su primera sinapsis los nervios aferentes del seno carotideo y depresor aórtico que conducen la información relacionada con la

presión arterial (barorreceptores) y con el contenido de gases (quimiorreceptores) de la sangre arterial. Por su parte, los sistemas responsables de la integración de los cambios de presión arterial asociados a modificaciones en el comportamiento, se sitúan en regiones cerebrales más rostrales, en concreto en regiones del prosencéfalo basal y del sistema límbico. Estos centros actúan concertadamente, ajustando la circulación a las demandas comportamentales.

Por lo que se refiere a las proyecciones de barorreceptores y quimiorreceptores que, haciendo estación en la zona caudal del NTS, se dirigen a otras estructuras cerebrales, las técnicas autorradiográficas han permitido establecer hasta la fecha cinco zonas terminales: la región ventrolateral del bulbo raquídeo, el núcleo parabraquial, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el núcleo central de la amígdala y el propio núcleo intermedio lateral de la médula espinal, todos ellos a su vez interconectados entre sí (Ciriello y cols. 1981). El NTS constituye, por tanto, el sustrato anatómico donde se localiza la primera sinapsis del arco barorreflejo.

El control tónico vasomotor corresponde a diversos grupos celulares, localizados en la zona ventrolateral del bulbo raquídeo. El área presora está constituida por un grupo de neuronas, entre las que se encuentran las denominadas C1, situadas en la región rostral ventrolateral (RVLB). De hecho, la interrupción de la transmisión neuronal a este nivel, mediante lesiones químicas o electrolíticas, reduce la presión arterial hasta niveles próximos a los obtenidos por transección espinal (Granata y cols. 1985; Dampney y Moon 1980). Los axones localizados en la RVLB contactan con la superficie medular en el núcleo intermedio lateral, proporcionando la fuente de excitación de las neuronas preganglionares simpáticas en la médula espinal, existiendo una cierta controversia sobre si los axones proceden de las neuronas del grupo C1 (Bachelard y cols. 1990) o de otras neuronas de neurotransmisor no identificado, que, localizadas también en la RVLB, se sitúan muy próximas a aquéllas (Granata 1990).

El área C1 de la RVLB se encuentra, además, densamente inervada por proyecciones neuronales procedentes de diversas regiones del NTS (Ross y cols. 1985). Las áreas que se proyectan a la C1 corresponden a las zonas concretas del NTS donde terminan las aferencias de quimio y barorreceptores. El hecho de que las lesiones efectuadas en estas zonas bloqueen completamente las respuestas vasodepresoras reflejas inducidas por estimulación del seno carotídeo (Benarroch y cols. 1986), indica que las vías que tienen su origen en el NTS y acaban en la

zona C1, son críticas en la mediación de la respuesta barorrefleja, ejerciendo su acción a través de un control tónico de carácter inhibitorio.

En paralelo a esta vía depresora, e inhibiendo igualmente la actividad simpática como resultado final, se ha descrito un segundo sistema depresor, independiente del reflejo barorreceptor, en la región ventrolateral caudal del bulbo raquídeo (CVLB) (Willette y cols. 1984), allí donde se sitúan diversos grupos neuronales, entre ellos el denominado A1. Las acciones de las neuronas localizadas en este área sobre la circulación son completamente opuestas a las ocasionadas por activación de la RVLB. De este modo, la estimulación química o eléctrica en esta zona produce una disminución drástica de la presión arterial (Imaizumi y cols. 1985; Blessing y Reis 1983).

Resultados obtenidos por Willette y cols. (1984) demuestran que las acciones depresoras inducidas desde la CVLB dependen de la integridad del área C1 en la RVLB. De hecho, las lesiones bilaterales en el área C1 inhiben la caída de la presión arterial inducida en rata por estimulación del área A1. El sustrato fisiológico responsable de este efecto depresor parece corresponderse con una vía que se proyecta desde A1 a C1 (Ross y cols. 1985) y que produciría, en último término, una disminución de la actividad de las neuronas del núcleo intermedio lateral en la médula espinal y, consecuentemente, del tono vasomotor simpático.

Con un carácter fundamentalmente antagónico al del NTS, el hipotálamo contiene las vías de control de presión arterial de carácter presor. Dada la posición que ocupa esta estructura cerebral y la amplitud de sus conexiones, es más que probable que opere de una manera integrativa más que de un modo reflejo. Puesto que el hipotálamo regula o, al menos, ejerce su influencia sobre distintos patrones comportamentales, parece razonable asumir que dicha región intervenga en la regulación de las modificaciones cardiovasculares que acompañan a las reacciones comportamentales.

De las dos vías localizadas a nivel hipotalámico con participación en el control cardiovascular, la primera de ellas circunscribe su acción al hipotálamo lateral y se origina en áreas rostrales, posiblemente en la corteza y en el sistema límbico. La segunda de ellas se localiza en el hipotálamo posterior y envía conexiones polisinápticas a bulbo raquídeo, núcleo ambiguo, núcleo lateral reticular y NTS (Calaresu y Thomas 1975). Además, el hipotálamo posterior posee proyecciones recíprocas con la zona C1 bulbar y proyecciones monosinápticas que se dirigen al

núcleo dorsal motor del vago y al núcleo intermedio lateral de la médula espinal (Saper y cols. 1976), hecho que señala una posible acción hipotalámica directa sobre las eferentes preganglionares simpáticas. El papel del hipotálamo posterior se adscribe a su carácter presor, mientras, por su parte, la estimulación del área anterior hipotalámica produce una disminución de la presión arterial del mismo orden que la respuesta evocada por estimulación de los barorreceptores (Hilton y Spyer 1971).

Otras muchas áreas cerebrales interconectadas con las dos zonas descritas en detalle, bulbo raquídeo e hipotálamo, ejercen también un papel importante en el complejo mecanismo que constituye el control cardiovascular. Entre las mismas merecen destacarse el núcleo ambiguo, el locus coeruleus y el núcleo central de la amígdala.

8.2. Bases neuroquímicas y neurofarmacológicas en la regulación central de la presión arterial

Desde el punto de vista de la neurotransmisión, son numerosas las moléculas, incluyendo neurotransmisores clásicos y neuropéptidos, que se han descrito sirven de sustrato para la transmisión del mensaje nervioso en cada una de las regiones anteriormente enumeradas y median, consecuentemente, los distintos efectos sobre la presión arterial.

8.2.1. Sistemas catecolaminérgicos en la regulación central de la presión arterial

La mayoría de las regiones que participan en la regulación de la presión arterial se encuentran profusamente inervadas por neuronas catecolaminérgicas. Aunque es aún prematuro delimitar el papel de la AD, NA y DA en el control central de la presión arterial, las evidencias indican que las neuronas catecolaminérgicas juegan un papel activo tanto en los estados de normotensión como en la hipertensión.

8.2.1.1. Biosíntesis, liberación e inactivación de catecolaminas en el sistema nervioso central.

Biosíntesis

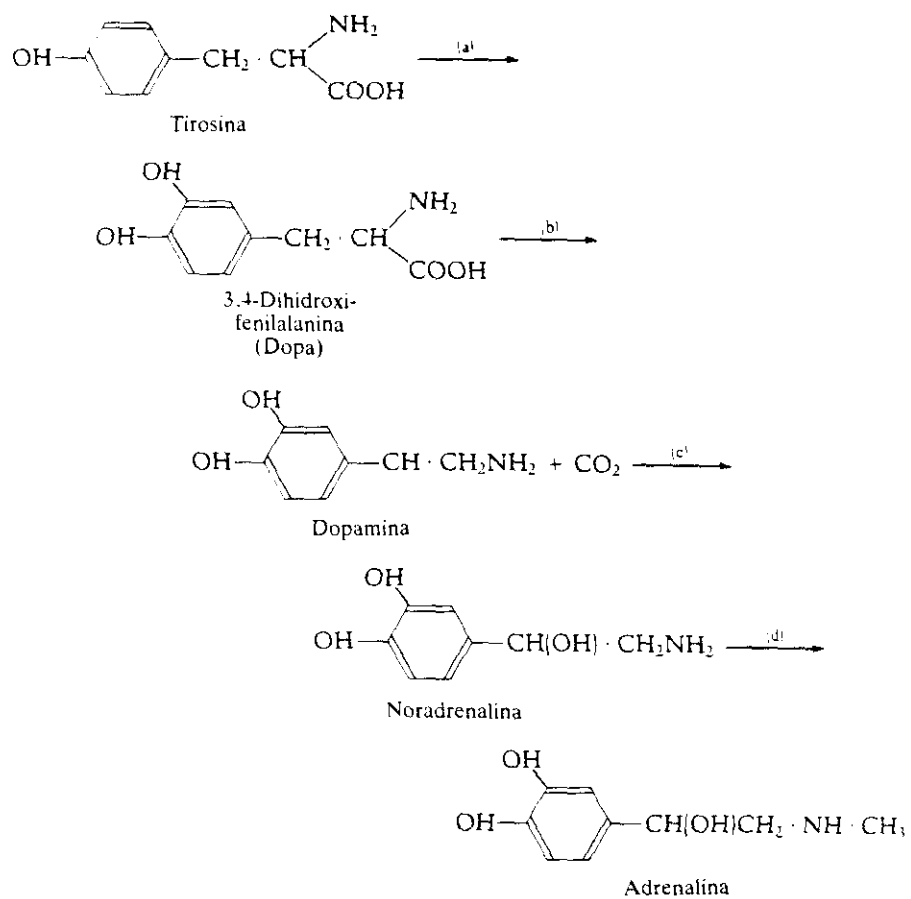
La síntesis de catecolaminas (NA, AD, y DA) se produce en el terminal nervioso, y se inicia a partir de la captación neuronal del precursor aminoacídico tirosina, presente en la circulación. Tras este paso inicial, las vías para la síntesis de los tres neurotransmisores siguen una ruta común, compuesta por una secuencia de reacciones o cascada enzimática (Fig.2).

Las enzimas que catalizan los distintos pasos en la secuencia son transportadas desde el soma neuronal, donde son sintetizadas, a las terminales axónicas. La tirosina sufre, de este modo, una serie de transformaciones bioquímicas para producir, en último término, NA, AD o DA, dependiendo de la biodisponibilidad de la feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT) y de la dopamina beta-hidroxilasa, enzimas responsables de la transformación de NA en AD y de DA en NA respectivamente.

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima inicial en la ruta biosintética y cataliza la conversión de tirosina en L-DOPA, constituyendo, además, la enzima limitante de la velocidad del proceso, de modo que se emplea con frecuencia, no sólo como marcador de la síntesis de DA, sino como marcador de la síntesis de las tres aminas en general (Plotsky y cols. 1989).

La regulación de la síntesis de catecolaminas es dependiente, por tanto, del grado de actividad de TH. A corto plazo, minutos o segundos, el proceso de regulación no se asocia a una alteración de la síntesis del enzima, para lo cual se requieren periodos más prolongados, sino a una modificación de la actividad de las moléculas del enzima ya existentes. En este proceso los niveles de los metabolitos y de las catecolaminas, como productos finales, actúan como inhibidores competitivos del cofactor pteridina en el sitio activo de la TH, o bien actúan oxidando a la propia pteridina, impidiendo la formación del enzima activo.

Una segunda modalidad de regulación incluye la activación alostérica de la TH mediante un proceso de fosforilación. Estos datos proporcionan soporte a la anterior especulación de que las propias catecolaminas puedan regular la actividad de la TH como respuesta a las alteraciones en los niveles intraneuronales de



Reacción enzimática	Enzima	Cofactores
a)	Tirosina hidroxilasa (EC 1.14.6.2)	Tetrahidrobiopterina molecular O ₂ , Fe ²⁺ , NADPH
b)	L-ácido aromático decarboxilasa (EC 4.1.1.28)	Piridoxal fosfato
c)	Dopamina β-hidroxilasa (EC 1.14.17.1.)	[Ascorbato; O ₂ molecular Cu ²⁺
d)	Noradrenalina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.28)	S-adenosilmetionina

Fig.2.- Síntesis enzimática de las catecolaminas.

aquéllas, siendo estos mecanismos, por lo tanto, responsables de que, cuando se produce un aumento de la actividad de las neuronas catecolaminérgicas, los niveles endógenos del neurotransmisor se mantengan constantes, a pesar de la pérdida del mismo que, se asume, ocurre durante el aumento de la liberación. Dicha situación homeostática es posible por el incremento de la actividad del enzima, que permite mantener un "pool" constante del neurotransmisor, aún cuando se verifiquen cambios sustanciales en la utilización de las catecolaminas.

Liberación

De todas las modalidades de liberación descritas para las distintas poblaciones catecolaminérgicas, el mecanismo que transcurre a nivel central es el menos conocido, si bien es cierto que se produce por un proceso dependiente de Ca^{2+} .

Existen un buen número de evidencias que demuestran que son muy diversas las sustancias, incluyendo neurotransmisores y neuropéptidos, que pueden regular la liberación de catecolaminas en SNC, independientemente de que la concentración local de las mismas en la sinapsis module su propia liberación mediante su interacción con los receptores alfa₂ presinápticos (Langer 1981).

Por lo que se refiere al sistema opioide, se ha podido demostrar que la activación de los receptores de este sistema peptidérgico, modula presinápticamente, en determinadas estructuras cerebrales, la liberación de catecolaminas (Mulder y cols. 1987; Schoffelmeer y cols. 1988; Detlef Taube y cols. 1976).

Inactivación

La recaptación facilitada por parte de las neuronas y células gliales circundantes a la hendidura sináptica, mediante sistemas de transporte de alta afinidad, es el medio principal por el que resultan inactivadas las aminas biógenas (Iversen 1978).

Estudios realizados "in vivo" indican, sin embargo, que, aproximadamente entre un 40 y un 60% de las aminas son metabolizadas enzimáticamente por la COMT y la MAO (Fig.3), mientras el resto es inactivada por una simple recaptación en diversos tejidos, constituyendo un mecanismo de inactivación no metabólico (Cooper 1986).

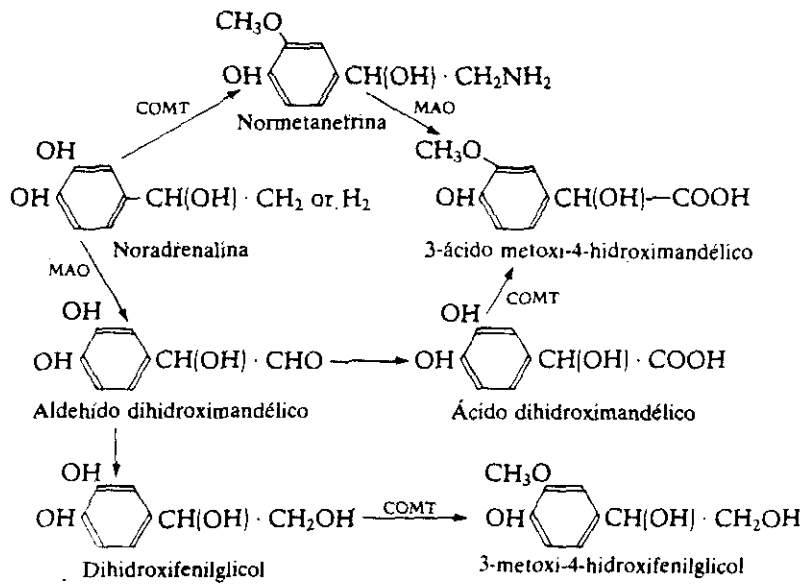
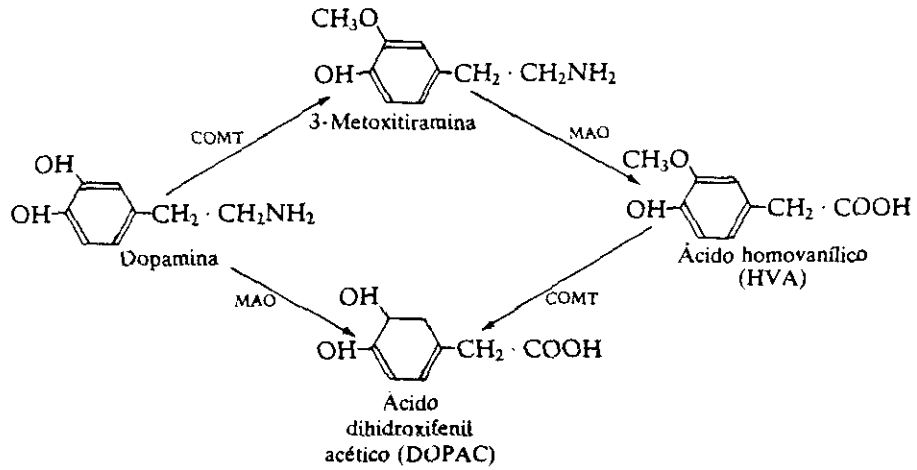


Fig.3.- Metabolismo de las catecolaminas.

Dos son las enzimas responsables de su metabolismo:

- La monoaminoxidasa (MAO), que convierte las catecolaminas en sus correspondientes aldehídos.
- La catecol-O-metiltransferasa (COMT), responsable de la formación de los metabolitos metilados.

En relación a la localización de ambas enzimas, la MAO ha sido considerada como un enzima de localización intraneuronal mitocondrial, aunque también se ha detectado extraneuronalmente. Para la COMT, mucho más abundante en SNC, no se ha hallado aún una localización celular precisa, si bien actúa preferentemente a nivel extraneuronal, estando unida a la membrana citoplasmática.

La participación de la COMT en el metabolismo central de las catecolaminas es más elevada que la contribución efectuada por la MAO, como se deduce del hecho de que la proporción de metabolitos metilados en SNC es ligeramente superior a la hallada para el resto de los mismos.

El 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol (MHPG) constituye el principal metabolito de NA y AD en SNC. El ácido 3-metoxi-4-hidroxi mandélico, también denominado vainillil mandélico (VMA), que se emplea como índice de la actividad catecolaminérgica periférica, es, sin embargo, prácticamente inexistente en SNC. Existen, además, diferencias muy apreciables en cuanto a la forma química en que el MHPG cerebral se presenta en las diversas especies. Mientras en rata aparece en su casi totalidad conjugado en forma de sulfato, en ratón y primates predomina la forma libre, con escasa aportación de las formas sulfato (Elsworth y cols. 1983; Karoum y cols. 1977).

La circunstancia de que NA y AD presenten como metabolito común el MHPG (Fig 3), dificulta enormemente la evaluación de la actividad adrenérgica en SNC. No obstante, es sabido que sólo una pequeña fracción del MHPG existente deriva de la actividad de neuronas adrenérgicas, correspondiendo el resto al metabolismo de NA, hecho que está de acuerdo con su mayor concentración cerebral (Kopin 1985).

Los metabolitos primarios de DA detectados en SNC son los ácidos homovanílico (HVA) y dihidroxifenilacético (DOPAC). En primates se utiliza una acumulación del metabolito mayoritario HVA, como índice de la actividad funcional de las neuronas dopaminérgicas en SNC. En cerebro de rata se ha demostrado, sin embargo, que el DOPAC refleja con mayor precisión la actividad de este neurotransmisor, aunque sus concentraciones son sólo dos veces superiores a las halladas para el HVA (Kopin 1985).

8.2.1.2. Concepto de velocidad de renovación

El término "turnover", o velocidad de renovación, define el ritmo al cual un neurotransmisor almacenado en el interior de un tejido es reemplazado. Por lo tanto, la velocidad de renovación no se corresponde necesariamente con el grado de biosíntesis, sino que refleja la suma conjunta de los procesos de síntesis, liberación y degradación y, consecuentemente, describe el estado funcional y la actividad, en este caso, de las neuronas catecolaminérgicas en una población determinada. Se considera que este parámetro bioquímico está sintonizado con el grado de actividad bioeléctrica neuronal.

Para el método seleccionado en el presente trabajo, con el fin de evaluar la velocidad de renovación, ésta se expresa como el cociente entre el nivel del metabolito y de la amina correspondiente en un momento determinado (Meek y Neff 1973).

8.2.1.3. Sistema adrenérgico y control central de la presión arterial

Debido a las cantidades relativamente pequeñas de AD halladas en el cerebro en comparación con otras monoaminas y a las dificultades para encontrar una técnica analítica suficientemente sensible para su detección, la adrenalina cerebral ha sido, hasta fechas muy recientes, ignorada sistemáticamente a la hora de definir su mediación en los diversos sistemas fisiológicos. De hecho, sólo el desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica, ha permitido sistematizar las investigaciones, que han puesto de manifiesto la contribución del sistema adrenérgico en el control de diversas funciones orgánicas.

Los cuerpos celulares que contienen AD se restringen a tres grupos localizados en bulbo raquídeo, designados como C1, C2 y C3 además de un pequeño grupo de neuronas existente en hipotálamo (Hökfelt y cols. 1973).

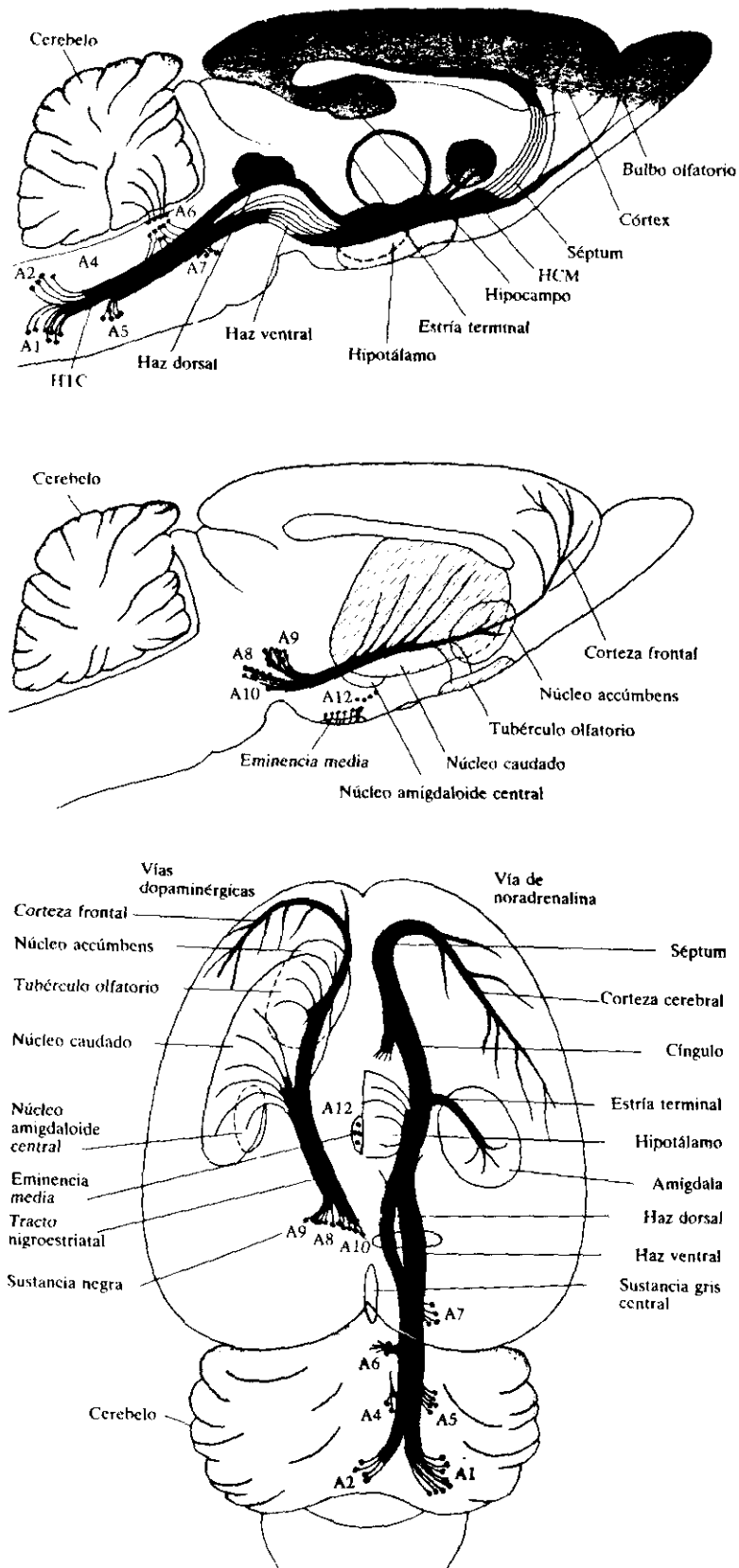


Fig.4.- Vías de la noradrenalina (panel superior) y dopamina (panel central) esquematizadas en un corte sagital. En el panel inferior se representan las mismas vías en un corte horizontal. Tomado de Bradford (1986).

El mayor y, posiblemente, el grupo más importante de neuronas adrenérgicas que intervienen en el control central de la presión arterial es el grupo C1, al que se aludía anteriormente, localizado en la RVLB. Este pequeño sistema microanatómico, identificado por la presencia del enzima PNMT, proyecta sus axones caudalmente para inervar el núcleo intermedio lateral de la médula espinal, y rostralmente para inervar diversos núcleos hipotalámicos (Fuller 1982).

A pesar de ello, no está determinada aún la identidad del neurotransmisor liberado por las proyecciones desde la RVLB a las neuronas espinales, proyecciones que intervienen en el control autónomo. Si bien clásicamente se ha considerado que la AD constituía el neurotransmisor de las mismas, las evidencias farmacológicas no soportan tal presunción, ya que la AD reduce, más que incrementa, la descarga de las fibras simpáticas (Guyenet y Stornetta 1982; Sangdee y Franz 1983). Sin embargo, es posible que otros neuropéptidos que se ha descrito están coalmacenados con la AD en estas fibras (Hökfelt y cols. 1983; Lorenz y cols. 1985), proporcionen la fuente de excitación de las neuronas preganglionares simpáticas, en el núcleo intermedio lateral de la médula espinal (Reis y cols. 1987a).

Ejerciendo una función moduladora sobre la presión arterial, se sitúa, en el NTS, a nivel rostral en la zona C2, un segundo grupo de neuronas adrenérgicas que se proyectan a los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, y al locus coeruleus, donde podrían controlar la actividad de los cuerpos celulares noradrenérgicos mediante señales inhibitorias (Sawchenko y Bohn 1988). Estas neuronas parecen intervenir modulando la expresión funcional de las áreas presora y depresora del bulbo raquídeo, o integrando la respuesta del reflejo barorreceptor (Kobilansky y cols. 1988). En esta línea se ha afirmado que una disminución del tono vasodepresor adrenérgico en NTS puede considerarse como indicador bioquímico de la reducción del funcionalismo del reflejo barorreceptor (Yukimura y cols. 1981a). Otras evidencias apoyan esta hipótesis. En esta región, la microinyección local de AD disminuye la presión arterial (Struyker-Boudier 1975), siendo bloqueado el efecto hipotensor por el antagonista adrenérgico fentolamina (De Jong y Nijkamp 1976).

Sin embargo, el empleo de los inhibidores de la PNMT constituye el único medio farmacológico para afectar selectivamente las neuronas adrenérgicas sin alterar los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico. Pues bien, confirmando la idea

de que las neuronas adrenérgicas en el bulbo raquídeo representan un sistema vasodepresor, la inyección intracisternal o intracerebroventricular de inhibidores de la PNMT incrementa la presión arterial (Bolme y cols. 1979; Fuxe y cols. 1980). Por otro lado, después de 14 semanas de producir una denervación seno-aórtica en rata (Chalmers y cols. 1979), la actividad de la PNMT está reducida en el hipotálamo anterior y posterior. En sentido contrario, los resultados recientes de Chatelain y cols. (1990), describen el efecto antihipertensor del inhibidor de la PNMT, CGS 19281A.

Por lo que respecta al hipotálamo, (Routledge y Marsden 1988) han descrito la existencia de un tracto adrenérgico, procedente de la región C1 en la RVLB, que interviene en el control de la presión arterial, y cuya estimulación eléctrica a nivel bulbar, incrementa la liberación de AD hipotalámica.

En resumen, aunque aún no se ha determinado con precisión si las neuronas adrenérgicas centrales son funcionalmente presoras o depresoras en el control de la presión arterial, debido a la ausencia de fármacos que actúen selectivamente interfiriendo la función adrenérgica, cada vez se consolida más el hecho de la posible intervención de la AD en el control y mantenimiento de la presión arterial.

8.2.1.4. Sistema noradrenérgico y control central de la presión arterial

La implicación del sistema noradrenérgico central en la regulación de la presión arterial se encuentra avalada por el sorprendente paralelismo existente entre la distribución de vías noradrenérgicas y los centros del SNC, cuyo papel en la regulación de la presión arterial ha sido suficientemente confirmado (Swanson y Sawchenko 1983). Como consecuencia de estos estudios neuroanatómicos, además de otras evidencias de tipo bioquímico, fisiológico y farmacológico, se ha postulado que, en varios centros hipotalámicos y bulbares, las neuronas noradrenérgicas podrían estar implicadas en el control de la presión arterial.

Dahlstrom y Fuxe (1964) describieron por primera vez los grupos de neuronas noradrenérgicas centrales y las numeraron de A1 caudalmente a A7 rostralmente. A partir de estos grupos celulares se originan las distintas vías que se proyectan rostral o caudalmente a diversas regiones cerebrales (Fig.4).

Los tractos NA de mayor longitud son dos:

- Una vía mayor, que tiene su origen en las regiones A4 y A6 del locus coeruleus. Este tracto proyecta la mayor parte de sus fibras en dirección rostral, originando el haz noradrenérgico dorsal que proporciona ramas a la mayor parte de las regiones encefálicas, algunas de ellas de probada trascendencia en el control de la presión arterial, como son el hipotálamo y la amígdala, extendiéndose caudalmente a otras estructuras, como el núcleo intermedio lateral de la médula espinal (Nygren y Olson 1977).

- Una segunda vía se origina en neuronas distribuidas difusamente en la región subcoerulea del tronco encefálico. El grupo A1 en la región caudal ventrolateral del bulbo raquídeo y el grupo A2 en el NTS, conjuntamente con la menor contribución relativa de los grupos A5 y A7, conforman un sistema ascendente denominado banda o haz noradrenérgico ventral (Ungerstedt 1971).

Si bien clásicamente se ha considerado que eran las neuronas noradrenérgicas del grupo A1, situado en la CLVB, las que se proyectaban a la zona RVLB del bulbo raquídeo para modular la actividad de las neuronas C1 adrenérgicas (Ross y cols. 1985), diversos autores han sugerido recientemente que la respuesta vasodepresora inducida por estimulación de la RVLB no está mediada por las neuronas A1 noradrenérgicas (Bonham y Jeske 1989; Wen-Li y Blessing 1990), y se ha propuesto al L-glutamato como el neurotransmisor responsable, en este área, del mantenimiento del tono vasomotor (Blessing 1988). En cualquier caso, la acción de las neuronas A1 sobre la circulación es completamente opuesta a la que desarrollan las neuronas C1 adrenérgicas. La estimulación química o eléctrica de las neuronas A1 provoca una disminución drástica de la presión arterial (Blessing y Reis 1983). En sentido contrario, la lesión en el área A1, produce el desarrollo inmediato de hipertensión en rata o conejo (Ross y cols. 1985). Todos estos efectos son mediados a través de una vía neuronal que desde A1 se proyecta a C1, ya que no se ha descrito una conexión directa de aquellas hacia la médula espinal que sería responsable de la alteración en la actividad del sistema nervioso simpático (Reis 1987a).

La participación de las neuronas NA, por lo que se refiere al control del reflejo barorreceptor se adscribe al grupo A2 en el NTS.

Existe en la literatura una amplia variedad de efectos sobre la presión arterial producidos por la administración de agentes adrenérgicos en el NTS. Las causas, como siempre que se observa esta situación divergente, se asocian con las diferentes especies animales empleadas, las distintas rutas de administración y, finalmente, con las características de cada una de las aproximaciones farmacológicas utilizadas para el mismo fin. Ahora bien, quizá tal controversia sólo refleja la imposibilidad, hasta el momento, de visualizar de forma global un sistema, en principio muy complejo, en el que la existencia de numerosas interconexiones puede originar nuevos circuitos compensatorios, no sólo a nivel neuronal, sino entre este sistema y el hormonal, de forma que el efecto primario pueda quedar enmascarado en un grado muy variable.

Muestra de esta diversidad de efectos puede ser, en primer lugar, la hipertensión (Vlahakos y cols. 1985) o hipotensión (De Jong y Nijkamp 1976; Struyker-Boudier 1975) descritas tras la administración local de NA en el NTS, que, en cualquier caso, es antagonizada por los agentes bloqueantes del receptor adrenérgico, lo que señala que su estimulación media el efecto final, cualquiera que sea el signo de éste.

Estudios recientes han demostrado, sin embargo, una disminución de la liberación de NA en el NTS como consecuencia del incremento de la presión arterial inducido farmacológicamente, y que permite, en último término, el correcto funcionamiento de la respuesta barorrefleja hipotensora (Kobilansky y cols. 1988). La confirmación del carácter hipotensor de la noradrenalina en este núcleo procede de los estudios de Patel y Schmid (1987), que han observado que la lesión en el NTS induce el desarrollo de una hipertensión de carácter neurogénico, que se origina como consecuencia de la ausencia de la actividad inhibitoria ejercida por las neuronas NA a este nivel sobre la actividad tónica vasomotora bulboespinal.

Ahora bien, otros datos apuntan a que la inyección a este nivel de la neurotoxina 6-OH dopamina, que produce una depleción del contenido de NA en los terminales nerviosos, no destruye el reflejo barorreceptor y causa solamente un estado transitorio de hipertensión (Snyder y cols. 1978). Estos resultados, junto con la ausencia de efecto de la hipotensión inducida experimentalmente sobre la liberación de NA (Kobilansky y cols. 1988), indican que la NA no parece ser crucial para la funcionalidad del NTS, si bien juega un papel facilitador o modulador.

Una afirmación similar resulta también válida para el hipotálamo. En este núcleo se ha podido determinar que la estimulación eléctrica del área posterior produce una respuesta presora, que parece ser debida a la estimulación de la liberación de NA y a la subsiguiente activación de los receptores alfa (Philippu y cols. 1981). Sin embargo, cuando la estimulación se efectúa en el hipotálamo anterior, se produce un efecto hipotensor, hecho congruente con la disminución de la presión arterial producida por administración de NA a este nivel.

A partir de estos estudios, se ha postulado que los mecanismos noradrenérgicos en el hipotálamo anterior estarían relacionados con el desencadenamiento de una respuesta depresora, que tiene como objeto amortiguar las elevaciones fisiológicas de la presión arterial, mientras que en el hipotálamo posterior el aumento de la actividad noradrenérgica es relativa a la respuesta compensatoria en estados hipotensivos (Philippu y cols. 1979). Así pues, existe una influencia recíproca entre el arco barorreflejo y la actividad noradrenérgica del hipotálamo, posibilitando la hipótesis de que los mecanismos noradrenérgicos en este núcleo pueden ser importantes en la regulación del reflejo barorreceptor.

8.2.1.5. Sistema dopaminérgico y control central de la presión arterial

Con una función mucho menos definida por el momento y un controvertido conjunto de evidencias farmacológicas, el sistema dopaminérgico ha sido también considerado entre los posibles sistemas que participan en los mecanismos centrales de control de la presión arterial.

De las seis vías dopaminérgicas descritas en el SNC, designadas consecutivamente de los grupos A7 a A15 (Fig.4), solamente las neuronas intrínsecas, localizadas en los diversos núcleos hipotálamicos, parecen tener alguna relevancia en el control cardiovascular; entre ellas, las neuronas de los grupos A11 y A12, localizadas respectivamente en el núcleo paraventricular y en el núcleo tuberoinfundicular, que se proyectan a eminencia media (Dahlstrom y Fuxe 1964). Además de las regiones A11 y A12, la pequeña población de terminales dopaminérgicas situadas en el NTS, parecen ser relativamente importantes en la modulación del reflejo barorreceptor. En gatos anestesiados, la actividad dopaminérgica en este núcleo se ve reducida de modo paralelo a la disminución de la presión arterial provocada experimentalmente (Kobilansky y cols. 1988).

Datos obtenidos recientemente por Felder y Carey (1987), otorgan un papel presor para la dopamina central. Esta afirmación está basada en el hecho de que la liberación basal de DA se encuentra incrementada en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), cuando se compara con sus respectivos controles WKY. De modo análogo, la microinyección de DA en el NTS de ratas anestesiadas induce un aumento de la presión arterial (Granata y Woodruff 1982), aunque con esta misma aproximación experimental Zandberg y cols. (1979) hallaron un efecto depresor.

8.2.2. Sistema opioide en la regulación central de la presión arterial

La sensibilidad del sistema cardiovascular a la administración exógena de opioides es conocida desde la segunda mitad del siglo XIX, cuando diversos autores describieron los efectos cardiovasculares inducidos por la morfina (Witkowski 1877; Van Egmund 1911).

La posible significación fisiológica del sistema opioide en el control cardiovascular tiene su punto de partida, en el descubrimiento de los péptidos opioides, y subsiguientemente en los trabajos de Flórez y Mediavilla (1977). Dichos autores demostraron que la aplicación de metionina encefalina en la superficie ventral del tronco cerebral del gato anestesiado ocasionaba, una disminución de la presión arterial reversible por naloxona. Con posterioridad, han sido numerosos los investigadores que han intentado definir los efectos cardiovasculares producidos por la administración de distintos agonistas opioides. Los resultados obtenidos demuestran que éstos pueden producir hipertensión o hipotensión y taquicardia o bradicardia, dependiendo del agonista y la dosis utilizada, del lugar y vía de administración, de la especie animal empleada, o de la presencia o ausencia de anestésicos a lo largo de la manipulación experimental.

Un hallazgo importante que se ha derivado de estos estudios es el carácter silente del sistema opioide en el control fisiológico de la presión arterial, de modo que su activación se restringe a aquellos casos concretos donde la homeostasis cardiovascular está interrumpida (Holaday 1985).

De cualquier modo, existen múltiples evidencias que apoyan la participación del sistema opioide endógeno en el control central del sistema cardiovascular.

8.2.2.1. Evidencias anatómicas de la participación del sistema opioide en el control central de la presión arterial

La amplia distribución del sistema opioide en el SNC en general, y en cerebro medio y bulbo raquídeo en particular, supone la proximidad, cuando no la existencia, de este tipo de péptidos en todas las áreas y núcleos descritos previamente como responsables del control cardiovascular a nivel central. En concreto, merece un interés especial la densa localización de receptores opioides y encefalinas halladas en hipotálamo y NTS (Khachaturian 1985; Akil y cols. 1988).

El patrón de distribución para estos receptores en estas zonas críticas para el control cardiovascular, muestra en rata una densidad muy elevada de receptores mu en bulbo raquídeo, preferentemente en el NTS, con moderada presencia de receptores delta y kappa (Sharif y Hughes 1989). En hipotálamo, los receptores mu son muy escasos y los delta están ausentes, correspondiendo la mayor concentración a los receptores kappa. Los tres sistemas opioideoérgicos (prodinorfina, proencefalina y POMC) aparecen representados en este núcleo en una proporción similar.

La hipotética importancia del sistema opioide intrabulbar con respecto al control central de la presión arterial ha sido confirmada con la reciente descripción de una vía encefalinérgica que se proyecta desde el NTS a la RVLB (Morilak y cols. 1989). Esta proyección podría tener una función moduladora importante, actuando sobre el reflejo barorreceptor, y su descubrimiento podría proporcionar nuevas perspectivas a la hora de definir los sustratos anatómicos responsables de los efectos farmacológicos de los agonistas y antagonistas opioides, y, lo que es más importante, puede representar el sustrato neuronal implicado en las alteraciones de la presión arterial o en las modificaciones de la sensibilidad del reflejo barorreceptor, observadas durante condiciones tales como el shock o el estrés.

Respecto a las neuronas beta-endorfinérgicas, tienen una gran significación funcional aquellas que, con su cuerpo celular ubicado en el núcleo arcuato, área preóptica e hipotálamo anterior, envían sus proyecciones al NTS (O'Donohue y Dorsa 1982), ya que conectan con dicho centro de reconocida trascendencia en la regulación homeostática cardiovascular.

8.2.2.2. Evidencias farmacológicas de la participación del sistema opioide en el control central de la presión arterial

Estas evidencias están constituídas por un número importante de investigaciones, incapaces de ser reflejadas de modo conjunto dada la controversia que existe sobre los efectos cardiovasculares producidos por los opioides. Debido a dichas variaciones, los ensayos con agonistas tienen, por sí mismos, un valor relativo para predecir el modo en el que los opioides modulan las respuestas cardiovasculares (Holaday 1983). La administración de antagonistas en animales cuya homeostasis está alterada, puede considerarse como una aproximación más adecuada para obtener información sobre el papel fisiológico y patofisiológico del sistema opioide endógeno en la función cardiovascular, ya que el sistema opioide, como se mencionaba con anterioridad, es inactivo en situación basal. De hecho, la administración del antagonista naloxona en ratas o individuos normotensos carece de efecto sobre el sistema cardiovascular (Feuerstein y Siren 1987b).

Como consecuencia de la escasa liposolubilidad de los péptidos opioides, la mayor parte de los datos existentes sobre sus efectos cardiovasculares más que por administración periférica, se han obtenido mediante su administración directa sobre SNC. Así, hipertensión y taquicardia suceden a la administración i.c.v. de morfina o de diversos péptidos opioides, mientras hipotensión y bradicardia se observan después de su administración i.v. (Lang y cols. 1982; Yukimura y cols. 1981c).

El empleo de análogos sintéticos de los opioides endógenos, más resistentes a la degradación enzimática (Tabla I), ha resuelto el problema inicial que representaba la imposibilidad de detectar efectos cardiovasculares apreciables después de la administración i.c.v. de péptidos tales como la met-enkefalina. En principio el experimentador estaba obligado a administrar dosis muy altas de los neuropéptidos, en cuyo caso los resultados obtenidos eran cuestionables debido a la posibilidad de que, a concentraciones tan elevadas, se produjera una ocupación inespecífica de otros receptores.

Por otra parte, es frecuente observar un dualismo de efecto en relación con la dosis, apareciendo, en muchos casos, efectos excitatorios (taquicardia e hipertensión) a dosis bajas, y efectos inhibitorios (bradicardia e hipotensión) a dosis elevadas (Bellet y cols. 1980; Bolme y cols. 1978). Por tanto, la mayor o menor ocupación de los receptores opioides parece ser crucial para el efecto obtenido. De nuevo, hay que tener en cuenta que los péptidos opioides son fácilmente

degradados a nivel central por acción de las peptidasas correspondientes, y que, por tanto, la ocupación puede variar, sobre todo, tras la administración i.c.v., donde influyen dos factores: el volumen del líquido cefalorraquídeo y la propia degradación enzimática (Arndt 1987), determinando entre ambos hechos la concentración final del péptido en el lugar de acción.

El estado del animal durante la manipulación experimental es también una variable importante a considerar en la interpretación de las respuestas farmacológicas inducidas por los opioides, puesto que el empleo de anestésicos altera drásticamente los efectos producidos por aquéllos. Delbarre y cols., en 1978, demostraron, por primera vez, que los anestésicos podían bloquear la respuesta presora a la inyección central de péptidos opioides. Con posterioridad, Sander y cols. (1982) y Yukimura y cols. (1981b), estudiaron, de modo sistemático, las respuestas cardiovasculares que seguían a la inyección de opiáceos en animal consciente y anestesiado, sin que hasta el momento, se hayan obtenido conclusiones definitivas al respecto.

Las diferencias entre especies son también apreciables. La administración de leu-enkefalina produce una disminución de la presión arterial en conejo, perro y mono anestesiado, sin embargo, el curso temporal de la respuesta es muy diverso y el aumento simultáneo de la frecuencia cardíaca observado en monos no aparece en rata y conejo (Koyama y cols. 1985). La inconsistencia entre estos resultados puede ser debida a las diferencias de sensibilidad del reflejo barorreceptor entre las diversas especies, situación esta que puede atribuirse, a su vez y parcialmente, a la distinta distribución de las subpoblaciones de receptores opioides en SNC para cada especie (Hughes y Shariff 1989; May y cols. 1989).

También ha sido investigada la posibilidad de que distintos subtipos de receptores opioides favorezcan un determinado efecto. En este punto, puede afirmarse que los agonistas del receptor μ son presores cuando se administran tanto en animal consciente como en anestesiado, y, en términos generales, su acción hipertensora transcurre independientemente de la zona del SNC en la que se efectúa la administración: NTS (Hassen y Feuerstein 1987; Gordon 1986) o hipotálamo anterior (Feuerstein y Faden 1982; Pfeiffer y cols. 1983a).

Los agonistas delta, por su parte, se asocian también a respuestas presoras, si bien se ha descrito que, para producir estos efectos, poseen una potencia inferior y de grado variable a la hallada para los agonistas del receptor μ

(Pfeiffer y cols. 1983b; Feuerstein y Faden 1982).

Con un carácter opuesto a las respuestas inducidas por activación de los receptores mu y delta, la estimulación de los receptores kappa en el núcleo paraventricular del hipotálamo, NTS y núcleo ambiguo y supraóptico, producen respuestas depresoras cuando se administran en rata anestesiada (Gautret y Schmitt 1985; Hassen y cols. 1984). En animal consciente, los efectos relativos a la administración de agonistas kappa están aun poco documentados. La microinyección en hipotálamo anterior del agonista kappa MR 2034, no altera la presión arterial ni la frecuencia cardíaca en rata (Pfeiffer y cols. 1983a). Resultados más recientes muestran una acción hipertensora para la dinorfina A (1-13) tras su administración i.c.v. (Glatt y cols. 1987), datos que concuerdan con los obtenidos por Saunders y Thornhill (1987), y en los que la hipertensión puede ser parcialmente debida, según el diseño experimental y la argumentación de los propios autores, a la intensa activación de la ingesta y de la conducta exploratoria evocada por la dinorfina, alteraciones estas que transcurren de modo simultáneo a la elevación de la presión arterial en las ratas.

Una gran parte de los estudios actuales en este área tratan de definir, de manera precisa, cuál es el sustrato anatómico sobre el que residen los efectos cardiovasculares de los opioides. Sobre la base del elevado contenido de receptores mu, delta y kappa, así como de encefalinas, observado tanto en la RVLB como en la CVLB, y de la gran relevancia de estas zonas en el control central de la presión arterial, Sapru y cols. (1987) han puesto de manifiesto que la activación de receptores opioides en la CVLB de rata anestesiada produce una disminución de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca de mayor magnitud, cuando los agonistas administrados son kappa y delta. La activación de los receptores mu y delta en el área depresora del bulbo raquídeo (RVLB), por el contrario, causa un incremento de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca, que, como en el caso anterior, son prevenidas por la administración de naloxona. Este efecto ha sido interpretado en términos de un aumento de la liberación de acetilcolina en RVLB, ya que, a nivel central, ésta se comporta como un neurotransmisor excitador (Brezenoff y Giuliano 1982).

La administración de agonistas opioides en rata consciente en diversas áreas hipotalámicas también ha sido examinada. Las microinyecciones de DADLE -(D-Ala², D-Leu⁵) encefalina- y DAGO -(D-Ala², N-Me-Fen⁴, Gli-ol⁵) encefalina-, agonistas específicos de los receptores delta y mu opioides respectivamente,

producen un incremento de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca. En este caso, para dosis bajas de DAGO, el mecanismo de acción sugerido es una activación final del sistema nervioso simpático ya que, simultáneamente, se ha observado un incremento en los niveles plasmáticos de AD y NA (Pfeiffer y cols. 1983b).

Por lo que se refiere a las evidencias farmacológicas, merecen, por último, un interés especial los efectos de los opioides sobre el reflejo barorreceptor. La mayoría de dichos efectos se ha caracterizado a través de la evaluación de las modificaciones que se producen en la frecuencia cardíaca en respuesta a estímulos presores o hipotensores (Petty y Reid 1982, Yukimura y cols. 1981c).

Con otra aproximación experimental, Gordon (1986) ha demostrado que la microinyección intracisternal del agonista selectivo del receptor mu, DAGO, es capaz de atenuar, de forma dosis-dependiente, la reducción refleja de la presión arterial, de la frecuencia cardíaca y de la actividad nerviosa simpática producida por estimulación del nervio aórtico. Este efecto es selectivo para los agonistas mu y presenta la particularidad de que la magnitud de la inhibición de la respuesta barorrefleja es inversamente proporcional al grado de activación de los barorreceptores. Es decir, la estimulación de los receptores opioides centrales suprime la función barorrefleja de modo más eficaz cuando la activación de los barorreceptores no resulta excesiva. Resultados similares, mostrando una modulación del arco barorreflejo para los agonistas mu, han sido descritos por Hassen y Feuerstein (1987), que demostraron que el incremento reflejo de la presión arterial, inducido por oclusión de la carótida, era abolido por administración de DAGO en el NTS. Este hecho apunta a que el NTS es el lugar donde los opioides exógenos pueden modular el reflejo barorreceptor. Sin embargo, la administración de naloxona en el NTS de animales controles no modifica la función barorrefleja, sugiriendo estos resultados que los péptidos opioides endógenos en esta zona no son imprescindibles para el control central barorreflejo en rata, aunque no se excluye la posibilidad de que, de nuevo, bajo determinadas situaciones (estres, shock), los opioides liberados sean capaces de modular el reflejo barorreceptor (Gordon 1990).

Por otro lado, es probable que el NTS no constituya la zona exclusiva del bulbo raquídeo, en la que los opioides interactúan con los sistemas centrales que regulan la función barorrefleja, ya que la administración del agonista del receptor delta DADLE en la CVLB también modifica el reflejo barorreceptor, potenciando la respuesta presora derivada de la oclusión carotidea previa (Willette y cols. 1984).

Dado que los efectos corresponden a la activación de dos subtipos distintos de receptores, es posible que se trate de acciones independientes y que dos familias de péptidos opioides regulen la función cardiovascular a dos niveles distintos del SNC.

Los mecanismos mediante los cuales la activación de los receptores opioides modulan en cerebro el reflejo barorreceptor podrían incluir la inhibición de la liberación de neurotransmisores desde las aferencias primarias del arco barorreflejo, de interneuronas del NTS, o la interferencia con la respuesta postsináptica de neuronas que participan en el control barorreflejo (Dingledine 1985; Mulder y cols. 1987, Nicoll 1982).

8.2.2.3. Evidencias clínicas de la participación del sistema opioide en el control central de la presión arterial

El tercer grupo de evidencias se centra en los estudios de Holaday (1983) demostrando el efecto terapéutico de la naloxona sobre la patología cardiovascular con la que cursan distintos tipos de shocks: endotóxico, hipovolémico y neurogénico.

Estos datos tienen un base bioquímica, puesto que el shock hemorrágico se encuentra también asociado a modificaciones en los niveles de opioides y de sus receptores en diversos núcleos del SNC (Feuerstein y cols. 1985). En concreto, en dichas condiciones experimentales se ha observado una supersensibilización selectiva para los receptores delta y kappa en el tronco cerebral (Feuerstein y cols. 1984). En cualquiera de los modelos experimentales empleados por Holaday para sus investigaciones, la administración i.v. o i.c.v. de dosis de naloxona que bloquean específicamente los receptores opioides restauran la hipotensión asociada al estado shock, del mismo modo que la administración previa del fármaco impide el desarrollo de los episodios hipotensivos (Holaday 1983).

Asimismo, se han caracterizado, parcialmente, los mecanismos precisos implicados en el efecto presor de la naloxona. Hasta la fecha, han sido propuestas tres hipótesis para explicar el efecto de la misma: antagonismo de opiodes endógenos (Holaday y Faden 1978), aumento de la liberación de catecolaminas periféricas o plasmáticas (Schadt y York 1981) y estabilización de membranas lisosomales (Curtis y Lefer 1980). La posibilidad de que un antagonismo sobre el sistema opioide endógeno, a nivel central, desencadene una secuencia de eventos,

desconocidos por el momento, para ocasionar un aumento de la actividad simpática periférica, podría constituir el mecanismo más probable para justificar el efecto presor de la naloxona en el shock hemorrágico hipovolémico (Schadt y Gaddis 1985).

En humanos se ha confirmado, igualmente, la eficacia de los antagonistas opioides en el tratamiento de distintos estados de shock (Tiengo 1980; Gurill 1983; McNicholas y Martin 1984). En muchos de los modelos investigados, sin embargo, el incremento de la presión arterial, provocado por la administración de naloxona, es de escasa magnitud y duración. Por otro lado, ciertos factores, como la rapidez en la pérdida de volumen sanguíneo y la baja temperatura ambiente, parecen disminuir los efectos beneficiosos del antagonista en distintas especies (Bennett y Gardiner 1982; Chen y cols. 1985). En la mayoría de los casos, aunque el tiempo de supervivencia tras la administración de naloxona aumenta, las posibilidades de recuperación total de los animales no son mejoradas, a menos que se proceda simultáneamente a restaurar el volumen sanguíneo (Van der Meer y cols. 1982; McIntosh y cols. 1984).

Estas apreciaciones, junto con datos más recientes que demuestran la ineficacia de la naloxona para revertir el shock por isquemia intestinal, y que ponen en duda su capacidad para contrarrestar el shock anafiláctico (Van der Meer y cols. 1986), cuestionan el empleo único de la naloxona en la terapia del shock. No obstante, no se puede excluir el posible empleo de la misma como coadyuvante de otros fármacos empleados clásicamente en su tratamiento.

8.3. Fisiopatología de la hipertensión esencial

De las distintas enfermedades que afectan al sistema cardiovascular, la hipertensión arterial es la que presenta una mayor incidencia en los países del área occidental, donde se calcula que entre un 15 y un 20% de los individuos mayores de 19 años son hipertensos. En España, según los datos disponibles de los distintos estudios epidemiológicos, la prevalencia de la hipertensión, atendiendo a los criterios clásicos de la OMS (presiones superiores o iguales a 160 de sistólica y 95 de diastólica), se sitúa entre el 20 y el 30% de la población (Luque Otero 1987).

Por otro lado, la hipertensión arterial constituye el factor principal de riesgo para enfermedades cardiovasculares tales como los accidentes cardiovasculares

cerebrales, la insuficiencia cardíaca congestiva, la aterosclerosis y las arteriopatías en general, y, por lo tanto, la enfermedad crónica a la que se asocia directa o indirectamente una morbimortalidad más elevada (Connell 1986).

Aunque las manifestaciones clínicas sean similares, los individuos con presión arterial persistentemente elevada, no constituyen un grupo homogéneo. La hipertensión arterial puede presentar etiologías muy diversas, a las que acompañan mecanismos fisiopatológicos también dispares. Desde el punto de vista de la etiología, los distintos tipos de hipertensión humana se han dividido en dos grandes subgrupos: hipertensión esencial, también denominada primaria o idiopática, cuando el origen es desconocido, e hipertensión secundaria, cuando la causa está establecida, y el proceso patológico que genera la elevación de la presión arterial es susceptible de tratamiento específico. No obstante, hay que hacer énfasis en el hecho de que sólo un 10% de los pacientes pertenecen al segundo grupo, representando el 90% restante a individuos hipertensos con elevaciones de la presión arterial cuya causa es desconocida.

8.3.1. Control central de la presión arterial durante modificaciones comportamentales

Los mecanismos centrales que gobiernan la variabilidad y la labilidad de la presión arterial son distintos, al menos en parte, a los responsables del control tónico de la misma.

Si el bulbo raquídeo constituía el núcleo central que operaba durante el control tónico y reflejo de la presión arterial, los sistemas responsables de la integración de los cambios de presión arterial asociados a modificaciones en el comportamiento se sitúan, además de en el bulbo, en regiones superiores del tronco encefálico, hipotálamo y sistema límbico (Reis y Ledoux 1987). En concreto, el núcleo paraventricular del hipotálamo y el núcleo central de la amígdala intervienen, de forma sobresaliente, en la regulación cardiovascular cuando se dan variaciones en el estado emocional del individuo, y constituyen circuitos cerebrales específicos que controlan los efectos cardiovasculares derivados de patrones concretos de conducta (Weiner 1985).

La activación de los mencionados núcleos hipotalámicos durante estas alteraciones parece ser responsable de la inhibición del reflejo barorreceptor, hecho

que permite que la presión arterial se mantenga elevada durante situaciones tales como el estrés, y después alcance un estado estacionario cuando la duración del estímulo aversivo se prolonga (Spyer 1989). Así, se acepta que, durante las primeras fases de hipertensión lábil, existe una disminución de la funcionalidad del reflejo barorreceptor, pero que, durante la hipertensión crónica, se observa un restablecimiento de la capacidad funcional de los barorreceptores para operar a niveles de presión arterial más elevados (Krieger 1988). Esta afirmación se corresponde con el hecho de que la función barorrefleja está prácticamente inhibida, o no es operativa, durante las alteraciones emocionales (Stephenson 1984).

La inhibición del reflejo barorreceptor durante el estrés emocional se ha demostrado en el hombre (Brooks y cols. 1978) y en el mono (Engel y Joseph 1982). La denervación quirúrgica de los barorreceptores también ha sido empleada para determinar su implicación en la hipertensión por estrés. Los resultados han puesto de manifiesto que la presión arterial de los animales denervados fluctuaba con mayor intensidad ante diversos estímulos ambientales que la presión arterial de los animales intactos (Cowley y cols. 1973). Empleando otra aproximación experimental para inhibir la función barorrefleja, las lesiones bilaterales en el NTS producen una hipertensión inmediata en rata (Miura y Reis 1972), y en gato un aumento crónico y mantenido de la presión arterial (Nathan y Reis 1977). La destrucción química o electrolítica de distintas áreas del NTS en rata, también incrementa la labilidad de la presión arterial sin modificar de modo neto la misma, mientras en gato las mismas lesiones ocasionan una hipertensión crónica donde la presión arterial está elevada y la reactividad de la misma ante conductas espontáneas, tales como el aseo, es marcadamente exagerada (Nathan y cols. 1978).

Todos estos datos indican, en primer lugar, que las neuronas dentro del NTS son esenciales para mantener la estabilidad y la reactividad de la presión arterial y, en segundo lugar, que son imprescindibles para mediar las respuestas cardiovasculares específicas, que se manifiestan ante los estímulos ambientales o las modificaciones de la conducta. En definitiva, la activación de un eje que se extiende longitudinalmente desde la amígdala al tronco cerebral, y que está constituido por una compleja red de circuitos neuronales, permite modular apropiadamente las alteraciones de la presión arterial, que se producen bajo determinadas situaciones fisiológicas y patológicas, tales como el ejercicio, los estados de alerta o el estrés emocional (Jordan y Spyer 1986). Este control se puede ejercer a distintos niveles y es posible gracias a la amplitud de las sinapsis que conforman el sistema.

8.3.2. Etiopatogénesis de la hipertensión esencial

Debido a la complejidad de los circuitos que regulan la presión arterial, no existe, por el momento, ningún mecanismo que explique el proceso por el cual se desarrolla e instaura la presión arterial elevada en este tipo de pacientes. La hipótesis, sin embargo, es que la hipertensión esencial no está mediada por un único factor, sino que, probablemente, tanto los sustratos anatómicos como las causas implicadas en el desarrollo y mantenimiento de la misma, son muy numerosos (Connell 1986).

Desde hace tiempo, se sabe que el estrés mental, la ansiedad y los diferentes estados emocionales pueden ser factores desencadenantes de una elevación marcada de la presión arterial, contribuyendo a la etiología multifactorial de la hipertensión esencial (Folkow, 1987).

El término hipertensión lábil o intermitente ha sido empleado para describir las oscilaciones de presión arterial entre niveles elevados y de normotensión, oscilaciones éstas que tienen, generalmente, un origen psicógeno. Distintos autores (Langewitz y Vale 1987; Falkner y cols. 1981) consideran que este estado de hipertensión lábil, en buen número de casos, supone el comienzo de la historia natural de la hipertensión esencial.

Es muy posible, además, que los sistemas activados durante las fases iniciales de la hipertensión difieran notablemente de aquéllos que actúan en una segunda fase, cuando la hipertensión está definitivamente establecida. En este sentido, la hipótesis neuronal establece que un componente central o neurogénico sería responsable de la inducción y desarrollo de la hipertensión, mientras el mantenimiento y establecimiento de la misma residiría en factores periféricos mecánicos que operarían a nivel vascular (Connell 1986).

La evolución de los patrones hemodinámicos, en la mayoría de estos pacientes, muestra, de hecho, que, en los estadios iniciales, durante el desarrollo de la hipertensión, la resistencia periférica no se encuentra alterada, pero a medida que la elevación de la presión arterial se va implantando, hay una evolución de la resistencia periférica desde su estado inicial hacia valores más elevados, manifestándose ahora un gasto cardíaco normal respecto a los valores incrementados del mismo durante la primera fase (Julius y cols. 1971).

Según los estudios de Julius y Johnson (1985) y Goldstein (1983), se considera que un estado de hiperactividad simpática podría ser responsable de los periodos de presión arterial elevada en los pacientes con hipertensión lábil, pacientes que, por otro lado, añaden a las manifestaciones farmacológicas y bioquímicas de disfuncionalidad simpática, una respuesta sobrepresora al estrés psicológico muy superior a la presentada por individuos normotensos (Drummond 1985). Esta misma situación se observa en las BHR (Borderline Hypertensive Rats) ante la aplicación de estímulos aversivos, con respecto a sus controles WKY (Sanders y cols. 1988). En varios de estos casos de hipertensión lábil, el aumento del gasto cardíaco parece ser la causa principal de la elevación de la presión arterial. No obstante, debido al hecho ya comentado de que está ausente o, al menos, no es operativa la correspondiente caída refleja compensatoria que, en situación normal, es capaz de restaurar la presión arterial, quizá la alteración residiría en la operatividad del reflejo barorreceptor, más que en la regulación del gasto cardíaco.

8.3.3. Hipertensión y estrés

Como ya reconoció Selye en 1946 al caracterizar las denominadas enfermedades de adaptación, entre las múltiples respuestas inducidas en el organismo por el estrés, la hipertensión es uno de los trastornos más característicos.

En la actualidad, en el ámbito de las investigaciones clínicas, se ha consolidado la idea, como se comentaba anteriormente, de que el desencadenamiento y desarrollo de la hipertensión esencial es consecuencia de una deficiencia de los mecanismos neurogénicos depresores sobre los presores. Este control anormal puede ser hereditario, pero existen numerosos datos que sugieren que los mecanismos neurogénicos pueden estar alterados como consecuencia de la exposición del organismo a estímulos ambientales. De todos ellos, el estrés mental está considerado como el candidato más probable para desencadenar este tipo de respuesta hipertensiva (Dustan 1987).

Si bien no existe ninguna duda de que el estrés, independientemente de su naturaleza física o emocional, incrementa inicialmente la presión arterial, surge una cierta controversia cuando se trata de determinar si éste contribuye, de la misma forma, al mantenimiento de la hipertensión. Experimentalmente, existen escasas evidencias de que el estrés, por sí mismo, produzca una hipertensión sostenida cuando se aplica en animales normotensos, apoyando la hipótesis de la naturaleza

multifactorial de la hipertensión esencial.

En la mayoría de los casos, la hipertensión tiene un carácter lábil y sólo es apreciable en tanto el individuo se encuentra sometido al estímulo estresante, aunque la intensidad y la duración del mismo sean elevadas. Avalando esta afirmación se pueden citar los estudios de Henry (1982), que empleó en ratones un modelo consistente en la lucha por la posesión de un congénere de distinto sexo. También se han descrito respuestas hipertensivas inducidas por estrés en los que el estímulo estresante consiste en promover la lucha entre individuos de la misma especie y sexo (Fokkema y Koolhaas 1985), bien sea compitiendo por la comida o por el espacio vital. Empleando modelos de condicionamiento aversivo en monos (Forsyth 1969), o por privación social de ratas adultas en jaulas metabólicas (Gardiner y Bennett 1977) se han obtenido respuestas hipertensivas también puntuales.

Si nos centramos en modelos de estrés físico, las consecuencias son muy similares. La presión arterial se incrementa pero desaparece al cesar la sesión de estimulación diaria. En este sentido, se encuentran también los resultados de Iomori y cols. (1982) tras la aplicación de shock inescapable en las patas, o los obtenidos tras estimulación ambiental en la que se precisa un periodo de tiempo para instaurar la respuesta hipertensiva, estando el animal, en este caso, sometido a distintos tipos de estímulos luminosos y acústicos (Perhach y cols. 1975; Galeno y cols. 1984), o en el estrés por inmovilización (Saavedra 1982; Kvetnansky y Mikulaj 1970) o por frío (Ceasar y cols. 1974).

Los datos en humanos, respecto a los efectos producidos por el estrés crónico sobre la presión arterial, son más confusos. Esta situación se debe, en gran medida, a la escasez de estudios a largo plazo, donde sea posible registrar la evolución de la hipertensión desde sus estadios iniciales hasta el mantenimiento e instauración de la misma, con el fin de establecer una correlación entre aquélla y el impacto de los factores psicosociales y ambientales en el transcurso del desarrollo de la enfermedad. El problema se acentúa, si se considera la dificultad de establecer conclusiones generales, cuando, con mayor fundamento que en el propio animal de experimentación, la susceptibilidad individual en humanos es un factor de mayor influencia.

Ya en 1945, Graham halló elevaciones apreciables de la presión arterial en soldados durante el combate, si bien la misma se restauraba cuando éstos

abandonaban el campo de batalla. Existe, por otro lado, una elevada prevalencia de la hipertensión entre trabajadores expuestos, de manera prolongada, a ruidos intensos (Jonsson y Hansson 1977; Delin 1984) o entre los controladores aéreos (Cobb y Rose 1973). Reforzando la incidencia de los factores ocupacionales en los casos de hipertensión, se ha comprobado que individuos sometidos a fuertes tensiones en su puesto de trabajo, con escasas expectativas profesionales, o con inestabilidad ocupacional, y que representan en cualquier caso fuentes de estrés, presentan valores de presión arterial sistólica y diastólica muy superiores a los de aquellos individuos cuyas experiencias laborales son menos desagradables (Siegrist 1987).

Puesto que los resultados no son concluyentes, una gran parte de los estudios en humanos se han enfocado a determinar la importancia de la predisposición individual en el carácter patógeno del estrés sobre el sistema cardiovascular. Falkner y cols. (1979) demostraron que niños con padres hipertensos presentaban una respuesta presora a la aplicación de estrés muy superior a la de adolescentes sin antecedentes familiares de hipertensión. Del mismo modo, individuos jóvenes con hipertensión lábil, o situados en las primeras fases de la misma, presentan mayor susceptibilidad al efecto presor inducido por el estrés mental en sus diversas formas de aplicación (test aritméticos: McCubbin y cols. 1988; Drummond 1985; realización de entrevistas o al test de estrés por frío: Fredrikson 1986).

En otro sentido, el patrón de respuesta presora al estrés está incrementado en individuos que ingieren o consumen grandes cantidades de sal (Falkner y cols. 1981), o en aquéllos otros con una funcionalidad renal o hepática disminuída (Brody y cols. 1987). También se ha demostrado que la respuesta hipertensiva al estrés se acentúa en función de las características psicológicas. Individuos que responden al patrón de comportamiento tipo A, con un carácter donde predominan la agresividad y las tendencias hostiles, tienen incrementada la duración y la magnitud de la respuesta presora al estrés, tanto mental como físico (DeQuattro 1989).

En conclusión, tanto en animal de experimentación como en humanos, los datos existentes hasta la fecha sugieren que los factores de predisposición parecen necesarios para la expresión de la hipertensión producida por efecto del estrés.

PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

1. ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL TRABAJO

1.1. Evidencias preliminares de la participación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva al estrés por privación social

Los resultados iniciales que sugerían la posible participación del sistema opioide en el desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social se encuentran en los trabajos de Naranjo y Fuentes (1985). Estos autores demostraron que el aislamiento de ratas jóvenes durante un período de tiempo no inferior a siete días producía una elevación de las lecturas de presión arterial sistólica, hecho que se acompañaba de un aumento del umbral doloroso, siendo ambos efectos sensibles a la administración del antagonista opioide naloxona.

La caracterización de la antedicha respuesta hipertensiva, efectuada con posterioridad (Florentino y cols. 1987), permitió establecer dos fases claramente diferenciadas en su desarrollo. Una primera fase de hipertensión lábil, cuando el período de aislamiento era inferior a 30 días aproximadamente, y en el transcurso de la cual la resocialización de los animales normalizaba los valores de presión arterial, y una segunda fase para tiempos de privación social superiores, donde la elevación de la presión arterial no se modificaba por interrupción de la aplicación del estímulo estresante, fase esta que denominaron de hipertensión establecida. Además, pudieron comprobar que la naloxona era capaz de antagonizar la hipertensión asociada a los primeros estadios del estrés, mientras que se mostraba ineficaz para restaurar las lecturas elevadas de presión arterial durante la segunda fase de aislamiento prolongado. De esta manera, postularon que el sistema opioide estaría implicado, únicamente, en el desencadenamiento y desarrollo de la hipertensión, mientras el mantenimiento de la misma sería independiente de la actividad del sistema opioide y estaría asociado a alteraciones a otro nivel, tal vez periférico.

Otras evidencias adicionales de la implicación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva generada por este modelo de estrés, incluían la observación de que otros antagonistas también inespecíficos del receptor opioide (naltrexona y nalorfina), se mostraban igualmente efectivos para bloquear la respuesta. La ausencia de efecto antihipertensor de un derivado cuaternario de naltrexona que, dada su naturaleza polar, no atraviesa la barrera hematoencefálica, indicaba, por

último, que la disminución de la hipertensión asociada al estrés, inducida por antagonistas opioides, tenía como lugar de acción el SNC (Naranjo y cols. 1986).

1.2. Modificaciones de la actividad de los sistemas catecolaminérgicos centrales asociadas al estrés

Tradicionalmente, en el estudio de las alteraciones neuroendocrinas producidas como consecuencia del estrés, se ha concedido una gran importancia al papel de las catecolaminas cerebrales, identificando éstas como el posible sustrato neuroquímico responsable de la activación inicial del SNC a nivel hipotalámico (Spinedi y cols. 1988).

Las modificaciones de la actividad catecolaminérgica central tras exposición al estrés son particularmente importantes en el hipotálamo e hipófisis anterior y han sido estudiadas con detalle por diversos autores (Lumpkin y cols. 1983; Johnston y cols. 1985). Tras la exposición aguda de ratas a estrés por éter, Lumpkin y cols. describieron un aumento de la velocidad de renovación de NA y DA en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. El aumento del tono noradrenérgico era particularmente significativo en éste último núcleo, y sería un hecho que serviría para explicar el incremento posterior de la liberación de vasopresina y, sobre todo, de CRF, al actuar la NA como reguladora de la secreción de ambos neuropéptidos (Spinedi y cols. 1988).

Aunque parece claro que las catecolaminas en el SNC resultan modificadas como consecuencia del estrés, el significado funcional y el sentido de tales variaciones no está aún determinado, existiendo una gran discrepancia entre los diversos autores. Esta discrepancia parece ser consecuencia de la naturaleza y, sobre todo, de la duración del estrés aplicado. Así, para el estrés agudo inducido por aplicación de shocks eléctricos en las patas se ha descrito un aumento de la velocidad de renovación de DA y NA en diversas regiones cerebrales de ratón (Dunn 1988). En rata se encuentran resultados similares, incremento de la liberación de NA en amígdala, hipotálamo y bulbo raquídeo (Tanaka y cols. 1988) o en locus coeruleus (Abercrombie y Jacobs 1988), cuando los animales son sometidos a estrés por inmovilización. Sin embargo, muchas de estas variaciones no se detectan, o se verifican en sentido contrario, cuando el estrés tiene carácter crónico. Hata y cols. (1987) han descrito un incremento de los niveles de NA y DA, hecho congruente con una disminución del tono noradrenérgico y dopaminérgico en corteza, hipotálamo e hipocampo de ratas sometidas durante

5-10 días a un modelo de estrés consistente en alterar, de modo sistemático, la temperatura de estabulación de los animales. En contraposición a los resultados anteriores, el contenido de ambos neurotransmisores no se modifica o disminuye cuando el estrés que se aplica es de tipo agudo. De modo análogo, se ha descrito un aumento de los niveles de NA y DA, tanto para el caso del estrés inducido por inmovilización prolongada (1 hora/día durante 24 días) (Adell y cols. 1988), como en el caso de aquél provocado por shocks repetidos en las patas (Anisman y cols. 1987).

La mayoría de los estudios, sin embargo, han sido diseñados con el objetivo de correlacionar las modificaciones en la actividad de los sistemas monoaminérgicos durante el estrés con las respuestas endocrinas que se suceden de modo paralelo, existiendo, por el momento, evidencias muy escasas que aporten algún dato al conocimiento del papel que desarrollan las catecolaminas cerebrales en el transcurso del estrés sobre otros sistemas fisiológicos.

1.3. Modulación de la liberación de catecolaminas por opioides

La interacción entre neuronas catecolaminérgicas y opioides está bien documentada desde que, en el año 1976, Detlef Taube y cols. pusieron de manifiesto que la met-enkefalina disminuía la liberación de NA producida por estimulación eléctrica en rebanadas de tejido procedentes de corteza frontal de rata. Ahora bien, esta interrelación no sólo se presenta a nivel central, sino que también se extiende a nivel periférico. En relación con el sistema nervioso simpático, se ha demostrado que los péptidos opioides actúan presinápticamente sobre receptores situados en terminales axónicas de fibras postganglionares simpáticas, con objeto de modular la liberación de NA (Szabo y cols. 1986). Datos en el mismo sentido son la inhibición por opioides de la liberación de NA en la arteria de la oreja del conejo (Illes y cols. 1985a) o en la arteria mesentérica (Illes y cols. 1985b).

Por lo que respecta de nuevo al SNC, la capacidad de los opioides para modular la liberación de catecolaminas, ha sido también demostrada utilizando otros diseños experimentales. Llorens y Schwartz (1984) demostraron que la inhibición de la degradación enzimática de péptidos opioides, mediante la administración conjunta i.c.v. de bestatina y tiorfano en rata, aumenta los niveles de NA en corteza cerebral. En sentido contrario, el antagonismo de la acción de los opioides endógenos por naloxona disminuye los niveles de NA en amígdala,

tálamo e hipotálamo (Tanaka y cols. 1988).

En experimentos "in vitro", los datos también son múltiples. La naloxona ha demostrado su efectividad para aumentar la liberación de NA en la neurohipófisis (Zhao y cols. 1988). Para el caso de la DA, Latimer y cols. (1987) observaron un aumento de la velocidad de renovación de este neurotransmisor en la región A10, incremento que era selectivo para el agonista del receptor mu opioide, DAGO. Con una aproximación distinta, consistente en la destrucción selectiva de terminales en tractos noradrenérgicos, mediante el empleo de la neurotoxina 6-OH-dopamina, y examen posterior de la modificación del número de receptores en membranas cerebrales, Schwartz y cols. (1979) observaron una disminución de receptores opioides en terminales noradrenérgicos de corteza y cerebelo, confirmando el hecho de que estos receptores están situados sobre dichos terminales, donde serían capaces de modular presinápticamente la liberación de NA.

En años recientes, el interés de los distintos grupos se ha focalizado en determinar qué subpoblación de receptores opiáceos media en cada región cerebral, y para cada amina en concreto, estas respuestas. En preparaciones sinaptosomales de corteza cerebral de rata, Mulder y cols. (1987) han demostrado, que el DAGO inhibe presinápticamente la liberación de NA, y que, por lo tanto, en esta estructura el efecto modulador de los opioides sobre este neurotransmisor, se produce a través de la ocupación de receptores mu opioides. La activación de receptores mu opioides también parece ser responsable de la inhibición de la liberación de NA en hipocampo y amígdala de rata (Werling y cols. 1987). Por su parte, los receptores kappa opioides inhibirían la liberación de DA en cuerpo estriado, mientras que, según este mismo estudio, los receptores delta opioides de corteza cerebral y cuerpo estriado, no estarían ligados a acciones sobre los sistemas monoaminérgicos (Schoffelmeer y cols. 1988).

2. OBJETIVOS

Tomando como base los resultados precedentes, que sugerían la participación del sistema opioide en la fase inicial de la respuesta hipertensiva, generada como consecuencia de la aplicación del modelo de privación social en rata, los objetivos globales del presente trabajo se pueden resumir en tres apartados.

1. Establecer de manera inequívoca, mediante el empleo de los dos enantiómeros del antagonista opioide naloxona, la implicación de este sistema en el desarrollo de la antedicha respuesta hipertensiva, así como determinar el subtipo de receptor opiáceo cuya activación persistente media el desarrollo de la hipertensión, empleando para ello antagonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides, en animales situados en la fase lábil de la respuesta.
2. Examinar si los efectos cardiovasculares producidos por la liberación de opioides endógenos en SNC durante el estrés son similares a los que se producen cuando se activa farmacológicamente el receptor opioide mediante la administración central de agonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides DADLE y DAGO, respectivamente, para lo cual se analizó el comportamiento de ambos péptidos, en un estudio sistemático tras su administración i.c.v., tanto en animal consciente como en animal anestesiado.
3. Delimitar la eventual interacción, a nivel central, entre los sistemas opioide y catecolaminérgico, de probada implicación éste en la regulación de la presión arterial. El objetivo, en este caso, consistía en establecer si las catecolaminas centrales son, de algún modo, alteradas como consecuencia de la activación previa del sistema opioide, y en último término, intervienen en el incremento de la presión arterial observado bien en el caso de los animales sometidos al modelo de estrés o en el de los animales administrados con los agonistas DADLE y DAGO.

2.1. Aproximaciones experimentales

2.1.1. Experiencias "in vivo"

Para el primero de los objetivos, se siguieron distintas aproximaciones, consistentes, todas ellas, en la aplicación de diferentes tratamientos farmacológicos, y que pueden dividirse entre aquéllos aplicados de forma aguda con posterioridad al desarrollo de la respuesta hipertensiva, y los que se aplicaron crónicamente de modo simultáneo al aislamiento.

Los tratamientos agudos fueron los siguientes:

- Administración aguda de los enantiómeros (-) y (+) de naloxona en los animales hipertensos.

Si bien el empleo de antagonistas es la herramienta farmacológica de uso más frecuente para determinar el papel de un sistema de neurotransmisión o de neuromodulación en un fenómeno determinado, en el caso del sistema opioide el sólo uso de la forma racémica de naloxona no suministra datos concluyentes ya que existen en la literatura una gran cantidad de datos, obtenidos utilizando la forma racémica de naloxona, que no garantizan que sea el receptor opiáceo el implicado en el proceso fisiológico o en el efecto farmacológico observado, como se le atribuye habitualmente, ya que la naloxona puede afectar, y de hecho actúa sobre otros sistemas de neurotransmisión (Sawynok y cols. 1979).

- Administración aguda de morfina en los animales hipertensos.

El segundo criterio seleccionado para establecer la mediación del sistema opioide en la hipertensión desarrollada como consecuencia del modelo de privación social, consistía en verificar que el agonista opioide, morfina, administrado de forma aguda, debía desencadenar en los animales aislados un efecto contrario al del antagonista opioide naloxona.

En el segundo grupo de experimentos realizados "in vivo" con objeto de establecer la implicación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva, los animales fueron tratados crónicamente con agonistas y antagonistas opioides de modo simultáneo al aislamiento y, por lo tanto, con carácter previo a la instauración de la respuesta hipertensiva. Estos experimentos se pueden desglosar en dos apartados:

- Determinación de la susceptibilidad de desarrollo de la hipertensión en animales dependientes de morfina.
- Desarrollo de la hipertensión en animales tratados crónicamente con el antagonista opioide naloxona.

Por último, y debido a la ausencia de selectividad de naloxona para bloquear de modo específico un determinado subtipo de receptor opioide, se procedió a determinar qué subpoblación de receptores media, en concreto, la respuesta hipertensiva, mediante el empleo de antagonistas selectivos de los

receptores delta y mu opiáceos, ICI 174,864, ICI 154,129 y beta-funaltrexamina respectivamente.

2.1.2. Experiencias "in vitro"

Bajo este epígrafe se incluyen un grupo de ensayos, tanto farmacológicos como neuroquímicos, que constituyen el tercer objetivo al que se aludía inicialmente. Estos experimentos estaban orientados a determinar si existía una interdependencia entre el efecto presor de los opioides y las catecolaminas en SNC, tanto tras la administración de los agonistas selectivos de los receptores mu y delta opioides, cuyas acciones cardiovasculares se habían examinado con anterioridad, como cuando la activación de este sistema peptidérgico se producía como consecuencia del estrés.

El objetivo final, en cualquier caso, fue establecer si el sistema catecolaminérgico central, en sus tres modalidades, noradrenérgico, adrenérgico y dopaminérgico, media los efectos del sistema opioide para producir, en definitiva, la elevación de la presión arterial.

La elección del sistema catecolaminérgico central frente a otros sistemas de neurotransmisión clásicos con el fin de estudiar la eventual interacción con el sistema opioide en terminos de las acciones presoras de éste, se justifica teniendo en cuenta las siguientes evidencias:

1. La correlación anatómica existente entre neuronas catecolaminérgicas y opioideórgicas que se ha descrito para núcleos de probada implicación en el control cardiovascular (Leger y cols. 1983; Ceccatelli y cols. 1989).
2. El conocido papel de las catecolaminas cerebrales en la regulación de la presión arterial (ver apartado 8.2.1. de la Introducción).
3. La alteracion de la actividad de los sistemas catecolaminérgicos centrales durante el estrés (ver apartado 1.2 de Antecedentes).
4. La probada existencia de un receptor presináptico opioide ubicado sobre terminales noradrenérgicas, así como la capacidad de los opioides para modular la liberación de catecolaminas en distintas estructuras cerebrales (ver apartado 1.3 de los Antecedentes).

La evaluación de las modificaciones de la actividad de los sistemas noradrenérgico, adrenérgico y dopaminérgico, asociadas a la activación del sistema opioide, se realizó empleando dos aproximaciones experimentales distintas:

- Efectuando en bulbo raquídeo e hipotálamo la valoración de las velocidades de renovación de NA, DA y de los niveles de AD, mediante la determinación del contenido de las aminas y de sus metabolitos respectivos.

- Puesto que la velocidad de renovación de un neurotransmisor refleja la suma conjunta de los procesos de síntesis, liberación y metabolismo en un momento determinado, y no permite discernir cuál de estos tres eventos se encuentra alterado en concreto, se determinó la actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima que cataliza la reacción inicial en el proceso de formación de DA, NA y AD. Ya que esta enzima cataliza la reacción limitante de la síntesis de catecolaminas y que juega, por lo tanto, un papel destacado en el mantenimiento de los niveles intraneuronales del neurotransmisor recién sintetizado, cualquier alteración en el grado de formación de las catecolaminas debe reflejarse como una variación de su actividad, y ésta puede emplearse como indicador de las modificaciones de la actividad funcional de estas neuronas (Broadhurst y Briley 1988).

MATERIALES Y METODOS

1. FARMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

La procedencia de los fármacos y productos químicos empleados fue la siguiente:

DADLE y DAGO procedían de Bachem. ICI 154,129 e ICI 174,864, de Cambridge Research Biochemical (CRB). Beta-funaltrexamina, de Research Biochemical Inc.(RBI). Naloxona (-) (Research Triangle Institute. U.S.A), Naloxona (+) (Dupont) y Naloxona clorhidrato, de Sigma. Morfina, del Ministerio de Sanidad y Consumo. El ácido etilendiaminotetracético (EDTA), octilsulfato sódico, bisulfito sódico, noradrenalina bitartrato, adrenalina, dopamina, DOPAC, 3,4, dihidroxibencilamina (DHBA), MHPG-sulfato, MHPG hemipiperazina, L-DOPA, D-tirosina y L-tirosina, seroalbumina bovina, tripsina, inhibidor de tripsina, hidroxiapatita y la corticosterona procedían de Sigma.

La ³H-etorfina y la ³H-corticosterona se obtuvieron de Amersham y el anticuerpo para corticosterona de Bioclin. La gamma-globulina procedía de Serva. Los reactivos empleados para la preparación de las distintas fases móviles tenían la siguiente procedencia: ácido cítrico, acetato sódico y fosfato disódico de Merck y metanol para HPLC (Scharlau).

El resto de los productos orgánicos o inorgánicos procedían de Merck, con pureza de análisis.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron ratas Wistar macho, de peso variable en función del experimento concreto efectuado. Para la realización del modelo de estrés, el peso de los animales al comienzo del aislamiento fue de 90 ± 10 g. Dado que la respuesta hipertensiva se desarrolla transcurrido un período de 7-15 días, los experimentos efectuados en ratas normotensas, con objeto de cuantificar el efecto de los agonistas opiáceos sobre los distintos parámetros, se llevaron a cabo en animales de un peso similar. En la tabla adjunta se expresan las edades respectivas para cada intervalo de peso.

<u>Peso (g)</u>	<u>Edad (semanas)</u>
90-100	6
140-150	8
200-220	11

Los animales procedían de Interfauna Ibérica (San Feliu de Codines, Barcelona) y permanecieron en nuestro estabulario, al menos, durante los 5 días previos a su utilización. Las ratas se mantuvieron a temperatura constante (21° C) y luz controlada (12 hr luz/12 hr oscuridad), disponiendo en todo momento de acceso libre a la comida y a la bebida.

3. VIAS Y PAUTAS DE ADMINISTRACION

Los distintos compuestos y fármacos administrados a los animales de experimentación se disolvieron en salino, excepto el ICI 174,864 que se disolvió en bicarbonato sódico diluido para la dosis de 20 ug/rata, y la morfina que se disolvió en sacarosa al 10% para el desarrollo de animales dependientes.

Los fármacos se administraron central o periféricamente:

Para la administración de naloxona, naltrexona y para las inyecciones agudas de morfina se empleó la administración periférica por vía i.p. en animal consciente. El volumen de inyección aplicado para la administración por esta vía fué de 2,5 ml/kg.

En el caso del animal anestesiado (etiluretano al 20%, 1,2 mg/kg) la administración intravenosa se llevó a cabo en la vena yugular. El ICI 154,129 se administró en vena caudal y en rata consciente. Para el desarrollo de animales dependientes de morfina se utilizó la vía oral según el esquema que se indica posteriormente.

La vía i.c.v. se utilizó para la administración local de los compuestos en SNC. con el fin de salvar la barrera hematoencefálica, siendo el volumen de inyección en este caso de 10 ul.

3.1. Administración intracerebroventricular

La administración i.c.v. se efectuó después de proceder a la canulación crónica del ventrículo lateral cerebral derecho, para lo cual se anestesiaron previamente las ratas con Equitesín (3 ml/kg), cuya composición se indica a continuación:

Hidrato de Cloral	2.5 mM
Pentobarbital sódico	0.4 mM
Sulfato magnésico	8.6 mM
Propilenglicol	56.0 mM
Etanol 90%	11.5%
Agua	c.s.

Una vez anestesiadas, se fijaron a un aparato estereotáxico (David Köpf) y se efectuó una pequeña incisión en la piel craneal, entre las líneas interocular e intraural, limpiándose perfectamente la superficie expuesta de la calota hasta dejar las suturas visibles, para permitir con posterioridad la fijación permanente de la cánula. A continuación, utilizando un torno dental, se practicaron tres pequeños orificios en el cráneo, en uno de los cuales se introdujo una cánula guía de teflón (24 GA, ID. 0.022". Wall. 0.006", Small Parts Inc. Maryland) de acuerdo con las siguientes coordenadas: 1.0 mm lateral, 0.8 mm posterior con respecto a la bregma. La profundidad fue variable en función del peso del animal empleado, estableciéndose la correlación que a continuación se indica:

<u>Peso del animal (g)</u>	<u>Profundidad (mm)</u>
150	3.5
200	4.0
250	4.5

La cánula se introdujo utilizando como soporte una jeringa Hamilton (Hamilton CO. Mod. 701), a la cual se había ajustado previamente, de forma que la profundidad alcanzada en el momento de la administración coincidiese con la señalada en las coordenadas correspondientes. La fijación permanente de la cánula a la superficie craneal se efectuó con cemento dental (Dura Lay, Reliance Dental Mtg. Co.). Para facilitar el proceso, se emplearon dos pequeños tornillos ajustados a los dos orificios situados por encima y por debajo de la posición de la cánula. Antes de proceder a cualquier manipulación experimental, se dejaron transcurrir,

al menos, 72 horas para permitir la recuperación completa de los animales que se mantuvieron aislados para evitar la destrucción mutua de las cánulas.

Transcurrido este periodo de tiempo, la administración se llevó a cabo introduciendo, a través de la cánula guía, una cánula de polietileno (PE 10, Clay Adams) que había sido llenada previamente con la solución a inyectar y que, a su vez, estaba conectada a una jeringa Hamilton (Hamilton CO. Mod. 701), necesaria para proceder a impulsar la solución a través de la misma. Para confirmar la localización correcta de la cánula, siempre que el diseño experimental lo permitía y tras el ensayo correspondiente, se inyectaron 10 μ l de tinta, comprobándose al cabo de 5 minutos, en una sección transversal del cerebro, que la distribución y difusión de la misma en el sistema ventricular era adecuada.

3.2. Administración crónica por implantación de minibombas Alzet

Para la administración crónica de naloxona en animales sometidos al modelo de privación social, se utilizaron 24 ratas macho de 90 ± 10 g de peso, a las que se les implantó una minibomba ALZET (modelo 2002) conteniendo naloxona o salino. El aislamiento o agrupamiento se efectuó inmediatamente después de la operación. Para proceder a la implantación de la bomba de infusión continua, una vez anestesiado el animal con equitesín, se procedió a afeitar la piel en la zona dorsal del cuello y se realizó una incisión transversal de 1 cm de largo. A continuación, se separó el tejido adherido a la piel, mediante un pinzo hemostático, y se realizó una cavidad subcutánea adecuada para la inserción de las minibombas en el espacio intraescapular. Una vez llena la bomba con la solución correspondiente, se introdujo por el extremo a través del cual se verifica la liberación y a continuación se suturó la herida.

La minibomba ALZET es una bomba en miniatura que libera una cantidad constante de la solución colocada en su interior durante un periodo más o menos largo de tiempo. El modelo empleado para el ensayo fue el 2002 que, con un reservorio de 200 μ l, libera 0.5 μ l/hora durante 14 días. De modo que, llena la misma con una solución de naloxona de 100 mg/ml, proporciona un grado de liberación de 50 μ g/h, suficiente para mantener bloqueado permanentemente el receptor opioide durante catorce días. Estas minibombas constan de un reservorio de material flexible e impermeable, rodeado de una lámina que contiene un agente osmótico, y, todo ello, rodeado a su vez de una membrana semipermeable. Cuando la minibomba está llena e implantada en el animal, se encuentra en un ambiente acuoso y el agente osmótico embebe una cierta cantidad de agua que es controlada

por la membrana semipermeable. Este agua embebida genera una presión hidrostática sobre la pared del reservorio, originándose así un flujo constante de su contenido a través del orificio de salida.

3.3. Protocolo para el desarrollo de animales dependientes de morfina.

Las ratas se hicieron dependientes de morfina por autoadministración oral del opiáceo en el agua de bebida, según el protocolo elaborado por Ahtee y cols. (1989). Este método presenta, sobre las técnicas clásicas (administración por inyección repetida de morfina durante varias semanas o implantación de pellets), las ventajas de evitar, tanto la manipulación excesiva de los animales eliminando de este modo el estrés eventual al que pudieran estar sometidos, como la aparición de síndromes de abstinencia parciales en los períodos existentes entre las inyecciones repetidas de morfina.

La morfina, en forma de clorhidrato, se disolvió en una solución de sacarosa al 10% con objeto de evitar el rechazo de los animales al opiáceo debido a su sabor amargo (Khavari y cols. 1975). Después de realizar un control inicial del consumo de la solución de sacarosa, los animales fueron aislados o agrupados y recibieron, durante 15 días, concentraciones crecientes de morfina (0.1-0.4 mg/ml) en la solución de bebida. Los dos grupos control eran similares, teniendo como fuente única de bebida sacarosa al 10%. El protocolo de administración fue el siguiente:

Días 0 - 4	0.1 mg/ml
Días 4 - 8	0.2 mg/ml
Días 8 - 12	0.3 mg/ml
Días 12 - 15	0.4 mg/ml

En el día 15 se interrumpió la administración y la dependencia física de los animales a morfina se confirmó mediante la observación de la pérdida de peso durante el síndrome de abstinencia (Stolerman y cols. 1975). A partir de este momento, y hasta la finalización del experimento, todos los animales se mantuvieron con sacarosa al 10%.

4. METODOS DE MEDIDA DE LA PRESION ARTERIAL

4.1. Medida indirecta (tail-cuff)

La medida indirecta de la presión arterial se efectuó en un aparato W+W, B.P Recorder o, en su caso, en un aparato Letica, según el método descrito por Buñag (1973). En este procedimiento se aplica en la cola del animal un manguito unido a un dispositivo neumático generador de una presión que varía cíclicamente. Cuando la presión de este manguito supera la presión sistólica de las arterias caudales, éstas se colapsan, interrumpiéndose la transmisión de la pulsación a la parte periférica de la cola. Cuando la presión del manguito desciende, la pulsación retorna y es detectada por un transductor acoplado previamente a la cola de la rata, cuya señal es convenientemente amplificada y registrada por una plumilla sobre un papel calibrado en mm de Hg o en un lector digital.

Para obtener un registro estable de presión arterial es preciso provocar previamente la vasodilatación de las arterias caudales de la rata, lo cual se consigue colocando el animal bajo una lámpara de luz infrarroja durante un período de tiempo de 5-10 minutos, dependiendo de la temperatura ambiente. A continuación, se introduce el manguito y el transductor en la cola y se va aumentando progresivamente la presión ejercida por el manguito a medida que se va registrando la pulsación. Cuando la presión del manguito iguala la presión diastólica, la amplitud del trazado comienza a descender hasta que se anula completamente cuando alcanza la presión sistólica. La escasa reproducibilidad en los valores de la presión arterial diastólica obtenidas con el aparato W+W, B.P recorder, obligaron a utilizar exclusivamente las medidas de presión arterial sistólica cuando el diseño experimental requería este método de medida.

Todas las ratas se sometieron a dicha medida durante los tres días previos al inicio de cada experimento con objeto de favorecer su acostumbramiento y posterior manipulación, seleccionando únicamente aquellos animales cuyos valores de presión arterial eran estables durante este período de tiempo. Los valores finales de las presiones arteriales sistólica y diastólica considerados corresponden a la media de, al menos, ocho medidas consecutivas. La frecuencia cardíaca se obtuvo mediante un cardiostacómetro acoplado al sistema.

4.2. Medida directa

La medida directa de la presión arterial se realizó conectando un catéter, previamente implantado en la aorta abdominal o en la carótida a un transductor Staham acoplado a un polígrafo Grass 7D con salida para tres canales. Dos de las tres unidades constan de un preamplificador y un amplificador de corriente y el tercero lleva un cardiotacómetro que, estimulado por la presión de pulso, permite la medida de la frecuencia cardíaca.

La presión arterial y la frecuencia cardíaca se registraron, al menos, durante los treinta minutos previos al inicio de cada experimento, o hasta que se consiguió un registro estable de presión, lo cual sucede cuando el animal permanece prácticamente inmóvil en el interior de la jaula. Para facilitar esta situación, el animal había sido acostumbrado previamente al entorno y al manejo durante los tres días previos a la realización del experimento. Las medidas de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, siempre que fue posible, se efectuaron por el método directo, eligiéndose éste frente al método indirecto porque permite determinar ambos parámetros cardiovasculares con el animal en situación libre, mientras que en el caso del "tail-cuff" ha de reducirse la motilidad del animalidad al mínimo envolviéndolo en el interior de un paño, quedando únicamente la cola al descubierto. Adicionalmente, el procedimiento de medida directa permite un registro continuo de la presión arterial, ventaja importante cuando se trata de observar efectos agudos o de breve duración, imposibles de apreciar por el método indirecto.

Las variaciones debidas al empleo de una u otra técnica fueron descartadas en experimentos previos realizados en rata anestesiada, pudiendo comprobarse que existía una buena correlación entre los valores de presión arterial sistólica y diastólica obtenidos por ambos procedimientos de medida, coincidiendo de este modo con los datos obtenidos por otros autores (Pfeffer, 1971; Ferrari y cols. 1986).

5. TEST DE ANALGESIA

El test de analgesia de la placa caliente (Eddy y Leimbach 1953) fue aplicado para evaluar la acción antinociceptiva provocada por el aislamiento, así como para

confirmar la adecuada liberación de naloxona en animales implantados con bombas ALZET mediante la determinación de su efecto hiperalgésico.

Para ello, las ratas se colocaron en una placa caliente mantenida a una temperatura constante de 50° C, anotándose el tiempo de latencia transcurrido hasta la aparición del primer síntoma nociceptivo. El lamido de las patas traseras fue el criterio seleccionado para la respuesta. En ausencia de la misma la aplicación del test al animal se interrumpió a los 80 sg. ("cut-offtime").

6. TECNICAS QUIRURGICAS

6.1. Canulación de la aorta abdominal

La implantación crónica de un catéter en la aorta abdominal, método que permite la medida directa de la presión arterial de un modo continuo en el animal consciente y en estado libre, se efectuó del modo siguiente. Una vez anestesiadas las ratas con equitesin, se practican dos incisiones transversales sobre la zona posterior del cuello. A continuación, se abre el abdomen siguiendo la línea alba. El catéter, compuesto por dos segmentos de polietileno PE-10 y PE 20 (Clay-Adams, U.S.A), de 10 y 17 cm de longitud, respectivamente, ensamblados de acuerdo con el método de Stanton (1971), se colocan en un trocar, el cual se pasa a través del psoas lateral izquierdo y, siguiendo la pared dorso lateral, se conduce hacia las dos incisiones previamente realizadas en el cuello, fijándose el extremo PE 20 del catéter al músculo situado por debajo de aquellas con hilo de sutura. Seguidamente, se llena con heparina 0.1% (Labs. Leo) y se cierra con un pequeño tapón de polietileno PE 100. Después de localizar y disecar cuidadosamente la aorta abdominal, entre la bifurcación de las arterias renal e ilíaca, se ocluye momentáneamente la arteria con hilo de sutura, y se pincha superficialmente por encima del punto de oclusión con una aguja semicircular C 18. Con posterioridad, el extremo PE 10, cortado en forma de bisel, se introduce en la aorta hasta situar el mismo por encima de su unión con la arteria renal izquierda. Una vez fijada la cánula al psoas, se procede a suturar, por planos, el músculo abdominal y la piel, aplicándose una solución de alcohol yodado sobre las suturas. Finalmente, se administra, a través de la cánula, gentamicina 5 ml/kg, (Gevramycin 20, Schering Labs. Essex, España). Esta operación, así como la administración de heparina, se repitieron tres veces por semana para evitar la

obstrucción de la cánula y prevenir el riesgo de infecciones. Una vez implantado el catéter, y antes de proceder a cualquier manipulación experimental en las ratas, se dejaron transcurrir, al menos, 72 horas para permitir la recuperación completa de los animales.

6.2. Canulación de la arteria carótida

La canulación de la arteria carótida se aplicó, única y exclusivamente, para la medida de la presión arterial en animales anestesiados con una solución de etiluretano al 20% (1,2 mg/kg). Para ello, el animal se coloca en posición ventral sobre una mesa de operaciones. Después de localizar la arteria junto al nervio vago, se disecciona el vaso, efectuándose la canulación con una pequeña aguja que se asegura a la arteria mediante hilo de sutura. La arteria así canulada y convenientemente conectada a un transductor Statham y a un polígrafo Grass 7D, permite la medida de la presión y la frecuencia cardíaca. Cuando el protocolo experimental exigía la administración en estos animales por vía i.v., se canuló la vena yugular contralateral de modo análogo al descrito para la carótida. Con objeto de prevenir la coagulación se administraron 0.1 ml de heparina 5.000 U/ml.

6.3. Extracción de las adrenales

Las adrenales se extrajeron retirando ambas glándulas a través de dos pequeñas incisiones realizadas a ambos lados del dorso del animal, tanto en la piel como en la masa muscular subyacente. Inmediatamente después de la extracción de las glándulas, se procedió a determinar su peso, previa eliminación del tejido adiposo adherido a las mismas.

7. MODELO DE ESTRES

El modelo de estrés utilizado fue el de deprivación social breve. Las condiciones experimentales para la inducción del estrés por este método fueron descritas en primer término por Gardiner y Bennett (1977) y modificadas posteriormente por Naranjo y Fuentes (1985). En este modelo, cada rata se coloca individualmente en una jaula standard (25*25*14 cm) de paredes opacas, manteniéndose en aislamiento continuo durante 15 días, o hasta que se obtiene el desarrollo de la respuesta hipertensiva, considerándose que ésta se produce cuando

los valores de presión arterial sistólica se sitúan por encima de los 150 mm de Hg. Paralelamente, se utiliza un grupo control constituido por un conjunto de cinco ratas agrupadas que permanecen durante el mismo período de tiempo en jaulas de mayor tamaño (40*33*16 cm) y en condiciones similares a las descritas para los animales aislados. En todos los casos se utilizaron animales de seis semanas de edad (90+10 g) al comienzo del período de aislamiento, que habían sido habituados previamente a la medida indirecta de presión arterial, y, en todo caso, con valores de presión arterial sistólica inferiores a 140 mm de Hg.

8. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

8.1. Fundamentos de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de fase reversa, empleada para la realización de determinados experimentos de este trabajo, es una variante de la cromatografía clásica de fase normal, que permite la separación de mezclas compuestas por sustancias polares las cuales, utilizando fase normal, quedarían fuertemente retenidas en la fase estacionaria (columna) por su carácter hidrofílico, circunstancia esta que alargaría el tiempo de análisis y la cantidad de eluyente empleado. La cromatografía de fase reversa de par iónico incorpora a la anterior la ventaja de permitir la manipulación selectiva de los tiempos de retención de moléculas ionizadas, cuando el formador del par iónico (en nuestro caso un ácido sulfónico) se añade a la fase móvil, e interacciona con el grupo NH^{4+} de las catecolaminas, suprimiendo su ionización e incrementando, de este modo, la retención de las mismas en la fase estacionaria, mientras los componentes ácidos o neutros de la muestra no son afectados.

Además de los compuestos formadores de pares iónicos, el pH, la concentración del solvente orgánico y la fuerza iónica, son los factores más frecuentemente manejados para obtener una resolución adecuada de la mezcla de catecolaminas analizadas.

Respecto a los sistemas de detección empleados, han sido los dos que a continuación se describen.

8.1.1. Detección electroquímica

Un compuesto puede ser detectado electroquímicamente cuando es capaz de sufrir procesos de óxido-reducción, dentro de los límites de potencial fijados por el tipo de material del electrodo de trabajo. Todas las catecolaminas son, por tanto, susceptibles de ser detectadas analíticamente por oxidación a sus correspondientes ortoquinonas en la superficie del electrodo de trabajo, liberándose dos electrones en el proceso. La intensidad de la corriente generada es directamente proporcional al número de moléculas oxidadas en contacto con la superficie del electrodo.

La selectividad de este método de detección se logra ajustando la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo, y el de referencia, a un valor justo por encima del potencial de oxidación de los compuestos de interés. Para la detección de catecolaminas, se requieren potenciales del orden de 0.60-0.70 V, sin embargo, los metabolitos O-metilados de éstas, como el MHPG, requieren una energía de activación más alta y, por tanto, potenciales de oxidación más elevados. En la práctica, mientras se efectuaba la elección del mejor método para la determinación de MHPG, se emplearon al menos 15 fases móviles distintas, variando fuerza iónica, pH y concentración de metanol en la fase móvil, así como modificando el potencial de oxidación, sin conseguir, con el empleo del detector electroquímico, ni la sensibilidad adecuada ni una resolución satisfactoria para este metabolito.

8.1.2. Detección fluorimétrica

La fluorescencia tiene lugar cuando los compuestos que poseen determinados grupos funcionales se excitan con energía de una cierta longitud de onda y emiten una radiación de energía inferior, que es medida gracias a la presencia de un fotomultiplicador. Las catecolaminas, debido a su estructura fenólica, presentan fluorescencia natural para una longitud de onda entre 200-300 nm. Este sistema de detección permite la cuantificación y separación de catecolaminas, y de catecoles en general, aunque con una sensibilidad del orden de 10-100 veces inferior a la obtenida cuando se emplea la detección electroquímica. Mediante el empleo de esta técnica, se obviaron los inconvenientes derivados de la escasa resolución que se obtenía para la identificación y posterior cuantificación del MHPG cuando se utilizaba la detección electroquímica, ya que otros componentes resultantes de la hidrólisis necesaria de la muestra, como se detallará posteriormente, detectados por este sistema no presentan fluorescencia natural.

Nuestro sistema constaba de un monocromador para la selección de la longitud de onda de excitación y un filtro de emisión de paso de banda para la longitud de onda de emisión.

8.2. Determinación de la velocidad de renovación de noradrenalina, dopamina y de los niveles de adrenalina por HPLC

8.2.1. Preparación de las muestras

Los animales se sacrificaron por decapitación, procediéndose de modo inmediato a la extracción del cerebro y, posteriormente, a la disección de las estructuras cerebrales discretas, según el procedimiento de Glowinski e Iversen (1966). A continuación, se pesaron y congelaron en nieve carbónica, almacenándose a -80°C hasta el momento de las determinaciones.

Homogeneización

La homogeneización se realizó en un líquido de extracción que contenía ácido perclórico 0.4 M y 3-4 DHBA como standard interno para la cuantificación de NA, AD, DA y DOPAC, empleando para este fin un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 1510, Braun). A continuación, se centrifugó el homogeneizado a 11.000 r.p.m. en una minifuga Heraeus. Mod.B durante 30 minutos, recogiendo los sobrenadantes para efectuar el análisis directo de los mismos por HPLC con detección electroquímica, en el caso de NA, AD, DA y DOPAC, o bien se procedió a realizar una hidrólisis ácida previa a su determinación fluorimétrica, en el caso del MHPG-sulfato. El volumen para la homogeneización fue variable, dependiendo de la concentración estimada de MHPG en el tejido a analizar. Se obtenían buenas respuestas para ambos detectores empleando 8 volúmenes para el bulbo raquídeo y 10 volúmenes para el hipotálamo.

Hidrólisis ácida

Para proceder a la determinación de MHPG, y puesto que este metabolito en cerebro de rata se encuentra mayoritariamente conjugado en forma de sulfato, es necesario realizar una hidrólisis previa, con objeto de dejar el MHPG en su forma libre, ya que la presencia del grupo sulfato imposibilita su detección posterior. Con este objeto, se tomaron 200 μl del sobrenadante en tubos de cristal de 3 ml y se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante 4 minutos. Después de

neutralizar los mismos con Na(OH) 2N, se efectuó el análisis cuantitativo de MHPG, tras someter a las muestras a una centrifugación leve con el fin de recolectar todo el líquido en el fondo de los tubos. El rendimiento de la hidrólisis no fue, en ningún caso, inferior al 70%.

8.2.2. Condiciones cromatográficas para la determinación de noradrenalina, adrenalina, dopamina y DOPAC.

La separación y cuantificación de estas aminas se llevó a cabo inyectando directamente los sobrenadantes en un equipo de HPLC con detección electroquímica, empleando columnas cromatográficas de fase reversa. El sistema cromatográfico empleado estaba constituido por una bomba (Waters M-510), un inyector automático (Spark Holland. Mod.Promis II), un detector electroquímico (Waters M-40) y un integrador (Spectra Physics, Mod. SP-4290). La columna empleada fue una Resolve C-18 (Waters) de 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro y 5 μ de tamaño de partícula, de fase reversa. La fase móvil estaba compuesta por:

Acido cítrico	0.1 M
Acetato sódico	0.1 M
EDTA	0.15 mM
Octilsulfatosódico (PIC)	1.2 mM
Metanol	10%
pH = 3.75	

todo ello, disuelto en agua procesada mediante un sistema Milli-Q (Waters), adosado a un sistema de prepurificación Milli-RO (Waters). La adición de PIC como formador de par iónico es imprescindible para la detección de NA, ya que aumenta su tiempo de retención impidiendo que eluya con el frente de inyección. La separación cromatográfica se realizó a un flujo de 1 ml/min, aplicándose una diferencia de potencial de 0.65 V, entre el electrodo de trabajo y el de referencia. La cantidad de muestra inyectada fue de 20 μ l.

8.2.3. Condiciones cromatográficas para la determinación de MHPG

Para determinar el contenido de MHPG en las muestras se utilizaron dos alícuotas del sobrenadante de 200 μ l cada una, según el método descrito por

Artigas y cols. (1986). La alícuota endógena (E) llevaba, además, 10 µl de agua destilada y la sobrecargada (S) 10 µl de MHPG-sulfato (600 pg/µl). A continuación, se procedió a la hidrólisis de ambas alícuotas, según se indicaba con anterioridad, y los sobrenadantes, una vez hidrolizados, se inyectaron en un equipo de HPLC con detección fluorimétrica.

Los componentes e instrumentación fueron similares a los descritos en el apartado anterior, si exceptuamos el empleo en este caso de un detector fluorimérico (Applied Biosystem, 980). La columna utilizada fue una ODS-1 Spherisorb (Brownlee) de 5 µ, 10 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro. La fase móvil tenía la siguiente composición:

Acido cítrico	0.03 M
Fosfato disódico	0.06 M
Metanol	5,5%

y circulaba por el sistema a un flujo constante de 1.2 ml/min. En estas condiciones, el MHPG eluye aproximadamente a los 5 minutos. Las longitudes de onda empleadas para la detección fueron 236 nm (excitación) y 350 (emisión). La respuesta del detector fluorimétrico para el MHPG era lineal, según se comprobó previamente, en un rango entre 0.5-5 ng $r = 0.9996$.

El volumen inyectado fue de 50 µl y la cuantificación se efectuó por el método de adición externa.

8.2.4. Cuantificación y expresión de los resultados

Los standards empleados para la identificación y cuantificación de los distintos componentes de las muestras se prepararon en ácido perclórico 0.4 M para NA, AD, DA y DOPAC y en metanol absoluto para el MHPG-sulfato y MHPG-hemipiperazina. Estas soluciones almacenadas a -20° C se mantienen estables durante un mes. Las soluciones de trabajo (50-200 pg/µl) se prepararon diariamente por dilución de las soluciones madre (100-200 ng/µl) en ácido perclórico.

La calibración del sistema se efectuó por inyección del standard externo correspondiente. El DHBA y el MHPG-sulfato se emplearon como standards internos para la cuantificación de NA, AD, DA, DOPAC y de MHPG, respectivamente, y su uso se justifica por las pequeñas variaciones que pudieran

presentarse en la preparación de la muestra o en el volumen de inyección. Para compensar la disminución gradual de la sensibilidad del detector con el uso continuo, se inyectaron los standards cada 5 muestras.

Los standards se procesaron de modo paralelo y la concentración de las catecolaminas en las muestras se determinó por comparación de las áreas de sus picos con las áreas de los picos obtenidos para los standards, después de aplicar la corrección correspondiente una vez evaluada la recuperación para el standard interno (3-4 DHBA). El valor obtenido fue de nuevo corregido, en función de los volúmenes de homogeneización de cada tejido, para expresar las concentraciones en pg/mg de tejido.

Para el caso del MHPG, la concentración en las muestras se obtuvo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$he/ce = hs/(ce + cs)$$

he = altura del pico de MHPG en la alicuota E

hs = altura del pico de MHPG en la alicuota S

ce = concentración real de MHPG

cs = concentración de MHPG-sulfato añadido a la alicuota S

Las velocidades de renovación de NA y DA se expresan como el cociente entre la concentración del metabolito y la concentración de la amina, MHPG/NA y DOPAC/DA respectivamente.

8.3. Ensayos de fijación

El fundamento de este tipo de ensayos se basa en la capacidad que poseen distintos radioligandos (compuestos marcados radioactivamente), a bajas concentraciones, para unirse selectivamente a aquellos sitios de fijación por los cuales presentan una afinidad elevada. Esta metodología permite estudiar las poblaciones relativas de receptores existentes en un tejido determinado y, asimismo, observar las eventuales variaciones producidas por distintos tratamientos sobre dichos receptores, mediante la cuantificación de una serie de parámetros tales como la constante de afinidad (KD) específica para cada receptor, el número de receptores (Bmax) o la determinación para los distintos agonistas y antagonistas de

cada receptor de los valores de IC₅₀ (concentración de desplazante que es capaz de inhibir en un 50% la unión específica de un ligando marcado).

El mayor problema en cualquier estudio de fijación, es la identificación de los sitios de unión reconocidos por el radioligando empleado como receptores. Para los receptores opioides son dos los requerimientos mínimos exigibles: que el proceso de unión específica sea saturable, entendiendo aquella como la diferencia de radioactividad ligada en presencia (binding inespecífico) y en ausencia (binding total) de un exceso del ligando no marcado frío, y que la unión sea estereoespecífica.

8.3.1. Metodología de los ensayos de fijación de receptores

El método más común para el análisis directo de la interacción opioide-receptor es la medida de la fijación de ligandos a preparaciones de membrana. Las membranas son preparadas por homogeneización en frío del tejido correspondiente, en un buffer adecuado para el ensayo. A continuación, el homogeneizado se somete a una o varias centrifugaciones sucesivas para separar la fracción enriquecida en membranas plasmáticas. Después se procede a la resuspensión del pellet, siendo en algunas ocasiones necesaria una preincubación para facilitar la disociación de los ligandos endógenos al receptor. Una vez preparadas las membranas, se procede a los ensayos de fijación propiamente dichos, incubando las mismas con distintas concentraciones de un radioligando en presencia y en ausencia de un exceso de ligando "frío" (no radioactivo), que actúa como desplazante. Para asegurar las condiciones óptimas del proceso de fijación se deben controlar los siguientes factores: concentración estimada del receptor, concentración del radioligando, tiempo, y temperatura de incubación. Tras la incubación, se procede a separar la fracción fijada del ligando al tejido de la fracción libre, mediante una filtración rápida al vacío, siendo necesario lavar cada tubo dos o tres veces con 5-10 ml del buffer frío correspondiente. Una vez finalizada la filtración, se realiza el contaje radiométrico de los filtros introducidos previamente en viales con un volumen adecuado de líquido de centelleo.

La representación de los datos se efectúa mediante el procedimiento de Scatchard en la que en abcisas se indican los valores de "binding específico" (BE/fmoles muestra) y en ordenadas BE/DL, donde DL es la concentración del ligando libre por muestra, obtenida de la diferencia entre la cantidad de ligando en el medio, y BE el "binding" total obtenido para cada concentración del ligando

marcado radioactivamente. La intersección de la recta con el eje de abscisas permite cuantificar el número de receptores (B_{max}) y la inversa de la pendiente la afinidad del proceso (K_D).

8.3.2. Fijación de ^3H -etorfina a receptores opioides

El hipotálamo y el bulbo raquídeo, además del cerebro total previa separación del cerebelo, fueron las estructuras elegidas para los estudios de fijación de etorfina, debido a la población relativamente elevada de receptores opioides en las mismas, así como por su conocido papel en el control cardiovascular.

Los animales, una vez sometidos al tratamiento en estudio, se sacrificaron por decapitación, procediéndose a la extracción del cerebro y a la disección de las estructuras, según se indica en el apartado 8.2.1. La homogeneización se realizó en 20 volúmenes de un buffer con la siguiente composición: Hepes 25mM, sacarosa 0,32 M, pH=7.4, en un homogeneizador con émbolo de teflón. El homogenado resultante se centrifugó a 4° C y 3000 r.p.m. durante 5 minutos en una centrífuga MSE, Mod. High Speed 18. Después se recogió el sobrenadante y el pellet fue nuevamente resuspendido en 20 volúmenes del mismo buffer hepes-sacarosa, siendo centrifugado por segunda vez en las mismas condiciones. El sobrenadante procedente de la misma, junto con el de la primera centrifugación, se sometieron seguidamente a una tercera centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos. El pellet obtenido se rehomogeneizó en 10 volúmenes y, después de una última centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos, se resuspendió en un volumen de buffer hepes-sacarosa suficiente para obtener una concentración final de 0.1 mg/ul de tejido. La suspensión resultante fue la que se empleó como fuente del receptor en los ensayos de fijación.

Posteriormente se incubaron, por triplicado y a 37°C durante 25 minutos, alícuotas de 100 ul para el bulbo raquídeo y de 70 ul para el hipotálamo, junto con ^3H -Etorfina (50 Ci/mmol) en un rango de concentraciones de (0.25-4 nM), en presencia y en ausencia de levorfanol 10^{-5} M, completando con hepes 25 mM hasta un volumen final de 500 ul por tubo. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se filtraron a vacío de forma rápida a través de filtros Wathman GF/F de fibra de vidrio. Los filtros se lavaron dos veces consecutivas con 5 ml de hepes 5mM y se introdujeron en miniviales, añadiendo 2 ml de cocktail de centelleo (22-Normascint. Lab. Scharlau) determinándose, por último, la radioactividad de las muestras en un contador de centelleo líquido Beta (LKB).

8.4. Valoración de proteínas

La evaluación de la concentración de proteína se realizó según el método de Lowry, que se basa en la formación de un complejo cobre-proteína en medio alcalino. Este complejo reduce el reactivo de Folin (fosfomolibdico-fosfotúngstico), originando un compuesto coloreado, azul, que es susceptible de ser medido espectrofotométricamente, presentando su longitud de onda de máxima absorción a 560 nm.

Para la realizar esta valoración se parte de una solución de albúmina bovina de concentración 1 mg/ml, a partir de la cual se prepara, posteriormente, una curva patrón mediante diluciones sucesivas para obtener concentraciones de proteína en un rango de 20-300 ug. Los reactivos empleados fueron los siguientes:

<u>Reactivo I</u>	Carbonato sódico 2%
	Hidróxido sódico 0.1 N

<u>Reactivo II</u>	Sulfato cúprico 0.5%
	Tartrato sódico 1%

Reactivo de Folin

A continuación, se colocan en cada tubo 400 ul de las soluciones que contienen las distintas concentraciones de albúmina bovina, o bien, una cierta cantidad de nuestro homogeneizado problema, volumen éste que depende de la concentración estimada de proteína en cada estructura cerebral, y que se lleva siempre hasta 400 ul con agua. Seguidamente, se añaden 2 ml de la solución alcalina de cobre, formada por la mezcla del reactivo I y el reactivo II en una proporción de 50:1. Se agita la muestra y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 200 ul del reactivo de Folin 1 N. Después de un tiempo de contacto no inferior a una hora, se mide la absorbancia del compuesto formado a 560 nm. Las concentraciones de proteína en la muestra problema se determinan por extrapolación de las absorbancias en la curva patrón.

8.5. Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona por radioinmunoensayo

8.5.1. Preparación de las muestras

Los animales se sacrificaron por decapitación, entre las 9 y las 11 a.m., recogiendo la sangre troncular en tubos de polipropileno heparinizados, enfriados con hielo. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 2500 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C. Por último, el sobrenadante se mantuvo congelado a -20° C hasta el momento del análisis.

Para evitar la necesidad de efectuar la extracción previa de la hormona con disolventes orgánicos, se realizó una digestión de las muestras con tripsina, enzima que permite la hidrólisis de la transcortina y otras proteínas con alta afinidad por la corticosterona. La tripsina y el inhibidor de tripsina se prepararon extemporáneamente en un buffer de ensayo constituido por:

Fosfato	0.005 M
Seroalbúmina Bovina	0.06 %
Gamma-Globulina	0.02 %
ClNa	0.9 %
pH = 7.4	

El ensayo se realizó por duplicado en miniviales, añadiendo 100 ul de la solución de tripsina (1 ug/ul) a 2 ul de las muestras, o a 100 ul de los standards, en su caso. Después de agitar los tubos durante un minuto e incubarlos a temperatura ambiente durante una hora, la reacción se detuvo añadiendo 100 ul de una solución de 1.25 ug/ul del inhibidor de tripsina. Tras agitación e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar el radioinmunoensayo.

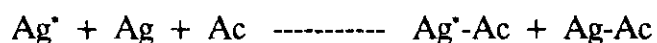
Los standards se prepararon diariamente a partir de una solución madre de corticosterona en etanol de 500 ug/ml, añadiendo 0, 15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 pg de corticosterona a 100 ul de etanol. El etanol se evaporó con corriente de nitrógeno en un baño a 37° C, y los standards se resuspendieron en 100 ul de buffer de ensayo.

8.5.2. Radioinmunoanálisis de corticosterona

El radioinmunoensayo es un método que se basa en la unión específica de un antígeno (corticosterona en nuestro caso) con su anticuerpo correspondiente:



Si a una cantidad constante de antígeno marcado (Ag^*) y de antisuero (Ac) se le añade antígeno no marcado (Ag), ambos antígenos compiten por los lugares de unión del anticuerpo, desplazando este último al trazador (Ag^*):



Para esta reacción se necesita una concentración del anticuerpo tal que permita obtener, al menos, un 50% de unión entre el antígeno marcado y el anticuerpo en ausencia de antígeno frío. Realizando una curva standard con concentraciones crecientes del Ag , se irá produciendo un desplazamiento progresivo del Ag^* del complejo $\text{Ag}^*\text{-Ac}$, de manera que puede establecerse una relación entre la concentración de Ag en la mezcla de reacción y la cantidad de complejo $\text{Ag}^*\text{-Ac}$ formado, determinado por el conteo del radioisótopo que permanece unido en forma de complejo. La concentración de complejo marcado radiométricamente representa el índice de la cantidad de antígeno frío existente en las muestras.

El radioinmunoensayo para corticosterona se llevó a cabo según el método de Armario y Castellanos (1984), realizando ligeras modificaciones. Después de realizar la digestión de las muestras y de los standards, según se indicaba en el apartado anterior, se completó el volumen de todos los tubos a 300 μl con buffer de ensayo, y se añadieron 100 μl de 1,2, ^3H corticosterona (60 Ci/mmol), aproximadamente unas 3000 c.p.m., y 100 μl de anticuerpo de dilución 1/10000 (concentración necesaria para obtener del orden de un 50% de unión antígeno-anticuerpo). La curva standard se completó con un tubo indicador de la unión máxima entre ^3H -corticosterona y el anticuerpo presente en el ensayo, denominado blanco de unión máximo (B_0), al cual no se le añadió el antígeno frío, y un tubo (N) que contenía el buffer de ensayo más el marcador sin el anticuerpo. Todas las muestras se incubaron a 0-4° C durante 14-16 h; transcurrido este periodo de tiempo, se separa el exceso de antígeno marcado y anticuerpo libre de los complejos antígeno-anticuerpo formados, precipitando estos últimos con 200 μl de hidroxipatita al 2.5% en buffer fosfato 0.001 M (pH=7.4) por centrifugación durante 10 minutos

a 3000 r.p.m. (0-4° C). Por último, se añaden 50 ul de buffer fosfato 0.05 M al pellet. Todos los tubos se sometieron a este tratamiento, excepto el indicador de la concentración total de antígeno marcado (Ag) en el ensayo. La cuantificación radiométrica de las muestras se realizó, tras añadir 2 ml de líquido de centelleo (22-Normascint. Lab. Scharlau), en un contador beta (LKB).

El tubo N, que contenía la corticosterona tritiada más el buffer de ensayo, representa la unión inespecífica de ésta a la hidroxiapatita, por lo que las c.p.m. obtenidas de su conteo se han de sustraer de las c.p.m. totales para cada tubo.

En la Figura 5 se muestra una curva de calibrado en la que se representa, en ordenadas, el porcentaje de complejo Ag^{*}-Ac frente a concentraciones crecientes de antígeno no marcado (corticosterona) en abscisas. Esta curva presenta una zona lineal que se empleará para la extrapolación de las c.p.m. contenidas en las muestras problema, y, consecuentemente, para la determinación del contenido de corticosterona en las mismas.

8.6. Determinación de la actividad de tirosina hidroxilasa

La evaluación de la actividad del enzima TH se efectuó según el método de Nagatsu y cols.(1979). El ensayo se basa en la determinación de la concentración de L-dopa formada por acción de la TH sobre su sustrato L-tirosina en homogeneizados cerebrales, efectuándose la cuantificación mediante HPLC de fase reversa con detección electroquímica.

Los animales se sacrificaron por decapitación y se procedió de modo inmediato a la disección del cerebro y de las estructuras cerebrales discretas (bulbo raquídeo e hipotálamo), siguiendo el procedimiento de Glowinsky e Iversen (1966). A continuación, las estructuras disecadas se pesaron y congelaron en nieve carbónica hasta el momento del ensayo.

La homogeneización del bulbo raquídeo y el hipotálamo se realizó en 4 y 2 volúmenes de sacarosa 0.25 M, respectivamente, y el homogenado correspondiente a 15 y 7 mg de tejido se incubó a 37° C en presencia de 100 ul de una solución compuesta por: acetato sódico 0.1 M, catalasa 0.1 mg/ml, 6-metil-5,6,7,8 tetrahidropterina (preparada en mercaptoetanol 1 M) y L-tirosina 0.2 mM. Para el blanco de incubación se empleó D-tirosina, que no es sustrato para la TH ya que la enzima sólo reconoce la forma L, en lugar de L-tirosina. Otro tubo conteniendo

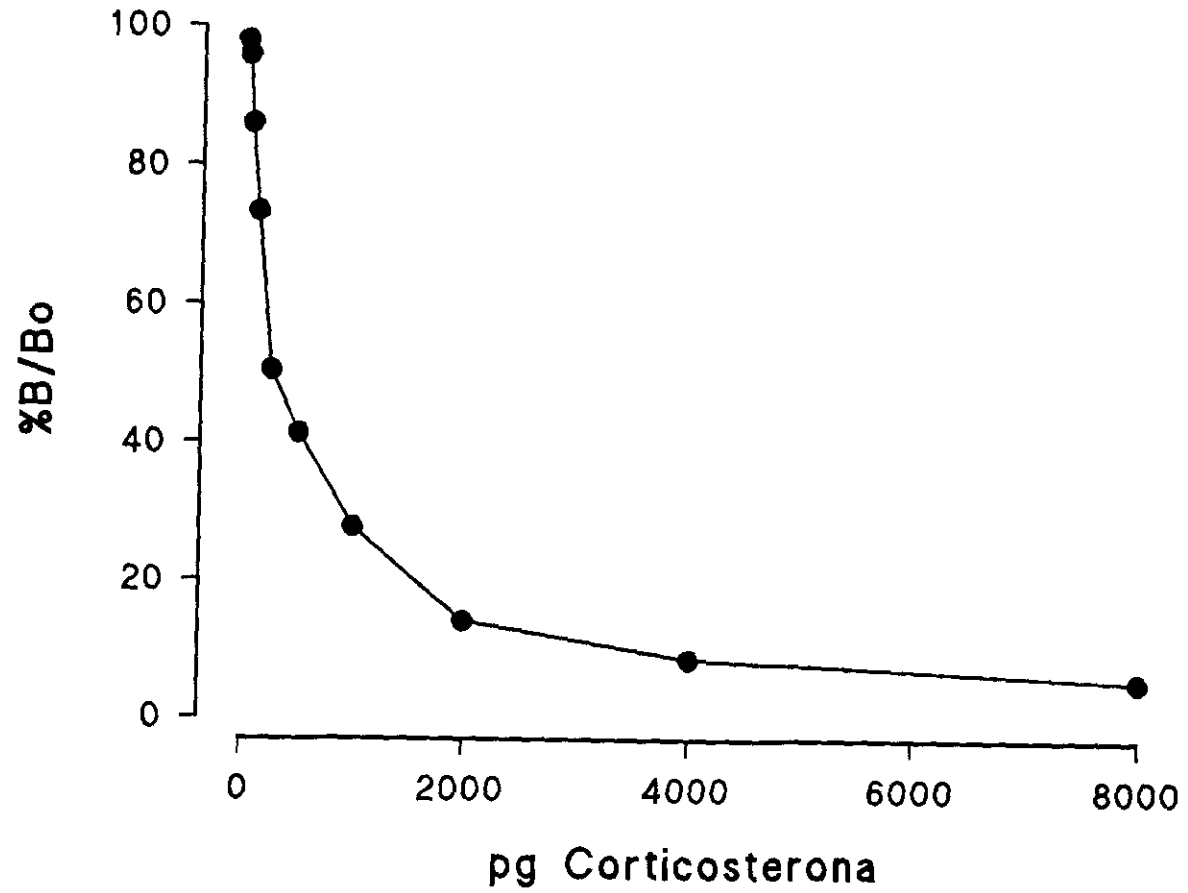


Fig.5.- Curva standard del radioinmunoensayo de corticosterona.

L-dopa 1 μM se empleó como standard interno. El objeto de procesar paralelamente tres tipos de tubos (test, blanco y standard interno) se fundamenta en la necesidad de tener un control indicativo de la L-dopa contenida inicialmente en la preparación antes de proceder al ensayo, o de la DOPA formada por reacción no enzimática, así como de la recuperación del ensayo. Tras 30 minutos de incubación, la reacción se detuvo añadiendo 0.2 ml de una solución de ácido perclórico 0.2 M que contenía bisulfito sódico 0.5 mM y DHBA 3 μM , realizándose una centrifugación posterior. La evaluación de las cantidades de L-dopa formadas en cada tubo se llevó a cabo inyectando los sobrenadantes en un equipo de HPLC con detección electroquímica, previa purificación de la L-dopa por absorción en alúmina activada, lavado y reextracción en ácido perclórico. El sistema cromatográfico utilizado fue similar al que se describe en el apartado 8.2.2. Para la separación se empleó una columna RP-18 (Brownlee Labs.) de 10 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro y 5 μ de tamaño de partícula, efectuándose la elución con la siguiente fase móvil:

Acido cítrico	10 mM
Fosfato disódico	5 mM
EDTA	0.05 mM
Octil sulfato sódico	0.12 mM
Metanol	3%
pH = 3.0	

La diferencia de potencial aplicada para la determinación entre el electrodo de trabajo y el de referencia fue de 0.80 V.

Los standards se procesaron de modo paralelo y la concentración de L-dopa en las muestras se determinó por comparación de las áreas de sus picos con las áreas correspondientes a los picos obtenidos para los standards, después de aplicar la corrección correspondiente y una vez evaluada la recuperación para el standard interno. La actividad de la TH se expresa en ng de L-dopa/mg de tejido/hora de incubación.

9. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

El valor de las variables estudiadas se expresa mediante un parámetro de centralización (media aritmética) y otro de dispersión (error standard de la media) (ES).

Para analizar las diferencias entre los grupos experimentales se utilizó el test "t" de Student, una vez comprobada la viabilidad de su aplicación (ajuste de los grupos experimentales a una distribución normal).

RESULTADOS

1. ESTUDIOS SOBRE LA PARTICIPACION DEL SISTEMA OPIOIDE EN LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRÉS POR DEPRIVACION SOCIAL

1.1. Caracterización de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social

La aplicación del modelo de privación social en ratas jóvenes produjo un incremento progresivo tanto de la presión arterial sistólica (Fig.6) como de la presión arterial diastólica (Fig.7). En nuestras condiciones de trabajo, el aumento de ambos parámetros fue significativo a partir de la primera semana de aislamiento, alcanzando la hipertensión su nivel máximo y prácticamente estable en el transcurso de la tercera semana. La lectura simultánea de la frecuencia cardíaca en los mismos animales no reveló modificaciones apreciables como consecuencia del aislamiento (agrupadas, 420 ± 18 ; aisladas, 408 ± 12 , en el día 14).

En los animales aislados, los niveles plasmáticos de corticosterona y el peso de las glándulas adrenales, se utilizaron como índices de la actividad del eje H-H-A y, consecuentemente, del grado de estrés al que están sometidos los animales. La determinación se llevó a cabo en el día 14 del aislamiento, una vez que los animales habían desarrollado la hipertensión. En este instante, los animales privados socialmente presentaban una elevación estadísticamente significativa de los niveles de la hormona, así como un aumento del peso (tejido fresco) de las adrenales respecto al grupo control de animales agrupados al cabo del mismo periodo de tiempo (Tabla II).

1.2. Reversión de la respuesta hipertensiva al estrés por naloxona

La administración i.p. del antagonista opiáceo naloxona (1 mg/kg) antagonizó totalmente la elevación de presión inducida por el estrés, ya que el grupo de animales aislados tratados con el antagonista presentaba unas lecturas de presión arterial tanto sistólica como diastólica, similares a las de los animales agrupados (Fig.8). El efecto antihipertensivo fue máximo a los 15 minutos de la inyección y la presión retornó a los niveles basales al cabo de 1 hora. El grupo control de animales agrupados normotensos no experimentó alteraciones en la presión arterial por efecto del tratamiento con el antagonista. Un tercer grupo de animales aislados se trató con salino para examinar la acción diferencial del vehículo, que resultó ser nula.

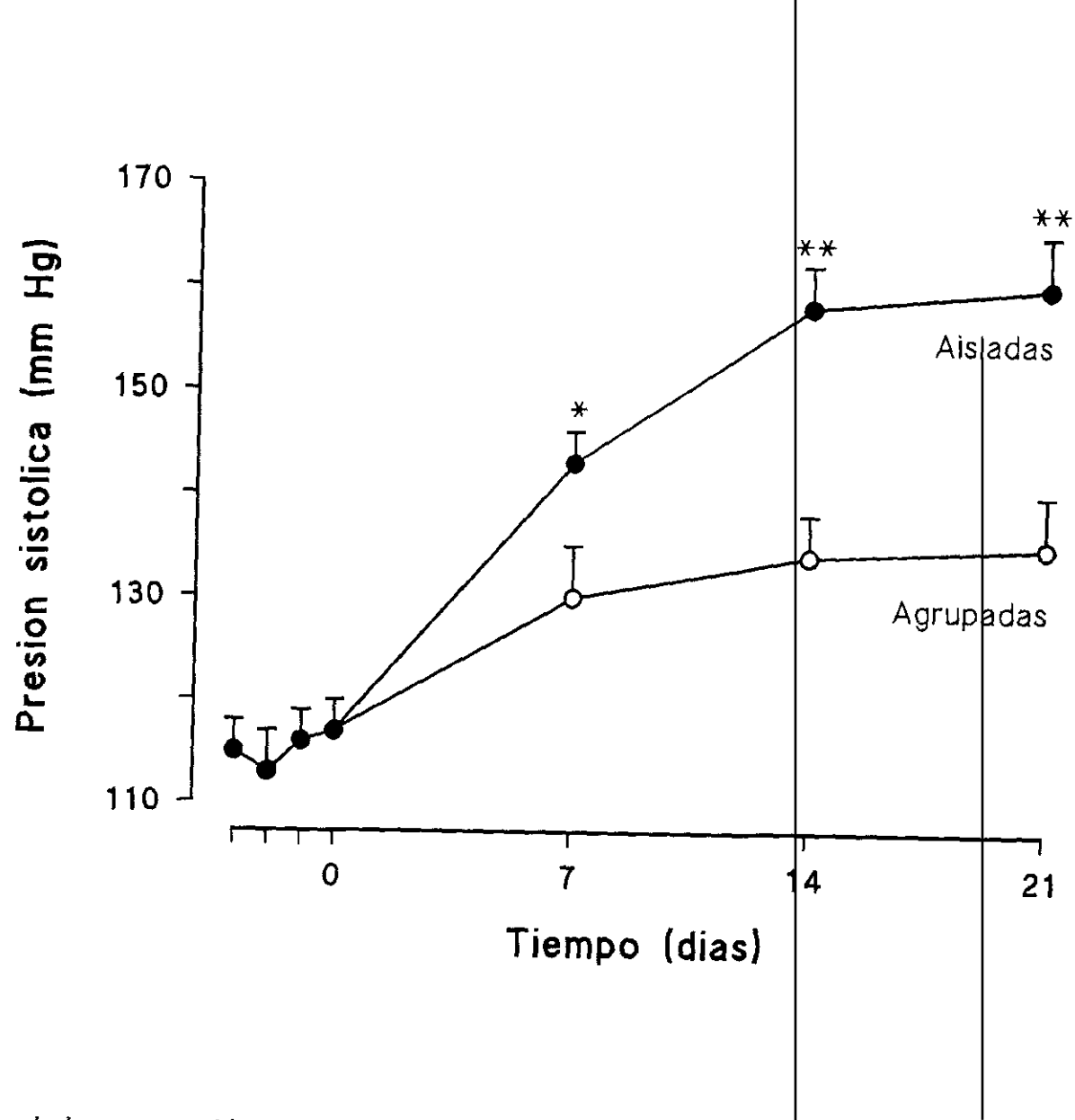


Fig.6.- Desarrollo de la respuesta hipertensiva inducida por privación social a lo largo del tiempo: presión arterial sistólica.

La presión arterial sistólica se determinó en animal consciente por el método indirecto -"tail-cuff"- (Buñag 1973). Las ratas fueron acostumbradas durante tres días a la medida de la presión arterial, realizándose el aislamiento en el día 0. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto a los valores de los animales agrupados (test de la t de Student).

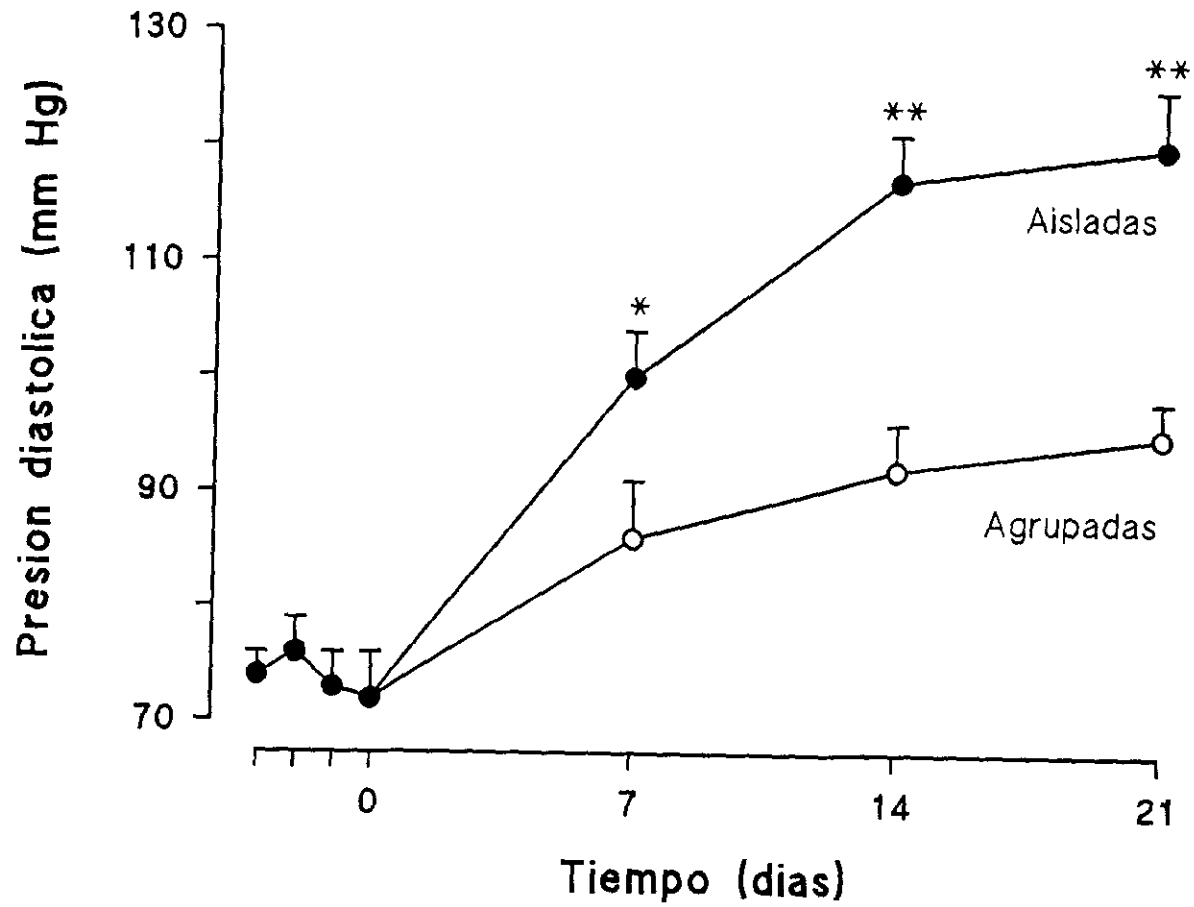


Fig.7.- Desarrollo de la respuesta hipertensiva inducida por privación social a lo largo del tiempo: presión arterial diastólica. Para detalles metodológicos precisos ver Fig. 6. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto a los animales agrupados (test de la t de Student).

TABLA II.- Efecto de la deprivación social sobre el peso de las glándulas adrenales y sobre los niveles plasmáticos de corticosterona.

	PESO ADRENALES (mg/100 g peso)	CORTICOSTERONA (ug/ml)
AGRUPADAS	15.7±0.7	4.08±1.17
AISLADAS	20.0±1.4*	8.56±0.09**

Los datos corresponden a animales sacrificados en el día 14 de aislamiento, cuando las ratas aisladas habían desarrollado la respuesta hipertensiva.

* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo control de animales agrupados (test de la t de Student).

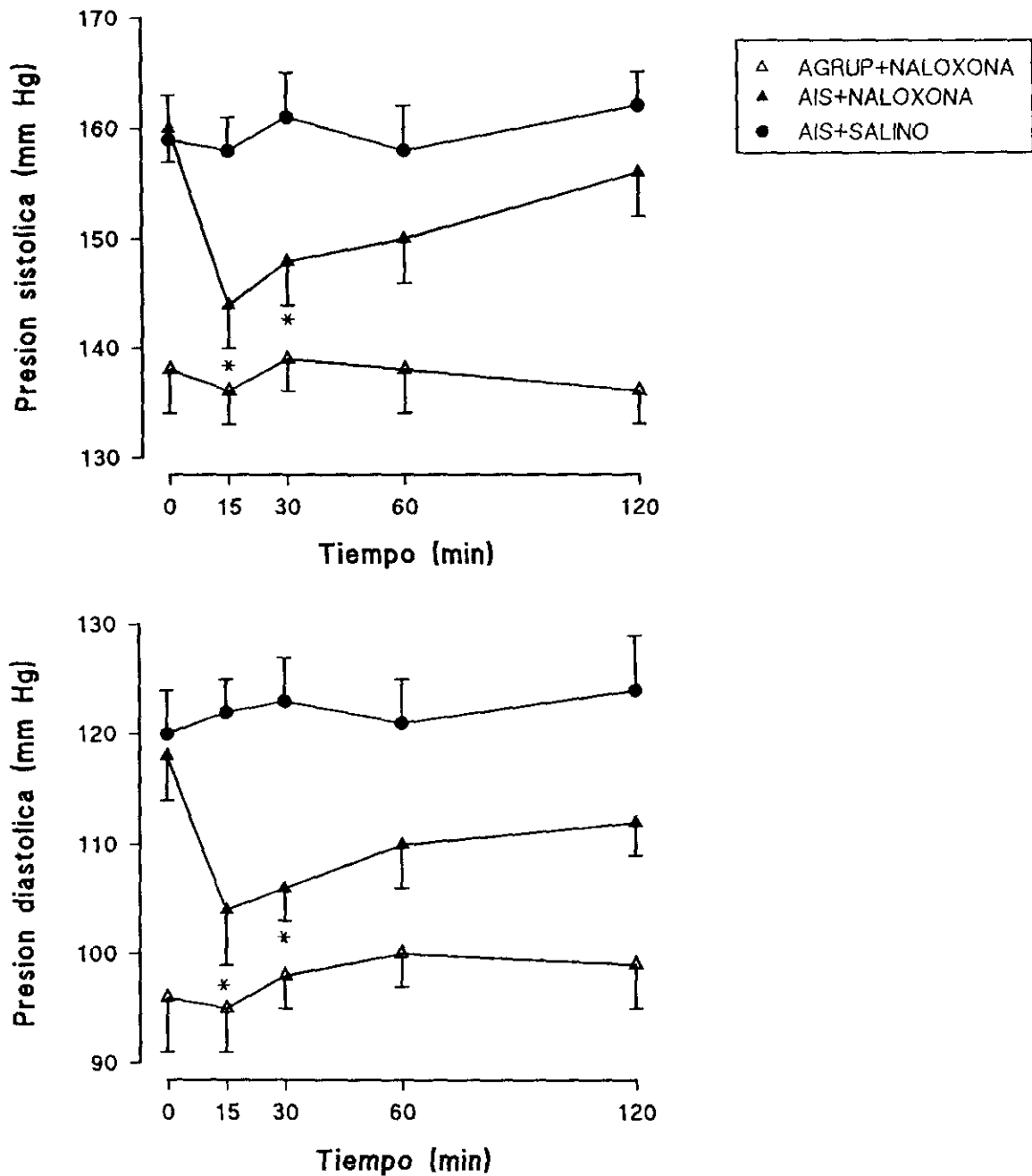


Fig.8.- Reversión de la respuesta hipertensiva inducida por privación social por administración intraperitoneal de naloxona.

El antagonista opiáceo naloxona (1 mg/kg) i.p. se administró tanto a los animales aislados, tras ser sometidos a privación social durante 14 días, como a los animales agrupados. Cada punto representa la media \pm E.S. de la presión arterial sistólica (panel superior), o diastólica (panel inferior). * $p < 0.05$ respecto a los animales aislados tratados con salino (test de la t de Student).

1.3. Reversión estereoespecífica de la respuesta hipertensiva al estrés por naloxona

Con objeto de evaluar la capacidad del antagonista opiáceo naloxona para revertir, de modo estereoespecífico, la respuesta hipertensiva generada como consecuencia de la aplicación del modelo de privación social, se procedió a la administración i.c.v. de los enantiómeros (-) y (+) del fármaco (20 nmol/rata) en animales que, una vez aislados e hipertensos, se habían sometido a la implantación de una cánula en el ventrículo lateral cerebral. Esta dosis de naloxona se seleccionó sobre la base de estudios preliminares en los que se había demostrado que era la mínima cantidad de la forma racémica capaz de antagonizar el aumento de presión arterial (10-20 mm Hg) que se produce tras la administración i.c.v. en animales conscientes y normotensos de los agonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO respectivamente. Dicho incremento era similar al que se genera en los animales estresados por efecto del aislamiento. Una dosis análoga de naloxona (24 nmol/rata) administrada i.c.v. se había demostrado además que era efectiva para antagonizar la hipotensión asociada al shock espinal (Holaday 1983).

Como se observa en la Fig.9, la administración de naloxona (-) produjo una disminución significativa de la presión arterial en los animales hipertensos. Por el contrario, la administración de una dosis equivalente de su correspondiente enantiómero naloxona (+) no antagonizó la antedicha respuesta hipertensiva, y su efecto no difería significativamente del que se obtuvo después de la administración del vehículo.

1.4. Efecto de la administración aguda de morfina en animales hipertensos por privación social

La administración i.p. de morfina (10 mg/kg) produjo un incremento de la presión arterial sistólica en las ratas sometidas durante 15 días al modelo de privación social y que presentaban, por tanto, previamente, lecturas elevadas de presión. Tras la administración del opiáceo, la presión arterial sistólica de este grupo sufrió un aumento estadísticamente significativo respecto al ligero efecto presor que se obtuvo cuando los animales agrupados normotensos se sometieron al mismo tratamiento. El aumento de la presión arterial fue máximo a los 30 minutos de la inyección (Fig.10).

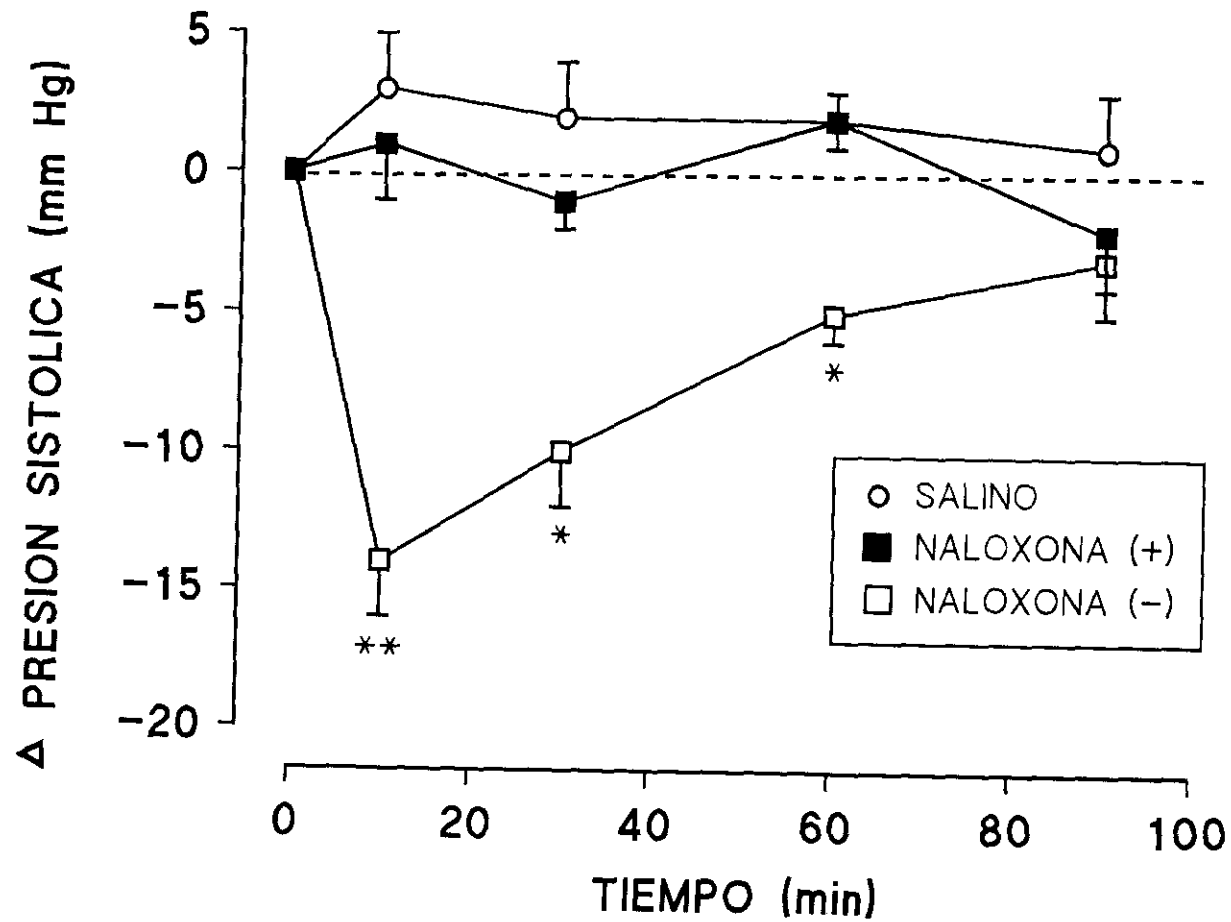


Fig.9.- Reversión estereoespecífica por naloxona de la respuesta hipertensiva inducida por privación social.

La presión arterial sistólica se midió en los animales tras 14 días de privación social y a los tiempos indicados después de la administración i.c.v. de naloxona (-) o (+) (20 nmol/rata) o salino. Valores de presión arterial sistólica previos al tratamiento: agrupadas, 136 ± 2 ; aisladas, 162 ± 2 . Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas a distintos tiempos después de la administración de los enantiómeros. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

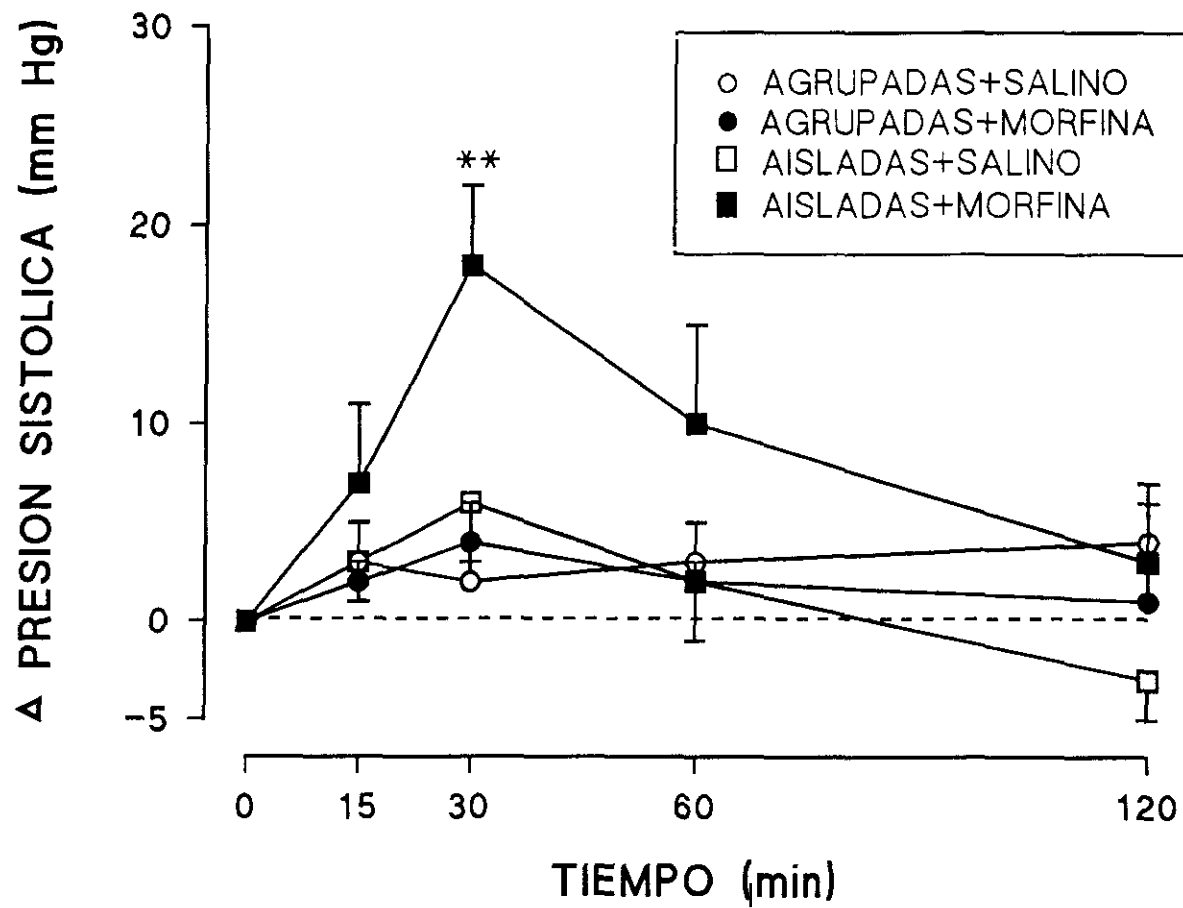


Fig.10.- Efecto de la administración aguda de morfina sobre la presión arterial sistólica de ratas con hipertensión inducida por privación social.

La morfina (10 mg/kg) o el salino se administraron i.p. Valores de presión arterial sistólica previos al tratamiento: agrupadas+salino, 139 ± 4 ; aisladas+salino, 160 ± 5 ; agrupadas+morfina, 142 ± 5 ; aisladas+morfina, 164 ± 5 . Cada punto corresponde a la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas a distintos tiempos después de la administración. ** $p < 0.01$ respecto a los animales agrupados tratados con morfina (test de la t de Student).

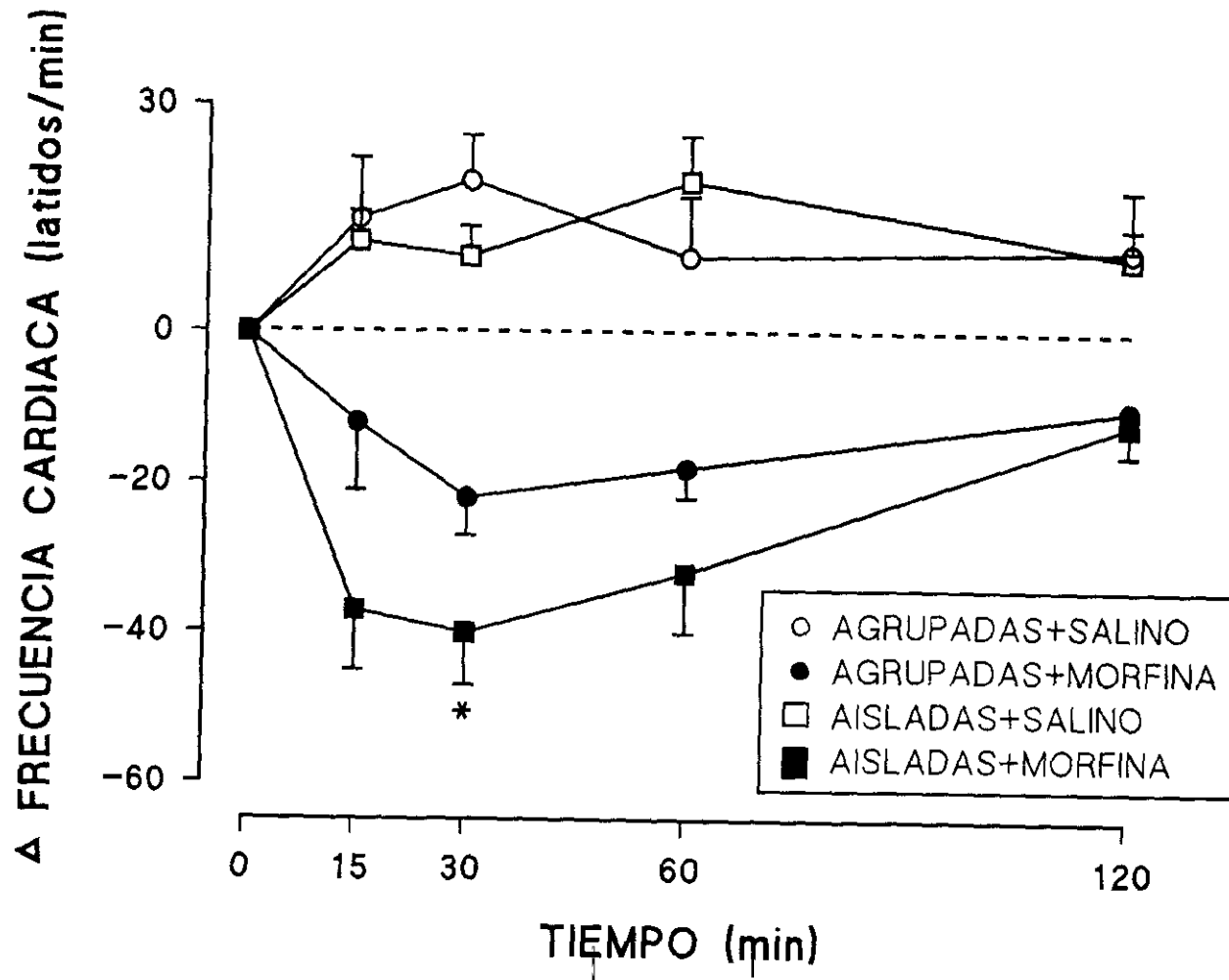


Fig.11.-Efecto de la administración aguda de morfina sobre la frecuencia cardíaca de ratas con hipertensión inducida por privación social.

La morfina (10 mg/kg) o el salino se administraron i.p. Valores de frecuencia cardíaca previos al tratamiento: agrupadas+salino, 390 ± 12 ; aisladas+salino, 410 ± 15 ; agrupadas+morfina, 415 ± 10 ; aisladas+morfina, 405 ± 10 . Cada punto corresponde a la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas a distintos tiempos después de la administración. * $p < 0.05$ respecto a los animales agrupados tratados con morfina (test de la t de Student).

La acción presora de la morfina se acompañó en ambos grupos de una disminución de la frecuencia cardíaca, que de nuevo fue máxima a los 30 minutos de la administración, y que, al igual que para la presión arterial, fue de mayor intensidad en los animales aislados hipertensos (Fig.11).

La administración de salino i.p. no modificó ambos parámetros cardiovasculares de modo significativo en ninguno de los dos grupos experimentales.

1.5. Desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social en animales expuestos crónicamente a morfina

En las Figs.14 y 15 se muestra la evolución de las presiones arteriales sistólica y diastólica en animales sometidos al modelo de privación social cuando son expuestos, de modo simultáneo, a la administración crónica de morfina. En ellas se observa cómo los animales aislados que no recibieron morfina en la solución de bebida desarrollaban la hipertensión de modo habitual durante el transcurso de las dos primeras semanas, alcanzándose valores significativamente elevados respecto a su grupo control (agrupados+sacarosa) a partir de los 8 días de aislamiento. Por el contrario, la presión arterial de los animales aislados dependientes de morfina se mantuvo prácticamente estable mientras las ratas estaban expuestas al efecto del fármaco. Los valores de presión arterial de este grupo fueron similares a los observados para su grupo control (agrupadas+morfina), y sólo ligeramente superiores a los de los animales agrupados que recibían una solución de sacarosa.

La dependencia física de los animales a la morfina se puso de manifiesto mediante la interrupción del tratamiento a los 15 días de su inicio y posterior observación de la pérdida de peso (máximo a las 24 horas) durante el síndrome de abstinencia. Dicha disminución ponderal fue seguida en los días posteriores por una mayor ganancia de peso en los animales previamente sometidos al tratamiento crónico con morfina que en el caso del grupo control (Fig.13). Asimismo, se detectó un incremento progresivo del volumen de solución ingerido por los animales expuestos a morfina a pesar del aumento de la concentración del fármaco en la misma, hecho que se traducía en una mayor dosis autoadministrada a lo largo del periodo de exposición al fármaco (Fig.12).

La interrupción del acceso a morfina provocó, asimismo, un aumento de la presión arterial muy acusado durante el síndrome de abstinencia, tanto en los animales aislados como en los agrupados. Dicho incremento continuó haciéndose

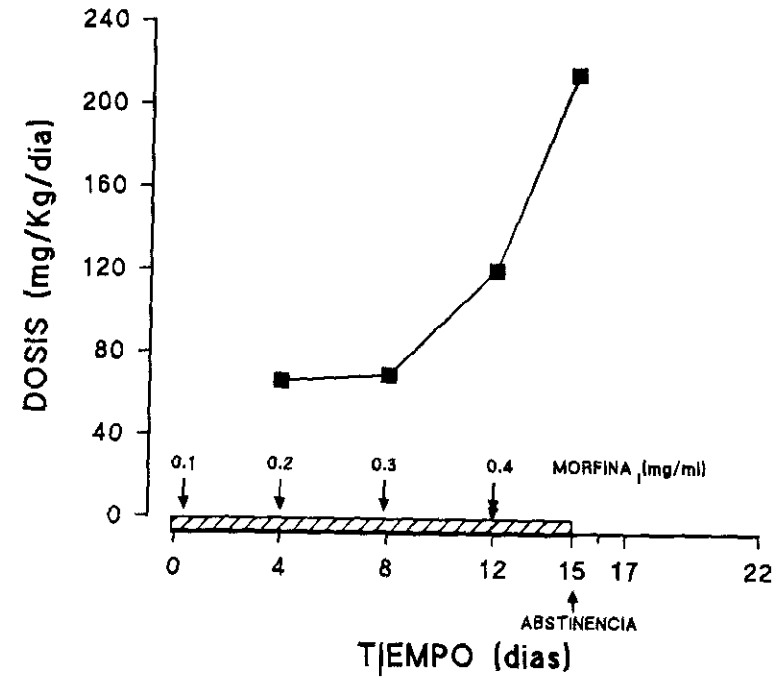
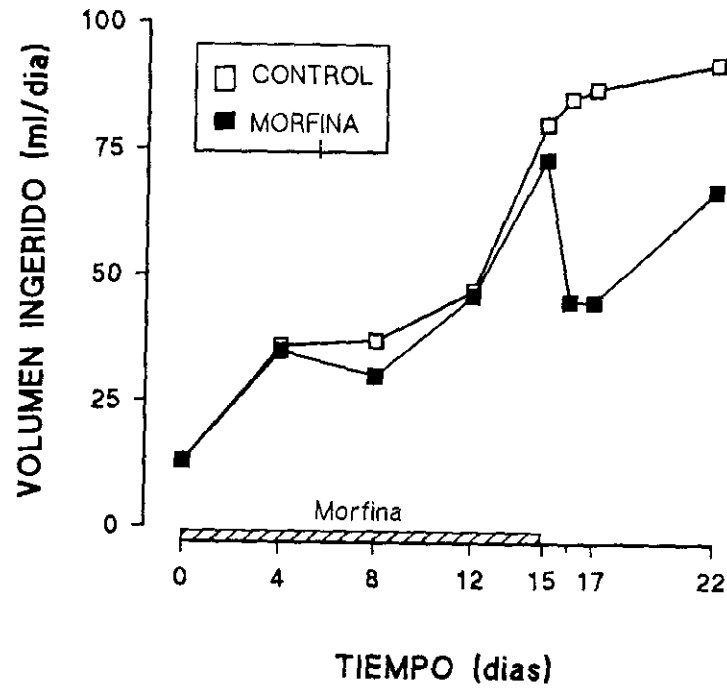


Fig.12.- Volumen de solución ingerida y dosis del fármaco autoadministrada en la bebida durante el proceso de inducción de dependencia a morfina.

Los animales (90 ± 10 g) fueron aislados en el día 0 y recibieron concentraciones crecientes de morfina en la solución de bebida o de sacarosa (grupo control) durante 15 días. Transcurrido este periodo, se suspendió la administración de morfina hasta la finalización del experimento. El grupo ■ representa al conjunto de los animales aislados y agrupados tratados con morfina. Debido a la imposibilidad de cuantificar el volumen ingerido individualmente por los animales agrupados no se representa el error standard de la media.

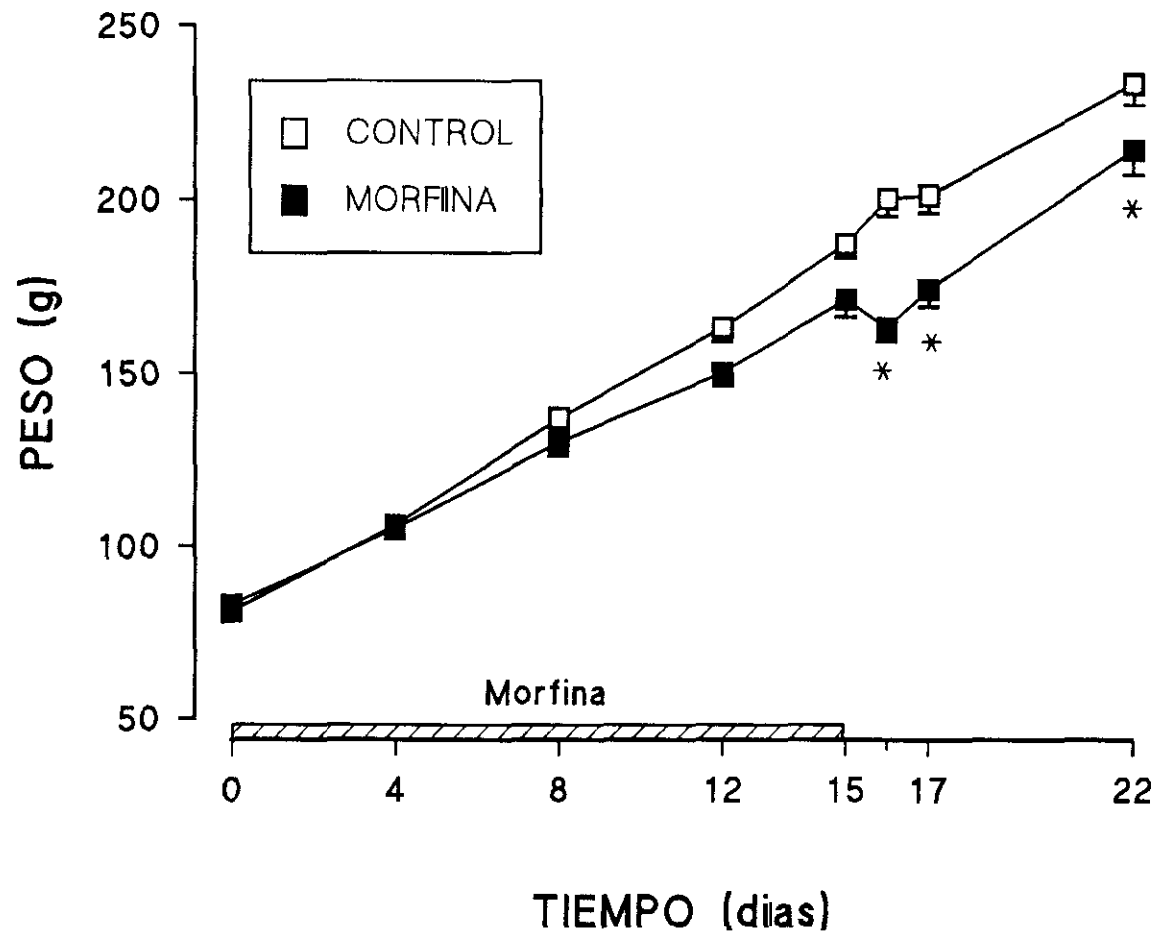


Fig.13.- Variaciones en el peso corporal de las ratas durante el proceso de inducción de dependencia a morfina.

Para detalles metodológicos concretos, ver Fig. 12. * $p < 0.05$ respecto al grupo control tratado con sacarosa en el agua de bebida. (test de la t de Student).

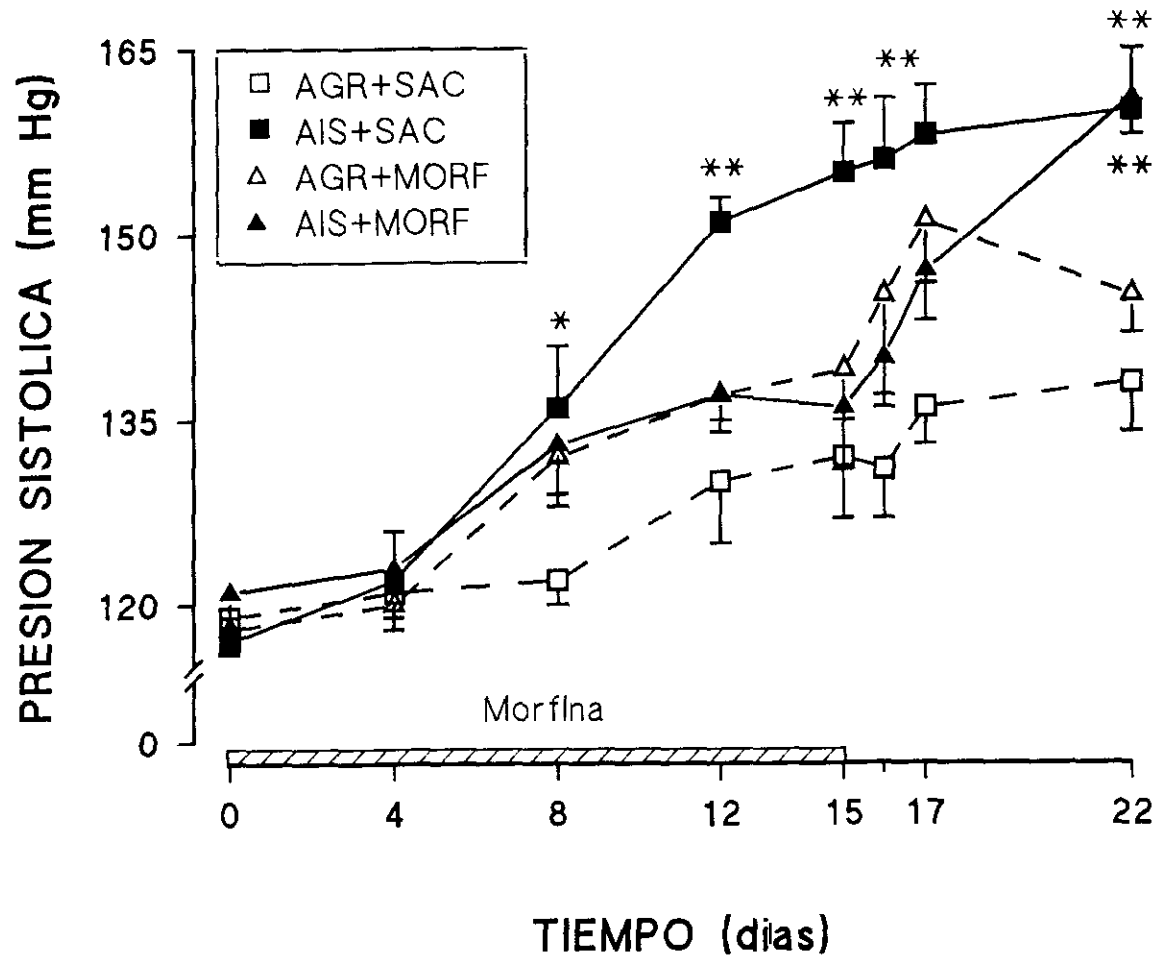


Fig.14.- Efecto del tratamiento crónico con morfina sobre el desarrollo de la elevación de la presión arterial sistólica inducida por privación social.

Los animales (90 ± 10 g) se aislaron en el día 0 y recibieron concentraciones crecientes de morfina en la solución de bebida (0.1-0.4 mg/ml) durante 15 días, o sacarosa en su caso. Transcurrido este periodo se suspendió la administración de morfina hasta la finalización del experimento. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto a los grupos controles respectivos -agru+sac y agru+morf- (test de la t de Student).

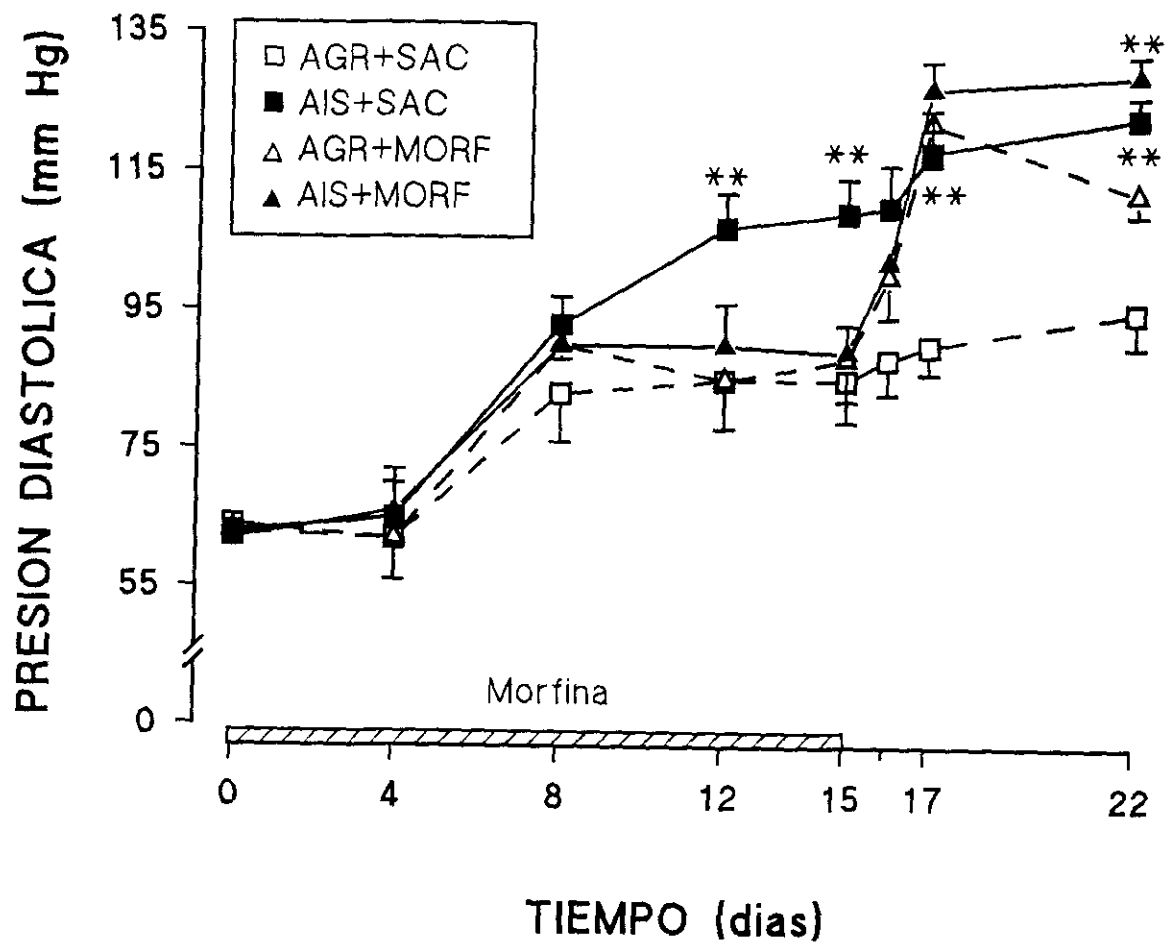


Fig.15.- Efecto del tratamiento crónico con morfina sobre el desarrollo de la elevación de la presión arterial diastólica inducida por privación social.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.14. ** $p < 0.01$ respecto a los grupos controles respectivos -agru+sac- y agru+morf- (test de la t de Student).

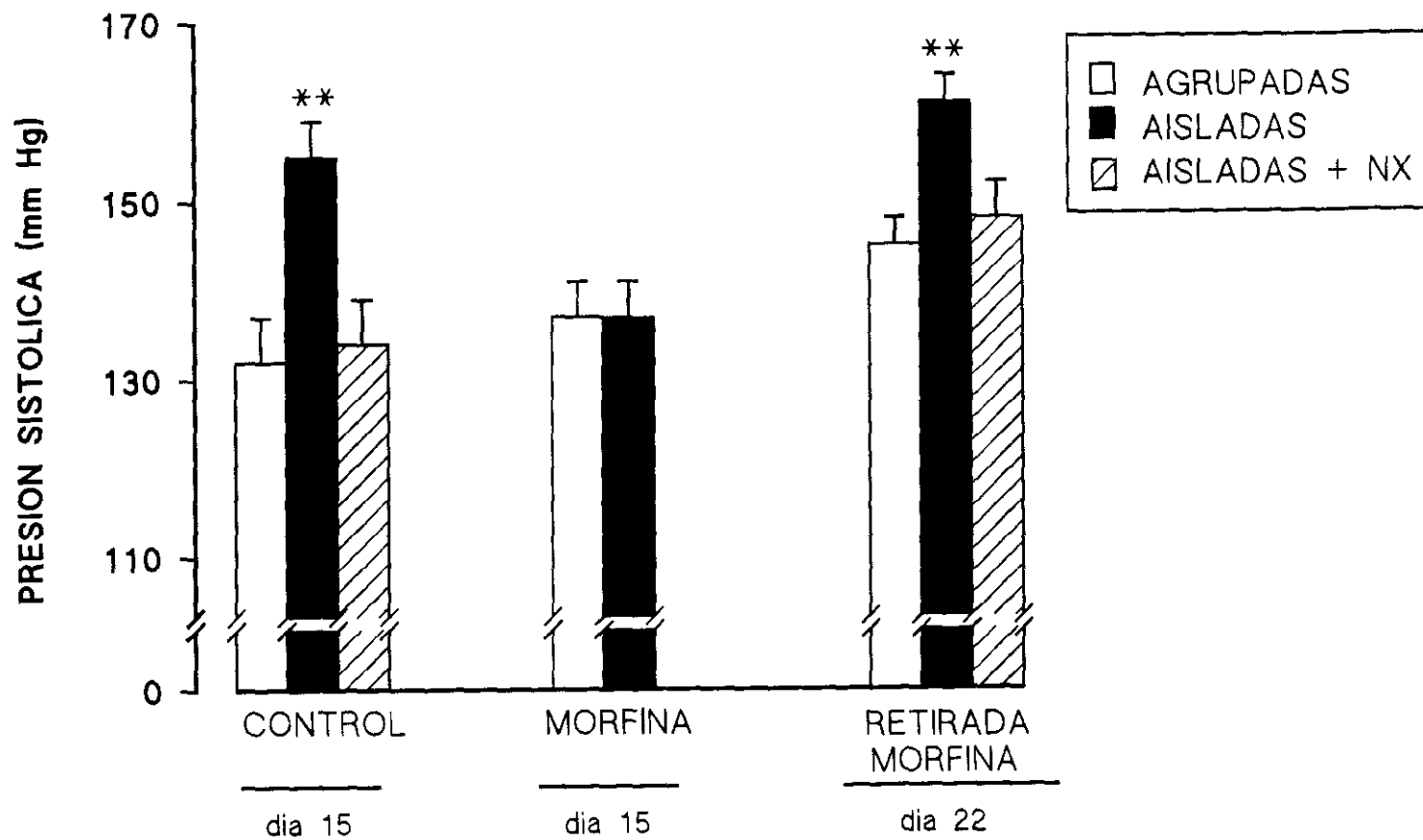


Fig.16.- Efecto de la naloxona sobre la elevación de presión arterial sistólica en ratas tratadas crónicamente con morfina, y sometidas a deprivación social.

Los valores de presión arterial sistólica en el día 15 se obtuvieron previamente a la inducción del síndrome de abstinencia. La naloxona (Nx) se administró a la dosis de 1 mg/kg i.p. Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.12. ** $p < 0.01$ respecto a los correspondientes animales agrupados (test de la t de Student).

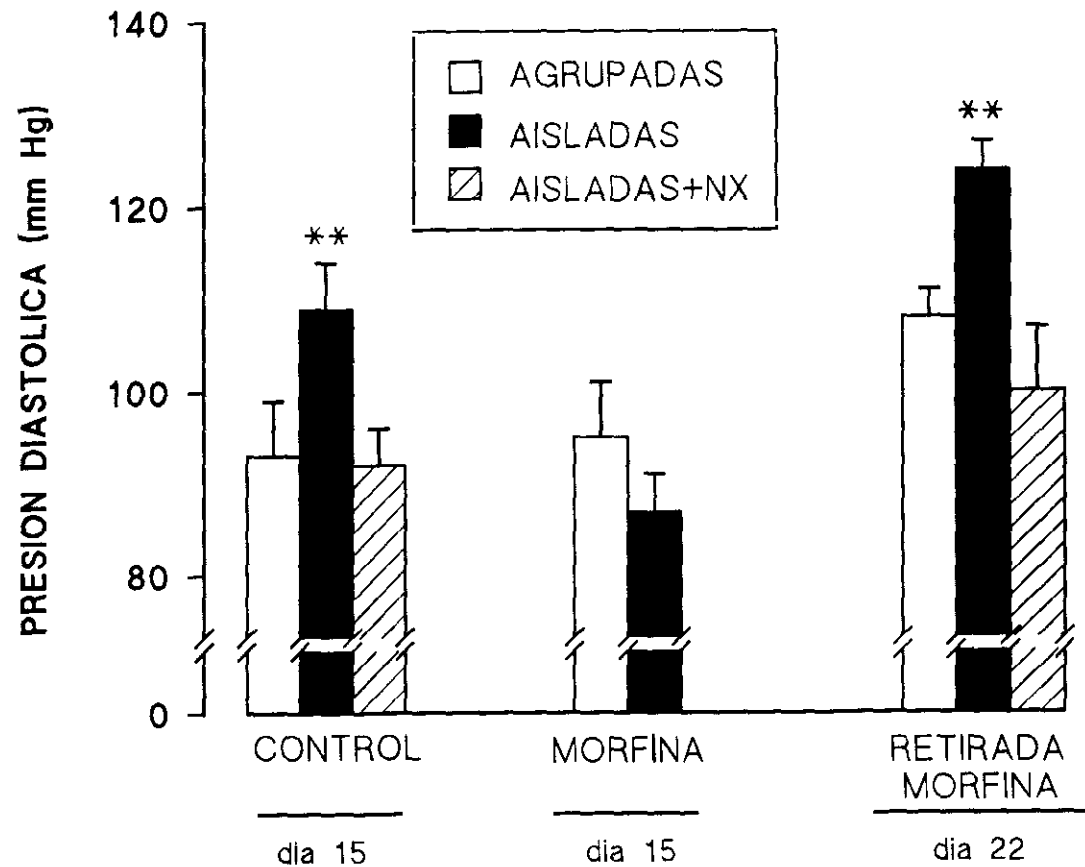


Fig.17.- Efecto de la naloxona sobre la elevación de presión arterial diastólica en ratas tratadas crónicamente con morfina y sometidas a deprivación social.

Los valores de presión arterial en el día 15 se obtuvieron previamente a la inducción del síndrome de abstinencia. Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.16. ** $p < 0.01$ respecto a los correspondientes animales agrupados (test de la t de Student).

mayor en días sucesivos en el caso de los animales aislados, mientras que para el caso de los animales agrupados se observaba un descenso, situándose entonces sus lecturas próximas a las de los animales agrupados en tratamiento constante con sacarosa. Como consecuencia, en el día 22 los animales aislados, superado el síndrome de abstinencia, y a los 7 días de reemplazar la morfina por una solución de sacarosa eran capaces de desarrollar la respuesta hipertensiva generada por la privación social (Fig.14 y 15).

Para poner de manifiesto el componente opioide de la hipertensión inducida por el aislamiento, tanto en el caso del grupo control tratado permanentemente con una solución de sacarosa, como en el del grupo de animales inicialmente dependientes de morfina y tras retirada de la misma, se procedió a la administración i.p de naloxona (1 mg/kg). La inyección del antagonista produjo, en ambos grupos, un bloqueo reversible de la hipertensión, hecho que se reflejó tanto en los valores de presión arterial sistólica (Fig.16) como en los de presión arterial diastólica (Fig.17).

1.6. Desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social en animales tratados crónicamente con naloxona

Para la realización de este experimento, se emplearon 4 grupos experimentales, constituidos todos ellos por animales a los que previamente se les había implantado una minibomba Alzet, cargada con salino (grupo control) o con el antagonista opioide naloxona. Durante los 14 días de tratamiento, la presión arterial sistólica (Fig.18) y diastólica (Fig.19) de los animales agrupados controles y de los animales agrupados tratados con naloxona permanecieron constantes (132-136 mm Hg y 105-110 mm Hg, respectivamente). Un tercer grupo de animales aislados controles, procesado de modo paralelo, presentaba un incremento considerable de los valores de presión arterial, alcanzando niveles estadísticamente significativos respecto a su grupo control de animales agrupados al cabo de dos semanas de ser sometidos a privación social. Sin embargo, en el grupo de ratas aisladas implantadas con una minibomba Alzet que liberaba naloxona, la presión arterial se elevó de manera mucho más lenta, no llegando en ningún momento a desarrollar la respuesta hipertensiva. En este mismo grupo, el cese de la actividad de la bomba tras dos semanas, se tradujo en un incremento lento y progresivo de la presión arterial sistólica y diastólica que, sin embargo, no llegó a ser significativo en el transcurso de la duración del experimento.

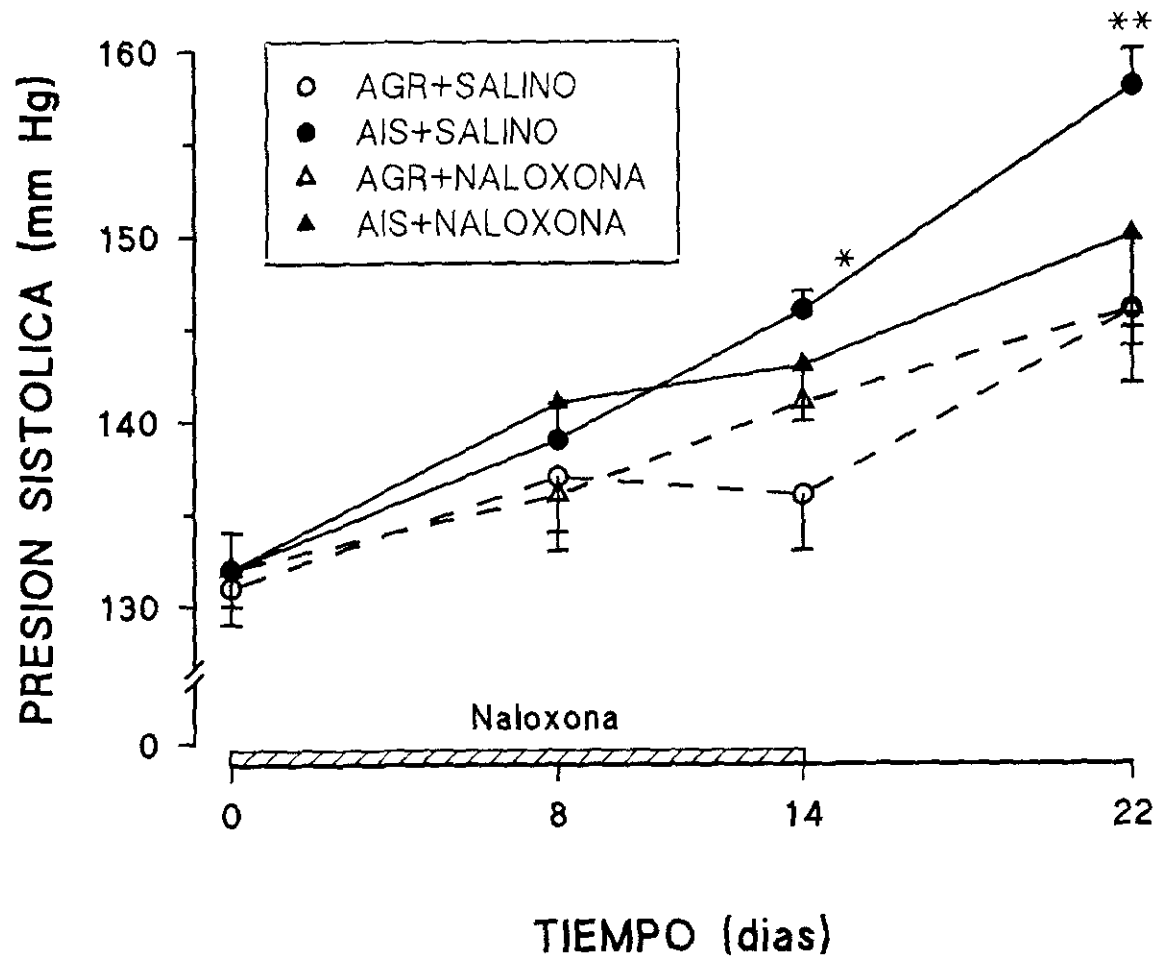


Fig.18.- Influencia del tratamiento crónico con naloxona sobre la elevación de la presión arterial sistólica en ratas sometidas a deprivación social.

Los animales (90 ± 10 g) se aislaron en el día 0, tras la medida basal de la presión arterial y la implantación subcutánea de una minibomba Alzet de infusión continua. La actividad de la bomba era de 14 días y contenía naloxona (100 mg/ml) o salino.

* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto a los correspondientes animales agrupados (test de la t de Student).

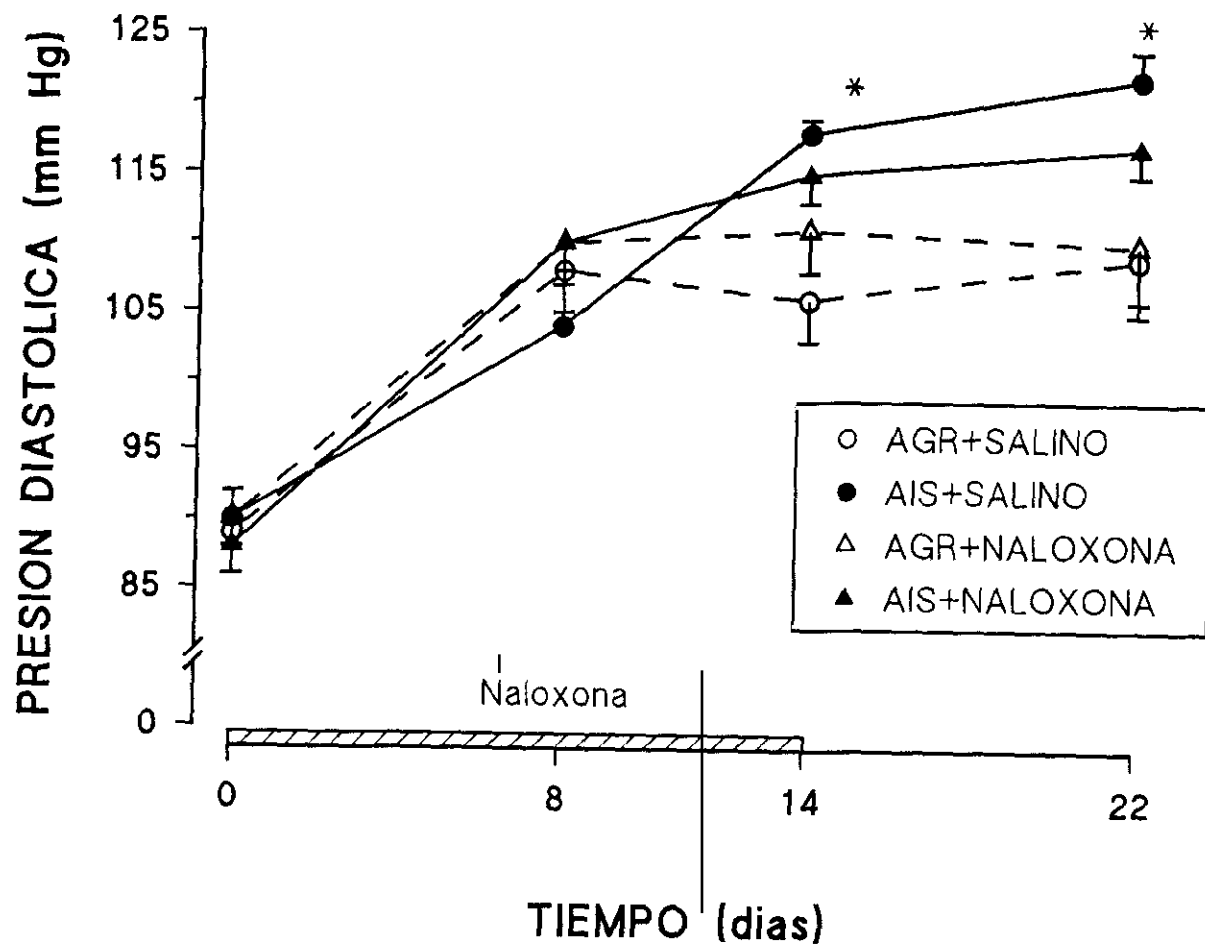


Fig.19.- Influencia del tratamiento crónico con naloxona sobre la elevación de presión arterial diastólica en ratas sometidas a privación social.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.18. * $p < 0.05$ respecto a los correspondientes animales agrupados (test de la t de Student).

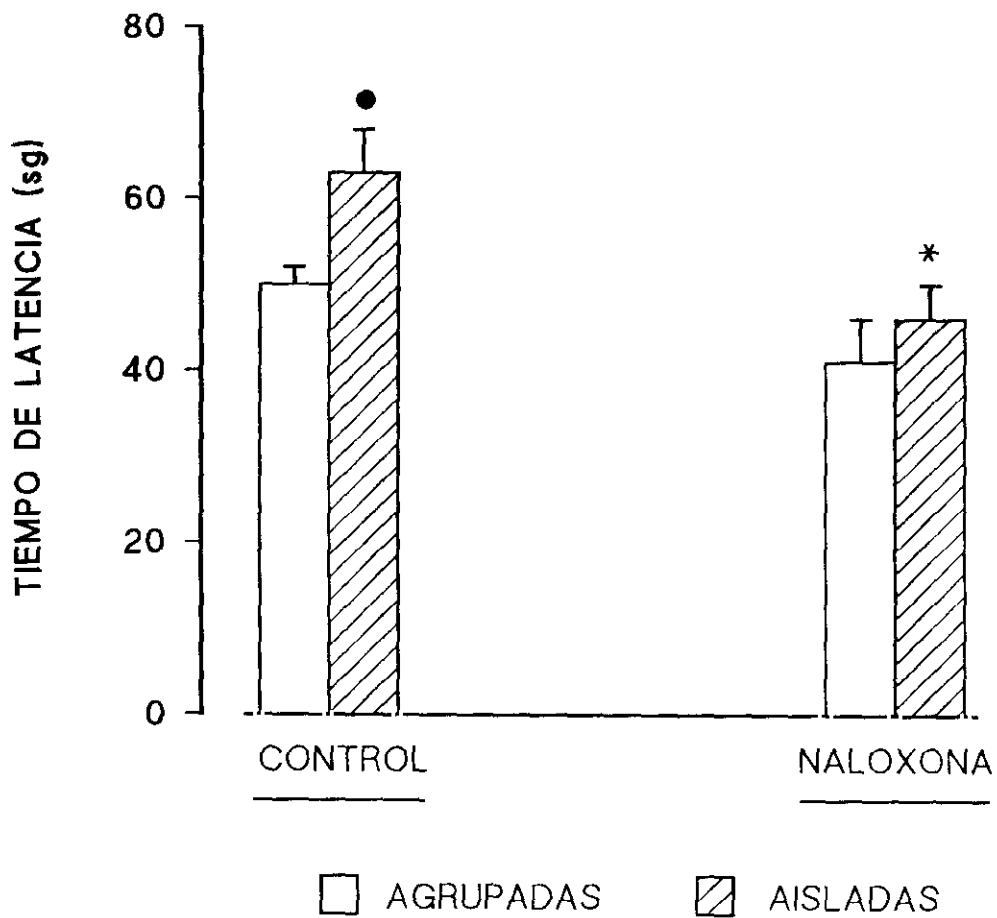


Fig.20.- Variación del umbral doloroso en ratas tratadas crónicamente con naloxona y sometidas a deprivación social.

La medida del umbral doloroso se realizó aplicando el test de analgesimetría de la placa caliente, anotando el tiempo que el animal tardaba en reaccionar a la aplicación del estímulo doloroso. El ensayo se efectuó en el día 14 del aislamiento. Para detalles metodológicos ver Fig. 18. * $p < 0.05$ respecto a las ratas aisladas controles, y ● $p < 0.05$ respecto a las ratas agrupadas controles (test de la t de Student).

El último día de funcionamiento de las bombas, cuando aún se desarrollaba normalmente la infusión continua del fármaco, se llevó a cabo el test de analgesimetría de la placa caliente en los 4 grupos experimentales, con objeto de determinar si la naloxona se liberaba adecuadamente desde el interior de las minibombas. Los resultados se recogen en la Fig.20. Los animales aislados tratados con naloxona presentaban un tiempo de latencia de respuesta a la aplicación del estímulo doloroso inferior al de los animales control igualmente aislados. La naloxona no produjo, sin embargo, efecto alguno sobre el umbral doloroso de los animales agrupados. Por otro lado, se pudo observar un aumento estadísticamente significativo del umbral de percepción nociceptivo de los animales aislados controles con respecto a las ratas agrupadas controles.

2. DETERMINACION DEL SUBTIPO DE RECEPTOR OPIOIDE IMPLICADO EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRES POR DEPRIVACION SOCIAL

2.1. Efectos de los antagonistas selectivos del receptor delta, ICI 174,864 e ICI 154,129.

Los antagonistas específicos del receptor delta, ICI 174,864 (15 nmol/rata) e ICI 154,129 (45 mg/kg) no modificaron los valores significativamente elevados de presión arterial en los animales aislados, cuando se administraron i.c.v. e i.v. respectivamente, y su efecto no difería del que se obtenía tras la administración de salino (Fig.21).

En el caso del tratamiento con ICI 174,864 se seleccionó la dosis de 15 nmol/rata i.c.v. por carecer de efectos neurotóxicos. Una dosis superior del antagonista (20 nmol/rata) se mostró igualmente inefectiva para revertir la repuesta hipertensiva y produjo, durante los 10 minutos posteriores a la inyección, alteraciones neurológicas severas, en todos los animales (5 de 5), que consistían en ataxia, parálisis de las extremidades y rotación a lo largo del eje longitudinal del tronco (movimiento en barril), efectos que habían sido descritos previamente por Long y cols. (1988) y que parecen ser consecuencia de acciones de tipo no opioide de estos péptidos.

Para los experimentos con ICI 154,129 se seleccionó la dosis de 15 mg/kg por vía i.v., de acuerdo con los trabajos previos de Holaday (1983).

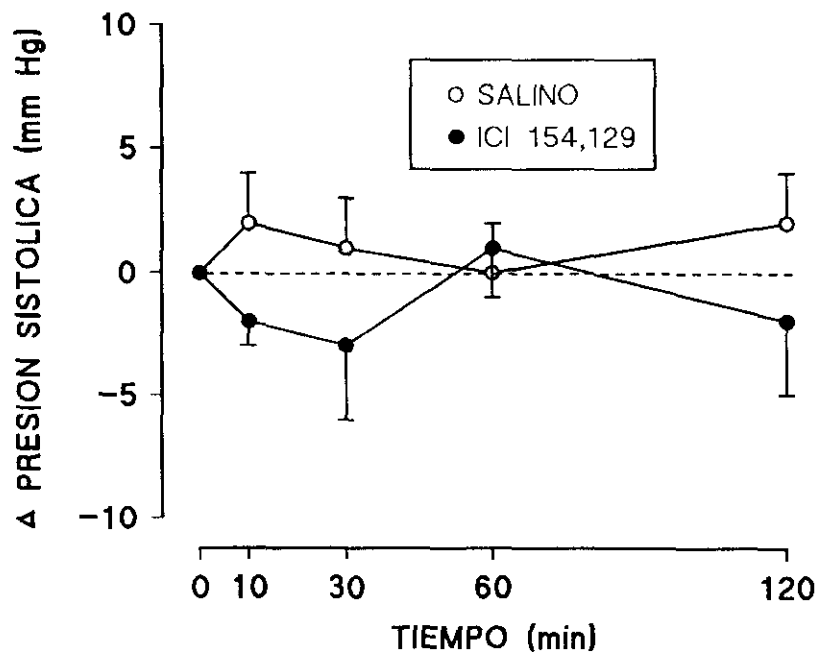
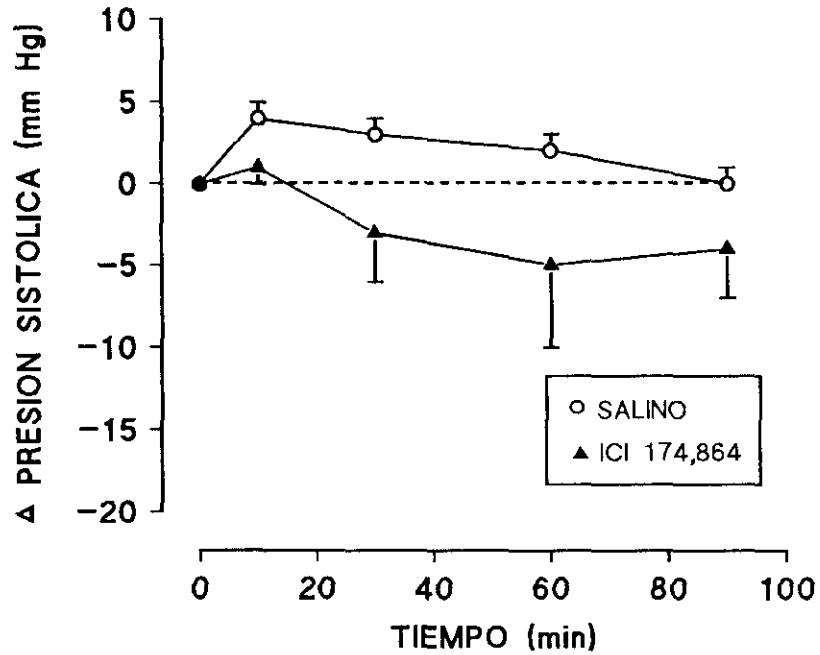


Fig.21.- Inefectividad de los antagonistas selectivos del receptor delta opioide ICI 174,864 e ICI 154,129 sobre la respuesta hipertensiva inducida por privación social.

Las medidas de presión arterial sistólica se efectuaron a distintos tiempos después de la administración i.c.v de ICI 174,864 (15 nmol/rata) -panel superior-, ICI 154,129 (45 mg/kg i.v.) -panel inferior- o salino en el grupo de animales aislados hipertensos. Valores de presión arterial sistólica previos al tratamiento: ICI 174,864, 159 ± 2 ; ICI 154,129, 160 ± 4 ; salino i.p 158 ± 4 , salino i.v., 161 ± 4 . Cada punto representa la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas tras la administración.

2.2. Efecto del antagonista selectivo del receptor mu, beta-funaltrexamina.

Con el fin de evaluar el efecto del antagonista selectivo del receptor mu, beta-funaltrexamina, sobre la respuesta hipertensiva inducida por privación social, los animales se trataron i.c.v. con una dosis de 20 nmol/rata del antagonista, o bien con un volumen similar de salino. La presión arterial y la frecuencia cardíaca se midieron hasta 48 horas después de la administración del fármaco. La dosis y los distintos tiempos para las medidas se seleccionaron tomando en consideración el hecho de que la beta-funaltrexamina posee propiedades agonistas del receptor kappa de modo agudo y durante las primeras horas siguientes a su administración, mientras que su comportamiento como antagonista irreversible del receptor mu, a la dosis ensayada (como demuestra su capacidad para bloquear la analgesia inducida por morfina), persiste al menos 24 horas (Takemori y cols. 1981).

Los datos obtenidos aparecen reflejados en la Fig.22. La respuesta hipertensiva de los animales aislados fue completamente antagonizada por la administración i.c.v. de la beta-funaltrexamina entre las 18 y las 24 horas de su administración, careciendo de efecto el tratamiento con salino. La inyección del antagonista no tuvo efecto sobre la frecuencia cardíaca en ninguno de los intervalos de tiempo a los que se efectuó la medida.

3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS CARDIOVASCULARES DE AGONISTAS SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DELTA Y MU OPIOIDES EN RATAS NORMOTENSAS

3.1. Efectos de la administración intracerebroventricular del agonista selectivo del receptor delta DADLE.

3.1.1. Efectos en animal consciente

El efecto sobre la presión arterial provocado por la administración i.c.v. del agonista selectivo del receptor delta, DADLE en ratas normotensas y en situación libre, se muestra en la Fig.23 (panel superior). En ella se observa claramente que la potencia de la acción hipertensora del péptido es dosis-dependiente en el rango ensayado (0.36-36 nmol/rata).

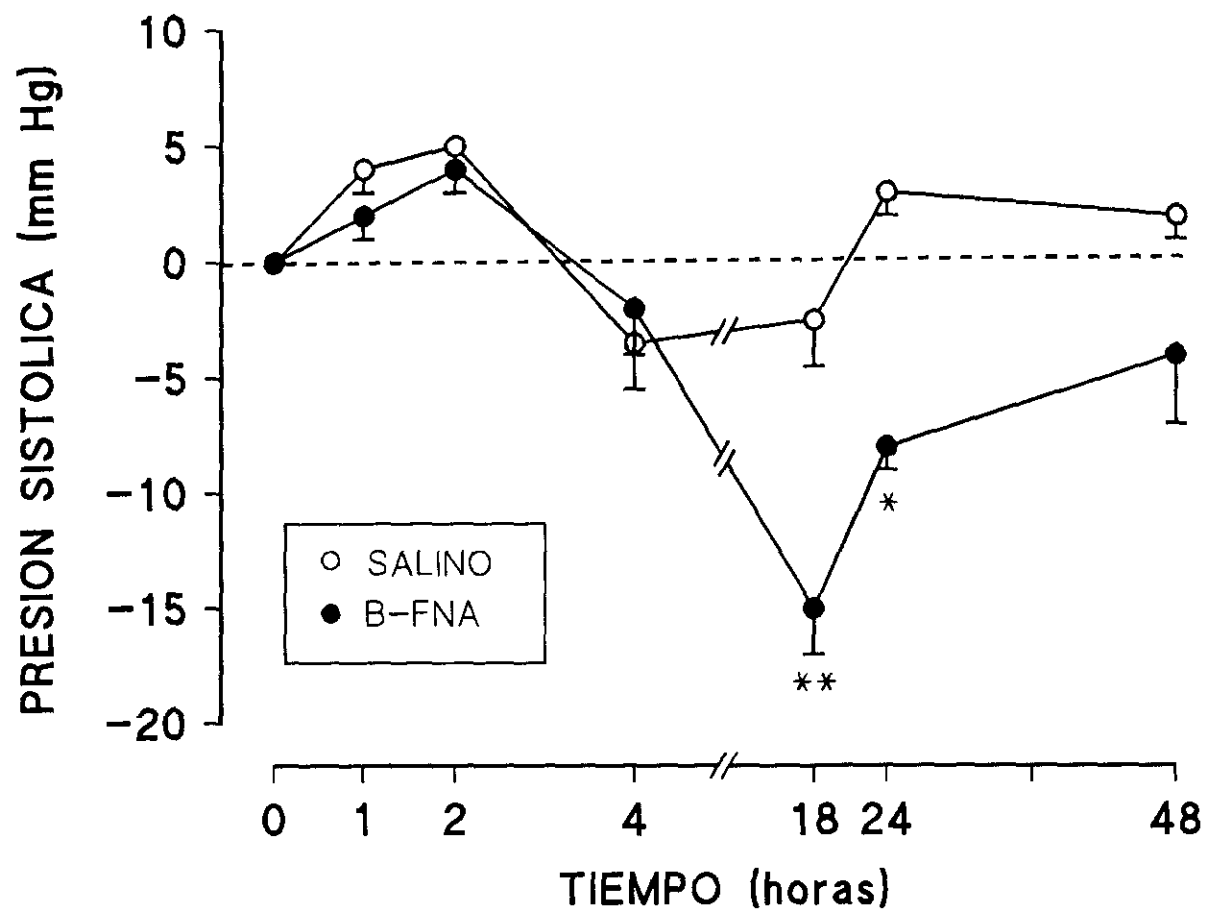


Fig.22.- Reversión de la respuesta hipertensiva inducida por privación social mediante la administración del antagonista selectivo del receptor mu opioide , beta-funaltrexamina.

Las medidas de presión arterial sistólica se efectuaron después de la administración i.c.v. de beta-funaltrexamina (20 nmol/rata) o salino en el grupo de animales aislados hipertensos. Valores de presión arterial sistólica previos al tratamiento: beta-FNA, 154 ± 2 ; salino, 155 ± 3 . Cada punto representa la media \pm E.S. de la diferencia entre los valores basales y las medidas tras la administración. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

Por otro lado, se analizaron los efectos comportamentales provocados por las distintas dosis de DADLE, con objeto de poder disociar las variaciones de presión arterial de las acciones inducidas por el péptido sobre la conducta. Aún cuando dosis superiores a 36 nmol/rata ocasionaban incrementos mayores de la presión arterial, éstas no se emplearon para la realización de los experimentos, dado que su administración tenía efectos catatónicos y producía rigidez muscular generalizada en todos los animales empleados para los ensayos. La catatonía era de aparición rápida (5 min) y se mantenía durante un periodo prolongado de tiempo (20-25 min). La dosis máxima empleada (36 nmol/rata) aun siendo mas baja que las dosis del agonista que presentaban efecto catatónico, produjo una suave sedación en los animales. La dosis inmediatamente inferior 18 nmol/rata se asoció frecuentemente (4 de 6 animales) con un ligero incremento de la actividad motora, que se acompañaba de un aumento del número de episodios de aseo y de la actividad exploratoria. Todos estos datos se tuvieron en consideración con objeto de eliminar aquellas respuestas cardiovasculares que estuvieran asociadas a un aumento excesivo de la actividad motora del animal. El resto de las dosis ensayadas no afectaron, aparentemente, a la conducta del animal.

En la Fig.24 se muestra el desarrollo en el tiempo de la respuesta presora del DADLE para la dosis de 36 nmol/rata. El aumento de presión arterial fue significativo entre los 5 y los 15 minutos de la administración, detectándose la máxima respuesta a los 10 minutos. Paralelamente al efecto presor, se producía una ligera bradicardia también dosis-dependiente (Tabla III), que, solamente para las dosis más altas (18 y 36 nmol/rata), fue significativa respecto a los valores de frecuencia cardíaca obtenidos para el grupo tratado con salino. La bradicardia comenzó a los 5 minutos de la administración del péptido y fue máxima a los 10 minutos. (Fig.25)

3.1.2. Efectos en animal anestesiado

En ratas anestesiadas con etiluretano, la administración i.c.v. de DADLE originó, de nuevo, un incremento dosis-dependiente de la presión arterial (Fig.23, panel inferior). El curso temporal de la respuesta presora fue análogo al observado cuando el péptido se administraba en el animal consciente, manifestando su efecto máximo a los 10 minutos de la inyección. En la Fig. 24 puede comprobarse este hecho, y se puede observar que la administración de una dosis de 36 nmol/rata produjo una elevación de la presión arterial que, para dosis similares, fue

significativamente superior en el animal anestesiado respecto al aumento de presión que se obtenía en el animal consciente.

Contrariamente a la bradicardia que producía el péptido en el animal consciente, el aumento de la presión arterial, en este caso, transcurría acompañado de una intensa taquicardia de carácter sostenido, que persistía incluso cuando el efecto presor del DADLE ya no era evidente y, del mismo modo, era dosis-dependiente (Tabla III).

3.1.3. Antagonismo por naloxona de los efectos cardiovasculares inducidos por la administración intracerebroventricular de DADLE

El estudio del antagonismo DADLE-naloxona se efectuó partiendo de una dosis i.c.v. del antagonista de 125 nmol/rata. Una dosis cuatro veces superior había sido utilizada previamente (Yukimura y cols. 1981b) para antagonizar los efectos cardiovasculares del también análogo sintético de met-enkefalina DAME (D-Ala² metionina enkefalina). La administración de 125 nmol/rata de naloxona en nuestro ensayo se manifestó, sin embargo, neurotóxica, puesto que provocaba en la rata una potente excitación psicomotora, caracterizada por sacudidas constantes, aumento de la agresividad y movimientos circulares estereotipados, por lo que esta dosis fue rechazada para el estudio.

En ensayos posteriores se empleó una dosis de 20 nmol/rata que carecía "per se" de efectos cardiovasculares y comportamentales y que se mostró como la mínima dosis capaz de impedir el aumento de la presión arterial (Fig.26) y la ligera bradicardia (Fig.27) ocasionada por la administración i.c.v. de 36 nmol/rata de DADLE. El antagonista se inyectó en el animal consciente por la misma vía y 5 minutos antes del péptido.

Siguiendo el mismo esquema de administración, se puso de manifiesto que el pretratamiento con naloxona antagonizaba el aumento de presión y la taquicardia que producía la administración de 36 nmol/rata de DADLE en el animal anestesiado. En este caso, sin embargo, fue necesario aumentar la dosis de naloxona hasta 40 nmol/rata para obtener un bloqueo completo de ambos efectos.

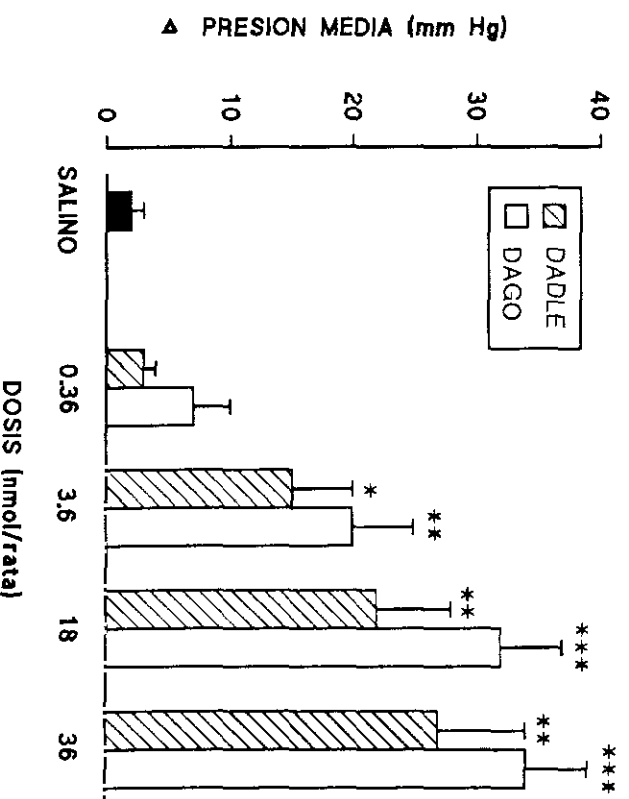
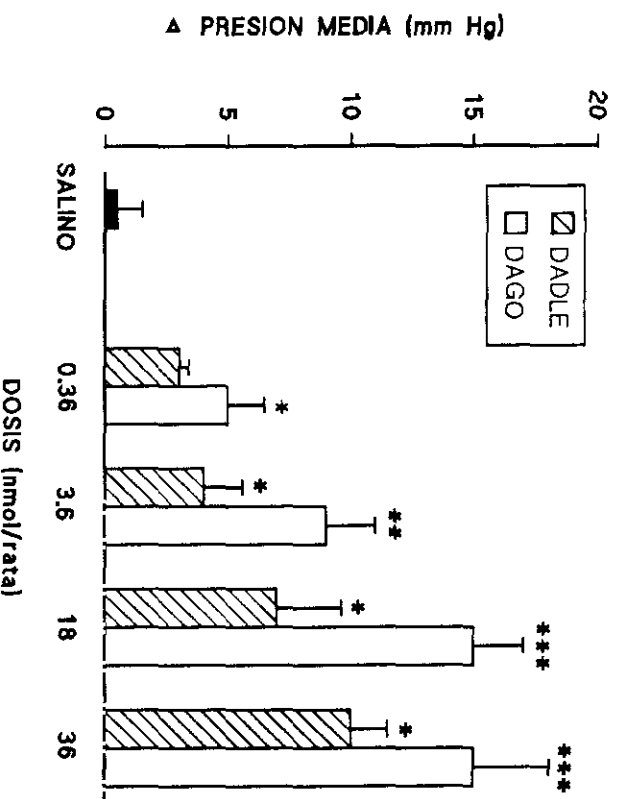


Fig. 23.- Relación dosis-efecto para los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE Y DAGO, sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en rata consciente (canulada en la aorta abdominal) y en situación libre o en rata anestesiada (canulada en la carótida).

Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas (método directo) a los 10 minutos de la administración i.c.v. de ambos péptidos o de salino. Panel superior (conscientes), panel inferior (anestesiadas). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

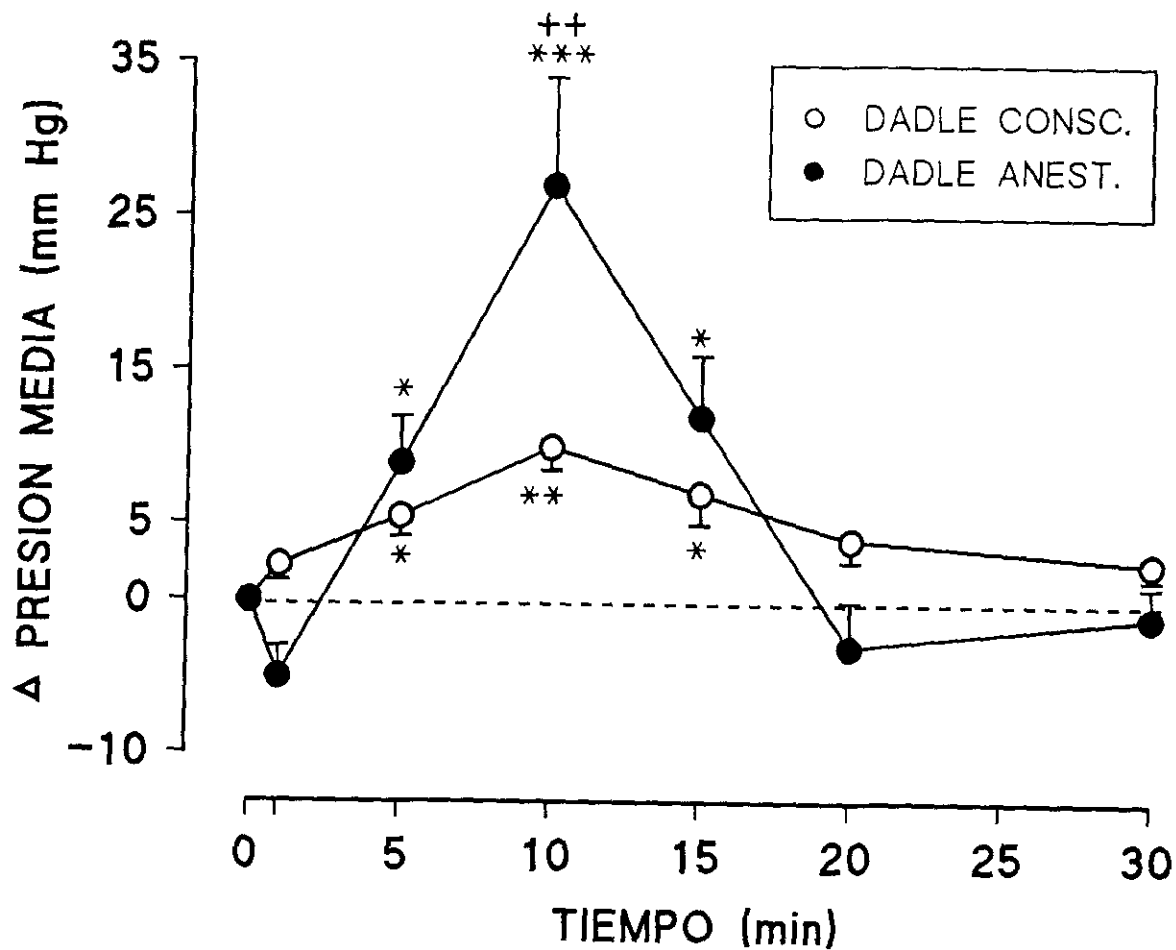


Fig.24.- Efecto de la anestesia sobre la acción presora del agonista delta opioide DADLE.

Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas de presión arterial (método directo) después de la administración i.c.v. de DADLE (36 nmol/rata) en el animal consciente o anestesiado con etiluretano. Valores de presión arterial previos al tratamiento: conscientes, 104 ± 6 ; anestesiadas, 89 ± 5 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto a los valores basales y ++ $p < 0.01$ respecto al efecto en rata consciente (test de la t de Student).

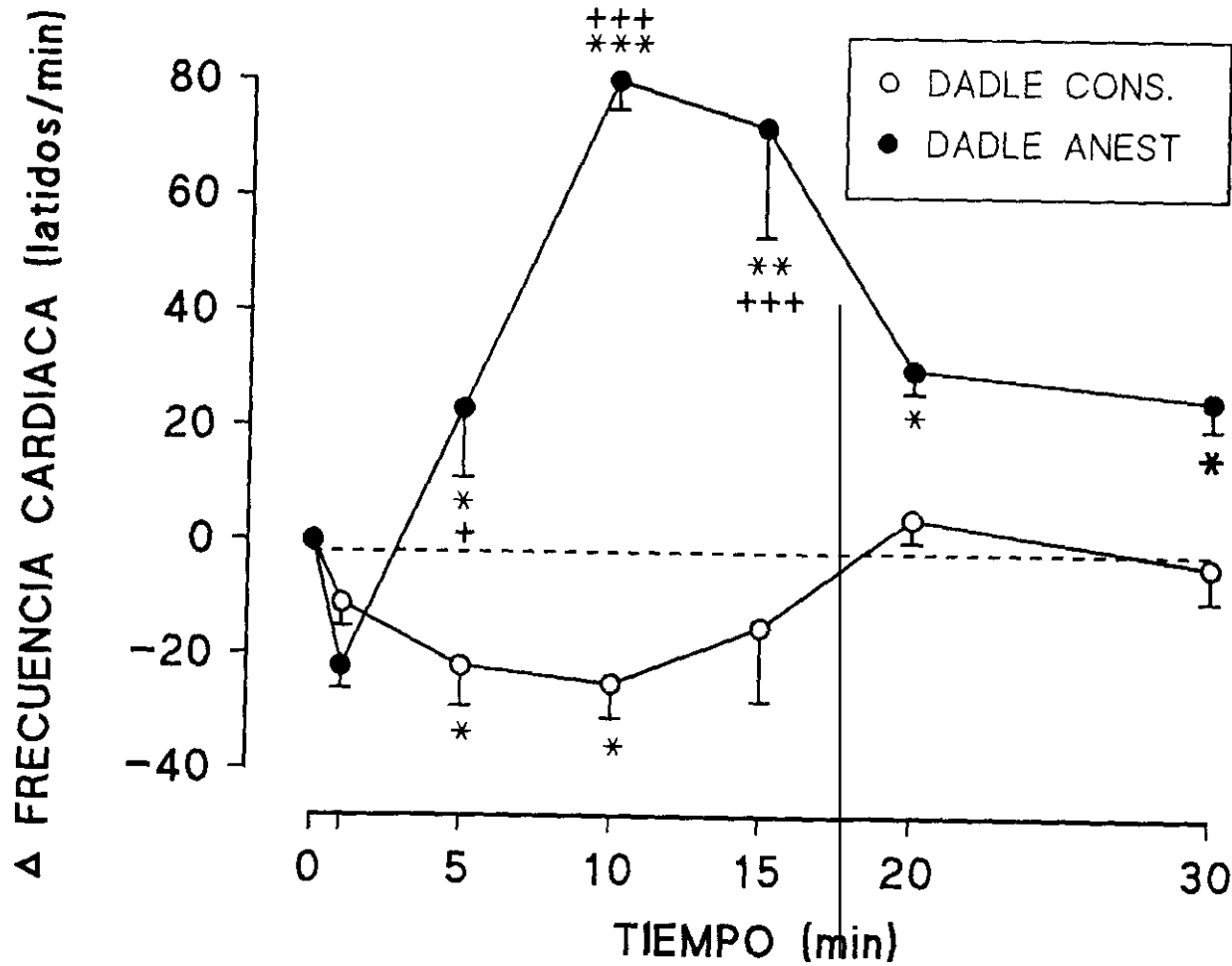


Fig.25.- Efecto de la anestesia sobre la disminución de la frecuencia cardíaca inducida por el agonista delta opioide DADLE.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig. 24. Valores de frecuencia cardíaca previos al tratamiento: conscientes, 390 ± 10 ; anestesiadas, 410 ± 9 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a los valores basales, y + $p < 0.05$ y +++ $p < 0.001$ respecto al efecto en el animal consciente (test de la t de Student).

TABLA III.- Efecto sobre la frecuencia cardíaca de los agonistas de los receptores mu y delta opioides, DAGO y DADLE.

		<u>Frecuencia cardíaca (latidos/min)</u>				
		(nmol/rata)	0.36	3.60	18.00	36.00
<u>DADLE</u>	ANEST.		12±5	70±15**	78±14***	80±8***
	CONSC.		-6±3	-8±5	-30±6**	40±8**
<u>DAGO</u>	ANEST.		-10±4*	-20±6**	-84±12***	-95±15***
	CONSC.		-8±3	-15±4	-58±7***	-65±8***
<u>SALINO</u>	ANEST.		4±3			
	CONSC.		-4±3			

Los datos representan la media ± E.S. de las diferencias entre los valores basales y la medida de la frecuencia cardíaca a los 10 minutos de la administración i.c.v. de DADLE (36 nmol/rata), DAGO (18 nmol/rata) o salino. * p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001 respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

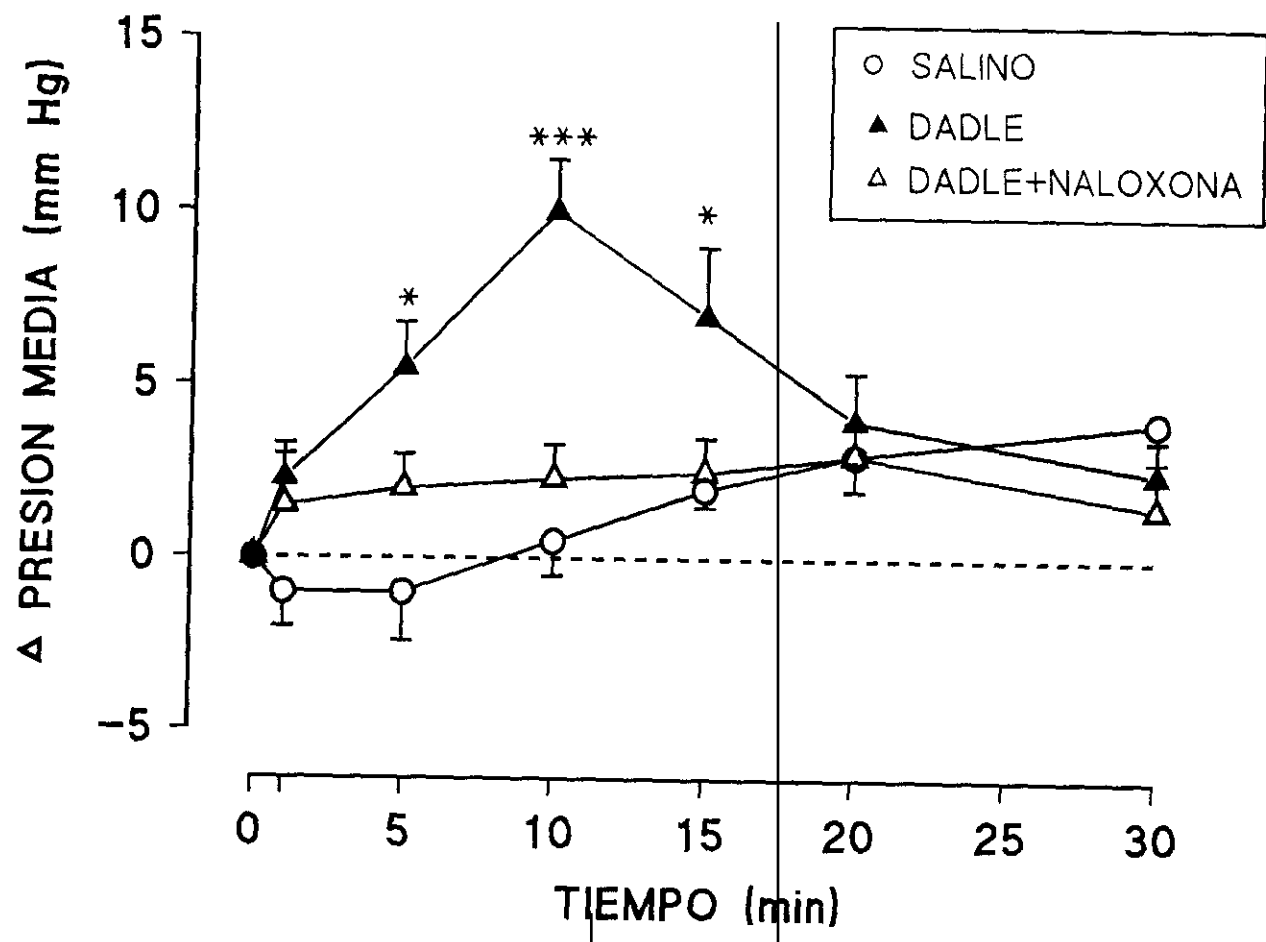


Fig.26.- Relación tiempo-respuesta para el efecto presor del agonista delta DADLE, y su antagonismo por naloxona, en rata canulada en la aorta abdominal, consciente y en situación libre.

La naloxona (20 nmol/rata, i.c.v) se administró 5 minutos antes de la inyección i.c.v de DADLE (36 nmol/rata). Valores de presión arterial previos al tratamiento: salino, 98 ± 4 ; DADLE, 104 ± 6 ; DADLE+naloxona, 99 ± 5 . Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas (método directo) después la administración. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

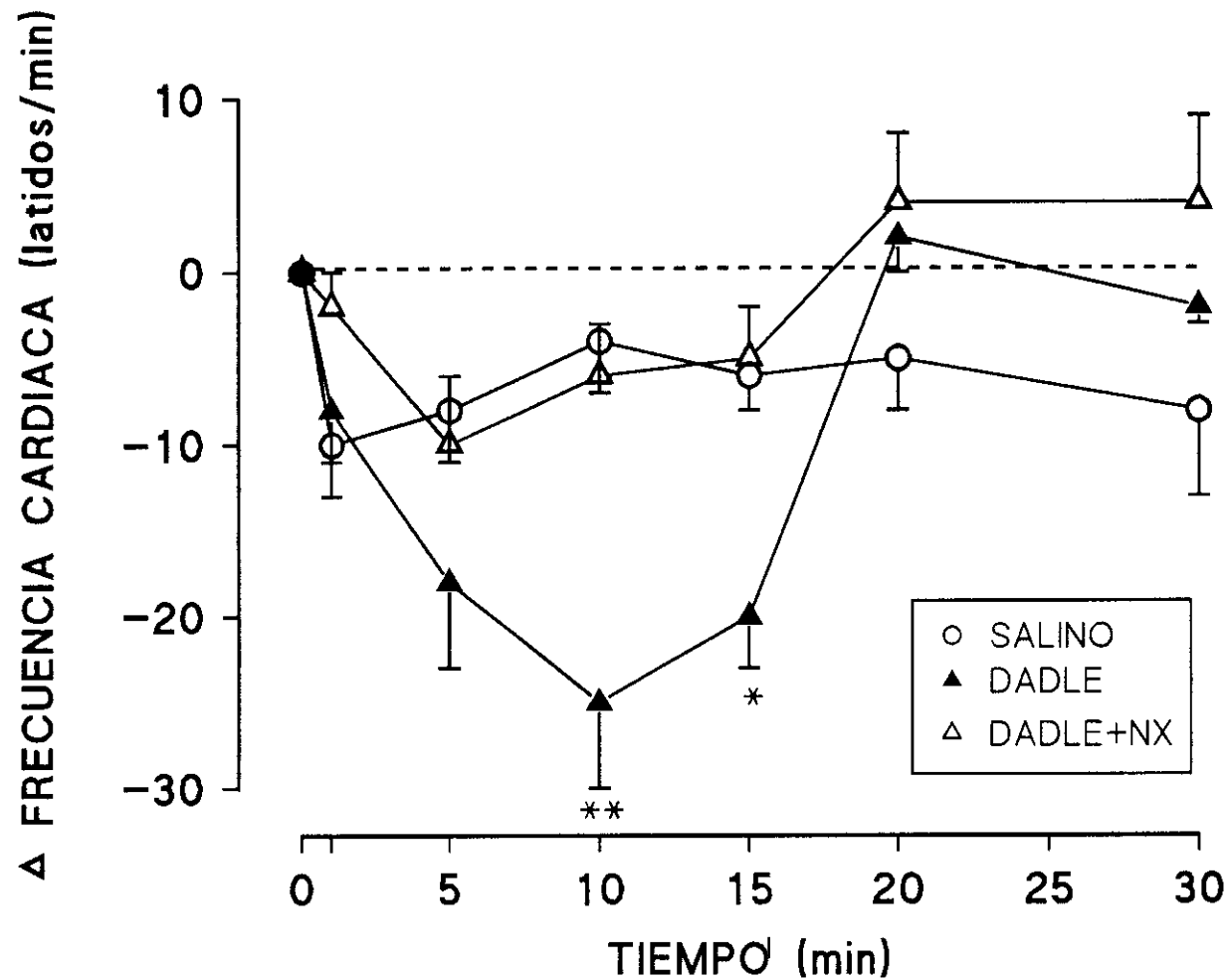


Fig.27.- Relación tiempo-respuesta para el efecto sobre la frecuencia cardíaca del agonista delta opioide DADLE, y su antagonismo por naloxona, en rata canulada en la aorta abdominal, consciente y en estado libre.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.26. Valores de frecuencia cardíaca previos al tratamiento: salino, 403 ± 12 ; DADLE, 390 ± 10 ; DADLE+naloxona, 407 ± 10 . * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

3.2. Efectos de la administración intracerebroventricular del agonista selectivo del receptor μ , DAGO.

3.2.1. Efectos en animal consciente

En rata consciente, la administración i.c.v. del agonista selectivo del receptor delta DAGO produjo un incremento dosis-dependiente de la presión arterial (Fig.23, panel superior), así como una intensa disminución del ritmo cardíaco (Tabla III). La máxima respuesta presora se obtuvo cuando se inyectaron 18 nmol/rata. Como se puede observar, el empleo de una dosis superior (36 nmol/rata) no aumentó la acción presora del péptido. Para dosis equimoleculares, el efecto del DAGO sobre ambos parámetros cardiovasculares fue aproximadamente 2 veces superior al que se obtuvo tras la inyección del agonista delta DADLE (Fig.23).

En las Figs. 28 y 29 se muestra la evolución en el tiempo de la presión arterial y la frecuencia cardíaca para la dosis de 18 nmol/rata. El aumento, estadísticamente significativo, de la presión arterial se manifestó entre los 5 y los 20 minutos de la administración, alcanzándose la respuesta máxima a los 10 minutos. La disminución de la frecuencia cardíaca presentaba un patrón temporal de respuesta similar, si bien la bradicardia, que se iniciaba rápidamente (1 minuto), persistía a los 30 minutos, cuando la acción presora del DAGO ya había desaparecido.

Los efectos comportamentales inducidos por el DAGO fueron muy discretos, y solamente las dos dosis superiores ensayadas produjeron una leve sedación en los animales.

3.2.2. Efectos en animal anestesiado

De modo análogo a las respuestas obtenidas en el caso del DADLE, la anestesia con etiluretano potenció el efecto presor del agonista μ , DAGO (Fig.23, panel inferior). El aumento de la presión arterial ocasionado por la dosis de 18 nmol/rata entre los 10 y los 15 minutos, en el animal anestesiado, fue significativamente superior respecto al incremento que se obtenía cuando la misma dosis se inyectó en el ventrículo lateral cerebral del animal consciente (Fig.28). La disminución de la frecuencia cardíaca, por su parte, fue también manifiesta inmediatamente después de la inyección (1 minuto) y se mantuvo hasta la finalización del experimento en valores inferiores a los que se habían observado

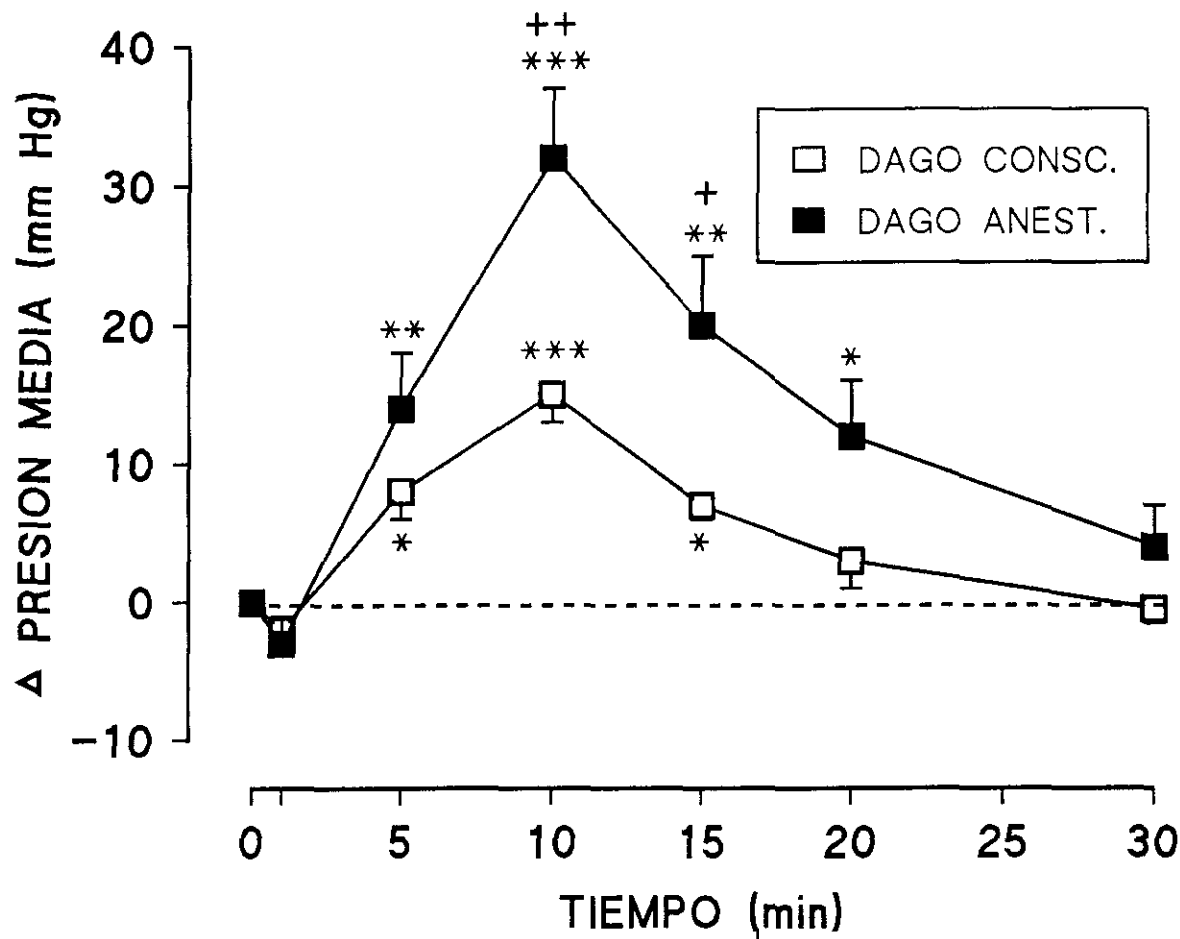


Fig.28.- Efecto de la anestesia sobre la acción presora del agonista mu opioide DAGO.

Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas de presión arterial (método directo) después de la administración i.c.v. de DAGO (18 nmol/rata) en el animal consciente o anestesiado con etiluretano. Valores de presión arterial previos al tratamiento: conscientes, 99 ± 6 ; anestesiadas, 82 ± 4 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a los valores basales y + $p < 0.05$ y ++ $p < 0.01$ respecto al efecto en animal consciente (test de la t de Student).

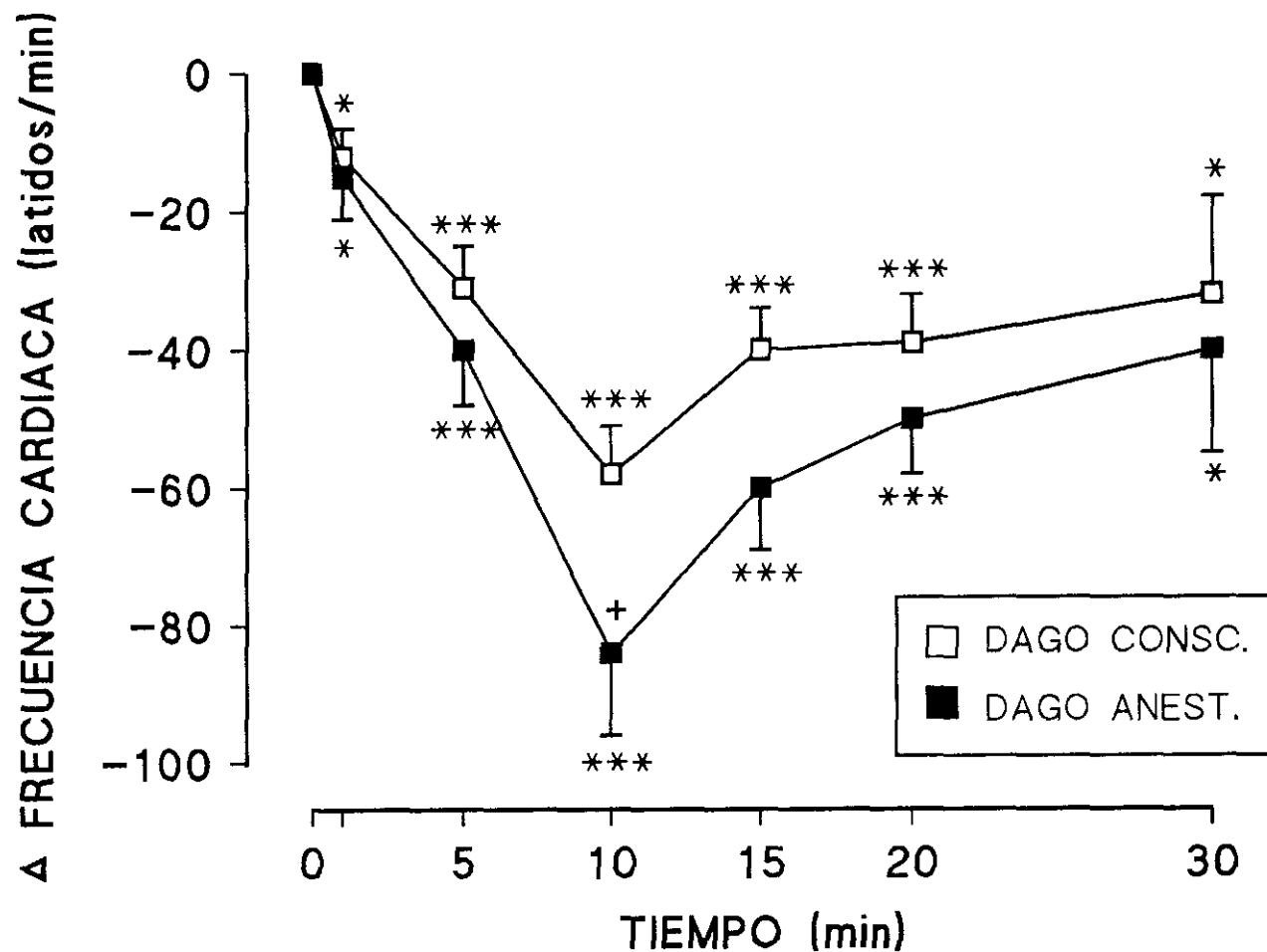


Fig.29.- Efecto de la anestesia sobre la disminución de la frecuencia cardíaca inducida por el agonista mu opioide DAGO.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig. 28. Valores de frecuencia cardíaca previos al tratamiento: conscientes, 372 ± 10 ; anestesiadas, 400 ± 12 . * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ respecto a los valores basales y + $p < 0.05$ respecto al efecto en animal consciente (test de la t de Student).

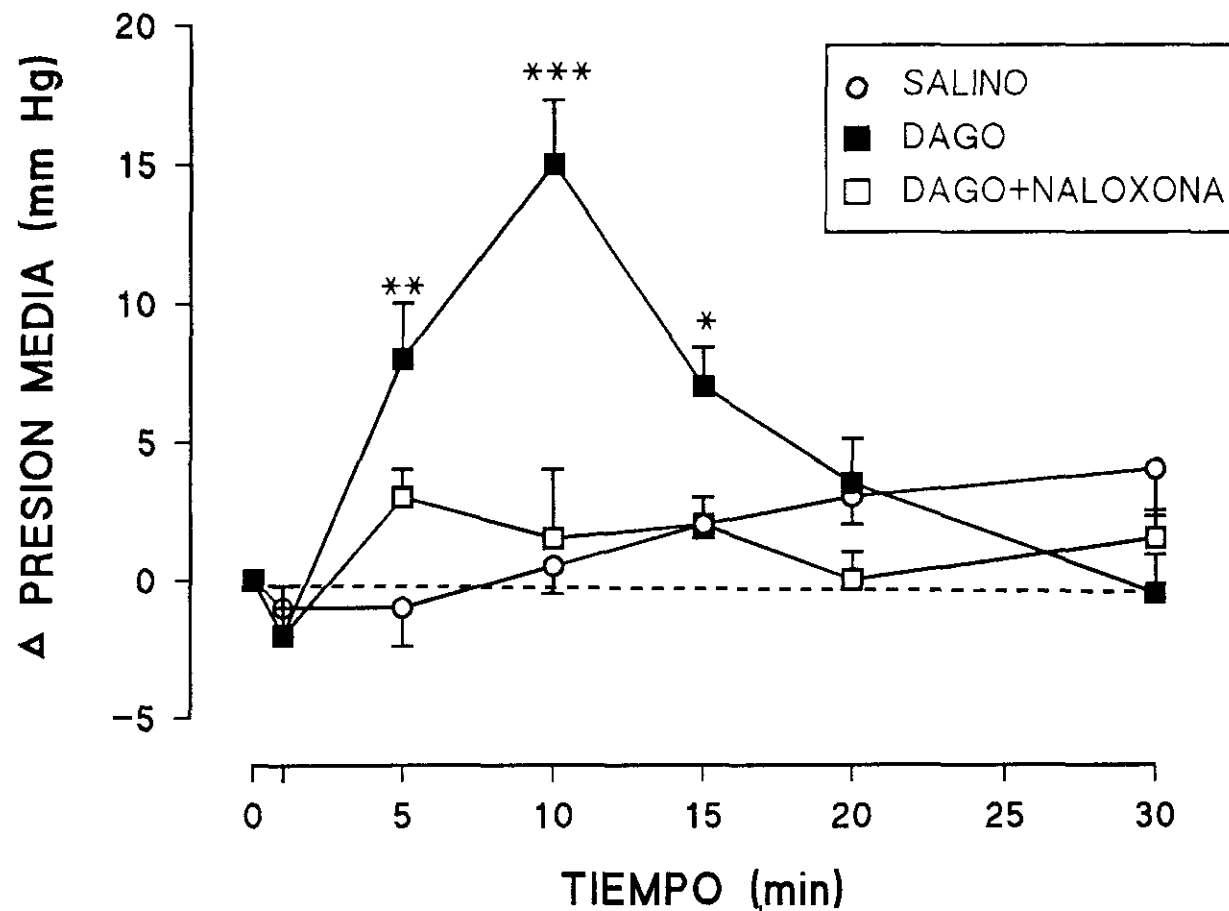


Fig.30.- Relación tiempo-respuesta para el efecto presor del agonista mu-opioide DAGO y su antagonismo por naloxona, en rata canulada en la aorta abdominal, consciente y en estado libre.

La naloxona (20 nmol/rata, i.c.v) se administró 5 minutos antes de la inyección i.c.v de DAGO (18 nmol/rata). Valores de presión arterial previos al tratamiento: salino, 96 ± 5 ; DAGO, 99 ± 6 ; DADLE+naloxona, 103 ± 4 . Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas (método directo) después la administración.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

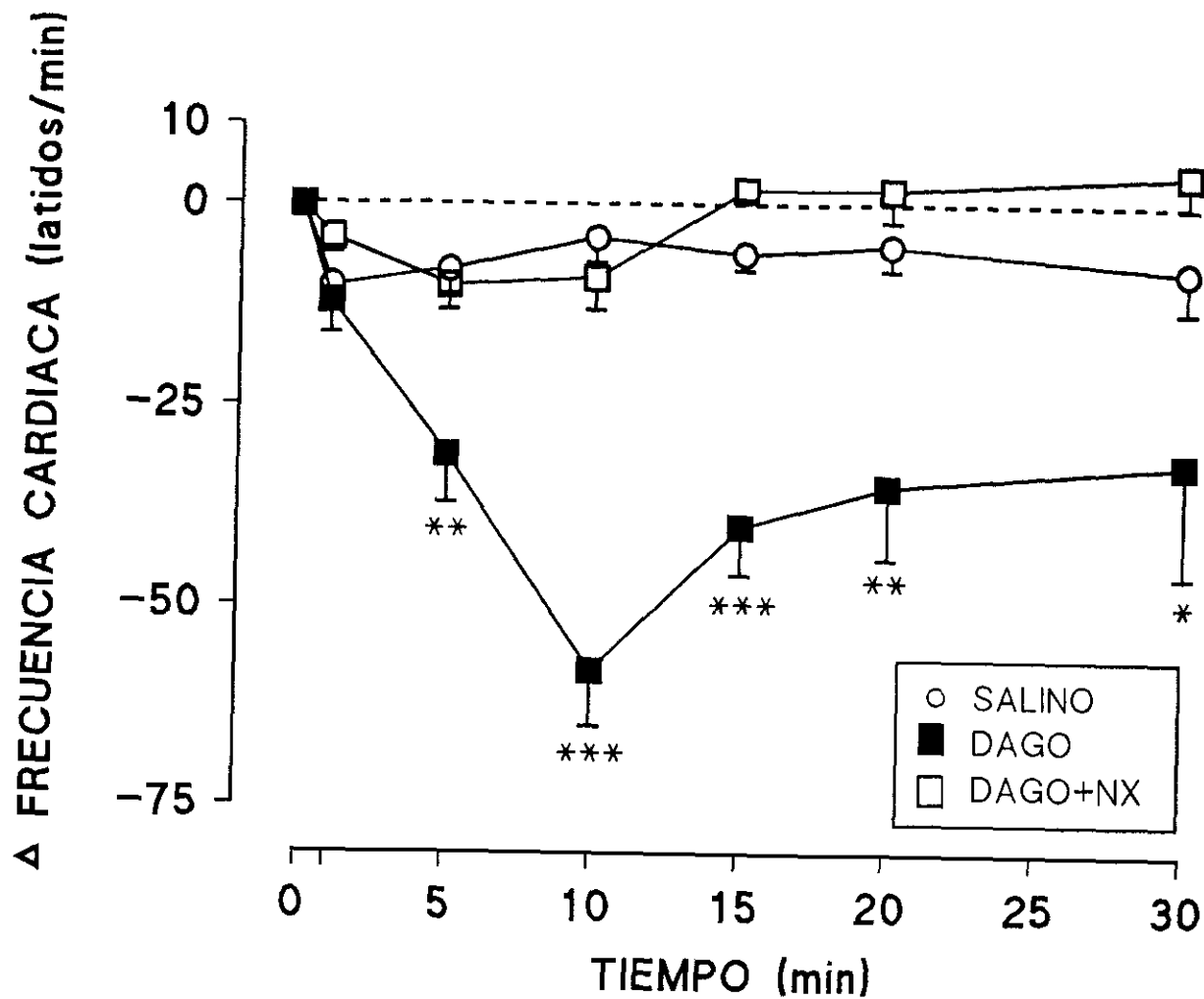


Fig.31.- Relación tiempo-respuesta para el efecto sobre la frecuencia cardíaca del agonista mu opioide DAGO, y su antagonismo por naloxona, en rata canulada en la aorta abdominal, consciente y en estado libre.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.30. Valores de F.C. previos al tratamiento: salino, 385 ± 9 ; DAGO, 372 ± 10 ; DAGO+naloxona, 390 ± 8 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

para el animal consciente (Fig.29). La respuesta máxima, tanto para la presión arterial, como para la frecuencia cardíaca, se detectó a los 10 minutos de la administración. El efecto dosis-dependiente del agonista μ sobre la frecuencia cardíaca se muestra en la Tabla III.

3.2.3. Antagonismo por naloxona de los efectos cardiovasculares inducidos por administración intracerebroventricular de DAGO

El pretratamiento con naloxona (20 nmol/rata, i.c.v.), 5 minutos antes de la inyección de DAGO (18 nmol/rata), bloqueó completamente el efecto hipertensor y la bradicardia inducidos por el agonista opiáceo en el animal consciente (Figs. 30 y 31). En el animal anestesiado, como en el caso del DADLE, fue necesario aumentar la dosis del antagonista hasta 40 nmol/rata para obtener una reversión completa de ambos efectos.

3.3. Efecto de la anestesia con etiluretano sobre la fijación de ^3H -etorfina a receptores opioides en bulbo raquídeo e hipotálamo.

A la vista de la potenciación de los efectos cardiovasculares que se producían cuando los agonistas DADLE y DAGO se administraban i.c.v. en el animal anestesiado con etiluretano, y para examinar la hipótesis de una eventual variación en los receptores inducida por el anestésico, se procedió a realizar un ensayo de fijación de ^3H -etorfina al receptor opioide en bulbo raquídeo e hipotálamo. Ambas estructuras se seleccionaron por constituir los dos centros más relevantes en el control cardiovascular.

Para la realización de esta experiencia se utilizaron dos grupos de ratas, el primero de los cuales se anestesió con etiluretano (1.2 mg/kg i.p.), sacrificando a los animales por decapitación a los 30 minutos de la administración del anestésico. El segundo grupo estaba formado por animales que recibieron una inyección i.p. de salino.

Los resultados obtenidos para bulbo raquídeo e hipotálamo, se muestran en las Fig.32 y 33 respectivamente, en las cuales se representa la fijación específica (BE) frente al cociente fijación específica/fijación total (BE/DL) para diferentes concentraciones de etorfina (0.25, 0.5, 1, 2 y 4 nM) (representación de Scatchard). En ambos casos se observa cómo la anestesia con etiluretano no modificó significativamente el número de lugares de unión de la etorfina marcada ni en

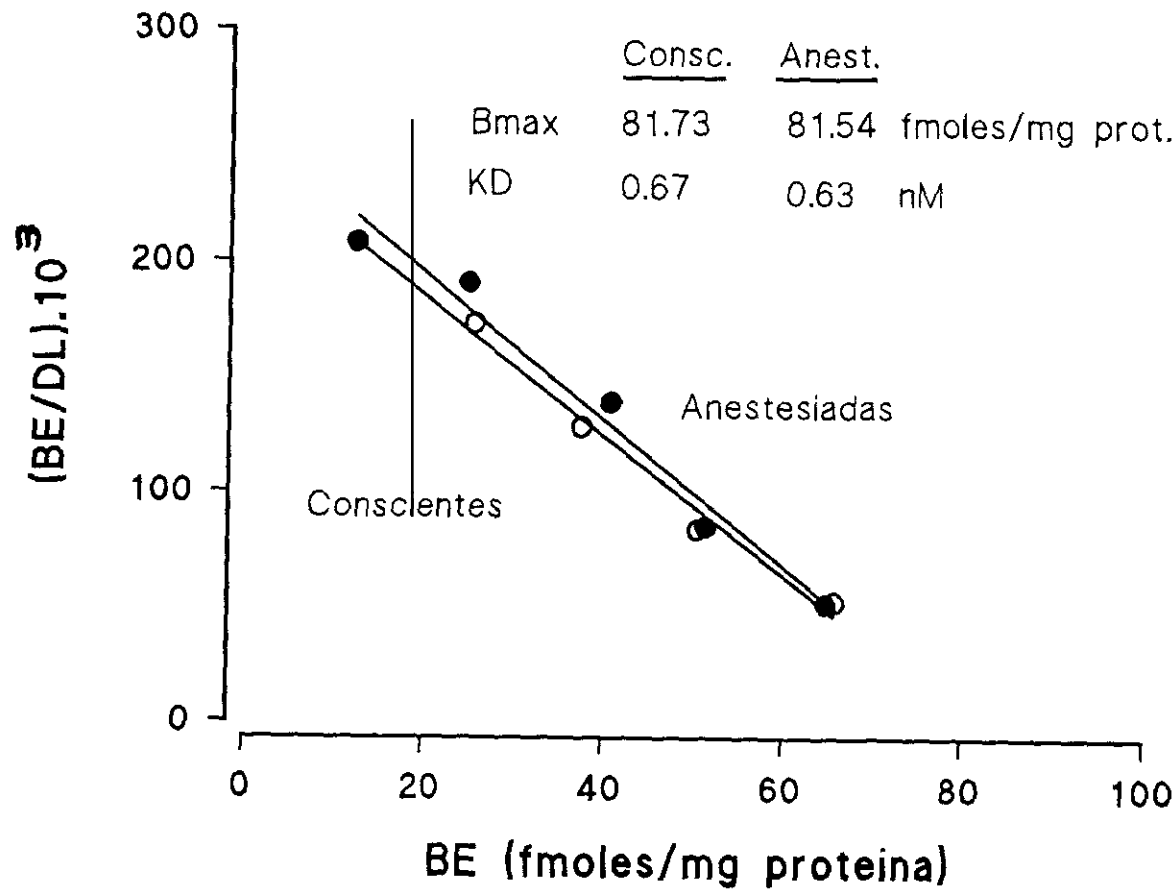


Fig.32.- Efecto de la anestesia con etiluretano sobre la fijacion de ^3H -etorfin en homogenizados de tejido procedentes de bulbo raquídeo de rata.

El etiluretano (1.2 mg/kg, i.p.) se administro 30 minutos antes de proceder al sacrificio de los animales. El grupo de animales conscientes recibió una inyección i.p. de salino.

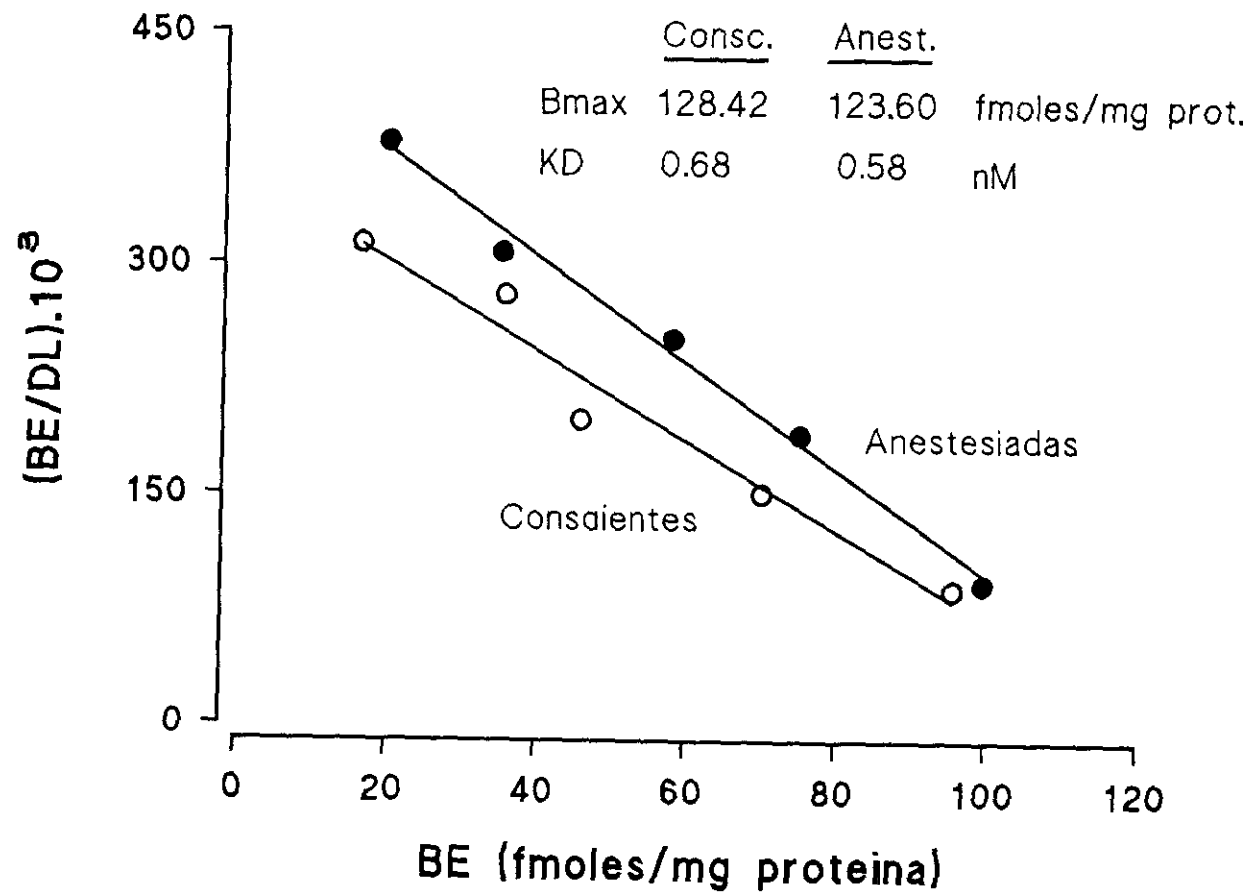


Fig.33.- Efecto de la anestesia con etiluretano sobre la fijación de ³H-etorfin a en homogeneizados de tejido procedentes de hipotálamo de rata.

Para detalles metodológicos precisos, ver Fig.32.

bulbo raquídeo ni en hipotálamo. Esta ausencia de efecto se traduce en unos valores de B_{max} similares para ambos grupos de animales. La afinidad del ligando por el receptor, representada por el valor de la KD , tampoco fue alterada por acción del anestésico en ninguna de las dos estructuras cerebrales examinadas.

3.4. Efecto de la administración intravenosa de DADLE y DAGO en rata anestesiada

La dosis de 18 nmol/rata de DADLE y DAGO ensayada previamente por vía i.c.v. se administró también periféricamente por vía i.v. para comprobar la acción diferencial de las distintas vías de administración. En la Fig.34 se muestra el efecto de ambos péptidos sobre la presión arterial (panel superior) y la frecuencia cardíaca (panel inferior) a la dosis mencionada cuando se administró en el animal anestesiado.

Ambos agonistas produjeron una disminución significativa de la presión arterial, disminución que transcurría de modo simultáneo con una ligera bradicardia. El efecto depresor fue inmediato y de carácter muy fugaz, comenzando a manifestarse a los 30 segundos de la administración y desapareciendo rápidamente (5 minutos). Este carácter lábil de la respuesta también se observó para el caso del efecto de ambos péptidos sobre la frecuencia cardíaca. La acción bradicardizante de los mismos tenía una cinética similar, con un pico de respuesta máximo a los 90 segundos de la administración y desaparición del efecto a los 4 minutos.

En esta ocasión el agonista mu DAGO se mostró sólo ligeramente más efectivo que el agonista del receptor delta DADLE para alterar ambos parámetros.

En todos los casos, los efectos fueron bloqueados por la administración previa de naloxona por vía intravenosa (0.1 mg/kg).

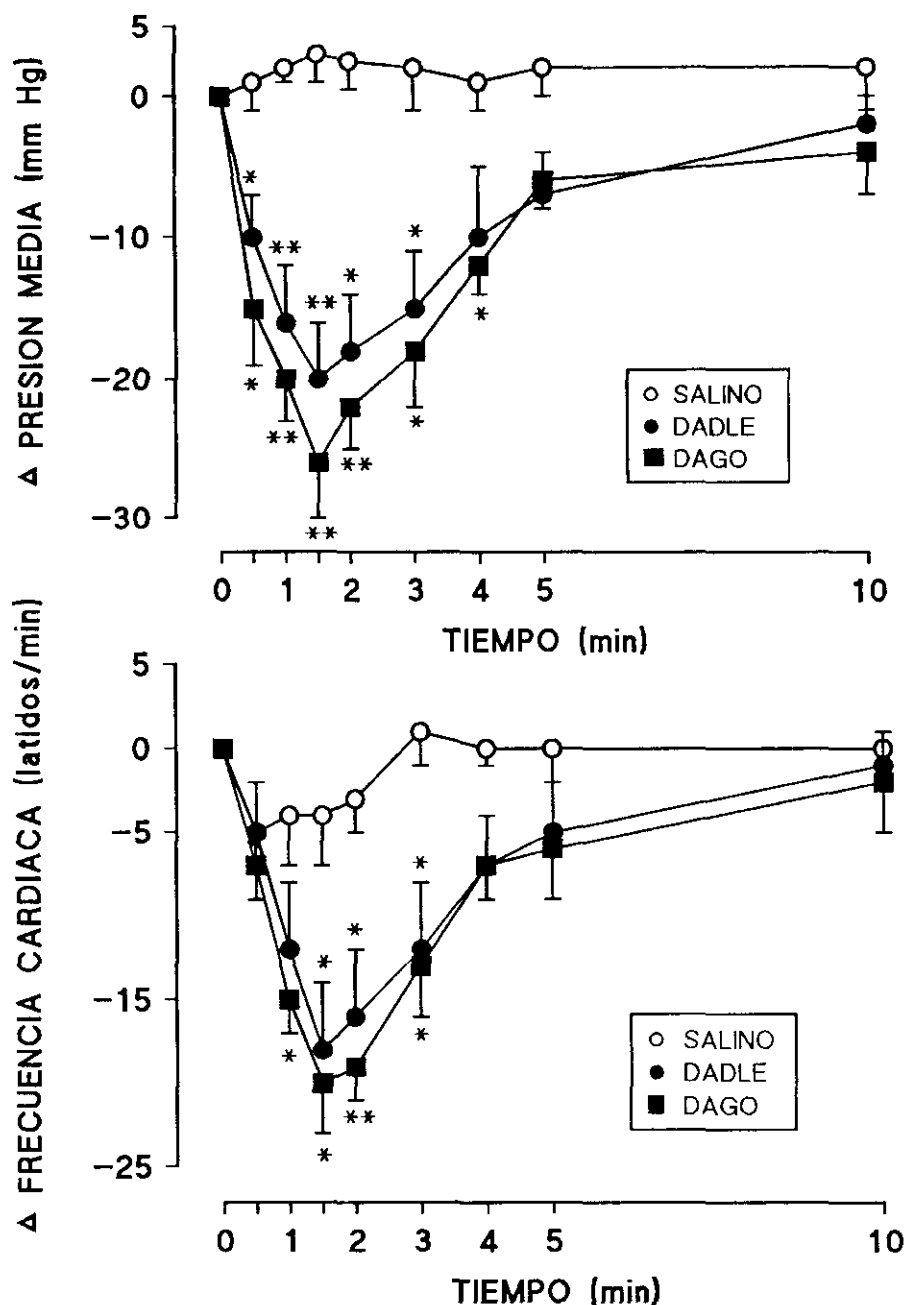


Fig.34.- Relación tiempo-respuesta para el efecto producido por la administración intravenosa de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en rata anestesiada.

Los datos representan la media \pm E.S. de las diferencias entre los valores basales y las medidas de presión arterial (panel superior) y frecuencia cardíaca (panel inferior), tomadas en la arteria carótida, después de la administración en la vena yugular de DADLE y DAGO (18 nmol/rata) o salino en animal anestesiado con etiluretano. Valores de presión arterial y frecuencia cardíaca previos al tratamiento: salino, $101 \pm 5/380 \pm 8$; DADLE, $94 \pm 6/375 \pm 10$; DAGO, $98 \pm 5/382 \pm 10$. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

4. INTERACCION ENTRE LOS SISTEMAS OPIOIDE Y CATECOLAMINERGICO A NIVEL CENTRAL

La determinación de los niveles de aminas y de sus metabolitos para la estimación de las correspondientes velocidades de renovación, así como los ensayos efectuados para evaluar la actividad de la TH, se llevaron a cabo después de 15 días de aislamiento, una vez que los animales aislados habían desarrollado la respuesta hipertensiva y se había comprobado la participación del sistema opioide en su desarrollo, mediante la reversión de la hipertensión con naloxona.

4.1. Efecto del estrés por privación social sobre la actividad de los sistemas catecolaminérgicos a nivel central

4.1.1. Efecto del estrés por privación social sobre las velocidades de renovación de noradrenalina y dopamina y sobre los niveles de adrenalina

Los cocientes MHPG/NA y DOPAC/DA expresan las velocidades de renovación de NA y DA respectivamente. Debido al hecho de que sólo una pequeña fracción del MHPG, imposible de determinar, deriva de la actividad de neuronas adrenérgicas, y procediendo la mayor parte del metabolismo de NA (hecho que está de acuerdo con la mayor concentración cerebral de este neurotransmisor; Kopin 1985), la evaluación de la actividad del sistema adrenérgico se efectuó tomando como referencia única y exclusiva el nivel de la amina en lugar de la velocidad de renovación. Se ha asumido, por tanto, que la totalidad del MHPG detectado procede del metabolismo de NA.

Efecto en bulbo raquídeo

En la Tabla IV se reflejan de modo conjunto los niveles de NA, AD y DA, así como los de sus metabolitos MHPG y DOPAC en bulbo raquídeo de animales hipertensos aislados y sus correspondientes controles agrupados. En esta región cerebral, el aislamiento no alteró los niveles de NA, DA ni los de sus correspondientes metabolitos MHPG y DOPAC, por lo que las velocidades de renovación de ambos neurotransmisores son similares a las que se hallaron para los animales agrupados (Fig.36). Sin embargo, como se observa en la Fig.35, los niveles de AD se encontraban significativamente aumentados en los animales privados socialmente (y por lo tanto hipertensos) respecto al grupo control de animales normotensos agrupados.

BULBO RAQUIDEO

	NA	MHPG	MHPG/NA	DA	DOPAC	DOPAC/DA	AD
AGRUPADAS	927 ± 26	212 ± 22	0.231 ± 0.027	44 ± 1	30 ± 2	0.677 ± 0.060	67 ± 4
AISLADAS	913 ± 22	214 ± 20	0.235 ± 0.023	42 ± 2	31 ± 3	0.681 ± 0.042	81 ± 3**

TABLA IV.- Efecto de la deprivación social sobre las velocidades de renovación de noradrenalina, dopamina, y sobre los niveles de adrenalina en bulbo raquídeo.

El sacrificio de los animales, para la determinación posterior de las aminas y sus metabolitos por HPLC, se efectuó a los 15 días de aislamiento una vez que los animales habían desarrollado la respuesta hipertensiva. Los cocientes MHPG/NA y DOPAC/DA representan las velocidades de renovación de NA y DA respectivamente. Los datos se expresan en pg/mg de tejido. ** $p < 0.01$ respecto a los animales agrupados (test de la t de Student).

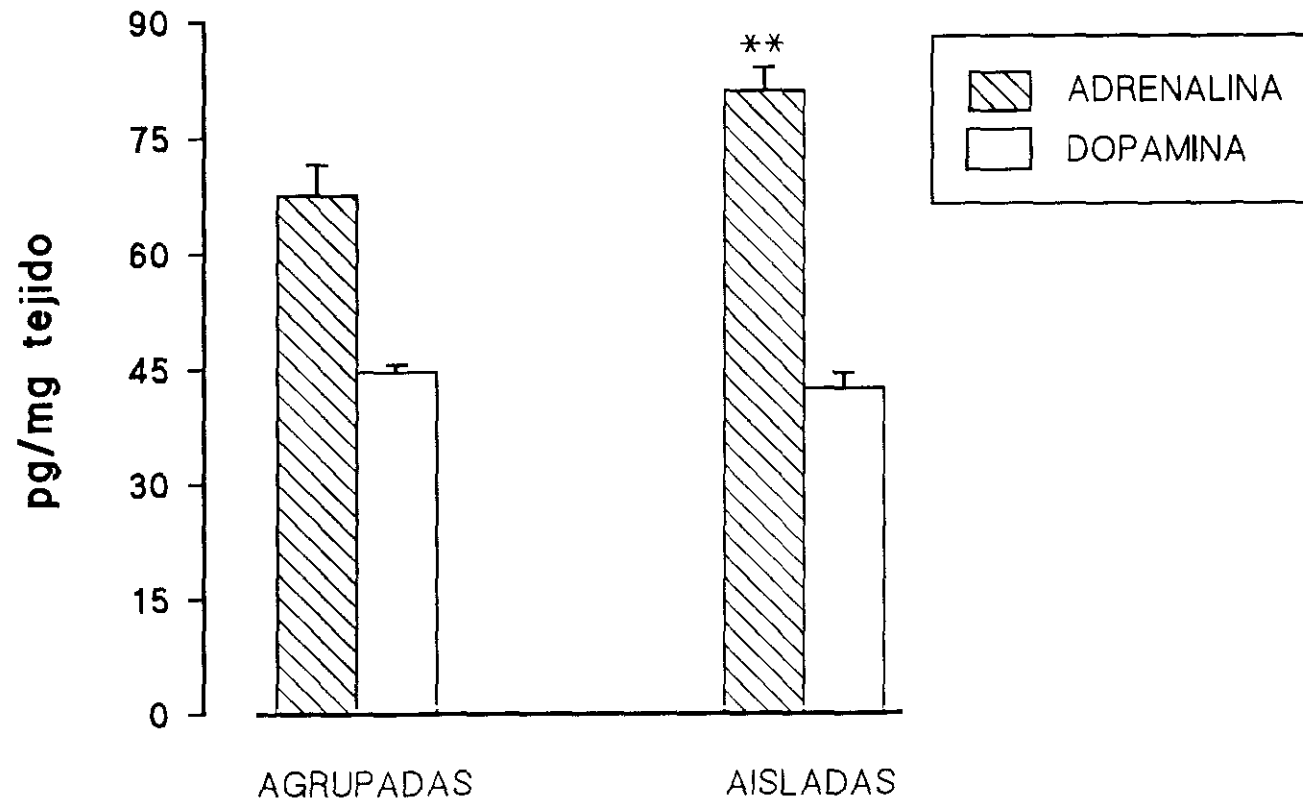


Fig.35.- Efecto del estrés por privación social sobre los niveles de adrenalina y dopamina en bulbo raquídeo.

El sacrificio de los animales, para la determinación posterior de las aminas y sus metabolitos por HPLC, se efectuó a los 14 días de aislamiento una vez que los animales habían desarrollado la respuesta hipertensiva. ** $p < 0.01$ respecto a los animales agrupados (test de la t de Student).

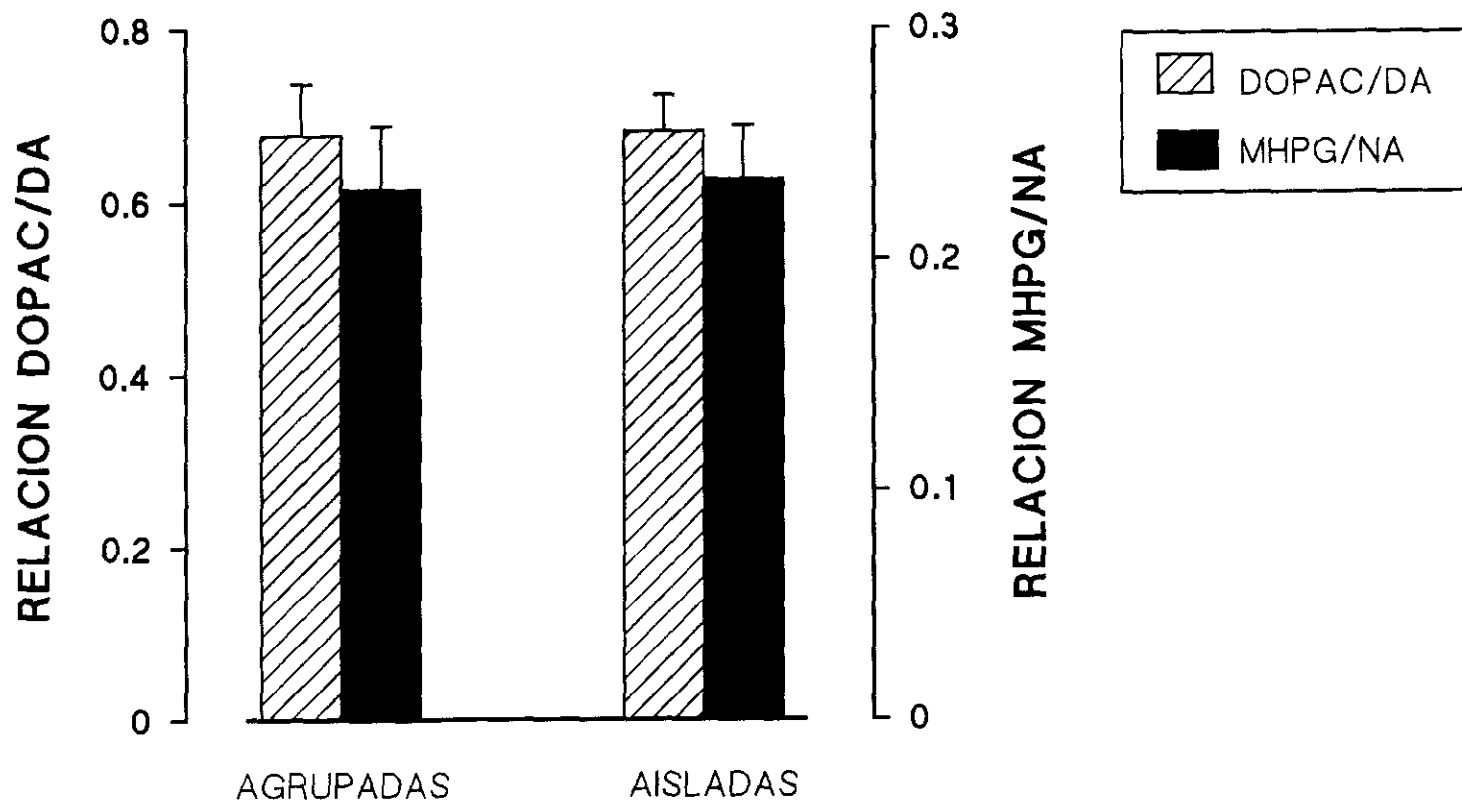


Fig.36.- Efecto del estrés por privación social sobre las velocidades de renovación de dopamina y noradrenalina en bulbo raquídeo.

Las velocidades de renovación de DA y NA se expresan respectivamente como los cocientes DOPAC/DA y MHPG/NA. Para detalles metodológicos, ver Fig.35.

Efecto en hipotálamo

Los resultados obtenidos en hipotálamo para los mismos grupos experimentales se muestran conjuntamente en la Tabla V.

El aislamiento no produjo alteraciones significativas en la velocidad de renovación de DA (Fig.39), como puede deducirse de la similitud de los contenidos de DA y de su metabolito DOPAC observada entre los animales aislados y agrupados. Sin embargo, se observó una disminución considerable de los niveles de MHPG en los animales hipertensos como consecuencia del aislamiento, hecho que no tenía correlato en el grupo control de animales agrupados (Fig.38), y que tampoco se acompañaba de modificaciones en los niveles de NA, produciéndose consecuentemente una disminución de la velocidad de renovación noradrenérgica (Fig.39). Por último, el análisis de AD en esta estructura cerebral reveló un incremento estadísticamente significativo en los niveles del neurotransmisor, en el caso de los animales aislados, cuando se compararon con el grupo control de animales agrupados (Fig.37).

4.1.2. Efecto del estrés por deprivación social sobre la síntesis de catecolaminas: ensayo de actividad del enzima tirosina hidroxilasa

Con objeto de complementar los datos previos y con el fin de examinar la posible alteración de la actividad de los sistemas catecolaminérgicos centrales por efecto del aislamiento, se procedió a determinar la actividad del enzima TH.

En la Tabla VI se muestra la actividad de la TH en bulbo raquídeo e hipotálamo de ratas con hipertensión inducida por deprivación social. En ambas estructuras, el grado de actividad del enzima en los animales aislados era inferior al que se observaba en los animales agrupados, si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística.

4.2. Efecto de la administración intracerebroventricular de DADLE y DAGO sobre la actividad de los sistemas catecolaminérgicos a nivel central

Para evaluar el efecto producido por los agonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO respectivamente sobre la actividad de los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico y adrenérgico, en bulbo raquídeo e hipotálamo, se seleccionaron las dosis de 36 nmol/rata para el DADLE y

HIPOTALAMO

	NA	MHPG	MHPG/NA	DA	DOPAC	DOPAC/DA	AD
AGRUPADAS	1744 ± 54	379 ± 25	0.217 ± 0.012	229 ± 18	95 ± 5	0.451 ± 0.061	28 ± 5
AISLADAS	1846 ± 36	289 ± 16**	0.157 ± 0.009**	251 ± 13	104 ± 5	0.427 ± 0.017	45 ± 4*

TABLA V.- Efecto de la privación social sobre las velocidades de renovación de noradrenalina, dopamina, y sobre los niveles de adrenalina en hipotálamo.

Para detalles metodológicos, ver Tabla IV. Los cocientes MHPG/NA y DOPAC/DA representan las velocidades de renovación de NA y DA respectivamente. Los datos se expresan en pg/mg de tejido, y representan la media ± E.S. * p<0.05 y ** p<0.01 respecto a los animales agrupados (test de la t de Student).

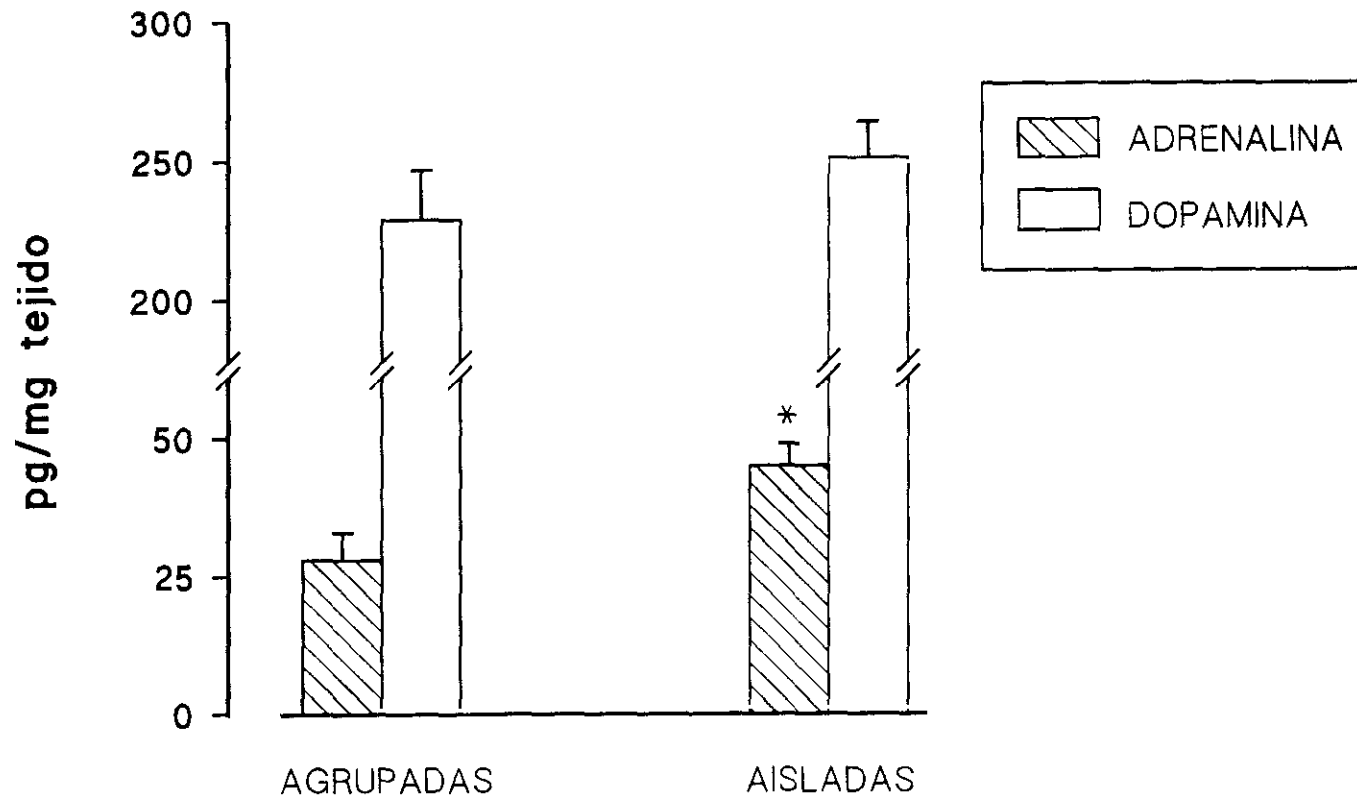


Fig.37.- Efecto del estrés por privación social sobre los niveles de adrenalina y dopamina en hipotálamo

Para detalles metodológicos concretos, ver Fig.35.

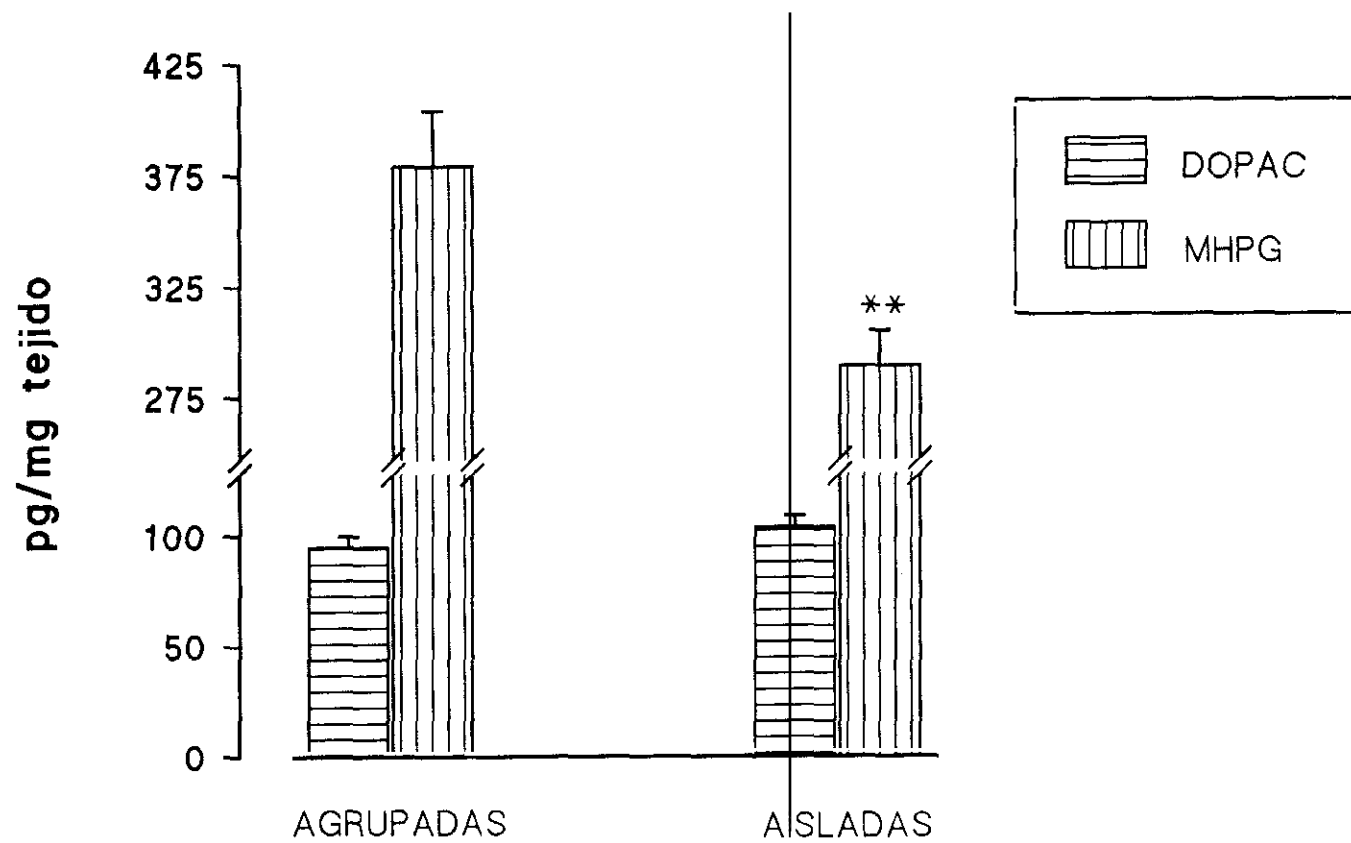


Fig.38.- Efecto del estrés por *deprivación social* sobre los niveles de DOPAC y MHPG en hipotálamo.

Para detalles metodológicos, ver Fig.35. ** $p < 0.01$ respecto a los animales agrupados (test de la t de Student).

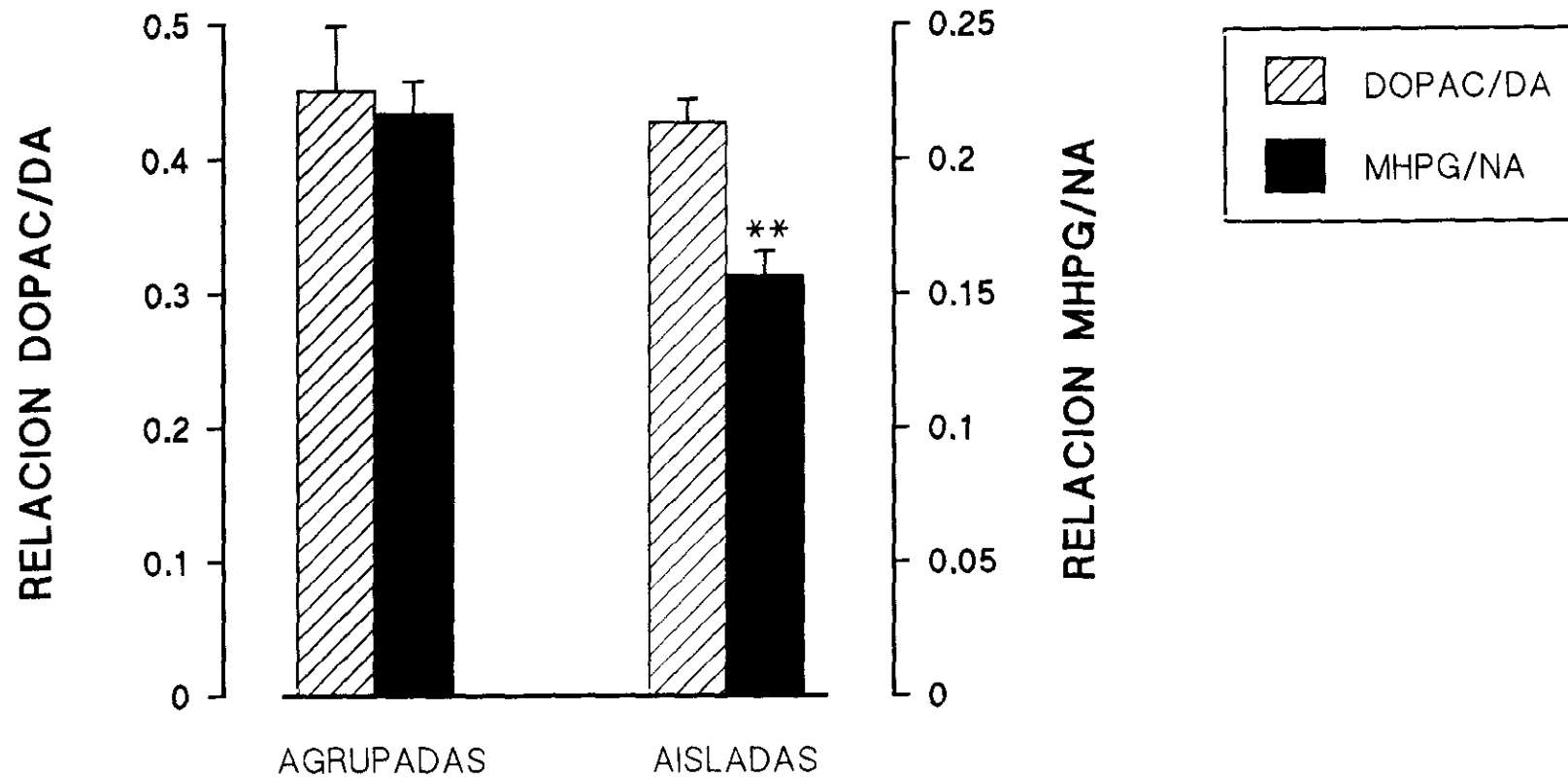


Fig.39.- Efecto del estrés por privación social sobre la velocidad de renovación de dopamina y noradrenalina en hipotálamo.
 Las velocidades de renovación de DA y NA se expresan respectivamente como los cocientes DOPAC/DA y MHPG/NA. Para detalles metodológicos, ver Fig.35. ** $p < 0.01$ respecto a los animales agrupados (test de la t de Student).

TABLA VI.- Actividad enzimática de la tirosina hidroxilasa en bulbo raquídeo e hipotálamo de ratas hipertensas por deprivación social.

	HIPOTALAMO	BULBO RAQUIDEO
AGRUPADAS	7.14±0.92	1.40±0.18
AISLADAS	5.50±0.72	0.76±0.20

Los datos corresponden a animales sacrificados en el día 14 del aislamiento, y se expresan en ng de L-DOPA formada/mg de tejido/h de incubación. Valores de presión arterial sistólica de las ratas empleadas para el ensayo: agrupadas, 135±4; aisladas, 168±4.

18 nmol/rata para el DAGO (i.c.v.). Estas dosis administradas en el animal consciente, producían elevaciones de la presión arterial, del mismo grado (10-20 mm Hg) que aquéllas ocasionadas por efecto de la deprivación social, según se mostraba en las figuras 24 y 28.

4.2.1. Efecto sobre las velocidades de renovación de noradrenalina y dopamina y sobre los niveles de adrenalina

Efecto en bulbo raquídeo

En la Tabla VII se reflejan de modo conjunto los niveles de NA, DA y AD, así como los de sus metabolitos MHPG y DOPAC en bulbo raquídeo a los 10 minutos de la administración de DADLE y DAGO. El momento en el cual se llevó a cabo el sacrificio de los animales tras la administración de los péptidos se seleccionó considerando que es el tiempo al que tiene lugar el efecto máximo de ambos compuestos sobre la presión arterial (Fig 24 y 28).

En bulbo raquídeo, solamente el DADLE disminuyó significativamente la velocidad de renovación de NA (Fig. 43). Esta alteración es consecuencia del descenso que se halló para los niveles de MHPG, apareciendo, en cambio, inalterados los niveles de NA (Fig.40).

Respecto a la actividad del sistema dopaminérgico, ninguno de ambos péptidos modificó la velocidad de renovación de DA (Fig.43), si bien, tras la administración del agonista delta DADLE, se apreciaba un incremento significativo del DOPAC respecto al grupo de animales tratados con salino (Fig.41). No obstante, dicho incremento se compensaba en el cálculo de la velocidad de renovación con el leve aumento presentado por los niveles de DA por efecto del péptido (Fig.41)

El único sistema alterado por acción del agonista mu DAGO fue el adrenérgico, ya que su administración indujo un aumento de los niveles del neurotransmisor próximo al 50%. El efecto fue selectivo para este péptido, ya que en este caso la inyección del agonista delta, DADLE, no producía modificación alguna sobre los niveles de AD (Fig.42).

BULBO RAQUIDEO

	NA	MHPG	MHPG/NA	DA	DOPAC	DOPAC/DA	AD
CONTROL	826 ± 42	166 ± 13	0.201 ± 0.014	49 ± 2	25 ± 4	0.503 ± 0.061	54 ± 4
SALINO	889 ± 18	169 ± 7	0.191 ± 0.010	46 ± 2	29 ± 2	0.587 ± 0.044	58 ± 4
DADLE	915 ± 47	136 ± 10*	0.138 ± 0.013*	57 ± 6	35 ± 2*	0.624 ± 0.043	64 ± 7
DAGO	891 ± 29	157 ± 9	0.179 ± 0.013	45 ± 2	25 ± 2	0.546 ± 0.037	90 ± 6**

TABLA VII.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre las velocidades de renovación de noradrenalina, dopamina, y sobre los niveles de adrenalina en bulbo raquídeo.

El sacrificio de los animales para la determinación posterior de la aminas y de sus metabolitos por HPLC, se efectuó a los 10 minutos de la administración i.c.v., de DADLE (36 nmol/rata), DAGO (18 nmol/rata), o salino, en el animal consciente y en situación libre. Los animales CONTROL habían sido implantados con una cánula permanente en el ventrículo cerebral, pero no recibieron ningún tratamiento. Los cocientes MHPG/NA y DOPAC/DA representan las velocidades de renovación de NA y DA respectivamente. Los datos se expresan en pg/mg de tejido. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

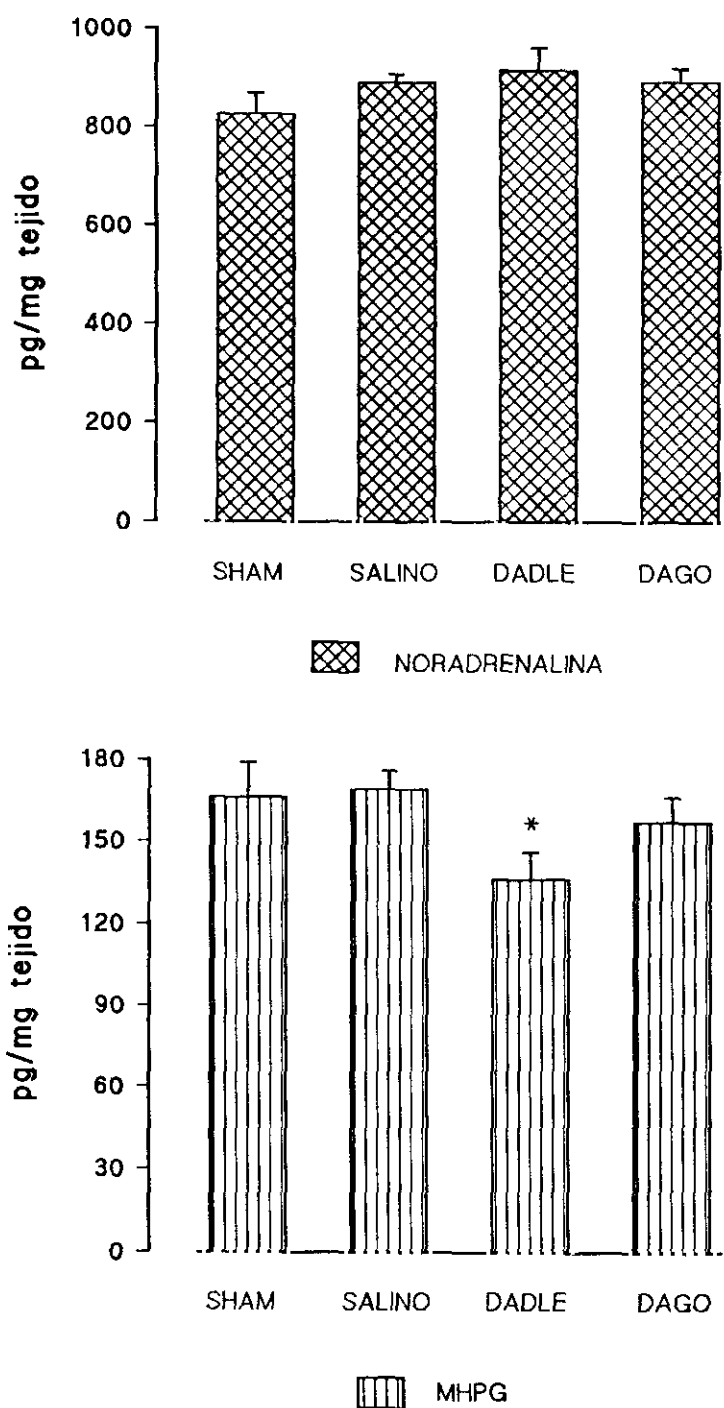


Fig.40.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre los niveles de noradrenalina y MHPG en bulbo raquídeo.

El sacrificio de los animales para la determinación posterior de la amina y de su metabolito por HPLC, se efectuó a los 10 minutos de la administración i.c.v., de DADLE (36 nmol/rata), DAGO (18 nmol/rata), o salino, en el animal consciente y en situación libre. Los animales SHAM habían sido implantados con una cánula permanente en el ventrículo cerebral, pero no recibieron ningún tratamiento. * $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

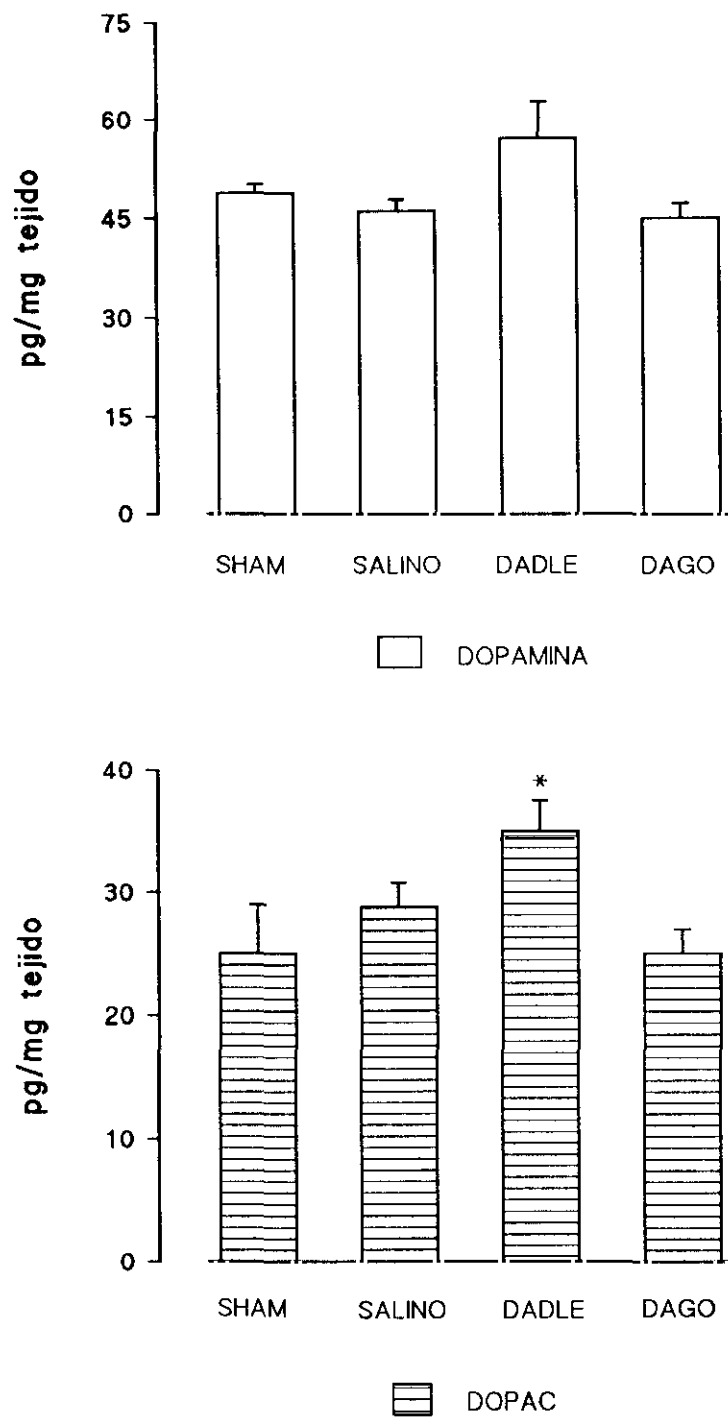


Fig.41.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre los niveles de dopamina y DOPAC en bulbo raquídeo.

Para detalles metodológicos, ver Fig.40. * $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

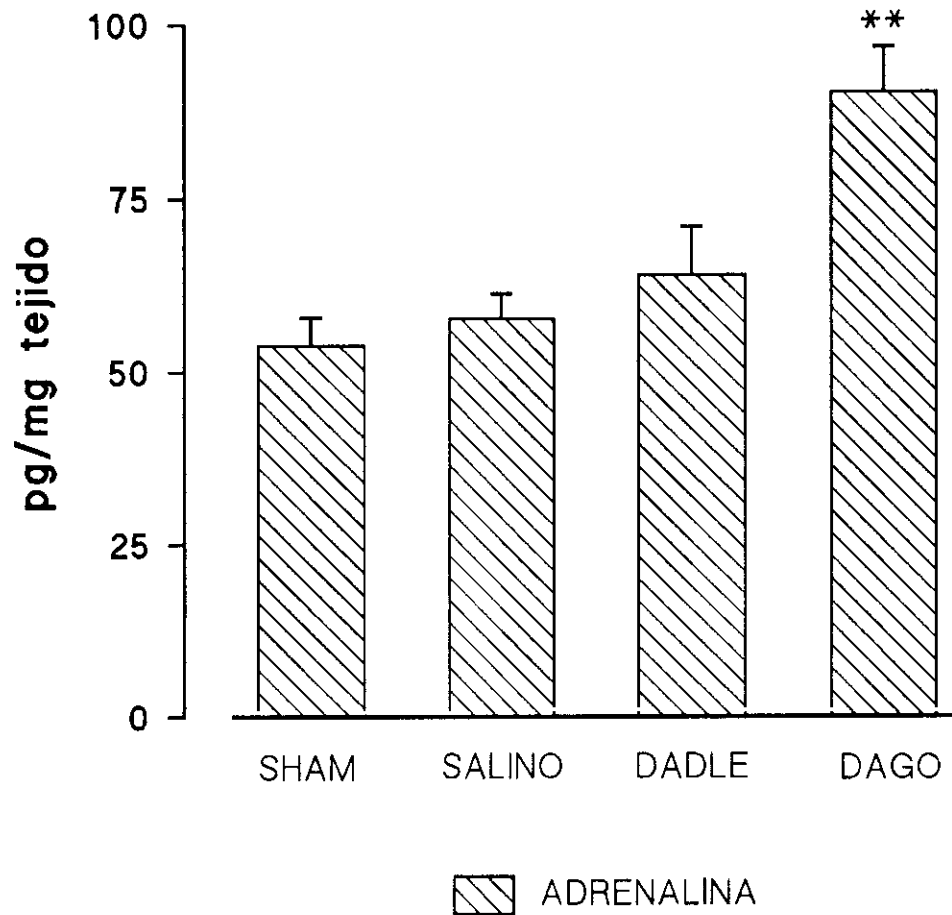


Fig.42.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre los niveles de adrenalina en bulbo raquídeo.

Para detalles metodológicos, ver Fig.40. ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

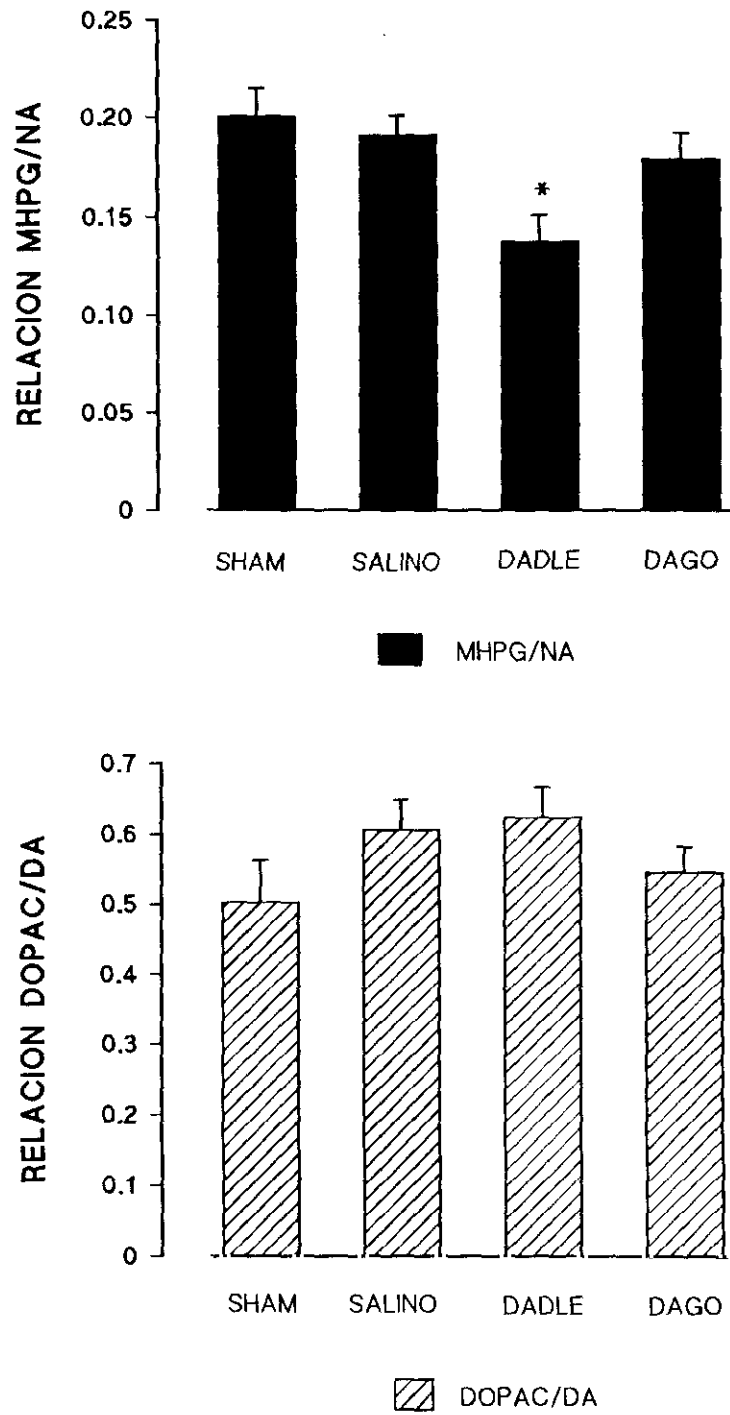


Fig.43.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre la velocidad de renovación de noradrenalina y dopamina en bulbo raquídeo.

Las velocidades de renovación de DA y NA se expresan respectivamente como los cocientes DOPAC/DA y MHPG/NA. Para detalles metodológicos, ver Fig.40. * $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

Efecto en hipotálamo

Los resultados obtenidos en el hipotálamo después de la administración de ambos agonistas se muestran en la Tabla VIII.

Siguiendo una aproximación experimental similar a las anteriores, los niveles de NA, DA y AD no sufrieron ninguna modificación después de la administración de ambos agonistas.

Respecto a los metabolitos de degradación de las catecolaminas, los niveles de DOPAC fueron similares en los cuatro grupos experimentales analizados, y el MHPG, si bien aparecía disminuído para ambos péptidos de modo significativo (Fig.44), su disminución no se tradujo en alteraciones de la velocidad de renovación de NA (Fig.45), puesto que, debido al ligero descenso en los niveles de NA obtenido en ambos casos, se verificó un efecto compensatorio al realizar el cociente MHPG/NA.

4.2.2. Efectos sobre la síntesis de catecolaminas: actividad del enzima tirosina hidroxilasa

La administración i.c.v. de DADLE y DAGO a las dosis anteriormente mencionadas produjo una disminución de la actividad de la TH en hipotálamo que no alcanzó, sin embargo, significación estadística respecto al efecto del salino sobre el enzima. En bulbo raquídeo, los valores se mantuvieron prácticamente constantes en todos los grupos experimentales (Tabla IX).

HIPOTALAMO

	NA	MHPG	MHPG/NA	DA	DOPAC	DOPAC/DA	AD
CONTROL	2536 ± 105	296 ± 26	0.083 ± 0.008	365 ± 15	99 ± 12	0.272 ± 0.030	41 ± 6
SALINO	2420 ± 68	308 ± 17	0.100 ± 0.006	389 ± 9	111 ± 9	0.290 ± 0.019	36 ± 3
DADLE	2142 ± 138	231 ± 22*	0.088 ± 0.004	352 ± 31	99 ± 9	0.291 ± 0.030	38 ± 4
DAGO	2273 ± 103	253 ± 17*	0.089 ± 0.005	395 ± 22	110 ± 8	0.287 ± 0.026	42 ± 3

TABLA VIII.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre las velocidades de renovación de noradrenalina, dopamina, y sobre los niveles de adrenalina en hipotálamo.

Para detalles metodológicos, ver Tabla VII. Los cocientes MHPG/NA y DOPAC/DA representan las velocidades de renovación de NA y DA respectivamente. Los datos se expresan en pg/mg de tejido. * $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

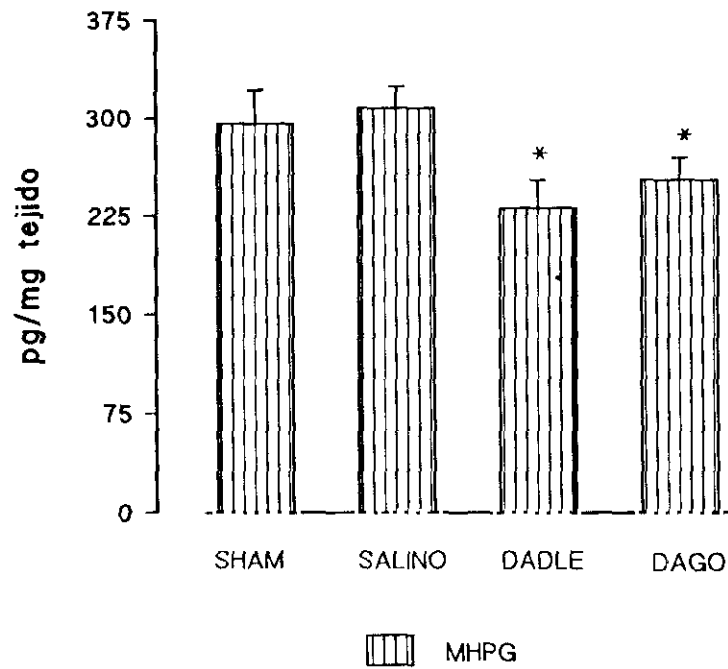
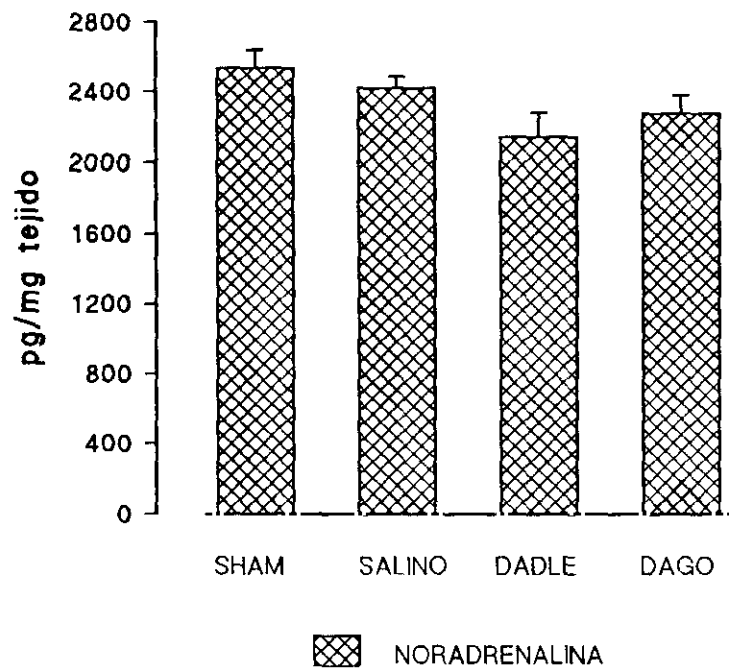


Fig.44.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre los niveles de noradrenalina y MHPG en hipotálamo.

Para detalles metodológicos, ver Fig.40. * $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con salino (test de la t de Student).

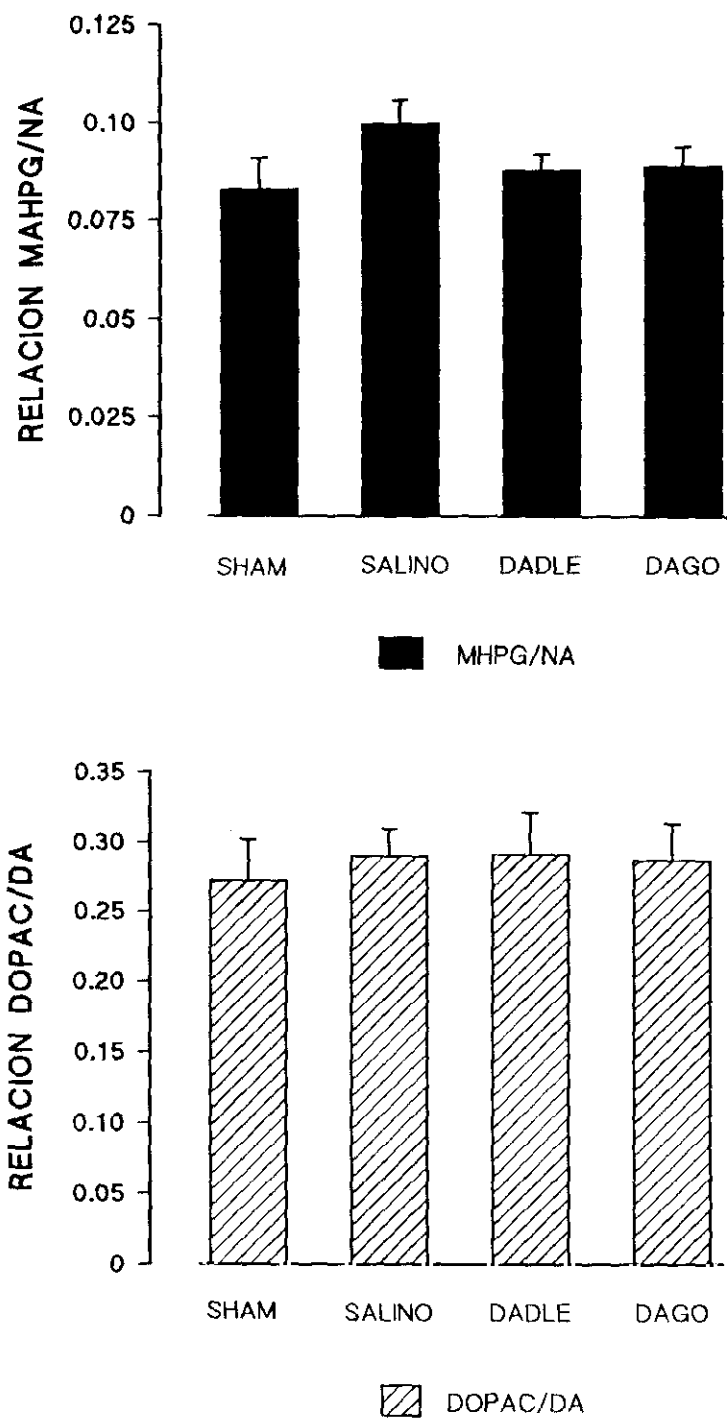


Fig.45.- Efecto de los agonistas de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO, sobre la velocidad de renovación de noradrenalina y dopamina en hipotálamo.

Las velocidades de renovación de DA y NA se expresan respectivamente como los cocientes DOPAC/DA y MHPG/NA. Para detalles metodológicos, ver Fig.40.

TABLA IX.- Actividad enzimática de la tirosina hidroxilasa en bulbo raquídeo e hipotálamo de ratas tratadas con los agonistas de los receptores mu y delta opioides, DAGO y DADLE.

	HIPOTALAMO	BULBO RAQUIDEO
CONTROL	6.58±0.64	1.23±0.14
SALINO	4.67±0.85	1.14±0.08
DADLE	4.59±0.55	1.08±0.12
DAGO	3.66±0.17	1.12±0.13

Los datos corresponden a animales sacrificados a los 10 minutos de la administración i.c.v. de DADLE (36 nmol/rata) y DAGO (18 nmol/rata) o de salino, y se expresan en ng de L-DOPA formada/mg de tejido/h de incubación. El grupo control presentaba una cánula permanente en el ventrículo cerebral, pero no recibió ningún tratamiento.

DISCUSSION

1. VALIDACION DE LA DEPRIVACION SOCIAL COMO MODELO DE ESTRES, Y CARACTERIZACION DE LA CORRESPONDIENTE RESPUESTA HIPERTENSIVA

Antes de intentar poner de manifiesto la implicación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva generada como consecuencia de la aplicación del modelo de privación social en ratas jóvenes, se procedió a validar dicho paradigma experimental como modelo de estrés. Si bien (como ya se hacía referencia en el apartado 3 de la Introducción) la definición de marcadores biológicos para el estrés resulta francamente complicada, hecho debido a la gran especificidad del efecto que produce cada modelo sobre los distintos parámetros fisiológicos, no es menos cierto que en todos ellos se verifica una activación del eje H-H-A (Selye 1976; Dunn y Kramarcy 1984). Como consecuencia de esta activación cabría esperar, por lo tanto, un aumento de los niveles de glucocorticoides circulantes y una hipertrofia de la glándula adrenal. Deben citarse en este sentido los trabajos de Vogel y Jensh (1988) y Natelson y cols. (1981) indicando que, mientras los niveles plasmáticos de catecolaminas expresan, con gran precisión, la intensidad del estrés percibido por el individuo cuando la naturaleza de aquél es aguda, la concentración de corticosterona en plasma refleja más adecuadamente la magnitud del estrés cuando éste presenta en su aplicación un carácter crónico o semicrónico. Por lo tanto, y desde este punto de vista, estaría justificada la determinación de corticosterona plasmática como índice del estrés inducido por privación social.

De acuerdo con el carácter semicrónico de nuestro modelo, y confirmando este extremo, los niveles plasmáticos de corticosterona se elevaron de manera significativa como consecuencia del aislamiento, simultáneamente, las glándulas adrenales sufrieron un incremento de peso. Estos resultados son cualitativamente coincidentes con las observaciones de Bennett y Gardiner (1978), empleando el mismo modelo experimental en ratas adultas. Sin embargo, con respecto a los resultados de estos autores, las variaciones en los niveles plasmáticos de corticosterona detectadas son, en nuestro caso, aunque considerables (aproximadamente del orden de dos veces superiores para los animales aislados con respecto al grupo control, al cabo de 14 días de aislamiento), sensiblemente inferiores a los descritos por Bennett y Gardiner (1978), incluso cuando ellos emplearon periodos de aislamiento menores (1-5 días). La mayor magnitud de estas variaciones podría explicarse, bien en función de la distinta edad de los animales

empleados para el ensayo, o bien, en función de la hora del día a la cual se efectuó la toma de muestras, circunstancia esta que, como es sabido y debido al ritmo circadiano de la corticosterona (Shimoda y cols. 1988), puede modificar de forma radical los resultados.

En una segunda aproximación a este modelo, se trataron de replicar los hallazgos de Naranjo y Fuentes (1985) en el sentido de que el aislamiento de ratas jóvenes durante un período no inferior a 7 días produce un incremento de la presión arterial sistólica. Efectivamente, este hecho ha sido confirmado y se ha podido, además, aportar el dato adicional de que la presión arterial diastólica de los animales deprivados socialmente se incrementa de modo paralelo, alcanzando unos valores máximos, y prácticamente estables, a partir de la segunda semana de aislamiento.

La generalización de este hallazgo no es, sin embargo, posible, ya que la raza parece ser determinante en cuanto a la capacidad de la rata para responder con elevaciones de presión arterial a este modelo de estrés. Así, Szenasi y cols. (1988) han observado que las ratas Long Evans son completamente resistentes al aumento de presión arterial generado como consecuencia del aislamiento.

En contraposición a los resultados de Naranjo y Fuentes (1985) obtenidos en una estirpe distinta de ratas Wistar, resultados que mostraban que la frecuencia cardíaca experimentaba un incremento significativo a los 7 días de aislamiento, recuperando sus niveles basales a los 15 días, en nuestro caso este parámetro cardiovascular no se modificó a lo largo del período de tiempo en que los animales se encontraron deprivados socialmente. Puesto que las condiciones experimentales empleadas para la aplicación del modelo de estrés fueron análogas a las aquí descritas, una posibilidad para fundamentar tal discrepancia podría estar constituida por la diferente reactividad de la estirpe de raza Wistar utilizada en ambos casos. Esta justificación de carácter genético también ha sido esgrimida por otros autores con el fin de explicar la diversidad de las respuestas observadas para distintos grupos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en diversos paradigmas experimentales (Trippodo y Frohlich 1981).

2. IMPLICACION DEL SISTEMA OPIOIDE EN LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRES POR DEPRIVACION SOCIAL

2.1. Tratamientos agudos

2.1.1. Reversión estereoespecífica de la respuesta hipertensiva al estrés por naloxona.

Como consecuencia de la aplicación del modelo de privación social, los animales mostraron una respuesta hipertensiva que, tanto para las lecturas de presión arterial sistólica como de presión arterial diastólica, fue sensible a la administración i.p. del antagonista opiáceo naloxona. Estos datos confirman y amplían los resultados de Florentino y cols. (1987), que consideraron el antagonismo por naloxona de la elevación de la presión arterial inducida por el aislamiento, como una condición necesaria aunque no suficiente, para poner de manifiesto la implicación de los péptidos opioides en dicha hipertensión. Asimismo, como ya había sido descrito por algunos autores (Holaday 1985), los resultados antedichos demuestran el carácter silente del sistema opioide en situaciones fisiológicas en las cuales la homeostasis del organismo no se encuentra perturbada; de hecho los valores de presión arterial del grupo control de animales normotensos no experimentó ninguna modificación por efecto de la naloxona.

Los resultados obtenidos están también de acuerdo con los publicados recientemente por Rhee y Hendrix (1989), que, aunque bajo otras condiciones experimentales, bloquearon con naloxona el aumento de la presión arterial asociado al estrés por inmovilización.

Los efectos farmacológicos descritos para la forma racémica de naloxona (forma del antagonista utilizada habitualmente), no demuestran incontrovertiblemente la mediación del receptor opiáceo (Sawynok y cols. 1979). El antagonismo con naloxona es, pues, un criterio necesario, pero no suficiente, para concluir la mediación opioide en una respuesta determinada. Desde que en el año 1975, Waterfield y Kosterlitz demostraron que los antagonistas opiáceos interaccionan estereoespecíficamente a nivel de receptor, para demostrar de forma definitiva la implicación del sistema opioide en un proceso fisiológico o farmacológico es necesario comprobar la existencia de estereoespecificidad en el bloqueo de dicho efecto por naloxona. Tomando como punto de referencia este

criterio en el estudio de la elevación de la presión arterial inducida por el aislamiento, se observó que la administración i.c.v. de naloxona (-) es capaz de revertir la antedicha respuesta hipertensiva, mientras que su correspondiente enantiómero (+), que presenta una afinidad 10.000 veces inferior sobre el receptor opioide (Ijima y cols. 1978), carece de efecto a la misma dosis. Esta estereoespecificidad en el bloqueo de la respuesta indica que la elevación de la presión arterial en este modelo está mediada, al menos en parte, por la activación del receptor opioide y demuestra que los opioides liberados durante el estrés son uno de los factores responsables de la respuesta hipertensiva observada.

Aunque la naturaleza central de la elevación de la presión arterial se había puesto de manifiesto mediante el empleo de 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 barrera hematoencefálica es prácticamente inexistente (área postrema, región subfornical; Holaday 1983). Bajo esta perspectiva, el hecho de que la dosis del antagonista seleccionada para su aplicación en el espacio ventricular cerebral fuera inefectiva cuando se administraba periféricamente, tanto por vía i.v. como por vía i.p. (vías estas para las que se requiere una concentración mucho más elevada de naloxona para producir un bloqueo equivalente de la respuesta hipertensiva), es un hecho que demuestra que es a nivel central, y no a nivel periférico, donde los opioides endógenos liberados como consecuencia del estrés ejercen su acción sobre el receptor para desencadenar la respuesta hipertensiva.

2.1.2. Potenciación de la respuesta presora a morfina en los animales privados socialmente

Siguiendo una aproximación opuesta, pero siempre con el fin de examinar si el sistema opioide es capaz de mediar el proceso hipertensivo observado en los animales sometidos a estrés por privación social y, puesto que todos los ensayos realizados en este trabajo y en estudios precedentes (Florentino y cols. 1987) fueron realizados mediante el empleo de antagonistas opiáceos, se llevó a cabo un estudio adicional empleando agonistas en esta misma línea de aproximación farmacológica, y observando su efecto sobre la presión arterial. Con este fin, se procedió al tratamiento agudo de los animales con morfina i.p., una vez que la hipertensión había alcanzado su desarrollo máximo. Tras la administración del opiáceo, la presión arterial de los animales aislados hipertensos, experimentó un incremento muy superior al que se obtuvo cuando la misma dosis se inyectó en el

grupo de animales agrupados normotensos. Las ratas aisladas hipertensas diferían, asimismo, de las normotensas en su respuesta al fármaco con respecto a la frecuencia cardíaca, ya que la bradicardia fue más intensa en el grupo sometido al estrés. La potenciación de la respuesta presora a la administración exógena de opioides, también ha sido empleada por otros autores (Yukimura y cols. 1981b; Rockhold y cols. 1981) para evaluar la mediación de este sistema en el incremento de la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). En estos experimentos, como en el caso de nuestros datos, el efecto presor obtenido para el opiáceo resultó muy superior cuando la administración se realizaba en ratas SHR, con respecto al que se observaba en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY).

La mayor intensidad del efecto presor de morfina en los animales hipertensos se explicaría como consecuencia del refuerzo ejercido por el fármaco sobre la sensibilidad de los mecanismos regulatorios cardiovasculares y sobre el propio sistema opioide endógeno de estos animales, activado con anterioridad a la administración del agonista. Estos resultados constituyen, pues, una segunda evidencia de la activación opioide en el transcurso de la respuesta hipertensiva al estrés por deprivación social.

En resumen, los datos obtenidos se encuentran en la misma línea que los observados por otros autores, en el sentido de que el sistema opioide se encuentra activado en numerosas formas de hipertensión experimental. Con datos estrictamente farmacológicos, se ha demostrado que la administración i.v. de naloxona disminuye la presión arterial de ratas jóvenes SHR, careciendo de efecto en sus controles WKY (Delbarre y cols. 1982). Por otro lado, con una aproximación bioquímica, Van Loon y cols. (1987) hallaron, en ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización, un incremento considerable de los niveles plasmáticos de met-enkefalina. En otros modelos experimentales de hipertensión, independientes de la aplicación de un estímulo estresante, se pueden encontrar resultados similares; así, recientemente se ha descrito un aumento de la concentración de ARNm de proencefalina en hipotálamo y cerebro medio de ratas SHR (Hoegler y cols. 1989).

2.2. Tratamientos crónicos

2.2.1. Tolerancia a la respuesta hipertensiva al estrés en animales aislados tratados crónicamente con morfina

Si los opioides están implicados en el desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por privación social, es un hecho que ha de manifestarse, además de en el bloqueo estereoespecífico del incremento de la presión arterial por naloxona, y en la sensibilización de los animales hipertensos al efecto presor producido por la administración aguda de morfina, como había sido descrito previamente, en la incapacidad o, al menos, en la dificultad de los animales aislados para desarrollar hipertensión cuando son expuestos simultáneamente a la administración crónica de morfina. La manifestación de tolerancia cruzada entre el efecto presor inducido por el opiáceo y la respuesta hipertensiva, apoyaría la mediación del sistema opioide, puesto que es un hecho conocido que efectos entre los cuales se observa tolerancia cruzada comparten un mecanismo de acción similar (Doty y cols. 1989). Este tipo de aproximación ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios para poner de manifiesto la implicación del sistema opioide en otro tipo de respuestas, como son el caso de la analgesia inducida por shock en las patas (Watkins y Mayer 1982), el efecto hipoalgésico de algunos antidepresivos (De Felipe y cols. 1986) o la regulación del eje H-H-A (Martínez y cols. 1990).

En este ensayo, los animales recibieron una solución con concentraciones crecientes de morfina en la solución de bebida a lo largo del periodo de aislamiento. En estas condiciones, los animales aislados tolerantes a morfina, cuya dependencia del fármaco se determinó verificando la pérdida de peso durante el síndrome de abstinencia (Stolerman y cols. 1975) y el incremento de la cantidad de morfina autoadministrada, se mostraron incapaces de desarrollar la hipertensión a lo largo del periodo de tiempo en que estuvieron expuestos al efecto del fármaco. Por el contrario, la evolución de la presión arterial de los animales aislados tratados con sacarosa tuvo lugar de manera habitual, alcanzando valores significativamente elevados al cabo de 15 días de privación social.

Estos resultados se interpretan como consecuencia de la ocupación permanente de los receptores opiáceos por la administración continuada de morfina. La consiguiente subsensibilización de aquéllos es el fenómeno que impide el efecto activador de los opioides endógenos y que, finalmente, imposibilita el desarrollo de la hipertensión. De hecho, cuando se procedió a sustituir el opiáceo por una

solución de sacarosa, los animales aislados recuperaron su capacidad para responder positivamente al estrés, manifestando un aumento significativo tanto de la presión arterial sistólica, como de la diastólica, transcurrida una semana desde la suspensión del tratamiento.

En nuestros experimentos, se observó que la interrupción del acceso de las ratas a la autoadministración de morfina provocaba un aumento brusco de la presión arterial durante 48 horas tanto en el grupo de animales aislados, como en los animales agrupados. El aumento de actividad simpática que conlleva el síndrome de abstinencia (Himmelsbach 1937; Buccafusco 1990) justificaría la elevación de la presión arterial observada en ambos grupos ya que, superado aquél, los animales agrupados recuperaron sus niveles de normotensión, mientras que los animales aislados evolucionaron hasta alcanzar valores de hipertensión. Como confirmación del componente opioide de la respuesta hipertensiva observada tras la retirada de la morfina en los animales aislados, la presión arterial disminuyó tras la administración i.p del antagonista opiáceo naloxona. La resistencia de los animales dependientes de morfina al desarrollo de la respuesta hipertensiva, que habría de generarse como consecuencia del aislamiento, constituye, pues, la tercera evidencia encontrada en el presente trabajo con respecto a la implicación del sistema opioide en la respuesta hipertensiva al estrés por deprivación social.

2.2.2. Prevención del desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés por deprivación social en animales tratados crónicamente con naloxona

La utilidad de los antagonistas opioides, no sólo para bloquear "a posteriori", sino también para prevenir el desarrollo de la respuesta hipertensiva al estrés, quedó puesta de manifiesto como consecuencia de los resultados obtenidos sobre la presión arterial en la presente memoria cuando los animales, paralelamente, se trataron crónicamente con una infusión continua de naloxona que se liberaba desde el interior de una minibomba Alzet. En estas condiciones, los animales no presentaron elevación alguna de la presión arterial en el transcurso del estrés. La influencia inhibitoria del antagonista fue más pronunciada al final del tratamiento, mientras, durante la primera semana, tanto los valores de presión arterial sistólica como diastólica de todos los grupos experimentales fueron similares. Con posterioridad, el cese de la actividad de la bomba, tras dos semanas liberando el antagonista se tradujo en un incremento lento y progresivo de la presión arterial en los animales aislados, sin que, sin embargo, y en base a los datos obtenidos, sea posible afirmar que alcancen la hipertensión. Esta tendencia a la elevación de la

presión arterial, que no llega a confirmarse estadísticamente, podría ser debida a que una semana es un tiempo insuficiente para que desaparezca por completo el efecto antagónico de la naloxona sobre los receptores opioides, a pesar del cese de la actividad de la bomba, sobre todo si se considera la posibilidad de que, tras la liberación subcutánea de la misma, una pequeña proporción del fármaco pueda quedar acumulada en tejido adiposo en forma de depot, eliminándose lentamente y dificultando, de este modo, el desarrollo completo de la hipertensión.

La efectividad de la infusión continua de naloxona para prevenir el desarrollo de la hipertensión ha sido también demostrada en ratas jóvenes SHR, en las cuales el tratamiento crónico con el antagonista retarda el desarrollo de la hipertensión de manera dosis-dependiente (Quock y cols. 1984).

Basándose en el hecho ya descrito de la hipoalgesia de naturaleza opioide asociada a la elevación de la presión arterial inducida por aislamiento (Naranjo y Fuentes 1985), la comprobación de que la naloxona se liberaba correctamente desde el interior de las minibombas se efectuó mediante la aplicación del test de analgesimetría de la placa caliente, prueba que explora mecanismos centrales implicados en el control de la nocicepción. En estas condiciones, el tratamiento continuado de los animales aislados con el antagonista, modificaba, de forma significativa, la respuesta conductual de aquéllos, en el test de "hot plate", presentando un tiempo de latencia a la aplicación del estímulo doloroso inferior al de los animales aislados tratados con salino. Este hecho, confirmaba que la liberación tenía lugar de modo efectivo.

La naloxona no modificó, sin embargo, el umbral doloroso de los animales agrupados. Esta ausencia de efecto no se puede atribuir estrictamente a una liberación inadecuada del fármaco en este grupo, sino, más bien, a la conocida inefectividad del antagonista en situaciones fisiológicas en las cuales no existe una activación previa del sistema opioide (Holaday 1985).

Por otro lado, el incremento del tiempo de latencia al test de la placa caliente observado en los animales aislados y la reversión de esta hipoalgesia por administración de naloxona, proporciona una evidencia adicional e indirecta de que el sistema opioide endógeno está activado en el transcurso del aislamiento. De esta manera, nuestros resultados suponen una confirmación de las observaciones antedichas de Naranjo y Fuentes (1985) que, con el empleo del mismo modelo y utilizando los tests de estímulo térmico (tail-flick) y presión en la pata (paw-pinch)

para evaluar el grado de analgesia, hallaron un aumento del umbral doloroso en los animales aislados.

3. DETERMINACION DEL SUBTIPO DE RECEPTOR OPIOIDE IMPLICADO EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA HIPERTENSIVA AL ESTRES

A pesar de la mayor afinidad relativa de la naloxona sobre el subtipo de receptor mu opiáceo, el antagonista no está desprovisto de efectos sobre los receptores delta y kappa (Paterson y cols. 1983). Por otro lado, experimentos realizados "in vivo" (Holaday 1983) no permiten garantizar, a la dosis empleada en nuestros ensayos, (20 nmol/rata i.c.v.) la selectividad del enantiómero (-) de naloxona sobre el receptor mu. Por lo tanto, el hecho de que este antagonista bloquee la respuesta hipertensiva al estrés no proporciona información definitiva sobre qué subpoblación específica de receptores opioides está mediando el componente opioideérgico de la hipertensión generada por deprivación social. Por esta razón, se hizo necesario el empleo de antagonistas selectivos de los distintos subtipos de receptores. En este sentido, el antagonista selectivo e irreversible del receptor mu, beta-funaltrexamina (Takemori y cols. 1981) produjo, tras su administración i.c.v., una disminución sostenida, aunque retardada, de las lecturas de presión elevadas como consecuencia del aislamiento, mientras los antagonistas específicos del receptor delta, ICI 154,129 (Shaw y cols. 1982) e ICI 174,864 (Cotton y cols. 1984), administrados por vía i.v e i.c.v. respectivamente, se mostraron inefectivos para revertir la hipertensión. Estas observaciones permiten afirmar que la activación del sistema opioide durante la respuesta hipertensiva al estrés por deprivación social estaría mediada por la ocupación de los receptores mu en SNC. En la misma línea de razonamiento, y abogando por una participación del receptor mu opioide en el desarrollo de distintas formas de hipertensión experimental, se sitúan los resultados de Gulati y cols. (1990). Estos autores han demostrado un aumento del número de receptores mu opioides en hipotálamo y una subsensibilización de los mismos en amígdala de ratas SHR respecto a sus controles WKY. Estos datos estarían, por su parte, 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).

Nuestros resultados a este respecto permiten, además, dar una explicación razonable a la situación paradójica que suponía el hecho de que el sistema opioide pudiera ser responsable de acciones cardiovasculares completamente opuestas, como son la hipertensión como consecuencia del estrés y la hipotensión asociada al shock hemorrágico (Holaday 1983). A la vista de los resultados aquí expuestos y de aquellos relativos a la reversión por antagonistas delta de la caída de presión arterial causada por shock hemorrágico (D'Amato y Holaday 1984), queda demostrado que son dos subpoblaciones de receptores opiáceos distintas las que median ambos efectos.

Es pertinente considerar aquí las razones por las cuales el receptor kappa fue excluido de este estudio. La primera razón es exclusivamente práctica, y se debe al insuficiente desarrollo de los antagonistas selectivos de este receptor. La segunda se sustenta en el escaso conocimiento que se posee, en la actualidad, de la farmacología cardiovascular asociada a este subtipo de receptor. Mientras con el empleo de muy distintos protocolos experimentales se ha logrado establecer, de modo más o menos claro, la acción presora derivada de la ocupación de los receptores mu y delta opioides en animales normotensos, los efectos derivados de la ocupación de los receptores kappa sobre la presión arterial son muy contradictorios. Si los estudios iniciales demostraban que los agonistas del receptor kappa producían hipotensión después de ser microinyectados en distintos núcleos cardiorregulatorios centrales (Feuerstein y Faden 1982; Hassen y cols. 1983), datos más recientes (Glatt y cols. 1987) muestran, por el contrario, una acción hipertensora para la dinorfina A (1-13) tras su administración i.c.v. estos datos concuerdan con los obtenidos por Saunders y Thornhill (1987), también en rata, según los cuales, sin embargo, la hipertensión no parece ser un fenómeno directo, sino que, más bien, parecería como consecuencia de la intensa activación de la ingesta y de la conducta exploratoria evocada por la dinorfina.

El papel activo del sistema opioide en la generación de la respuesta hipertensiva en este modelo de estrés, detectado mediante la aplicación de las distintas aproximaciones experimentales descritas anteriormente, es congruente, asimismo, con los resultados obtenidos en experiencias de fijación al receptor opioide. Así, Petkov y cols. (1985) observaron una disminución del número de lugares de unión específicos a ^3H -met-enkefalina en preparaciones de membranas de cerebro completo (Petkov y cols. 1985) procedentes de animales aislados.

En resumen, los resultados obtenidos permiten afirmar que los agonistas opioides endógenos, movilizados como consecuencia del estrés por aislamiento en la rata, tienen un papel crítico en la elevación de la presión arterial a través de su acción sobre los receptores mu opioides centrales.

Tal y como se hacía referencia en la Introducción de esta memoria, el efecto estimulante de numerosas formas de estrés, sobre la secreción de péptidos opioides en diversas especies, es un hecho contrastado. Dicha activación se refleja, bien en modificaciones de la dinámica receptorial (Feuerstein y cols. 1984; Stuckey y cols. 1989), bien en cambios de los niveles de los ligandos endógenos, tanto en plasma (Van Loon y cols. 1987) como en SNC (Zamir y cols. 1985), o bien, por lo que es aún más importante, un aumento de la biosíntesis de opioides. Esto último viene avalado por las variaciones observadas en los niveles de ARNm de proencefalina A o de POMC en el núcleo paraventricular del hipotálamo e hipófisis respectivamente (Harbuz y Lightman 1989; Lightman y Scott Young 1987).

En nuestro modelo, los datos no nos permiten dilucidar, por el momento, qué ligandos endógenos, en concreto, activarían los receptores mu opioides en el transcurso del estrés para elevar la presión arterial. La mayor concentración de los péptidos derivados de la proencefalina en núcleos de probada trascendencia en el control cardiovascular (hipotálamo y bulbo raquídeo; Akil y cols. 1988) y la acción hipotensora de la beta-endorfina, cuando se administra en SNC (Naranjo y cols. 1985; Petty y Reid 1982), apoyarían, sin embargo, la hipótesis de un papel activo de las encefalinas en las acciones presoras de los opioides y de la respuesta hipertensiva al estrés. En concordancia con esta hipótesis, es interesante reseñar la descripción reciente de una vía encefalinérgica que se proyecta desde el NTS a la RVLB (Morilak y cols. 1989). Esta proyección podría tener una función moduladora importante actuando sobre el reflejo barorreceptor, y quizá pudiera representar uno de los sustratos neuronales responsables de las modificaciones de la función barorrefleja observada durante la hipertensión. De hecho, se acepta que, durante las primeras fases de dicha disfunción, cuando aun no está definitivamente establecida la elevación de presión, existe una disminución de la funcionalidad barorrefleja (Krieger 1988), que, además, no es operativa durante las alteraciones emocionales (Stephenson 1984), situaciones ambas que confluyen en nuestro modelo (labilidad de la hipertensión y estrés de tipo psicológico).

Por otro lado, y como se apuntaba en el apartado 8.2.2.2. de la Introducción, las evidencias que asocian la estimulación de los receptores opioides centrales con

la supresión del reflejo barorreceptor a nivel experimental son múltiples. Una de las más concluyentes es la capacidad que presenta la naloxona para mejorar notablemente la funcionalidad de dicho reflejo (Szilagyí 1987).

Con estas premisas, se puede hipotetizar que, en el caso de la aplicación del modelo de estrés por privación social en rata, la respuesta hipertensiva, que, como se ha demostrado, está mediada, al menos en parte, por el sistema opioide central, se desencadena como consecuencia de la pérdida de la capacidad del reflejo barorreceptor para amortiguar la elevación de la presión arterial durante el estrés, siendo provocada dicha supresión de la funcionalidad barorrefleja por los propios péptidos opioides.

Atendiendo sólo a nuestros datos es difícil extrapolar y sugerir que, análogamente, los opioides pudieran estar también implicados en la génesis o en el mantenimiento de la hipertensión esencial en humanos, disfunción cardiovascular para la que se desconoce el mecanismo neurogénico presor que conduce a su desencadenamiento.

En este sentido, los datos son contradictorios. A favor de la idea de un papel activo del sistema opioide en la hipertensión en humanos, Kimura y cols. (1985) hallaron un incremento de los niveles de met-enkefalina en orina y plasma de pacientes con hipertensión esencial establecida, si bien la concentración del péptido no se normalizaba en orina cuando éstos eran sometidos a tratamientos con agentes antihipertensivos clásicos. Por otro lado, se ha observado un incremento del umbral doloroso de pacientes hipertensos ante la estimulación de la pulpa dental (Rosa y cols. 1986). Por el contrario, Kraft y cols. (1987) han descrito recientemente, en adolescentes situados en los primeros estadios de la hipertensión, una disminución de los niveles plasmáticos de beta-endorfina y leu-enkefalina, resultados éstos que coinciden con la ausencia de efecto que se ha descrito para la naloxona en adultos hipertensos, que presentaban una elevación sostenida de la presión arterial (Fuenmayor y Cubbedu 1986). Además, la administración de este antagonista en individuos normotensos sometidos a estrés mental experimental, lejos de prevenir el aumento de la presión arterial, eleva la intensidad de la respuesta hipertensiva, mientras que en los pacientes con hipertensión establecida la naloxona carece de efecto. Estos resultados han sido atribuidos a que, a causa de un estado funcional preexistente en el cual la actividad opioide estaría disminuida, la inhibición ejercida por el sistema opioide sobre el sistema nervioso simpático sería deficiente en

individuos hipertensos o con riesgo de hipertensión esencial (McCubbin y cols. 1985).

La discrepancia entre los resultados obtenidos en humanos y en animales de experimentación podría ser atribuible a la variabilidad entre especies, ya que a la distinta sensibilidad de éstas al efecto de los opioides (Koyama y cols. 1985), hay que añadir la diferente naturaleza del estrés aplicado en cada caso, por lo cual, para hacer una correcta comparación de los resultados, sería necesario aplicar un estrés inescapable y prolongado (aproximación éticamente inviable), como es el caso de la privación social en rata.

Respecto a los resultados de Fuenmayor y Cubbedu (1986) y Kraft y cols. (1987), se podría argüir que los opioides están únicamente implicados en los primeros estadios de la hipertensión experimental, ya que efectivamente la respuesta hipertensiva a la privación social es sensible a la administración de naloxona, sólo y únicamente, cuando el aislamiento no se prolonga más allá de 30 días, mientras que, si el estímulo aversivo persiste, el antagonista opioide es inefectivo (Florentino y cols. 1987). Este mismo hecho también ha sido demostrado en otros modelos experimentales (SHR, Saavedra 1981; y ratas tratadas con deoxicorticosterona -ratas DOCA-salt-; Zamir y cols. 1980) de hipertensión establecida para los que la naloxona carece de efecto sobre la presión arterial.

Para finalizar con este apartado, es importante resaltar, con vistas a una hipotética aplicación terapéutica de nuestros datos, el empleo de antagonistas selectivos de los receptores μ en el tratamiento de algunas formas de hipertensión esencial en humanos, si investigaciones futuras logran poner de manifiesto el papel del sistema opioide en la etiología y desarrollo de esta alteración cardiovascular. De esta manera sería posible controlar la elevación incipiente de la presión arterial debida a la exposición continua a situaciones de estrés mediante el uso de estos compuestos. En este sentido, su uso estaría, sin embargo, cuestionado por la aparición simultánea de hiperalgesia que, casi con toda seguridad, aparecería en estos pacientes, como consecuencia del bloqueo de los receptores μ_1 , que median la analgesia supraespinal (Pasternak y cols. 1980). Por tanto, la plasmación terapéutica de estos datos hace necesario, primero llegar a disponer de antagonistas de gran selectividad de acción sobre los receptores μ_1 y μ_2 , y, segundo demostrar que ambos fenómenos, la hipertensión y la percepción de la sensación dolorosa, están mediadas por la ocupación de estas dos distintas subpoblaciones de receptores.

4. EFECTOS CARDIOVASCULARES DE LOS AGONISTAS SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DELTA Y MU OPIOIDES, DADLE Y DAGO

La mayoría de los datos en la literatura referentes a los efectos producidos por los agonistas opioides sobre la presión arterial, se han efectuado en animal anestesiado (Feuerstein y Siren 1987a). Puesto que es conocida la capacidad de la mayoría de los agentes anestésicos para modificar drásticamente las respuestas cardiovasculares, se procedió a realizar un estudio sistemático de la acción de los agonistas específicos de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO respectivamente. En primer lugar, el estudio se llevó a cabo en animal consciente, con objeto de posibilitar la extrapolación de los resultados al caso de la hipertensión que se sucedía como consecuencia de la activación endógena del sistema opioide durante el estrés, tal y como se ha demostrado anteriormente, y con posterioridad en animal anestesiado, con el fin, en este caso, de hallar una explicación a la discrepancia entre los datos, que, como se reflejaba en la revisión realizada en la Introducción, aparece en la literatura. La atención preferente se centró en explorar las acciones de ambos agonistas a nivel central, si bien también se abordó el estudio de sus efectos periféricos.

El incremento del "pool" de opioides en la brecha sináptica mediante la administración i.c.v. de los agonistas sintéticos (D-Ala², D-Leu⁵) encefalina -DADLE-, análogo de leucina encefalina y (D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵) encefalina -DAGO-, análogo de met-enkefalina (ambos ligandos preferenciales de los subtipos de receptor opioide delta y mu respectivamente, y diseñados para obtener una prolongación de efectos en base a su menor vulnerabilidad al ataque enzimático; Beddell y cols. 1977), produjo un incremento de la presión arterial de modo análogo al efecto presor que, como ha quedado demostrado en experimentos precedentes, se sucede a la activación del sistema opioide endógeno central como consecuencia del estrés por deprivación social.

En todo estudio cardiovascular ha de tenerse en cuenta que los resultados, especialmente aquellos referentes al aumento de la presión arterial, carecen de valor si se producen a dosis de los fármacos a las que tiene lugar una alteración manifiesta del comportamiento. Esto es aplicable, en particular, cuando estas alteraciones repercuten en la actividad motora del animal, ya que los propioceptores, localizados en el músculo esquelético, son excitados durante la contracción y mandan información al SNC, a través de la formación reticular, para

provocar un aumento de la presión arterial. Por esta razón, se analizaron detalladamente aquellas modificaciones cardiovasculares que, tras la administración de ambos péptidos, cursaban junto con alteraciones de la actividad motora, con el objeto de disociar el efecto presor "per se" del compuesto de la sobrepresión resultante de la variación de la motilidad del animal. Con este razonamiento, dosis de DADLE superiores a 36 nmol/rata fueron rechazadas para el ensayo.

En el animal consciente y en estado libre, ambos compuestos ocasionaron un aumento de la presión arterial y una disminución paralela de la frecuencia cardíaca, variaciones de instauración progresiva que fueron dependientes de la dosis y reversibles por naloxona. Ambos efectos pueden considerarse de acción central, ya que, después de la microinyección de los mismos por vía i.c.v., menos de un 5% de la concentración total de DADLE y de DAGO ha sido detectada a nivel espinal (Dauge y cols. 1987).

Los resultados obtenidos con el DAGO en el presente trabajo coinciden con datos recientes de Kiristy-Roy y cols. (1989), descritos también para ratas en situación libre tras administración i.c.v. del agonista mu opioide. La diferencia más apreciable entre ambos grupos de datos radica en la mayor magnitud del efecto presor obtenido por estos autores, dado que una dosis de 5 nmoles/rata origina un incremento de la presión arterial equivalente al que hemos obtenido en nuestro trabajo por administración de 18 nmoles/rata, observándose una situación análoga sobre la frecuencia cardíaca. En este sentido, una razón válida para explicar esta aparente discrepancia podría ser la diferencia de edad de las ratas empleadas para los ensayos.

Respecto a los efectos cardiovasculares del DADLE en rata consciente, nuestros hallazgos concuerdan con las observaciones de Pfeiffer y cols. (1983b), realizando microinyecciones locales del agonista delta en hipotálamo anterior. Con aproximaciones experimentales similares y administración i.c.v., en esta ocasión con el empleo del también agonista del receptor delta, DALA (D-Ala² encefalinamida), diversos autores observaron respuestas de la misma naturaleza que las aquí descritas (Yukimura y cols. 1981b; Rockhold y cols. 1980). El incremento de la presión arterial que se sucede tras la administración del péptido, según la teoría de Gordon (1986), podría ser interpretado, al menos parcialmente, en base a una disminución de la actividad barorrefleja, mientras la bradicardia sería consecuencia de una activación vagal, puesto que, según se ha descrito por Marson

y cols. (1989), el tratamiento con metilnitrato de atropina, en el caso del DAGO, transforma la bradicardia en taquicardia.

En nuestros experimentos, la diferencia principal observada entre los efectos del DAGO y del DADLE, a igualdad de dosis, reside en la mayor potencia del agonista μ opioide para afectar ambos parámetros cardiovasculares, resultados que se sitúan en la línea de trabajos previos, donde, comparando los efectos de ambos péptidos tras su inyección en el NTS de ratas anestesiadas, el DAGO mostró una potencia 10 veces superior al DADLE para inducir, tanto el aumento de la presión arterial, como de la frecuencia cardíaca (Hassen y cols. 1982). Por otra parte, estos datos apoyan la hipótesis, sustentada en observaciones del mismo signo efectuadas por otros autores (Pfeiffer y cols. 1983a; Pfeiffer y cols. 1983b), de que los receptores μ , más que los delta, serían los receptores primarios responsables de la mediación de las acciones presoras centrales de los péptidos opioides. Dicha respuesta farmacológica tendría el soporte fisiológico adecuado, en nuestro caso, ya que, como ha quedado reflejado, la respuesta hipertensiva al estrés por privación social parece ser, en efecto, secundaria a la ocupación de los receptores μ opioides en SNC.

Ahora bien, aparte de este hecho diferencial para los dos compuestos, quizá lo más sobresaliente de este capítulo de nuestro estudio sea la potenciación del efecto presor que, para ambos opioides, se observó cuando la administración i.c.v. se efectuó en ratas anestesiadas con etiluretano, respecto al incremento de presión arterial que se obtuvo en animal consciente, y que, de nuevo, fue superior para el agonista del receptor μ opioide, DAGO. El aumento de potencia de los opioides sobre la función cardiovascular en el organismo anestesiado había sido apuntado por Lemaire y cols. (1978). Estos autores describieron que, en este estado, se produce un incremento de la respuesta depresora a la inyección i.v. de beta-endorfina, sin que, hasta la fecha, se hayan obtenido otras confirmaciones experimentales al respecto. De hecho, experiencias posteriores (Randich y cols. 1986) revelaron que el pentobarbital disminuía la presión arterial en ratas tratadas con el agonista delta DALA cuando se administraba también por vía i.v.

Todos los resultados anteriormente descritos en la literatura por los diversos autores, se han obtenido tras la inyección periférica de los opioides, adoleciéndose, casi por completo y por el momento, de estudios que valoren la incidencia de la anestesia sobre los efectos cardiovasculares obtenidos por la aplicación central de agonistas opioides, y, en culaquier caso, todos ellos son muy contradictorios.

Delbarre y cols.(1978) demostraron, por primera vez, que los anestésicos podían bloquear la respuesta presora a la inyección central de opioides. Por su parte, Yukimura y cols. (1981b) describieron una inversión de la respuesta presora al análogo de met-enkefalina DAME (D-Ala²-metionina encefalina) en rata consciente cuando estos mismos animales eran anestesiados con alfa-cloralosa, resultados todos ellos, que discrepan ampliamente de los obtenidos en nuestros ensayos. Esta discrepancia puede ser debida al diferente grado de profundidad alcanzado con los distintos anestésicos, ya que, si bien todos los anestésicos generales modifican, en mayor o menor medida, la función cardiovascular (Martner y Biber 1982), la alteración del reflejo barorreceptor, circunstancia ésta a la que se atribuye la capacidad de los anestésicos para afectar el sistema cardiovascular, no alcanza la misma intensidad para cada uno de ellos. Entre todos los anestésicos utilizados comúnmente en el animal de experimentación, el etiluretano ha resultado ser el que muestra una menor incidencia sobre los parámetros hemodinámicos (Maggi y Meli 1986), por esta razón fue éste el seleccionado para efectuar el estudio sistemático con DADLE y DAGO. No obstante, la administración de etiluretano producía una ligera disminución de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca en todos los animales.

La circunstancia de que en la rata anestesiada fuera necesario aumentar la dosis de naloxona (40 nmol/rata) para bloquear la acción presora de ambos péptidos respecto a la dosis del antagonista empleada en el animal consciente (20 nmol/rata), es un hecho que sugiere que la potenciación de los efectos de DADLE y DAGO en el animal anestesiado deriva de una acción directa sobre el sistema opioide, y no sobre otros sistemas de neurotransmisión. Por esta razón, se procedió a evaluar la posibilidad de que el etiluretano modificara el número o las características cinéticas del receptor opioide, de modo que se pudiera así explicar el mayor efecto de ambos agonistas cuando existía la presencia concomitante de anestesia. Los estudios de fijación con ³H-etorfina descartaron, sin embargo, que el efecto potenciador del etiluretano fuera debido a esta circunstancia, ya que no se observaron alteraciones en la afinidad del proceso de fijación ni en el número de lugares de unión a ³H-etorfina, tanto en hipotálamo como en bulbo raquídeo, zonas que, en caso afirmativo, habrían de haber sido presumiblemente afectadas por acción del anestésico, dada su relevancia en el control cardiovascular.

Una explicación alternativa para justificar la potenciación de efectos en presencia de etiluretano, podría ser la posibilidad, ya apuntada por algunos autores, de que la anestesia, por sí misma, constituya una fuente de estrés en los animales,

y produzca una liberación de opioides endógenos (Sapolsky 1990; Vermes y cols. 1981; Maiewsky y cols. 1984) insuficiente "per se" para que se refleje de modo significativo en los ensayos de "binding", pero capaz de sensibilizar al sistema opioide endógeno a la respuesta presora obtenida por la administración posterior de DADLE y DAGO.

Respecto al efecto de ambos compuestos sobre la frecuencia cardíaca en animal anestesiado, es importante señalar que, mientras el DAGO produjo una bradicardia dosis-dependiente que, de manera análoga al caso de la presión, era de mayor intensidad, la anestesia invirtió completamente el perfil de la respuesta inducida por el DADLE en el animal consciente, causando, en este caso, una intensa taquicardia. Estos resultados concuerdan con los datos de Yukimura y cols. (1981b), que hallaron para el DAME i.c.v. una inversión del efecto que, sobre la frecuencia cardíaca, producía la administración del péptido en el animal consciente, después de proceder a la anestesia con alfa-cloralosa.

En un intento de aportar datos que contribuyan al conocimiento de la farmacología cardiovascular del DADLE y del DAGO, se efectuó un último grupo de experimentos, orientados a establecer el efecto inducido por ambos agonistas, en esta ocasión, tras su administración periférica por vía i.v. en animal anestesiado. La disminución de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca que acompañan a la inyección por esta vía de los dos péptidos, está de acuerdo con los efectos depresores hallados, asimismo, para los agonistas opioides DAME y DALE administrados por esta misma vía (Thornhill y Saunders 1985).

Como ocurriera tras su administración central, los efectos observados fueron de mayor intensidad, a igualdad de dosis, para el agonista mu opioide, DAGO, si bien por esta vía las diferencias de potencia entre ambos péptidos fueron bastante inferiores a las que se obtuvieron por vía i.c.v. Por otro lado, el perfil farmacocinético de las respuestas cardiovasculares (rápidas y de muy breve duración) se explicaría por una acción local de los péptidos sobre receptores opioides situados en el propio vaso sanguíneo, suposición bastante lógica si se tiene en cuenta que, como consecuencia de la escasa permeabilidad que presenta la barrera hematoencefálica a la difusión de moléculas, que, como los propios opioides, poseen un carácter fuertemente polar, el acceso de estas sustancias al SNC desde la periferia está muy limitado.

Con todas las consideraciones anteriores, el hecho de que las variaciones de la presión arterial tras la administración i.v. de los péptidos se produzcan en sentido contrario a la ocasionadas por administración i.c.v., sugiere que las poblaciones de receptores opioides centrales, por un lado, y periférico, por otro, median acciones cardiovasculares de distinto signo.

5. MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD CATECOLAMINERGICA CENTRAL EN EL TRANCURSO DEL ESTRES POR DEPRIVACION SOCIAL

El descubrimiento de los neuropéptidos a lo largo de las dos últimas décadas (Krieger y cols. 1983), aparte del interés puramente neurobiológico que encierra, desde el punto de vista farmacológico supone una auténtica revolución al expansionar, de manera notable, el número de moléculas que, formando parte de la inervación de distintos tractos nerviosos, son objetivos potenciales de modulación terapéutica. Este hecho ha quedado demostrado en nuestro caso al haberse observado que la respuesta hipertensiva al estrés por privación social es susceptible, a nivel experimental, de tratamiento con antagonistas del receptor opioide.

La aparición de estas sustancias ha abierto una notable discusión acerca de si los péptidos cerebrales, y entre ellos los péptidos opioides, deberían ser clasificados como neurotransmisores o ser incluidos en una segunda categoría funcional de sustancias totalmente distintas, los denominados neuromoduladores. La diferencia exacta entre neurotransmisor y neuromodulador no se ha establecido aún en términos aceptados definitivamente. Cuando los receptores postsinápticos para una sustancia determinada están unidos a respuestas mediadas por canales iónicos, la sustancia debe ser considerada como neurotransmisor más que como neuromodulador en esa sinapsis, ya que activa su propia secuencia de fenómenos postsinápticos. Los neuromoduladores actúan, sin embargo, en algún punto del complejo receptor postsináptico para provocar un cambio en la eficiencia del neurotransmisor sobre los canales iónicos, o en otras acciones postsinápticas, pudiendo, también, desencadenar su acción alterando la liberación o la síntesis del neurotransmisor, al actuar sobre un receptor presináptico.

Los neuropéptidos, en muchas ocasiones, producen excitación o inhibición neuronal, sin llegar a producir un potencial de acción, pero sí modificando, de

forma lenta, un segundo sistema de neurotransmisión clásico (aminas, aminoácidos). Atendiendo, pues, a los criterios anteriores, los neuropéptidos se pueden incluir en el grupo de los neuromoduladores. De hecho, los neuropéptidos "per se", salvo muy contadas excepciones, como el factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH; Nung Jan y Yeh Jan 1983), no producen variaciones electrofisiológicas en preparaciones de tejido nervioso. Sin embargo, en un gran número de casos, sí que se ha observado que amplían o atenúan, según tengan un carácter excitatorio o inhibitorio, las modificaciones electrofisiológicas rápidas desencadenadas por los mensajeros intersinápticos clásicos (aminas o aminoácidos). De esta manera, los neuropéptidos, una vez liberados, ejercen un efecto modulador sobre las acciones de los neurotransmisores convencionales, dando origen así a una visión más compleja del fenómeno de transmisión de las señales en el SNC.

Los péptidos opioides, al igual que otros neuromoduladores, pueden llevar a cabo sus efectos parcialmente a través de tres mecanismos: deprimiendo presinápticamente la liberación de un neurotransmisor, alterando la capacidad de otros neurotransmisores para producir cambios en la conductancia iónica a nivel postsináptico, o bien directamente, incrementando el umbral de excitación de la neurona postsináptica por hiperpolarización de la membrana (Holaday 1985).

Para el sistema opioide se ha descrito en SNC la existencia de un receptor presináptico opioide ubicado en el terminal noradrenérgico, regulando la actividad de este sistema de neurotransmisión (Detlef Taube 1976) a través de una acción moduladora inhibitoria (Mulder y cols. 1987).

Por otra parte, y como se hacía referencia en el capítulo de Antecedentes, son numerosos los estudios que revelan modificaciones de la actividad de las neuronas catecolaminérgicas en respuesta a una gran variedad de estímulos estresantes. Con estas premisas, y conocida, por otro lado, la manifiesta contribución de las catecolaminas en la regulación cardiovascular, se planteaba la posibilidad de que la respuesta hipertensiva observada en el transcurso del estrés por privación social, y consecuencia, como había quedado demostrado, de la activación del sistema opioide cerebral, estuviera mediada, de manera coparticipada y en último término, por alteraciones de la transmisión catecolaminérgica en SNC. Este hecho sería consecuencia de la capacidad de los opioides para modificar este sistema de neurotransmisión debido a su capacidad neuromoduladora.

En nuestras condiciones experimentales, las modificaciones más relevantes observadas, después de someter a los animales al modelo de privación social, tanto en bulbo raquídeo como en hipotálamo, fueron halladas en el contenido de AD, que apareció notablemente aumentado en ambas estructuras cerebrales, lo que sería consistente con una acumulación del neurotransmisor en el terminal como consecuencia de una disminución de la actividad adrenérgica neuronal.

Mientras en hipotálamo la variación en los niveles de AD transcurría de modo simultáneo a una disminución del tono noradrenérgico, (hecho que quedaba reflejado por la disminución de los niveles del metabolito de NA, MHPG), en bulbo raquídeo este sistema no sufrió ninguna alteración. De modo análogo, el sistema dopaminérgico tampoco se modificó en el transcurso del estrés, en ninguna de ambas estructuras cerebrales.

Analizando los resultados en bulbo raquídeo, en cuanto a la transmisión noradrenérgica, es posible que la similitud de las velocidades de renovación entre animales aislados y agrupados no refleje, exactamente, la refractariedad de este sistema ante el estrés, sino que, debido a la ubiquidad del neurotransmisor en los distintos núcleos bulbares, la ausencia aparente de efecto represente el resultado neto de la inhibición simultánea de las diversas poblaciones noradrenérgicas bulbares (A1 en la CVLB y A2 en el NTS), cuyos efectos, sobre todo por lo que se refiere al control cardiovascular, son contrapuestos (Patel y Schmid 1987; Reis y cols. 1987).

Si las mencionadas variaciones en el tono catecolaminérgico durante el aislamiento están correlacionadas con el aumento de la presión arterial es, por el momento, sólo una hipótesis, puesto que también es posible que dichas variaciones sean reflejo de otros eventos fisiológicos (comportamentales, neuroendocrinos, etc.), que acompañan al estrés (Weiss y cols. 1989), y que han sido asociados, igualmente, con modificaciones del tono catecolaminérgico central. Esta consideración alcanza mayor relevancia en el caso del hipotálamo, región cerebral que juega un papel fundamental en la coordinación de las respuestas comportamentales y neuroendocrinas (Swanson y Sawchenko 1983). Por el contrario, el bulbo raquídeo es una zona que desempeña, casi exclusivamente, funciones autónomas, como el control cardiovascular, sin aparentes implicaciones en el funcionalismo endocrino.

A favor de una relación directa entre la disminución del tono adrenérgico en bulbo raquídeo y la respuesta hipertensiva aparecida en el transcurso del estrés, se situarían los datos de Fuxe y cols. (1979) y Wijnen y cols. (1978), que han sugerido que una deficiencia de la transmisión adrenérgica en la zona dorsal del bulbo raquídeo sería uno de los factores responsables de la hipertensión en ratas SHR. Este hecho es consistente con el papel vasodepresor de las neuronas C2 adrenérgicas en el NTS, propuesto por estos mismos autores (Fuxe y cols. 1975).

En esta misma línea de razonamiento, se ha afirmado que una disminución del tono vasodepresor adrenérgico en el NTS puede considerarse como indicador bioquímico de la reducción del funcionalismo del reflejo barorreceptor (Yukimura y cols. 1981a). Dicha reducción se pone de manifiesto durante las primeras fases de la hipertensión lábil (Krieger 1988), y estaría, en nuestro modelo de estrés, en consonancia con la inhibición del arco barorreflejo provocada por los opioides endógenos liberados, tal y como ha sido demostrado por diversos autores para distintos agonistas opiáceos (Petty y Reid 1982; Gordon 1990).

Coincidiendo también con nuestros resultados, estos autores (Fuxe y cols. 1975) no observaron modificaciones de la actividad dopaminérgica hipotalámica de ratas SHR respecto a sus controles WKY. La misma ausencia de efecto sobre este sistema de neurotransmisión observada en nuestro modelo no excluiría, totalmente, la participación de las neuronas dopaminérgicas en el desarrollo de la hipertensión, ya que, de nuevo, las terminales dopaminérgicas en hipotálamo, no sólo desempeñan funciones cardiovasculares, sino también comportamentales y neuroendocrinas (Hökfelt y cols. 1973), funciones éstas que son patentes en el transcurso del estrés, y que podrían contrarrestar el efecto cardiovascular intrínseco de las mismas.

Esta explicación puede hacerse extensible para justificar la discrepancia entre la inalterabilidad de la actividad adrenérgica hipotalámica observada por estos autores y la disminución obtenida en nuestro caso, ya que para las ratas SHR, al tratarse de un modelo experimental de hipertensión no relacionado con el estrés, no se manifestarían otras variaciones bioquímicas asociadas al mismo.

En cuanto a la disminución de la velocidad de renovación de NA en hipotálamo que se observaba en las ratas aisladas, y que se manifestaba por un descenso muy significativo de los niveles de MHPG, los resultados son coincidentes con los obtenidos para otros modelos experimentales de hipertensión. Así, Wijnen

y cols. (1980) hallaron una disminución de la actividad de este sistema de neurotransmisión en hipotálamo de ratas SHR, disminución que no parecía ser el resultado de un reflejo fisiológico compensatorio desencadenado con objeto de reducir la presión arterial en estos animales, como ha sugerido Saavedra (1981). De hecho, el tono noradrenérgico se mantenía deprimido cuando se producía un descenso de la presión arterial tras realizar una transección espinal. Igualmente, De Champlain y Van Ameringen (1981), detectaron, en cerebro medio de ratas DOCA-salt, un descenso de la velocidad de renovación de NA.

Mitchell y Lawler (1989) han sugerido, del mismo modo, la participación del sistema noradrenérgico hipotalámico en la génesis de la hipertensión, al observar que ratas BHR con hipertensión lábil y sometidas a un modelo de estrés consistente en la aplicación repetida de shocks eléctricos en la cola (manipulación que habían demostrado previamente inducía una elevación de la presión arterial) presentaban una disminución de la velocidad de renovación de NA en los núcleos ventromedial y paraventricular del hipotálamo. En el caso de estos últimos autores, dicha disminución podría asociarse en hipotálamo a una reducción de la actividad noradrenérgica en la región anterior, zona diencefálica a la cual se atribuye una función vasodepresora (Philippu y cols. 1979).

El sentido de los cambios observados en la actividad noradrenérgica de las ratas aisladas, en relación a las modificaciones halladas en otras formas de estrés descritas por diversos investigadores, merece un comentario especial, ya que, si durante el estrés agudo parece verificarse una activación del sistema noradrenérgico en distintas regiones cerebrales, necesaria para responder a las demandas más inmediatas del organismo (Dunn 1988; Tanaka y cols. 1988), no ocurre, sin embargo, lo mismo cuando el estrés es persistente y tiene un carácter crónico o semicrónico.

En estas condiciones (estrés crónico), el resultado observado en la mayoría de los casos es un aumento de la concentración de catecolaminas cerebrales (Adell y cols. 1988; Hata y cols. 1987; Anisman y cols. 1987). Según estos últimos autores, la aplicación crónica del estrés produciría un incremento compensatorio de la síntesis de las aminas para cubrir el descenso del "pool" intraneuronal, producido por la movilización continua de las mismas, de modo que el incremento en los niveles de los neurotransmisores observado sería consecuencia de un aumento de la síntesis, más que de una disminución de su utilización. Esto no deja de ser, sin embargo, una hipótesis, puesto que, tanto en los estudios de Anisman y cols., como

en los de Kvetnansky y cols. (1977), que postulaban un mecanismo similar, no se realizaron determinaciones paralelas de la actividad de TH, evaluación que se hace necesaria para confirmar si efectivamente la síntesis se encuentra alterada.

En el modelo de privación social, este extremo no pudo ser confirmado. Por el contrario, tanto en bulbo raquídeo como en hipotálamo, el aislamiento se asoció a una disminución de la actividad de TH. Dado que este descenso, aunque importante, no llegó a ser estadísticamente significativo sobre la base del número de observaciones realizado, es muy probable que la disminución de las actividades noradrenérgica y adrenérgica se deba a una disminución de la utilización del neurotransmisor, más que a un descenso de la síntesis "per se" como suceso primario. La síntesis estaría, entonces, ligeramente disminuída como consecuencia inmediata e indirecta del descenso de la utilización de ambos neurotransmisores, hecho orientado a mantener una concentración intraneuronal estable de ambas catecolaminas tras la disminución de la utilización a la que se aludía. Esta hipótesis está avalada experimentalmente, ya que, en hipotálamo, donde los niveles de MHPG aparecían notoriamente disminuídos para el grupo de animales aislados, la concentración de NA no estaba aumentada, como cabría esperar, sino que se mantuvo inalterada.

Por último, y haciendo referencia a la actividad de la TH hipotálmica, es posible que el ligero descenso observado refleje, preferentemente, el estado de las neuronas dopaminérgicas tras el estrés, debido a la mayor concentración relativa de éstas sobre las neuronas que constituyen las poblaciones noradrenérgica y adrenérgica en este núcleo cerebral. Puesto que la velocidad de renovación de DA no se modificó por efecto del aislamiento, no es aventurado pensar que las variaciones de la actividad correspondiente a neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas hubieran podido quedar enmascaradas y diluídas por la mayor contribución de la TH de neuronas dopaminérgicas, cuya actividad, evaluada con anterioridad mediante la determinación de la velocidad de renovación, se encontraba inalterada.

6. MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD CATECOLAMINERGICA CENTRAL POR DADLE Y DAGO

Si bien las disminuciones del tono noradrenérgico en hipotálamo y de la actividad adrenérgica en ambas estructuras durante el aislamiento eran evidentes, cabía la posibilidad de que estas variaciones no fueran consecuencia de la acción de los opioides liberados durante el estrés, a pesar de la más que probable existencia de un receptor presináptico sobre terminales catecolaminérgicas (Detlef Taube y cols. 1976; Schoffelmeer y cols. 1988). Ha de tenerse en cuenta que otras sustancias endógenas, como la corticosterona, también liberada desde la glándula adrenal en el transcurso del aislamiento, como había quedado demostrado y con fácil acceso al SNC, es también capaz de reducir la transmisión noradrenérgica en diversos núcleos hipotálamicos (Jhanwar-Uniyal y cols. 1989).

A esta posibilidad, habría que añadir una segunda, ya comentada, en el sentido de que estas variaciones constituyeran un indicador bioquímico de otras alteraciones aparecidas como consecuencia del estrés más que de la propia respuesta hipertensiva.

Con objeto de aclarar, al menos parcialmente, ambas circunstancias, se procedió a evaluar el efecto de la administración exógena, por vía i.c.v, de los agonistas selectivos de los receptores delta y mu opioides, DADLE y DAGO. Este diseño experimental permite visualizar acciones opioides puras y desprovistas ya de interferencias de otros sistemas de neurotransmisión, sobre las actividades noradrenérgica, adrenérgica y dopaminérgica en hipotálamo y bulbo raquídeo, en el momento en el que se alcanza el pico máximo de su efecto presor (10 min). Para este fin, se seleccionaron las dosis de 36 nmol/rata para el DADLE y 18 nmol/rata para el DAGO, dosis que, ensayadas con anterioridad, habían demostrado producir un aumento de presión arterial similar al que se desarrolla en el transcurso del aislamiento.

En hipotálamo no se apreció ninguna variación de la actividad de los tres sistemas de neurotransmisión, tanto cuando se evaluó ésta individualmente, mediante la determinación de la velocidad de renovación, como cuando se examinaron las posibles alteraciones de modo conjunto, mediante la determinación de la actividad de la TH.

Salvando las diferencias entre la administración aguda de agonistas y la liberación continuada de opioides endógenos durante el transcurso del estrés por privación social, la comparación entre ambos grupos de resultados sustentarían la hipótesis, manejada al inicio de este apartado, en el sentido de que, en hipotálamo, las variaciones de las actividades noradrenérgica y adrenérgica durante el estrés serían responsables de otras modificaciones comportamentales y neuroendocrinas más que de la propia respuesta hipertensiva.

En el caso de la NA, si bien se observó un descenso significativo de MHPG tras la administración de ambos péptidos, la disminución de este metabolito no se tradujo en alteraciones de la velocidad de renovación, puesto que se obtenía un efecto compensatorio al realizar el cociente MHPG/NA, como consecuencia del ligero descenso de NA detectado en ambos casos. La disminución simultánea del contenido del metabolito y de la amina podría interpretarse, eventualmente, en términos de una disminución de la síntesis, circunstancia que no se produce en este caso, ya que la actividad de la TH después de la administración de los agonistas opioides es similar en todos los grupos experimentales.

Por lo que respecta al bulbo raquídeo, el DADLE indujo una disminución de los niveles de MHPG sin alterar el contenido de NA, mientras el DAGO provocó una elevación de los niveles de adrenalina. Así pues, en rata consciente, el efecto presor del agonista delta opioide DADLE estaría asociado a una disminución de la velocidad de renovación de NA en bulbo raquídeo, mientras la ocupación del receptor mu produce una disminución de la transmisión adrenérgica. En ninguno de ambos casos el aumento de la presión arterial parece, a la vista de los resultados, consecuencia de alteraciones de la velocidad de renovación de NA y AD a nivel hipotalámico, ni de modificaciones del tono dopaminérgico en ambas estructuras, ya que la velocidad de renovación de DA no se modificó tras la administración de ninguno de ambos péptidos.

En este mismo contexto, cuando se determinó la actividad de la TH, no se observó ninguna variación, por lo que puede afirmarse que, del total de los procesos que podrían ser responsables de las alteraciones observadas en la velocidad de renovación (síntesis, liberación e inactivación), tras la administración de ambos péptidos, no sería la síntesis el evento modificado. Dado que numerosos autores han puesto de manifiesto que la activación del receptor opioide puede modular presinápticamente la liberación de diversos neurotransmisores, y, en concreto, de las catecolaminas (Heijna y cols. 1990; Mulder y cols. 1987; Werling

y cols. 1987), y que, por el momento no existe ninguna evidencia que sugiera una regulación del metabolismo de catecolaminas por opioides, parece razonable pensar que una disminución diferencial (AD para los agonistas μ opioides y NA para los agonistas delta) de la liberación de estos neurotransmisores en bulbo raquídeo sería responsable del aumento de presión arterial.

Estos resultados constituyen la primera evidencia experimental "in vivo" de que, en una estructura cerebral concreta, pueda existir una inhibición selectiva de la transmisión noradrenérgica y adrenérgica, debido a la ocupación de distintos receptores opioides. Hasta la fecha, este fenómeno había sido puesto de manifiesto únicamente "in vitro", y siempre con la ausencia significativa de datos relativos a la regulación de neuronas adrenérgicas por opioides. Así, Schoffelmeer y cols. (1988) hallaron, en una preparación de rebanadas de tejido, que los receptores μ y delta opioides median, presinápticamente la liberación de NA y DA en corteza y estriado respectivamente.

Si se comparan los resultados obtenidos entre la activación pura del receptor μ por administración exógena del agonista DAGO y la activación tónica del mismo receptor por efecto del aislamiento, el único punto de coincidencia, donde se replican los resultados, se refiere a la disminución de la actividad adrenérgica en bulbo raquídeo, por lo que es factible suponer que el resto de las alteraciones sobre el tono catecolaminérgico central durante el estrés no sean debidas a efectos mediados por opioides, o bien que estas modificaciones no repercutan en la respuesta hipertensiva. Desde esta perspectiva y para finalizar, podría hipotetizarse que la activación de los receptores μ opioides en SNC provoca una reducción del tono adrenérgico en bulbo raquídeo, por lo que el aumento de la presión arterial inducido por el DAGO o por el aislamiento podría ser una consecuencia indirecta de la inhibición presináptica de la liberación de adrenalina sobre las terminales de esta estructura cerebral.

El grupo de neuronas que en bulbo raquídeo serían sustrato de esta respuesta, podría quizá ubicarse en el NTS, núcleo bulbar en el cual se ha observado una disminución de la transmisión adrenérgica cuando se provoca experimentalmente un incremento de la presión arterial (Kobilansky y cols. 1988). De modo análogo, el aumento de la presión arterial observado, tanto en los animales sometidos al estrés por privación social como en aquellos tratados con el agonista del receptor μ DAGO, podría estar asociado a una disminución del tono adrenérgico a este nivel.

CONCLUSIONES

1. En las condiciones experimentales establecidas en este trabajo, el estrés producido por privación social en rata da lugar a una respuesta hipertensiva que es sensible, de manera estereoespecífica, a la administración intracerebroventricular (i.c.v) de naloxona, presentando el enantiómero (-) un efecto hipotensor. Además, la administración crónica por infusión continua del antagonista opiáceo es capaz de prevenir el desarrollo de la hipertensión. Ambos hechos, considerados conjuntamente, avalan la hipótesis de que la respuesta hipertensiva al estrés en este modelo experimental se produce, al menos parcialmente, por activación del sistema opioide central.
2. Como prueba adicional de la existencia de un componente opioide en dicha respuesta hipertensiva, el efecto presor de la morfina administrada de forma aguda por vía i.c.v. se encuentra potenciado en los animales aislados. Por otro parte, la respuesta hipertensiva al estrés no se desencadena en ratas tolerantes a morfina, administrada ésta de forma crónica en el agua de bebida.
3. La participación de los péptidos opioides en la respuesta hipertensiva al estrés parece producirse a nivel central y a través de la activación del receptor mu opioide. A favor de esta hipótesis, la administración intracerebroventricular del antagonista específico de dicho receptor, beta-funaltrexamina, revierte el incremento de la presión arterial en los animales aislados.
4. La potenciación del tono opioide cerebral producido por la administración i.c.v. de DADLE -(D-Ala², D-Leu⁵) encefalina- y DAGO -(D-Ala², N-Me-Fen⁴, Gliol⁵) encefalina-, agonistas selectivos de los receptores opiáceos delta y mu respectivamente, produce, tanto en el animal consciente como en las ratas anestesiadas con etiluretano, un incremento dosis-dependiente de la presión arterial que es antagonizable por naloxona, siendo el efecto del DAGO de una potencia dos veces superior al producido por el DADLE. Adicionalmente, se ha observado un incremento de la acción presora de ambos péptidos en el animal anestesiado respecto al obtenido en el animal consciente.
5. La activación tónica del receptor opioide en el transcurso del estrés se acompaña de una disminución de la actividad adrenérgica en bulbo raquídeo e hipotálamo, así como de una reducción de la velocidad de renovación de noradrenalina en esta última estructura.

6. La antedicha disminución observada en el tono adrenérgico durante el estrés parece ser consecuencia de una inhibición de la liberación del neurotransmisor por acción de los opioides sobre el receptor μ , toda vez que la activación farmacológica de dicho receptor por administración de su agonista selectivo, DAGO, produce efectos en el bulbo raquídeo y sobre el sistema adrenérgico análogos a los observados durante el estrés, hecho este que podría contribuir al incremento de la presión arterial.
7. Por su parte, el agonista específico del receptor delta, DADLE, produce una elevación de la presión arterial que se muestra asociada a una reducción selectiva de la transmisión noradrenérgica en bulbo raquídeo.
8. La ausencia de variaciones en la actividad de la tirosina hidroxilasa, tanto frente al estrés como frente a la administración de ambos agonistas, excluye la posibilidad de que las modificaciones en la transmisión adrenérgica y/o noradrenérgica, observadas en ambos casos, sean consecuencia de una alteración en la síntesis de las catecolaminas como evento primario.
9. Los resultados de este trabajo abren nuevas perspectivas terapéuticas sobre la base de la aquí demostrada implicación del sistema opioide en la respuesta presora al estrés, considerando éste como uno de los posibles factores desencadenantes de la hipertensión esencial.

BIBLIOGRAFIA

ABERCROMBIE, D.E. y JACOBS, B.L. (1988). "Systemic naloxone administration potentiates locus coeruleus noradrenergic neuronal activity under stressful but not non-stressful conditions". *Brain Res.*: 441, 362.

ADAMS, J.W., ANDREWS, J.S., HILLER, J.M., SIMON, E.J. y HOLTZMAN, S.G. (1987). "Effects of stress and beta-funaltrexamine pretreatment on morphine analgesia and opioid peptides". *Life Sci.*: 41, 2835.

ADELL, A., GARCIA-MARQUEZ, C., ARMARIO, A. y GELPI, E. (1988). "Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress". *J. Neurochem.*: 50, 1678.

AHTEE, L., ATTILA, L.M.J., CARLSON, K.R. y HAIKALA, H. (1989). "Changes in brain monoamine metabolism during withdrawal from chronic oral self-administration of morphine and in response to a morphine challenge in the withdrawal state". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 249, 303.

AKIL, H., MADDEN, J., PATRICK, R.L. y BARCHAS, J.D. (1976). "Stress induced increase in endogenous opiate peptides: Concurrent analgesia and its partial reversal by naloxone". En: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*. H.W. Kosterlitz (eds.). Elsevier, Amsterdam. 63.

AKIL, H., WATSON, S.J., BERGER, P.A. y BARCHAS, J.D. (1978). "Endorphins, beta-LPH and ACTH: biochemical, pharmacological and anatomical studies". *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*: 18, 125.

AKIL, H., HEWLETT, W.A., BARCHAS, J.D. y LI, C.H. (1980). "Binding of ³-H beta-endorphin to rat brain membranes: Characterization of opiate properties and interaction with ACTH". *Eur. J. Pharmacol.*: 64, 1.

AKIL, H., WATSON, S.J., YOUNG, E., LEWIS, M.E., KHACHATURIAN, H. y WALKER, J.M. (1984). "Endogenous opioids: biology and function". *Ann. Rev. Neurosci.*: 7, 223.

AKIL, H., BRONSTEIN, D. y MANSOUR, A. (1988). "Overview of the endogenous opioid systems: anatomical, biochemical and functional issues". En:

Endorphins, Opiates and Behavioural Processes. R.J. Rodgers y S.J. Cooper (eds.). John Wiley & Sons, Chichester. 1.

ANISMAN, H., IRWIN, J., BOWERS, W., AHLUWALIA, P. y ZACHARKO, R.M. (1987). "Variations on norepinephrine concentrations following chronic stressor application". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 26, 653.

ARMARIO, A. y CASTELLANOS, J.M. (1984). "A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat". *Rev. Esp. Fisiol.*: 40, 437.

ARMARIO, A., ORTIZ, R. y BALASCH, J. (1984). "Effect of crowding on some physiological and behavioural variables in adult male rats". *Physiol. and Behav.*: 32, 35.

ARNDT, J.O. (1987). "Opiate receptors in the CNS and their possible role in cardiovascular control". En: *Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation*. Joseph P. Buckley y Carlos M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 137.

ARTIGAS, F., SARRIAS, M.J., ADELL, A. y GELPI, E. (1986). "Quantification of total MHPG in the rat brain using a non enzymatic hydrolysis procedure. Effects of drugs". *Life Sci.*: 39, 1571.

ATWEH, S.F. y KUHAR, M.J. (1983). "Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain". *Br. Med. Bull.*: 39, 47.

AXELROD, J. y REISINE, T.D. (1984). "Stress hormones: their interaction and regulation". *Science*: 224, 452.

BACHELARD, H., GARDINER, S.M. y BENNETT, T. (1990). "Cardiovascular responses elicited by chemical stimulation of the C1 area of the rostral ventrolateral medulla in conscious, unrestrained rats". *Eur. J. Pharmacol.*: 183, 860.

BEAUMONT, A., FUENTES, J.A., HUGHES, J. y METTERS, K. (1980). "Opioid precursors in striatum". *FEBS. Lett.*: 122, 135.

BEDDELL, C.R., CLARK, R.B., HARDY, G.W., LOWE, L.A., UBATABA, F., VANE, J.R., WILKINSON, S., MILLER, R.J., CHANG, K.J. y CUATRECASAS,

P. (1977). "Structural requirements for opioid activity of analogues of the enkephalin". *Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol.)*: 198, 249.

BELLET, M., ELGHOZI, J.L., MEYER, P., PERNOLLET, M.G. y SCHMITT, H. (1980). "Central cardiovascular effects of narcotic analgesics and enkephalins in rats". *Br. J. Pharmacol.*: 71, 365.

BENARROCH, E.E., GRANATA, A.R., RUGGIERO, D., PARK, D.H. y REIS, D.J. (1986). "Neurons of the C1 area mediate cardiovascular responses initiated from the ventral medullare surface". *Am. J. Physiol. (Regulatory)*: 250, R932.

BENNETT, T. y GARDINER, S.M. (1978). "Corticosteroid involvement in the changes in noradrenergic responsiveness of tissues from rats made hypertensive by short-term isolation". *Br. J. Pharmacol.*: 64, 129.

BENNETT, T. y GARDINER, S.M. (1982). "The influence of naloxone on hemorrhagic hypotension in Brattleboro rats". *J. Physiol.*: 33, 69P.

BLACKBURN, T., BORKOWSKY, K.R., FRIEND, J. y RANCE, M.J. (1986). "On the mechanism of kappa-opioid-induced diuresis". *Br. J. Pharmacol.*: 89, 593.

BLESSING, W.W y REIS, D.J. (1983). "Evidence that GABA- and glycine-like inputs inhibit vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit". *Neurosci. Lett.*: 37, 57.

BLESSING, W.W. (1988). "Depressor neurons in rabbit caudal medulla act via GABA receptors in rostral medulla". *Am. J. Physiol.*: 254, H686.

BLISS, E.L., AILION, J. y ZWANZIGER, J. (1968). "Metabolism of norepinephrine, serotonin and dopamine in rat brain with stress". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 164, 122.

BLOOM, F., BATTENBERG, E., ROSSIER, J., LING, N. y GUILLEMIN, R. (1978). "Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 75, 1591.

BOLME, P., FUXE, K., AGNATI, L.F., BRADLEY, R. y SMYTHIES, J. (1978).

"Cardiovascular effects of morphine and opioid peptides following intracisternal administration in chloralose-anesthetized rats". *Eur. J. Pharmacol.*: 48, 319.

BOLME, P., FUXE, K., JONSSON, G., GANTEN, D., AGNATI, L., ANDERSSON, K., HALLMAN, H., GOLDSTEIN, M. y HÖKFELT, T. (1979). "Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers". Pergamon, Nueva York.

BONHAM, A.C. y JESKE, I. (1989). "Cardiorespiratory effects of DL-homocysteic acid in the caudal ventrolateral medulla". *Am. J. Physiol.*: 256, H688.

BRADFORD, H.F. (1986). *Chemical Neurobiology. An Introduction to Neurochemistry*. W.H. Freeman (ed). Freeman Co, Nueva York.

BRAIN, P. (1985). "What does individual housing mean to a mouse?". *Life Sci.*: 16, 187.

BREZENOFF, H.E. y GIULIANO, R. (1982). "Cardiovascular control by cholinergic mechanisms in the central nervous system". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*: 22, 341.

BROADHURST, A.M. y BRILEY, M. (1988). "Catecholamine and 5-HT synthesis *ex vivo* as an index of *in-vivo* neuronal activity and regulation". *Trends Pharmacol. Sci.*: 9, 349.

BRODIE, D.A. y HANSON, H.M. (1960). "A study of factors involved in the production of gastric ulcers by the restraint technique". *Gastroenterology*: 38, 353.

BRODY, M.J., NATELSON, B.H. y ANDERSON, E.A. (1987). "Task Force 3: Behavioural mechanisms in hypertension". *Circulation*: 76, 95.

BROOKS, D, FOX, P., LOPEZ, R. y SLEIGHT, P. (1978). "The effect of mental arithmetic on blood pressure variability and baroreflex sensitivity in man". *J. Physiol.*: 280, 75P.

BUCCAFASCO, J.J. (1990). "Participation of different brain regions in the anti-narcotic withdrawal action of clonidine in the dependent rat". *Brain Res.*: 513, 8.

BUCKINGHAM, J.C. y COOPER, T.A. (1984). "Differences in Hypothalamo-

Pituitary-Adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine". *Neuroendocrinology*: 38, 411.

BUÑAG, R.D. (1973). "Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure". *J. Appl. Physiol.*: 34, 279.

CALARESU, F.R. y THOMAS, M.R. (1975). "Electrophysiological connection in the brain stem involved in cardiovascular regulation". *Brain. Res.*: 87, 335.

CANNON, W.B. (1932). "The Wisdom of the Body". Norton, Nueva York.

CEASAR, P.M., HAGUE, P., SHARMAN, D.F. y WERDINIUS, B. (1974). "Studies on the metabolism of catecholamines in the central nervous system of the mouse". *Br. J. Pharmacol.*: 51, 187.

CECCATELLI, S., MILLHORN, D.E., HÖKFELT, T. y GOLDSTEIN, M. (1989). "Evidence for the occurrence of an enkephalin-like peptide in adrenaline and noradrenaline neurons of the rat medulla oblongata". *Exp. Brain Res.*: 74, 631.

CHALMERS, J.P., PETTY, M. y REID, J.L. (1979). "Participation of adrenergic and noradrenergic neurons in central connections of arterial baroreceptor reflexes in the rat". *Circ. Res.*: 45, 516.

CHANCE, W.T., WHITE, A.C. KRYNOCK, G.M. y ROSECRAMS, J.A. (1977). "Autoanalgesia: behaviourally activated antinociception". *Eur. J. Pharmacol.*: 44, 283.

CHATELAIN, R.E., MANNIELLO, M.J., DARDIK, B.N., RIZZO, M. y BROSNIHAN, K.B. (1990). "Antihypertensive effects of CGS 19281A, an inhibitor of phenylethanolamine-N-methyltransferase". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 252, 117.

CHAVKIN, C. (1988). "Electrophysiology of opiates and opioid peptides". En: *The Opiate Receptors*. G.W. Pasternak (ed.). The Humana Press, Clifton, Nueva Jersey. 273.

CHEN, C.H., O'LEARY, E.L., JANSSEN, H.F. y LUTHERER, L.O. (1985). "Changes in ambient temperature alter the blood pressure response to endotoxin and the effectiveness of naloxone". *Circ. Shock*: 16, 185.

CHEN, G.G., CHALAZONITIS, A., SHEN, K.F. y CRAIN, S.M. (1988). "Inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase blocks opioid-induced prolongation of the action potential of mouse sensory ganglion neurons in dissociated cell cultures". *Brain Res.*: 462, 372.

CHESSELET, M.F., CHERAMY, A., REISINE, T.D., LUBETZKI, C., GLOWINSKY, J., FOURNIE-ZALUSKY, M.C. y ROQUES, B.P. (1982). "Effects of various opiates including delta and mu agonists on dopamine release from nigrostriatal dopaminergic neurons in vitro and in vivo in the cat". *Life Sci.*: 31, 2291.

CHESSELET, M.F. (1984). "Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis". *Neuroscience*: 12, 347.

CHILDERS, S.R. (1988). "Opioid-coupled second messenger systems". En: *The Opiate Receptors*. G.W. Pasternak (ed.). The Humana Press, Clifton, Nueva Jersey. 231.

CIRIELLO, J. y CALARESU, F.R. (1981). "Projections from buffer nerves to the nucleus of the solitary tract: an anatomical and electrophysiological study in the cat". *J. Auton. Nerv. Syst.*: 3, 299.

COBB, S. y ROSE, R.M. (1973). "Hypertension, peptic ulcer and diabetes in air traffic controllers". *JAMA*: 224, 489.

CONNELL, J.M.C. (1986). "Essential hypertension: rational pharmacotherapy". *Trends Pharmacol. Sci.*: 7, 412.

COOPER, J.R., BLOOM, F.E. y ROTH, R.H. (1986). "The Biochemical Basis of Neuropharmacology". Oxford University Press, Nueva York.

COTTON, R.L., GILES, L., MILLER, L., SHAW, J.S. y TIMMS, D. (1984). "ICI 174,864: A highly selective antagonist for the delta opiate receptor". *Eur. J. Pharmacol.*: 97, 331.

COWLEY, A.W.Jr., LIARD, J.F. y GUYTON, A.C. (1973). "Role of the baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs". *Circ. Res.*: 32, 564.

CURTIS, M.T. y LEFER, A.M. (1980). "Protective actions of naloxone in hemorrhagic shock". *Am. J. Physiol.*: 239, H416.

DAHLSTROM, A. y FUXE, K. (1964). "Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons". *Acta Physiol. Scand.*: 62, 5.

D'AMATO, R. y HOLADAY, J.W. (1984). "Multiple opioid receptors in endotoxic shock: Evidence for delta involvement and mu-delta interactions in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: 8125, 2898.

DAMPNEY, R.A.L. y MOON, E.A. (1980). "Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia". *Am. J. Physiol.*: 239, H349.

DANTZER, R. y MORMEDE, P. (1985). "Stress in domestic animals: A psychoneuroendocrine perspective". En: *Animal Stress*. G. Morbeg (ed.). American Physiological Society, Bethesda. 81.

DAUGE, V., PETIT, F., ROSSIGNOL, P. y ROQUES, B.P. (1987). "Use of mu and delta opioid peptides of various selectivity involvement of mu opioid receptors in supraespal analgesia (tail-flick test)". *Eur. J. Pharmacol.*: 141, 171.

DE CHAMPLAIN, J. Y VAN AMERINGEN, M.R. (1981). "Evidence for the participation of central noradrenergic mechanisms in DOCA-sodium hypertension in the rat". En: *Central Nervous System in Hypertension*. J.P. Buckley y C.M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 141.

DE FELIPE M.C., DE CEBALLOS, M.L. y FUENTES J.A. (1986). "Hypoalgesia induced by antidepressants in mice: A case for opioids and serotonin". *Eur. J. Pharmacol.*: 125, 193.

DE JONG, W. y NIJKAMP, F.P. (1976). "Centrally induced hypotension and bradycardia after administration of alpha-methylnoradrenaline into the area of the nucleus tractus solitarii of the rat". *Br. J. Pharmacol.*: 58, 593.

DELBARRE, B., SENON, B., DUFRAISSE, M. y DUPONT, M. (1978). "Central blood pressure regulation: possible role of opioids". *Soc. Neurosci. Abst.*: 4, 19.

DELBARRE, B., CASSET-SENON, D., DELBARRE, G., SESTILLANGE, P. y CHRISTIN, O. (1982). "Naloxone effects on blood pressure, analgesia and diuresis in spontaneous hypertensive and normotensive rats". *Neurosci. Lett.*: 30, 167.

DELIN, C.O. (1984). "Noisy work and hypertension". *Lancet II*: 8408, 931.

DeQUATTRO, V. (1989). "Primary hypertension, neural tone, and behaviour. Role in pressor responses to stress". *Am. J. Hypertens.*: 2, 345S.

DETLEF TAUBE, H., BOROWSKY, E., ENDO, T. y STARKE, K. (1976). "Enkephalin: a potential modulator of noradrenaline release in rat brain". *Eur. J. Pharmacol.*: 38, 377.

DINGLEDINE, R. (1985). "Opioid peptides: Central nervous system". En: *Neurotransmitter Actions in the Vertebrate Nervous System*. M.A. Rogowski y J.L. Barker (eds.). Plenum Press, Nueva York. 341.

DOTEVALL, G. (1985). "Stress and Common Gastrointestinal Disorders. A Comprehensive Approach". Praeger Publishers, Nueva York.

DOTY, P., PICKER, M.J. y DYKSTRA, L.A. (1989). "Differential cross-tolerance to opioid agonists in morphine-tolerant squirrel monkeys responding under a schedule of food presentation". *Eur. J. Pharmacol.*: 174, 171.

DRUMMOND, P. (1985). "Cardiovascular reactivity in borderline hypertensives during behavioural and orthostatic stress". *Psychophysiology*: 22, 621.

DUGGAN, A.W. y NORTH, R.A. (1983). "Electrophysiology of opioids". *Pharmacol. Rev.*: 35, 219.

DUNN, A. y KRAMARCY, N.R. (1984). "Neurochemical responses in stress: relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and catecholamine systems". En: *Handbook of Psychopharmacology*. Vol. 18. L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder (eds.). Plenum Press, Nueva York. 455.

DUNN, A.J. (1988) "Stress-related changes in cerebral catecholamine and indoleamine metabolism: Lack of effect of adrenalectomy and corticosterone". *J. Neurochem.*: 51, 406.

- DUSTAN, H.P. (1987). "Behavioural factors in hypertension". *Circulation*: 76, 57.
- EDDY, N.B. y LEIMBACH, D. (1953). "Synthetic analgesic II. Dithienyl- butenyl- and dithienylbutylamines". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 107, 385.
- EIPPER, B.A. y MAINS, R.E. (1980). "Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin/endorphin and related peptides". *Endocr. Rev.*: 1, 1.
- ELSWORTH, J.D., ROTH, R.H. y REDMOND, D.E. Jr. (1983). "Relative importance of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and 3,4-dihydroxyphenylglycol as norepinephrine metabolites in rat, monkey, and humans". *J. Neurochem.*: 41, 786.
- ENGEL, B.T. y JOSEPH, J.A. (1982). "Attenuation of baroreflexes during operant cardiac conditioning". *Psychophysiology*: 19, 609.
- FALKNER, B., ONESTI, G., ANGELAKOS, E.T., FERNANDES, M. y LANGMAN, C. (1979). "Cardiovascular response to mental stress in normal adolescents with hypertensive parents". *Hypertension*: 1, 23.
- FALKNER, B., KUSHNER, H., ONESTI, G. y ANGELAKOS, E.T. (1981). "Cardiovascular characteristics in adolescents, who develop essential hypertension". *Hypertension*: 3, 521.
- FELDER, R. y CAREY, R.M. (1987). "Dopamine in cardiovascular function". En: *Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation*. Joseph P. Buckley y Carlos M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 79.
- FERRARI, A.U., DAFFONCHIO, A., ALBERGATI, F. y MANCIA, G. (1986). "Limitations of the tail-cuff method for measuring blood pressure in rats". *J. Hypertens.*: 4, S179.
- FERRARIO, C.M., SCHIAVONE, M.T, BARNES, K.L., BROSNIHAN, K.B. y SPETH, R. (1985). "Role of central mechanisms in the development of endocrine hypertension". En: *Essential Hypertension as an Endocrine Disease*. Christopher R.W. Edwards y Robert M. Carey (eds.). Butterworths International Medical Reviews, Londres. 4.
- FEUERSTEIN, G. y FADEN, A.I. (1982). "Differential cardiovascular effect of mu-

delta-, and kappa-opiate agonists at discrete hypothalamic sites in the anesthetized rat". *Life Sci.*: 31, 2197.

FEUERSTEIN, G., FADEN, A.I. y KRUMINS, S.A. (1984). "Alteration in opiate receptor binding after hemorrhagic shock". *Eur. J. Pharmacol.*: 100, 245.

FEUERSTEIN, G., MOLINEAUX, C.J., ROSENBERGER, J.G., ZERBE, R.L., COX, B.M. y FADEN, A.I. (1985). "Hemorrhagic shock and the central vasopressing and opioid peptide system of rats". *Am. J. Physiol.*: 249, E244.

FEUERSTEIN, G. y SIREN, A.L. (1987a). "The opioid peptides. A role in hypertension?". *Hypertension*: 9, 561.

FEUERSTEIN, G. y SIREN, A.L. (1987b). "Cardiovascular effects of enkephalins". *ISI Atlas Sci. Pharmacol.*: 1, 280.

FLORENTINO, A., JIMENEZ, I., NARANJO, J.R., URDIN, M.C. y FUENTES, J.A. (1987). "Hipotensive effect of naloxone on high blood pressure induced by stress in the rat". *Life Sci.*: 41, 2445.

FLOREZ, J. y MEDIAVILLA, A. (1977). "Respiratory and cardiovascular effects of Met-enkephalin applied to the ventral surface of the brain stem". *Brain Res.*: 138, 585.

FOKKEMA, D.S. y KOOLHAAS, J.M. (1985). "Acute and conditioned blood pressure changes in relation to social and psychosocial stimuli in rats". *Physiol. Behav.*: 34, 33.

FOLKOW, B. (1987). "Psychosocial and central nervous influences in primary hypertension". *Circulation*: 76, 10.

FORSYTH, R.P. (1969). "Blood Pressure responses to long-term avoidance schedules in the restrained rhesus monkey". *Psychosom. Med.*: 31, 300.

FRAIOLI, F., PANERAI, A.E., SANTORO, C., FABBRI, A., SANTORO, F. y ISIDORI, A. (1982). "Control of gonadotropin secretion in man: role of opioid peptides". *Horm. Metab. Res.*: 14, 312.

FRATTA, W., YANG, H.Y.T., HONG, J. y COSTA, E. (1977). "Stability of met-enkephalin content in brain structure of morphinedependent or foot shock stressed rats". *Nature*: 268, 452.

FREDRIKSON, M. (1986). "Behavioral aspects of cardiovascular reactivity in essential hypertension". En: *Biological and Psychological Factors in Cardiovascular Disease*. T.H. Schmidt, T.M. Dembroski y G. Blumchen (eds.). Springer Verlag, Nueva York. 23.

FUENMAYOR, N. y CUBEDDU, L. (1986). "Cardiovascular and endocrine effects of naloxone compared in normotensive and hypertensive patients". *Eur. J. Pharmacol.*: 126, 189.

FULLER, R.W. (1982). "Pharmacology of brain epinephrine neurons". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*: 22, 31.

FURUHASHI, N., TAKAHASHI, Y., KONO, H., SHINKAWA, O., FUKAYA, T. y SUZUKI, M. (1984). "Sex-difference in the human peripheral plasma beta-endorphin and beta-lipotropin levels". *Gynecol. Obstet. Invest.*: 17, 145.

FUXE, K., HÖKFELT, T., BOLME, P., GOLDSTEIN, M. JOHANSSON, O., JONSSON, G., LIDBRINK, P., LJUNGDAHL, y SACHS, C. (1975). "The topography of central catecholamine pathways in relation to possible role in blood pressure control". En: *Central Action of Drugs in Blood Pressure Regulation*. D. S. Davies y J.S. Reid (eds.). Pitman Medical, Londres. 8.

FUXE, K., GANTEN, D., JONSSON, G., BOLME, P., AGNATI, L.F., ANDERSSON, K., GOLDSTEIN, M. y HÖKFELT, T. (1979). "Evidence for a selective reduction of adrenaline turnover in the dorsal medline of the caudal medulla oblongata of young spontaneous hypertensive rats". *Acta. Physiol. Scand.*: 107, 397.

FUXE, K., BOLME, P., AGANTI, L.F., JONSSON, G., ANDERSSON, K., KOHLER, C. y HÖKFELT, T. (1980). "Central Adrenaline Neurons. Basic Aspects and their Role in Cardiovascular Functions". Pergamon, Oxford.

GALENO, T.M., VAN HOESEN, G.W. y BRODY, M.J. (1984). "Central amygdaloid nucleus lesions attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise

stress in the spontaneously hypertensive rat". *Brain Res.*: 291, 249.

GARDINER, S.M. y BENNETT, T. (1977). "The effects of short-term isolation on systolic blood pressure and heart rate in rats". *Med. Biol.*: 55, 325.

GAUTRET, B. y SCHMITT, H. (1985). "Central and peripheral sites for cardiovascular actions of dynorphin (1-13) in rats". *Eur. J. Pharmacol.*: 111, 263.

GLATT, C.E., KENNER, J.R., LONG, J.B. y HOLADAY, J.W. (1987). "Cardiovascular effects of dynorphin A (1-13) in conscious rats and its modulation of morphine bradycardia over time". *Peptides*: 8, 1089.

GLOWINSKI, J. e IVERSEN L.L. (1966). "Regional studies of catecholamines in the rat brain - I". *J. Neurochem.*: 13, 655.

GOLDSTEIN, A., LOWNEY, L.I. y PAL, B.K. (1971). "Stereo-specific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 68, 1742.

GOLDSTEIN, A., TACHIBANA, S., LOWNWEY, L.I., HUNKAPILLER, M. y HOOD, L. (1979). "Dynorphin (1-13), an extraordinary potent opioid peptide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 76, 6666.

GOLDSTEIN, D. (1983). "Plasma catecholamines and essential hypertension: An analytical review". *Hypertension*: 5, 86.

GOLDSTEIN, A., BARRETT, R.W., JAMES, I.F., LOWNEY, L.I., WEITZ, C.J., KNIPMEYER, L.L. y RAPOPORT, H. (1985). "Morphine and other opiates from beef brain and adrenal". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 82, 5203.

GORDON, F.J. (1986). "Central opioid receptors and baroreflex control of sympathetic and cardiovascular function". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 237, 428.

GORDON, F.J. (1990). "Opioids and central baroreflex control: A site of action in the nucleus tractus solitarius". *Peptides*: 11, 305.

GOVONI, S., HANBAUER, I. y HEXUM, T.D. (1981). "In vivo characterization in the mechanisms that secrete enkephalin-like peptides stored in dog adrenal

medulla". *Neuropharmacology*: 20, 639.

GRAF, L. y KENESSEY, A. (1981). "Characterization of proteinases involved in the generation of opioid peptides from beta-lipotropin". En: *Hormonal Proteins and Peptides: Beta-Endorphin*. C.H. Li (ed.). Academic Press, Nueva York. 35.

GRAHAM, J.D.P. (1945). "High blood pressure after battle". *The Lancet*: 1, 239.

GRANATA, A.R. y WOODRUFF, G.N. (1982). "Dopaminergic mechanisms in the nucleus tractus solitarius and effects on blood pressure". *Brain Res. Bull.*: 8, 483.

GRANATA, A.R., RUGGIERO, D.A., PARK, D.H., JOH, T.H. and REIS, D.J. (1985). "Brain stem area with C1 epinephrine neurons mediates baroreflex vasodepressor responses". *Am. J. Physiol.*: 248, H547.

GRANATA, A.R. (1990). "Intracellular study of different cardiovascular non-catecholaminergic neurons in the C1 area in the rostral ventrolateral medulla". *Eur. J. Pharmacol.*: 183, 453.

GROSSMAN, A. (1988). "Opioids and stress in man". *J. Endocr.*: 119, 377.

GROSSMAN, A. (1989). "Stress and the immune response: interactions of peptides, gonadal steroids and the immune system". En: *Frontiers in Stress Research*. H. Weiner, I. Florin, R. Murison y D. Hellhammer (eds.). Hans Hubers Publishers, Toronto. 181.

GUILLEMIN, R., VARGO, T., ROSSIER, J., MINICK, S., LING, N., RIVIER, C., WALE, W. y BLOOM, F. (1977). "Beta-endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland". *Science*: 197, 1367.

GULATI, A., RAMARAO, P. y BHARGAVA, H.N. (1990). "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.

GURILL, N.J. (1983). "Naloxone in endotoxic shock: Experimental models and clinical perspective". En: *Advances in Shock Research*. S. Reichard y D.G. Reynolds (eds.). Alan R. Liss, Nueva York. Vol. 10, 63.

GUTHRIE, J. y BASBAUM, A.I. (1984). "Colocalization of immunoreactive pro-enkephalin and pro-dynorphin products on medullary neurons of the rat". *Neuropeptides*: 4, 437.

GUYENET, P.G. y STORNETTA, R.L. (1982). "Inhibition of sympathetic preganglionic discharges by epinephrine and L-methylepinephrine". *Brain Res.*: 235, 271.

HARBUZ, M.S. y LIGHTMAN, S.L. (1989). "Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat". *J. Endocrinol.*: 122, 705.

HASSEN, A.H., FEUERSTEIN, G. y FADEN, A.I. (1982). "Mu receptors and opioid cardiovascular effects in the NTS of rat". *Peptides*: 3, 973.

HASSEN, A.H., FEUERSTEIN, G. y FADEN, A.I. (1983). "Differential cardiovascular effects mediated by mu and kappa opiate receptors in hindbrain nuclei". *Peptides*: 4, 621.

HASSEN, A.H., FEUERSTEIN, G. y FADEN, A.I. (1984). "Kappa opioid receptors modulate cardiorespiratory function in hindbrain nuclei of rat". *J. Neurosci.*: 4, 2213.

HASSEN, A.H. y FEUERSTEIN, G. (1987). "Mu-opioid receptors in NTS elicit pressor responses via sympathetic pathways". *Am. J. Physiol.*: 252, H156.

HATA, T., KITA, T., KAMANAKA, Y., HONDA, S. KAHEKI, K. KAWABATA, A. y ITOH, E. (1987). "Catecholamine levels in the brain of SART (repeated cold)-stressed rats". *J. Auton. Pharmacol.*: 7, 257.

HEIJNA, M.H., HOGENBOOM, F., SCHOFFELMEER, A.N.M. y MULDER, A.H. (1990). "Opioid receptor-mediated inhibition of dopamine release from basal hypothalamus slices; involvement of both mu and kappa receptors". *Eur. J. Pharmacol.*: 183, 2334.

HENRY, J.P. (1982). "Psychosocial stimulation of mice in complex population cages and the mechanism of cardiomyopathy". En: *Circulation, Neurobiology and Behaviour*. O.A. Smith, R.A. Galosy y S.M. Weiss (eds.). Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York. 267.

HERSH, L.B. (1986). "Minireview: Nomenclature for enkephalin degrading peptidases". *Life Sci.*: 38, 1151.

HILTON, S.M. y SPYER, R.M. (1971). "Participation of the anterior hypothalamus in the baroreceptor reflex". *J. Physiol. Lond.*: 218, 271.

HIMMELSBACH, C.K. (1937). "Studies of certain addiction characteristics of (a) dihydromorphine ("paramorphan"), (b) dihydrodesoxy-morphine-D ("desomorphine"), (c) dihydrodesoxycodine-D ("desocodine") and (d) methyldihydromorphinone ("metopon)". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 67, 239.

HINKLE, L.E.Jr. (1987). "Stress and disease: the concept after 50 years". *Soc. Sci. Med.*: 25, 561.

HNATOWICH, R.J., LABELLA, F.S., KIERNAN, K. y GLAVIN, G.B. (1986). "Cold-restraint stress reduces ³-H Etorfina binding to rat brain membranes: Influence of acute and chronic morphine and naloxone". *Brain Res.*: 380, 107.

HOEGLER, D.B., SOLE, M.J. y LIEW, C.C. (1989). "Rat brain regional preproenkephalin A messenger RNA levels are altered in genetic hypertension". *Am. J. Hypertens.*: 2, 542.

HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M. y JOHANSSON, O. (1973). "Evidence for adrenalin neurons in the rat brain". *Acta Physiol. Scand.*: 89, 286.

HÖKFELT, T., LUNDBERG, J.M., TATEMOTO, K., MUTT, V., TERENIUS, L., POLAK, J., BLOOM, S., SASEK, C., ELDE, R. y GOLDSTEIN, M. (1983). "Neuropeptide Y (NPY) and FMRFamide neuropeptide-like immunoreactivities in catecholamine neurons of the rat medulla oblongata". *Acta Physiol. Scand.*: 117, 315.

HOLADAY, J.W. y FADEN, A.I. (1978). "Naloxone reversal of endotoxin hypertension suggests role of endorphins". *Shock Nature*: 275, 450.

HOLADAY, J.W., RUVIO, B.A., ROBLES, L.E., JOHNSON, C.E. y D'AMATO, R.J. (1982). "M154,129, a putative delta antagonist, reverses endotoxic shock without altering morphine analgesia". *Life Sci.*: 31, 2359.

HOLADAY, J.W. (1983). "Cardiovascular effects of endogenous opiate systems". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*: 23, 541.

HOLADAY, J.W. (1985). "Endogenous Opioids and their Receptors". *Current Concepts Col. Upjohn, Michigan*.

HOLLT, V. (1983). "Multiple endogenous opioid peptides". *Trends Neurosci.*: 6, 24.

HUGHES, J., SMITH, T.W. y KOSTERLITZ, H. (1975). "Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity". *Nature*: 258, 577.

HULSE, G.K. y COLEMAN, G.L. (1984). "Effect of stress on tissue and plasma levels of immunoreactive beta-endorphin in ovariectomized rats primed with oestrogen and progesterone". *J. Endocrinol.*: 100, 271.

IJIMA, I., MINAMIKAWA, J., JACOBSON, A.E., BROSSI, A., RICE, K.C. y KLEE, W.A. (1978). "Studies in the (+)-morphinan series. 5. Synthesis and biological properties of (+)-naloxone". *J. Med. Chem.*: 21, 398.

ILLES, P., PFEIFFER, N., KÜGELEGEN, I. y STARKE, K. (1985a). "Presynaptic opioid receptor subtypes in the rabbit ear artery". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 232, 526.

ILLES, P., RAMME, D. y STARKE, K. (1985b). "Inhibition of neuroeffector transmission in the rabbit mesenteric artery by Met⁵ enkephalin". *Eur. J. Pharmacol.*: 107, 397.

IMAIZUMI, T., GRANATA, A.R., BENERROCH, E.E., SVED, A.F. y REIS, D.J. (1985). "Contributions of arginine vasopressin and the sympathetic nervous system to fulminating hypertension after destruction of neurons of caudal ventrolateral medulla in the rat". *J. Hypertens.*: 3, 491.

INABA, M., KAMATA, K. y KAMIDE, M. (1981). "Effects of adrenal demedullation and peripheral noradrenaline-depleting agents on adrenocortical function and spleen in rats". *Japan J. Pharmacol.*: 31, 787.

IOMORI, K., TANAKA, M., KOHNO, Y., IDA, Y., NAKASAWA, R., HOAKI,

Y., TSUDA, A. y NAGASAKI, N. (1982). "Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 16, 637.

ITZHAK, Y. (1988). "Multiple opioid binding sites". En: *The Opiate Receptors*. G.W. Pasternak (ed.). The Humana Press, Clifton, Nueva Jersey. 95.

IUVONE, P.M., MORASCO, J. y DUNN, A.J. (1977). "Effect of corticosterone on the synthesis of ³H catecholamines in the brains of the CD-mice". *Brain Res.*: 120, 571.

IVERSEN, L.L. (1978). *Handbook of Psychopharmacology*. Vol 3. L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder (eds.). Plenum Press, Nueva York. 381.

JHANWAR-UNIYAL, M., RENNER, K.J., BAILO, M.T., LUINE, V.N. y LEIBOWITZ, S.F. (1989). "Corticosterone-dependent alterations in utilization of catecholamines in discrete areas of rat brain". *Brain Res.*: 500, 247.

JOHNSTON, C.A., SPINEDI, E. y NEGRO-VILAR, A. (1985). "Effect of acute ether stress on monoamine metabolism in median eminence and discrete hypothalamic nuclei of the rat brain and on anterior pituitary hormone secretion". *Neuroendocrinology*: 41, 83.

JONSSON, A. y HANSSON, L. (1977). "Prolonged exposure to a stressful stimulus (noise) as a cause of raised blood pressure in man". *Lancet*: 8, 86.

JORDAN, D. Y SPYER, K.M. (1986). "Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity". *Prog. Brain Res.*: 67, 295.

JULIUS, S., PASCUAL, A.V. y SANNERSTEDT, R. (1971). "Relationship between cardiac output and peripheral resistance in borderline hypertension". *Circulation*: 43, 382.

JULIUS, S. y JOHNSON, E.H. (1985). "Stress, autonomic hyperactivity and essential hypertension: an enigma". *J. Hypertension*: 3, S11.

KALIN, N.H., CARNES, M., BARKSDALE, C.M., SHELTON, S.E., STEWART, R.D. y RISCH, S.C. (1985). "Effects of acute behavioural stress on plasma and

cerebrospinal fluid ACTH and beta-endorphin in rhesus monkeys". *Neuroendocrinology*: 40, 97.

KANT, G.J., MOUGEY, E.H. y MEYERHOFF, J.L. (1986). "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.

KAROUM, F., MOYER-SCHWING, J., POTKIN, S.G. y WYATT, R.J. (1977). "Presence of free, sulfate, and glucuronide conjugated 3-methoxy-4-hydroxy phenylglycol (MHPG) in human brain. Cerebrospinal fluid and plasma". *Brain Res.*: 125, 333.

KEIM, K.L. y SIGG, E.B. (1976). "Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 4, 289.

KELLER-WOOD, M.E. y DALLMAN, M.F. (1984). "Corticosteroid inhibition of ACTH secretion". *Endocr. Rev.*: 5, 1.

KHACHATURIAN, H., LEWIS, M.E., SCHÄFER, M.K-H. y WATSON, S.J. (1985). "Anatomy of the CNS opioid systems". *Trends Neurosci.*: 8, 111.

KHAVARI, K.A., PETERS, T.C. y BAITY, P.L. (1975). "Voluntary morphine ingestion, morphine dependence, and recovery from withdrawal signs". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 3, 1093.

KIMURA, T., OTA, K., MATSUI, K., IITAKE, K., SHOJI, M., INOUE, M., YOSHINAGA, K. y SHARE, L. (1985). "The presence of methionine-enkephalin in plasma and urine in normal human subjects and various patients". *Endocrinol. Japon.*: 32, 517.

KIRITSY-ROY, J.A., MARSON, L. y VAN LOON, G.R. (1989). "Sympathoadrenal, cardiovascular and blood gas responses to highly selective mu and delta opioid peptides". *Eur. J. Pharmacol.*: 251, 1096.

KITCHEN, I. y ROWAN, K.M. (1984). "Differences in the effects of mu- and delta-opioid receptor antagonists upon plasma corticosterone levels in stressed mice". *Eur. J. Pharmacol.*: 101, 153.

KOBILANSKY, C. LAZINGER, I. y PHILIPPU, A. (1988). "Release of endogenous catecholamines in the nucleus tractus solitarii during experimentally induced blood pressure changes". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*: 337, 125.

KOPIN, I.J. (1985). "Catecholamine Metabolism: basic aspects and clinical significance". *Pharmacol. Rev.*: 37, 333.

KOSKI, G. y KLEE, W.A. (1981). "Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 78, 4309.

KOYAMA, S., TERADA, N., SHIOJIMA, Y. y TAKEUCHI, T. (1985). "Some species differences in cardiovascular responses to intravenously injected leucine-enkephalin". *Experientia*: 41, 1394.

KRAFT, K., THEOBALD, R., KOLLOCH, R. y STUMPE, K.O. (1987). "Normalization of blood pressure and plasma concentrations of beta-endorphin and leucine-enkephalin in patients with primary hypertension after treatment with clonidine". *J. Cardiovasc. Pharmacol.*: 10 (Sup. 12), S147.

KRIEGER, D.T., BROWNSTEIN, M.J. y MARTIN, J.B. (1983). "Brain Peptides". Wiley (ed.). Nueva York.

KRIEGER, E.M. (1988). "Mechanisms of complete baroreceptor resetting in hypertension". *Drugs*: 35, 98.

KVETNANSKY, R. y MIKULAJ, L. (1970). "Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress". *Endocrinology*: 87, 738.

KVETNANSKY, R., PALKOVITS, M., MITRO, A., TORDA, T. y MIKULAJ, L. (1977). "Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats". *Neuroendocrinology*: 23, 257.

LAMOTTE, C., PERT, C.B. y SNYDER, S.H. (1976). "Opiate receptor binding in primate spinal cord: Distribution and changes after dorsal root section". *Brain Res.*: 112, 407.

LANG, R.E., BRUCKNER, U.B., KEMPF, B., RASCHER, W., STERM, V.,

UNGER, T., SPECK, G. y GANTEN, D. (1982). "Opioid peptides and blood pressure regulation". *Clin. Exp. Hypertension*: A4, 249.

LANGER, S.Z. (1981). "Presynaptic regulation of the release of catecholamines". *Pharmacol. Rev.*: 32, 337.

LANGEWITZ, W. y RÜDDEL, h. (1987). "Applied psychophysiology in hypertension". *J. Clin. Hypertens.*: 3, 381.

LATIMER, L.G., DUFFY, P. y KALIVAS, P.W. (1987). "Mu opioid receptor involvement in enkephalin activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 241, 328.

LAWLER, J.E., BARKER, G.J., HUBBARD, J.W., COX, R.H. y RANDALL, G.W. (1984). "Blood pressure and plasma renin activity responses to chronic stress in the borderline hypertensive rat". *Physiol. and Behav.*: 32, 101.

LAZARUS, R.S. (1966). "Psychological Stress and the Coping Process". McGraw-Hill, Nueva York.

LEGER, L., CHARNAY, Y., CHAYVIALLE, J.A., BEROD, A., DRAY, F., PUJOL, J.F., JOUVET, M. y DUBOIS, P.M. (1983) "Localization of substance P and enkephalin-like immunoreactivity in relation to catecholamine-containing cells bodies in the cat dorsolateral pontine tegmentum: an immunofluorescence study". *Neuroscience*: 8, 525.

LEMAIRE, I., TSENG, I. y LEMAIER, S. (1978). "Systemic administration of beta-endorphin: potent hypotensive effect involving a serotonergic pathway". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 75, 6240.

LEWIS, J.W., TERMAN, G.W., WATKINS, L.R., MAYER, D.J. y LIEBESKIND, J.C. (1982). "Adrenal medullary enkephalin-like peptides may mediate opioid stress analgesia". *Science*: 217, 557.

LEWIS, M.E., YOUNG, E.A., HOUGHTON, R.A., AKIL, H. Y WATSON (1984). "Binding of ³-H dynorphin A to apparent kappa opioid receptors in deep layers of guinea pig cerebral cortex". *Eur. J. Pharmacol.*: 98, 149.

LI, C.H. y CHUNG, D. (1976). "Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 73, 1145.

LIGHTMAN, S.L. y YOUNG, W.S. III (1987). "Changes in hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal". *Nature*: 328, 643.

LIM, A.T.W. y FUNDER. J.W. (1983). "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.

LINDBERG, I. y YANG, H.Y-T. (1984). "Distribution of Met⁵-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-immunoreactive peptides in rat brain: Presence of multiple molecular forms". *Brain Res.*: 299, 73.

LIVETT, B.G., DEAN, D.M., WHELAN, L.G., UDENFRIEND, S. y ROSSIER, J. (1981). "Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells". *Nature*: 289, 317.

LONG, J.B., PETRAS, J.M. y HOLADAY, J.W. (1988). "Neurologic deficits and neuronal injury in rats resulting from nonopioid actions of the delta opioid receptor antagonist ICI 174864". *Eur. J. Pharmacol.*: 244, 1169.

LORD, J.A.H., WATERFIELD, A.A., HUGHES, J. y KOSTERLITZ, H.W. (1977). "Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors". *Nature*: 267, 495.

LORENZ, R.G., SAPER, C.B., WONG, D.L., CIARANELLO, R.D. y LOEWY, A.D. (1985). "Co-localization of substance P and phenylethanolamine N-methyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the ventrolateral medulla that project to the spinal cord: potential role in control of vasomotor tone". *Neurosci. Lett.*: 55, 255.

LUDBROOK, J. MANCIA, G. y ZANCHETTI, A. (1980). "Does the baroreceptor heart rate reflex indicate the capacity of the arterial baroreceptors to control blood pressure ?". *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*: 7, 499.

LUMPKIN, M.D., SAMSON, W.K. y McCANN, S.M. (1983). "Hypothalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat". *Endocrinology*: 112, 1711.

LUQUE OTERO, M. (1987). "Repercusión del tratamiento antihipertensivo crónico sobre la calidad de vida". *Med. Clin.*: 89, 598.

LLORENS-CORTES, C. y SCHWARTZ, J.C. (1984). "Changes in turnover of cerebral monoamines following inhibition of enkephalin metabolism by tiorphan and bestatin". *Eur. J. Pharmacol.*: 104, 369.

MACK, K.J., LEE, M.F. y WEYHENMEYER, J.A. (1985). "Effects of guanyl nucleotides and ions on kappa opioid binding". *Brain Res. Bull.*: 14, 301.

MADDEN, J., AKIL, K., PATRICK, R.L. y BARCHAS, J.D. (1977). "Stress induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat". *Nature*: 265, 358.

MAGGI, C.A. y MELI, A. (1986). "Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system". *Experientia*: 42, 292.

MAIEWSKY,S., MULDOON,S. y MUELLER, G.P. (1984) "Anesthesia and stimulation of pituitary beta-endorphin release in rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 176, 268.

MAINS, R.E. y EIPPER, B.A. (1981). "Differences in the post-translational processing of beta-endorphin in rat anterior and intermediate pituitary". *J. Biol. Chem.*: 256, 5683.

MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M.E., AKIL, H. y WATSON, S.J. (1988). "Anatomy of CNS opioid receptors". *Trends Neurosci.*: 11, 308.

MARSON, L., KIRITSY-ROY, J.A. y VAN LOON, G.R. (1989). "Mu opioid peptide modulation of cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress". *Am. J. Physiol.*: 257, R901.

MARTIN, W.R., EADES, C.G, THOMPSON, J.A., HUPPLER, R.E. y GILBERT,

P.E.(1976). "The effects of morphine and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 197, 517.

MARTINEZ, J.A., VARGAS, M.L., FUENTE, T., DEL RIO GARCIA, J. y MILANES, M.V. (1990). "Plasma beta-endorphin and cortisol levels in morphine-tolerant rats and in naloxone-induced withdrawal". *Eur. J. Pharmacol.*: 182, 117.

MARTNER, J. y BIBER, B. (1982). "Anesthesia and cardiovascular regulation". *Acta Anesth. Scan. Suppl.*: 76, 20.

MASON, J.W. (1971). "A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory". *J. Psychiatr. Res.*: 8, 323.

MAY, C.N., DASHWOOD, M.R., WHITEHEAD, C.J. y MATHIAS, C.J. (1989). "Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution". *Br. J. Pharmacol.*: 98, 903.

McCARTY, R. (1985). "Sympathetic-adrenal medullary and cardiovascular responses to acute cold stress in adult and aged rats". *J. Auton. Nerv. Sys.*: 12, 15.

McCUBBIN, J.A., SURWIT, R.S. y WILLIAMS, R.B.Jr. (1985). "Endogenous opiate peptides, stress reactivity, and risk for hypertension". *Hypertension*, 7, 808.

McCUBBIN, J.A., SURWIT, R.S. y WILLIAMS, R.B.Jr. (1988). "Opioid dysfunction and risk for hypertension: Naloxone and blood pressure responses during different types of stress". *Psychosom. Med.*: 50, 8.

McINTOSH, T., PALTER, M., YESTON, N., GERSTEIN, L. y EGDAHL, R. (1984). "Efficacy of high dose naloxone and nalbuphine in baboon hemorrhagic shock". *Proc. Eur. Shock Soc.*: 22.

MEEK, J.L. y NEFF, H. (1973). "The rate of formation of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylenglycol sulfate in brain as an estimate of the rate of formation of norepinephrine". *Eur. J. Pharmacol.*: 184, 570.

METZGER, J.M. y STEIN, E.A. (1984). "Beta-endorphin and sprint training". *Life Sci.*: 34, 1541.

MILLAN, M.J., PREZEWLOCKI, R., JERLICZ, M., GRAMICH, C., HOFT, V. y HERTZ, A. (1981). "Stress induced release of brain and pituitary beta-endorphin: major role of endorphins in generation of hypothermia, not analgesia". *Brain Res.*: 208, 325.

MIURA, M. y REIS, D.J. (1972). "The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baro- and chemoreceptors". *J. Physiol.*: 223, 525.

MITCHELL, V.P., y LAWLER, J.E. (1989). "Norepinephrine content of discrete brain nuclei in acutely and chronically stressed borderline hypertensive rats". *Brain Res. Bull.*: 22, 545.

MORILAK, D.A., SOMOGYI, P., McILHINNEY, R.A.J. y CHALMERS, J. (1989). "An enkephalin-containing pathway from nucleus tractus solitarius to the pressor area of the rostral ventrolateral medulla of the rabbit". *Neurosci.*: 31, 187.

MORLEY, J.E., ELSON, M.K. y LEVINE, A.S. (1982). "The effects of stress on central nervous system concentrations of the opioid peptide, dynorphin". *Peptides*: 3, 901.

MULDER, A., HOGENBOOM, F., WARDEH, G. y SCHOFFELMEER, A.N.M. (1987). "Morphine and enkephalins potently inhibit ³-H noradrenaline release from rat brain cortex synaptosomes. Further evidence for a presynaptic localization of mu-opioid receptors". *J. Neurochem.*: 48, 1043.

MUNCK, A., GUYRE, P.M. y HOLBROOK, N.J. (1984). "Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions". *Endocr. Rev.*: 5, 25.

MURISON, R.C.C. e ISAKSEN, E. (1982). "Gastric ulceration and adrenocortical activity after inescapable and escapable pre-shock in rats". *Scand. J. Psychol. Suppl.*: 133.

NAGATSU, T., OKA, K. y KATO, T. (1979). "Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*: 163, 247.

NAKAO, K., NAKAI, Y., JINGAMI, H., OKI, S., FUKATA, J. e IMURA, H. (1979). "Substantial rise of plasma beta-endorphin levels after insulin-induced hypoglycemia in human subjects". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*: 49, 838.

NARANJO, J.R. y FUENTES, J.A. (1985). "Association between hypoalgesia and hypertension in rats after short-term isolation". *Neuropharmacology*: 24, 167.

NARANJO, J.R., FERNANDEZ-ROMAN, M., URDIN, M.C. y FUENTES, J.A. (1985). "Beta-endorphin: A common factor in the antihypertensive action of clonidine-type imidazolines in spontaneously hypertensive rats". *Gen. Pharmacol.*: 16, 287.

NARANJO, J.R., URDIN, M.C., BORRELL, J. y FUENTES, J.A. (1986). "Evidence for a central but not adrenal, opioid mediation in hypertension induced by brief isolation in the rat". *Life Sci.*: 38, 1923.

NATELSON, B.H., TAPP, W.N., ADAMUS, J.E., MITTLER, J.C. y LEVIN, B.E. (1981). "Humoral indices of stress in rats". *Physiol. and Behav.*: 26, 1049.

NATHAN, M.A. y REIS, D.J. (1977). "Chronic labile hypertension produced by lesions of the nucleus tractus solitarius in cat". *Circ. Res.*: 40, 72.

NATHAN, M.A., TUCKER, L.W., SEVERINI, W.P. y REIS, D.J. (1978). "Enhancement of conditioned arterial pressure responses in cats after brainstem lesions". *Science*: 201, 71.

McNICHOLAS, L.F. y MARTIN, W.R. (1984). "New and experimental therapeutic roles for naloxone and related opioid antagonists". *Drugs*: 27, 81.

NICOLL, R.A. (1982). "Responses of central neurons to opiates and opioid peptides". En: *Regulatory Peptides: from Molecular Biology to Function*. E. Costa y M. Trabucchi (eds.). Raven Press, Nueva York. 337.

NORTH, R.A., WILLIAMS, J.T., SURPRENANT, A. y CHRISTIE, M.J. (1987). "Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 84, 5487.

NUNG JANG, Y. y YEH JAN, L. (1983). "A LHRH-like peptidergic

neurotransmitter capable of action at a distance in autonomic ganglia". *Trends in Neurosci.*: 6, 320.

NYGREN, L.G. y OLSON, L. (1977). "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.

O'DONOHUE, T.L. y DORSA, D.H. (1982). "The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine systems". *Peptides*: 3, 353.

OWENS, P.C. y SMITH, R. (1987). "Opioid peptides in blood and cerebrospinal fluid during acute stress". *Batlière's Clin. Endocr. Metab.*: 2, 415.

PARATI, G., POMIDOSSI, G., CASADEI, R., RAVOGLI, A., GROPELLI, A., CESANA, B. y MANCIA, G. (1988). "Comparison of the cardiovascular effects of different laboratory stressors and their relationship with blood pressure variability". *J. Hypertens.*: 6, 1.

PASTERNAK, G.W., CHILDERS, S.R. y SNYDER, S.H. (1980). "Opiate analgesia: Evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptors". *Science*: 208, 514.

PASTERNAK, G.W. (1988). "Multiple mu opiate receptors". *ISI Atlas Sci. Pharmacol.*: 148.

PATERSON, S.J., ROBSON, L.E. y KOSTERLITZ, H.W. (1983). "Classification of opioid receptors". *Br. Med. Bull.*: 39, 31.

PATEL, K.P. y SCHMID, P.G. (1987). "The role of central noradrenergic pathways in the actions of vasodepressing on baroreflex control of circulation". En: *Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation*. Joseph P. Buckley y Carlos M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 53.

PERHACH, J.L., FERGUSON, H.C. y MCKINNEY, G.R. (1975). "Evaluation of antihypertensive agents in the stress-induced hypertensive rat". *Life Sci.*: 16, 1731.

PERT, C.B. y SNYDER, S.H. (1973). "Demonstration in nervous tissue". *Science*: 179, 1011.

- PETKOV, V.V., KONSTANTINOVA, T. y GRACHOVSKA, T. (1985). "Changes in brain opiate receptors in rats with isolation syndrome". *Pharmacol. Res. Com.*: 17, 575.
- PETTY, M.A. y REID J.L. (1982). "The effect of opiates on arterial baroreflex function in the rabbit". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*: 319, 206.
- PETTY, M.A., DE YONG, W. y DE WIED, D. (1982). "An inhibitory role of beta endorphin in central cardiovascular regulation". *Life Sci.*: 30, 1835.
- PFEFFER, J.M., PFEFFER, M.A. y FROLICH, E.D. (1971). "Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats". *J. Lab. Clin. Med.*: 78, 952.
- PFEIFFER, A., FEUERSTEIN, G., FADEN, A. y KOPIN, I.J. (1982). "Evidence for an involvement of mu-, but not delta- or kappa-opiate receptors in sympathetically and parasympathetically mediated cardiovascular responses to opiates upon anterior hypothalamic injection". *Life Sci.*: 31, 1279.
- PFEIFFER, A., FEUERSTEIN, G., ZERBE, R.L., FADEN, A.I. y KOPIN, I.J. (1983a). "Mu-receptors mediate opioid cardiovascular effects at anterior hypothalamic pathways". *Endocrinology*: 113, 929.
- PFEIFFER, A., FEUERSTEIN, G., KOPIN, I.J. y FADEN, A.I. (1983b). "Cardiovascular and respiratory effect of mu-, delta- and kappa-opiate agonists micro-injected into the anterior hypothalamic brain area of awake rats". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 225, 735.
- PHILIPPU, A., DIETL, H. y SINHA, J.N. (1979). "In vivo release of endogenous catecholamines in the hypothalamus". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*: 308, 137.
- PHILIPPU, A., DIETL, H. y EISERT, A. (1981). "Hypotension alters the release of catecholamines in the hypothalamus of the conscious rabbit". *Eur. J. Pharmacol.*: 69, 519.
- PLOTSKY, P.M. y VALE, W. (1984). "Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal

circulation and its inhibition by glucocorticoids". *Endocrinology*: 144, 164.

PLOTSKY, P.M., CUNNINGHAM, E.T. Jr. y WIDMAIER, E.P. (1989). "Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion". *Endocr. Rev.*: 10, 437.

PORRECA, F., MOSBERG, H.I., OMNAAS, J.R., BURKS, T.F. y COWAN, A. (1987). "Supraespal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 240, 890.

QUOCK, R.M., VAUGHN, L.K. y KOUCHICH, F.J. (1984). "Influence of chronic naloxone treatment on development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*: 325, 88.

RABKIN, J.G. y STRUENING, E.L. (1976). "Life events, stress and illness". *Science*: 194, 1013.

RANDICH, A. y CALLAHAN, F. (1986). "(D-Ala²)-methionine enkephalinamide (DALA): characterization of antinociceptive, cardiovascular, and autonomic nervous system actions in conscious and pentobarbital-anesthetized rats". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 25, 641.

REID, R.L y YEN, S.S.C. (1981). "Beta-endorphin stimulates the secretion of insulin and glucose in humans". *J. Clin. End. Metab.*: 52, 592.

REIS, D.J. (1981). "The brain and arterial hypertension: evidence for a neural-imbalance hypothesis". En: *Disturbances in Neurogenic Control of the Circulation*. F.A. Abboud, H.A. Fozzard, J.P. Gilmore y D.J. Reis (eds.). American Physiological Society, Williams and Wilkins, Bethesda. 87.

REIS, D.J., ROSS, C., GRANATA, A.R. y RUGGIERO, D.A. (1987). "Role of C1 area of rostroventrolateral medulla in cardiovascular control". En: *Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation*. Joseph P. Buckley y Carlos M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 1.

REIS, D.J. y LEDOUX, J.E. (1987). "Some central neural mechanisms governing resting and behaviourally coupled control of blood pressure". *Circulation*: 76, 2.

REISINE, T., AFFOLTER, H.U., ROUGON, G. y BARBET, J. (1986). "New insights into the molecular mechanisms of stress". *Trends Neurosci.*: 9, 574.

RHEE, H.M. y HENDRIX, D.W. (1989). "Effects of stress intensity and modality on cardiovascular system: an involvement of opioid system". En: *Molecular Biology of Stress*. S. Breznitz y O. Zinder (eds.). Alan R. Liss, Inc., Nueva York. 87.

RICHARDSON MORTON, K.D., VAN DE KAR, L.D., BROWNFIELD, M.S., LORENS, S.A., NAPIER, T.C. y URBAN, J.H. (1990). "Stress-induced renin and corticosterone secretion is mediated by catecholaminergic nerve terminals in the hypothalamic paraventricular nucleus". *Neuroendocrinology*: 51, 320.

RIVIER, C.L. y PLOTSKY, P.M. (1986). "Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion". *Annu. Rev. Physiol.*: 48, 475.

ROCKHOLD, R.W., CROFTON, J.T. y SHARE, L. (1980). "Increased pressor responsiveness to enkephalin in spontaneously hypertensive rats: The role of vasopressin". *Clin. Sci.*: 59, 235S.

ROCKHOLD, R.W., CROFTON, J.T. y SHARE, L. (1981). "Vasopressin release does not contribute to pressor action of enkephalin in SHR". *Hypertension*: 3, 410.

ROSA, C., GHIONE, S., PANATTONI, E., MEZZASALMA, L. y GIULIANO, G. (1986). "Comparison of pain perception in normotensives and borderline hypertensives by means of a tooth pulp-stimulation test". *J. Cardiovasc. Pharmacol.*: 8 (Sup. 5), S125.

ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A. y REIS, D.J. (1985). "Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla". *J. Comp. Neurol.*: 242, 511.

ROSSIER, J., GUILLEMIN, R. y BLOOM, F. (1978). "Foot-sock induced stress decreases leu⁵-enkephalin immunoreactivity in rat hypothalamus". *Eur. J. Pharmacol.*: 48, 465.

ROSSIER, J., FRENCH, E., RIVIER, C., SHIBASAKI, T., GUILLEMIN, R. y BLOOM, F. (1980). "Stress-induced release of prolactin: blockade by dexamethasone and nalozone may indicate beta-endorphin mediation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 77, 666.

ROUTLEDGE, C.W. y MARS DEN, C.A. (1988). "Adrenaline in the CNS and the action of antihypertensive drugs". *Trends Pharmacol. Sci.*: 9, 209.

SAAVEDRA, J.M. (1981). "Naloxone reversal decrease in pain sensitivity in young and adult spontaneously hypertensive rats". *Brain Res.*: 201, 471.

SAAVEDRA, J.M. (1981). "Central biogenic amines and neuropeptides in genetic hypertension". En: *Central Nervous System in Hypertension*. J.P. Buckley y C.M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 129.

SAAVEDRA, J.M. (1982). "Changes in dopamine, noradrenaline and adrenaline in specific septal and preoptic nuclei after acute immobilization stress". *Neuroendocrinology*: 35, 396.

SANDER, G., GILES, T., KASTIN, A., KANEISH, A. y COY, D. (1982). "Leucine-enkephalin: reversal of intrinsic cardiovascular stimulation by pentobarbital". *Eur. J. Pharmacol.*: 78, 467.

SANDERS, B.J., COX, R.H. y LAWLER, J.E. (1988). "Cardiovascular and renal responses to stress in borderline hypertensive rat". *Am. J. Physiol.*: 255, R431.

SANGDEE, C. y FRANZ, D.N. (1983). "Evidence for inhibition of sympathetic preganglionic neurons by bulbospinal epinephrine pathways". *Neurosci. Lett.*: 37, 167.

SAPER, C., LOEWY, A.D., SWANSON, L.W. y COWAN, W.N. (1976). "Direct hypothalamo-autonomic connections". *Brain Res.*: 117, 305.

SAPOLSKY, R.M. (1990). "El estrés en los animales". *Investigación y Ciencia*: 162, 68.

SAPRU, H.N., PUNNEN, S. y WILLETTE, R.N. (1987). "Role of enkephalins in ventrolateral medullary control of blood pressure". En: *Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation*. Jodeph P. Buckley y Carlos M. Ferrario (eds.). Raven Press, Nueva York. 153.

SAUNDERS, W.S. y THORNHILL, J.A. (1987). "Pressor, tachycardic and feeding responses in conscious rats following i.c.v. administration of dynorphin. Central

blockade by opiate and α_1 -receptor antagonists". *Reg. Peptides*: 19, 209.

SAWCHENKO, P. y BOHN, M. (1988). "Glucorticoid receptor-immunoreactivity in C1, C2 and C3 adrenergic neurons that project to the hypothalamus or to the spinal cord in the rat". *J. Comp. Neurol.*: 205, 107.

SAWYNOK, J., PINSKY, C. y LABELLA, F.S. (1979). "Minireview on the specificity of naloxone as an opiate antagonist". *Life.Sci.*: 25, 1621.

SCHADT, J.C. y YORK, D.H. (1981). "The reversal of hemorrhagic hypotension by naloxone in conscious rabbits". *Can. J. Physiol. Pharmacol.*: 59, 1208.

SCHADT, J.C. y GADDIS, R.R. (1985). "Endogenous opiate peptides may limit norepinephrine release during hemorrhage". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 232, 656.

SCHOFFELMEER, A.N.M., RICE, K.C., JACOBSON, A.E., VAN GELDEREN, J.G., HOGENBOOM, F., HEIJNA, M.H. y MULDER, A.H. (1988). "Mu-, delta- and kappa opiod receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenilate cyclase activity in rat brain slices: studies with fentanyl isothiocyanate". *Eur. J. Pharmacol.*: 154, 169.

SCHWARTZ, J.C., DELABAUME, S. LLORENS, C., PATEY, G. y POLLARD, H. (1979). "Presynaptic opiate receptors on catecholamine neurons in brain: possible implications in tolerance and dependence to opioids". En: *The Release of Catecholamines from Adrenergic Neurons*. D.M. Paton (ed.). Pergamon Press, Oxford. 143.

SELYE, H. (1936). "A syndrome produced by diverse nocuous agentes". *Nature*: 138, 32.

SELYE, H. (1946). "The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*: 6, 117.

SELYE, H. (1970). "The evolution of the stress concept". *Am. Sci.*: 61, 692.

SELYE, H. (1976). "Stress in health and disease". Butterworths, Boston.

SENAY, E.C. y LEVINE, R.J. (1967). "Synergism between cold and restraint for

rapid production of stress ulcers in rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 124, 1221.

SHARIF, N.A. y HUGHES, J. (1989). "Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors". *Peptides*: 10, 499.

SHAW, J.S., MILLER, L., TURNBULL, M.J., GORMLEY, J.J. y MORLEY, J.S. (1982). "Selective antagonist at the opiate delta receptor". *Life Sci.*: 31, 1259.

SHIMODA, K., YAMADA, N., OHI, K., TSUJIMOTO, T., TAKAHASHI, K. y TAKAHASHI, S. (1988). "Chronic administration of tricyclic antidepressants suppresses hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in male rats". *Psychoneuroendocrinology*: 13, 431.

SHIOMI, H. y AKIL, H. (1982). "Pulse chase studies of the POMC/beta-endorphin system in the pituitary of acutely and chronically stressed rats". *Life Sci.*: 31, 2185.

SHIOMI, H., WATSON, S.J., KELSEY, J.E. y AKIL, H. (1986). "Pre-translational and post-translational mechanism for regulating beta-endorphin/ACTH cells: studies in the anterior lobe". *Endocrinology*: 119, 1793.

SIEGRIST, J. (1987). "Impaired quality of life as a risk factor in cardiovascular disease". *J. Chron. Dis.*: 40, 571.

SIMON, E.J., HILLER, J.M. y EDELMAN, I. (1973). "Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 70, 1947.

SMELIK, P.G., BERKENBOSCH, F., VERMES, I. y TILDERS, F.J.H. (1983). "The role of catecholamines in the control of the secretion of proopiomelanocortin-derived peptides from the anterior and intermediate lobes and its implications in the response to stress". En: *The Anterior Pituitary Gland*. A.S. Bhatnagar (ed.). Raven Press, Nueva York. 113.

SNYDER, D.W., NATHAN, M.A. y REIS, D.J. (1978). "Chronic lability of arterial pressure produced by selective destruction of the catecholamine innervation of the nucleus tractus solitarius in the rat". *Circ. Res.*: 43, 662.

SPARROW, M.G., ROGGENDORF, H. y VOGEL, W.H. (1987). "Effect of ethanol on heart rate and blood pressure in nonstressed and stressed rats". *Life Sci.*: 40, 2551.

SPINEDI, E., JOHNSTON, C.A., CHISARI, A. y NEGRO-VILAR, A. (1988). "Role of central epinephrine on the regulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion". *Endocrinology*: 122, 1977.

SPYER, K.M. (1989). "Neural mechanisms involved in cardiovascular control during affective behaviour". *Trends Neurosci.*: 12, 506.

STANTON, H.C. (1971). "Experimental hypertension". En: *Methods in Pharmacology*. A. Schwartz (ed.). Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation, Nueva York. Vol. 1.

STEPHENSON, R.B. (1984). "Modification of reflex regulation of blood pressure by behaviour". *Ann. Rev. Physiol.*: 46, 133.

STOLERMAN, I.P., JOHNSON, C.A., BUNKER, P. y JARVIK, M.E. (1975). "Weight loss and shock-elicited aggression as indices of morphine abstinence in rats". *Psychopharmacol.*: 45, 157.

STRUYKER-BOUDIER, H. (1975). "Adrenaline induced cardiovascular changes after intrahypothalamic administration into rats". *Eur. J. Pharmacol.*: 31, 153.

STUCKEY, J., MARRA, S., MINOR, T. e INSEL, T.R. (1989). "Changes in mu opiate receptors following inescapable shock". *Brain Res.*: 476, 167.

SWANSON, L.W. y SAWCHENKO, P.E. (1983). "Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei". *Ann. Rev. Neurosci.*: 6, 269.

SZABO, B., HEDLER, L., ENSINGER, H. y STARKE, K. (1986). "Opioid peptides decrease noraadrenaline release and blood pressure in the rabbit at peripheral receptors". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*: 332, 50.

SZENASI, G., BENCSATH, P. y TAKACS, L. (1988). "No effect of isolation on blood pressure and daily electrolyte excretion in rats". *Acta Physiol. Hung.*: 72, 93.

SZILAGYI, J.E. (1987). "Opioid modulation of baroreceptor reflex sensitivity in dogs". *Am. J. Pharmacol.*: 252, H733.

TAKEMORI, A., DENNIS, E.L.L. y PORTOGHESE, P.S. (1981). "The irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic properties of the fumarate methyl ester derivative of naltrexone". *Eur. J. Pharmacol.*: 70, 445.

TANAKA, M., IDA, Y. y TSUDA, A. (1988). "Naloxone, given before but not after stress exposure, enhances stress-induced increases in regional brain noradrenaline release". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 29, 613.

TAPP, W.N., LEVIN, B.E. y NATELSON, B.H. (1983). "Stress-induced heart failure". *Psychosom. Med.*: 45, 171.

TAPP, W.N. y NATELSON, B.H. (1988). "Consequences of stress: a multiplicative function of health status". *FASEB. J.*: 2, 2268.

TERENIUS, L. (1973). "Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex". *Acta. Pharmacol. Toxicol.*:32, 317.

TERMAN, J.S., SHAVIT, K., LEWIS, J.W., CANNON, J.T. y LIEBESKIND, J.C. (1984). "Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress". *Science*: 226, 1270.

THORNHILL, J.A. y SAUNDERS, W.S. (1985). "Blood pressure of conscious rats to intravenous administration of enkephalin derivatives (D-Ala² methionine and leucine enkephalinamide, and methionine and leucine enkephalinamide)". *Peptides*: 6, 1253.

TIENGO, M. (1980). "Naloxone in irreversible shock". *Lancet*: 2, 690.

TRIPPODO, N.C. y FROHLICH, E.D. (1981). "Similarities of genetic (spontaneous hypertension), in man and rat". *Cir. Res.*: 48, 309.

UNGERSTEDT, U. (1971). "Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain". *Acta Physiol. Scan.*: 367, 1.

VALE, W., SPEISS, J., RIVIER, C. y RIVIER, J. (1981). "Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that simulates the secretions of corticotropin and beta-endorphin". *Science*: 213, 1394.

VAN LOON, G.R., PIERZCHALA, K, BROWN, L.V. y BROWN, D.R. (1987). "Plasma met-enkephalin and cardiovascular responses to stress". En: *Opioid Peptides and Blood Pressure Control*. K.O. Stumpe, J. Faden y L. Craft (eds.). Springer-Verlag, Berlín. 1.

VAN EGMUND, A.A.J. (1911). "Über die wirkung des morphins auf das herz". *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*: 65, 197.

VAN DER MEER, C., SNIJDERS, P.M. y VALKENBURG, P.W. (1982). "The effect of ATP on survival in intestinal ischemia shock, hemorrhagic shock and endotoxin shock in rats". *Circ. Shock*: 9, 619.

VAN DER MEER, K., VALKENBURG, P.W., BASTIAANS, A.C., VLEEMING, W., UFKES, J.G.R. y OTTENHOF, M. (1986). "Effect of naloxone on blood pressure and survival in different shock models in rats". *Eur. J. Pharmacol.*: 124, 299.

VASWANI, K.K. y TEJWANI, G.A. (1986). "Food deprivation-induced changes in the level of opioid peptides in the pituitary and brain of rat". *Life Sci.*: 38, 197.

VASWANI, K.K., RICHARD, C.W. III y TEJWANI, G.A. (1988). "Cold swim stress-induced changes in the levels of opioid peptides in the rat CNS and peripheral tissues". *Pharmacol. Biochem. Behav.*: 29, 163.

VERMES, I., BERKENBOSCH, F., TILDERS, F.J.H., y SMELIK, P.G. (1981). "Hypothalamic deafferentation in the rat appears to discriminate between the anterior lobe and intermediate lobe to stress". *Neurosci. Lett.*: 27, 89.

VIVEROS, O.H., DILIBERTO, E.J.Jr. y HAZUM, E. (1979). "Opiate-like materials in the adrenal medulla: Evidence for storage and secretion with catecholamines". *Mol. Pharmacol.*: 16, 1101.

VLAHAKOS, D., GAVRAS, I. y GABRAS, H. (1985). "Alpha-adrenoceptor agonists applied in the area of the nucleus tractus solitarii in the rat: effects of

anaesthesia on cardiovascular responses". *Brain Res.*: 341, 372.

VOGEL, W.H. (1987). "Stress the neglected variable in experimental pharmacology and toxicology". *Trends Pharmacol. Sci.*: 8, 35.

VOGEL, W.H. y JENSH, R. (1988). "Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats". *Neurosci. Lett.*: 87, 183.

WATERFIELD, A.A. y KOSTERLITZ, H.W. (1975). "Stereospecific increase by narcotic antagonist of evoked acetylcholine output in guinea-pig ileum". En: *The Opiate Narcotics*. A. Goldstein (ed.). Pergamon Press, Nueva York. 35.

WATKINS, L.R. y MAYER, D.J. (1982). "Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems". *Science Wash. DC*: 216, 1185.

WATSON, S.J., AKIL, H., RICHARD, C.W. y BARDHAS, J.D. (1980). "Evidence for two separate peptide neuronal system. *Nature*: 275, 226.

WATSON, S.J., AKIL, H., FISCHLI, W., GOLDSTEIN, A., ZIMMERMAN, E., NILVER, G. y VAN WIMERSMA GREIDANUS, T.B. (1982a). "Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurons". *Science*: 216, 85.

WATSON, S.J., KHACHATURIAN, H., AKIL, H., COY, D. y GOLDSTEIN, A. (1982b). "Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain". *Science*: 218, 1134.

WEINER, H. (1985). "The concept of stress in the light of studies on disasters, unemployment, and loss: A critical analysis". En: *Stress in Health and Disease*. M.R. Zales (ed.). Brunner-Mazel, Nueva York. 24.

WEISS, J.M. (1977). "Psychological and behavioural influences on gastrointestinal lesions in animal models". En: *Psychopathology: Experimental Models*. J.D. Maser y M.E.P. Seligman (eds.). Freeman, San Francisco. 232.

WEISS, J.M., SIMSON, P.G. y SIMSON, P.E. (1989). "Neurochemical basis of stress-induced depression". En: *Frontiers in Stress Research*. H. Weiner, I. Florin, R. Murison y D. Hellhammer (eds.). Hans Huber Publishers, Toronto. 37.

WEN-LI, Y. y BLESSING, W.W. (1990). "Localization of vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla in the rabbit". *Brain Res.*: 517, 57.

WERLING, L.L., BROWN, S.R. y COX, B.M. (1987). "Opioid receptor regulation of the release of norepinephrin in brain". *Neuropharmacology*: 26, 987.

WIEDEMANN, E., SAITO, T., LINFOOT, J.A. y LI C.H. (1979). "Specific radioimmunoassay of human beta-endorphin in unextracted plasma". *J. Clin. Endocrinol Metab.*: 49, 478.

WIJNEN, H., PALKOVITS, M. DE JONG, W. y VERSTEEG, D. (1978). "Elevated adrenaline content in nuclei of medulla oblongata and the hypothalamus during the development of spontaneous hypertension". *Brain Res.*: 157, 191.

WIJNEN, H., SPIERENBURG, H.A., DE KLOET, E.R., DE JONG, W. y VERSTEEG, D.H.G. (1980). "Decrease in noradrenergic activity in hypothalamic nuclei during the development of spontaneous hypertension". *Brain Res.*: 184, 153.

WILLETTE, R.N., PUNNEN, S., KRIEGER, A.J. y SAPRU, H.N. (1984). "Hypertensive response following stimulation of opiate receptors in the caudal ventrolateral medulla". *Neuropharmacology*: 23, 401.

WILSON, S.P., KLEIN, R.L., CHANG, K.J., GASPARIS, M:S., VIVEROS, O.H. and YANG, W.H. (1980). "Are opioids peptides co-transmitters in noradrenergic vesicles of sympathetic nerves?. *Nature*: 288, 707.

WITKOWSKI, L. (1877). "Über die morphin wirkung". *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*: 7, 246.

WOLFF, H.G. (1950). "Life Stress and Bodily Disease. A Formulation". Williams and Wilkins (eds.). Baltimore.

WOLLEMANN, M. (1990). "Recent developments in the research of opioid receptor subtype molecular characterization". *J. Neurochem.*: 54, 1095.

WOLOZIN, B.L. y PASTERNAK, G.W. (1981). "Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 78, 6181.

YUKIMURA, T., FUXE, K., GANTEN, D., ANDERSSON, K., HÄRFSTRAND, A., UNGER, T. y AGNATI, L.F. (1981a). "Acute sino-aortic denervation in rats produces a selective increase of adrenaline turnover in the dorsal midline area of the caudal medulla oblongata and a reduction of adrenaline levels in the anterior and posterior hypothalamus". *Eur. J. Pharmacol.*: 69, 361.

YUKIMURA, T., UNGER, T., RASCHER, W., LANG, R.E. y GANTEN, D. (1981b). "Central peptidergic stimulation in blood pressure control: role of enkephalins in rats". *Clin. Sci.*: 61, 347.

YUKIMURA, T., STOCK, G., STUMPF, H., UNGER, T. y GANTEN, D. (1981c). "Effects of D-Ala²-methionine-enkephalin on blood pressure, heart rate, and baroreceptor reflex sensitivity in conscious cats". *Hypertension*: 3, 528.

ZAMIR, N., SIMANTOV, R. y SEGAL, M. (1980). "Pain sensitivity and opioid activity in genetically and experimentally hypertensive rats". *Brain Res.*: 184, 299.

ZAMIR, N., ZAMIR, D., EIDEN, L.E., PALKOVITS, M., BROWNSTEIN, M.J., ESKAY, R.L., WEBER, E., FADEN, A.I. y FEUERSTEIN, G. (1985). "Methionine and leucine enkephalin in rat neurohypophysis: different responses to osmotic stimuli and T2 toxin". *Science*: 228, 606.

ZANDBERG, B., DE JONG, W. y DE WIED, D. (1979). "Effect of catecholaminereceptor stimulating agents on blood pressure after local application in the nucleus tractus solitarii of the medulla oblongata". *Eur. J. Pharmacol.*: 55, 43.

ZHAO, B., CHAPMAN, C. y BICKNELL, R.J. (1988). "Opioid-noradrenergic interactions in the neurohypophysis". *Neuroendocrinology*: 48, 16.

ZUKIN, R.Z., EGHLALI, M., OLIVE, D., UNTERWALD, E.M. y TEMPEL, A. (1988). "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.