

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Papel de las catecolaminas cerebrales, adrenomedulares y
hormonas adrenocorticales en los efectos que acompañan a
la administración aguda y crónica de morfina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carmen Guaza Rodríguez

DIRECTOR:

Sara Borrell Ruiz

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310045691

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

T 577.175
GUA
pap

PAPEL DE LAS CATECOLAMINAS CEREBRALES,
ADRENOMEDULARES Y HORMONAS ADRENOCORTI-
CALES EN LOS EFECTOS QUE ACOMPAÑAN A
LA ADMINISTRACION AGUDA Y CRONICA DE
MORFINA.

Tesis que presenta CARMEN GUAZA RODRIGUEZ
para optar al Grado de Doctor en Ciencias.



R. 28. 238

El presente estudio ha sido realizado en la Sección de Esteroides del Instituto "G. Marañón" del C.S.I.C., bajo la dirección de la Dra. Sara Borrell Ruiz, Profesora de Investigación, a quien deseo expresar mi agradecimiento por su ayuda en la realización de este trabajo.

Así mismo agradezco al Prof. Dr. A. Fraile Ovejero, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias de Madrid, por hacerse cargo de esta Tesis.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio la ayuda y colaboración prestada en la realización de este trabajo.

I N D I C E

INTRODUCCION	<u>Páginas</u>
Consideraciones generales	2
Planteamiento del trabajo	19
 MATERIALES Y METODOS:	
Animales de experimentación	25
Determinación de corticosterona en glán- dulas adrenales y plasma	29
Determinación de catecolaminas en glán- dulas adrenales	34
Determinación de dopamina y noradrenali- na en cerebro	38
Método estadístico	42
Estudio del cálculo de la velocidad de "turnover"	44

RESULTADOS	<u>Páginas</u>
Animales controles	48
Administración de morfina en dosis única	56
Administración de H 44/68	70
Administración de H 44/68 y de morfina en dosis única	79
Administración crónica de morfina . . .	85
Administración de nalorfina a animales tratados con morfina durante seis días .	91
Administración de H 44/68 a animales tra tados cronicamente con morfina	96
Tablas correspondientes a resultados in- dividuales	102
DISCUSION	144
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFIA	189

I N T R O D U C C I O N

En los últimos años ha aumentado el interés acerca de los mecanismos de control que implican la interacción del sistema nervioso y endocrino. La interdependencia funcional entre estos dos sistemas es de vital importancia para la integración y coordinación de algunas de las funciones del organismo y finalmente para el mantenimiento del equilibrio homeostático.

El eslabón entre el sistema nervioso y el endocrino es, al menos en parte adrenérgico, siendo las catecolaminas que median la transmisión en las sinapsis dopaminérgicas y noradrenérgicas, la dopamina y la noradrenalina respectivamente. Hay una tercera catecolamina fisiológicamente importante, la adrenalina, formada fundamentalmente en la médula adrenal; las células de este órgano, células cromafines, son en realidad neuronas simpáticas postgangliónicas que han perdido sus axones y se han especializado en la secreción de noradrenalina y adrenalina a la circulación sistémica. La secreción de las hormonas de la médula adrenal tiene lugar en respuesta a un impulso neural, que induce la liberación de acetilcolina en las sinapsis de las neuronas preganglionares con las células cromafines; por tanto también los mecanismos

colinérgicos están implicados en el control neuroendocrino.

El camino biosintético de las catecolaminas fué establecido por Gurin y Delluva (1947) quienes vinieron a confirmar el esquema de Blaschko (1939). En el proceso metabólico (ver Figura A), los enzimas necesarios hasta la formación de noradrenalina son comunes a las terminaciones nerviosas adrenérgicas y a las células de la médula adrenal; estas últimas contienen además el enzima fenil-etanolamina-N-metil-transferasa que cataliza la conversión de noradrenalina a adrenalina.

En 1965 Levitt y col., hallaron que el enzima tirosina-hidroxilasa catalizaba el primer paso limitante en la biosíntesis de catecolaminas; la distribución del enzima coincide con la de estas aminas y al ser específico para la L-tirosina y L-fenil alanina puede catalizar dos pasos consecutivos similares, fenil alanina \rightarrow tiro-sina \rightarrow L-dopa. Los inhibidores de este enzima han sido cuidadosamente estudiados debido a su actuación en el paso limitante del proceso biosintético; el más utilizado ha sido la L- α -metil-para-tirosina, que inhibe al enzima por competición con la tirosina (Nagatsu y col., 1964). El siguiente paso Dopa \rightarrow Dopamina está cataliza-do por el enzima Dopa-decarboxilasa que no es específi-

co para la L-Dopa sino que también decarboxila L-amino-ácidos aromáticos. El enzima Dopamina- β -hidroxilasa cataliza la conversión de Dopamina \rightarrow Noradrenalina; los inhibidores de este enzima son de mucho interés, ya que reducen los niveles endógenos de noradrenalina y no modifican o aumentan los de dopamina; entre los más utilizados se encuentra el dietil-ditio-carbamato, y su metabolito reducido, el disulfiram. Por último la fenil-etaⁿolamina-N-metil-transferasa, de la que ya hemos dicho que se localiza esencialmente en el médula adrenal y cuya actividad se ha sugerido (Wurtman y Axelrod, 1965; 1966) está bajo control de los esteroides de la corteza adrenal, aunque existen otros criterios (Fuller y Hunt, 1967; Kitabchi y col., 1968; Ciaranello y Black, 1971; Rivas y Borrell, 1971) en relación con esta hipótesis.

Las catecolaminas pueden ser metabolizadas a productos inactivos a través de dos rutas metabólicas, bien mediante una deanimación oxidativa o por una O-metilación; la primera reacción, catalizada por la monoaminoxidasa, enzima mitocondrial, permite que las catecolaminas intracelulares pueden ser metabolizadas a derivados deaminados, mientras que la segunda reacción, catalizada por el enzima catecol-O-metil-transferasa, tiene lugar fuera de las células por lo que afecta a las catecolaminas extracelulares.

Hace ya tiempo que se viene investigando el papel de las catecolaminas adrenomedulares y hormonas de la corteza adrenal en los procesos de defensa y adaptación del organismo animal. Los trabajos de Cannon (1914) sobre la función de emergencia del sistema simpático-adrenal tuvieron especial interés ya que se describía por primera vez un importante mecanismo adaptativo de naturaleza neuroendocrina. Selye (1936) posteriormente, puso de manifiesto que la respuesta y adaptación a situaciones de stress va asociada a una activación del eje hipófisis-adrenal.

Está generalmente aceptado que el sistema nervioso central juega un papel esencial en la regulación de algunas funciones endocrinas. Observaciones histoquímicas (Carlsson y col., 1962; Dahlström y Fuxe, 1966; Fuxe y Hökfelt, 1969) sobre la existencia de una densa acumulación de neuronas catecolaminérgicas en la eminencia mediana del hipotálamo, además de la presencia de numerosas fibras monoaminérgicas en el lóbulo intermedio de la hipófisis, son indicativos de la posible participación de los mecanismos adrenérgicos en la regulación de la función hipofisaria.

De hecho, estudios fisiológicos, farmacológicos y bioquímicos, sugieren que diversas aminas del sistema

nervioso central podrían estar implicadas en el control de la síntesis y/o liberación de algunos de los factores hipotalámicos que regulan la secreción de hormonas de la hipófisis anterior, entre ellos de un posible factor de liberación de hormona adrenocorticotropa que induciría en la adenohipófisis la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) y la subsiguiente estimulación por esta hormona de la esteroidogénesis en la glándula adrenal.

Diversos investigadores (Freedman y col., 1962; Maynert y Levi, 1964; Corrodi y col., 1968) han observado que situaciones de "stress" que van acompañadas de una activación de la corteza adrenal causan una reducción en el contenido de algunas aminos cerebrales. Van Loon y col., (1971a) han podido observar en perros, como la administración intravenosa de L-Dopa, precursor de la noradrenalina, inhibe en la vena adrenal el aumento de 17-OH-corticosteroides, como respuesta al "stress" causado por la laparotomía. Estos mismos autores (1971b) han apreciado que la administración de α -metil-para-tirosina, droga que hemos dicho inhibe el enzima tirosina-hidroxilasa y que por tanto produce una disminución en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro, induce en la rata un aumento en los niveles de corticosterona en plasma, que es en parte prevenido cuando se ad-

ministra simultaneamente el precursor, L-Dopa.

Westerman y col. (1962) encontraron que la administración de reserpina, fármaco capaz de producir descensos en el contenido de monoaminas del cerebro, ya que bloquea los procesos de captación de las aminas a sus vesículas de almacenamiento e induce la deaminación oxidativa de las mismas dentro del citoplasma liberándose así en forma inactiva, causa paralelamente aumentos en la secreción de ACTH. Así mismo De Schaepdryver y Preziosi (1959) trabajando con ratones observaron que el iproniacid, inhibidor del enzima monoamino-oxidasa, además de prevenir el descenso de bioaminas que sigue a la administración de reserpina, inhibe también la estimulación adrenocortical que se produce por la sola administración de este fármaco.

Desde hace años se viene postulando que en el control de la secreción de diversas hormonas de la hipófisis anterior participan, a través de un mecanismo de retroregulación, las hormonas producidas en las glándulas periféricas (tiroides, corteza adrenal, gonadas); también se ha sugerido la existencia de un segundo mecanismo de retroregulación denominado "corto", ya que ahora la señal reguladora sobre los receptores hipotalámicos, la constituyen las hormonas hipofisarias, e incluso se

ha indicado la posibilidad de un mecanismo de retroregulación "ultracorto" en el que la información a los receptores del hipotálamo es suministrada por las mismas hormonas hipotalámicas. Los dos primeros tipos de retroregulación mencionados se han descrito para el control de la secreción de ACTH (Corbin y col., 1965; Motta y col., 1965), habiéndose apuntado la posibilidad de que neuronas noradrenérgicas del hipotálamo puedan jugar un papel importante como mediadoras de alguno de los mecanismos de retroregulación de los glucocorticoides. A favor de esta hipótesis Dallman y Yates (1968) observaron que el irponiacid era capaz de potenciar la acción inhibidora de los glucocorticoides en la secreción de ACTH.

Parece ser que neuronas noradrenérgicas del cerebro y particularmente del hipotálamo podrían ejercer una influencia inhibidora en la liberación del factor de liberación de hormona adrenocorticotropa en el plexo capilar primario de la eminencia mediana y por tanto en la secreción de ACTH. Esta hipótesis está basada en experimentos farmacológicos que indican que agentes que reducen el contenido de algunas aminos cerebrales o que bloquean receptores catecolaminérgicos incrementan la secreción de ACTH (Bhattacharya y Marks, 1969a; Ganong, 1970; Scapagnini y col., 1970; Van Loon y col., 1971 a, b)

mientras que fármacos liberadores de catecolaminas o precursores de las mismas, inhiben en la rata la hipersecreción de corticosterona inducida por situaciones de "stress" (Bhattacharya y Marks, 1969b; Marks y col., 1970).

En base a la relación existente entre el sistema nervioso y el endocrino cabría pensar que la acción de ciertos fármacos sobre este último, pudiera ser mediada a través del sistema nervioso y que la respuesta del organismo a los mismos, sea la resultante de la coordinación de ambos sistemas. Una droga que puede inducir grandes cambios en el comportamiento animal, es la morfina. Algunos autores, han indicado que la administración de esta droga produce un descenso en el contenido de noradrenalina en cerebro (Vogt, 1954; Freedman y col., 1961; Maynert y Klingman, 1962; Gunne, 1963) y de catecolaminas en glándula adrenal (Elliott, 1912; Maynert y Klingman, 1962; Gunne, 1963; Borrell y col., 1975), así como un aumento en la secreción de ACTH y por tanto de corticosteroides (Nakao y col., 1966; Nikodijevik y Maickel, 1967; Kokka y col., 1973; Borrell y col., 1974); sin embargo actualmente se desconoce si estos efectos son independientes o si la acción de la morfina sobre los niveles de catecolaminas, particularmente del cerebro, está de alguna

manera relacionado con la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Es bien sabido que el efecto de la morfina sobre el comportamiento es dependiente de la dosis y de la especie animal; mientras que en algunas especies el opioide produce mayor o menor grado de sedación, en otras su acción es fundamentalmente excitante (Maynert, 1967). Aunque en la rata se ha visto que dosis muy pequeñas de morfina pueden tener una acción estimulante (Ayhan y Randrup, 1973) la administración aguda del opioide ejerce una acción analgésico-sedante y provoca síntomas como catalepsia y rigidez muscular, que van disminuyendo con la administración repetida de la droga, para dar paso a un aumento en la actividad locomotora y roedora del animal, lo que es un índice del desarrollo de la dependencia física a la morfina (Sloan y col., 1963; Kumar y col., 1971; Ayhan y Randrup, 1972; Kuschinsky y Hornykiewicz, 1972).

Desde que algunos investigadores observaron que la morfina producía cambios en los niveles de aminas del cerebro (Vogt, 1954; Maynert y Klingman, 1962; Gunne, 1963; Takagi y Nakama, 1966; Paelzow y Paalzow, 1971), ha aumentado el interés acerca de si estas bioaminas pudieran estar implicadas en la acción anagésica de la droga.

Vedernikov y Africanov (1969) observaron en la rata que la cocaína que inhibe la recaptación de la noradrenalina y el pirogalol, inhibidor del enzima catecol-O-metil-transferasa y que por tanto aumenta los niveles de noradrenalina, potencian el efecto analgésico de la morfina; sin embargo el disulfiram, inhibidor del enzima dopamina- β -hidroxilasa, disminuye la acción analgésica del opioide debido probablemente a la deficiente formación de noradrenalina a partir de la dopamina. Según estos estudios, drogas que aumentan la concentración de noradrenalina en el cerebro, potenciarían el efecto antinoceptivo de la morfina.

Maynert y Klingman (1962) estudiando el efecto de la morfina sobre las hormonas de la médula adrenal en diferentes especies animales, observaron una disminución en la concentración de catecolaminas que difería de unas especies a otras en intensidad e indicaron que la inyección aguda de la droga estimulaba el sistema nervioso simpático y causaba una liberación de catecolaminas de la glándula adrenal.

Más recientemente se ha indicado que en la rata la morfina puede interferir con la neurotransmisión dopaminérgica en el cerebro ya que sus efectos farmacológicos son potenciados no solo por el haloperidol, bloqueador

de receptores dopaminérgicos, sino también por un inhibidor de la biosíntesis de catecolaminas, el α -metil-para-tirosina y que algunos efectos de la droga, incluyendo la analgesia son antagonizados por el pretratamiento con L-Dopa, precursor de la dopamina (Eidelberg y Ersparmer, 1975; Dahlström y col., 1975; Tulunay y col., 1976).

Las hormonas adrenocorticales en dosis farmacológicas también se ha visto son capaces de modificar el efecto analgésico de la morfina, pero se desconoce si la molla liberación de corticosteroides por la droga, afecta significativamente las acciones del opioide (Winter y Flataker, 1951; Zimmerman y Pang, 1975); sin embargo un cierto papel de las hormonas de la médula y/o corteza adrenal en los procesos que participan en la inducción de analgesia por la morfina no ha sido desechado, toda vez que la adrenalectomía potencia este efecto de la droga (Lewis, 1923; McKay y McKay, 1929; Miller y col., 1955; Gebhart y Mitchell, 1972; Wei, 1973).

La morfina fue uno de los estímulos estresantes que llevó a Selye (1936) al descubrimiento de que la secreción de ACTH aumentaba en situaciones de alarma, este investigador observó que después de altas dosis de morfina se producía una disminución en el peso del timo y un aumento en el de la corteza adrenal de la rata y que es-

tos efectos endocrinos desaparecían con la hipofisectomía, llegando a la conclusión de que situaciones de "stress" provocan un incremento en la secreción de ACTH y por tanto de corticosteroides; esta acción estimulante de la morfina en la secreción de hormonas cortico - adrenales ha sido posteriormente confirmada por otros autores (George y Way, 1955; Nikodijevic y Maickel, 1967; Kokka y col., 1972); en estos estudios se indica que la droga no actúa directamente en la glándula adrenal, puesto que en los animales hipofisectomizados no se observa este efecto. Además Briggs y Munson (1955) observaron que la morfina administrada a ratas anestesiadas con pentobarbital podía bloquear la secreción de ACTH.

Según ciertos autores (McKay y McKay, 1929; George y Way, 1955; Tanabe y Cafruny, 1958; Simon y col., 1975a) la administración crónica de morfina causa hipertrofia adrenal; por otro lado, Kokka y col. (1973) trabajando con ratas, han observado que la tolerancia al efecto estimulante de la morfina sobre la secreción de corticosterona se adquiere rápidamente y que la administración continuada del opioide produce una disminución en los niveles plasmáticos de esta hormona; también otros estudios (Eisenman y col., 1958; 1961) indican que en el hombre la eliminación diaria de 17-hidroxycorticosteroides y 17-cetosteroides en orina está disminuída por el tratamiento

crónico con el opioide; así mismo Borrell y col., (1975) encuentran que en el gato la inyección repetida de morfina causa un descenso en el contenido de corticosteroides en glándula suprarrenal, si bien esta acción supresora de la droga no afecta la respuesta de la glándula adrenal al ACTH exógeno (Nakao y col., 1966; Kokka y col., 1973).

Sin embargo Paroli y Melchiorri (1961) observaron "in vitro" que muestras de tejido adrenal obtenidas de ratas morfinizadas, cuando se añadía ACTH al medio de cultivo, producían corticosteroides en mucho menor grado que los controles y sugirieron una influencia directa de la morfina en el metabolismo hormonal del tejido adrenocortical.

La posibilidad de que los procesos adaptativos a la morfina pudieran estar mediados por el eje hipófisis-adrenal, fue primeramente considerado por McKay (1931) y por Sung y col., (1953); recientemente Wei (1973) observó que la adrenalectomía, a diferencia de lo indicado para el efecto analgésico, no impide el desarrollo de tolerancia y dependencia física a la droga, ni modifica la intensidad del síndrome de abstinencia y concluye que estos fenómenos no parecen ser mediados por el eje hipófisis-adrenal.

5310045691

Los mecanismos responsables del desarrollo de la dependencia física y tolerancia durante la administración crónica de morfina todavía permanecen sin aclarar. Desde que se encontró que la droga induce cambios en el metabolismo de las monoaminas del cerebro (Vogt, 1954; Gunne y col., 1969; Way, 1972; Sugrue, 1974; Theiss y col., 1975) se ha sugerido que los efectos del opioide pudieran ser debidos a una alteración de los mecanismos transmisores del sistema nervioso central. En los últimos años se ha destacado también el importante papel que parecen tener las catecolaminas del cerebro en la expresión del síndrome de abstinencia en animales tolerantes a la morfina (Schwartz y Eidelberg, 1970; Herz y col., 1974; Blasig y col., 1975; Way y col., 1976).

También se han hecho estudios sobre la actividad de algunos de los enzimas que intervienen en el metabolismo de las catecolaminas, durante el tratamiento crónico con morfina. Reiss y col. (1970) encontraron que en animales tolerantes a la droga, hay un aumento en la actividad del enzima tirosina-hidroxilasa en glándula adrenal y cerebro, que tiende a disminuir durante el síndrome de abstinencia.

El aumento en la concentración de noradrenalina en el cerebro, observado por varios autores (Freedman y col., 1961; Maynert y Klingman, 1962; Gunne, 1963; Sloan y col.,

1963; Akera y Brody, 1968) en animales tratados crónicamente con morfina, ha sugerido un aumento en la velocidad de síntesis de esta amina. Estudios del efecto de la administración repetida de morfina, sobre el metabolismo de las catecolaminas del cerebro reflejan resultados conflictivos; Clouet y Ratner (1970) hallan que la velocidad de conversión de ^{14}C -tirosina a ^{14}C -dopamina y ^{14}C -noradrenalina en el cerebro de la rata está incrementada después de repetidas inyecciones del opioide mientras que otros investigadores (Neal, 1968; Gunne y col., 1969; Papeschi y col., 1975) no encuentran diferencias entre ratas crónicamente morfinizadas y controles, respecto a variaciones en el "turnover" de estas aminas.

Trabajos recientes reflejan un gran interés en los mecanismos de transmisión dopaminérgica en el cerebro en los efectos de la morfina. Puri y Lal (1974) han sugerido que el tratamiento crónico de morfina, induce una hiperactividad en los receptores dopaminérgicos postsinápticos como consecuencia de la disminución en la neurotransmisión dopaminérgica y que este hecho puede estar relacionado con el desarrollo de la tolerancia y dependencia al opioide.

PLANTEAMIENTO

La elevada concentración de determinadas monoaminas en el hipotálamo y el que una de las funciones más importantes de éste sea la regulación de la función hipofisaria hace patente el interés de todos aquellos estudios en los que se trata de relacionar el papel de dichas aminas en el control de los mecanismos reguladores de la liberación de los denominados factores hipofisiotrópicos que a su vez intervienen en la secreción de hormonas de la hipófisis.

Se sabe que modificaciones en el sistema hipofisario-adrenal se relacionan con cambios en el comportamiento (Cannon, 1914; Selye, 1936), indicándose en trabajos recientes que variaciones en el metabolismo de catecolaminas podrían ser responsables además de cambios en la actividad adrenocortical (Ganong, 1970; Van Loon y col., 1971a,b; Scapagnini y Preziosi, 1973).

Los trabajos clásicos en los que se ha estudiado en diferentes especies animales la acción de la morfina sobre las aminas del cerebro se refieren fundamentalmente al metabolismo de la noradrenalina; en ellos se indica que el opioide, administrado en dosis única, causa una disminu-

ción de los niveles de esta amina (Vogt, 1954; Maynert y Klingman, 1962; Gunne, 1963); más recientemente y en base al posible papel que otro neurotransmisor del sistema nervioso central, la dopamina, precursor a su vez en la biosíntesis de la noradrenalina, parece tener en las modificaciones del comportamiento animal, ha aumentado el interés acerca del estudio del efecto que la morfina pueden tener sobre el metabolismo de esta bioamina y su posible relación con la acción de la droga.

Es conocido que la acción de la morfina varía según las especies animales; aún cuando la rata viene siendo la especie animal más comunmente utilizada, las diferencias entre las condiciones experimentales, sobre todo en cuanto a dosis, tiempo de sacrificio, vía de administración del compuesto, y otras variantes de cada laboratorio, posiblemente sean la razón de las discrepancias de los resultados y de la interpretación de los mismos por distintos autores y por tanto de que en la actualidad es té lejos de estar claramente establecido cuales son los mecanismos de acción y los efectos de la morfina.

Hace tiempo se viene estudiando el papel de las ca te co la mi na s en los procesos de analgesia, tolerancia y dependencia física a la morfina así como en las manifestaciones del síndrome de abstinencia en animales toleran

tes a la misma. Sin embargo son escasos los trabajos en los que se haga un estudio paralelo de la acción de la morfina sobre las hormonas de la médula y corteza adrenal (Borrell y col., 1974) y que sepamos ninguno en que se hayan estudiado además simultáneamente variaciones en los niveles de catecolaminas del cerebro.

Por todo ello consideramos interesante estudiar las variaciones de catecolaminas en cerebro y glándula adrenal así como de corticosteroides, en animales sometidos a la administración aguda y crónica de morfina para tratar de correlacionar estos parámetros con los efectos que acompañan a la administración del opioide.

Aún cuando diversos trabajos apuntan la posibilidad de que uno de los mecanismos de acción de la morfina podría ser la alteración de los mecanismos transmisores del sistema nervioso central, el tema permanece aún sin resolverse. Uno de los caminos que pensamos podría contribuir al esclarecimiento de esta cuestión sería el estudiar como la morfina puede modificar el "turnover" de las catecolaminas,

Es sabido que se pueden estimar cambios en el "turnover" de las monoaminas del cerebro, determinando el grado de reducción del contenido endógeno de las mismas después de la inhibición de su síntesis (Anden y col., 1966;

Corrodi y Hansson, 1966; Costa y Neff, 1966) por lo que decidimos utilizar este método para estudiar posibles cambios del mismo por la administración de morfina. Como inhibidor de la biosíntesis emplearíamos el ester metílico de la α -metil-p-tirosina (H 44/68), bloqueador del enzima tirosina hidroxilasa, paso limitante en la biosíntesis de catecolaminas. Elegimos este compuesto porque se ha observado que la disminución de catecolaminas que tiene lugar no cambia esencialmente la liberación de las mismas (Persson y Waldeck, 1970; Nybäck, 1971); además el H 44/68 mantiene intactos los mecanismos de recaptación de las aminas y no inhibe el enzima monoamino-oxidasa lo que hace improbable que tenga lugar una redistribución de aminas intraneuralmente (Jonsson y col., 1969; Sachs, 1970).

En primer término estudiaríamos la respuesta a la administración aguda de diferentes dosis de morfina, así como distintos tiempos de sacrificio de los animales para conocer la dosis y el tiempo adecuados en el que fuera observada una variación de dopamina y noradrenalina en cerebro así como de hormonas de la glándula adrenal.

A continuación determinaríamos, a distintos tiempos, el grado de depleción de catecolaminas que sigue a la administración de la alfa-metil-p-tirosina para seguidamente estudiar la respuesta a la administración aguda de morfi-

na en animales con una síntesis deficiente de catecolaminas lograda mediante la previa administración del inhibidor mencionado.

Dado el tan discutido papel de las bioaminas del sistema nervioso central en el desarrollo de la tolerancia y dependencia física a los narcóticos, consideramos interesante estudiar también cambios en el "turnover" de la dopamina y noradrenalina de animales crónicamente morfinaizados y así al comparar los resultados de las distintas experiencias determinar si el desarrollo de la tolerancia al efecto de la morfina induce variaciones en el metabolismo de estos neurotransmisores, que pudieran relacionarse con el fenómeno de la adicción.

En otro grupo de experiencias estudiaríamos el efecto que la administración continuada de la droga puede tener simultáneamente sobre los parámetros de nuestro estudio, es decir, dopamina y noradrenalina en cerebro y hormonas de la corteza y médula adrenal. Para ello una vez determinado el esquema de morfinización induciríamos el síndrome de abstinencia mediante la administración de un antagonista de la morfina, concretamente la nalorfina.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Se han utilizado ratas hembra de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 200 y 300 gramos. Los animales fueron colocados en número de cuatro por jaula una semana antes de cualquier tratamiento, estando sometidos a idénticas condiciones de alimentación, temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y ciclo de luz diario (7:00 - 19:00 horas). Los animales son privados de la comida el día anterior al sacrificio aproximadamente a las 17:30 horas.

El sacrificio se realizó mediante decapitación por guillotina, sangrando a los animales inmediatamente. La sangre se recoge sobre heparina y sin pérdida de tiempo se centrifuga para la separación del plasma. Seguidamente se extirpan el cerebro y las glándulas adrenales del animal, procediéndose a continuación al peso de dichos órganos.

Todo el material biológico a utilizar es mantenido en hielo durante su manipulación o conservado en congelador (-20°C) no más de cuarenta y ocho horas hasta su homogeneización. Una vez homogeneizados los tejidos pueden conservarse en congelador (-20°C) durante dos semanas.

Administración de compuestos:

Los compuestos fueron inyectados intraperitonealmente

en un volumen de 0,5 ml.

- Morfina clorhidrato (UQUIFA, S.A.E., Barcelona).
- Ester metílico de la D-L alfa-metil-para-tirosina, H 44/68 (SIGMA).
- Nalorfina (UQUIFA, S.A.E., Barcelona).

En la administración de morfina en dosis única se utilizaron las siguientes dosis: 10,30, 50 y 100 mg/kg y los animales se sacrificaron una hora y tres horas después de la inyección.

La dosis empleada en el tratamiento con α -metil-p-tirosina (H 44/68) fue de 250 mg/kg y se sacrificaron los animales a tres tiempos diferentes: cuatro, dieciséis y diecinueve horas después de la inyección.

La administración de compuestos se realizó de tal manera que los animales fueran siempre sacrificados entre las 12:00 y 13:00 horas, con el fin de evitar posibles variaciones debidas al ritmo circadiano de los parámetros de nuestro estudio.

En el tratamiento conjunto con H 44/68 y morfina en dosis única se administró el H 44/68 a las 17:00 horas y transcurrido un periodo de tiempo de dieciséis horas se inyectó 50 mg/kg de morfina y los animales se sacrificaron tres horas después.

En el tratamiento crónico de morfina, empleamos dos esquemas de morfinización, con un periodo de duración de seis y doce días.

Morfinización durante seis días consecutivos: el primer día se comienza con una dosis de 25 mg/kg, el segundo y tercer día se inyecta esta misma dosis dos veces al día, el cuarto y quinto día se inyectan 50 mg/kg dos veces al día y el sexto día se inyecta la dosis anterior y se sacrifican los animales tres horas después de esta última inyección.

Morfinización durante doce días consecutivos: el primer y segundo día se administra 25 mg/kg de morfina, los días tercero y cuarto esta misma dosis. dos veces al día, el quinto día se duplica la dosis a 50 mg/kg, inyectándose dos veces diarias y se mantiene el tratamiento así hasta el día doceavo en que se inyecta 50 mg/kg y se sacrifica a los animales pasadas tres horas de la inyección.

La administración de nalorfina (10 mg/kg) a animales morfinizados durante seis días se realiza el sexto día inmediatamente después de la última inyección de morfina y se sacrifican los animales tres horas después de la inyección de nalorfina.

La administración de H 44/68 a animales tratados con morfina durante doce días se realizó el undécimo día a las

17:00 horas; al día siguiente se inyectó 50 mg/kg de morfina a las 9:00 horas y los animales se sacrificaron tres horas después de la inyección del opioide.

Los animales controles son sometidos a la administración de solución salina al 0,9%.

DETERMINACION DE CORTICOSTERONA EN GLANDULAS ADRENALES Y PLASMA.

Hemos utilizado el método de Matsumura y col. (1967). En esencia el método consiste en: extracción de los esteroides con dicloruro de metileno; separación de compuestos cetónicos y no cetónicos con el reactivo T de Girard; hidrólisis, extracción y purificación de las hidrazonas; formación del compuesto fluorescente mediante reactivo sulfúrico/etanol y lectura de la intensidad de fluorescencia, exactamente a los 30 minutos de haber adicionado este reactivo, tiempo en el que el desarrollo de la fluorescencia es máximo para la corticosterona.

Técnica seguida:

Homogeneización del tejido: Las glándulas adrenales se homogeneizan en agua bidestilada al 1% (peso/volumen).

- 1 ml de plasma ó 0,5 ml del homogeneizado de adrenales se completan con agua bidestilada hasta un volumen total de 7,5 ml y se extraen durante 10 minutos con 15 ml de dicloruro de metileno por agitación circular lenta en extractor rotatorio.

- Pasar a tubos y centrifugar para separar las dos fases; eliminar la fase acuosa.
- Lavar el extracto con 2 ml de OHNa 0,1 N agitando suavemente durante 20 segundos; centrifugar y por aspiración separar y desechar la fase alcalina.
- Lavar de nuevo con 2 ml de H₂O bidestilada agitando como antes; centrifugar y eliminar la fase acuosa; desecar el extracto con Na₂SO₄ anhidro.
- Evaporar a sequedad una parte alícuota del extracto (10 ml) a 37°C y en corriente de nitrógeno.
- Añadir al extracto seco, 0,5 ml de reactivo T de Girard dejándolo resbalar por las paredes del tubo e incubar durante 30 minutos a 37°C en baño de agua.
- Enfriar rápidamente en hielo y añadir 3 ml de Na₂CC₃ 0,4 M.
- Extraer la mezcla por agitación con 3 ml de éter etílico durante 1 minuto; centrifugar y eliminar la capa etérea.
- Añadir 0,5 ml de HCl 6 N; mezclar suavemente y dejar 30 minutos a la temperatura del laboratorio.
- Extraer por agitación durante 1 minuto con 3 ml de éter de petróleo y eliminar la fase orgánica.
- Extraer una parte alícuota (3,5 ml) del extracto acuoso con 15 ml de dicloruro de metileno por agitación intensa

durante 2 minutos; centrifugar y eliminar la fase acuosa.

- Desecar con Na_2SO_4 anhidro.

- Tomar una parte alicuota del extracto (10 ml) a la que se adicionan 2 ml del reactivo ácido sulfúrico/etanol recientemente preparado; agitar 20 segundos y eliminar luego la capa orgánica.

- La intensidad de fluorescencia se determina exactamente a los 30 minutos de haber añadido el reactivo sulfúrico/etanol en un espectrofotofluorímetro Aminco-Bowman a una activación de 470 m μ y una fluorescencia de 525 m μ .

- Paralelamente se lleva a lo largo de todo el método un blanco y un patrón de 0,5 μg de corticosterona. Se realiza igualmente en cada determinación la medida directa de la fluorescencia de un blanco y un patrón de 0,5 μg de corticosterona. En función de estos datos se calcula el tanto por ciento de recuperación del método y la concentración de corticosterona en la muestra problema.

Reactivos

- Dicloruro de metileno (D'Homio); redestilado.

- Hidróxido sódico (Merck); solución 0,1 N.

- Sulfato sódico anhidro (BDH).

- Reactivo de Girard T (cloruro de trimetilaminoacético hidrazida); 100 mg se disuelven en 0,5 ml de ácido acético glacial y se completan con etanol redestilado hasta un volumen final de 5 ml.
- Eter etílico (Abelló, para anestesia); recientemente redestilado sobre sulfato ferroso.
- Carbonato sódico (Merck); solución 0,4 M.
- Acido clorhídrico (May & Baker); solución 6 N.
- Eter de petróleo (BDH); redestilado y recogiendo solamente la fracción que destila de 30°C a 40°C.
- Acido sulfúrico (Merck); $d = 1,84$.
- Alcohol etílico (Compañía de Alcoholes); previamente purificado (hervir a reflujo con OHK durante 8 horas y destilar; adicionar a este alcohol una mezcla de AgNO_3 y OHK, agitar varias veces y pasadas 24 horas redestilar de nuevo.
- Solución ácido sulfúrico/etanol al 75% (v/v).
- Solución patrón de corticosterona (4-Pregnen-11 β , 21-diol-3,20-diona) (Schwarz/Mann, New York). La solución "stock" en etanol (100 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$), preparando a partir de ella una solución diluída de concentración 10 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$ y a partir de esta, una segunda solución de concentración

1 µg/l ml, ambas en agua bidestilada.

- Agua bidestilada.

DETERMINACION DE CATECOLAMINAS EN GLANDULAS ADRENALES

Para la determinación de catecolaminas en glándula adrenal hemos empleado el procedimiento de Shore y Olin (1958) modificado por Callingham y Cass (1963).

Fundamentalmente el método consiste en una extracción de las catecolaminas del homogeneizado de tejido adrenal, con butanol-clorhídrico-saturado de cloruro sódico; una parte alícuota de esta fase orgánica es extraída con n-heptano y ácido clorhídrico, pasando las catecolaminas ahora a la fase ácida, que se separa y se utiliza para la reacción fluorimétrica.

Determinamos catecolaminas totales refiriendo los resultados a adrenalina debido a que la glándula adrenal de la rata posee muy pequeña proporción de noradrenalina (West, 1955). Para la formación de los correspondientes compuestos fluorescentes se utiliza la reacción de trihidroxiindol a pH 5, ya que a este pH se oxidan tanto la adrenalina como la noradrenalina mientras que a pH 3 solamente la adrenalina. En partes alícuotas del extracto tamponadas a pH 5, se forman los cromocompuestos mediante la adición de solución de

iodo; el exceso de reactivo iodado es neutralizado con tiosulfato sódico; por adición de solución alcalina de ascorbato, los cromocompuestos son transformados en los correspondientes trihidroxiindol luteinas que se determinan a continuación. Bajo luz ultravioleta se activa la fluorescencia y se determina la intensidad en un espectrofotofluorímetro Aminco-Bowman.

Técnica seguida:

Homogeneización del tejido: las glándulas adrenales se homogeneizan en ácido clorhídrico 0,01 N, en una concentración al 3% (peso/volumen).

Extracción y purificación: 0,1 ml del homogeneizado es llevado hasta un volumen final de 1,5 ml con HCl 0,01 N y se extrae por agitación intensa durante una hora con 15 ml de butanol saturado y 2,5 g de NaCl en agitador mecánico. Después de centrifugar durante 10 minutos a 2.000 r.p.m., 10 ml del extracto en butanol (que contiene las aminas) se agita de nuevo durante 5 minutos con 20 ml de heptano y 3,5 ml de HCl 0,01 N. Las aminas pasan ahora a la fase ácida, sirviendo el heptano para su desplazamiento a ella. Con este extracto ácido se realizará la valoración cuantitativa de las bioaminas mediante la reacción del trihidroxiindol.

Valoración cuantitativa:

- A una serie de tubos que contenían 0,25 ml de buffer pH 5 se añade 0,75 ml del extracto ácido.
- Adicionar 0,025 ml de solución alcohólica de iodo y dejar reaccionar durante 5 minutos y medio.
- El exceso de iodo es neutralizado con 0,025 ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y a continuación se adiciona 0,25 ml de solución alcalina de ascorbato, recientemente preparada.
- Paralelamente y por cada muestra oxidada, se hace el correspondiente blanco de la reacción impidiendo la formación del cromocompuesto al adicionar una mezcla de iodo-tiosulfato sódico en la misma proporción que en las muestras problema.
- Una vez terminada la reacción, se activa la fluorescencia poniendo los tubos bajo luz ultravioleta durante 15 minutos.
- La intensidad de la fluorescencia se determina a una activación de 410 $\text{m}\mu$ y una emisión de 520 $\text{m}\mu$.
- A lo largo del método se lleva un "internal standard" adicionando al problema 1 μg de adrenalina (aunque determinamos catecolaminas totales lo referimos a adrenalina, toda vez que la glándula adrenal de la rata contiene fundamentalmente esta amina y solo una pequeñísima proporción de norepinephrina). Se hace siempre la reacción con un patrón directo en igual concentración que la del "internal standard",

lo cual permite calcular la recuperación del método y hallar la concentración de catecolaminas en las muestras problema.

Reactivos:

- Acido clorhídrico (May & Baker); solución 0,01 N.
- n-Butanol (May & Baker) saturado de NaCl (Merck) y HCl 0,01 N (1 litro de n-butanol se agita con 175 ml de HCl 0,01 N hasta que el ácido se haya disuelto; añadir luego 125 g de NaCl y volver a agitar).
- Heptano (May & Baker); redestilado.
- Buffer acetato de pH 5.
- Solución de iodo (May & Baker) 0,1 N en alcohol etílico del 95%.
- Solución de tiosulfato sódico (Merck) 0,1 M.
- Solución alcalina de ácido ascórbico (British Drug House); 10 mg de ácido ascórbico/1 ml de H₂O bidestilada/2 ml OHNa 5 N.
- Soluciones patrones: L-adrenalina (British Drug House) en la concentración de 1 mg/1 ml en HCl 0,01 N (conservar en nevera).
- Agua bidestilada.

DETERMINACION DE DOPAMINA Y NORADRENALINA EN CEREBRO.

Para la determinación de dopamina y noradrenalina en cerebro hemos seguido en esencia el método descrito por Shellenberger y Gordon (1971), con ligeras modificaciones.

El método se basa fundamentalmente en una primera extracción de las catecolaminas del cerebro en ácido perclórico; de una parte alícuota de este extracto ácido se extraen las bioaminas mediante adsorción en alúmina a un pH alcalino adecuado; las monoaminas son luego desplazadas de la alúmina con ácido perclórico diluido, de forma que pasan de nuevo a la fase ácida de la que se toman partes alícuotas para la reacción fluorimétrica.

Técnica seguida:

Homogeneización del tejido: La homogeneización del cerebro se realiza en 3 volúmenes (g/ml) de ácido perclórico

0,4 N. Se centrifuga a 15.000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos en ultracentrífuga Sorvall. Se separa el sobrenadante y se rehomogeneiza el sedimento en 2,5 volúmenes del mismo ácido; se centrifuga de nuevo a la misma velocidad y temperatura, se reúnen los dos sobrenadantes y se lleva a un volumen final de 6 volúmenes, completando con ácido perclórico 0,4 N.

Extracción: Se separan 6 ml del extracto ácido y se añade solución de tricina en cantidad adecuada para obtener un pH de 9-9,2. Se adicionan 350 mg de alúmina activa y se agita durante 20 minutos en un agitador mecánico.

Se centrifuga 5 minutos a 2.000 r.p.m. desechándose el sobrenadante y se lava la alúmina con 20 ml de agua bi destilada agitando 1 minuto, centrifugando y eliminando el agua de la loción; este lavado se repite dos veces más.

Se añaden 3 ml de ácido perclórico 0,05 N a la alúmina y se agita de nuevo durante 20 minutos. Se centrifuga 5 minutos a 2.000 r.p.m. y del sobrenadante se toman dos partes alícuotas de 1 ml, para blanco y problema sobre las que se realiza la reacción fluorimétrica.

Valoración cuantitativa: A una serie de tubos que contienen 1,5 ml de solución buffer fosfato-EDTA pH 7 se añade 1 ml del extracto ácido y 0,2 ml de solución de iodo de jando proceder la reacción durante 2 minutos; pasado este

tiempo se adiciona 0,5 ml de solución alcalina de sulfito. A los 2 minutos de la adición de sulfito se acidifica con 0,4 ml de ácido acético glacial, con lo que se alcanza un pH de 4,4-4,8.

En los blancos se invierte el orden de adición de los reactivos.

Se calienta en estufa a 100°C durante 3-4 minutos, en friándose luego los tubos en hielo durante 5 minutos. La intensidad relativa de fluorescencia de la noradrenalina se lee a temperatura ambiente a una activación de 390 m μ y una emisión de 490 m μ . Se llevan de nuevo las muestras a la estufa de 100°C y pasados 35-40 minutos se enfrían los tubos en hielo, leyéndose la fluorescencia correspondiente a la dopamina seguidamente sin dejar que las muestras alcancen la temperatura del laboratorio.

A lo largo del método son llevados patrones de 400 ng de dopamina y de noradrenalina, haciéndose siempre la determinación de patrones directos de igual concentración; estos datos permiten calcular la recuperación del método y la concentración de dopamina y noradrenalina en la muestra.

Reactivos:

- Acido perclórico (BDH); solución 0,4 N; añadir a 1000 ml de esta solución 1 g de metabisulfito sódico y 0,5 g de EDTA (BDH).

- Oxido de aluminio (Merck, neutro grado 1) activado; 200 g de alúmina se hierven en 1 litro de ácido clorhídrico 2 N durante 20 minutos. Lavar con 1 litro del mismo ácido y después con agua bidestilada hasta que el pH del agua esté comprendido entre 3 y 3,5. La alúmina así lavada se mantiene durante 2 horas en estufa a 200°C conservándola luego en desecador.
- Solución de Tricina (Merck); disolver 17,9 g de tricina (N- tris-(hidroximetil)-metil -glicina) y 25 g de EDTA en 1 litro de OHNa 0,525 N.
- Solución acuosa de iodo (May & Baker) 0,1 N; disolver 1,25 g de iodo y 5 g de ioduro potásico (May & Baker) en 100 ml de agua bidestilada.
- Solución alcalina de sulfito sódico (Merck); tomar 1 ml de una solución que contiene 250 mg de sulfito sódico/1 ml de agua bidestilada y diluirlo a 10 ml con hidroxido sódico 5 N.
- Solución buffer fosfato-EDTA de pH 7.
- Acido perclórico (BDH); solución 0,05 N.
- Soluciones patrones; L-noradrenalina y dopamina (BDH) en concentración de 1 mg/1 ml de ácido clorhídrico 0,01 N (conservar en nevera).
- Agua bidestilada.

METODO ESTADISTICO

Para el análisis estadístico hemos determinado la me dia aritmética y el error standard de los resultados de cada grupo de experiencias de la siguiente manera:

Sean x_i los valores individuales obtenidos para cada parámetro de nuestro estudio en un grupo de experiencias de n animales.

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

$$\text{Error standard de la media: E.S.} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

Para conocer si la media aritmética de un grupo de experiencias es significativamente diferente de la encontrada en otro relacionable, hemos empleado el parámetro "t" de Student (Snedecor, 1956).

Sean \bar{x}_a y \bar{x}_b las medias aritméticas encontradas para un determinado parámetro de nuestro estudio en dos grupos de experiencias a y b, de n_a y n_b número de animales respectivamente, siendo x_a y x_b los valores individuales de cada grupo:

$$t = (\bar{x}_a - \bar{x}_b) \sqrt{\frac{\frac{n_a n_b (n_a + n_b - 2)}{n_a + n_b}}{\left(\sum x_a^2 - \frac{(\sum x_a)^2}{n_a} \right) + \left(\sum x_b^2 - \frac{(\sum x_b)^2}{n_b} \right)}}$$

Obteniendo el valor de "t" se determina en las tablas correspondientes el grado de significancia para $N = (n_a + n_b - 2)$ grados de confianza que viene dado por el valor de P.

En este estudio, se ha estimado que la diferencia entre dos medias aritméticas es significativa cuando encontramos para P un valor menor a 0,05, reflejandose en las correspondientes tablas y figuras.

ESTUDIO DEL CALCULO DE LA VELOCIDAD DE "TURNOVER"

La determinación de la velocidad de "turnover" por el método de la inhibición de la síntesis de catecolaminas (Brodie y col., 1966) está basada en el hecho de que la concentración de catecolaminas desciende siguiendo una curva exponencial, después de la administración de α -metil-p-tirosina, inhibidor del enzima tirosina-hidroxilasa.

Puesto que después de la inhibición de la síntesis de catecolaminas, la concentración de dopamina y noradrenalina en cerebro disminuye exponencialmente, se puede obtener la fracción del total de dopamina o noradrenalina que se forma o se libera por unidad de tiempo (k) mediante la transformación logarítmica de los niveles de estas bioaminas para la construcción de las rectas de regresión por el método de los mínimos cuadrados; obtenido el valor k, el producto de éste por los niveles basales de la amina en cuestión nos daría la velocidad de "turnover" de la misma.

En condiciones de equilibrio dinámico, la velocidad de síntesis es igual a la velocidad de liberación.

Podemos expresar que la velocidad de síntesis o "turnover" (V) para estas catecolaminas, por ejemplo pa-

ra la noradrenalina viene dada por:

$$V = k [NA]_0$$

siendo k = constante (porcentaje de noradrenalina que se renueva por unidad de tiempo).

$[NA]_0$ = concentración inicial de noradrenalina.

Al bloquear la síntesis la concentración de noradrenalina desciende a una velocidad que es proporcional a la concentración:

$$- d [NA] / dt = k \cdot [NA]$$

integrando esta expresión:

$$[NA]_t = [NA]_0 \cdot e^{-kt} \text{ (ecuación de la curva exponencial)}$$

convirtiéndolo a \log_{10} , tenemos que:

$$\log [NA]_t = \log [NA]_0 - kt \log e$$

$$\log [NA]_t = \log [NA]_0 - 0,434 kt$$

$$k = \frac{\log [NA]_0 - \log [NA]_t}{0,434 t}$$

$$k = \frac{\log [NA]_0 / [NA]_t}{0,434 t}$$

siendo $T_{\frac{1}{2}}$ = vida media (tiempo necesario para que la concentración inicial de noradrenalina se haya reducido a la mitad; este valor se obtiene de la recta de regresión).

tendremos que en el tiempo $T_{\frac{1}{2}}$: $[NA]_t = \frac{1}{2} [NA]_0$

$$\text{por tanto: } k = \frac{\log 2}{0,434 T_{\frac{1}{2}}} ; k = \frac{1}{1,44 T_{\frac{1}{2}}}$$

y la velocidad de turnover $V = k [NA]_0$ (el producto del valor k , por la concentración inicial de noradrenalina).

R E S U L T A D O S

ANIMALES CONTROLES

Hemos hecho determinaciones de los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales no sometidos a ningún tratamiento y de animales control a los que se les inyectó solución salina; estos últimos se sacrificaron media hora, una hora y tres horas después de ser inyectados con salino una sola vez (Tablas I, II y III). También realizamos otro grupo de animales control a los que se administró solución salina durante seis días consecutivos (Tabla IV) a las mismas horas y el mismo número de inyecciones que cuando se administra morfina durante este periodo de tiempo; estos controles fueron sacrificados tres horas después de la última inyección de solución salina.

En la Figura 1 podemos observar como en los animales sacrificados media hora después de la inyección de salino, los niveles de corticosterona en glándula adrenal están significativamente elevados ($P < 0,001$) respecto a los animales no sometidos a tratamiento alguno y respecto al resto de los diferentes grupos de animales control; en el grupo de animales sacrificados una hora

después de la inyección los niveles de esta hormona ya han retornado al de los animales normales. En el resto de los parámetros determinados, es decir, catecolaminas en glándula adrenal (Figura 1) y dopamina y noradrenalina en cerebro (Figura 2), no observamos diferencias por la administración de solución salina (dosis única) a ninguno de los diferentes tiempos de sacrificio de los animales, ni cuando estos son sometidos a la administración repetida de salino y sacrificados tres horas después de la última inyección.

El hecho de que el grupo de animales control sacrificados media hora después de la inyección de solución salina tenga los niveles de corticosterona significativamente elevados, pudiera ser atribuido al "stress" de sacar al animal de la jaula y ser inyectado; por ello este lapso de tiempo fué desestimado para nuestro estudio.

Toda vez que como hemos podido apreciar los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas en glándula adrenal son semejantes en todos los grupos de animales controles estudiados y que la concentración de corticosterona en glándula solo experimenta la variación mencionada a los treinta minutos de inyectada la solución fisiológica no realizamos otros grupos de animales control.

Tabla I

Efecto de la administración de solución salina sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 0,5 horas después de la inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>No tratados</u>	<u>Salino</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	53 ± 4	91 ± 6	< 0,001
Catecolaminas	1430 ± 84	1440 ± 70	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	777 ± 21	739 ± 92	n.s.
Noradrenalina	392 ± 21	381 ± 8	n.s.

Promedios ± E.S. 7-8 animales.

Tabla II

Efecto de la administración de solución salina sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 1 hora después de la inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>No tratados</u>	<u>Salino</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	53 ± 4	50 ± 2	n.s.
Catecolaminas	1430 ± 84	1588 ± 127	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	777 ± 21	811 ± 16	n.s.
Noradrenalina	392 ± 21	368 ± 7	n.s.

Promedios ± E.S. de 7-8 animales

Tabla III

Efecto de la administración de solución salina sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 3 horas después de la inyección.

<u>Glándula</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>No tratados</u>	<u>Salino</u>	<u>"pu"</u>
Corticosterona	53 \pm 4	46 \pm 3	n.s.
Catecolaminas	1430 \pm 84	1470 \pm 43	n.s.
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	777 \pm 21	778 \pm 17	n.s.
Noradrenalina	392 \pm 21	361 \pm 6	n.s.

Promedios \pm E.S. de 7-14 animales.

Tabla IV

Efecto de la administración de solución salina durante 6 días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 3 horas después de la última inyección.

<u>Glándula</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>No tratados</u>	<u>Salino</u>	"p"
Corticosterona	53 \pm 4	50 \pm 3	n.s.
Catecolaminas	1430 \pm 84	1455 \pm 23	n.s.
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	777 \pm 21	760 \pm 35	n.s.
Noradrenalina	392 \pm 21	381 \pm 11	n.s.

Promedios \pm E.S. de 7-8 animales.

GLANDULA ADRENAL

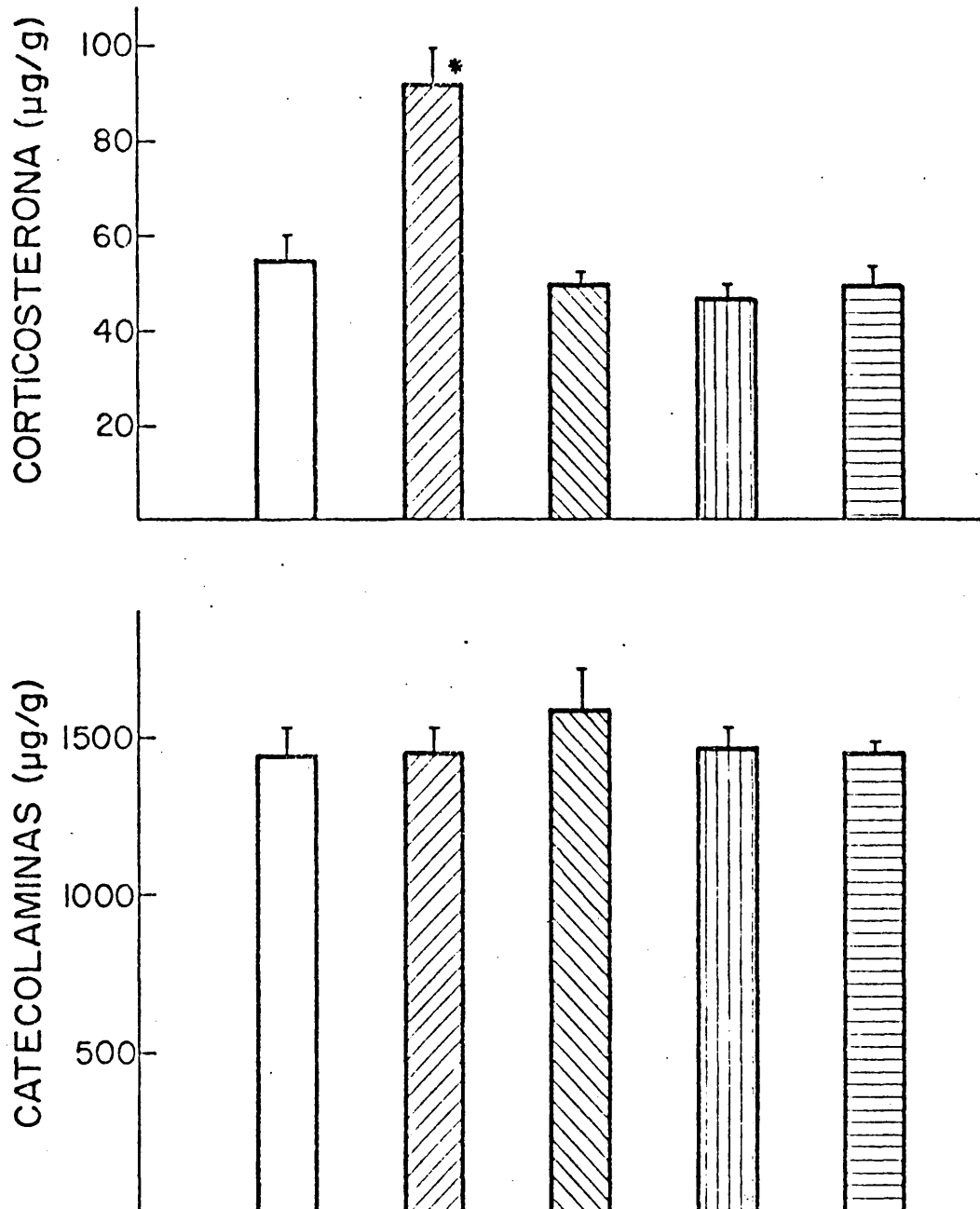


Figura 1

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal de animales no tratados y sometidos a la administración de solución salina. Promedios \pm E.S.

□ no tratados; ▨ salino 0,5 horas; ▩ salino 1 hora;
▧ salino 3 horas; ▨ salino 6 días. *P < 0,001

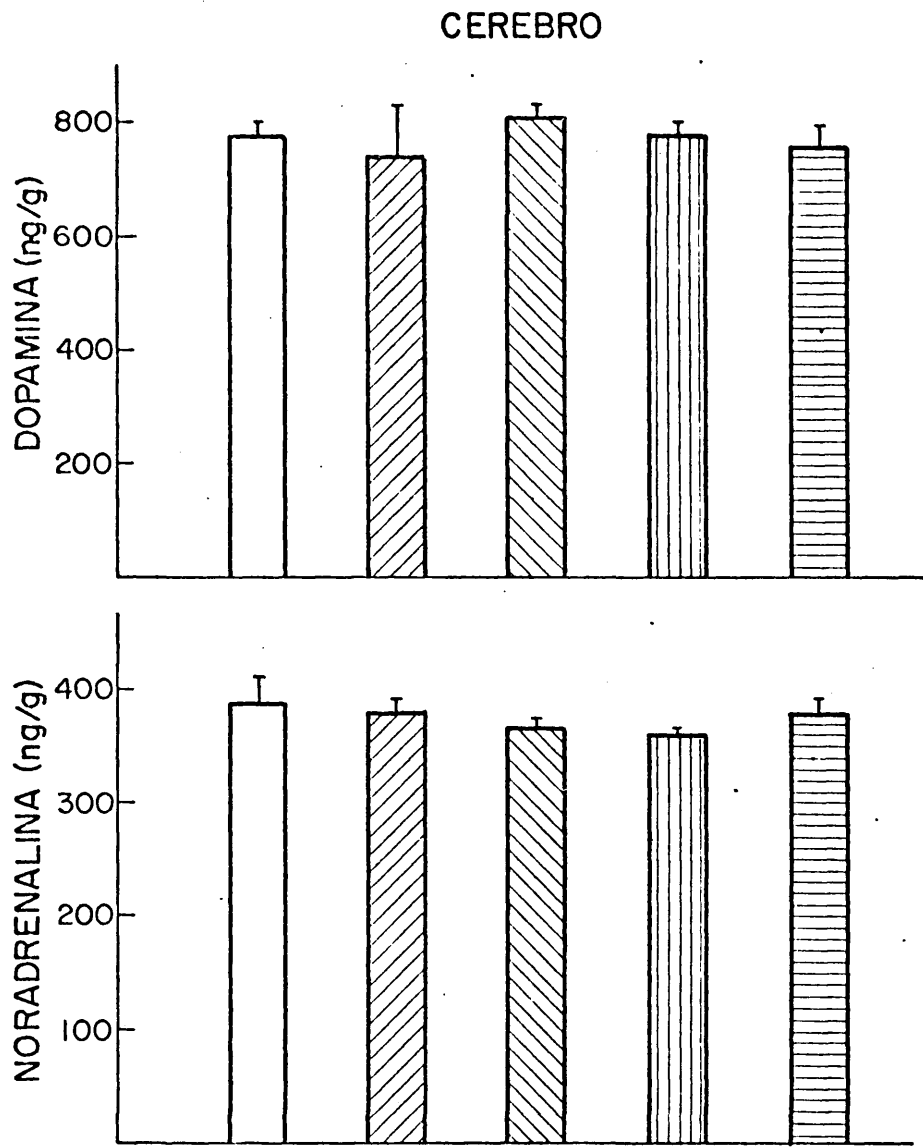


Figura 2

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales no tratados y sometidos a la administración de solución salina. Promedios \pm E.S.

no tratados;
 salino 0,5 horas;
 salino 1 hora
 salino 3 horas;
 salino 6 días

ADMINISTRACION DE MORFINA EN DOSIS UNICA

En primer lugar hicimos unos grupos de experiencias para determinar dosis y tiempo de sacrificio adecuados para obtener una respuesta en los distintos parámetros de nuestro trabajo, que nos permitiera estudiar las posibles interrelaciones entre ellos por el efecto de la droga. Las dosis utilizadas fueron 10, 30, 50 y 100 mg/kg, de morfina, sacrificando a los animales, una hora y tres horas después de la inyección.

En las Tablas V, VI, VII y VIII, damos los resultados del efecto de la administración de 10, 30, 50 y 100 mg/kg de morfina, cuando los animales son sacrificados una hora después de la inyección.

Vemos que, excepto con la dosis menor (10 mg/kg), que resulta inefectiva, se producen aumentos altamente significativos ($P < 0,001$) en los niveles de corticosterona en glándula adrenal. No observamos variación en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal con ninguna de las dosis empleadas. Los resultados en cerebro también muestran escasa variación frente a los respectivos controles y sólo el contenido de noradrenalina, resulta afectado, encontrando descensos con 30 y 100 mg/kg

que aunque significativos ($P < 0,05$) los tantos por ciento de variación son respectivamente de solo un 13% y un 9%.

En las Tablas IX, X y XI vemos los resultados obtenidos por la administración de morfina, cuando los animales son sacrificados tres horas después de la inyección. Podemos observar que los niveles de corticosterona en glándula adrenal persisten elevados con 30, 50 y 100 mg/kg, aunque las diferencias significativas ($P < 0,02$, $P < 0,01$ y $P < 0,01$ respectivamente) son ahora de menor grado que cuando los animales se sacrificaban una hora después de administrada la droga (Figura 3). Los niveles de catecolaminas en glándula adrenal tampoco a este tiempo resultan significativamente modificados con ninguna de las dosis empleadas, no obteniendo por tanto variaciones en catecolaminas adrenales ni una hora, ni tres horas después de la inyección del opioide (Figura 4). Tres horas después de la inyección de 50 y 100 mg/kg de morfina se observan descensos altamente significativos de dopamina ($P < 0,001$) y de noradrenalina ($P < 0,001$) en cerebro, es decir, este tiempo es efectivo para producir una depleción de ambas bioaminas, puesto que en los animales sacrificados una hora después de la inyección no obtuvimos variaciones de dopamina (Figuras 5 y 6).

La elevación observada en los niveles de corticosterona en glándula adrenal por la administración aguda de mor-

fina pudiera ser reflejo de una estimulación del eje hipó-
fisis-adrenal, que según nuestros resultados es máxima
una hora después de administrada la droga. Un descenso
en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro lo
encontramos tres horas después de la inyección del opioi-
de, cuando los niveles de corticosterona tienden a recupe-
rarse; por tanto no observamos que los niveles más altos
de corticosterona en glándula coincidan con la bajada de
catecolamina en cerebro.

Ya a los quince minutos de administrada la droga se
observa en los animales una actitud que podríamos denomi-
nar cataléptica, con rigidez muscular, depresión respira-
toria y a veces con posturas anormales. La menor dosis
utilizada (10 mg/kg) produce este mismo efecto en el com-
portamiento aunque aproximadamente una hora después de la
inyección los animales muestran ya una cierta actividad
locomotora; con el resto de las dosis podemos decir que
la duración del efecto es mayor, puesto que tres horas
después de la inyección, cuando los animales van a ser sa-
crificados, todavía muestran síntomas de catalepsia.

Tabla V

Efecto de la administración de 10 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 1 hora después de la inyección.

<u>Glándula ($\mu\text{g/g}$)</u>	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	50 \pm 2	61 \pm 5	n.s.
Catecolaminas	1588 \pm 127	1474 \pm 35	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	811 \pm 16	731 \pm 29	n.s.
Noradrenalina	368 \pm 7	343 \pm 14	n.s.

Promedios \pm E.S. de 7-8 animales.

Tabla VI

Efecto de la administración de 30 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticostero
na y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 1 hora después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticosterona	50 ± 2	118 ± 5	< 0,001
Catecolaminas	1588 ± 127	1294 ± 82	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	811 ± 16	800 ± 52	n.s.
Noradrenalina	368 ± 7	321 ± 18	< 0,05

Promedios ± E.S. de 7-8 animales.

Tabla VII

Efecto de la administración de 50 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 1 hora después de la inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	50 ± 2	81 ± 4	< 0,001
Catecolaminas	1588 ± 127	1656 ± 71	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	811 ± 16	766 ± 8	n.s.
Noradrenalina	368 ± 7	389 ± 13	n.s.

Promedios ± E.S. de 8-12 animales.

Tabla VIII

Efecto de la administración de 100 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 1 hora después de la inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	50 ± 2	104 ± 5	<0,001
Catecolaminas	1588 ± 127	1650 ± 56	n.s.

<u>Cerebro (ng/g)</u>		
Dopamina	811 ± 16	790 ± 14
Noradrenalina	368 ± 7	336 ± 13

Promedios ± S.S. de 7-8 animales.

Tabla IX

Efecto de la administración de 30 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 3 horas después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticosterona	46 ± 3	61 ± 6	< 0,02
Catecolaminas	1470 ± 43	1306 ± 72	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	778 ± 17	836 ± 24	n.s.
Noradrenalina	361 ± 6	347 ± 16	n.s.

Promedios ± E.S. de 7-14 animales.

Tabla X

Efecto de la administración de 50 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 3 horas después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticosterona	46 ± 3	64 ± 5	< 0,01
Catecolaminas	1470 ± 43	1504 ± 68	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	778 ± 17	599 ± 19	< 0,001
Noradrenalina	361 ± 6	288 ± 9	< 0,001

Promedios ± E.S. de 14-17 animales.

Tabla XI

Efecto de la administración de 100 mg/kg de Morfina, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 3 horas después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticosterona	46 ± 3	59 ± 3	<0,01
Catecolaminas	1470 ± 43	1432 ± 84	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	778 ± 17	668 ± 20	<0,001
Noradrenalina	361 ± 6	308 ± 14	<0,001

Promedios ± E.S. de 8-14 animales.

GLANDULA ADRENAL

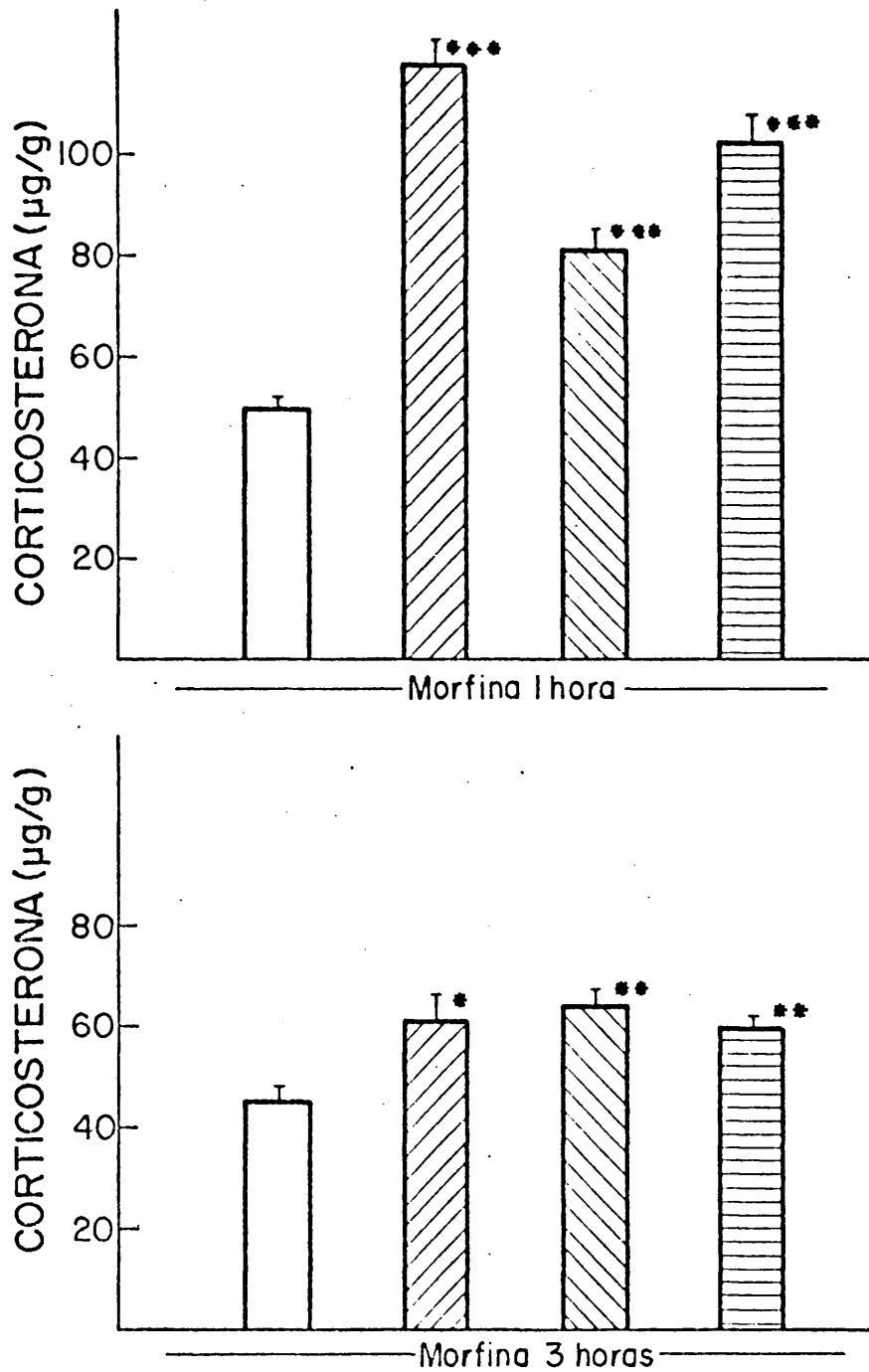


Figura 3

Niveles de corticosterona en glándula adrenal de animales tratados con diferentes dosis de morfina y sacrificados una o tres horas después de la inyección. Promedios \pm E.S.

□ control; ▨ morfina 30 mg/kg; ▩ morfina 50 mg/kg;
 ▨ morfina 100 mg/kg; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,02$

GLANDULA ADRENAL

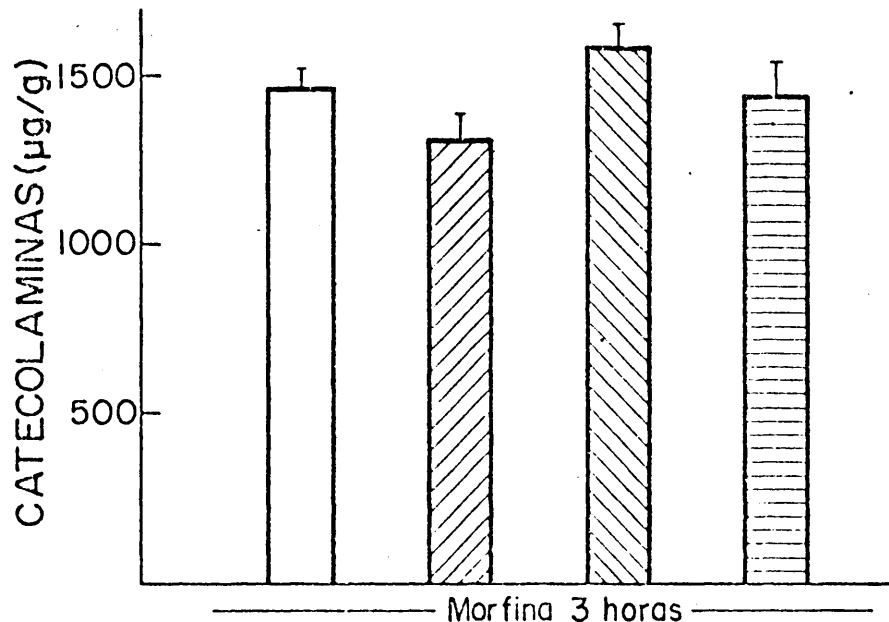
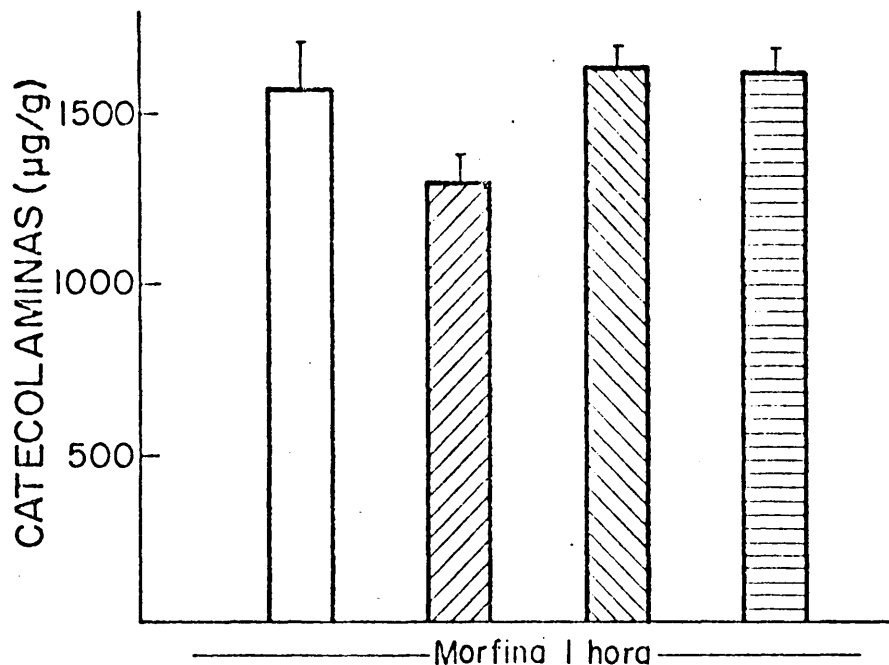


Figura 4

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal en animales tratados con diferentes dosis de morfina y sacrificados una o tres horas después de la inyección. Promedios \pm E.S.

□ control; ▨ morfina 30 mg/kg; ▩ morfina 50 mg/kg;
▤ morfina 100 mg/kg

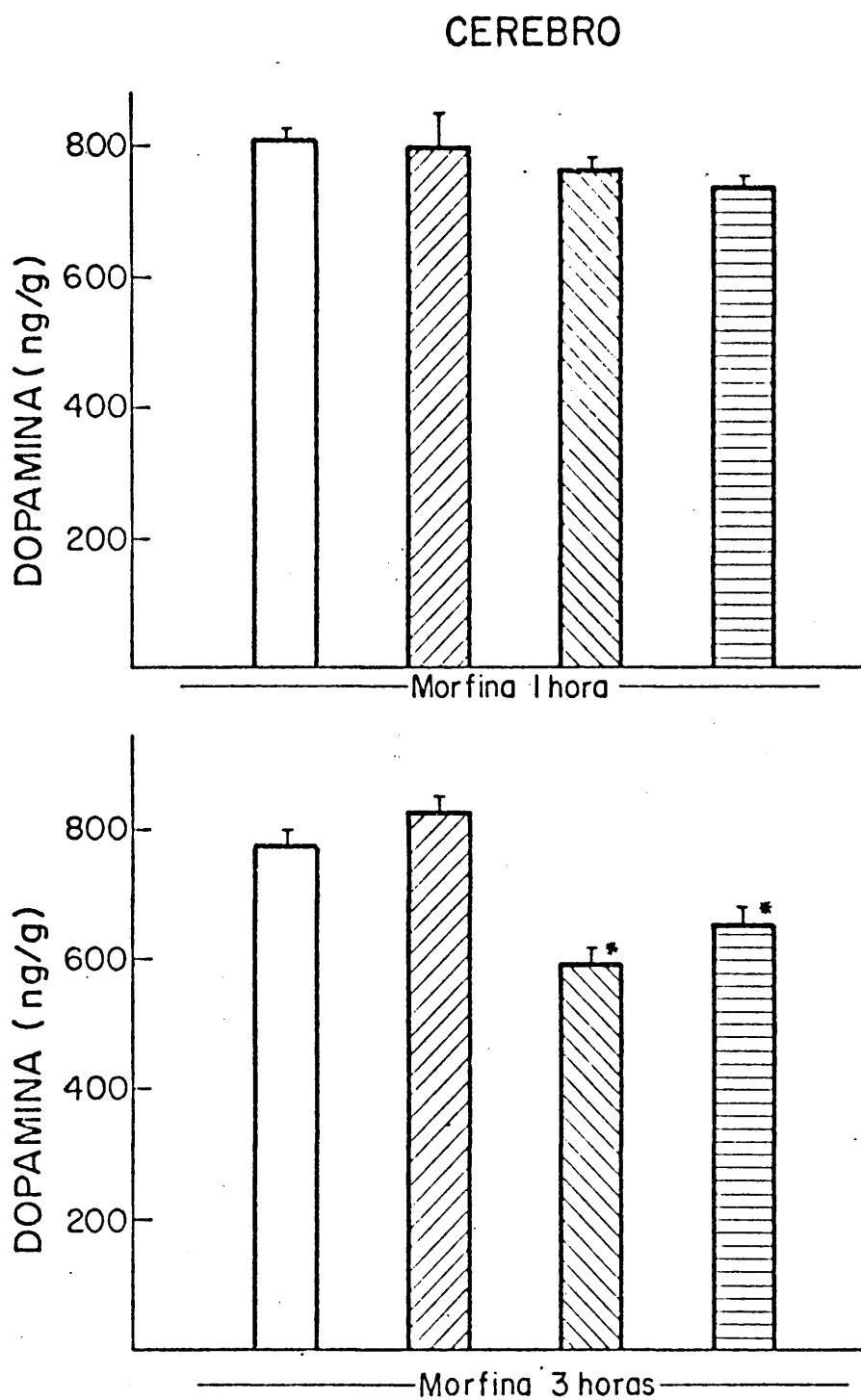


Figura 5

Niveles de dopamina en cerebro de animales tratados con diferentes dosis de morfina y sacrificados una o tres horas después de la inyección. Promedios \pm E.S.

□ control; ▨ morfina 30 mg/kg; ▩ morfina 50 mg/kg;
 ▤ morfina 100 mg/kg; *P<0,001

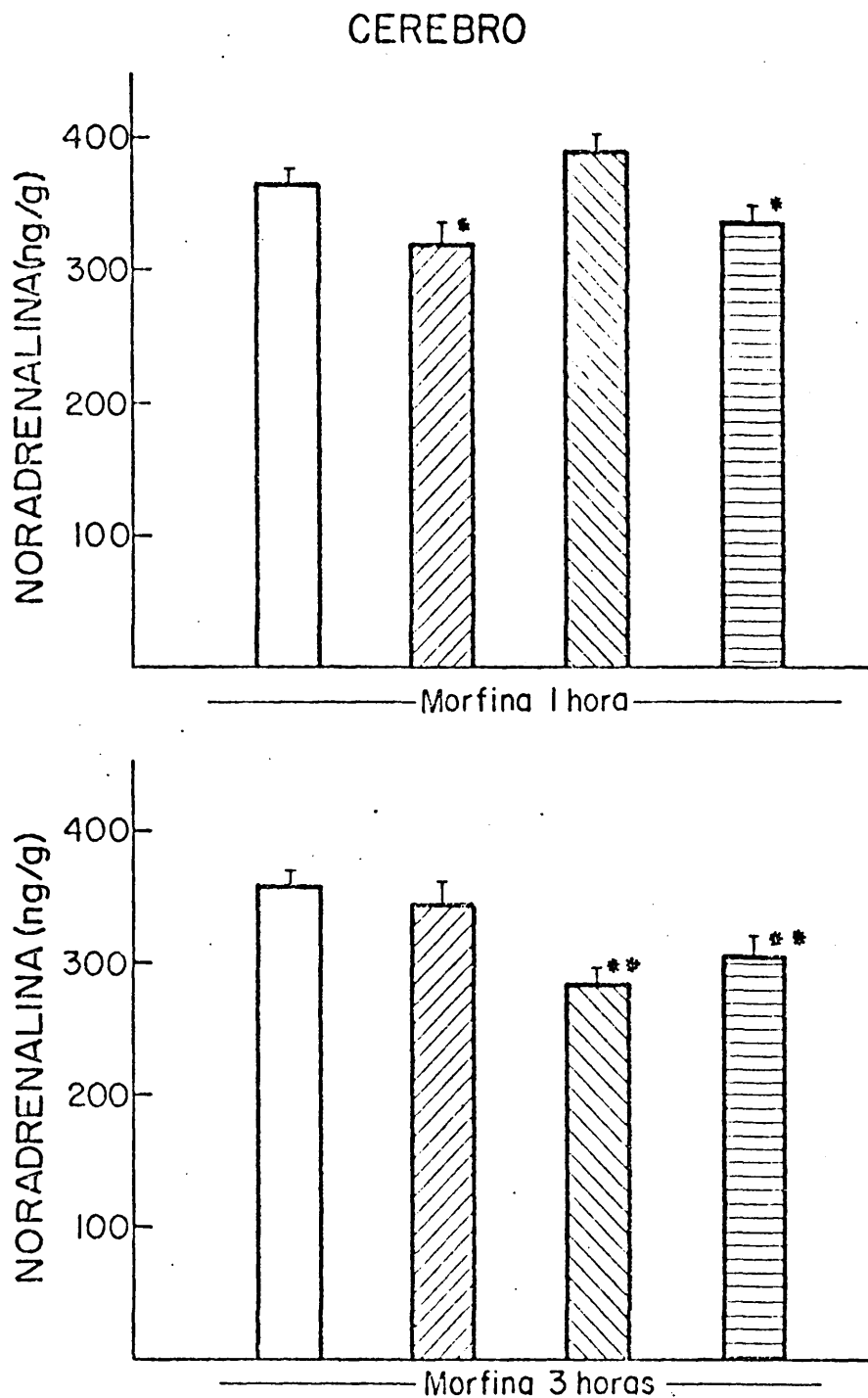


Figura 6

Niveles de noradrenalina en cerebro de animales tratados con diferentes dosis de morfina y sacrificados una o tres horas después de la inyección. Promedios \pm E.S.

□ control; ▨ morfina 30 mg/kg; ▩ morfina 50 mg/kg;
 ▤ morfina 100 mg/kg; **P < 0,001; *P < 0,05

ADMINISTRACION DE H 44/68

Con el fin de estudiar el efecto del tratamiento conjunto del metil ester de α -metil-p-tirosina (H 44/68) y morfina sobre el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas y corticosterona en glándula adrenal, realizamos primero un grupo de experiencias para conocer la acción del inhibidor sobre los parámetros de nuestro estudio. Conocido por la literatura la dosis efectiva comunmente empleada para disminuir los niveles de catecolaminas en la rata, inyectamos 250 mg/kg de H 44/68 y sacrificamos a los animales a tres tiempos distintos, cuatro, diez y seis y diez y nueve horas para determinar la velocidad de "turnover" de la dopamina y noradrenalina en cerebro y para seleccionar el intervalo de tiempo que consideráramos más adecuado para la posterior administración del inhibidor y el opioide. Para el análisis estadístico, comparamos estos resultados con los de los animales sacrificados a las tres horas de la administración de solución salina, puesto que no se observan diferencias (ver Tablas II y III) entre los animales control sacrificados una hora y tres horas después de la administración de solución salina en ninguno de los parámetros determinados.

Los animales sacrificados cuatro horas después de la inyección del inhibidor (Tabla XII) muestran una elevación significativa ($P < 0,001$) en la concentración de corticosterona en glándula adrenal; no se obtienen variaciones en el contenido de catecolaminas en glándula adrenal y se observan descensos significativos en los niveles de dopamina ($P < 0,001$) y de noradrenalina ($P < 0,001$) en cerebro, siendo el tanto por ciento de variación de un 59% y de un 38% respectivamente.

En la Tabla XIII, vemos los resultados de la administración de H 44/68 en animales sacrificados diez y seis horas después de la inyección; los niveles de corticosterona en glándula adrenal están significativamente elevados ($P < 0,01$) respecto a los de los animales control; tampoco en este grupo se observa variación en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal, mientras que la disminución de bioaminas en cerebro se intensifica a este tiempo, siendo ahora los descensos de un 90% para la dopamina y de un 82% para la noradrenalina.

Cuando los animales se sacrifican diez y nueve horas después de administrado el inhibidor (Tabla XIV), los niveles de corticosterona en glándula adrenal también se encuentran significativamente ($P < 0,01$) aumentados; la concentración de catecolaminas en glándula adrenal experimen-

ta un descenso altamente significativo ($P < 0,001$) a este intervalo de tiempo y el contenido de bioaminas en cerebro todavía continúa significativamente ($P < 0,001$) disminuido, si bien parece iniciarse una recuperación, toda vez que existe una diferencia significativa ($P < 0,02$) entre los niveles de dopamina en los animales sacrificados diez y seis o diez y nueve horas después de la administración del compuesto.

En la Figura 7 representamos las variaciones en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro, juntamente con los de corticosterona en glándula adrenal por la administración de H 44/68. Vemos que, aunque la máxima depleción de catecolaminas en cerebro ocurre a las diez y seis horas de administrado el inhibidor, a este tiempo no se observa una mayor elevación en los niveles de corticosterona en glándula adrenal que a las cuatro horas.

La acción observada del H 44/68 sobre los niveles de corticosterona en glándula adrenal podría estar relacionada con el descenso de dopamina y noradrenalina en cerebro. El hecho de que las catecolaminas en glándula adrenal no muestren respuesta al inhibidor hasta pasadas diez y nueve horas de su administración, pudiera ser debido a la larga vida media de la adrenalina en dicha glándula.

La Figura 8 muestra las rectas de regresión correspondientes a los descensos de las concentraciones de dopamina y noradrenalina en cerebro después de la administración de H 44/68, en función del tiempo.

Los niveles de estas bioaminas descienden exponencialmente en proporción a una constante, k (ver cálculo, pág. 44) que para la dopamina resulta ser $k = 0,19 \text{ hr}^{-1}$ y para la noradrenalina, $k = 0,12 \text{ hr}^{-1}$. La vida media de estas bioaminas, halladas directamente a partir de las líneas de regresión es para la dopamina $T_{DA} = 3,7 \text{ hr.}$ y para la noradrenalina $T_{NA} = 5,9 \text{ hr.}$ Las velocidades de síntesis o "turnover" (producto de la constante, k , por la concentración inicial de la amina en cuestión) son $V_{DA} = 0,146 \text{ } \mu\text{g/h/hr}$ para la dopamina y $V_{NA} = 0,046 \text{ } \mu\text{g/g/hr.}$ para la noradrenalina.

Tabla XII

Efecto de la administración de 250 mg/kg de H 44/68, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 4 horas después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>H 44/68</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticosterona	46 ± 3	66 ± 5	<0,001
Catecolaminas	1470 ± 43	1590 ± 32	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	778 ± 17	315 ± 15	<0,001
Noradrenalina	361 ± 6	222 ± 8	<0,001

Promedios ± E.S. de 7-14 animales.

Tabla XIII

Efecto de la administración de 250 mg/kg de H 44/68, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 16 horas después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>H 44/68</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticosterona	46 ± 3	61 ± 3	< 0,01
Catecolaminas -	1470 ± 43	1410 ± 64	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	778 ± 17	79 ± 4	< 0,001
Noradrenalina	361 ± 6	64 ± 3	< 0,001

Promedios ± E. S. de 10-14 animales.

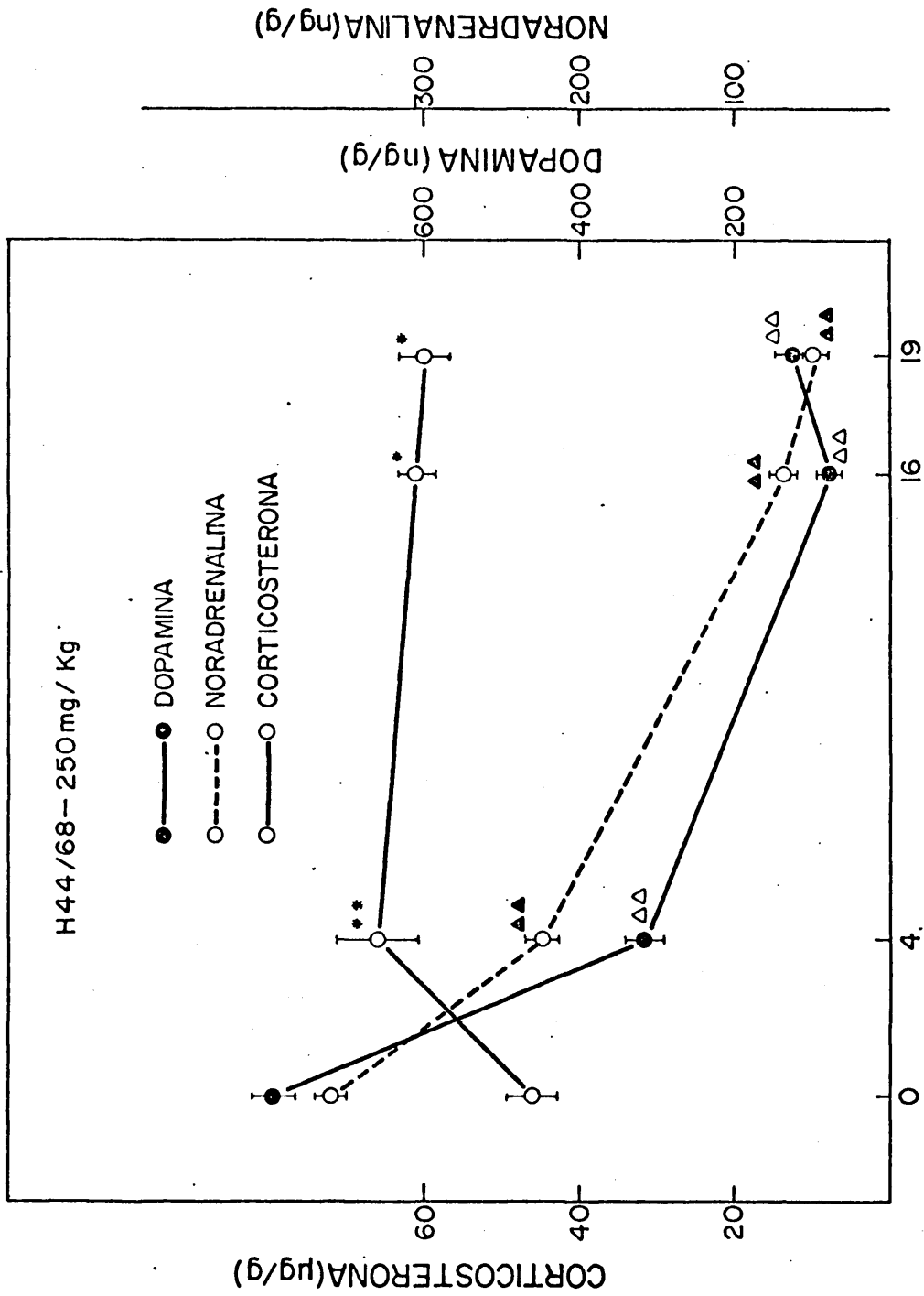
Tabla XIV

Efecto de la administración de 250 mg/kg de H 44/68, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro.

Animales sacrificados 12 horas después de la inyección.

	<u>Controles</u>	<u>H 44/68</u>	<u>"p"</u>
<u>Glándula (µg/g)</u>			
Corticoesterona	46 ± 3	60 ± 3	< 0,01
Catecolaminas	1470 ± 43	1091 ± 88	< 0,001
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	778 ± 17	121 ± 21	< 0,001
Noradrenalina	361 ± 6	57 ± 6	< 0,001

Promedios ± E.S. de 6-14 animales.



HORAS

Figura 7

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de corticosterona en glándula adrenal de animales tratados con H 44/68 y sacrificados a diferentes tiempos. Promedios ± E.S.
 $\Delta\Delta$ $P < 0,001$; $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0,001$; $\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P < 0,001$; $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P < 0,01$

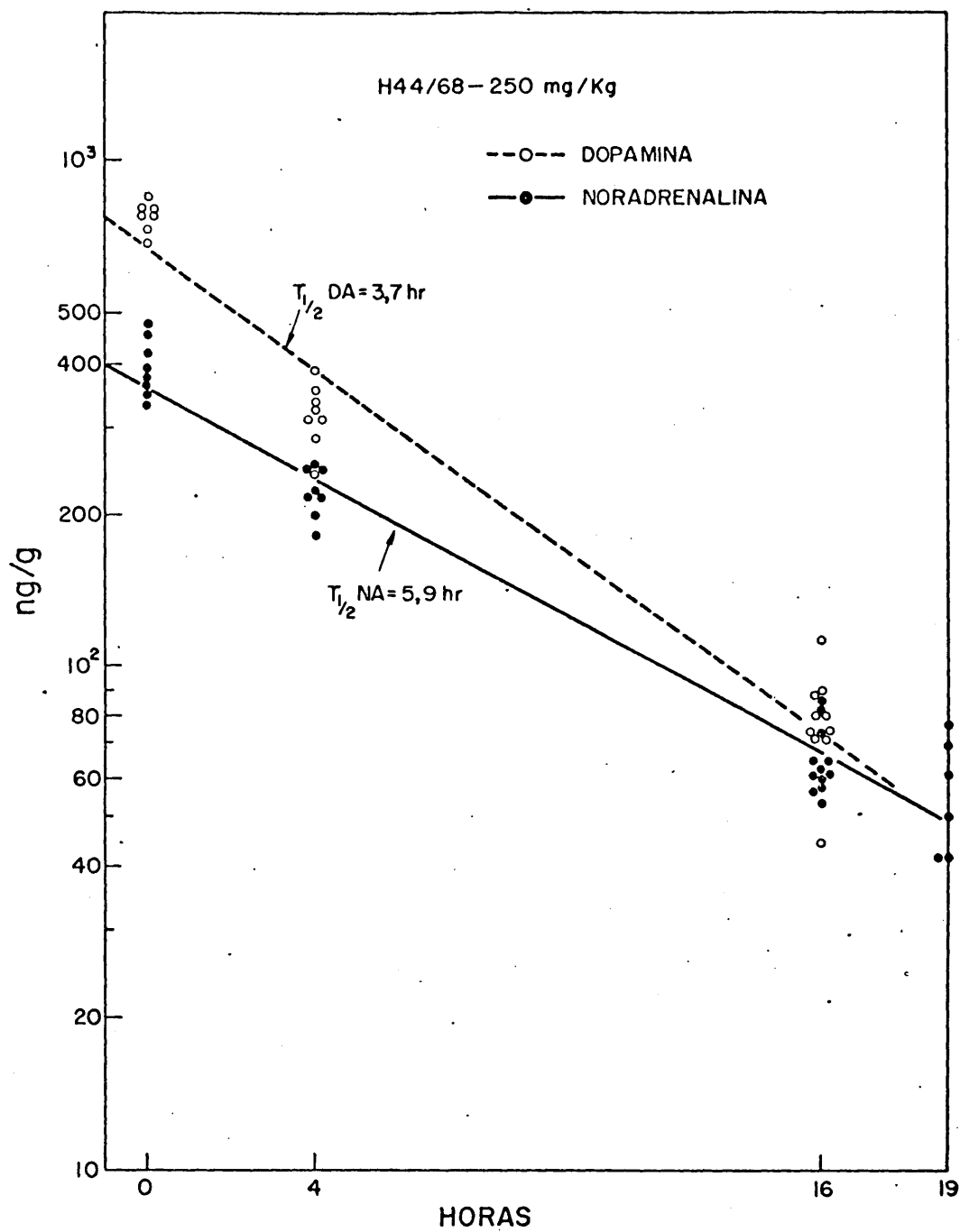


Figura 8

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro a distintos tiempos después de la administración de H 44/68. Las pendientes de las rectas de regresión se han calculado por el método de los mínimos cuadrados.

ADMINISTRACION DE H 44/68 Y DE MORFINA EN DOSIS UNI-CA

Determinada la respuesta a la administración de H 44/68 o de morfina independientemente, estudiamos la acción que el tratamiento conjunto de ambos compuestos podría tener sobre el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro y sobre la concentración de catecolaminas y corticosterona en glándula adrenal. Para ello, inyectamos 250 mg/kg de H 44/68 y transcurridas diez y seis horas se administró 50 mg/kg de morfina, siendo sacrificados los animales tres horas después de esta última inyección. Para el análisis estadístico, los resultados obtenidos con este grupo de experiencias se compararán con los de los animales que reciben la misma dosis de H 44/68 y pasadas diez y seis horas se les administra solución salina, siendo sacrificados horas después.

En la tabla XV podemos ver como los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas y corticosterona en glándula adrenal de los animales inyectados con salino a las diez y seis horas de la administración de H 44/68 y sacrificados tres horas después de dar el inhibidor, no difieren de los observados en los animales inyecta

dos con H 44/68 y sacrificados diez y nueve horas después. Al comparar los resultados de los animales tratados con H 44/68 y morfina (Tabla XV) con los obtenidos por el tratamiento con H 44/68 o con morfina, vemos (Fig. 9) que el aumento en los niveles de corticosterona en glándula adrenal observado por la administración aguda de morfina o por el tratamiento único con H 44/68 no es significativamente modificado por la administración conjunta de estos fármacos, siendo los niveles de corticosterona del mismo orden que los hallados en los tratamientos independientes. Respecto a catecolaminas en glándula adrenal, aunque la sola administración de morfina como ya se ha indicado, no produce variaciones, la administración de esta droga a animales pretratados con H 44/68 induce un descenso altamente significativo ($P < 0,001$) al comparar estos resultados con los obtenidos en animales tratados con el inhibidor y salino.

El contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro, dijimos desciende significativamente por la administración aguda de morfina y también al administrar H 44/68 se producen intensos descensos en los niveles de estas bioaminas; pues bien, la inyección de morfina a animales previamente tratados con el inhibidor causa una reducción significativa ($P < 0,05$) para ambas bioaminas que es de un

51% para la dopamina y de un 22% para la noradrenalina, al comparar los resultados con los obtenidos en animales tratados con H 44/68 y salino (Tabla XV; Figura 10).

El tratamiento con morfina posterior a la administración de H 44/68 intensifica el descenso de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas en glándula adrenal causado por la administración del inhibidor, posiblemente por un aumento en la liberación de los mismos por acción del opioide, si bien no modifica la acción del H 44/68 sobre los niveles de corticosterona en glándula adrenal.

Tabla XV

Efecto de la administración de Morfina (50 mg/kg) en animales tratados 16 horas antes con H 44/68 (250/mg/kg) sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina en cerebro.

	H 44/68 ^a	H 44/68 ^b + Salino ^b	H 44/68 ^c + Morfina ^c	* "p"
<u>Glándula (µg/g)</u>				
Corticosterona	60 ± 3	67 ± 4	70 ± 4	n.s.
Catecolaminas	1091 ± 88	936 ± 34	691 ± 31	< 0,001
<u>Cerebro (ng/g)</u>				
Dopamina	121 ± 21	117 ± 19	57 ± 6	< 0,05
Noradrenalina	57 ± 6	57 ± 4	44 ± 2	< 0,05

a) animales sacrificados 19 horas después de la inyección.

b) animales inyectados con salino a las 16 horas de la administración de H 44/68 y sacrificados 3 horas después.

c) animales inyectados con Morfina a las 16 horas de la administración de H 44/68 y sacrificados 3 horas después.

* significancia de las diferencias entre (c) y (b).

Promedios ± E.S. de 7-14 animales.

GLANDULA ADRENAL

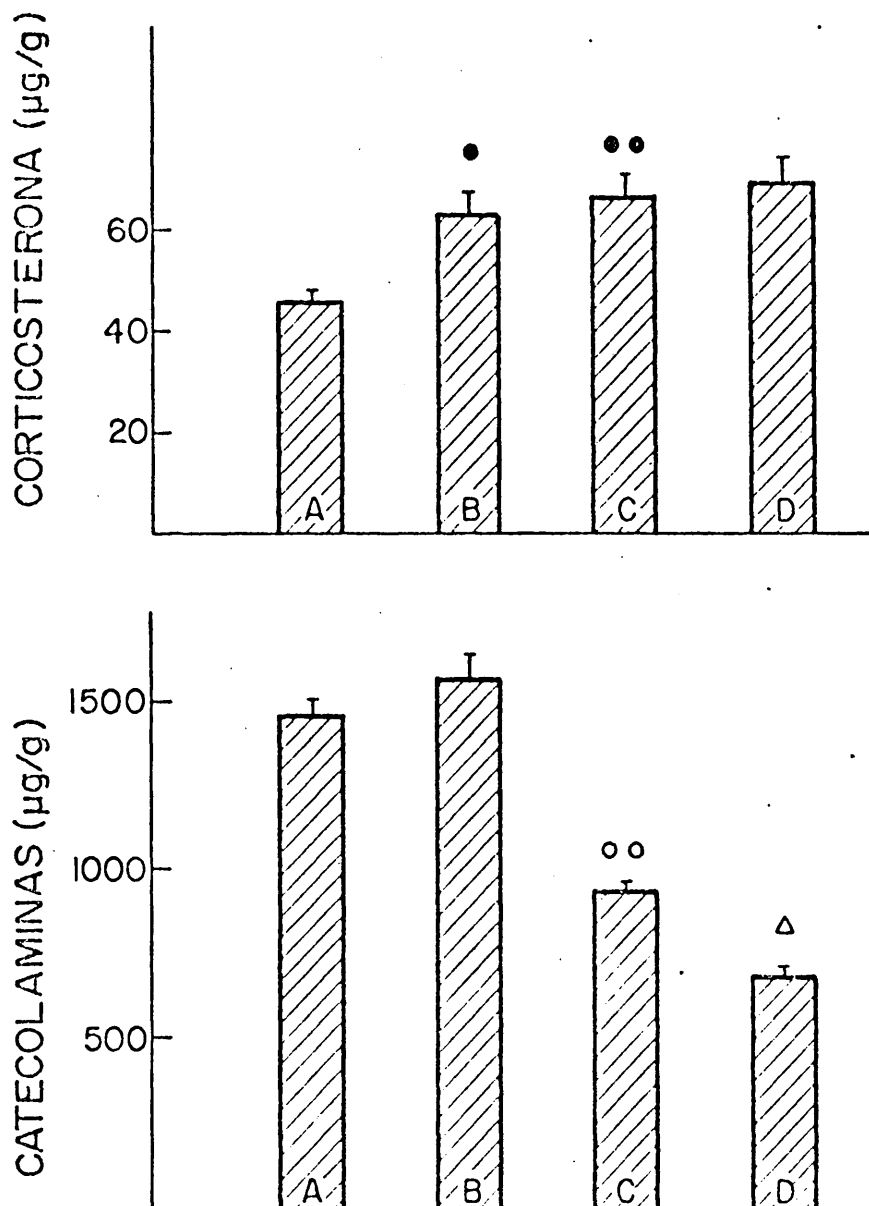


Figura 9

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal de animales sacrificados después de la administración de solución salina, 3 horas (A); morfina, 3 horas (B); H 44/68, 16 horas + solución salina, 3 horas (C) y H 44/68, 16 horas + morfina, 3 horas (D). Promedios \pm E.S.

● $P < 0,01$ B vs. A; ●● $P < 0,001$ C vs. A; ○○ $P < 0,001$ C vs. A;
 Δ $P < 0,001$ D vs. C

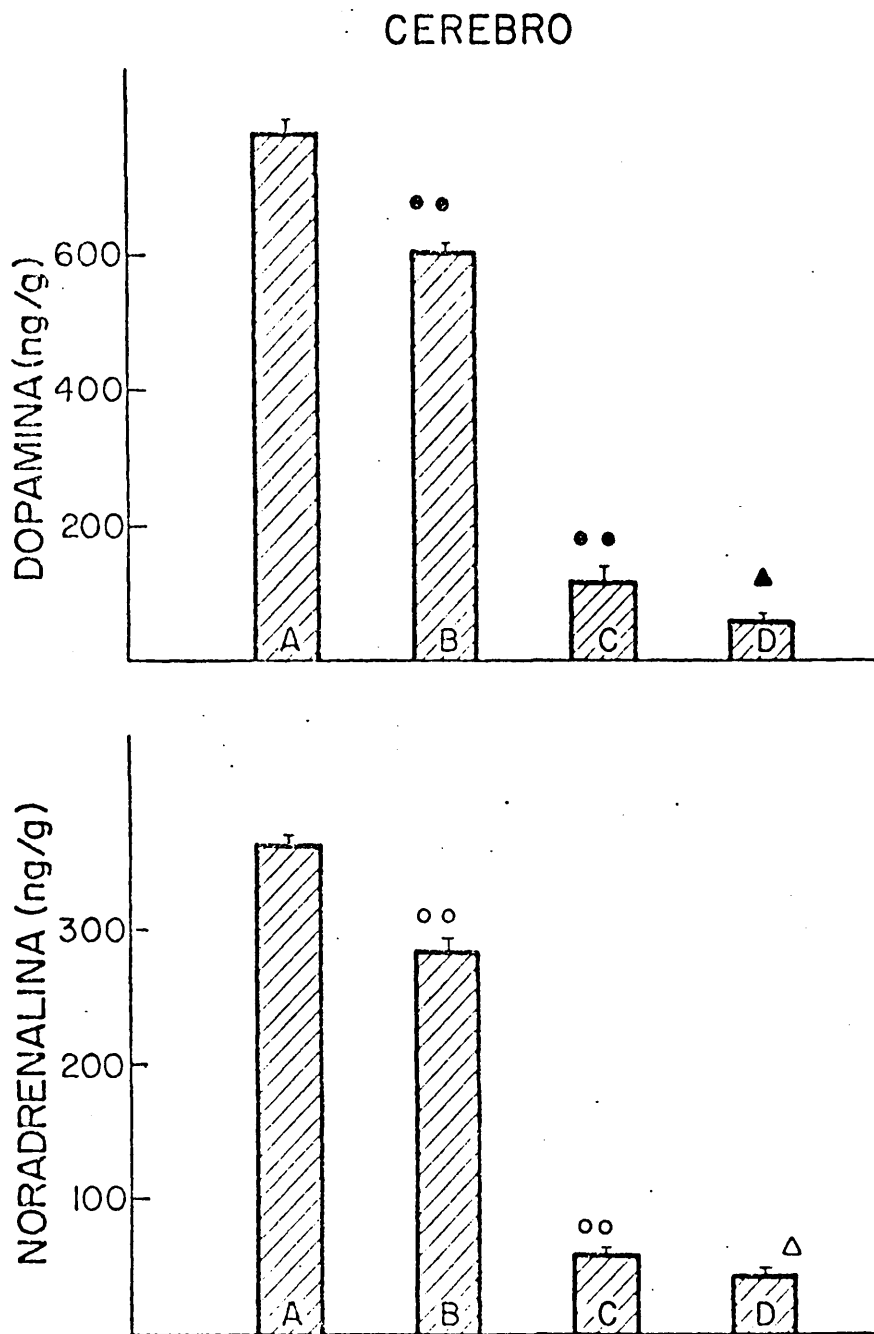


Figura 10

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales sacrificados después de la administración de solución salina, 3 horas (A); morfina, 3 horas (B); H 44/68, 16 horas + solución salina, 3 horas (C); H 44/68, 16 horas+morfina, 3 horas (D). Promedios \pm E.S.

●● $P < 0,001$ B vs. A y C vs. A; ▲ $P < 0,05$ D vs. C;
 ○○ $P < 0,01$ B vs. A y C vs. A; △ $P < 0,05$ D vs. C

ADMINISTRACION CRONICA DE MORFINA

Al conocer ya el efecto de la administración aguda de morfina sobre los parámetros de nuestro estudio, proseguimos nuestra investigación estudiando simultáneamente la acción que sobre las hormonas de la médula y corteza adrenal y catecolaminas del cerebro pudiera tener la administración crónica de morfina. Realizamos dos grupos de experiencias en que la droga era administrada durante seis y doce días según los esquemas de morfinización ya descritos en materiales y métodos.

La administración continuada de morfina durante seis días (Tabla XVI) produce un descenso significativo en los niveles de corticosterona en glándula adrenal ($P < 0,01$) y plasma ($P < 0,02$) respecto a los animales controles, observándose un efecto semejante al prolongar el tratamiento hasta doce días (Tabla XVII), ya que los niveles de esta hormona son aproximadamente del mismo orden (Figura 11) que los de los animales tratados durante seis días y la diferencia significativa respecto a controles es a los doce días $P < 0,01$ en glándula y $P < 0,01$ en plasma. No encontramos diferencias significativas respecto a los

animales controles en el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro, ni tampoco en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal después de seis (Tabla XVI) y doce (Tabla XVII) días de tratamiento continuado con morfina (Figuras 11 y 12).

Respecto al comportamiento, podemos decir que ya a los seis días de administración diaria de morfina, se aprecia un marcado descenso en la intensidad y duración de los síntomas observados por el tratamiento agudo; al prolongar el período de morfinización, los animales muestran una notable actividad roedora, además de comportamiento agresivo cuando se les intenta coger.

El descenso en los niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, observado con los dos esquemas de morfinización crónica estudiados, parece indicar que la administración repetida de morfina posiblemente ejerza un efecto inhibitor sobre el eje hipófisis-adrenal. El no encontrar ahora variaciones en el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro parece indicar que se desarrolla tolerancia al efecto depletivo que la droga tiene sobre estas monoaminas al ser administrada en dosis única.

Tabla XVI

Efecto de la administración de Morfina durante 6 días consecutivos sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y corticosterona en plasma.

Animales sacrificados 3 horas después de la última inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	50 ± 3	31 ± 6	< 0,01
Catecolaminas	1455 ± 23	1350 ± 58	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	760 ± 35	749 ± 12	n.s.
Noradrenalina	381 ± 11	356 ± 14	n.s.
<u>Plasma (µg/100 ml)</u>			
Corticosterona	48 ± 4	20 ± 5	< 0,02

Promedios ± E.S. de 8-9 animales.

Tabla XVII

Efecto de la administración de Morfina durante 12 días consecutivos sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y corticosterona en plasma.

Animales sacrificados 3 horas después de la última inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>Controles</u>	<u>Morfina</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	50 ± 3	33 ± 3	<0,01
Catecolaminas	1455 ± 23	1390 ± 84	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	760 ± 35	791 ± 12	n.s.
Noradrenalina	381 ± 11	348 ± 11	n.s.
<u>Plasma (µg/100 ml)</u>			
Corticosterona	48 ± 4	29 ± 3	<0,01

Promedios ± E.S. de 8-9 animales.

GLANDULA ADRENAL

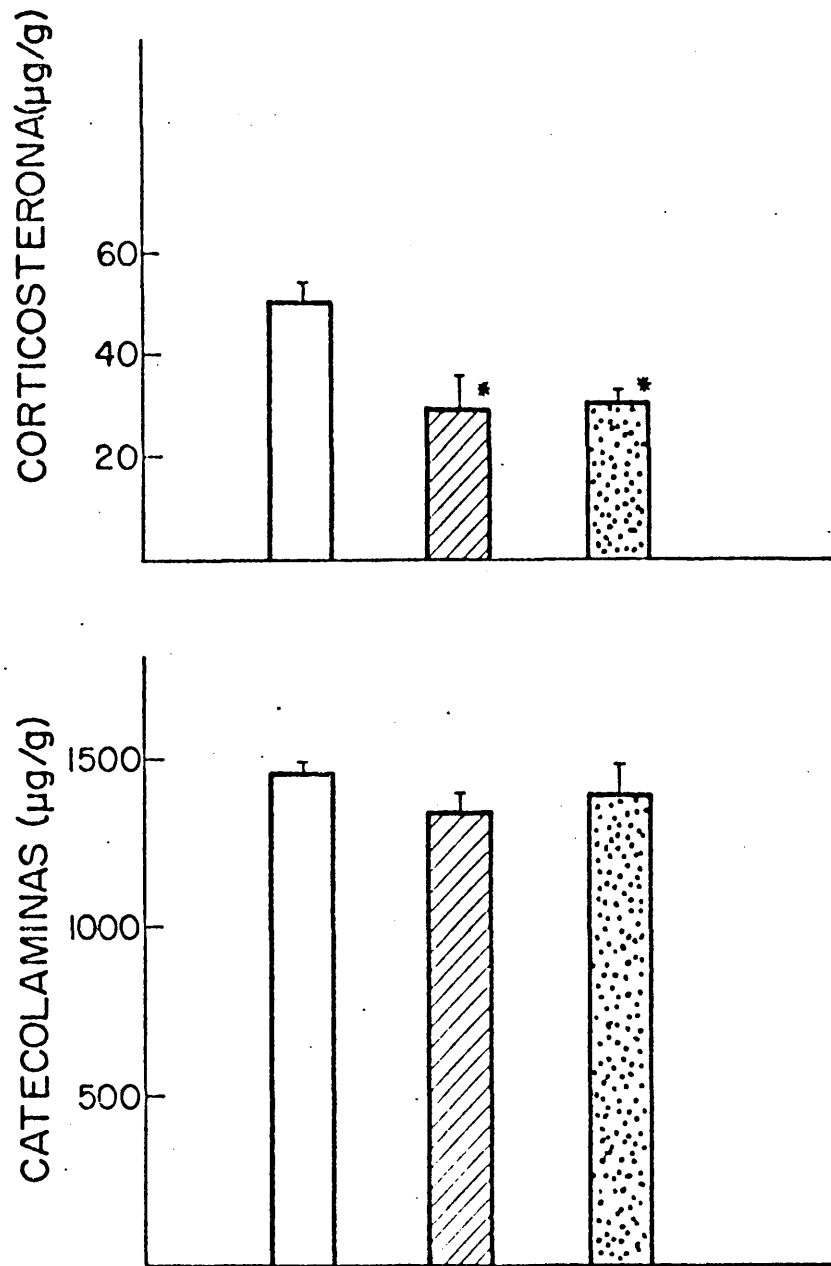


Figura 11

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal de animales sacrificados después de la administración continuada de solución salina y morfina. Promedios \pm E.S.

□ control 6 días; ▨ morfina 6 días; ▩ morfina 12 días
* $P < 0,01$ respecto control

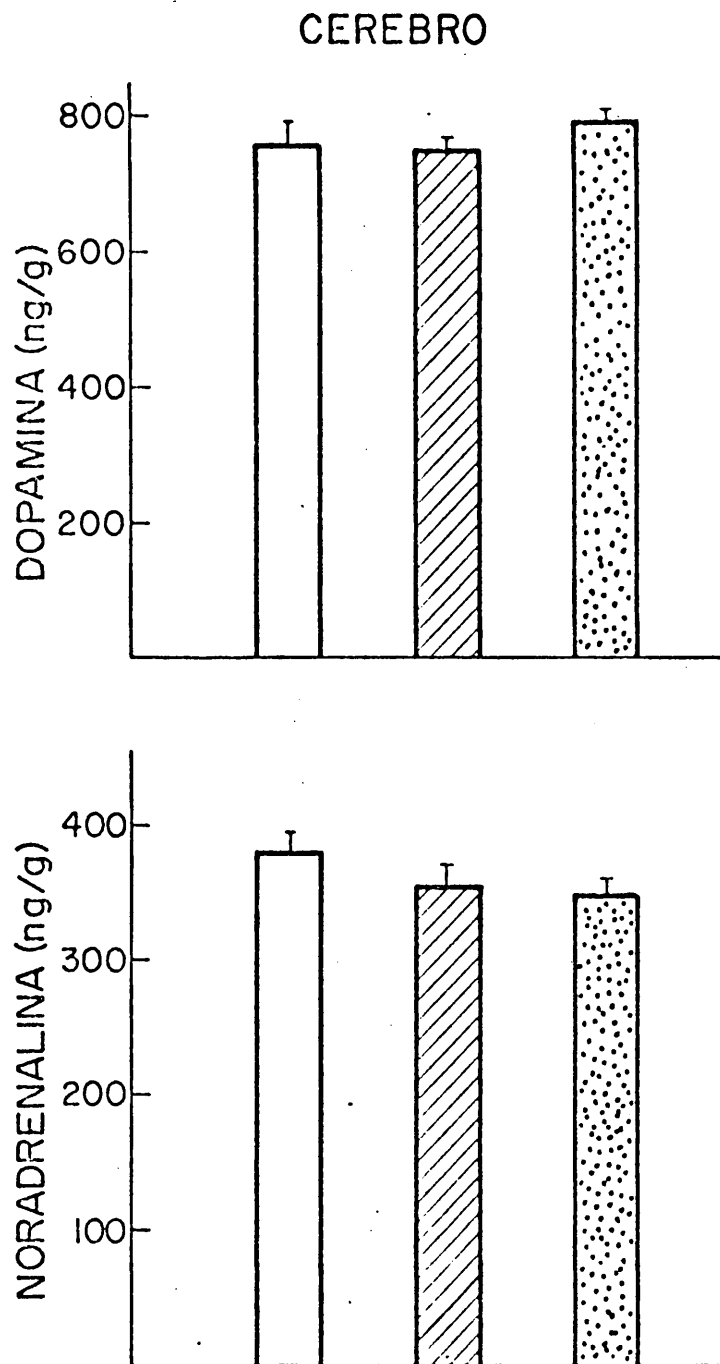


Figura 12

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales sacrificados después de la administración continuada de solución salina y morfina. Promedios \pm E.S.

□ control 6 días; ▨ morfina 6 días; ▩ morfina 12 días

ADMINISTRACION DE NALORFINA A ANIMALES TRATADOS CON
MORFINA DURANTE SEIS DIAS

Con el fin de conocer si después de seis días consecutivos de administrar morfina, se podía haber desarrollado en los animales un cierto grado de dependencia a la droga, realizamos un grupo de experiencias en las que se estudió el efecto de la administración de nalorfina, antagonista de la morfina, sobre los niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma; así mismo se determinaron los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas en glándula adrenal. En estas experiencias los animales fueron inyectados con morfina durante seis días, según el esquema de morfina ya mencionado e inmediatamente después de la última inyección del opioide se les administró nalorfina (10 mg/kg) siendo sacrificados tres horas después.

Como puede observarse en la Tabla XVIII y Figura 13, la administración de nalorfina a los animales morfinaizados produce un aumento altamente significativo en los niveles de corticosterona en glándula adrenal ($P < 0,001$) y plasma ($P < 0,001$) respecto a los animales tratados solo con el opioide. La concentración de catecolaminas en glán

dula adrenal no es modificada significativamente por la inyección de nalorfina.

Respecto a las catecolaminas en cerebro el contenido de noradrenalina no presenta variación, mientras que se aprecia un incremento significativo ($P < 0,001$) en los niveles de dopamina (Tabla XVIII; Figura 14).

Aproximadamente a los quince minutos de administrar nalorfina, los animales muestran marcada hiperactividad, destacándose la gran tendencia a mascar o roer los peles e incluso las uñas y la punta de los dedos; también observamos intensa excitación y mayor comportamiento agresivo que durante los últimos días del tratamiento crónico con morfina. Este comportamiento es debido probablemente al fenómeno de la abstinencia inducido por la inyección del antagonista del narcótico.

El aumento observado en los niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma es muy posible sea consecuencia del "stress" de abstinencia provocado, en los animales habituados a la morfina, por la inyección de nalorfina, lo que indicaría que ciertamente estos animales presentan ya un determinado grado de dependencia/tolerancia a la morfina. La elevación en el contenido de dopamina en cerebro, podría estar relacionada con los síntomas de hiperactividad observados en los animales tratados con el antagonista.

Tabla XVIII

Efecto de la administración de Nalorfina, en animales tratados con Morfina -6 días- sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y corticosterona en plasma.

Animales sacrificados 3 horas después de la última inyección.

<u>Glándula</u> (µg/g)	<u>Morfina</u>	<u>Morfina + Nalorfina</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	31 ± 6	71 ± 6	<0,001
Catecolaminas	1350 ± 58	1251 ± 109	n.s.
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	749 ± 12	838 ± 12	<0,001
Noradrenalina	356 ± 14	353 ± 27	n.s.
<u>Plasma</u> (µg/100 ml)			
Corticosterona	20 ± 5	65 ± 3	<0,001

Promedios ± E.S. de 7-8 animales.

GLANDULA ADRENAL

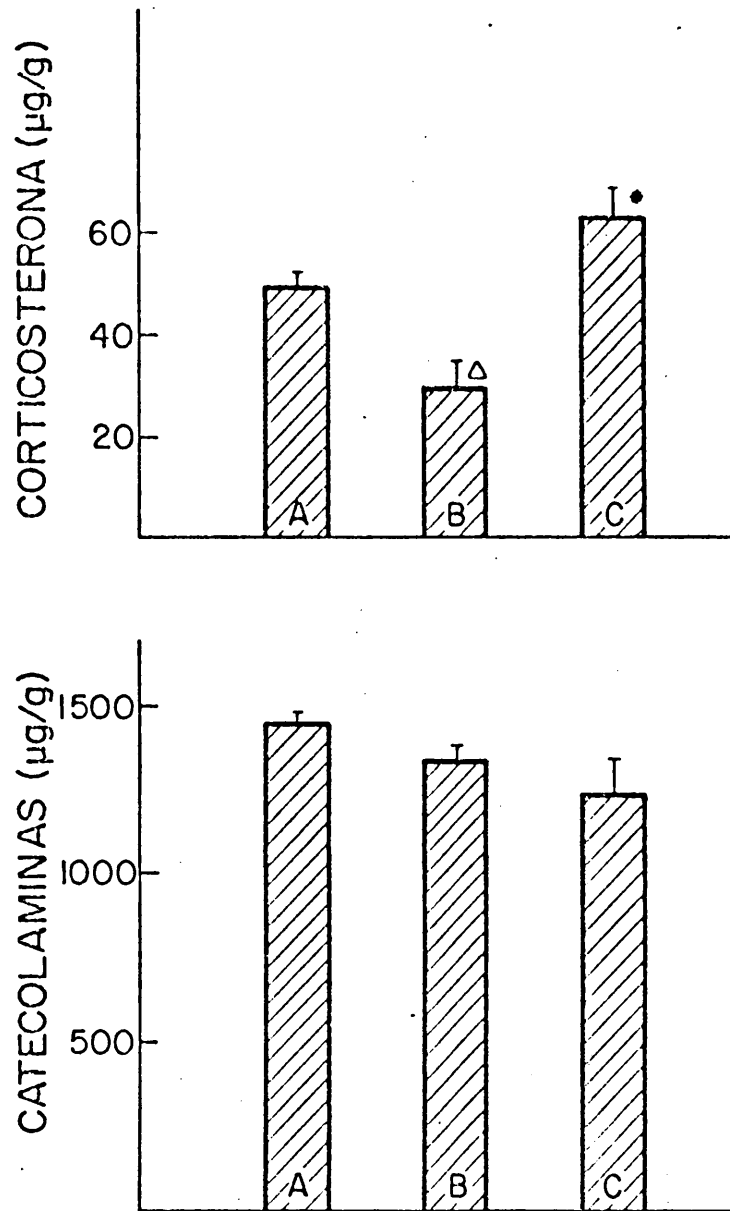


Figura 13

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal de animales sometidos a la administración de solución salina, 6 días (A); morfina, 6 días (B); morfina, 6 días + nalorfina (C). Promedios \pm E.S.

$\nabla P < 0,01$ B vs. A; $\star P < 0,001$ C vs. B

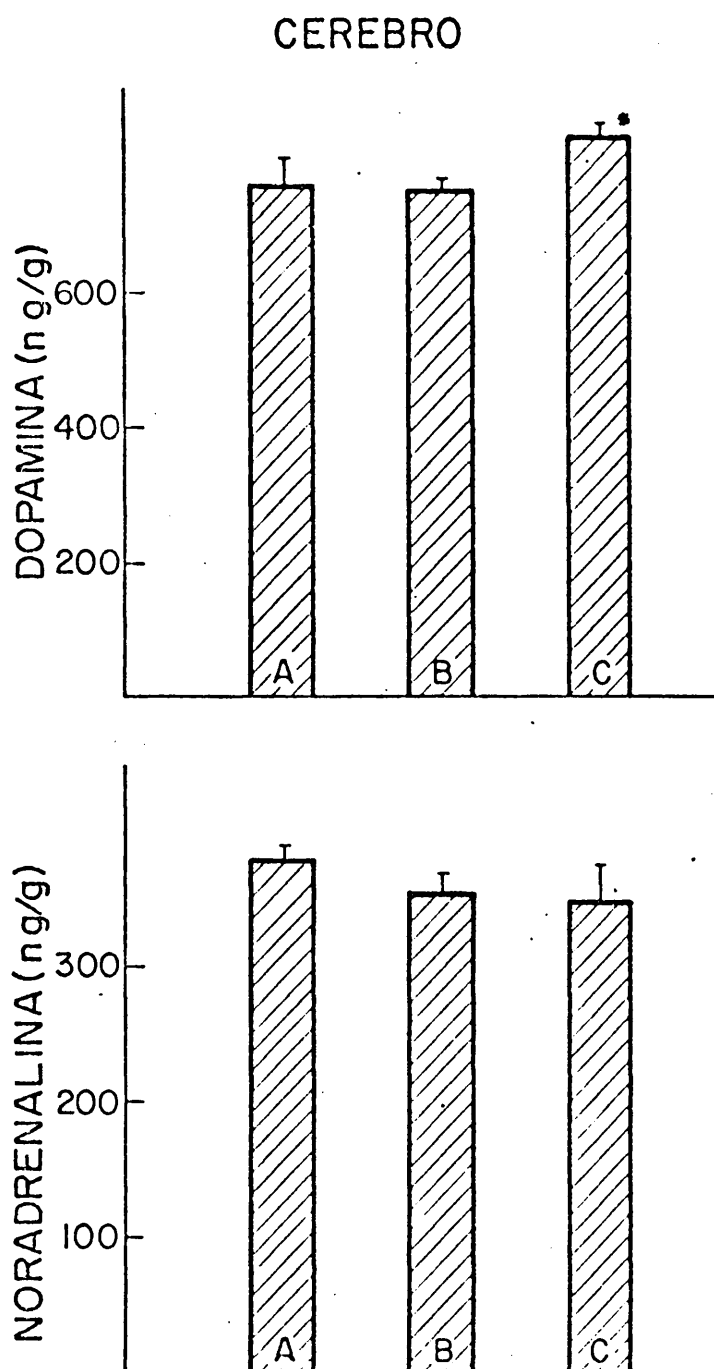


Figura 14

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales sacrificados después de la administración de solución salina, 6 días (A); morfina, 6 días (B); morfina, 6 días + nalorfina (C). Promedios \pm E.S.

* $P < 0,001$ C vs. B

ADMINISTRACION DE H 44/68 A ANIMALES TRATADOS CRONICAMENTE CON MORFINA.

Conocido el efecto de la administración de morfina en dosis única sobre los niveles de hormonas de la médula y corteza adrenal y sobre el contenido de dopamina y norepinefrina en cerebro en animales a los que previamente se les había administrado H 44/68, estudiamos la acción del inhibidor en animales tratados crónicamente con morfina. Para ello realizamos un grupo de experiencias en que los animales fueron sometidos al ciclo de morfinización de doce días; el día undécimo se administró 250 mg/kg del inhibidor y pasadas diez y seis horas se inyectó la última dosis de morfina, siendo sacrificados los animales tres horas después. Para el análisis estadístico, los resultados se comparan frente a animales tratados con el inhibidor y diez y seis horas después con salino.

En la Tabla XIX vemos que la concentración de catecolaminas en glándula adrenal y los niveles de corticosterona en glándula y plasma en los animales morfinizados e inyectados con H 44/68 no varía respecto a los tratados con el inhibidor y salino.

Aún cuando la administración crónica de morfina (Ta-

bla XVII) hemos dicho causa un descenso en los niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, no impide la respuesta corticoadrenal a la administración de H 44/68, observándose un aumento altamente significativo ($P < 0,001$) en la corticosterona adrenal respecto a los animales solamente morfinizados. Tampoco la inyección continuada de morfina modifica la respuesta de los animales al tratamiento con H 44/68 en cuanto a hormonas de la médula adrenal se refiere (Figura 15).

En los animales tratados crónicamente con morfina, la administración de H 44/68 no produce el mismo grado de depleción en el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro que cuando se administra el inhibidor a animales no morfinizados, estando los niveles de dopamina y noradrenalina significativamente elevados ($P < 0,001$ y $P < 0,02$ respectivamente) en los animales inyectados diariamente con el opioide (Tabla XIX; Figura 16).

El que los animales crónicamente tratados con morfina presenten los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro más altos que los animales que solo reciben el inhibidor pudiera ser debido a que ahora la liberación de dichas bioaminas está disminuída, al contrario de lo que ocurría cuando inyectábamos el opioide en dosis única. El hecho de que el tratamiento crónico con morfina no varíe la

respuesta de las catecolaminas adrenales al H 44/68, pudiera atribuirse a que se ha desarrollado tolerancia al aumento en la liberación de las mismas producido por la administración aguda de la droga.

Tabla XIX

Efecto de la administración de H 44/68 en animales tratados con Morfina durante 12 días, sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y corticosterona en plasma.

Animales sacrificados 3 horas después de la última inyección.

<u>Glándula (µg/g)</u>	<u>H 44/68</u>	<u>Morfina + H 44/68</u>	<u>"p"</u>
Corticosterona	67 ± 4	68 ± 4	n.s.
Catecolaminas	936 ± 34	934 ± 76	n.s.
<u>Cerebro (ng/g)</u>			
Dopamina	117 ± 19	358 ± 55	< 0,001
Noradrenalina	57 ± 4	118 ± 28	< 0,02
<u>Plasma (µg/ 100 ml)</u>			
Corticosterona	88 ± 7	83 ± 8	n.s.

Promedios ± E.S. de 8-14 animales.

GLANDULA ADRENAL

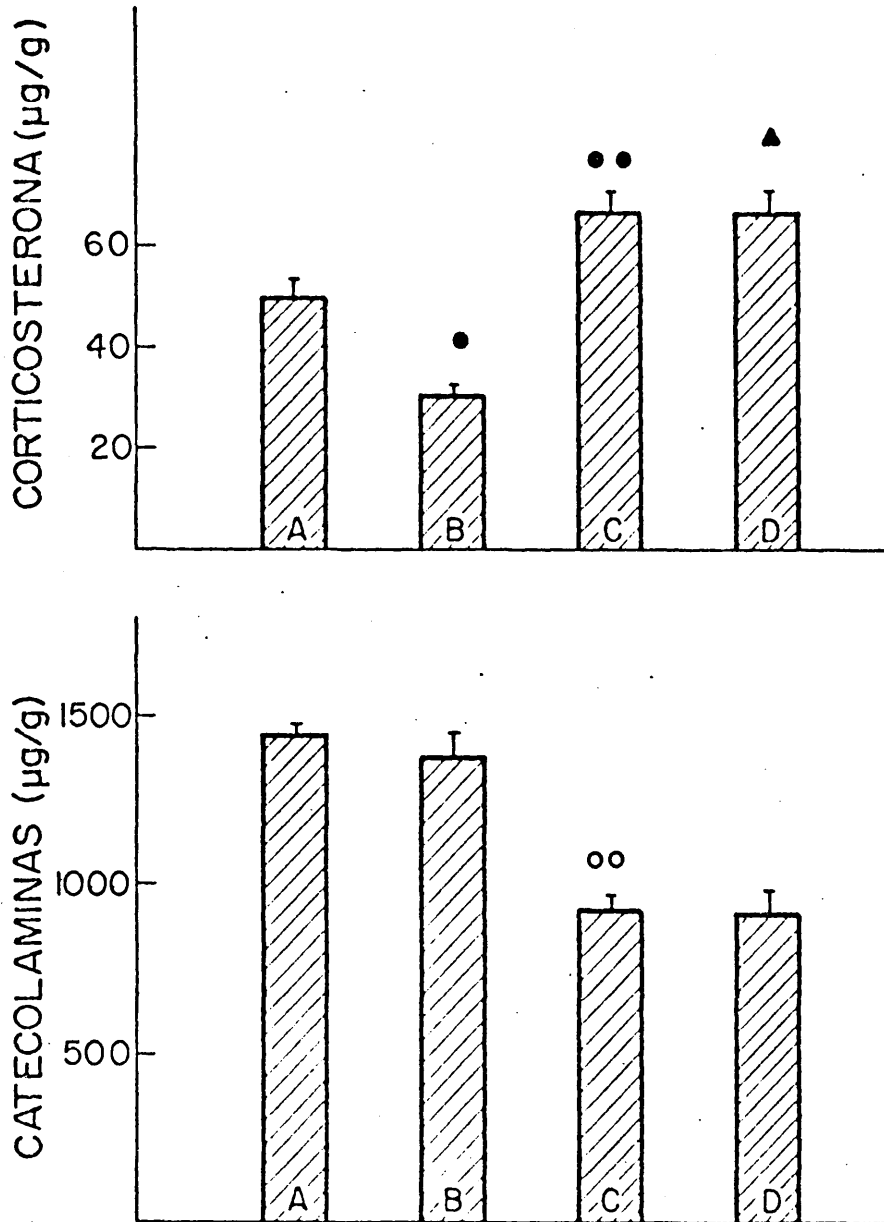


Figura 15

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal de animales sacrificados después de la administración de solución salina, 6 días (A); morfina, 12 días (B); H 44/68 (C); morfina, 12 días + H 44/68 (D). Promedios \pm E.S.

• $P < 0,01$ B vs. A; •• $P < 0,001$ C vs. A; ▲ $P < 0,001$ D vs. B;
 oo $P < 0,001$ C vs. A

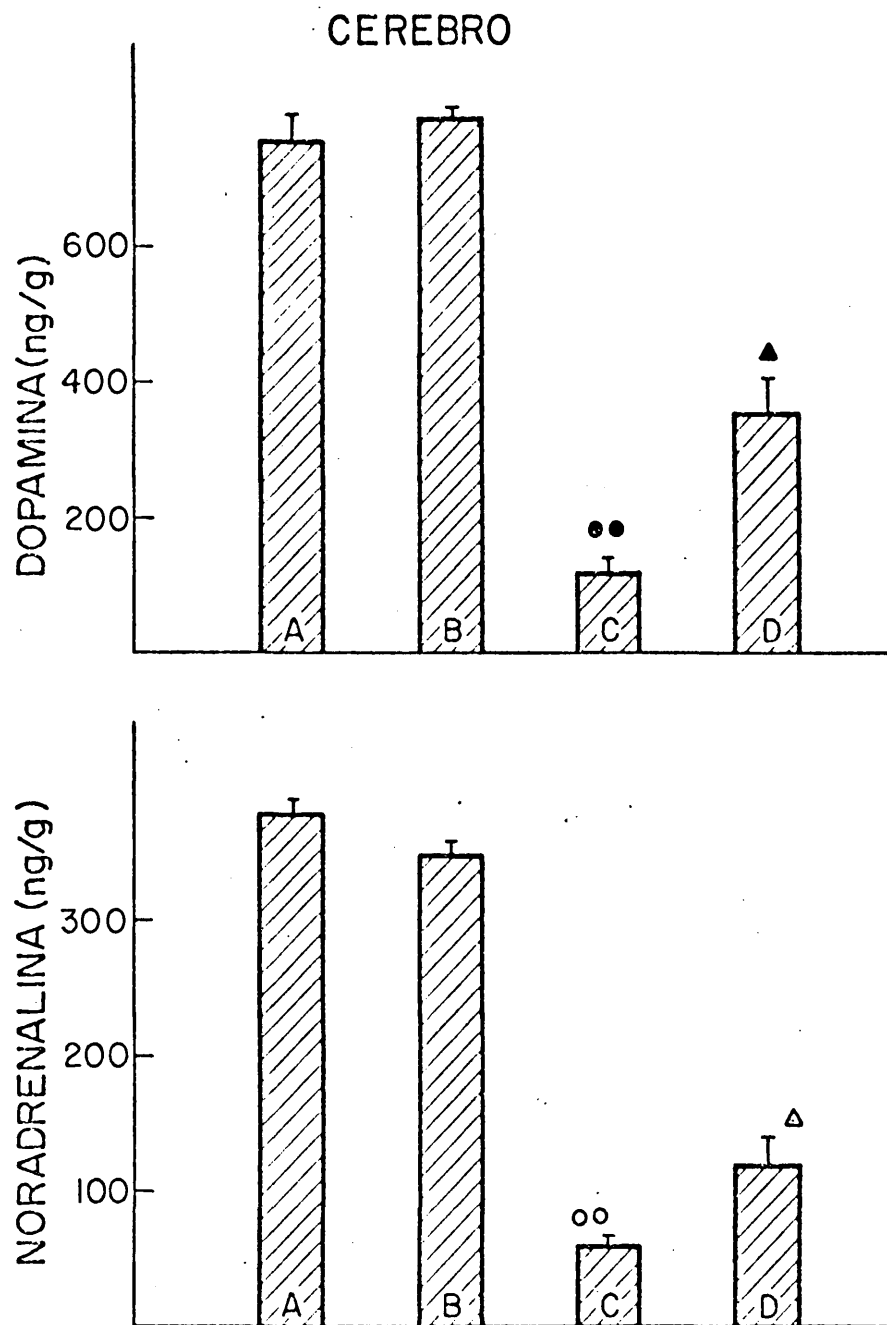


Figura 16

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales sacrificados después de la administración de solución salina, 6 días (A); morfina, 12 días (B); H 44/68 (C); morfina, 12 días + H 44/68 (D). Promedios \pm E.S.

••P<0,001 C vs. A; Δ P<0,01 D vs. C; $\circ\circ$ P<0,001 C vs. A;

Δ P<0,01 D vs. C

Tabla 1

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales normales.

	<u>Corticosterona</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	56	1250	47
	36	1281	49
	44	1250	56
	63	1469	48
	61	1750	41
	55	1563	43
		1438	52
Promedios	53	1430	48
± E.S.	±4	±70	±2

Tabla 2

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales normales.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	684	372	1,46
	772	356	1,50
	772	328	1,50
	728	344	1,50
	812	472	1,52
	812	456	1,43
	856	416	1,77
Promedios	777	392	1,53
± E.S.	±21	±21	±0,04

Tabla 3

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 0,5 h. después de la inyección de solución salina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	115	1432	48
	98	1625	53
	97	1375	73
	73	1625	61
	98	1450	63
	81	1208	61
	73	1375	56
Promedios	91	1440	59
\pm E.S.	± 6	± 70	± 3

Tabla 4

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebro de animales sacrificados 0,5 horas después de la inyección de solución salina.

	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso cerebros</u> (g)
	662	360	1,70
	662	412	1,64
	662	372	1,76
	744	360	1,76
	827	400	1,80
	786	388	1,65
	827	373	1,60
Promedios	739	381	1,70
± E.S.	±92	±8	±0,03

Tabla 5

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 1 hora después de la inyección de solución salina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	54	2050	55
	51	1850	53
	49	1640	51
	44	2050	55
	57	1412	50
	45	1294	52
	53	1235	58
		1176	51
Promedios	50	1588	53
\pm E.S.	± 2	± 127	± 1

Tabla 6

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 1 hora después de la inyección de solución salina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	800	340	1,60
	852	384	1,40
	752	372	1,80
	752	356	1,75
	816	384	1,67
	816	354	1,57
	880	400	1,62
	816	354	1,42
Promedios	811	368	1,60
± E.S.	±16	±7	±0,05

Tabla 7

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 3 horas después de la inyección de solución salina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	53	1400	52
	41	1500	53
	43	1550	56
	27	1810	70
	47	1350	55
	47	1550	69
	55	1900	48
	45	1300	50
	65	1400	48
	27	1575	65
	45	1450	54
	52	1535	45
	51	1400	53
	47	1450	53
Promedios	46	1470	55
\pm E.S.	± 3	± 43	± 2

Tabla 8

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 3 horas después de la inyección de solución salina.

	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso cerebros</u> (g)
	760	328	1,36
	800	356	1,59
	840	368	1,56
	880	356	1,60
	628	324	1,50
	744	352	1,48
	684	400	1,50
	760	372	1,50
	800	366	1,51
	776	345	1,72
	840	386	1,50
	800	372	1,48
	800	372	1,50
	776	360	1,50
Promedios	778	361	1,52
± E.S.	±17	±6	±0,02

Tabla 9

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 10 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	46	1445	45
	45	1465	69
	55	1500	57
	81	1630	46
	62	1400	54
	77	1530	51
	64	1345	60
Promedios	61	1474	55
\pm E.S.	± 5	± 35	± 3

Tabla 10

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 10 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	667	358	1,55
	624	276	1,53
	800	358	1,70
	712	345	1,56
	756	386	1,63
	844	358	1,56
	712	317	1,69
Promedios	731	343	1,60
± E.S.	±29	±14	±0,03

Tabla 11

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 30 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	118	1070	47
	103	1070	53
	124	1070	64
	112	1105	41
	117	1570	47
	103	1500	49
	144	1500	43
	123	1465	51
Promedios	118	1294	49
+ E.S.	+5	+82	+3

Tabla 12

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 30 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	704	372	1,37
	992	372	1,40
	960	336	1,57
	712	372	1,38
	624	264	1,55
	800	308	1,57
	806	292	1,57
		292	1,46
Promedios	800	321	1,48
± E.S.	±52	±18	±0,03

Tabla 13

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 50 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	57	1875	49
	68	1925	46
	76	1821	47
	62	1554	51
	82	1000	43
	81	1450	47
	76	1800	46
	89	1550	41
	93	1600	45
	100	1800	41
	90	1700	44
	96	1800	43
Promedios	81	1656	46
\pm E.S.	± 4	± 73	± 2

Tabla 14

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 50 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	720	427	1,62
	720	386	1,43
	752	372	1,53
	752	372'	1,63
	736	340	1,44
	780	372	1,43
	736	340	1,48
	716	352	1,44
	672	352	1,58
	756	464	1,53
	940	464	1,63
	912	436	1,56
Promedios	766	389	1,53
± E.S.	±8	±13	±0,02

Tabla 15

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 100 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	89	1800	50
	104	1500	48
	89	1550	42
	97	1875	44
	132	1675	67
	97	1500	50
	104	1800	46
	118	1500	43
Promedios	104	1650	49
\pm E.S.	± 5	± 56	± 3

Tabla 16

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 1 hora después de la administración de 100 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	800	386	1,34
	768	360	1,46
	868	320	1,47
	800	386	1,69
	776	320	1,62
	776	320	1,48
	800	292	1,66
	732	308	1,64
Promedios	790	336	1,55
± E.S.	±14	±13	±0,04

Tabla 17

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 3 horas después de la administración de 30 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	64	1285	42
	43	1145	36
	52	1000	37
	77	1583	85
	42	1335	85
	76	1445	71
	75	1347	63
Promedios	61	1306	56
± E.S.	±6	±72	±8

Tabla 18

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 3 horas después de la administración de 30 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	828	392	1,64
	828	384	1,57
	788	400	1,38
	704	276	1,54
	914	332	1,63
	914	313	1,69
	857	365	1,59
	857	313	1,69
Promedios	836	347	1,59
± E.S.	±24	±16	±0,04

Tabla 19

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 3 horas después de la administración de 50 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Catecolaminas</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Peso glándulas</u> (mg/par)
	77	2135	52
	104	1300	65
	61	1635	51
	57	2035	53
	29	1500	55
	55	1550	58
	80	1200	45
	78	1550	47
	64	1500	47
	57	1600	52
	78	1775	47
	64	2000	40
	59	1207	44
	82	1467	47
	25	1565	56
	64	1500	52
	46		54
Promedios	64	1594	49
\pm E.S.	± 5	± 68	± 4

Tabla 20

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 3 horas después de la administración de 50 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	440	220	1,58
	584	293	1,63
	540	266	1,64
	600	253	1,51
	600	280	1,57
	440	220	1,65
	560	290	1,50
	624	340	1,60
	624	336	1,62
	552	336	1,62
	576	303	1,63
	620	248	1,43
	660	300	1,44
	684	290	1,45
	664	317	1,47
	708	276	1,40
	684	317	1,50
Promedios	598	288	1,54
± E.S.	±19	±9	±0,02

Tabla 21

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 3 horas después de la administración de 100 mg/kg de morfina.

	<u>Corticosterona</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Catecolaminas</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Peso glándulas</u> (mg/par)
	75	1530	47
	54	1095	54
	64	1405	57
	68	1630	45
	55	1500	48
	46	1700	51
	59	1550	49
	54	1050	57
Promedios	59	1432	51
\pm E.S.	± 3	± 84	± 2

Tabla 22

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 3 horas después de la administración de 100 mg/kg de morfina.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	684	303	1,54
	640	331	1,55
	557	276	1,37
	728	358	1,54
	684	358	1,57
	640	303	1,45
	684	290	1,55
	728	248	1,42
Promedios	668	308	1,50
± E.S.	±20	±14	±0,03

Tabla 23

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 4 horas después de la administración de H 44/68.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	41	1600	41
	71	1700	28
	73	1500	50
	73	1600	51
	58	1700	52
	79	1530	64
	70	1500	53
Promedios	66	1590	49
\pm E.S.	± 5	± 32	± 4

Tabla 24

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 4 horas después de la administración de H 44/68.

	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso cerebros</u> (g)
	244	180	1,50
	284	200	1,60
	320	240	1,55
	386	224	1,51
	352	252	1,60
	304	220	1,50
	304	240	1,63
	332	220	1,64
Promedios	315	222	1,56
± E.S.	±15	±8	±0,02

Tabla 25

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 16 horas después de la administración de H 44/68.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	58	1335	44
	46	1610	50
	48	1280	55
	64	1835	37
	53	1445	33
	67	1625	48
	67	1375	58
	69	1250	48
	69	1400	62
	77	1050	67
	52	1300	49
Promedios	61	1410	50
\pm E.S.	± 3	± 64	± 3

Tabla 26

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 16 horas después de la administración de H 44/68.

	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso cerebros</u> (g)
	148	88	1,57
	74	74	1,55
	44	57	1,65
	30	62	1,63
	74	53	1,61
	112	64	1,53
	80	61	1,66
	72	56	1,62
	88	61	1,44
	80	64	1,46
	72	61	1,44
Promedios	79	64	1,56
± E.S.	±4	±3	±0,03

Tabla 27

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 19 horas después de la administración de H 44/68.

	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso glándulas</u> <u>(mg/par)</u>
	62	790	49
	62	1125	58
	69	935	79
	62	1050	60
	47	1280	63
	57	1370	53
Promedios	60	1091	60
\pm E.S.	± 3	± 88	± 4

Tabla 28

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 19 horas después de la administración de H 44/68.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	160	77	1,20
	120	41	1,54
	96	61	1,58
	168	69	1,55
	88	50	1,39
	96	41	1,45
Promedios	121	57	1,45
± E.S.	±21	±6	±0,06

Tabla 29

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 3 horas después de la administración de solución salina y previamente tratados con H 44/68.

	<u>Corticosterona</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Catecolaminas</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Peso glándulas</u> (mg/par)
	57	835	48
	91	880	61
	60	815	69
	85	915	59
	91	835	57
	51	835	52
	62	855	69
	60	835	63
	63	1000	53
	65	900	48
	77	1150	53
	62	1200	59
	56	1000	61
	51	1050	58
Promedios	67	936	58
\pm E.S.	± 4	± 34	± 2

Tabla 30

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 3 horas después de la administración de solución salina y previamente tratados con H 44/68.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	200	88	1,40
	80	52	1,40
	172	48	1,50
	60	80	1,40
	40	60	1,35
	156	43	1,40
	200	46	1,35
	80	68	1,64
	50	46	1,61
	180	55	1,53
	40	46	1,58
	60	46	1,46
	200	55	1,54
Promedios	117	57	1,47
± E.S.	±19	±4	±0,03

Tabla 31

Niveles de corticosterona y catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales sacrificados 3 horas después de la administración de morfina y previamente tratados con H 44/68.

	<u>Corticosterona</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Catecolaminas</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Peso glándulas</u> (mg/par)
	80	595	47
	79	845	56
	86	635	68
	60	660	61
	58	680	56
	60	680	69
	67	745	66
Promedios	70	691	60
\pm E.S.	± 4	± 31	± 3

Tabla 32

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales sacrificados 3 horas después de la administración de morfina y previamente tratados con H 44/68.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	50	52	1,60
	50	40	1,40
	90	48	1,49
	80	44	1,45
	40	44	1,53
	40	36	1,60
	40		1,65
Promedios	57	44	1,53
± E.S.	±6	±2	±0,03

Tabla 33

Niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, de catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales inyectados con solución salina durante 6 días consecutivos y sacrificados 3 horas después de la última inyección.

	Corticosterona		Catecolaminas	
	<u>Glándula</u>	<u>Plasma</u>	<u>Glándula</u>	<u>Peso glándulas</u>
	<u>($\mu\text{g/g}$)</u>	<u>($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)</u>	<u>($\mu\text{g/g}$)</u>	<u>(mg/par)</u>
	43	31	1400	55
	39	44	1400	59
	53	34	1400	56
	50	60	1650	55
	66	44	1650	55
	46	67	1150	60
	48	44	1150	53
	51	57	1500	52
	58	47	1800	48
Promedios	50	48	1455	55
\pm E.S.	± 3	± 4	± 23	± 1

Tabla 34

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales inyectados con solución salina durante 6 días consecutivos y sacrificados 3 horas después de la última inyección.

	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso cerebros</u> (g)
	800	384	1,70
	720	372	1,50
	840	384	1,48
	920	428	1,49
	800	384	1,48
	720	412	1,49
	640	360	1,43
	640	328	1,43
Promedios	760	381	1,50
± E.S.	±35	±11	±0,03

Tabla 35

Niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, de catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales inyectados con morfina durante 6 días consecutivos y sacrificados 3 horas después de la última inyección.

Corticosterona		Catecolaminas		
<u>Glándula</u>	<u>Plasma</u>	<u>Glándula</u>	<u>Peso glándulas</u>	
(ug/g)	(ug/100ml)	(ug/g)	(mg/par)	
20	12	1600	50	
28	8	1450	53	
42	35	1500	58	
61	8	1250	64	
20	25	1400	66	
18	41	1300	73	
44	8	1135	60	
15		1165	69	
Promedios	31	20	1350	62
± E.S.	±6	±5	±58	±3

Tabla 36

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales inyectados con morfina durante 6 días consecutivos y sacrificados 3 horas después de la última inyección.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	720	376	1,60
	720	358	1,60
	748	376	1,50
	720	400	1,50
	748	400	1,47
	756	300	1,47
	756	320	1,53
	820	320	1,52
Promedios	749	356	1,52
± E.S.	±12	±14	±0,02

Tabla 37

Niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, de catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales inyectados con morfina durante 12 días consecutivos y sacrificados 3 horas después de la última inyección.

	Corticosterona		Catecolaminas	Peso glándulas
	<u>Glándula</u>	<u>Plasma</u>	<u>Glándula</u>	<u>Peso glándulas</u>
	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	($\mu\text{g/g}$)	(mg/par)
	48	28	1200	58
	47	34	1800	44
	27	16	1200	70
	30	36	1215	69
	20	15	1215	68
	31	37	1700	52
	33	35	1450	59
	31	33	1350	57
Promedios	33	29	1390	60
\pm E.S.	± 3	± 3	± 84	± 3

Tabla 38

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales inyectados con morfina durante 12 días consecutivos y sacrificados 3 horas después de la última inyección.

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	756	362	1,56
	788	381	1,49
	820	324	1,57
	756	305	1,67
	820	305	1,60
	840	362	1,58
	788	362	1,54
	756	381	1,42
Promedios	791	348	1,55
± E.S.	±12	±11	±0,03

Tabla 39

Niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, de catecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de animales tratados con morfina durante 6 días y sacrificados 3 horas después de la inyección de nalorfina.

	Corticosterona		Catecolaminas	
	<u>Glándula</u>	<u>Plasma</u>	<u>Glándula</u>	<u>Peso glándulas</u>
	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	($\mu\text{g/g}$)	(mg/par)
	48	63	930	46
	66	62	1430	59
	80	75	1180	67
	88	81	1145	58
	57	60	1930	47
	57	62	1105	60
	103	50	1070	48
	71	63	1215	47
Promedios	71	65	1251	54
\pm E.S.	± 6	± 3	± 109	± 3

Tabla 40

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales tratados con morfina durante 6 días y sacrificados 3 horas después de la inyección de nalorfina.

	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso cerebros</u> (g)
	786	368	1,41
	890	440	1,53
	807	368	1,60
	869	368	1,58
	848	300	1,55
	807	332	1,48
	848	316	1,46
	848	332	1,53
Promedios	838	353	1,52
± E.S.	±12	±27	±0,02

Tabla 41

Niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma, de ca
tecolaminas en glándula adrenal y peso par de glándulas de
animales inyectados con morfina durante 12 días y tratados
con H 44/68. (Ver texto).

Corticosterona		Catecolaminas	
<u>Glándula</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Plasma</u> ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	<u>Glándula</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Peso glándulas</u> (mg/par)
68	81	790	58
74	81	540	61
74	84	835	54
48	41	1190	54
73	70	1000	60
59	94	1190	86
80	118	940	70
66	94	990	66
Promedios 68	83	934	63
\pm E.S. ± 4	± 8	± 76	± 4

Tabla 42

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y peso cerebros de animales inyectados con morfina durante 12 días y tratados con H 44/68. (ver texto).

	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso cerebros</u> <u>(g)</u>
	480	109	1,43
	208	54	1,43
	224	60	1,46
	576	236	1,45
	400	87	1,41
	240	76	1,61
	208	71	1,49
	528	252	1,60
Promedios	358	118	1,49
± E.S.	±55	±28	±0,03

DISCUSSION

La acción de la morfina sobre las monoaminas del cerebro, parece ser que está muy relacionada con la especie, la dosis y tiempo de sacrificio de los animales empleados. Maynert y Klingman (1962) estudiando el efecto de la morfina en diferentes especies animales -perro, conejo y rata- encuentran que en ésta última especie, solo la administración de dosis altas de morfina (60 a 200 mg/kg) causan una reducción significativa de los niveles de noradrenalina en cerebro, produciéndose el máximo efecto en un entorno de tiempo de aproximadamente 5 horas después de la inyección del opioide, recuperándose los niveles normales al cabo de 24 horas. En las otras especies estudiadas por estos autores (perro y conejo) también observaron descensos en el contenido de noradrenalina en cerebro pero solo después de la administración de mayores dosis de morfina que las administradas a las ratas (200 mg/kg en el perro y 300 mg/kg en el conejo) que producían convulsiones e incluso la muerte en algunos de estos animales.

Fennesy y Lee (1972) han observado en el ratón que el contenido de noradrenalina en cerebro disminuye por la administración de dosis moderadas (2 a 20 mg/kg) pero no altas (superiores a 20 mg/kg) o bajas (inferiores a 2 mg/kg)

de morfina; sin embargo, el efecto sobre los niveles de dopamina es diferente, de forma que dosis altas inducen un aumento, mientras que dosis moderadas producen un descenso significativo en los niveles de esta bioamina en cerebro. Estos mismos autores (Fennesy y Lee, 1972) han observado que en el ratón el tiempo para obtener un máximo efecto de la morfina sobre el contenido de noradrenalina en cerebro es considerablemente inferior (30 minutos post-inyección) al descrito por diversos autores para otras especies animales y anteriormente comentados.

En nuestro estudio, sólo después de dosis agudas de morfina relativamente altas (50 mg/kg) observamos descensos significativos en los niveles tanto de dopamina como de noradrenalina en cerebro cuando las ratas son sacrificadas tres horas después de la administración del opioide. Estos resultados, al igual que los obtenidos en los animales sacrificados una hora después de la inyección de diferentes dosis de morfina en que solo se producen ligeros descensos en los niveles de noradrenalina con las dosis de 30 y 100 mg/kg pero en ningún caso en los niveles de dopamina, coinciden con los observados por otros autores (Maynert y Klingman, 1962; Gunne, 1963) y son indicativos de que en la rata son necesarias dosis altas del

opioide y un periodo de tiempo de unas horas posteriormente a la administración aguda del mismo para poder evaluar descensos en los niveles de catecolaminas en cerebro. No obstante debe tenerse en cuenta que los niveles de catecolaminas en cerebro son el resultado de los procesos de síntesis, catabolismo y recaptación de las mismas y por ello, más recientemente y con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos por los cuales la morfina modifica el metabolismo de las bioaminas del cerebro, así como la posible interrelación de los mismos con los cambios en la actividad y en el comportamiento que acompañan a la administración del fármaco, se vienen utilizando diversos modelos experimentales que faciliten la investigación de los mecanismos neuroquímicos de acción de la morfina.

Fundamentalmente los modelos que se han venido utilizando en estos estudios, algunos de los cuales sirven para determinar la velocidad de "turnover" de las catecolaminas en un tejido dado, entendiéndose por tal, la velocidad a que una sustancia se renueva en un determinado compartimiento o "pool" metabólico (cantidad por unidad de tiempo) han consistido en:

- Determinación de los niveles de precursores y catabolitos de catecolaminas.- Según algunos autores (Shiomi y Takagi, 1974) la determinación de los niveles de éstos puede

reflejar la actividad metabólica más claramente que incluso la concentración de las propias bioaminas.

- Incorporación de aminas o precursores de las mismas marcados isotópicamente.- La amina o su precursor isotópicamente marcado son rápidamente captados por neuronas adrenérgicas, incorporándose al "pool" metabólico correspondiente, siendo la velocidad de desaparición de catecolaminas marcadas indicativa de la actividad metabólica (velocidad de "turnover") (Udenfriend y Zaltzman-Nirenberg, 1963; Mountanari y col., 1963; Brodie y col., 1966).

- Inhibición síntesis.- Este procedimiento frecuentemente utilizado en los últimos años, sobre todo para la determinación de la velocidad de "turnover" de las catecolaminas en cerebro, se basa en que la concentración de estas desciende de manera exponencial después del bloqueo de la síntesis por inhibidores específicos; la velocidad de "turnover" de las catecolaminas puede ser hallada a partir de la constante de depleción obtenida de la declinación semilogarítmica de los niveles de las aminas (Brodie y col., 1966; Neff y Costa, 1966).

- Inhibición del catabolismo.- También la inhibición de algunos de los sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de las catecolaminas puede ser un buen

instrumento para estudiar la actividad metabólica de las mismas bajo diferentes condiciones experimentales (Spector y col., 1958; Crout y col., 1961).

Fukui y Takagi (1972) observaron que en ratones a los que se administra una dosis analgésica de morfina (10 mg/kg) no solo se produce un descenso en la concentración de noradrenalina y dopamina en cerebro (Takagi y Nakama, 1966) sino que estos descensos van acompañados de un aumento en los niveles de ácido 3,4-dihidroxifenilacético y de ácido homovanílico, principales metabolitos de la dopamina, sugiriendo que la administración aguda de la droga debería inducir un aumento en la biosíntesis de la dopamina, razón por la cual los niveles de dichos metabolitos se encontrarían aumentados. Sin embargo, en base a los resultados de estos autores no pueden ser excluidos otros posibles mecanismos de acción de la morfina, como serían que el opioide afectase los mecanismos de recaptación de la dopamina en las vesículas de almacenamiento, aumentando de esta forma los niveles de amina libre para su degradación metabólica.

En el año 1972, Smith y col., reportaron para el ratón aumentos en la incorporación en cerebro de ^{14}C -tiro-sina a ^{14}C -dopamina y ^{14}C -noradrenalina después de la administración de una dosis de morfina a animales no tole-

rantes a la droga, concluyendo estos autores que por tan to el opioide induciría un aumento en la biosíntesis de ambas catecolaminas; sin embargo debe tenerse en cuenta que la dosis de morfina utilizada por ellos para obtener los máximos de incorporación de ^{14}C -tirosina a ^{14}C -catecolaminas es de 100 mg/kg, dosis considerada muy alta para el ratón y que Fennessy y Lee (1972), estudiando la actividad motora de esta especie animal después de la ad ministración aguda de la droga, observaron que aumentaba en tres veces a la observada en los animales control, así como los niveles de noradrenalina y especialmente de dopamina en el cerebro total de los animales.

En base a estudios histoquímicos y bioquímicos (Spector y col., 1965; Anden y col., 1966; Corrodi y Hansson, 1966) en los que se ha demostrado la gran efectividad del compuesto α -metil-p-tirosina para inhibir la biosíntesis de las catecolaminas a nivel del enzima tirosina-hidroxilasa por competición con el sustrato, la tirosina, el metil ester de este compuesto, denominado H 44/68, se ha ve nido utilizando para evaluar la velocidad de síntesis o de "turnover" de las catecolaminas, así como el efecto que una reducción drástica en los niveles de estas bioaminas podría tener bajo diferentes condiciones experimentales.

Anden y col. (1966) observaron que transcurridas cuatro horas después de la administración de H 44/68 en una dosis de 500 mg/kg, la intensidad de fluorescencia en las terminaciones nerviosas dopaminérgicas y noradrenérgicas y por tanto el contenido de ambas bioaminas, comienza a disminuir, aunque muy levemente y solo en algunas zonas discretas del cerebro; pero a partir de las doce horas la reducción es muy notable en todas las áreas estudiadas tendiendo a recuperarse el contenido normal de bioaminas después de veinticuatro horas de inyectado el compuesto.

Nosotros hemos utilizado el H 44/68 en nuestro trabajo fundamentalmente con tres objetivos, si bien todos ellos íntimamente relacionados. En primer lugar considera moa la necesidad de evaluar, bajo nuestras condiciones ex perimentales, cual era la velocidad de "turnover" de la dopamina y noradrenalina en cerebro de animales intactos; en segundo lugar, estudiar como la administración aguda y crónica de morfina podía modificar el "turnover" de las catecolaminas y en tercer lugar, cómo la inhibición de la biosíntesis de catecolaminas por el H 44/68 podría influir sobre la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en animales intactos y tratados aguda o crónicamente con mor fina.

La dosis utilizada de 250 mg/kg de H 44/68, comproba

mos era efectiva para producir una reducción en los niveles endógenos de dopamina y noradrenalina en cerebro ya a las cuatro horas de administrado el compuesto y a las diez y seis horas los niveles obtenidos de dichas aminas representan entre el 10 y el 15% de los cuantificados en los animales intactos.

Brodie y col., (1966) administrando α -metil-p-tirosina determinaron en la rata la velocidad de "turnover" de dopamina y noradrenalina en cerebro y de noradrenalina en corazón y compararon este último resultado con el que encontraron utilizando técnicas isotópicas, comprobando que por ambos procedimientos se obtenían resultados similares, por lo que confirmaron la validez del método de la inhibición de la síntesis de catecolaminas para estimar la velocidad de "turnover" o utilización de las mismas.

En nuestro estudio hemos hallado por este método un valor de k (constante de declinación de los niveles de catecolaminas) para la dopamina igual a $0,19 \text{ hr}^{-1}$, y para la noradrenalina igual a $0,12 \text{ hr}^{-1}$, resultados que son similares a los observados por otros autores (Brodie y col., 1966; Sugrue, 1974). La vida media ($T_{\frac{1}{2}}$) que hemos obtenido a partir de las correspondientes rectas de regresión en el caso de noradrenalina ($T_{\frac{1}{2}} = 5,9$ horas) es se-

mejante a la hallada por Neff y Costa (1966), mientras que la vida media de la dopamina ($T_{\frac{1}{2}} = 3,7$ horas) es algo superior al valor obtenido por estos autores, tal vez debido a diferencias en la cepa de rata utilizada, como ya se ha observado en algunos estudios (Brodie y col., 1966).

Una vez conocido cual era el efecto que bajo nuestras condiciones experimentales causaba la administración de H 44/68 a las ratas intactas, continuamos el estudio planteado por medio de la utilización de este inhibidor de la biosíntesis de catecolaminas con el fin de determinar si las variaciones observadas en los niveles de noradrenalina y dopamina en cerebro en las ratas inyectadas con una sola dosis de morfina podían estar relacionadas con variaciones en el "turnover" de estas bioaminas. Para ello, a animales inyectados con H 44/68 les fue administrada una dosis de morfina a un intervalo de tiempo (16 horas) en que como anteriormente hemos indicado, los niveles de dopamina y noradrenalina se encontraban muy claramente disminuidos, por inhibición de su síntesis.

En el periodo de tiempo en que se estaba realizando esta tesis doctoral, fueron varios los trabajos publicados por diversos autores en los que se ha prestado una

especial atención a los mecanismos neuroquímicos de acción de la morfina; así, Sugrue (1974) indicaba que la administración de una sola dosis de morfina no modificaba la velocidad de síntesis de la noradrenalina en el cerebro total de la rata, mientras que inducía un aumento en el "turnover" de la dopamina siendo ambas evaluaciones realizadas en ratas previamente sometidas a la administración de α -metil-p-tirosina. Papeschi y col. (1975), investigando este problema también en ratas, observan así mismo aumentos en la velocidad de depleción de la dopamina en el cerebro total cuando se administra el ester metílico de la α -metil-p-tirosina (H 44/68) a ratas previamente tratadas con una sola dosis de morfina. Estos últimos autores postulan que el lugar de acción de la morfina debería ser el citoplasma neuronal y no las vesículas sinápticas, indicando que la morfina aumenta la síntesis y catabolismo de la dopamina nuevamente sintetizada antes de que llegue a las vesículas sinápticas y por tanto, si es verdad que solo las aminos contenidas en las vesículas están relacionadas con la actividad nerviosa (Anden y col., 1969; Almgren y Lundborg, 1971), la morfina parece ser no alteraría la actividad funcional de las neuronas dopaminérgicas.

También recientemente Gomes y col. (1976) han observado, mediante la administración de α -metil-p-tirosina,

que en la rata intacta la morfina en dosis única aumenta el "turnover" de la dopamina y tiende a incrementar el de la noradrenalina aunque no significativamente y que la preadministración de naloxona bloquea estos efectos; estos mismos investigadores indican que en los animales anestesiados el opioide retarda la desaparición de la noradrenalina, después del bloqueo de la síntesis y que sin embargo no afecta el "turnover" de la dopamina.

Pero ya en trabajos anteriores (Smith y col., 1972) se había indicado que la morfina en administración aguda, además de causar una disminución en el contenido de dopamina y noradrenalina en el cerebro del ratón, aumentaba la incorporación de ^{14}C -tirosina a ^{14}C -dopamina y ^{14}C -noradrenalina, posiblemente debido a que la morfina libera catecolaminas de las neuronas adrenérgicas y aumenta la velocidad de "turnover" de las mismas.

Toda vez que en nuestro estudio los niveles tanto de noradrenalina como de dopamina en las ratas tratadas con H 44/68 más morfina son inferiores a los observados en las ratas tratadas solo con el inhibidor de la biosíntesis de las catecolaminas, los resultados obtenidos son indicativos de que los descensos en los niveles de noradrenalina y dopamina observados por la administración aguda del opioide pudieran ser debidos a aumentos en el "turnover" de ambas bioaminas.

Son varios los autores que recientemente, estudiando el mecanismo de acción analgésico de la morfina han sugerido que posiblemente sea a través de una acción sobre los sistemas dopaminérgicos del sistema nervioso central, como el opioide ejercería dicha acción; de hecho, los experimentos de Hornykiewicz (1966) son indicativos de que la vía dopaminérgica de la sustancia negra-cuerpo estriado, está implicada en el control del sistema motor extrapiramidal y dados los síntomas de catalepsia y rigidez muscular que observamos en las ratas tras la inyección aguda de morfina, la reducción en la concentración de dopamina podría interpretarse también como una acción de la morfina en el sistema extrapiramidal.

Fukui y Takagi (1972) sugieren que dada la existencia de mecanismos inhibitorios descendentes de centros superiores que actúan en la transmisión espino-sensorial (Hagbarth y Kerr, 1954) la dopamina podría estimular estos sistemas inhibidores directamente o bien podría tener una acción inhibidora en la neuronas inhibente, causando así su acción analgésica; sin embargo, no puede ser descartada la posibilidad de que otras monoaminas incluyendo la noradrenalina, pueden también participar en los mecanismos de acción de la morfina.

Así mismo diversos autores (Kuschinsky, 1973; Lal, 1975) han sugerido que el aumento en el "turnover" de dopamina inducido por la administración aguda de morfina podría ser el resultado del bloqueo por el opioide de receptores dopaminérgicos del sistema nervioso central toda vez que drogas que bloquean dichos receptores inducen un efecto similar en el "turnover" de dicha bioamina.

Recientemente Furukuwa y col. (1976) estudiando el efecto de modificadores selectivos de los niveles de catecolaminas en el cerebro, en relación al efecto analgésico de la morfina en la rata, han observado que la analgesia inducida por el opioide es antagonizada por la preadministración de reserpina y tetrabezina, pero no por el pretratamiento con siringopina que no afecta al contenido de dopamina y sí disminuye los niveles de noradrenalina y serotonina, por lo que los anteriores autores sugiereren que el incremento en el "turnover" de dopamina, observado por diversos investigadores (Gunne y col., 1969; Smith y col., 1972; Sugrue, 1974), podría estar directamente relacionado con la acción analgésica de la droga.

Los resultados obtenidos por nosotros acerca de la acción de la morfina cuando se administra en una sola dosis sobre los niveles de dopamina en el cerebro, corrobo-

ran los anteriormente comentados en los que se ha observado un aumento en el "turnover" de la dopamina bajo diferentes condiciones experimentales y los trabajos ya citados en los que se indica la probable implicación de esta bioamina en los efectos farmacológicos del opioide, si bien en dichos estudios no se descarta la posible participación de la noradrenalina en el mecanismo de acción de la droga. La razón por la cual en nuestro trabajo observamos aumentos en el "turnover" de la noradrenalina pudiera ser debido a diferencias en el modelo seguido por los autores anteriormente comentados que administran el inhibidor del enzima tirosina-hidroxilasa posteriormente a la inyección de morfina, sacrificando los animales en las primeras horas que siguen a la administración de los compuestos y por consiguiente cuando los niveles endógenos de esta bioamina no han alcanzado el mínimo valor post-inhibición.

Pero la morfina no solo afecta las catecolaminas del cerebro, sino también las periféricas, por tanto consideramos de interés el estudio simultáneo de la acción del opioide sobre las catecolaminas de la glándula adrenal.

Elliott (1912) observó que el descenso en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal de gatos sometidos

dos a la administración aguda de morfina era debido a la estimulación por la droga del sistema nervioso simpático, toda vez que el seccionamiento del nervio esplácnico prevenía este efecto del opioide. Maynert y Levi (1964) en gatos de cría y Borrell y col. (1974) en gatos adultos demostraron que la previa administración de anestésicos del tipo fenobarbital o pentobarbital inhibía el aumento en los niveles de glucosa en sangre y los descensos en los niveles de catecolaminas en la glándula adrenal que se producen por la sola administración de morfina.

Sin embargo, no bajo todas las condiciones experimentales estudiadas se han obtenido descensos en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal. Maynert y Klingman (1962), observaron en perros, ratas y conejos descensos en los niveles de adrenalina en la glándula adrenal, solo después de la administración de dosis de morfina consideradas como altas (60-200 mg/kg). Gunne (1963) también observó que la administración de dosis del orden de 30 mg/kg causaba descensos en el contenido de catecolaminas en la glándula adrenal de la rata pasado un lapso de tiempo de 4 horas después de la inyección aguda de morfina.

En nuestras experiencias, aún cuando la concentración de catecolaminas en la glándula adrenal no varía con ningun

na de las dosis de morfina empleadas, no podemos decir por ello que la droga no produzca liberación de las mismas, ya que pensamos pudiera tener lugar un efecto compensatorio en la resíntesis; hay que tener en cuenta que los niveles que medimos representan el efecto neto en un período de tiempo de las velocidades de síntesis, liberación y recaptación y no debemos olvidar que la morfina bien pudiera afectar el "turnover" de las catecolaminas, sin modificar los niveles de las mismas. Por ello y al igual que en el estudio del efecto de la administración aguda de la droga sobre las catecolaminas en cerebro, también estudiamos el "turnover" de las catecolaminas en la glándula adrenal.

En primer lugar debemos indicar que la sola inyección de α -metil-p-tirosina, el inhibidor del enzima tirosina hidroxilasa induce descensos en los niveles de catecolaminas en la glándula adrenal solo en las ratas sacrificadas a las diez y nueve horas de la inyección. Esta falta de correlación en la magnitud y en la velocidad de cambio de la respuesta a la administración de H 44/68 entre las catecolaminas de la glándula adrenal y del cerebro, aún cuando pudiera ser interpretada como una evidencia en contra de la hipótesis mantenida por algunos autores (Vogt, 1954; Maynert y Klingman, 1962) de la existencia de una clara conexión funcional entre el sistema adrenérgico cerebral y la médula

adrenal, pensamos sea debida a diferencias en la vida media de las catecolaminas en el cerebro y en la médula adrenal, como ya ha sido indicado por otros autores (Udenfriend y col., 1953; Gordon, 1968).

Sin embargo, cuando utilizando H 44/68 hemos determinado la variación en el "turnover" de las catecolaminas inducida por la administración aguda de morfina hemos observado que al igual que para la dopamina y noradrenalina en cerebro, la morfina induce también un aumento en el "turnover" de las catecolaminas en la glándula adrenal; por tanto, pensamos que la razón de la diferencia en las respuestas a la morfina del sistema adrenérgico cerebral y de la glándula adrenal podría ser atribuida a que la respuesta de catecolaminas en cerebro parece ser más intensa que en la médula adrenal, al igual que ocurre con la sola administración de H 44/68. Lo que sí parece deducirse de nuestros resultados es que paralelamente a la liberación de catecolaminas de la glándula adrenal, hay un aumento en la síntesis de las mismas, ya que solo en condiciones de inhibición de síntesis es patente una depleción de aminas en la glándula, lo que sugiere que la síntesis de catecolaminas es realmente incrementada en respuesta a la estimulación simpática por la morfina.

Muchos de los trabajos en los que se investiga la

acción de la morfina sobre la función corticoadrenal, se han realizado determinando solo los niveles de ácido ascórbico en glándula adrenal, puesto que se ha considerado que la reducción en el contenido adrenal de este ácido reflejaba un aumento en la secreción de hormona adrenocorticotropa; sin embargo en algunos estudios se ha observado que un aumento en los niveles de corticosteroides en glándula adrenal y plasma, no siempre se corresponde con un descenso en el contenido adrenal de ácido ascórbico (Mountanari y Stockham, 1962; Borrell y col., 1975), por lo que actualmente se considera necesaria la determinación de los niveles de hormonas corticoadrenales en glándula y/o plasma como indicadores de la actividad del eje hipófisis-adrenal.

Diversos trabajos indican que la administración aguda de morfina tiene un efecto estimulante sobre la secreción de ACTH; este efecto es medido en unos casos únicamente por la depleción de ácido ascórbico en glándula adrenal (Nasmyth, 1954; Briggs y Munson, 1955; George y Way, 1955) mientras que en otros se determinan niveles de corticosteroides en glándula y /o plasma (Nakao y col., 1966; Nikodijevic y Maickel, 1967; Kokka y col., 1973; Borrell y col., 1974).

Briggs y Munson (1955) encontraron que en la rata la

anestesia con pentobarbital previamente a la inyección aguda de morfina, inhibe la depleción de ácido ascórbico adrenal observada después de la administración del opioide; además la administración conjunta de pentobarbital y morfina es capaz de bloquear la liberación de ACTH en respuesta a diversos estímulos (Briggs y Munson, 1955; Ohler y Sevy, 1956), si bien no parece ser altere la respuesta de la glándula adrenal al ACTH exógeno (Borrell y col., 1974).

Los resultados de nuestro estudio indican que la administración aguda de morfina causa una elevación en los niveles de corticosterona en glándula adrenal y que este efecto es máximo una hora después de la inyección, puesto que a las tres horas aunque los niveles continúan altos, la diferencia de la significancia de los promedios con los niveles de corticosterona de los correspondientes animales control es de un nivel inferior; Nakao y col., (1966) también encuentran que en la rata el mayor efecto de la droga sobre la producción y liberación de corticosteroides se refleja una hora después de la inyección, observando estos autores que a las tres horas de la inyección los niveles de corticosterona se encuentran dentro de los límites hallados para los animales normales.

Al estudiar el efecto de diferentes dosis de morfina sobre la secreción de ACTH, hemos encontrado que la menor dosis utilizada (10 mg/kg) no aumenta significativamente el nivel de corticosterona adrenal y que a partir de 30 mg/kg se observan aumentos en el contenido de esta hormona. Un efecto similar al observado por nosotros ha sido hallado por Kokka y col. (1973); estos autores determinan niveles de corticosterona en plasma después de la administración de diferentes dosis de morfina, indicando que se requieren dosis de al menos 20 mg/kg para producir una marcada estimulación en la liberación de ACTH.

Por trabajos realizados con animales hipofisectomizados (George y Way, 1959; Nakao y col., 1966), se piensa que la morfina no actúa directamente en la glándula adrenal sino a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Lotti y col. (1969) mediante la administración de microcantidades de morfina en diversas regiones del hipotálamo localizaron un área en la que la inyección de la droga producía un notable descenso en el contenido adrenal de ácido ascórbico y un aumento en los niveles de corticosterona en plasma; estos autores han señalado que este área, correspondiente al hipotálamo medio-ventral, podía ser el lugar de acción de la morfina y que posiblemente induciendo la secreción del factor de liberación de ACTH produzca

la estimulación observada en la actividad adrenocortical.

Aunque los mecanismos por los que los narcótico-analgésicos influyen en la actividad hipofisaria no han sido claramente definidos, pudiera ser que ciertos neurotransmisores del sistema nervioso central intervinieran en los mismos (George, 1971; Simon y col., 1975a,b).

En base a estudios realizados con compuestos que modifican el metabolismo de las catecolaminas, desde hace tiempo diversos investigadores (Van Loon y col., 1971a,b; Ganong, 1972; Scapagnini y col., 1970, 1975) vienen sosteniendo la hipótesis de la existencia de un sistema central adrenérgico que inhibe la secreción de ACTH; algunos de los trabajos que han contribuido a esta hipótesis se han realizado utilizando α -metil-p-tirosina para inhibir la síntesis de catecolaminas y en ellos se indica la existencia de una posible relación inversa entre el contenido de monoaminas en el hipotálamo y el de corticosteroides en plasma después de administrado el inhibidor. Así mismo Scapagnini y col. (1972) han indicado que podría ser la noradrenalina la bioamina implicada en el mantenimiento de un tono inhibidor sobre la secreción de ACTH, puesto que la administración de FLA 63, inhibidor del enzima dopamina- β -hidroxilasa, que por tanto causa una disminución en los niveles de noradrenalina sin alterar los de dopami-

na, produce una marcada activación corticoadrenal.

Toda vez que como vemos en nuestro estudio, la mor fina puede alterar los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de corticosterona en glándula adrenal, cabe preguntarse si estos dos hechos son independientes o si la respuesta adrenocortical a la administración del opioide está relacionada con las variaciones de estas bioaminas.

Los resultados obtenidos por nosotros no muestran la existencia de una clara correlación entre las variaciones en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y los de corticosterona en glándula adrenal por la administración aguda de morfina, puesto que una hora des pués de la inyección de la droga, cuando obtenemos el ma yor aumento en la concentración de corticosterona adrenal solo se observa un pequeño descenso en los niveles de noradrenalina, mientras que es a las tres horas de ad ministrado el opioide, cuando los niveles de ambas bioaminas han disminuído significativamente y los de corticosterona, aunque persisten elevados, están más próximos a los obtenidos en los animales control.

Simon y col. (1975a) estudiando en la rata el efecto de la morfina sobre los niveles de dopamina, noradrenali-

na y serotonina en diferentes regiones del cerebro, tampoco consideran posible relacionar cambios en los niveles de monoaminas en cerebro con la respuesta adrenocortical observada por la inyección aguda de la droga.

En nuestro estudio, después del tratamiento con H 44/68, unido a una reducción en el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro, observamos que el nivel de corticosterona en glándula adrenal está significativamente elevado, siendo este incremento aproximadamente del mismo orden a todos los tiempos de sacrificio de los animales estudiados. Este aumento en la concentración de corticosterona adrenal podría estar relacionado con la reducción en los niveles de catecolaminas en cerebro inducida por la inhibición de su biosíntesis, de acuerdo con la ya mencionada hipótesis de Ganong (1972).

Sin embargo otros investigadores (McKiney y col., 1971; Thornburg y Moore, 1971) después de la administración repetida de pequeñas dosis de α -metil-p- tirosina encuentran una reducción en el contenido de catecolaminas en cerebro pero no observan simultáneos aumentos en la secreción de ACTH, sugiriéndose por tanto que la elevación de corticosterona en plasma obtenida por otros autores podría ser el resultado de la respuesta a un "stress"

no específico y no consecuencia de la depleción de aminas en cerebro. En un trabajo reciente Borrell y Borrell (1977) encuentran que en el gato, aún cuando se produce una disminución en el contenido de noradrenalina en el diencéfalo y un aumento en los niveles de hidrocortisona en plasma dieciséis horas después de la inyección de H 44/68, a las tres horas de la administración del inhibidor los niveles de corticosteroides están elevados sin que la noradrenalina haya experimentado cambios e indican que la liberación de ACTH inducida por este fármaco pudiera ser independiente del bloqueo de la síntesis de catecolaminas.

Kaplanski y col. (1972) administraron a un grupo de ratas una dosis alta de H 44/68 (250 mg/kg); en este grupo de animales al igual que Scapagnini y col. (1972) observaron una fuerte reducción en la concentración de dopamina y noradrenalina en cerebro simultáneamente a un aumento de los niveles de corticosterona en plasma, si bien esta elevación no tenía lugar cuando se anestesiaba a las ratas con nembutal; otro grupo de animales que recibió pequeñas y repetidas dosis de H 44/68, aún cuando tenía reducidos los niveles de catecolaminas en cerebro no mostraba variaciones en los de corticosterona plasmática, concluyendo estos autores también que la liberación de ACTH inducida por la α -metil-p-tirosina podría ser debida a una acción es-

tresante y no a descensos en el contenido de catecolaminas en cerebro.

Estudiando el efecto de la administración crónica de morfina en perros, ratas y conejos, Maynert y Klingman (1962) encontraron en la rata, aumentos significativos en el contenido de noradrenalina en cerebro, mientras que en las otras dos especies estudiadas solo observaron ligeros aumentos en los niveles de dicha bioamina que no diferían significativamente de los hallados en los animales control; así mismo Gunne (1963) observó niveles supranormales de noradrenalina en el cerebro de ratas sometidas a la administración prolongada de morfina y sugirió que el aumento podría ser debido a un incremento en la síntesis de catecolaminas, toda vez que ratas morfinizadas y tratadas con un inhibidor del enzima monoaminoxidasa tenían los niveles de noradrenalina significativamente mas altos que los observados en las ratas control tratadas con el inhibidor.

Aún cuando Akera y Brody (1968) también hallaron aumentos en los niveles de noradrenalina en cerebro de ratas dependientes a la morfina, indicaron que este hecho no parecía relacionarse con el desarrollo de tolerancia al opioide, sino que podría ser una respuesta específica

de la morfina, puesto que el levorfanol y la metadona (drogas adictivas) no causan este efecto sobre el contenido de noradrenalina en cerebro.

Sin embargo, en otros trabajos (Simon y col., 1975b; Theiss y col., 1975) no se ha observado que la administración prolongada de morfina cause una elevación en los niveles de noradrenalina en cerebro. Simon y col., (1975b) al estudiar en la rata el efecto del tratamiento crónico de morfina sobre el contenido de monoaminas en diferentes regiones del cerebro, no hallaron aumentos en los niveles de noradrenalina en ninguna de las áreas estudiadas en animales sometidos a la administración del opioide durante diferentes periodos de tiempo; el contenido de dopamina no variaba después de una semana, aumentaba en los animales morfinizados durante dos semanas, excepto en la región de la corteza cerebral, y solo disminuía significativamente en la amígdala a las seis semanas de tratamiento; estos autores comprobaron que los cambios en el contenido de aminas encontrados en una región tienden a reflejarse en las otras regiones diferenciándose solo en el grado de variación, e indicaron que por tanto la morfina parecía poseer una escasa especificidad regional respecto a su acción sobre los niveles de bioaminas en cerebro. Theiss y col., (1975) también determinaron los niveles de dopamina y nora

drenalina en el cerebro total de ratas morfino-dependientes no observando diferencias con los hallados en los animales control.

Bajo nuestras condiciones experimentales, hemos observado que la administración de morfina durante seis y doce días consecutivos no altera la concentración de dopamina y noradrenalina en el cerebro de la rata; parece ser pues, que se desarrolla tolerancia al efecto depletivo que sobre el contenido de estas aminas en cerebro causa una única dosis del fármaco; el hecho de no encontrar los niveles modificados podría ser indicativo de que se ha restablecido el equilibrio entre la síntesis y la liberación de dichas catecolaminas.

En la última década se han publicado algunos trabajos en los que se investigaba el efecto del tratamiento crónico con morfina sobre el "turnover" de las catecolaminas en cerebro; los resultados de estos estudios son diversos; mientras que Clouet y Ratner (1970) encuentran un aumento en el "turnover" de dopamina y noradrenalina en el cerebro de ratas después de repetidas inyecciones de morfina, otros autores no hallan diferencias en el "turnover" de dopamina (Gunne y col., 1969; Theiss y col., 1975) ni de noradrenalina (Neal, 1968; Theiss y col., 1975)

entre las ratas crónicamente morfinizadas y las control; también Smith (1970, 1972) y Fukui y Takagi (1972) indicaron que en el ratón, con la administración prolongada del opioide se desarrolla tolerancia al incremento en el "turnover" de las catecolaminas en cerebro, que se observaba al inyectar morfina en dosis única.

Nuestros resultados obtenidos por la administración de α -metil-p-tirosina a ratas previamente morfinizadas durante doce días muestran que los niveles de dopamina y noradrenalina en el cerebro de estos animales están significativamente elevados respecto a los niveles observados en animales tratados solamente con el inhibidor; es decir, el grado de depleción de catecolaminas inducido por la inhibición de su síntesis es menor en animales tratados crónicamente con el opioide que en animales normales; este hecho parece indicar que por el tratamiento crónico con morfina el "turnover" de ambas bioaminas está disminuido; es interesante resaltar que dicho efecto es contrario al causado por la administración aguda del opioide, puesto que cuando administrábamos H 44/68 y morfina en dosis única hallábamos aumentos en el "turnover" de estas catecolaminas en cerebro.

En cuanto a la concentración de catecolaminas en glán

dula adrenal, tampoco encontramos variaciones después de inyectar morfina durante seis y doce días. Maynert y Klingman (1962) al encontrar los niveles elevados sugirieron que la estimulación del sistema nervioso simpático que se produce por una primera dosis de morfina continúa durante el ciclo de adición al narcótico y que el aumento en la concentración de catecolaminas podía ser un mecanismo de adaptación al mismo; hay que tener en cuenta que el modelo experimental de estos autores diffiere mucho del nuestro, ya que el período de tratamiento es más largo (200 días) y las dosis empleadas mucho mayores (200 mg/kg/día); sin embargo Gunne(1963) no detecta ningún cambio en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal a pesar de utilizar dosis de morfina que exceden a las de los anteriores autores.

En el tratamiento agudo encontrábamos que cuando se inhibía la síntesis de catecolaminas se producía una mayor reducción en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal de ratas a las que se había administrado el opioide, mientras que en el tratamiento crónico, no observamos diferencias, lo que indica que también se produce tolerancia a la liberación inicial de catecolaminas de la médula adrenal; estos resultados están de acuerdo con anteriores estudios del laboratorio (Borrell y Bonelli,

1975) realizados en gatos, en los que después de catorce días de inyectar diariamente morfina, el contenido de noradrenalina y adrenalina en glándula adrenal había retornado a niveles normales.

En el hombre la administración continuada de morfina induce una disminución en la eliminación diaria en orina de 17-cetosteroides y de 17-hidroxicorticosteroides, así como un descenso de corticosteroides en plasma (Eisenman y col., 1958, 1961). Paroli y Melchiorri (1961) observaron que en la rata la inyección repetida de la droga producía una reducción en la excreción urinaria de hidroxicorticosteroides y de 17-cetosteroides, sugiriendo que el tratamiento crónico con el opioide conduce a una reducción en la actividad adrenocortical. También Borrell y col. (1975) encontraron en el gato descensos en el contenido de corticosteroides en glándula suprarrenal después de dos semanas de administrar diariamente morfina.

Kokka y col. (1973) estudiando algunos aspectos de tolerancia endocrina en ratas tratadas crónicamente con morfina, encontraron que se desarrolla muy rápidamente tolerancia al efecto estimulante que una sola inyección del opioide produce sobre la secreción de ACTH, a pesar de que las ratas todavía presentan marcada catatonía y de

presión respiratoria; además al aumentar la duración del tratamiento los niveles de corticosterona en plasma son significativamente inferiores a los observados en los controles, lo que les induce a pensar en una reducción de la secreción de ACTH producida por la administración crónica de la droga.

En nuestro estudio encontramos los niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma inferiores a los hallados en los animales control ya a los seis días de administrar diariamente morfina, observando un efecto semejante al prolongar el tratamiento hasta doce días; esta respuesta parece indicar que la inyección repetida de la droga reduce la función del eje hipófisis-adrenal. Toda vez que en nuestras experiencias la inyección repetida del opioide conduce a una disminución en la actividad cortico-adrenal que sin embargo no impide la respuesta adrenocortical de los animales morfino-dependientes a la administración de H 44/68, inhibidor de la síntesis de catecolaminas y a la inyección de nalorfina, antagonista de la morfina y puesto que según ciertos autores (McDonald y col., 1959; Nikodijevic y Maickel, 1967; Kokka y col., 1973) los animales morfinizados responden normalmente al tratamiento con ACTH exógeno, opinamos que la acción su-

presora de la morfina no debe tener lugar directamente sobre la corteza adrenal, inclinándonos a pensar en una disminución en el contenido y/o liberación de ACTH, inversamente a lo que ocurría con la administración aguda de morfina.

Por otro lado desde hace tiempo se ha descrito que en la rata el tratamiento crónico con morfina produce hipertrofia adrenal (Sung y col., 1953; Tanabe y Cafruny, 1958; Simon y col., 1975b); sin embargo Akera y Brody (1968) al no encontrar variación en el peso de las glándulas adrenales, consideraron que la hipertrofia no era causada por la morfina, sino por el fenómeno de abstinencia que podían presentar los animales cuando transcurrían más de ocho horas entre dos inyecciones consecutivas de la droga ya que los efectos de la misma duraban aproximadamente ese tiempo. En nuestras experiencias, el peso de las glándulas adrenales de animales tratados cronicamente con morfina, aunque presentan un cierto aumento, no difiere significativamente de los observados en los animales control, hecho que pensamos podría ser indicativo de que los animales no se encuentran en estado de abstinencia entre cada dos inyecciones de la droga.

En un trabajo reciente (Simon y col., 1975b) se ha

investigado en la rata el efecto de la administración crónica de morfina sobre la concentración de corticosterona en plasma y de aminos biógenas en diversas áreas del cerebro, comprobándose en el mismo la importancia de la duración del tratamiento, hora y día de sacrificio y tiempo transcurrido desde la última inyección de la droga, en los resultados obtenidos; en este mismo trabajo se indica la existencia de una correlación inversa entre los niveles de serotonina en cerebro y los de corticosterona en plasma, si bien y al igual que en nuestro estudio, Simon y col. no hallan una correlación entre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y los de corticosterona en glándula adrenal y plasma en los animales tratados crónicamente con morfina.

La administración de nalorfina, así como otros narcótico-antagonistas, a animales dependientes a la morfina, precipita en los mismos un síndrome semejante al de abstinencia, aunque los síntomas fisiológicos aparecen mucho más rápidamente. En nuestras experiencias, en los animales tratados con morfina durante seis días, la inyección de nalorfina produce marcados aumentos en los niveles de corticosterona en glándula adrenal y plasma; esta estimulación de la función adrenocortical se considera (Paroli y Melchiorri, 1961) se produce en respuesta al "stress" de abstinencia.

cia, inducido por la administración del antagonista del opioide y por tanto nuestros resultados son indicativos de que en los animales se ha desarrollado ya un cierto grado de dependencia a la morfina a pesar de la corta duración del tratamiento.

También Kokka y col. (1973) con un esquema de morfinización parecido al utilizado por nosotros, observaron que en la rata la administración de naloxona, otro antagonista de la morfina, provoca en los animales morfinizados signos típicos de abstinencia, como hipotermia, hiperactividad, etc. además de una notable activación del eje hipófisis-adrenal, evaluada por la elevación de los niveles de corticosterona en plasma. Anteriormente Paroli y Melchiorri (1961), habían encontrado que la excreción urinaria de corticosteroides en la rata está aumentada durante el síndrome de abstinencia a la morfina, bien sea éste inducido por la administración de nalorfina, bien por cesar de administrar el opioide. Así mismo Borrell y col. (1975) han indicado que en el gato, especie en que la morfina tiene acción excitante, la administración de nalorfina a animales tratados crónicamente con el opioide también produce un aumento en los niveles de corticosteroides en glándula suprarrenal y plasma.

En nuestras experiencias los animales tratados con nalorfina mostraron una marcada irritabilidad e incluso comportamiento agresivo cuando fueron sacados de la jau la para el sacrificio; observamos además posturas estereotipadas así como una gran actividad roedora y motriz, síntomas descritos para la rata como signos del síndrome de abstinencia (Kaymackcalan y Woods, 1956; Buckett, 1964; Bläsig y col., 1973). Si consideramos este fenómeno como un "stress" y puesto que estos animales presentan unos niveles de corticosterona en glándula y plasma notablemente elevados, podemos pensar que el tratamiento crónico con morfina, no impide la respuesta de la rata al "stress" a pesar de la disminución en la actividad adrenocortical observada en los animales morfinizados.

Maynert y Klingman (1962) encontraron que después de provocar el síndrome de abstinencia con nalorfina, el contenido de catecolaminas en glándula adrenal está disminuido en el perro y en el conejo, pero no es modificado en la rata, resultados que respecto a la rata coinciden con los de Gunne (1963); nosotros no observamos variaciones en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal, ni tampoco en el contenido de noradrenalina en cerebro, observando sin embargo que los niveles de dopamina son significativamente superiores tras la administración de nalorfina. Iwamoto y col. (1973) también

encuentran un aumento en los niveles de dopamina del cerebro, asociado con el síndrome de abstinencia inducido por la naloxona, en ratones y ratas dependientes a la morfina.

Toda vez que algunos investigadores (Schwartz y Eidelberg, 1970; Maruyama y Takemori, 1973; Herz y col., 1974) han observado que el tratamiento con drogas que afectan el contenido de catecolaminas en el cerebro, modifica algunos signos típicos del síndrome de abstinencia, pensamos que el aumento en el contenido de dopamina podría estar relacionado con la manifestación de estos síntomas. Recientemente se ha sugerido (Puri y Lal, 1973; Cox y col. 1975) que la dopamina en cerebro tiene un importante papel en la hipotermia y comportamiento agresivo que muestran las ratas durante el síndrome de abstinencia a la morfina.

Kumar y col. (1971) han indicado que en los roedores los efectos catalépticos y el comportamiento estereotipado parecen estar inversamente relacionados durante el desarrollo de la tolerancia a la morfina. En nuestras experiencias, hemos podido comprobar que con la administración crónica de morfina, los síntomas catalépticos disminuyen en duración e intensidad a medida que avanzamos en

el tratamiento y los animales muestran mayor actividad, aumentando sobre todo la actividad roedora, lo que parece indicar, de acuerdo con los criterios normalmente establecidos para la rata (Bläsig y col., 1973), que se van haciendo tolerantes/dependientes a la morfina.

Sin embargo se han descrito diferencias entre las distintas especies animales en relación al desarrollo de la tolerancia y dependencia física a la morfina. Generalmente en aquellas especies en las que el opioide tiene una acción analgésico-sedante se desarrolla rápidamente tolerancia a este efecto, mientras que en las que tiene un efecto excitante, como por ejemplo el gato, se ha observado (Borrell, 1973) que se adquiere cierta tolerancia al efecto excitante de la inyección inicial de la droga pero en mucho menor grado.

Hemos comprobado que en la rata, bajo nuestras condiciones experimentales, no solo se desarrolla rápidamente tolerancia a los efectos de la administración aguda de morfina, sino que también igualmente se adquiere dependencia física, como lo indica el hecho de que después de inyectar morfina durante seis días consecutivos, la administración de un antagonista del opioide, la nalorfina, provoque aumentos en los niveles de corticosterona en glándu

la adrenal y plasma, junto con la aparición de diversos síntomas de abstinencia. Estas observaciones parecen es tar de acuerdo con la teoría de Way y col. (1969) quienes indican que el desarrollo de la tolerancia va acompañado por el desarrollo de la dependencia física a la morfina y que parece ser un proceso común subordinado el uno al otro.

C O N C L U S I O N E S

Hemos estudiado el efecto que el tratamiento agudo de distintas dosis de morfina ejerce simultaneamente sobre la concentración de dopamina y noradrenalina en cerebro, sobre los niveles de corticosterona y sobre el contenido de catecolaminas en glándula adrenal de ratas hembra adultas.

También han sido determinadas las variaciones de los parámetros mencionados en animales sometidos a la administración continuada de morfina durante seis y doce días, así como la respuesta a la nalorfina de los animales crónicamente morfinizados.

La respuesta a la administración aguda y crónica del opioide ha sido estudiada además en animales con una síntesis deficiente de catecolaminas provocada mediante la administración del metil éster de la α -metil-p-tirosina (H 44/68), inhibidor de la biosíntesis de estos neurotransmisores a nivel del enzima tirosina hidroxilasa.

Por los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir:

- 1.- La administración aguda de morfina induce aumentos en la secreción de ACTH, evaluado por los niveles de corticosterona en glándula adrenal o plasma, mientras que la administración continuada del opioide produce descensos en la misma; por tanto se desarrolla tolerancia al efecto estimulante que sobre la secreción de ACTH tiene una única dosis de la droga; sin embargo no parece ser que el tratamiento crónico inhiba la respuesta de los animales al "stress".
- 2.- La administración de morfina en dosis única causa descensos en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y aumentos en el "turnover" de ambas bioaminas, determinado por medio de la inhibición de la síntesis de catecolaminas con H 44/68. La administración crónica, aun cuando no modifica los niveles de estas dos aminas en el cerebro, disminuye el "turnover" de las mismas, lo que indica que se desarrolla tolerancia al efecto que sobre las catecolaminas en cerebro produce la inyección inicial del opioide.
- 3.- Por el tratamiento agudo con morfina, aunque no se modifican los niveles de catecolaminas en glándula

adrenal, se observan aumentos en el "turnover" de las mismas mientras que no se producen variaciones con el tratamiento prolongado de la droga; es decir, también se produce tolerancia a la acción de la morfina en dosis única sobre las catecolaminas de la glándula adrenal.

- 4.- La inhibición de la síntesis de catecolaminas por el H 44/68 refleja una respuesta distinta en glándula adrenal que en cerebro, siendo más intensa en cerebro al igual que cuando inyectábamos morfina; este hecho creemos que es debido a diferencias en la vida media de las catecolaminas en glándula adrenal y cerebro y no a una falta de conexión funcional entre estos dos sistemas adrenérgicos.
- 5.- Aún cuando en animales sometidos a la administración del inhibidor de la síntesis de catecolaminas, H 44/68, se observa simultáneamente a los descensos en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro aumentos en el contenido adrenal de corticosterona, por el conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis con las diferentes pruebas experimentales no se puede deducir la existencia de una relación inversa entre el contenido de noradrenalina y/o dopamina en cerebro y la actividad del eje hipotá-

mo-hipófisis-adrenal.

- 6.- La rata desarrolla rápidamente dependencia a la morfina como lo indica la elevación en la actividad del eje hipófisis-adrenal causada por la administración de nalorfina a animales tratados crónicamente con el opioide durante seis días.
- 7.- El aumento en el contenido de dopamina en cerebro encontrado en animales morfinizados durante seis días y tratados con nalorfina, creemos pudiera estar relacionado con el aumento en la actividad locomotora observada en estos animales y posiblemente atribuible al síndrome de abstinencia inducido por la administración de nalorfina.
- 8.- La inyección inicial de morfina provoca en la rata sin tomas de sedación, rigidez muscular y catalepsia que van desapareciendo por la administración repetida de la droga, observándose signos de excitación y aumento de la actividad roedora, lo que indica que se desarrolla tolerancia a los efectos farmacológicos que produce la administración aguda del opioide.
- 9.- En la rata por la administración continuada de morfina se desarrolla tolerancia no solo a los efectos que sobre el comportamiento induce la droga en dosis única

sino también a los efectos de la misma sobre la función del eje hipófisis-adrenal, sobre el metabolismo de la dopamina y noradrenalina en cerebro y sobre las catecolaminas en glándula adrenal. Si todas estas acciones de la morfina son interdependientes o no, requiere posteriores investigaciones.

B I B L I O G R A F I A

- Akera, T. y Brody, T. M.; *Biochem. Pharmacol.*, 17, 657, 1968.
- Almgren, D. y Lundborg, P.; *J. Pharm. Pharmacol.*, 23, 671, 1971.
- Anden, N. E., Corrodi, H., Dahlström, A., Fuxe, K. y Hökfelt, T.; *Life Sci.*, 5, 561, 1966.
- Anden, N. E., Corrodi, H. y Fuxe, K.; *En Metabolism of Amines in the Brain*. Hooper, G. (Ed.). MacMillan, London, (1969), pg. 38.
- Ayhan, I. H. y Randrup, A.; *Psychopharmacologia*, 27, 203, 1972.
- Ayhan, I. H. y Randrup, A.; *Psychopharmacologia*, 29, 317, 1973.
- Bhattacharya, A. N. y Marks, B. H.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 165, 108, 1969a.
- Bhattacharya, A. N. y Marks, B. H.; *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 130, 1194, 1969b.
- Blaschko, H.; *J. Physiol.*, 96, 50P, 1939.
- Bläsigg, J., Herz, A. y Gramsch, C.; *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, 286, 325, 1975.

- Bläsig, J., Herz, A., Reinhold, K. y Zieglgänsberger, S.; *Psychopharmacologia*, 33, 19, 1973.
- Borrell, J.; Tesis Doctoral, 1973.
- Borrell, J. y Borrell, S.; *Eur. J. Pharmacol.*, 32, 337, 1975.
- Borrell, J. y Borrell, S.; *Neuroscience Letters*, 4, 191, 1977.
- Borrell, J., Llorens, I. y Borrell, S.; *Hormone Res.*, 5, 351, 1974.
- Borrell, J., Llorens, I. y Borrell, S.; *Eur. J. Pharmacol.*, 31, 237, 1975.
- Briggs, F. N. y Munson, P. L.; *Endocrinology*, 57, 205, 1955.
- Brodie, B. B., Costa, E., Dlabac, A., Neef, N. H. y Smookler, H. H.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154, 493, 1966.
- Buckett, W. R.; *Psychopharmacologia*, 6, 410, 1964.
- Callingham, B. A. y Cass, R.; *En Clinical Chemistry of Monoamines*. Varley, H. y Gowenlock, A. H. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, (1963), pg. 19.
- Cannon, W. B.; *Am. J. Physiol.*, 33, 356, 1914.

- Carlsson, A., Falck, B. y Hillarp, N. A.; Acta Physiol. Scand., 56, supl., 196, 1962.
- Ciaranello, R. D. y Black, I. B.; Biochem. Pharmacol., 20, 3259, 1971.
- Clouet, D. H. y Ratner, M.; Science, 168, 854, 1970.
- Corbin, A., Mangili, G., Motta, M. y Martini, L.; Endocrinology, 76, 811, 1965.
- Corrodi, H. y Hansson, L. C.; Psychopharmacologia, 10, 116, 1966.
- Corrodi, H., Fuxe, K. y Hökfelt, I.; Life Sci., 7, 107, 1968.
- Costa, E. y Neff, N. E.; En Biochem Pharmacology of Basal Ganglia. Proceedings of the Second Symposium of Parkinson's Disease. Costa, E., Cote, L. y Yahr, M. D. (Eds.). Raven Press, New York, (1966), pg. 141.
- Cox, B., Ary, M. y Lomax, P.; Life Sci., 17, 41, 1975.
- Crout, J. R., Creveling, C. R. y Udenfriend, S.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 132, 269, 1961.
- Dahlström, B. y Fuxe, K.; Acta Endocrinol., 51, 301, 1966.
- Dahlström, B., Paalzow, G. y Paalzow, L.; Life Sci., 17, 11, 1975.

- Fuxe, K.; Acta Physiol. Scand., 64, Supl., 247, 1965.
- Fuxe, K. y Hökfelt, T.; En Frontiers in Neuroendocrinology. Ganong, W. F. y Martini, L. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, (1969), pg. 61.
- Fuxe, K., Corrodi, H. y Hökfelt, T. y Jonsson, G.; Progr. Brain Res., 32, 42, 1970.
- Fuxe, K., Hökfelt, T. y Nilsson, O.; Life Sci., 6, 2057, 1967.
- Ganong, W. F.; En The Hypothalamus. Martini, L., Motta, M. y Fraschini, F. (Eds.), Academic Press, New York, (1970), pg. 313.
- Ganong, W. F.; En Brain-Endocrine Interaction. Median Eminence: Structure and Function. Int. Symp. Munich, Karger, Basel, (1972), pg. 254.
- Gebhart, G. F. y Mitchell, C. L.; Eur. J. Pharmacol., 18, 37, 1972.
- George, R.; En Narcotic Drugs. Clouet, D. H. (Ed.), Plenum Press, New York, (1971), pg. 283.
- George, R. y Way, E. L.; Br. J. Pharmacol., 10, 260, 1955.
- George, R. y Way, E. L.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 125, 111, 1959.

- Gomes, C., Svensson, T. H. y Trolin, G.; Arch. Pharmacol., 294, 141, 1976.
- Gordon, R.; En Studies on the regulation of Catecholamines Biosynthesis. Tesis Doctoral, 1968.
- Gunne, L. M.; Acta Physiol. Scand., 58, Supl., 204, 1963.
- Gunne, L. M., Jonsson, J. y Fuxe, K.; Eur. J. Pharmacol., 5, 338, 1969.
- Gurin, S. y Delluva, A. M.; J. Biol. Chem., 170, 545, 1947.
- Hargbarth, K. E. y Kerr, D. I. R.; J. Neurophysiol., 17, 295, 1954.
- Herz, A., Bläsigg, J. y Papeschi, R.; Psychopharmacologia, 39, 121, 1974.
- Hornykiewitcz, O.; Pharmac. Rev., 18, 925, 1966.
- Iwamoto, E. T., Ho, I. K. y Way, E. L.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 187, 558, 1973.
- Jonsson, G., Hamberger, B., Malmfors, T. y Sachs, C.; Eur. J. Pharmacol., 8, 58, 1969.
- Kaplanski, J., Dorts, J. W. y Smelik, P. L.; Eur. J. Pharmacol., 20, 238, 1972.
- Kaymakcalan, S. y Woods, L. A.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 117, 112, 1956.

- Kitabchi, A. E., Solomon, S. S. y Williams, R. H.;
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 296, 1968.
- Kokka, N., Garcia, J. F. y Elliott, H. W.; Progr.
Brain Res., 39, 347, 1973.
- Kokka, N., Garcia, J. F., George, R. y Elliott, H. W.,
Endocrinology, 90, 735, 1972.
- Kumar, R., Mitchell, E. y Stoterman, I. P.; Br. J.
Pharmacol., 42, 473, 1971.
- Kuschinsky, K.; Experientia, 29, 1365, 1973.
- Kuschinsky, K. y Hornykiewicz, O.; Eur. J. Pharmacol.,
19, 119, 1972.
- Lal, H.; Life Sci., 17, 483, 1975.
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. y Udenfriend, S.;
J. Pharmacol. Exp. Ther., 148, 1, 1965.
- Lewis, J. T.; Am. J. Physiol., 64, 506, 1923.
- Lotti, V. J., Kokka, N. y George, R.; Neuroendocrinolo-
gy, 4, 326, 1969.
- Marks, B. H., Hall, M. M. y Bhattacharya, A. N.; Progr.
Brain Res., 32, 58, 1970.
- Maruyama, Y. y Takemori, A. E.; J. Pharmacol. Exp. Ther.,
185, 602, 1973.

- Matsumura, M., Kurosawa, A. y Ogawa, Y.; Steroids, 2, 537, 1967.
- Maynert, E. W.; Fed. Proc., 26, 1111, 1967.
- Maynert, E. W. y Klingman, G. I.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 135, 285, 1962.
- Maynert, E. W. y Levi, R.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 143, 90, 1964.
- McDonald, R. X., Evans, F. T., Weise, V. K. y Patrick, R. W.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 125, 241, 1959.
- McKay, E. M.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 43, 51, 1931.
- McKay, E. M. y McKay, L. L.; J. Pharmacol., 35, 67, 1929.
- McKinney, W. T. Jr., Prang, A. J. Jr., Maychowicz, E. y Schelesinger, K.; Dis Nerv. Syst., 32, 308, 1971.
- Miller, J. W., George, R., Elliott, H. W., Sung, C. Y. y Way, E. L.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 114, 43, 1955.
- Moore, K. E., Wright, P. F. y Bert, J. K.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 155, 506, 1967.
- Motta, M., Mangili, G. y Martini, L.; Endocrinology, 77, 392, 1965.
- Mountanari, R. y Stockham, M. A.; Br. J. Pharmacol., 18, 337, 1962.
- Nagatsu, T., Levitt, M. y Udenfriend, S.; J. Biol. Chem., 239, 2910, 1964.

- Nakao, T., Hiraga, K., Inaba, M. y Urata, Y.; En Steroid Dynamics, Pincus, G., Nakao, T. y Tait, J. F. (Eds.), Academic Press, New York, (1966) pg. 179.
- Nasmyth, P. A.; Br. J. Pharmacol., 2, 95, 1954.
- Neal, M. J.; J. Pharm. Pharmacol., 20, 950, 1968.
- Neff, N. H. y Costa, E.; Life Sci., 5, 951, 1966.
- Nikodijevik, O. y Maickel, R. P.; Biochem. Pharmacol., 16, 2137, 1967.
- Nybäck, H.; Acta Pharmacol., 30, 372, 1971.
- Ohler, E. A. y Sevy, R. W.; Endocrinology, 59, 347, 1956.
- Paalzow, L. y Paalzow, G.; Acta Pharmacol. et Toxicol., 30, 104, 1971.
- Papeschi, R., Theiss, P. y Herz, A.; Eur. J. Pharmacol., 34, 253, 1975.
- Paroli, E. y Melchiorri, P.; Biochem. Pharmacol., 5, 1, 1960.
- Paroli, E. y Melchiorri, P.; Biochem. Pharmacol., 6, 18, 1961.
- Persson, T. y Waldeck, B.; J. Pharm. Pharmacol., 22, 473, 1970.
- Puri, K. y Lal, H.; Psychopharmacologia, 32, 113, 1973.

- Puri, K. y Lal, H.; *Psychopharmacologia*, 35, 237, 1974.
- Reis, J. D., Hess, P. y Azmitia, E. C.; *Brain Res.*, 20, 309, 1970.
- Rivas, C. y Borrell, S.; *J. Endocr.*, 51, 283, 1971.
- Sachs, C.; *Acta Physiol. Scand.*; Supl. 341, 3, 1970.
- Satoh, M. y Takagi, H.; *Eur. J. Pharmacol.*, 14, 150, 1970.
- Scapagnini, U. y Preziosi, P.; *Prog. Brain Res.*, 39, 171, 1973.
- Scapagnini, U., Anunziato, L., Lombardi, G., Oliver, C. y Preziosi, P.; *Neuroendocrinology*, 18, 272, 1975.
- Scapagnini, U., Van Loon, G. R., Moberg, G. P. y Ganong, W. F.; *Eur. J. Pharmacol.*, 11, 266, 1970.
- Scapagnini, U., Van Loon, G. R., Moberg, G. P., Preziosi, P. y Ganong, W. F.; *Neuroendocrinology*, 10, 155, 1972.
- Schwartz, A. S. y Eidelberg, E.; *Life Sci.*, 9, 613, 1970.
- Selye, H.; *Nature*, 138, 32, 1936.
- Shellenberger, M. K. y Gordon, J. H.; *Anal. Biochem.*, 49, 356, 1971.
- Shiomi, H. y Takagi, H.; *Br. J. Pharmacol.*, 52, 519, 1974.

- Shore, P. A. y Olin, J. S.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 122, 295, 1958.
- Simon, M., George, R. y Garcia, J.; Eur. J. Pharmacol., 34, 21, 1975a.
- Simon, M., George, R. y Garcia, J.; Eur. J. Pharmacol., 34, 27, 1975b.
- Sloan, J. W., Brooks, J. W., Eisenman, A. J. y Martin, E. R.; Psychopharmacologia, 4, 261, 1963.
- Smith, C. B., Sheldon, M. I., Bedmarczyk, J. H. y Villarreal, J. E.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 180, 547, 1972.
- Smith, C. B., Villarreal, J. E., Bedmarczyk, J. H. y Sheldon, M. I.; Science, 170, 1106, 1970.
- Snedecor, G. W.; En Statistical Methods, Ed. Ames. Iowa, State University Press, 1956.
- Spector, S., Prockop, D., Shore, P. P. y Brodie, B. B.; Science, 127, 704, 1958.
- Spector, S., Sjoerdsma, A. y Udenfriend, S.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 147, 86, 1965.
- Sugrue, M. F.; Br. J. Pharmacol., 52, 159, 1974.
- Sung, C. Y., Way, E. L. y Scott, K. G.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 107, 12, 1953.

- Takagi, H. y Nakama, M.; Jap. J. Pharmacol., 16, 483, 1966.
- Tanabe, T. y Cafruny, E. J.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 122, 148, 1958.
- Theiss, P., Papeschi, R. y Herz, A.; Eur. J. Pharmacol., 34, 263, 1975.
- Thornburg, J. E. y Moore, K. E.; Arch. Intern. Pharmacodyn., 194, 158, 1971.
- Tulunay, F. C., Yano, I. y Takemori, A. E.; Eur. J. Pharmacol., 35, 285, 1976.
- Udenfriend, S. y Zaltzman-Nirenberg, P.; Science, 142, 394, 1963.
- Udenfriend, S., Cooper, J. R., Clark, C. T. y Baer, J. E.; Science, 117, 663, 1953.
- Van Loon, G. R., Hilger, L., King, A. B., Boryezka, A. T. y Ganong, W. F.; Endocrinology, 88, 1404, 1971a.
- Van Loon, G. R., Scapagnini, U., Moberg, G. P. y Ganong, W. F.; Endocrinology, 89, 1464, 1971b.
- Vedernikov, Y. P. y Africanov, I. I.; J. Pharm. Pharmacol., 21, 845, 1969.
- Vogt, M.; J. Physiol., 123, 451, 1954.

- Way, E. L.; Fed. Proc., 31, 113, 1972.
- Way, E. L., Iwamoto, E. T., Khanna, S., Ho, I. K., Shen, F. y Loh, H. H.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 199, 400, 1976.
- Way, E. L., Loh, H. H. y Shen, F. H.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 167, 1, 1969.
- Wei, E.; Br. J. Pharmacol., 47, 693, 1973.
- West, G. B.; Quart. Rev. Biol., 30, 116, 1955.
- Westerman, E. O., Maickel, R. P. y Brodie, B. B.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 138, 208, 1962.
- Winter, C. A. y Flataker, L.; J. Pharmacol., 103, 93, 1951.
- Wurtman, R. J. y Axelrod, J.; Science, 150, 1464, 1965.
- Wurtman, R. J. y Axelrod, J.; J. Biol. Chem.; 241, 2301, 1966.
- Zimmerman, E. y Pang, C. N.; Proc. West Pharmacol. Soc., 18, 279, 1975.